



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA  
DEL LITORAL**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA**

**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y POTENCIAL AGRONÓMICO DE UN  
BIOFERTILIZANTE FERMENTADO ANAERÓBICAMENTE PARA  
INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE FRÉJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)  
BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO.**

**Trabajo de Titulación Previo a la Obtención del Título de Magister en  
Investigación en Biotecnología Agrícola**

Presentado por:

Ronald Eduardo León Aroca

Guayaquil – Ecuador

2018

## AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) por el financiamiento de este proyecto y por la dirección del mismo.

A la Doctora Daynet Sosa Del Castillo., directora del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), al Doctor Eduardo Chávez Navarrete, al Doctor Omar Ruíz Barzola y, al Doctor Christian Romero Bonifaz docentes de la Facultad Ciencias de la Vida (FCV), por el apoyo brindado durante el período académico y elaboración de mi tesis.

## DEDICATORIA

A Dios por guiarme en el camino correcto y llenarme de bendiciones.

A mis Padres Gloria Aroca de León, Ramón León Banchón, y Hermana Malena León Aroca, por el amor permanente que me han brindado y que han estado presentes en el recorrer del camino de mi vida.

A mi Esposa, Tamara Delgado C., a mis hijos Sebastián y Renatta León Delgado, por su apoyo, paciencia, cariño, y sobre todo por el amor y cariño que me brindaron durante todo este recorrido.

## TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

[Julie Nieto Wigby, Ph. D.]  
DECANO O DELEGADO

[Eduardo Chávez Navarrete, Ph. D.]  
DIRECTOR DE PROYECTO DE TITULACIÓN

[Christian Romero Bonifaz, Ph. D.]  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL 1

[Efrén Santos Ordoñez, Ph. D.]  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL 2

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral.

Ronald Eduardo León Aroca

## GLOSARIO

**Biofertilizante.** Producto que contienen macro y micro nutrientes esenciales para el crecimiento y producción de las plantas.

**Inoculante biológico.** Es un producto a base de microorganismos: hongos y/o bacterias, que, aplicados a la siembra de la semilla, facilitan el crecimiento vegetal y aumentan o mantienen su rendimiento, con una dosis reducida o sin fertilizante.

**Microorganismos.** Conjunto de seres vivos que se caracterizan por tener un tamaño microscópico de modo que la mayoría de ellos no son visibles sin un microscopio, son muy complejos en su estructura y organización.

***Rhizobium* sp.** Es un género de bacterias Gram-negativas del suelo que fijan nitrógeno atmosférico. Pertenece a un grupo de bacterias fijadoras de nitrógeno que se denominan colectivamente rizobio.

**Bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPR).** Bacterias que colonizan las raíces y promueven el crecimiento de las plantas.

**Sistemática.** Es un área de la biología encargada de clasificar a las especies a partir de su historia evolutiva (filogenia). Se ocupa de la diversidad biológica en un plano descriptivo y en uno interpretativo.

## ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS .....	ii
DEDICATORIA .....	iii
TRIBUNAL DE GRADUACIÓN .....	iv
DECLARACIÓN EXPRESA .....	v
GLOSARIO .....	vi
ÍNDICE GENERAL .....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
INDICE DE TABLAS .....	xi
ÍNDICE DE ECUACIONES .....	xii
ABREVIATURAS .....	xiii
RESUMEN .....	xii
CAPÍTULO 1 .....	2
1.    Introducción y objetivos .....	2
1.1    Antecedentes y justificación .....	3
1.2    Objetivo general .....	5
1.3    Objetivos específicos .....	5
1.4    Marco Teórico .....	5
1.4.1    los biofertilizantes (BFs) .....	5
1.4.1.1    Beneficios y limitaciones de la fertilización orgánica: .....	6
1.4.1.2    Clasificación de los BFs .....	7
1.4.1.3    Aplicaciones de los bioles, conservación y parámetros de calidad .....	9
1.4.2    Relación de los BFs con las fitohormonas vegetales. Caso: ácido abscísico y el ácido jasmónico .....	10
1.4.3    Relación de los biofertilizantes (BFs) con la respuesta fisiológica de las plantas al estrés hídrico. ....	11
1.4.4 <i>Phaseolus vulgaris</i> L. como cultivo modelo para ensayos de fertilización orgánica bajo condiciones de estrés hídrico. ....	11
CAPÍTULO 2 .....	13
2.    Metodología .....	14
2.1    Evaluación del efecto de la temperatura, color de envases y tiempo de almacenamiento sobre parámetros físico-químicos relacionados con la calidad del producto .....	14
2.1.1    Diseño experimental y análisis de datos .....	15
2.2    Evaluación de la inocuidad del biofertilizante y su efecto fungicida sobre <i>Moniliophthora roreri</i> en condiciones de laboratorio. ....	17
2.2.1    Diseño experimental y análisis de datos .....	19
2.3    Evaluación del potencial agronómico beneficioso de la aplicación del biofertilizante, sobre plántulas de fréjol sometidas a estrés hídrico en condiciones de invernadero, mediante la evaluación de parámetros agronómicos. ....	20
2.3.1    Preparación del inóculo, siembra y mantenimiento de plántulas en vivero. ....	20
2.3.1.1    Diseño experimental y análisis de datos .....	22

CAPÍTULO 3 .....	24
3. Resultados y Discusión .....	25
3.1 Evaluación sistemática, el efecto de la temperatura, color de los envases y tiempo de almacenamiento sobre parámetros físico-químicos relacionados al proceso de fermentación y relacionados con la calidad del producto.....	25
3.2 Evaluación de la inocuidad del BF y su efecto fungicida sobre <i>Monilophthora royeri</i> en condiciones de laboratorio.....	28
3.3 Comprobar el potencial agronómico beneficioso de la aplicación del biofertilizante, sobre plántulas de fréjol sometidas a estrés hídrico en condiciones de invernadero, mediante la evaluación de parámetros agronómicos.....	31
CONCLUSIONES.....	41
RECOMENDACIONES .....	42
REFERENCIAS.....	43
ANEXOS .....	52



## ÍNDICE DE FIGURAS

*Página*

<b>FIGURA 1.</b> A) SEPARACIÓN DE LAS FASES SÓLIDAS Y LÍQUIDAS DEL BF. B) ENVASADO DEL BF EN BOTELLAS PET (T-28).....	15
<b>FIGURA 2.</b> A) ENVASES CON EL BF EN TEMPERATURA AMBIENTE (27°C). B) TOMA DE MUESTRA DEL BF (50 mL) CON UNA JERINGUILLA. C) TOMA DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS CON EL MULTIPARÁMETRO.....	17
<b>FIGURA 3.</b> A) INOCULACIÓN DE MEDIO ESPECIFICO EN PLACAS COMPACT DRY PARA LA IDENTIFICACIÓN DE <i>SALMONELLA</i> SP. B) TUBOS CON MEDIO SELECTIVO PARA EL DIAGNÓSTICO DE COLIFORMES TOTALES.....	18
<b>FIGURA 4.</b> A) DISCOS DE <i>M. RORERI</i> A12.1 (AMAZONÍA) DE 3 MM DE DIÁMETRO. B) CAJAS PETRI SEÑALADAS Y DISPENSADAS CON MEDIO PDA ENVENENADO CON EL BFs....	18
<b>FIGURA 5.</b> A) ESPECTROFOTÓMETRO GENESYS5 QUE MUESTRA LA CONCENTRACIÓN AJUSTADA DEL INÓCULO BACTERIANO. B) PLÁNTULAS DE FRÉJOL INOCULADAS Y SIN INOCULAR. ....	21
<b>FIGURA 6.</b> A) INDICACIÓN DE LA PUNTA DE RAÍZ PRIMARIA Y SECUNDARIA CON AYUDA DE UN PIN DE DISECCIÓN B) SELECCIÓN DE NÓDULOS PRESENTES EN LAS RAÍCES. .	22
<b>FIGURA 7.</b> PARÁMETROS FÍSICOS-QUÍMICOS EVALUADOS DURANTE UN PERÍODO DE TIEMPO DE NUEVES MESES, LAS FLECHAS DE COLOR VERDE REPRESENTA EL MES MÁXIMO DE ALMACENAMIENTO DEL BF DE ACUERDO CON LA PRUEBA DE TUKEY PARA DIFERENCIAR LAS MEDIAS DE LOS TRATAMIENTOS CON UN $\alpha=0.05$ .....	27
<b>FIGURA 8.</b> A) COLOR AZÚL DE LAS PLACAS INDICAN AUSENCIA DE <i>SALMONELLA</i> SP. B) LA NO PRESENCIA DE BURBUJAS EN EL MEDIO INDICA AUSENCIA DE COLIFORMES FECALIS ( <i>E.COLI.</i> ) .....	28
<b>FIGURA 9.</b> PICR DE <i>M. RORERI</i> . DURANTE 15 DÍAS DE EVALUACIÓN CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL BF, PROVENIENTES DE DISTINTOS AMBIENTES Y DE DIFERENTES ENVASES. LETRAS DISTINTAS DIFIEREN ESTADÍSTICAMENTE ( $P<0.05$ ). 29	29
<b>FIGURA 10.</b> PICR DE <i>M. RORERI</i> . DURANTE 15 DÍAS DE EVALUACIÓN CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL BF, PROVENIENTES DE DISTINTOS AMBIENTES Y DE DIFERENTES ENVASES. MEDIAS CON LETRAS DISTINTAS DIFIEREN ESTADÍSTICAMENTE ( $P<0.05$ ).....	30
<b>FIGURA 11.</b> PORCENTAJE DE HUMEDAD EN SUSTRATO ARENA CON DIFERENTES FRECUENCIAS DE RIEGO (24, 48, 72 Y 96 H) DURANTE SIETE SEMANAS DE EVALUACIÓN. ....	31
<b>FIGURA 12.</b> PROMEDIO DE ALTURA DE LA PLANTA E INTERACCIÓN FRECUENCIA DE RIEGO * DOSIS DE BF, LAS PLANTAS FUERON EVALUADAS DURANTE SIETE SEMANAS. LETRAS DISTINTAS DIFIEREN ESTADÍSTICAMENTE ( $P<0.05$ ).....	34
<b>FIGURA 13.</b> EVALUACIÓN DE PARÁMETROS AGRONÓMICOS NÚMERO DE NÓDULOS Y PESO DE RAÍZ EN PLÁNTULAS DE FRÉJOL IRRIGADAS CON DOS TIPOS DE DOSIS 5% BF+95% AGUA Y 100% AGUA. ....	37

- FIGURA 14.** NÚMERO DE NÓDULOS Y PESO DE RAÍZ EN PLÁNTULAS DE FRÉJOL  
INOCULADAS CON LAS CEPAS *R. LEGUMINOSARUM*, *R. PHASEOLI* Y SIN *RHIZOBIUM SP.*  
IRRIGADAS CON DOS TIPOS DE DOSIS 5% BF+95% AGUA Y 100% AGUA. .... 38
- FIGURA 15.** NÚMERO DE NÓDULOS Y PESO DE RAÍZ EN PLÁNTULAS DE FRÉJOL  
INOCULADAS CON LAS CEPAS *R. LEGUMINOSARUM*, *R. PHASEOLI* Y SIN *RHIZOBIUM SP.*  
IRRIGADAS EN CUATRO DISTINTAS FRECUENCIAS DE RIEGO 24, 48, 72 Y 96 HORAS... 39

## INDICE DE TABLAS

<b>TABLA I.</b> PARÁMETROS FÍSICOS-QUÍMICOS ESTANDARIZADOS DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN ANAERÓBICA. (OBTENIDO DE CHÁVEZ, E., & PERALTA, E. 2016)....	3
<b>TABLA II.</b> CLASIFICACIÓN DE LOS BIOFERTILIZANTES .....	8
<b>TABLA III.</b> COMBINACIÓN DE FACTORES Y NIVELES PROBADOS EN ESTA INVESTIGACIÓN. ....	16
<b>TABLA IV.</b> PROMEDIO DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS CON LA INTERACCIÓN AMBIENTES * COLOR DE ENVASE .....	25
<b>TABLA V.</b> MEJORES CONDICIONES PARA MANTENER LAS CARACTERÍSTICAS DEL BF SEGÚN LOS PARÁMETROS FÍSICOS-QUÍMICOS. ....	26
<b>TABLA VI.</b> MEDIAS DE PICR DE <i>M. RORERI</i> EN LA INTERACCIÓN (AMBIENTES * ENVASE) .....	30
<b>TABLA VII.</b> ANÁLISIS QUÍMICO DE LA CONCENTRACIÓN DE MACRO Y MICRONUTRIENTES DEL NUTRABIOL.....	32
<b>TABLA VIII.</b> CONTENIDO DE MACRONUTRIENTES (%) ENTRE DIFERENTES PRODUCTOS QUE EXISTE EN EL MERCADO ECUATORIANO, BIOLES DEL PERÍODO 2014-2017 Y NUTRABIOL .....	33
<b>TABLA X.</b> MEDIAS DE LA INTERACCIÓN (CEPAS * DOSIS) DEL PARÁMETRO AGRONÓMICO GROSOR DEL TALLO.....	35
<b>TABLA XI.</b> MEDIAS DE LA INTERACCIÓN (CEPAS * FRECUENCIA DE RIEGO) DE LOS PARÁMETROS AGRONÓMICOS PROMEDIO DE CLOROFILA Y GROSOR DEL TALLO .....	35

## ÍNDICE DE ECUACIONES

<b>ECUACIÓN 1.</b> MODELO MATEMÁTICO $3^k$ ( $k=2$ ).....	15
<b>ECUACIÓN 2.</b> MODELO MATEMÁTICO $3^k+C$ ( $k=3$ ).....	19
<b>ECUACIÓN 3.</b> PORCENTAJE DE HUMEDAD DEL SUELO.....	21
<b>ECUACIÓN 4.</b> MODELO MATEMÁTICO BIFACTORIAL.....	22

## ABREVIATURAS

**AGROCALIDAD:** Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario

**ANOVA:** Análisis de Varianza

**ATA:** Ámbar Temperatura Ambiente

**ATC:** Ámbar Temperatura Cuarto Frío

**ATI:** Ámbar Temperatura Invernadero

**BF:** Biofertilizante

**BTA:** Blanco Temperatura Ambiente

**BTC:** Blanco Temperatura Cuarto Frío

**BTI:** Blanco Temperatura Invernadero

**CaCl:** Cloruro de Calcio

**CaO:** Óxido de Calcio

**Cu:** Cobre

**DCA:** Diseño Completamente Aleatorizado

**Fe:** Hierro

**FeCl<sub>3</sub>:** Cloruro de Hierro

**HMA:** Microorganismos Arbusculares

**HPLC:** Cromatografía Líquida de Alta Resolución

**INIAP:** Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias

**K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:** Fosfato Dipotásico

**K<sub>2</sub>O:** Óxido de Potasio

**MANOVA:** Análisis de Varianza Multivariado

**MgO:** Óxido de Magnesio

**MgSO<sub>4</sub>:** Sulfato de Magnesio

**Mn:** Manganeseo

**N:** Sodio

**NaCl:** Cloruro de Sodio

**O. D.:** Densidad óptica.

**P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:** Óxido de Fósforo

**PDA:** Papa Dextrosa Agar

**PET:** Tereftalato de Polietileno

**PGPR:** Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de la Planta

**pH:** potencial de Hidrógeno

**PICR:** Porcentaje de Inhibición del crecimiento radial

**PSM:** Microorganismos Solubilizadores de Fósforo

**RPM:** Revoluciones Por Minuto

**SSB:** Bacterias Solubilizadoras de Silicato

**TTA:** Transparente Temperatura Ambiente

**TTC:** Transparente Temperatura Cuarto Frío

**TTI:** Transparente Temperatura Invernadero

**Zn:** Zinc

## RESUMEN

Los biofertilizantes (BFs) son productos que contienen macro y micro nutrientes esenciales para el crecimiento y producción de las plantas, comprenden una gama de microorganismos que, al ser inoculados en el suelo o planta, promueven el crecimiento y confieren resistencia a ciertas enfermedades. La biotecnología ha sido fundamental para la transformación de desechos agroindustriales en productos con valor agregado, como los BFs, cuya transformación se da por digestión anaeróbica. Los procesos fermentativos han sido estandarizados mediante la evaluación de parámetros fisicoquímicos como: pH, conductividad eléctrica, sólidos totales disponibles y salinidad. El objetivo de esta investigación es evaluar la calidad y el potencial agronómico de un biofertilizante (NUTRABIOL) fermentado anaeróbicamente en la producción de fréjol bajo condiciones de invernadero. Para cumplir este objetivo se establecieron tres bioensayos: i) Evaluación del efecto de la temperatura, color de envases y tiempo de almacenamiento sobre parámetros fisicoquímicos relacionados al proceso de fermentación y relacionados con la calidad o vida útil del producto, se utilizó un diseño 3K (K=2), donde se consideraron dos factores y tres niveles: color de los envases (transparente, ámbar y blanco) y condiciones de almacenamiento (9°C, 27°C y 32°C). ii) evaluación de la inocuidad del biofertilizante y su efecto fungicida sobre *Moniliophthora roreri* en condiciones de laboratorio, se utilizó un diseño 3k+C (k=3) donde se consideraron 3 factores: color de envases, condiciones de almacenamiento y concentración (3%, 5% y 7%) más control, estas combinaciones fueron arregladas espacialmente en un diseño de bloques con 3 repeticiones. iii) Evaluación del potencial agronómico del biofertilizante, aplicado sobre plántulas de fréjol sometidas a estrés hídrico en condiciones de invernadero, en este ensayo se evaluaron parámetros agronómicos y se utilizó un diseño factorial, donde se consideraron 3 factores: Cepas (*R. Leguminosarum*, *R. phaseoli*), dosis de riego (5% BF+95% agua y 100% agua) y frecuencia de riego (24, 48, 72 y 96 h). En cada uno de los análisis se usó el análisis de varianza (ANOVA) para establecer las diferencias significativas en el modelo, donde existieron diferencias, se empleó el test de comparaciones múltiples de Tukey para diferenciar las medias entre los tratamientos. Para todas las pruebas estadísticas se utilizó un  $\alpha=0.05$  y fueron realizadas con el software estadístico InfoStat versión estudiantil 2008 (Grupo InfoStat). Las condiciones idóneas para conservar las propiedades físico-químicas deseadas del BF es a temperatura de 32°C en color de envase transparente y que el tiempo máximo de almacenamiento no debe superar los seis meses. El BF no posee microorganismos patógenos como: *Salmonella* sp., *E. coli* y *Listeria* sp. Así mismo, se demostró que, el BF de un mes de almacenamiento, a una temperatura de 9°C, con una concentración 7% y a un pH de 6.0, el porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *M. roreri* es de apenas 40%, un 18% y 30% más que las concentraciones de 3 y 1% respectivamente. Se evidenció que los parámetros agronómicos de las plantas de fréjol (*Phaseolus vulgaris*) que fueron inoculadas con la cepa *R. phaseoli* y *R. leguminosarum* y no inoculadas que fueron irrigadas con el BF promovió una mayor cantidad de nódulos, 16%, 11% y 7%, y las raíces presentaron mayor peso, 31%, 24% y 21% que las plantas que fueron regadas solo con agua. Las plantas de fréjol que fueron irrigadas con una periodicidad de 24 h e inoculadas con la cepa *R. phaseoli* mostraron una mayor cantidad de nódulos en 73%, 120% y 265%, comparadas con las plantas que

fueron irrigadas en 48, 72 y 96 h respectivamente. Así mismo, existió un incremento en peso de raíz, las que fueron regadas a las 24 h e inoculadas con la cepa *R. phaseoli* presentaron 37%, 122% y 187% mayor peso de raíz comparadas con las que fueron regadas a las 48, 72 y 96 horas correspondientemente.

# CAPÍTULO 1



## 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los biofertilizantes (BFs) son productos que contienen macro y micro nutrientes esenciales para el crecimiento y producción de las plantas, existiendo diferentes tipos como los abonos, el compost así como aquellos que incluyen inoculantes microbianos los cuales contienen células vivas o latentes, metabolitos excretados de una amplia gama de microorganismos que, al ser aplicados al suelo o la planta, aumentan el número de microorganismos y aceleran ciertos procesos microbianos con el fin de ofrecer una mayor disponibilidad de nutrientes y agua para la planta [1, 2, 3].

Los BFs son ampliamente utilizados en la agricultura moderna, y entre los beneficios más importantes se pueden identificar los siguientes: mejoran la fertilidad del suelo, conservan la humedad, mejoran la descomposición de la materia orgánica, retienen metales pesados, producen ácidos orgánicos y nutrientes para las plantas, ayudan la defensa de las plantas ante patógenos y protegen contra otros tipos de estrés abióticos [4]; contribuyendo por ende, al aumento de la producción manteniendo el respeto al medio ambiente.

El avance de la tecnología, específicamente la biotecnología, ha sido fundamental para la transformación de desechos agroindustriales en productos con valor agregado, como son los BFs. Esta transformación se da por digestión aeróbica o anaeróbica. En esta transformación intervienen cuatro tipos de procesos biológicos-químicos elementales en los procesos de la digestión anaerobia como son: 1. Hidrólisis, 2. Acidogénesis, 3. Acetogénesis y 4. Metanogénesis [5]. El proceso de elaboración de BFs se lleva a cabo mediante digestión anaeróbica donde más de una cepa en combinación con ciertos aditivos protegen las células durante el período de almacenamiento [6].

Existen diferentes tipos de BFs, los cuales se clasifican de acuerdo con la función a la que están orientados: fijadores de nitrógeno, solubilizadores y captadores de minerales, fósforo principalmente, promotores del crecimiento, descomponedores de materia orgánica y controladores de enfermedades [7].

El Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), a través de los años, ha estudiado y desarrollado metodologías para la elaboración de BFs (conocidos como bioles) con características nutricionales, este es obtenido del proceso de fermentación anaeróbica de estiércol de ganado vacuno, rocas minerales, microorganismos eficientes locales y melaza por un tiempo de 4 meses [8], la calidad del BF es determinada mediante la evaluación sistemática de los parámetros fisicoquímicos como: pH, conductividad eléctrica (CE), sólidos totales disponibles (STD) y salinidad, lo que aseguran la obtención de un producto final estable e inocuo con efectos estimulantes en los cultivos [8].

**Tabla I.** Parámetros físicos-químicos estandarizados durante el proceso de fermentación anaeróbica. (Obtenido de Chávez, E., & Peralta, E. 2016).

<b>Parámetro</b>	<b>Máximo</b>	<b>Mínimo</b>
<b>Conductividad eléctrica (mS/cm)</b>	20,70	17,90
<b>Sólidos totales (ppm)</b>	10,29	8,83
<b>Salinidad (psu)</b>	12,40	10,54
<b>pH</b>	4,13	3,69

Los BFs han sido utilizados de manera tradicional en agricultura, sin embargo, todavía se siguen utilizando como acompañantes de la fertilización química, a pesar de que su uso y resultados han demostrado que pueden reemplazar la aplicación de fertilizantes minerales [9]. Aun así, existen varias limitaciones para incrementar la producción de estos insumos para satisfacer la demanda existente y potencial. Por ejemplo, conocer las condiciones idóneas de almacenamiento para conservar las características de este producto. Esta característica es fundamental para una producción y distribución masiva de estos productos. Es necesario identificar el tipo de envase adecuado y las condiciones de temperatura que mantengan las características de un producto recién envasado y el tiempo en percha [10].

Una limitante de los BFs es su corto ciclo de vida ya que poseen células vivas, metabolitos, y bioproductos fácilmente degradables. Otro reto radica en su aplicación ya que dependerá del conocimiento de los requerimientos nutricionales de los cultivos y las condiciones ambientales donde se apliquen, así como de su interacción con otros microorganismos autóctonos [9]. Por otro lado, estos BFs son sometidos a distintas evaluaciones por los organismos estatales de control o regulación de insumos agrícolas, con el fin de avalar, registrarlos, y que su comercialización sea segura en el mercado, que los productores sientan confianza en estos productos y puedan usarlo en diversos cultivos.

## 1.1 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

El sistema de agricultura convencional es fuertemente dependiente de fertilizantes inorgánicos y pesticidas, su uso inadecuado impacta negativamente el ambiente y la salud pública debido a la contaminación del suelo, agua y aire [11].

Sin embargo, el aporte de los fertilizantes químicos al proceso productivo es componente clave para el pleno desarrollo y la potencialización de la actividad agraria y el boom de la revolución verde lo demuestra. Diversos estudios científicos han reportado procesos degradantes de los suelos agrícolas en la era posterior a la revolución verde [12]. Estos estudios reportan cambios negativos en las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los suelos, esto como consecuencia de la aplicación excesiva e inadecuada de fertilizantes minerales. Hasta el momento, estos fertilizantes constituyen la principal fuente de nutrientes para la mayoría de los cultivos comerciales [12].

Un informe de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), emitido en el 2015, menciona que el uso mundial de los fertilizantes (el nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K)) debe incrementarse paulatinamente en los próximos años debido a la necesidad de aumentar el rendimiento de los cultivos, particularmente en los países en vías de desarrollo [13]. Para el caso del N, se prevé un aumento anual de un 1.4%, por su parte el uso de P (en su forma de  $P_2O_5$ ) se incrementará en un 2.2% y en el caso del K (en su forma  $K_2O$ ) en un 2.6% [13].

Ante los serios problemas que pueden traer el uso indiscriminado de los fertilizantes convencionales, es el uso de fuentes orgánicas, como es el caso de los BFs, juegan cada vez un papel más importante y se destacan porque ayudan al mantenimiento y disponibilidad de nutrientes en la rizósfera, pudiendo ser aplicados a través de las semillas, en el agua de riego o directamente al suelo [14], constituyéndose en una alternativa amigable con el ambiente, en muchos casos de bajo costo para medianos y pequeños productores [14].

Según estadísticas de la Federación Internacional de Movimientos de Agricultura Orgánica (IFOAM), actualmente hay 172 países donde se práctica la producción orgánica —de los 198 países que existen en el mundo—, donde Ecuador tiene un papel dinámico. La agricultura orgánica es cada vez más extensiva y de mayores necesidades de insumos en el sector agrícola ecuatoriano. Los datos mencionados por la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (AGROCALIDAD) indican que la producción orgánica se práctica en 23 de las 24 provincias del país. Además, hasta marzo de 2017 se contaron con 36.246 hectáreas y 11.529 productores orgánicos registrados [15]

En los últimos 10 años, la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) a través del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), ha trabajado en la estandarización de una metodología para la elaboración de BFs de fermentación anaeróbica (conocido como biol) [8]. Este tema forma parte de las principales líneas de investigación del CIBE. Con este trabajo de investigación se busca profundizar en el conocimiento del área de técnicas agrícolas abordando la problemática del uso del NUTRABIOL (nombre comercial del biol estandarizado por CIBE-ESPOL) y sus implicaciones en la producción de cultivos de interés agrícola del país.

Siguiendo la tendencia mundial en el uso de los BFs, el NUTRABIOL ha sido aplicado en diversos proyectos relacionado con cacao, nacional o CCN-51 en campo a nivel de fincas de pequeños y medianos productores. Con la aplicación del NUTRABIOL existió un aumento de la producción entre el 40-70% y hubo un incremento del 40% en los ingresos de los productores (datos por publicar).

La presente investigación plantea evaluar la calidad y el potencial agronómico del BF-NUTRABIOL, la inocuidad del producto, su actividad fungicida y su efecto fertilizante sobre plántulas de fréjol sometidas a estrés hídrico en condiciones de invernadero.

En Ecuador existe poca o nula información de BFs disponibles al público. En la actualidad se han identificado nueve empresas productoras, distribuidoras o comercializadora de insumos orgánicos denominados como biol (BFs), solo tres de estas empresas se encuentran registrados en AGROCALIDAD [16].

## 1.2 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la calidad, las condiciones de almacenamiento y el potencial agronómico del biofertilizante líquido NUTRABIOL fermentado anaeróbicamente bajo condiciones controladas.

## 1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos de esta investigación fueron:

- Monitorear sistemáticamente el efecto de la temperatura, color de envases y tiempo de almacenamiento sobre parámetros físico-químicos relacionados con la calidad del producto para las recomendaciones de almacenamiento adecuadas.
- Evaluar la inocuidad del biofertilizante y su efecto fungicida sobre *Moniliophthora roreri* en condiciones de laboratorio para determinar la ausencia de microorganismos patógenos y el potencial antifúngico del BF.
- Analizar el potencial agronómico de la aplicación del biofertilizante sobre plántulas de fréjol sometidas a estrés hídrico en condiciones de invernadero, mediante la evaluación de parámetros agronómicos.

## 1.4 MARCO TEÓRICO

### 1.4.1 Los biofertilizantes (BFs)

En la transformación de la materia orgánica se liberan desechos orgánicos de sales y toxinas, dando como resultado un material "estabilizado" de uso agrícola. Al remojar bolsas de varios tipos de materia orgánica con agua se crea un líquido rico en nutrientes beneficiosos, compuestos orgánicos y microbios que se encuentran en estos materiales. El líquido obtenido se puede aplicar en los sistemas de fertirrigación, como una maceración en el suelo o como un aerosol foliar, constituyendo en sí la base de la biofertilización [17].

Según Vairo dos Santos (1992), el término BF refiere al efluente pastoso resultante de la fermentación de la materia orgánica de origen vegetal y animal, en un medio líquido, por un determinado tiempo, en presencia o ausencia de oxígeno, en una cámara denominada biodigestor. Como resultado de este proceso se obtiene un sistema de dos fases: una sólida usada como abono orgánico y otra líquida utilizada como fertilizante foliar y que además ayuda en el control de enfermedades y plagas [18].

Al referirse a los BFs, la literatura cita que son productos biológicamente activos o inoculantes microbianos de bacterias, algas y hongos (por separado o

en combinación), que pueden ayudar a la fijación del nitrógeno biológico en beneficio de las plantas [19].

Otros autores se refieren a los BF's como las sustancias que contienen microbios vivos, que cuando se aplican a semillas, plantas o suelo promueven el crecimiento mediante el suministro de nutrientes esenciales como N, P y otros nutrientes minerales [20].

US Legal define a los BF's como productos que se pueden usar para proteger a los cultivos y que promueven el crecimiento de las plantas al aumentar el suministro de nutrientes primarios a las mismas [21].

Los BF's ayudan a acelerar los procesos microbianos en el suelo, aumentando la dinámica de los nutrientes y su óptima asimilación por las plantas [22]. A pesar de los beneficios reportados, los BF's aún no son ampliamente utilizados en la agricultura. Por consiguiente, es importante llevar a cabo más proyectos de investigación que permitan determinar los procesos mediante los cuales los BF's benefician a los cultivos [23].

El uso de los BF's es sugerido en la gestión integrada de nutrientes, ya que son económicos, incluyen el reciclaje de residuos orgánicos, son fáciles de aplicar, entre otras ventajas [24]. Es necesario mencionar que los BF's no solo influyen en el proceso de la nutrición vegetal, estos también brindan vigor, resistencia sistémica ante diversas plagas y enfermedades e intervienen en la liberación de proteínas de resistencia y en la activación de la inmunidad inducida [25].

Existen factores ambientales y agronómicos que pueden afectar la efectividad de los BF's, dentro de estos se incluyen: las precipitaciones, el aumento o la disminución de la humedad relativa, la temperatura del aire y del suelo, el pH del suelo, BF de poca calidad, entre otros, los que pueden disminuir rápidamente la calidad de estos compuestos. También el uso de fertilizantes convencionales inhibe o disminuye la efectividad de los BF's [26].

#### **1.4.1.1 Beneficios y limitaciones de la fertilización orgánica:**

Según Carvajal y Carmona (2012), los biofertilizantes presentan los siguientes ventajas y desventajas [27]:

Ventajas:

- Los fertilizantes biológicos pueden movilizar nutrientes que favorecen el desarrollo de actividades biológicas en los suelos.
- El mantenimiento de la salud de las plantas mejora al agregar nutrientes balanceados.
- Se proporciona suministro de alimentos y se impulsa el crecimiento de microorganismos y gusanos del suelo beneficiosos.
- Como resultado de la buena estructura proporcionada al suelo, se promueve el crecimiento de la raíz.
- El contenido de materia orgánica en el suelo aumenta como consecuencia de una aplicación prolongada.

- Promueve el desarrollo de asociaciones de micorrizas, lo que aumenta la disponibilidad de fósforo (P) en el suelo.
- Ayuda a eliminar las enfermedades plantares y proporciona un suministro continuo de micronutrientes al suelo.
- Contribuir al mantenimiento de concentraciones estables de nitrógeno (N) y fósforo (P).
- Mejoras en la capacidad de intercambio de nutrientes en el suelo.

#### Desventajas

- Los productos de compost tienen concentraciones de nutrientes muy variables. Además, los costos de implementación son más altos que los de ciertos fertilizantes químicos.
- La aplicación extensiva y a largo plazo puede dar como resultado la acumulación de sales, nutriente y metales pesados que podrían causar efectos adversos en el crecimiento de las plantas, el desarrollo de organismos del suelo, la calidad del agua y la salud humana.
- Se requieren grandes volúmenes para la aplicación de la tierra debido a los bajos contenidos de nutrientes, en comparación con los fertilizantes químicos.
- Los macronutrientes principales pueden no estar disponibles en cantidades suficientes para el crecimiento y desarrollo de las plantas.
- Pueden existir deficiencias nutricionales causadas por la baja transferencia de micro y macro nutrientes.

#### 1.4.1.2 Clasificación de los BFs

Los BFs pueden clasificarse en dependencia de la fuente de nutrimentos, el grado de procesamiento, y su estado físico sólido o líquido [28], diferenciándose entre ellos en base a los microorganismos empleados, los procesos de obtención, aplicación, envasado, comercialización [29].

**Tabla II.** Clasificación de los biofertilizantes

Fuente de nutrientes	Grado de procesamiento	Sólido	Líquidos
Materia orgánica	Sin procesar	<i>Residuos vegetales:</i> Residuos de cosecha Residuos de poda Residuos de postcosecha  <i>Residuos de animales:</i> Estiércoles frescos Residuos de mataderos y otros  <i>Coberturas:</i> Abonos verdes y mulch	Efluentes:  Pulpa de café Desechos de origen animal- Otros residuos líquidos
	Procesados	Compost Lombricompostos Bocashi Ácidos húmicos	Biofermentados Té de compost Ácidos húmicos Té de estiércol Extractos de algas

Actualmente los BFs más utilizados en la agricultura son:

- Inoculantes microbianos: que presentan poblaciones microbianas variadas, donde su alto contenido de nutrientes les permite reaccionar con la materia orgánica del suelo y así producir sustancias que son benéficas para las plantas. Se debe tener en cuenta que en los mecanismos involucrados en el crecimiento y desarrollo vegetal generalmente existe especificidad en la interacción entre la planta hospedera y la cepa microbiana implicada [30].
- El compost: ha sido a lo largo de la historia un producto utilizado en la agricultura, cuyo objetivo es obtener un producto final estable con contenido de nutrientes disponibles, donde la acción de microorganismos como hongos y bacterias permite la obtención de ácidos húmicos y fúlvicos, que favorecen la absorción de nutrientes y la humedad en suelos. Los factores más importantes en el proceso de compostaje son: el contenido de agua (50 a 60% de humedad), pH (6.5 a 8), y las etapas termofílicas [31].

- Los abonos orgánicos sólidos provienen de excretas de animales, de seres humanos, de residuos de alimentos, excedentes vegetales de las plantas cultivadas u otra fuente orgánica; los abonos orgánicos pueden implementarse en áreas donde se realizan cultivos intensivos lo que favorece la mejora en la estructura del suelo [32].
- Los biofertilizantes líquidos, generalmente llamados “bioles”, son de los abonos más fácil de utilizar porque alimenta directamente a las plantas, en muchos casos se aplican al follaje y pueden ser incluidos en el agua de riego. Esta forma de biofertilización líquida también es aplicada al suelo, lo que ayuda al reciclaje y disolución de los macro y micro nutrientes, evita también la acumulación o concentración de sales y crea un medio ideal para la multiplicación de otros microorganismos benéficos e impide el desarrollo de agentes patógenos, con lo cual se reduce el riesgo de enfermedades [33].

#### 1.4.1.3 Aplicaciones de los bioles, conservación y parámetros de calidad

Actualmente, una gama de formulaciones de BFs comerciales están basados bajo estrategias que garantizan el máximo de viabilidad de los microorganismos utilizados en tales formulaciones; los materiales utilizados pueden tener un papel en el mantenimiento de la viabilidad (capacidad de acción) de los microorganismos antes del lanzamiento en el campo, así como también proporcionan un adecuado microambiente para un crecimiento rápido de los organismos en su liberación [34].

La combinación del incremento de la temperatura del proceso y el tiempo de inactivación de los patógeno, ocurren de forma simultánea donde se tienen en cuenta otros parámetros como el pH y la concentración de  $\text{NH}_3$  dentro del digestor aspectos que influyen en la localización final del BF. Por esta razón, es importante optimizar y monitorear de cerca el proceso de digestión anaeróbica y los parámetros del proceso [35].

La composición final de los BFs puede verse afectada por los siguientes factores: tiempo y temperatura de almacenamiento, características de la matriz polimérica, tasa de crecimiento bacteriano, tasa de degradación del compuesto activo, variaciones en la concentración de los compuestos utilizados, contaminación en los ensayos de laboratorio, entre otros [36].

Estos factores inciden además en el proceso de la fermentación, por lo que se necesita la implementación de técnicas analíticas que permitan estandarizar el proceso de producción y almacenamiento para obtener un BF de alta calidad [36].

Los BFs contienen compuestos producidos a partir de fermentaciones microbianas. Estos compuestos actúan como promotores del crecimiento en las plantas y se comenzaron a utilizar como una alternativa sustentable a los fertilizantes químicos con el fin de disminuir la contaminación ambiental y alcanzar una agricultura sustentable [37].



Varias investigaciones han reportado resultados positivos en cultivos donde se han aplicado biofertilizantes de forma continua. Estas investigaciones se han desarrollado en países como: Argentina, Paraguay, Brasil, Uruguay, Cuba, entre otros, donde los BFs componen la base de la producción de leguminosas [38, 39, 40]. Uno de los ejemplos es la producción de soya (*Glycine max*), que presenta una alta acumulación de proteínas en su semilla, en más de 300 ensayos realizados en Argentina, inoculando la soya con cepas de BFs altamente eficientes, se reportó una respuesta positiva que permitió incrementar la producción en un 62% [26].

En Ecuador, los BFs han sido empleados en el cultivo del plátano (*Musa* sp.). En investigaciones previas, se analizó el efecto directo de los biofertilizantes líquidos en la formación de colonias y en el crecimiento del micelio de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, en condiciones de laboratorio. El efecto de cuatro diferentes tipos de BFs sobre *M. fijiensis* fueron evaluados en condiciones de laboratorio en medios de cultivo sólidos y líquidos. El estudio reveló que los biofertilizantes presentes en concentraciones al 30% y 70% en medios de cultivo, tanto sólidos como líquidos, inhibían totalmente el desarrollo de conidias y micelio de *M. fijiensis*, mientras que los biofertilizantes presentes en concentraciones al 10% inhibían parcialmente el desarrollo del hongo [41].

La mayoría de los BFs distribuidos comercialmente en el país se encuentran en presentaciones líquidas y sólidas, como es el caso de los inoculantes bacterianos [42]. Aun cuando estos productos tienen una viabilidad que puede verse afectada por el tiempo y condiciones de almacenamiento, estos son usados ampliamente en cultivos extensivos como banano, ayudando a la disminución de los costos de producción y a la mitigación de los impactos ambientales que provocan el uso de fertilizantes de origen químico [42].

#### **1.4.2 Relación de los BFs con las fitohormonas vegetales. Caso: ácido abscísico y el ácido jasmónico**

Durante el proceso de elaboración de los BFs se producen fitohormonas como: auxinas, ácido abscísico, ácido jasmónico, giberelinas, citoquininas, entre otras, las cuales van a estimular el crecimiento y desarrollo de las plantas. Estos biocompuestos catalizan rutas metabólicas y fisiológicas de las plantas, generando un impacto positivo sobre la sanidad de los cultivos y resistencia a diversos estreses [43].

El ácido jasmónico es un regulador del crecimiento vegetal endógeno, el mismo que es sintetizado de forma natural por las plantas, está muy relacionado con una respuesta defensiva contra insectos y patógenos, que involucra a metabolitos secundarios como son: los alcaloides, flavonoides, compuestos volátiles, glucosinolatos, y proteínas de función defensiva como 9- y 13-lipooxigenasas lo que contribuye a amplificar la respuesta, debido a una rápida acumulación de esta molécula [44].

El ácido jasmónico está bien relacionado con el ácido abscísico ya que no solo participa en la inhibición de la germinación en varias especies, este posee un

efecto sinérgico regulador de las diferentes respuestas a estrés, que incluye la defensa de la planta frente a patógenos [45]. Como se ha descrito anteriormente, el uso de BF's contribuye al control de enfermedades en las plantas, también está asociado con el crecimiento y desarrollo de los vegetales, razones que su uso consecutivo tendría el potencial de controlar plagas y enfermedades de forma biológica [45].

En las plantas, la producción de ácido abscísico aumenta cuando coinciden factores como la falta de humedad del suelo y la presencia de altas temperaturas del ambiente, por lo que se explica que esta hormona está involucrada en las vías bioquímicas esenciales para la sobrevivencia de las plantas ante el estrés hídrico; la aplicación de BF's que promueven la producción de ácido abscísico podrían incidir en el fortalecimiento de los vegetales que al estimular las rutas metabólicas les confieren mayor tolerancia al estrés por calor o déficit hídrico [43].

#### **1.4.3 Relación de los biofertilizantes (BFs) con la respuesta fisiológica de las plantas al estrés hídrico.**

Las plantas, al ser expuestas a un déficit de humedad (estrés hídrico), activan mecanismos bioquímicos que las ayudan a contrarrestar este estrés. Dentro de los mecanismos descritos con mayor frecuencia se encuentra la acumulación de osmolitos (Los osmolitos orgánicos son pequeños solutos usados por células de numerosos organismos y tejidos con estrés hídrico para mantener un volumen celular) [46]. Varios autores han reportado el efecto negativo de la sequía sobre el crecimiento de los vegetales, donde los componentes del rendimiento son relacionados a la humedad del suelo con la nutrición, por ello el uso de BF's se considera una alternativa que podría disminuir el estrés hídrico, favoreciendo el crecimiento y desarrollo de las plantas [47,48,49].

Con el uso de BF's se ha observado también una reducción en la tensión fisiológica provocada por los microorganismos patógenos en la raíz y estos contribuyen a una mayor tolerancia de los cultivos ante el estrés hídrico, como es el caso de los ácidos abscísico y jasmónico. Estos compuestos son sintetizados como respuesta al estrés hídrico [50].

El uso de BF's en la agricultura es de suma importancia, los aportes de nutrientes logran una producción sostenible, que incluye aspectos económicos y ambientales, siendo estratégico dentro de los sistemas de producción agrícola, donde la elaboración de bioinsumos constituyen una alternativa en la producción orgánica y ecológica. Para ello es necesario elevar el número de investigaciones científicas sobre la incorporación y el uso adecuado de BF's ante las condiciones de estrés de los cultivos de importancia económica [51].

#### **1.4.4 *Phaseolus vulgaris* L. como cultivo modelo para ensayos de fertilización orgánica bajo condiciones de estrés hídrico.**

El cultivo de frejol es de gran importancia para la seguridad alimentaria en el mundo, principalmente por su alto valor proteico. Adicionalmente, contiene

carbohidratos, minerales esenciales (fósforo, zinc, hierro, potasio y magnesio) y vitaminas del complejo B (como tiamina, riboflavina, niacina y ácido fólico; en conjunto tienen la cualidad de ayudar a proveer energía), [52].

Actualmente la producción mundial de fréjol tiende al alza, impulsada por un aumento en la superficie cultivada y en los rendimientos por unidad de superficie. Siete países concentran el 63% de la producción mundial de esta leguminosa: India, Myanmar, Brasil, Estados Unidos, México, China y Tanzania [53]. Durante el período 2012-2013, este cultivo ocupó el tercer lugar en producción y solo fue superado por el maíz y la soya [54].

México es considerado como el lugar de origen del fréjol, la variabilidad de estas plantas tiene como base la diversidad genética, generada y preservada por culturas precolombinas, por lo que hoy se aprecia una gran variación en formas, tamaños y colores de semilla en las regiones donde se cultiva el fréjol. [55].

Dentro de Latinoamérica, especialmente en Colombia, el cultivo de fréjol es importante dentro de la economía campesina. Sin embargo, hoy la producción no es capaz de satisfacer la demanda existente, razón que hace necesario realizar importaciones de este producto para el consumo nacional [56].

Ecuador es un país donde se destacan los cultivos de leguminosas dentro de los principales componentes en los sistemas de producción agrícola, especialmente en la región Sierra; el fréjol es apetecido por la mayoría de la población y se siembra como monocultivo o en asociaciones con otros cultivos [57].

En Ecuador, este importante cultivo es afectado por factores externos que limitan la producción, dentro de ellos podemos mencionar la presencia de plantas indeseables que no solo perturba el rendimiento, sino que también incrementan los costos de producción [58].

Según los resultados reportados por diversos autores, el fréjol es un cultivo susceptible al exceso o falta de humedad durante su etapa de crecimiento y desarrollo; en la actualidad el 60% de la producción mundial de este cultivo es obtenido bajo condiciones de déficit hídrico. Estos factores han llevado a considerar a la sequía como un factor limitante para obtener altos rendimientos [59].

## CAPÍTULO 2

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA, COLOR DE ENVASES Y TIEMPO DE ALMACENAMIENTO SOBRE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS RELACIONADOS CON LA CALIDAD DEL PRODUCTO.

Existen condiciones adecuadas para conservar un producto de origen orgánico sin que este pierda su calidad y características durante su tiempo de almacenamiento. Estas condiciones ideales podrían estar relacionadas a la temperatura, color de envases y luminosidad, humedad relativa, entre otros. Es importante recalcar que el proceso de la elaboración del biofertilizante se encuentra estandarizado, sin embargo, no se ha logrado dilucidar las condiciones ideales para el almacenamiento del NUTRABIOL. En este acápite de la investigación, se probará la hipótesis que la temperatura y color del envase influyen en parámetros de calidad.

Para corroborar la hipótesis planteada se estudiaron tres tipos de ambientes: cuarto frío, ambiente, e invernadero con una temperatura promedio de  $9\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $32\pm 4^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Además, el efecto de la temperatura fue combinado con tres tipos de colores de envases: ámbar, blanco y transparente.

Este trabajo arrancó con la elaboración del BF, para lo cual se siguió una metodología estandarizada previamente [8, 60]. Los ingredientes que se usaron en la elaboración del BF fueron: estiércol de ganado vacuno, microorganismos eficientes, rocas minerales (roca fosfórica y sulfato de potasio y magnesio), ceniza de tamo de arroz, suero de leche, melaza y agua. Estos materiales fueron colocados en un biorreactor de plástico con capacidad para 600 L sellado herméticamente. La fermentación se realizó por cuatro meses con reactivaciones mensuales de microorganismos eficientes y melaza.

Durante el tiempo de fermentación se evaluaron los parámetros físico-químicos como: pH, conductividad eléctrica (CE), sólidos totales (ST), y salinidad (Sal), estos parámetros fueron medidos cada vez que el BF fue reactivado con microorganismos eficientes y melaza con un equipo multi-parámetro (Orion star A329 Thermo Scientific, USA).

Luego del período de fermentación, se procedió a separar la fase líquida de la sólida (conocido como cosecha) utilizando una malla de tela tipo toldo (Figura 1). A la fase líquida, se determinaron los parámetros físico-químicos mencionados previamente en la elaboración del BF. Se tomaron tres muestras ( $n=3$ ) utilizando envases PET (T-28) de 1 L de capacidad y fueron enviadas al laboratorio de AGROCALIDAD donde se determinó la concentración de N total, P (como  $\text{P}_2\text{O}_5$ ) y K (como  $\text{K}_2\text{O}$ ).

El BF fue envasado en 45 botellas tipo PET (T-28) de 1 L de capacidad, en un diseño  $3^k$  (detalles del diseño y tratamientos se presenta en la sección de diseños experimentales y análisis de datos). En estas botellas se evaluaron los parámetros

físico-químicos mencionados anteriormente de forma mensual durante nueve meses. Para mantener las condiciones anaeróbicas durante las mediciones, se adaptaron mangueras (< 1 mm de diámetro) en las tapas de los envases. Las muestras fueron tomadas con una jeringuilla estéril de 50 mL en cada tratamiento y colocadas en un tubo falcon para realizar las mediciones de los parámetros físico-químicos.



**Figura 1.** A) Separación de las fases sólidas y líquidas del BF. B) Envasado del BF en botellas PET (T-28).

### 2.1.1 Diseño experimental y análisis de datos

Se utilizó un diseño  $3^K$  ( $K=2$ ), donde se consideraron dos factores y tres niveles: color de los envases (transparente, ámbar y blanco) y condiciones de almacenamiento (cuarto frío, ambiente e invernadero) (Tabla III). Estas combinaciones fueron arregladas espacialmente en un diseño de bloques con 5 repeticiones para un total de 45 observaciones (en este caso, botellas). Las variables de respuesta fueron: conductividad eléctrica, sólidos totales disponibles, salinidad y pH. Parámetros que se evaluaron por 9 meses (Figura 2).

$$y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + E_{ijk}$$

**Ecuación 1.** Modelo matemático  $3^K$  ( $K=2$ )

$y$ = Conductividad eléctrica, sólidos totales disponibles, salinidad y pH

$\mu$ = Media natural sin efecto de nada

$i$ = Temperatura de ambientes ( $9 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $32 \pm 4^\circ\text{C}$ )

$j$ = Envases (transparente, ámbar y blanco)

$k$ = 1,2,3,4,5 número de observaciones por tratamiento

Debido a que los datos no cumplieron con una distribución normal, estos fueron sometidos a una transformación matemática. Se analizaron los residuos de la diferencia de los valores observados de los valores esperados. Los valores esperados fueron obtenidos de la Tabla I (máximo): pH=4.13; CE=20.7; ST=10.29 y Sal=12.4. Para el análisis de los datos se utilizó el análisis de varianza multivariado (MANOVA) donde se incluyeron las variables independientes y sus

interacciones para determinar diferencias significativas en el modelo, y en donde existieron diferencias, se usó el test de comparaciones de Hotelling para diferenciar las medias de los vectores. Además, se usó el análisis de varianza (ANOVA) para establecer las diferencias significativas en el modelo, donde existieron diferencias, se empleó el test de comparaciones múltiples de Tukey para diferenciar las medias entre los tratamientos. Para determinar las diferencias significativas en todos los análisis estadísticos se utilizó un  $\alpha=0.05$ , todas las pruebas de los análisis fueron realizadas con el software estadístico InfoStat versión estudiantil 2008 (Grupo InfoStat).

**Tabla III.** Combinación de factores y niveles probados en esta investigación.

Condiciones ambientales	Tratamientos				
Cuarto frío	**TTC 2	*BTC 2	**TTC 1	*BTC 5	***ATC 1
	**TTC 5	**TTC 3	***ATC4	***ATC 5	*BTC 4
	**TTC4	***ATC 2	*BTC 3	*BTC 1	***ATC 3
Ambiente	*BTA 5	**TTA 5	**TTA 1	***ATA 3	*BTA 1
	**TTA 3	***ATA 2	*BTA 2	**TTA 4	*BTA 3
	***ATA 5	*BTA 4	***ATA 4	***ATA 1	**TTA 2
Invernadero	**TTI 3	*BTI 4	*BTI 3	**TTI 5	***ATI 1
	**TTI 2	***ATI 3	*BTI 1	***ATI 4	***ATI 2
	*BTI 5	*BTI 2	**TTI 4	***ATI 5	**TTI 1

\* B (blanco)

\*\* T (transparente)

\*\*\* A (Ámbar)



**Figura 2.** A) Envases con el BF en temperatura ambiente (27°C). B) Toma de muestra del BF (50 mL) con una jeringuilla. C) Toma de parámetros físico-químicos con el multiparámetro.

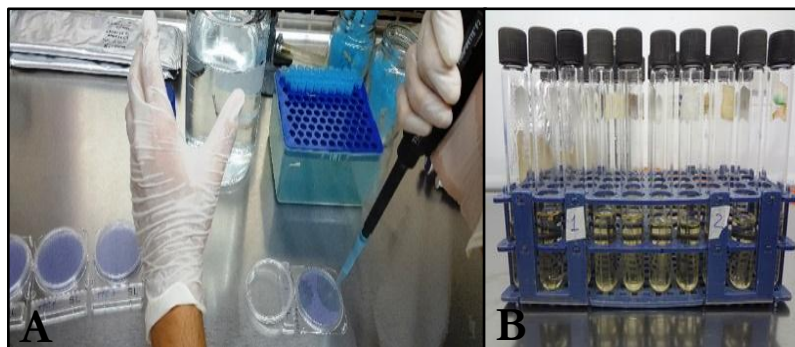
## 2.2 EVALUACIÓN DE LA INOCUIDAD DEL BIOFERTILIZANTE Y SU EFECTO FUNGICIDA SOBRE *MONILIOPHTHORA RORERI* EN CONDICIONES DE LABORATORIO.

Bacterias patógenas perjudiciales para los seres humanos como enterobacterias (*Salmonella* sp., *Escherichia coli*, etc.) y *Listeria* sp., están presentes en el estiércol de ganado vacuno, uno de los principales materiales en la elaboración de biofermentos. Un proceso de fermentación anaeróbica adecuado tiene el potencial de eliminar *Salmonella* sp., *Listeria* sp., y coliformes totales y fecales.

La presencia de *Salmonella* sp., se monitoreó mediante un kit comercial (Compact Dry SL de R-biopharm) (Figura 3), el cual determina la presencia o ausencia del microorganismo por el cambio de color del medio de azul-violeta a amarillo, causado por la alcalinización del medio en presencia de la enzima lisina-descarboxilasa, específica de *Salmonella* sp. Las muestras fueron evaluadas mensualmente durante cuatro meses.

La presencia de coliformes totales en el noveno mes de almacenamiento se determinó mediante el método estándar para la examinación de aguas residuales (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater) [61].

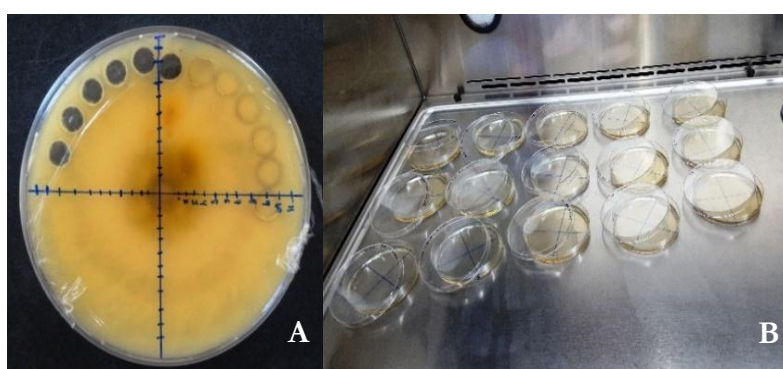




**Figura 3.** A) Inoculación de medio específico en placas compact dry para la identificación de *Salmonella* sp. B) Tubos con medio selectivo para el diagnóstico de coliformes totales.

En investigaciones preliminares, los BFs han demostrado combatir eficazmente los fitopatógenos *Moniliophthora roreri*, *Moniliophthora perniciosa*, *Mycosphaerella fijiensis* y *Fusarium oxysporum* en condiciones de laboratorio [62]. El efecto fungicida del BF se evaluó en moniliasis de cacao (*Moniliophthora roreri*). Este patógeno puede ocasionar pérdidas de hasta el 60% de la producción por infección y daño a la mazorca [62].

En cada uno de los tratamientos se tomó 10 mL del BF como sub-muestra. Este procedimiento fue realizado para todas las réplicas y las sub-muestras obtenidas fueron combinadas para obtener 50 mL de muestra final. Cada una de estas muestras fueron mezcladas con medio papa dextrosa agar (PDA) y agar en cuatro concentraciones de BF: 0%, 3%, 5% y 7% con tres réplicas. El pH de los medios fue ajustado a 6.0 utilizando KOH [63]. Los medios y sus diferentes concentraciones de BF fueron esterilizados a 121°C y 15 lb/pul<sup>2</sup> por 25 min. Dentro de una cámara de flujo laminar, se procedió a dispensar los medios esterilizados en cajas Petri; con un sacabocado de 3 mm de diámetro se sembraron las cepas de *M. roreri* en cada uno de los tratamientos (Figura 4).



**Figura 4.** A) Discos de *M. roreri* A12.1 (amazonía) de 3 mm de diámetro. B) Cajas Petri señaladas y dispensadas con medio PDA envenenado con el BFs.

### 2.2.1 Diseño experimental y análisis de datos

Se utilizó un diseño  $3^k+C$  ( $k=3$ ), donde se consideraron 3 factores: color de envases (transparente, ámbar y blanco), condiciones de almacenamiento (cuarto frío, ambiente e invernadero) y concentración (3%, 5% y 7%) más control. Las condiciones de almacenamiento están descritas en acápite 2.1.1. Estas combinaciones fueron arregladas espacialmente en un diseño de bloques con 3 repeticiones para un total de 81 observaciones. La variable de interés que se midió fue: el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de *M. roreri*. La cepa del hongo permaneció en crecimiento por 15 días, este ensayo se repitió mensualmente durante 4 meses.

$$Y_{ijklm} = \mu + A_i + B_j + C_k + (AB)_{ij} + (BC)_{ik} + (AC)_{jk} + (ABC)_{ijk} + \text{Bloque}_m + E_{ijklm}$$

**Ecuación 2.** Modelo matemático  $3^k+C$  ( $k=3$ )

$y$  = Porcentaje de inhibición de *M. roreri*.

$\mu$  = Media natural

$i$  = Envases (transparente, ámbar y blanco)

$j$  = Concentraciones (0%, 3%, 5% y 7%)

$k$  = Condiciones ambientales ( $9\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $27\pm 2^\circ\text{C}$  y  $32\pm 4^\circ\text{C}$ )

$m$  = Bloque

$l$  = 1,2,3, número de observaciones por tratamiento

$m$  = 1,2,3,4, número de evaluaciones

Para el análisis de los datos se utilizó el análisis de varianza multivariado (MANOVA) donde se incluyeron las variables independientes y sus interacciones para determinar diferencias significativas en el modelo, y en donde existieron diferencias, se usó el test de comparaciones de Hotelling para diferenciar las medias de los vectores. Además, se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para establecer las diferencias significativas en el modelo, donde existieron diferencias, se empleó el test de comparaciones múltiples de Tukey para diferenciar las medias de los tratamientos. Para determinar las diferencias significativas se utilizó un  $\alpha=0.05$ , todas las pruebas de los análisis fueron realizadas con el software estadístico descrito en el acápite 2.1.1.

## 2.3 EVALUACIÓN DEL POTENCIAL AGRONÓMICO BENEFICIOSO DE LA APLICACIÓN DEL BIOFERTILIZANTE, SOBRE PLÁNTULAS DE FRÉJOL SOMETIDAS A ESTRÉS HÍDRICO EN CONDICIONES DE INVERNADERO, MEDIANTE LA EVALUACIÓN DE PARÁMETROS AGRONÓMICOS.

### 2.3.1 Preparación del inóculo, siembra y mantenimiento de plántulas en vivero.

Las semillas de fréjol certificadas se adquirieron en el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) Santa Catalina. La variedad utilizada fue: 485 INIAP Urcuquí. Las cepas de *Rhizobium phaseoli* y *Rhizobium leguminosarum* fueron debidamente caracterizadas y obtenidas del banco de microorganismos del CIBE.

Las concentraciones del inóculo bacteriano de *R. phaseoli* y *R. leguminosarum* fueron ajustadas a una densidad óptica (O.D.<sub>540</sub>) de 0.2, utilizando un espectrofotómetro de UV visible (genesys5 336001, Thermo Spectronic, USA). Se inocularon semillas de la variedad 485 INIAP Urcuquí con cada una de las cepas. En la germinación de las semillas se utilizó papel toalla humedecida con 30 mL de agua destilada estéril. Luego de tres días, las semillas que presentaron germinación epigeal se sembraron en vasos plásticos que contenían 200 g de sustrato (100% arena). Después de aproximadamente cuatro días, se observó la germinación hipogeal. Se escogieron las plántulas más homogéneas del semillero para la siembra. Las plantas fueron sembradas en vasos que contenían 2 kg de sustrato (100% arena) Figura 5.

Para determinar la dosis adecuada del BF, se realizó un ensayo preliminar durante 15 días. El BF fue mezclado a diferentes concentraciones con agua para determinar la tolerancia de las plantas de fréjol a las mezclas. Las concentraciones que se usaron fueron: 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 y 20% (v/v) del BF en agua. Se observó que las plantas respondieron adecuadamente a una concentración de 5%, a concentraciones superiores se observaron signos de toxicidad (datos no presentados).

Para determinar la periodicidad de riego y su respectivo porcentaje de humedad se realizó un segundo estudio preliminar. Plantas germinadas de fréjol fueron sembradas en vasos con 2 kg de sustrato (100% arena), estas plantas fueron irrigadas con la mezcla del BF al 5%. Se establecieron cuatro períodos de riego los cuales fueron: 24, 48, 72 y 96 h. Antes de efectuar cada riego, se tomó una muestra de 5 g para el análisis de % de humedad (gravimétricamente). Para evaluar el % de humedad la muestra tomada se pesó en una balanza gramera digital y se registró este peso como peso húmedo. Luego, las muestras fueron secadas en una estufa a una temperatura de 105°C por 24 h. Luego de este periodo, las muestras fueron pesadas y se registró este peso como peso seco. Para obtener el porcentaje de humedad se utilizó la ecuación 3. Estos resultados son presentados en la figura 9.

En base a los estudios preliminares se establecieron las dosis y frecuencias de riego para las plántulas de fréjol que fueron inoculadas con las bacterias *R. Phaseoli* y *R. Leguminosarum*. Adicionalmente se incluyó un tratamiento sin inoculación. Estas plantas fueron regadas con 50 mL de la mezcla del BF al 5% y agua 100%. El porcentaje de humedad del suelo se obtuvo en base a la periodicidad con que se regaban las plantas.

$$\% \text{ humedad} = \frac{\text{peso húmedo} - \text{peso seco}}{\text{peso seco}}$$

### Ecuación 3. Porcentaje de humedad del suelo

Los parámetros agronómicos que se evaluaron en las plantas fueron los siguientes:

- Crecimiento de la planta: se midió con una regla desde el nudo cotiledonal hasta el meristema apical.
- El grosor del tallo: se realizó la medición en el nudo cotiledonal con un vernier digital (stainless hardened 150 mm Okpow, China).
- El contenido de clorofila: se midió con un medidor portátil SPAD (chlrophyll content meter-200 plus Opti-Science, USA).

Todas estas mediciones se las realizaron una vez por semana, durante siete semanas.

Luego de transcurrido las siete semanas, se procedió a cosechar las plántulas de fréjol, donde se evaluaron los siguientes parámetros agronómicos:

- Producción de nódulos: se cuantificó utilizando el software Root & Nodule Quantification Software, (Department of Biology-Laurier University, USA) [64] (Figura 6).
- Peso de raíces: se utilizó la balanza digital (JY 1002, USA) y se registró el peso fresco de raíces (Figura 8).



**Figura 5.** A) Espectrofotómetro Genesys5 que muestra la concentración ajustada del inóculo bacteriano. B) Plántulas de fréjol inoculadas y sin inocular.

### 2.3.1.1 Diseño experimental y análisis de datos

Para los parámetros agronómicos se utilizó un diseño factorial. Donde se consideraron 3 factores: Cepas (*R. Leguminosarum*, *R. phaseoli* y control), dosis de BF (0 o 5%) y frecuencia de riego (24, 48, 72 y 96 h). Las variables de respuesta que se midieron fueron: Crecimiento de la planta, grosor del tallo y contenido de clorofila, medidos durante siete semanas, y, peso de raíz y número de nódulos medidos una vez culminado el experimento.

$$*y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + C_k + (AB)_{ij} + (AC)_{ik} + (BC)_{jk} + (ABC)_{ijk} + E_{ijkl}$$

$$**y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + C_k + (AB)_{ij} + (AC)_{ik} + (BC)_{jk} + (ABC)_{ijk} + E_{ijkl}$$

**Ecuación 4.** Modelo matemático bifactorial

y= \*Crecimiento de planta, grosor del tallo, contenido de clorofila,

y= \*\*número de nódulos y peso de raíz

$\mu$ = Media natural sin efecto de nada

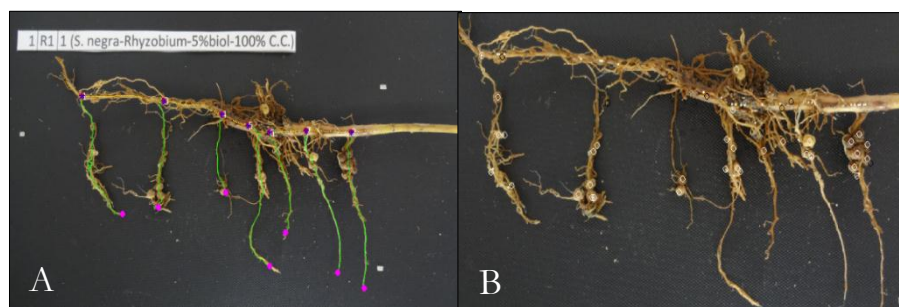
i= Cepas (*R. Leguminosarum*, *R. phaseoli* y sin *Rhizobium*)

j= Dosis (5% BF + 95% agua y 100% agua)

k= Frecuencia de riego (24, 48, 72 y 96 h)

l=Evaluaciones (\*7 semanas) (\*\* 1 sola vez)

Para el análisis de los datos se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para establecer las diferencias significativas en el modelo, donde existieron diferencias, se empleó el test de comparaciones múltiples de Tukey para diferenciar las medias de los tratamientos. Para determinar las diferencias significativas se utilizó un  $\alpha=0.05$ , todas las pruebas de los análisis fueron realizadas con el software estadístico descrito en el acápite 2.1.1.



**Figura 6.** A) Indicación de la punta de raíz primaria y secundaria con ayuda de un pin de disección B) Selección de nódulos presentes en las raíces.

## CAPÍTULO 3

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 EVALUACIÓN SISTEMÁTICA, EL EFECTO DE LA TEMPERATURA, COLOR DE LOS ENVASES Y TIEMPO DE ALMACENAMIENTO SOBRE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS RELACIONADOS AL PROCESO DE FERMENTACIÓN Y RELACIONADOS CON LA CALIDAD DEL PRODUCTO.

Se monitorearon los siguientes parámetros físico-químicos: pH, CE, y sal del NUTRABIOL en tres tipos de color de envases y en tres ambientes distintos por nueve meses. La tabla MANOVA y las tablas de los ANOVAs, correspondiente a este estudio se encuentran en el ANEXO 1 y 2, respectivamente. Utilizando el diseño factorial  $3^K$  ( $K=2$ ), se realizó un análisis incluyendo todas las variables y sus interacciones. Los factores presentaron diferencias significativas ( $P<0.05$ ). Al encontrar estas diferencias, se realizó el ANOVA con los factores color de envase y ambiente (excluyendo tiempo) por cada uno de los meses.

Con excepción de sólidos totales (ST), el análisis reflejó diferencias significativas para todas las variables evaluadas. ST es la única variable físico-química donde no se observó un efecto significativo de la interacción, sin embargo, las otras variables sí reportaron significancia estadística en la interacción.

**Tabla IV.** Promedio de parámetros físico-químicos<sup>1</sup> con la interacción

Almacenamiento	Color de Envase	CE	ST	Sal	pH
Ambiente	Ámbar	18,61 (C) <sup>2</sup>	9,11 (C)	11,05 (C)	3,56 (CD)
Ambiente	Blanco	18,78 (BC)	9,20 (BC)	11,21 (B)	3,56 (CD)
Ambiente	Transparente	18,97 (B)	9,24 (B)	11,21 (B)	3,55 (CD)
Controlada (inv)	Ámbar	19,38 (A)	9,45 (A)	11,53 (A)	3,55 (D)
Controlada (inv)	Blanco	19,26 (A)	9,43 (A)	11,54 (A)	3,57 (CD)
Controlada (inv)	Transparente	19,45 (A)	9,53 (A)	11,65 (A)	3,57 (C)
Cuarto frío	Ámbar	18,72 (C)	9,17 (BC)	10,71 (D)	3,78 (AB)
Cuarto frío	Blanco	18,66 (C)	9,14 (BC)	10,69 (D)	3,77 (B)
Cuarto frío	Transparente	18,80 (BC)	9,22 (BC)	10,75 (D)	3,81 (A)

ambientes<sup>2</sup> \* color de envase

<sup>1</sup> CE: Conductividad eléctrica (mS/cm), ST: Sólidos totales (ppm), Sal: Salinidad (psu)

<sup>2</sup> Ambiente ( $27\pm 2^\circ\text{C}$ ), Controlada (Invernadero) ( $32\pm 4^\circ\text{C}$ ), Cuarto frío ( $9\pm 1^\circ\text{C}$ ).

*Medias con las mismas letras no difieren estadísticamente  $p > 0.05$  con la prueba del test de Tukey*

En la tabla anterior se puede observar que, en ambiente controlada ( $T \approx 32 \pm 4^\circ\text{C}$ ) y con cualquier color de envase, las variables CE, ST y Sal son superiores que con las otras condiciones. Por otro lado, en un ambiente de cuarto frío ( $T \approx 9 \pm 1^\circ\text{C}$ ) y con colores de envases transparente y ámbar los valores de pH son menos ácidos en comparación con las otras condiciones de almacenamiento.

**Tabla V.** Mejores condiciones para mantener las características del BF según los parámetros físicos-químicos.

	CE	ST	Sal	pH
<b>Condiciones de almacenamiento</b>	Ambiente controlado ( $32 \pm 4^\circ\text{C}$ ) + color de envase transparente ó ámbar ó blanco			Ambiente cuarto frío ( $9 \pm 1^\circ\text{C}$ ) + color de envase transparente ó ámbar ó blanco + Transparente

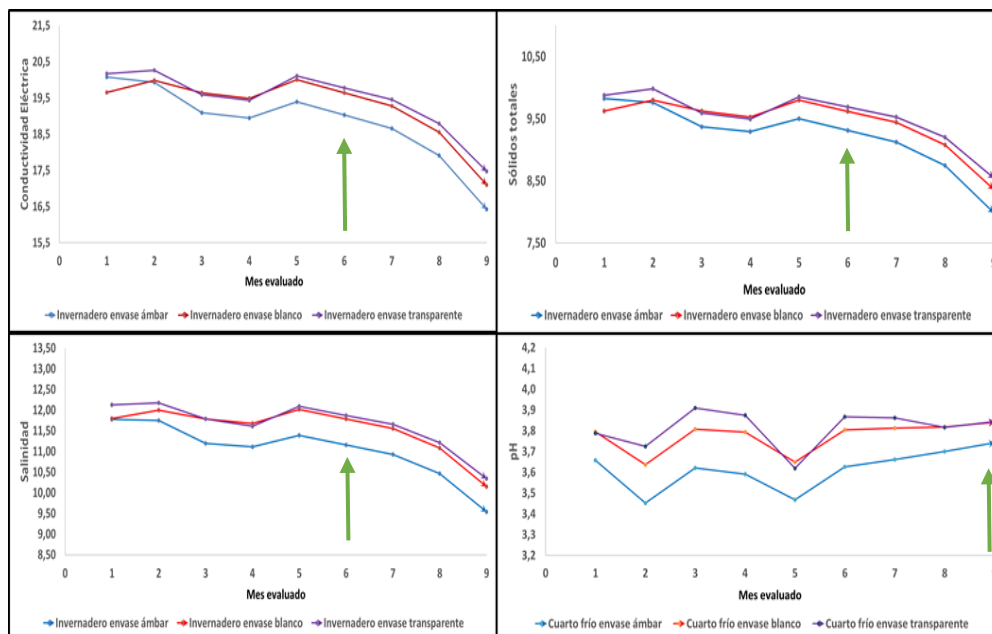
En este estudio se determinó, de forma inicial, que las condiciones de temperatura y color de envase adecuado para mantener las propiedades físico-químicas del BF son: condiciones controladas ( $T \approx 32^\circ\text{C}$ ) y color de envase transparente, seguido de ámbar y blanco, respectivamente (Tabla V). Los promedios de los parámetros físico-químicos evaluados durante nueve meses fueron: 19.45 (CE), 9.53 (ST) y 11.65 (Sal), estos valores se encuentran muy cercanos a los máximos reportados por otros autores y resumidos en la tabla I [8].

Es importante recalcar que variables como CE y Sal está relacionadas con la presencia de nutrientes como Mg, Ca, K en forma de sales. Para llegar a niveles adecuados de estos parámetros otras variables como pH, potencial redox, cinética de reducción, precipitación, formación de complejos y adsorción desempeñan un papel clave. [65]. Se puede inferir que al tener más sales presentes en una solución existiría una mayor disponibilidad de nutrientes en el BF, es imperativo realizar una investigación de la cantidad y dinámica de nutrientes en el BF en varias condiciones de almacenamiento.

Se observó que los valores del pH en la interacción (ambientes \* color de envases) tuvo un comportamiento descendente, se encuentran entre 3.60 y 3.81, menores a los valores mostrados en la Tabla I (3.69-4.13) [8]. Por lo que, si existe un problema de sensibilidad a la aplicación de un producto ácido, se recomienda incrementar el pH con hidróxido de potasio (KOH) previo a su aplicación. Sin embargo, estos resultados coinciden con lo reportado por *Ngampimol, H. (2008)* donde un BF líquido a partir de materiales vegetales almacenado durante seis meses mostró un pH entre 3.3 y 4.0, este parámetro no se vio afectado significativamente por la condición de almacenamiento (exposición a la luz solar) [66].



Para determinar el tiempo de almacenamiento del BF, se construyeron curvas con las medidas repetidas (meses) de los parámetros físico-químicos. Para cada parámetro se realizó un ANOVA entre meses consecutivos para determinar donde se observan diferencias estadísticas. Las diferencias encontradas se incluyen en el ANEXO 3.



**Figura 7.** Parámetros físico-químicos evaluados durante un período de tiempo de nueve meses, las flechas de color verde representa el mes máximo de almacenamiento del BF de acuerdo con la prueba de Tukey para diferenciar las medias de los tratamientos con un  $\alpha=0.05$ .

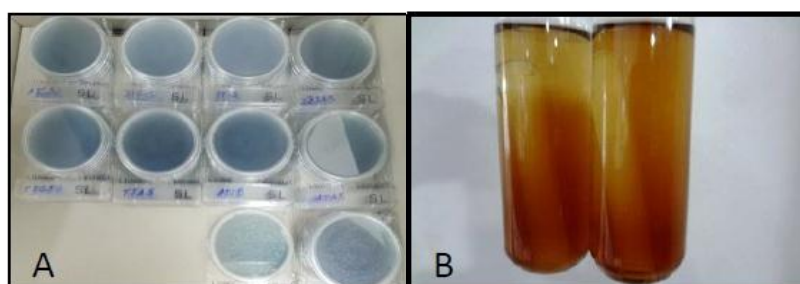
Utilizando el ANOVA y las curvas, se determinó que el tiempo de máximo de almacenamiento del BF es de seis meses, a partir de este tiempo se puede observar un descenso en los parámetros evaluados. Este tiempo de almacenamiento puede incrementarse, tentativamente, si se realizara un proceso de tamizaje presurizado para separar más eficientemente los sólidos de los líquidos y detener al máximo procesos de fermentación luego del almacenaje.

Desde el mes siete al mes nueve se puede observar un decrecimiento de los parámetros físico-químicos CE, ST y Sal (Figura 7). Este decrecimiento puede ser ocasionado por la precipitación de las sales y su deposición en el fondo de los envases. Existe muy poca bibliografía sobre el tiempo de almacenamiento de los BFs, sin embargo, (Santosh., 2015) determinó que BFs líquidos desarrollados con el 0.5% de polivinilpirrolidona (PVP), polímero soluble en agua, y 0.5% de glicerol, se lograron tiempos de almacenamiento de BFs de 180 días [67]. Ngampimol, H. (2008) reportó que la vida útil de un BF líquido depende de las características físicas como: color, olor, y aspecto de la botella [66]. (Mahdi et al., 2010) determinó que los BFs líquidos son enmiendas líquidas con formulaciones especiales que no solo contiene microorganismos deseados y nutrientes, sino también contienen protectores celulares especiales que promueve la formación de esporas para una mayor vida útil y tolerancia a condiciones adversas [65]. En este estudio no se evaluaron aspectos microbiológicos, lo cuál es muy

recomendado para futuros trabajos. Este estudio coincide con otros autores (Mahdi et al., 2010) que las características físicas como: color y el aspecto del envase más un pool de microorganismos son importantes e influyen en la vida útil del BF [65].

### 3.2 EVALUACIÓN DE LA INOCUIDAD DEL BF Y SU EFECTO FUNGICIDA SOBRE *MONILIOPHTHORA RORERI* EN CONDICIONES DE LABORATORIO.

La inocuidad del BF se confirmó por medio de la ausencia de *Salmonella* sp., evaluada mediante el kit comercial Compact Dry SL de R-biopharm. La detección fue determinada mediante colorimetría (de azul-violeta a amarillo) (Figura 8A). En ningún BF, almacenado en diferentes condiciones, se reportó la presencia de este organismo de interés en salud pública. También, se corroboró la ausencia de coliformes fecales (*E. coli*) en todos los productos al no existir presencia de burbujas en el medio líquido (Figura 8B). De la misma manera, se confirmó la ausencia de *Listeria* sp. por el método/Ref. API-5.8-04-01-00M38. (AOAC 041101) [68] (Anexo 4). Se determinó que la eficiencia del proceso de la digestión anaerobia inactiva a cepas patógenas como: *Salmonella* sp., coliformes fecales (*E. coli*) y *Listeria* sp., coincidiendo con este estudio microbiológico [69]. Estos resultados confirman que el producto es seguro para la aplicación en agricultura y la manipulación por operarios.



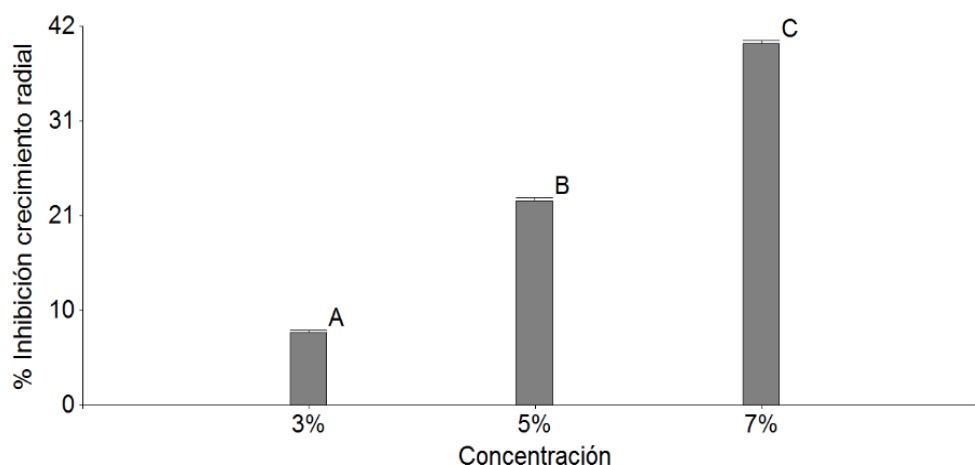
**Figura 8.** A) Color azul de las placas indican ausencia de *Salmonella* sp. B) La no presencia de burbujas en el medio indica ausencia de Coliformes fecales (*E.coli*.)

Además de las pruebas de inocuidad, se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de *M. roseri* en cuatro concentraciones de BF: 0, 3, 5 y 7 %. El BF utilizado se obtuvo de todas las combinaciones de almacenamiento durante los primeros cuatro meses. La tabla del ANOVA, correspondiente a este estudio, se encuentra en el Anexo 5. Según el diseño que se utilizó [ $3^k+C$  ( $k=3$ )], se observó en la variable PICR que en todos los factores hubo evidencia estadística que indicaron diferencia significativa entre los niveles ( $P<0.05$ ).

Se puede observar que a la concentración de 7% en promedio el PICR de *M. roseri* es de 40% (Figura 9). Otras investigaciones han reportado resultados similares, por ejemplo, Magdama F., (2010) [62] observó que los BFs, elaborados mediante fermentación anaeróbica, inhibieron el crecimiento micelial de *M. roseri* en

condiciones *in vitro* a partir del 2% de concentración, coincidiendo con resultados obtenidos por Jimenez, M. et al., (2007) quienes reportaron resultados similares en pruebas contra *M. fijiensis* [70]. También otros autores determinaron la capacidad que tienen los bioles para reducir enfermedades causadas por *Botrytis*, *Phytophthora* y *Venturia* bajo condiciones de laboratorio [71, 72 y 73]. El uso de un biofertilizante redujo el crecimiento completo de *M. fijiensis* sembrada en medio líquido bajo condiciones óptimas (pH 5, T = 25°C, agitación a 90 rpm y 0.1 F/M ratio) [74].

Por otra parte, la aplicación sistemática de BF en campo logró reducir del número de mazorcas afectadas por enfermedades fungosas en el cultivo de cacao durante dos años de evaluación. Los autores reportaron que en promedio hubo 2.24 y 5.09 menos número de mazorcas afectadas por moniliasis y escoba de bruja, respectivamente [8]. Además, la aplicación de biol en dosis al 25% (v:v), con una frecuencia de aplicación semanal en plantas infectadas por SqMV, promovió el crecimiento, favoreció la emisión foliar y redujo en un 26% la severidad de los síntomas causados por el virus del mosaico de la calabaza en plantas de melón (Alvarez R, et.al, 2007)[75]. Estos resultados coinciden con los resultados de esta tesis, mostrando que el BF, producido anaeróbicamente, tiene una gran capacidad de inhibir hongos patógenos como la monilia y escoba de bruja en cacao. Uno de los problemas es que se necesita una dosis elevada (7%) para que este efecto inhibitorio exista.



**Figura 9.** PICR de *M. roseri*. durante 15 días de evaluación con diferentes concentraciones del BF, provenientes de distintos ambientes y de diferentes envases. Letras distintas difieren estadísticamente ( $P < 0.05$ ).

Debido al efecto significativo del factor concentración, el análisis de las interacciones se lo realizó utilizando los factores: ambiente de almacenamiento y color de envases.

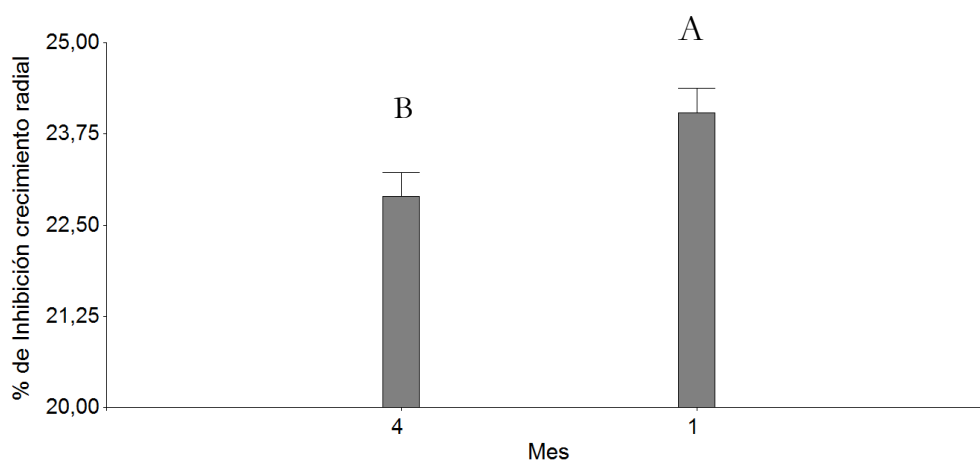
Realizando este análisis se observó que los BFs almacenados en cuarto frío (9°C) inhibió el crecimiento de *M. roseri* en comparación con los demás ambientes (Tabla VII). Se puede pensar que ciertos microorganismos que estarían presentes en el BF a una temperatura alcanzada en cuarto frío tendrían un mayor poder inhibitorio contra *M. roseri*. Este hecho deberá ser investigado en futuros trabajos. (Harish et al., 2017)

determinó que ciertos microorganismos presentes en los BFs líquidos tienen una mayor viabilidad, mejor estabilidad a altas temperaturas y una mayor actividad en el campo [74].

**Tabla VI.** Medias de PICR de *M. royeri* en la interacción (Ambientes \* Envase)

Ambientes	Color de envase	$\bar{X}$
Controlada (invernadero)	Ámbar	22,14 (A)
Controlada (invernadero)	Transparente	22,19 (A)
Controlada (invernadero)	Blanco	22,81 (A)
Ambiente	Ámbar	23,03 (ABC)
Ambiente	Transparente	23,69 (BCD)
Ambiente	Blanco	24,19 (CD)
Cuarto frío	Transparente	24,50 (D)
Cuarto frío	Blanco	24,56 (D)
Cuarto frío	Ámbar	24,61 (D)

Como existieron diferencias estadísticas entre mes 1 y mes 4 ( $P < 0.05$ ), sus observaciones se sometieron al test de comparaciones múltiples de Tukey. El efecto del tiempo es muy importante en los primeros cuatro meses de evaluación, por temas logísticos no se pudo evaluar hasta el noveno mes, sin embargo, se puede observar que la media del BF conservado durante el primer mes tiene mayor PICR sobre el patógeno en comparación al que está almacenado por 4 meses (Figura 10). Esto puede explicarse a la presencia de algún compuesto en el BF. Es necesario mencionar que este un producto natural que posee muchas variaciones y que aun el tema del efecto del BF contra patógenos no está totalmente esclarecido, hasta el momento se desconoce el compuesto que estaría presente en el primer mes y que se inhibe en el cuarto mes.

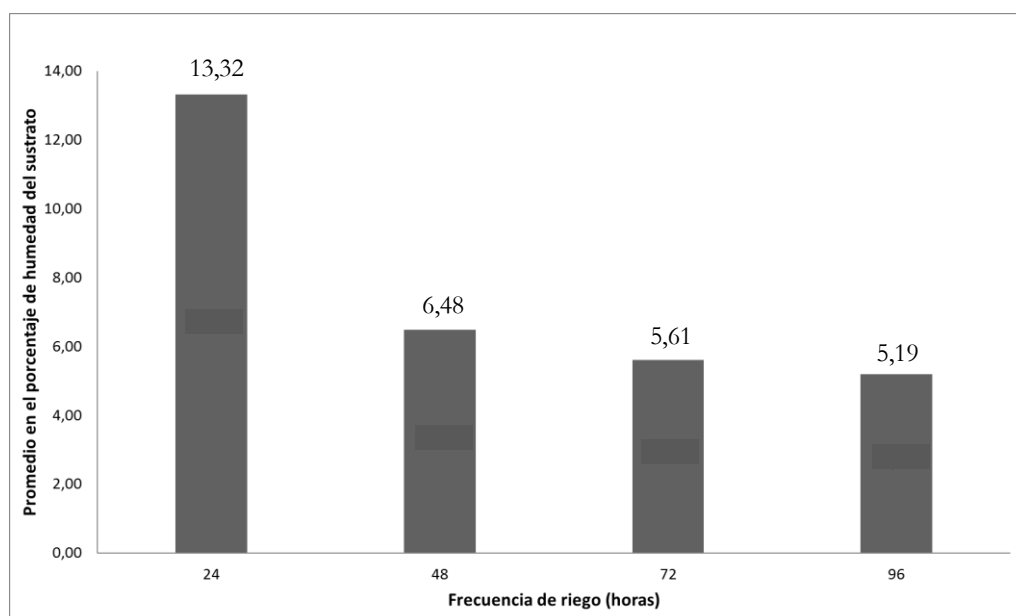


**Figura 10.** PICR de *M. royeri* durante 15 días de evaluación con diferentes concentraciones del BF, provenientes de distintos ambientes y de diferentes envases. Medias con letras distintas difieren estadísticamente ( $P < 0.05$ ).

### 3.3 COMPROBAR EL POTENCIAL AGRONÓMICO BENEFICIOSO DE LA APLICACIÓN DEL BIOFERTILIZANTE, SOBRE PLÁNTULAS DE FRÉJOL SOMETIDAS A ESTRÉS HÍDRICO EN CONDICIONES DE INVERNADERO, MEDIANTE LA EVALUACIÓN DE PARÁMETROS AGRONÓMICOS.

Dentro de los parámetros agronómicos se evaluaron altura de planta, clorofila (SPDA) y grosor del tallo en plántulas de fréjol inoculadas con las cepas de *R. leguminosarum*, *R. phaseoli* y sin inoculación (nodulación natural). Los parámetros agronómicos fueron evaluados una vez por semana durante siete semanas.

El porcentaje de humedad del sustrato con una frecuencia de 24, 48, 72 y 96h fueron, en promedio, de 13.3%, 6.48%, 5.61%, y 5.19%, respectivamente (Figura 11).



**Figura 11.** Porcentaje de humedad en sustrato arena con diferentes frecuencias de riego (24, 48, 72 y 96 h) durante siete semanas de evaluación.

La tabla de los ANOVAs, correspondiente a este estudio, se encuentran en el Anexo 9. De acuerdo con el diseño factorial, se reportó diferencia significativa en cada uno de los modelos de las variables en estudio ( $P < 0.05$ ). Se realizaron los ANOVAs a cada uno de los factores que presentaron diferencia estadística en cada uno de los niveles y para diferenciar las medias de los niveles se empleó el test de comparaciones múltiples de Tukey (Anexo 10 y 11), demostrando interacción entre los factores: cepas, frecuencia de riego y dosis de BF. Esta interacción fue significativa para todas las variables agronómicas medidas excepto en el número de nódulos y peso de raíz (Anexo 12).

El mayor promedio de clorofila se observó en la semana cuatro, a partir de la semana cinco el promedio de la clorofila fue decreciendo hasta la semana siete (última

evaluación). Existió diferencia estadística a partir de la semana cinco de evaluación con un ( $P < 0.05$ ) (Tabla VII).

(Rajasekaran. S., et., al 1989) determinó que el contenido más alto de clorofila (1,598 mg / g de peso en peso) se registraron en cultivo de arroz cultivado en suelo y tratado con *Azospirillum* y *Bacillus*. De manera similar, el contenido más bajo de clorofila (0,640 mg / g en peso) se registró en cultivos de arroz sin fertilizantes. El contenido total de clorofila es un indicativo de actividad fotosintética y metabólica [76]. (Ahuja et al., 2007) determinó que la desaparición de la clorofila en las plantas es debido a la pérdida de metabolitos esenciales [77]. (Singh et al., 1999) comprobó que la presencia o ausencia de clorofila en la planta afecta en gran medida la producción de metabolitos secundarios y otros componentes esenciales [78].

(Wu et al., 2005) determinó que la aplicación de BFs inoculados con microorganismos puede generar un aumento en el crecimiento de las plantas, en el porcentaje de germinación, respuesta benéfica a factores externos de estrés y a la protección de enfermedades en plantas de maíz (*Zea mays*) [89]. Estos resultados coinciden con otros autores ya que el BF utilizado en este estudio contiene una gran cantidad de microorganismo benéficos.

Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar el potencial agronómico beneficioso de la aplicación del biofertilizante, sobre plántulas de fréjol sometidas a estrés hídrico en condiciones de invernadero, mediante la evaluación de parámetros agronómicos.

**Tabla VII.** Análisis químico de la concentración de macro y micronutrientes del NUTRABIOL

AMBIENTES	COLOR DE ENVASE	INICIAL (DÍA 0)			FINAL (DÍA 360)			DIFERENCIA		
		%			%			%		
		NT	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O	NT	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O	NT	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O
AMBIENTE	BLANCO	0,300	0,051	0,582	0,380	0,062	0,639	0,080	0,011	0,057
AMBIENTE	TRANSPARENTE	0,300	0,051	0,582	0,390	0,062	0,638	0,090	0,011	0,056
AMBIENTE	ÁMBAR	0,300	0,051	0,582	0,380	0,062	0,638	0,080	0,011	0,056
CONTROLADA (Invernadero)	BLANCO	0,300	0,051	0,582	0,280	0,052	0,665	0,020	0,001	0,083
CONTROLADA (Invernadero)	TRANSPARENTE	0,300	0,051	0,582	0,270	0,051	0,666	0,030	0,000	0,084
CONTROLADA (Invernadero)	ÁMBAR	0,300	0,051	0,582	0,280	0,052	0,665	0,020	0,001	0,083
CUARTO FRÍO	BLANCO	0,300	0,051	0,582	0,350	0,062	0,618	0,050	0,011	0,036
CUARTO FRÍO	TRANSPARENTE	0,300	0,051	0,582	0,360	0,063	0,620	0,060	0,012	0,038
CUARTO FRÍO	ÁMBAR	0,300	0,051	0,582	0,360	0,062	0,622	0,060	0,011	0,040

En la tabla VIII se muestran los resultados de los análisis químicos de las concentraciones de los macro y micronutrientes del NUTRABIOL al día 0, a los 360 días y su diferencia, estos análisis se enviaron a analizar a los laboratorios de AGROCALIDAD. Para los análisis se utilizaron procedimientos estandarizados para cada uno de elementos: Nitrógeno total (NT) (PEE/F/01), P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (PEE/F/04) y K<sub>2</sub>O (PEE/F/011) (Anexo 13). En las muestras inicial (día 0), se puede observar que los porcentajes de NT, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y K<sub>2</sub>O no presentan diferencias, en este análisis no intervino

la temperatura de los distintos ambientes (recién envasados), sin embargo, las muestras enviadas a los 360 días de almacenamiento, los nutrientes mostraron una diferencia de +/- 0.1% en NT, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y K<sub>2</sub>O según el ambiente y color de envase.

Los envases en condiciones de ambiente controlado (32°C) presentaron las menores diferencias en las concentraciones de NT, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y K<sub>2</sub>O.

**Tabla VIII.** Contenido de macronutrientes (%) entre diferentes productos que existe en el mercado ecuatoriano, bioles del período 2014-2017 y NUTRABIOL

Fuentes	Contenido Mineral (%)		
	N total	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O
<b>Bioles 2014-2017</b>	0,308	0,093	0,563
<b>PL-480</b>	0,100	0,079	0,610
<b>BAS</b>	6,000	3,500	10,000
<b>NBC</b>	0,220	0,190	0,200
<b>BTV</b>			70,000
<b>BHP</b>	0,300	0,020	0,640

Comparando el NUTRABIOL con otros productos ofertados en el mercado -considerados BFs- encontramos una mayor concentración de NT, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y K<sub>2</sub>O en el producto BAS (6.0%, 3.5% y 10.0%, respectivamente) biol de la empresa AGRONATURALIZA S.A., frente a lo registrado en el producto NUTRABIOL 0.35%, 0.06% y 0.63%. (Estudio realizado por investigadores del CIBE, no publicado).

Los BFs contienen macro y micronutrientes, los ácidos orgánicos presentes en los BFs ayudan a disolver los nutrientes en el suelo y su disponibilidad para las plantas [80].

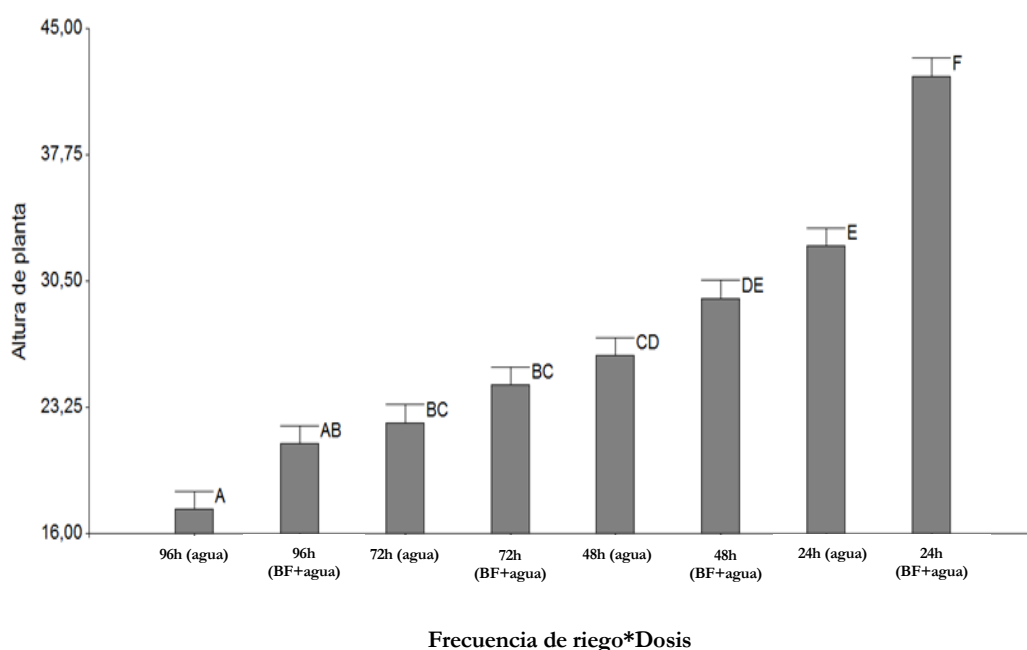
**Tabla IX.** Medias de parámetros agronómicos para el factor semanas

Semanas	Altura de planta	Promedio de clorofila	Grosor del tallo
	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
1	2,54 (A)	15,41 (D)	2,30 (A)
2	8,99 (B)	15,98 (D)	2,36 (B)
3	17,31 (C)	16,47 (D)	2,41 (C)
4	26,15 (D)	16,47 (D)	2,46 (D)
5	35,26 (E)	13,70 (C)	2,50 (E)
6	44,26 (F)	10,81 (B)	2,54 (F)
7	54,49 (G)	6,80 (A)	2,54 (F)

*Medias con las mismas letras no difieren estadísticamente  $P > 0.05$*

En esta línea, la variable altura de planta se observó interacción entre frecuencia de riego y dosis. El riego con una frecuencia de 24 h y una aplicación del BF al 5% mostró diferencias significativas ( $P<0.05$ ) en comparación con los demás tratamientos (Figura 12).

(Rajasekaran. S., et., al 1989) determinaron que en plantas de arroz (*Oryza sativa*) inoculadas con BFs presentaron mayor altura en la planta, peso y presencia de NPK en comparación con las plantas que no fueron inoculadas con el BF [76]. En otros estudios se obtuvieron resultados similares debido a la aplicación de BFs en varios cultivos, tales como lo determinó Neelamegam et al., (2007) en el frejol negro (*Vigna mungo*) [81], Kumar y Chandra., (2008) en lenteja (*Lens esculenta*) [82], Nishita y Joshi., (2010) en garbanzo (*Cicer arietinum*) [83], Singh et al., (2012) en Maíz (*Zea mays*) [84] y Sahu et al., (2014) en Guayaba (*Psidium guajava*) [85].



**Figura 12.** Promedio de altura de la planta e interacción frecuencia de riego \* Dosis de BF, las plantas fueron evaluadas durante siete semanas. Letras distintas difieren estadísticamente ( $P<0.05$ ).

Con respecto al parámetro agronómico grosor del tallo, en la interacción Cepas \* Dosis, las plantas que fueron inoculadas con la cepa *R. leguminosarum* presentan mayor grosor del tallo en las plantas, evidenciando diferencias estadísticas en las medias ( $P<0.05$ ) de los demás tratamientos (Tabla X).

En la interacción Cepas \* Frecuencia de riego de los parámetros agronómicos promedio de clorofila y grosor del tallo, la cepa *R. leguminosarum* con una frecuencia de riego de 24 horas difiere estadísticamente de los demás tratamientos (Tabla XI).



Otros autores han reportado que algunas rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) como la bacteria *Rhizobium* pueden mejorar el crecimiento y desarrollo de las plantas al interferir en la concentración de hormonas vegetales e influir en los procesos fisiológicos de la planta en concentraciones muy bajas [86]. Otros estudios determinaron que las especies de *Rhizobium* tienen un efecto positivo en el crecimiento y desarrollo del maíz (*Zea mays*) [87], como también, en el crecimiento, grosor y rendimiento del arroz [88].

**Tabla IX.** Medias de la interacción (Cepas \* Dosis) del parámetro agronómico grosor del tallo

Cepas * Dosis		Grosor del tallo
		$\bar{X}$
<i>R. leguminosarum</i>	5% BF + 95% agua	2,46 (B)
<i>R. leguminosarum</i>	100% agua	2,45 (B)
<i>R. phaseoli</i>	5% BF + 95% agua	2,44 (A)
<i>R. phaseoli</i>	100% agua	2,43 (A)
Sin <i>Rhizobium</i>	5% BF + 95% agua	2,44 (A)
Sin <i>Rhizobium</i>	100% agua	2,43 (A)

Medias con las mismas letras no difieren estadísticamente  $P > 0.05$

**Tabla XI.** Medias de la interacción (Cepas \* Frecuencia de riego) de los parámetros agronómicos promedio de clorofila y grosor del tallo

Cepas * Frecuencia de riego		Promedio de clorofila	Grosor del tallo
		$\bar{X}$	$\bar{X}$
<i>R. leguminosarum</i>	24	16,70 (G)	2,51 (G)
<i>R. phaseoli</i>	24	15,14 (EF)	2,48 (F)
Sin <i>Rhizobium</i>	24	14,96 (DEF)	2,48 (F)
<i>R. leguminosarum</i>	48	15,31 (F)	2,49 (F)
<i>R. phaseoli</i>	48	13,02 (BC)	2,43 (CD)
Sin <i>Rhizobium</i>	48	13,61 (CDE)	2,45 (E)
<i>R. leguminosarum</i>	72	13,51 (CD)	2,45 (E)
<i>R. phaseoli</i>	72	12,37 (ABC)	2,42 (BCD)
Sin <i>Rhizobium</i>	72	13,23 (BC)	2,43 (CD)
<i>R. leguminosarum</i>	96	12,79 (BC)	2,39 (A)
<i>R. phaseoli</i>	96	10,95 (A)	2,41 (AB)
Sin <i>Rhizobium</i>	96	11,95 (AB)	2,41 (AB)

Medias con las mismas letras no difieren estadísticamente  $P > 0.05$

Dentro de los organismos fijadores de N, uno de los más importantes es la especie *Rhizobium*. El tiempo de vida de estas bacterias depende de la asociación con la planta hospedera [89]. La cepa *R. leguminosarum* es conocida por su simbiosis con el fréjol, las señales reconocidas por su actividad biológica en la interacción *Rhizobium*-leguminosas son de naturaleza lipídica.

Estudios han demostrado que las especies de *Rhizobium* mejoran significativamente el crecimiento, rendimiento, contenido de N y P vegetal, las tasas bioquímicas fotosintéticas y clorofila, es debido a la interacción planta-inóculo y se le atribuye a la biosíntesis de las auxinas, que es una hormona vegetal relacionada con la regulación y periodicidad del crecimiento; funciones fisiológicas asociadas con la elongación de tallos, formación de raíces adventicias, inducción de floración, diferenciación vascular, y promoción de la dominancia apical [90].

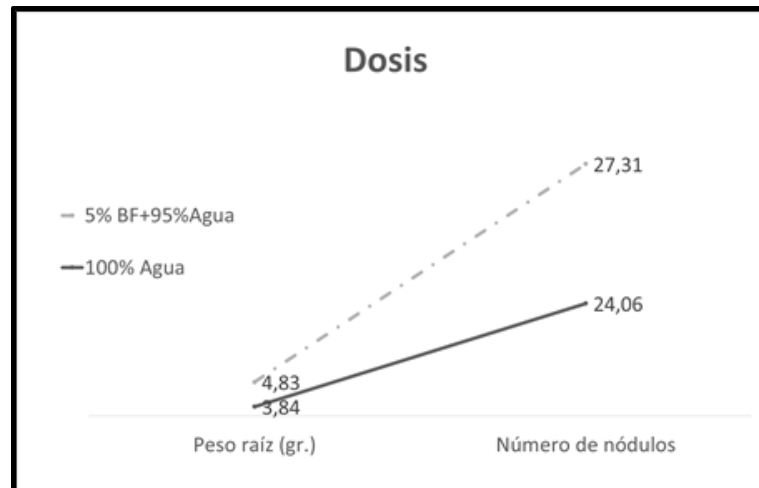
Estas plantas presentaron mejor colonización en la raíz, que resultó en una mejor arquitectura del sistema radicular, por lo tanto, influyó en el crecimiento y rendimiento del maíz [87].

Una vez cosechadas las plantas, se determinó el número de nódulos y peso de raíz. De acuerdo al ANOVA existieron diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ ) entre los factores: semanas, cepas, frecuencia de riego y dosis. (Anexo 11), así como también en el modelo de la interacción entre los factores ( $P < 0.05$ ) (Anexo 12).

Se observó que en el factor dosis las plantas que fueron irrigadas con la dosis BF al 5% durante siete semanas, el peso de la raíz fue 26% y el número de nódulos 14% mayor que el de las plantas que fueron irrigadas sin BF (Figura 13). Este estudio reveló que las plantas que fueron irrigadas con el BF mostraron mejores resultados en la cantidad de nódulos y peso en la raíz.

El BF utilizado en este estudio (NUTRABIOL) contiene microorganismos como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pichia sporocuriosa*, análisis realizados en los laboratorios del CIBE. Otros estudios similares han demostrado que al utilizar BFs líquidos a base de microorganismos con *Bacillus*, promueven el crecimiento y la supervivencia de las células en las plantas durante un período de tiempo más prolongado de hasta dos años [65]. El rendimiento, número de vainas, número de semillas por vainas y peso de semillas en el fréjol se vieron influenciados significativamente por la aplicación de BFs líquidos [91].

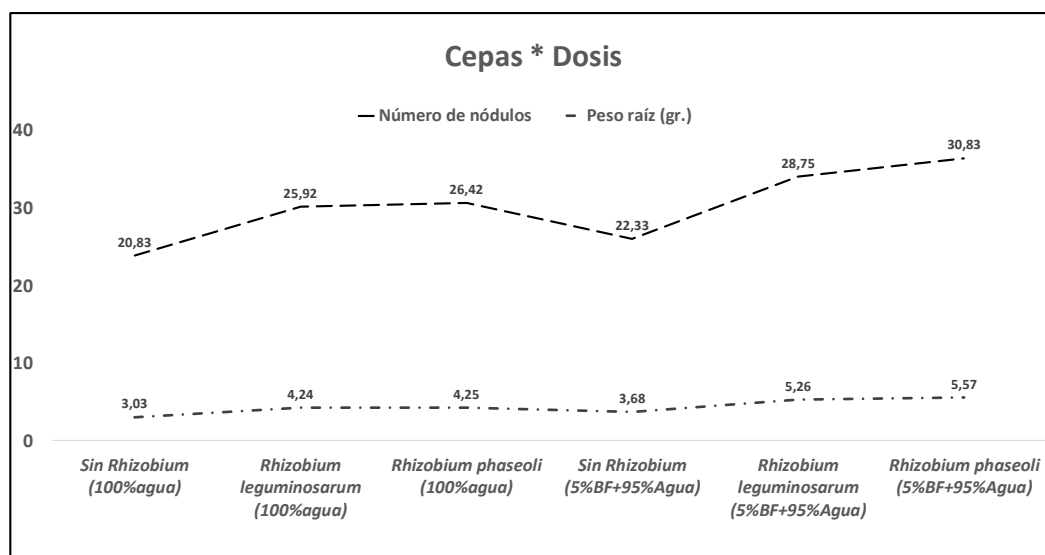
Las bacterias *Rhizobium* y *Bacillus* fueron inoculadas en semillas de trigo (*Triticum aestivum* L.). Los resultados revelaron que el número de macollas ( $370.3 \text{ m}^{-2}$ ), la longitud de la espiga (13.50 cm), el número de granos ( $46 \text{ spike}^{-1}$ ), el rendimiento del grano ( $6171 \text{ kg ha}^{-1}$ ), biomasa ( $17.00 \text{ t ha}^{-1}$ ), proteína de grano (11.84%), peso de 1000 granos (62 g) y en el rendimiento de grano mejoró hasta un 17,5% en comparación con el control [92].



**Figura 13.** Evaluación de parámetros agronómicos número de nódulos y peso de raíz en plántulas de fréjol irrigadas con dos tipos de dosis 5% BF+95% Agua y 100% Agua.

Los resultados mostraron que las plantas inoculadas con la cepa *R. phaseoli* y *R. leguminosarum* y no inoculadas que fueron irrigadas con el BF promovió una mayor cantidad de nódulos, 16%, 11% y 7% más, que las plantas que fueron regadas con agua. Adicionalmente, las raíces de las plantas inoculadas con la cepa *R. phaseoli*, *R. leguminosarum* y no inoculadas que fueron regadas con el BF presentaron mayor peso, 31%, 24% y 21% más, que las plantas que fueron irrigadas solo con agua. (Figura 14). Las cepas *R. leguminosarum* y *R. phaseoli* que se utilizaron en este estudio colonizaron las raíces de *P. vulgaris* esto expresado en un mayor número de nódulos comparado con las plantas no inoculadas. Sin embargo, tomando en cuenta el número de nódulos en raíces, *P. vulgaris* tuvo una mayor afinidad por *R. phaseoli*.

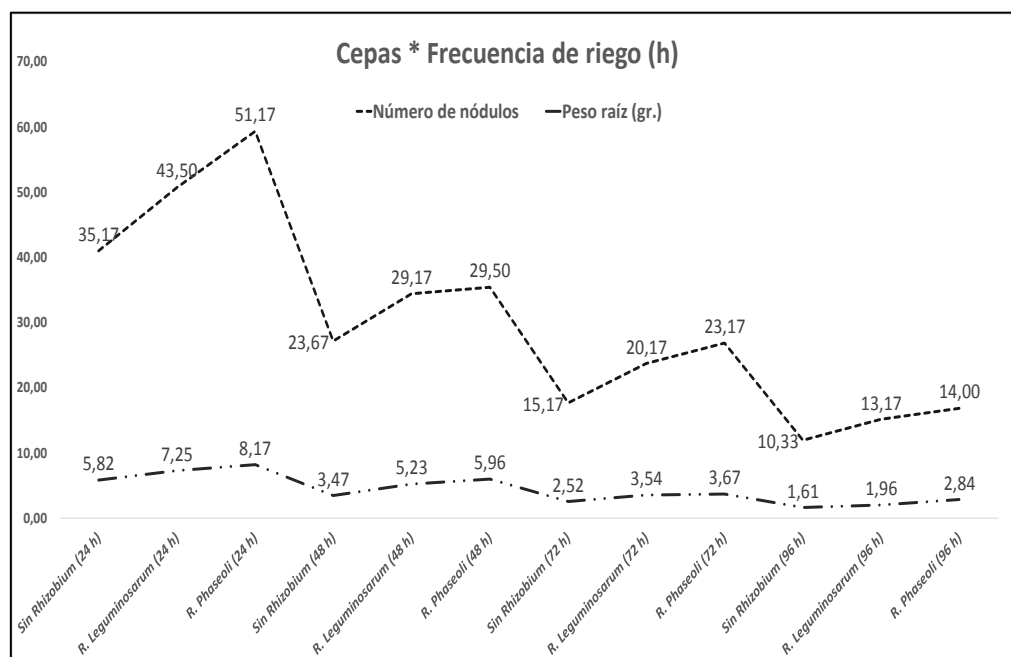
La simbiosis entre *Rhizobium*- leguminosas es efectiva cuando implica una serie de interacciones específicas. Las alteraciones en el huésped (leguminosa) o en los genomas del *Rhizobium* y el medio ambiente pueden dar como resultado en el desarrollo de nódulos ineficaces [93]. Sin embargo, existen ciertas especies de *Rhizobium* que son específicas para un grupo de plantas leguminosas, esto se ha reportado para *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *Phaseolus vulgaris*; *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *Vicia*; *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, *Trifolium*; *R. etli*, *Phaseolus vulgaris*; *R. tropici*, *Teramnus labialis*; y *R. indigoferae*, *Indigofera*, todos estos son ejemplos de especies de *Rhizobium* fijadoras de N atmosférico con huéspedes específicos [79].



**Figura 14.** Número de nódulos y peso de raíz en plántulas de fréjol inoculadas con las cepas *R. leguminosarum*, *R. phaseoli* y sin *Rhizobium sp.* irrigadas con dos tipos de dosis 5% BF+95% Agua y 100% Agua.

Las plantas de fréjol que fueron irrigadas con una periodicidad de 24 h e inoculadas con la cepa *R. phaseoli* mostraron una mayor cantidad de nódulos en 73%, 120% y 265%, comparadas con las plantas que fueron irrigadas en 48, 72 y 96 h respectivamente. Mientras tanto, las que fueron inoculadas con la cepa *R. leguminosarum* mostraron un incremento en 49%, 115%, y 186% en las frecuencias de irrigación y las plantas no inoculadas incrementaron en 48%, 131% y 240%, respectivamente.

Así mismo, existió un incremento en peso de raíz, las que fueron regadas a las 24 h e inoculadas con la cepa *R. phaseoli* presentaron 37%, 122% y 187% mayor peso de raíz comparadas con las que fueron regadas a las 48, 72 y 96 horas respectivamente. Simultáneamente, las inoculadas con *R. leguminosarum* incrementó el peso de raíz en 38%, 104%, y 269% en las frecuencias de riego y las que no fueron inoculadas mostraron un incremento en 67%, 130% y 261%, correspondientemente (Figura 15).



**Figura 15.** Número de nódulos y peso de raíz en plántulas de fréjol inoculadas con las cepas *R. leguminosarum*, *R. phaseoli* y sin *Rhizobium sp.* irrigadas en cuatro distintas frecuencias de riego 24, 48, 72 y 96 horas.

Las cepas de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* se encuentran presentes en el BF utilizado en esta investigación, son rizobacterias-bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) [74], que son competentes para la rizosfera y forman colonias en las raíces, generalmente se encuentran en tres formas, de vida libre, parasitarias y saprófitas. Estas relaciones son beneficiosas para el crecimiento de las plantas, la calidad de los cultivos y la productividad [94].

Este BF contiene microbios vivos que ayuda a mejorar la fertilidad del suelo ya sea fijando nitrógeno atmosférico, solubilizando fósforo, descomponiendo desechos orgánicos o aumentando el crecimiento de las plantas producido por hormonas de crecimiento y actividades biológicas en la que incluyen varias PGPR.

Un suministro de riego adecuado asegurará el crecimiento normal de las plantas. Si el riego se lo realiza cada 72 o 96 h las plantas detendrán su desarrollo y esto afectará a parámetros como el número de nódulos y peso de raíz. (Swaraj et al., 1995) Determinó que una de las respuestas inmediatas de los rizobios a la deficiencia de agua se refiere a los cambios morfológicos de la senescencia nodular como el cambio de color y la pérdida de turgencia en los primeros nódulos formados [95]. La modificación de las células rhizobiales por estrés hídrico eventualmente conducirá a una reducción en la infección y nodulación de las leguminosas [63, 96, 97]. Además de su efecto depresivo sobre el inicio de los nódulos, el déficit hídrico también resulta en la restricción del desarrollo y la función del nódulo [96].

La presencia de poblaciones de rizobios en suelos desérticos y la nodulación efectiva de las leguminosas que crecen allí enfatizan el hecho de que los rizobios pueden existir en suelos con niveles de humedad limitantes; sin embargo, las densidades de población tienden a ser más bajas en condiciones de sequía y aumentan a medida que

se alivia el estrés hídrico, aunque, algunos rizobios de vida libre son capaces de sobrevivir bajo estrés por sequía o bajo potencial hídrico [98].

Estudios muestran que la deficiencia de agua afecta la nodulación, la fijación de nitrógeno y la diversidad genética de los rizobios nodulantes del fréjol común (*Phaseolus vulgaris*), donde constituye el primer informe de una cepa que mejora la fijación de nitrógeno del fréjol común en condiciones de deficiencia de agua. Bajo la deficiencia de agua, la planta huésped es nodulada por los genotipos más competitivos entre las cepas tolerantes a la sequía [99].

Estudios han determinado que, la deficiencia de agua en las plantas afecta directamente a la nodulación de las leguminosas [100]. La limitación de agua en el monocultivo de trigo induce la disminución de sus raíces [79], así como también la limita el desarrollo de nódulos y su función [96, 97]. También han determinado que la nodulación y la fijación de nitrógeno en la alfalfa se puede mejorar inoculando las plantas con rizobios competitivos y tolerantes a la sequía [96], por lo tanto, se puede seleccionar cepas de rizobios con tolerancia al estrés hídrico [100].

## CONCLUSIONES

1. De acuerdo a los resultados de este estudio, las condiciones idóneas para conservar las propiedades físico-químicas deseadas del BF es a temperatura de 32°C en color de envase transparente y que el tiempo máximo de almacenamiento no debe superar los seis meses.
2. Se comprobó que, bajo todas las condiciones de almacenamiento probadas, el BF no posee microorganismos patógenos como: *Salmonella* sp., *E. coli* y *Listeria* sp. Así mismo, se demostró que, el BF de un mes de almacenamiento, a una temperatura de 9°C, con una concentración 7% y a un pH de 6.0, el porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *M. royeri* es de apenas 40%, un 18% y 30% más que las concentraciones de 3 y 1% respectivamente. A pesar de conservar sus propiedades físico-químicas durante seis meses, la capacidad antifúngica de un BF almacenado por cuatro meses decrece.
3. Se evidenció que los parámetros agronómicos de las plantas de fréjol (*Phaseolus vulgaris*) que fueron inoculadas con la cepa *R. phaseoli* que fueron irrigadas con el BF promovió una mayor cantidad de nódulos, 16% y las raíces presentaron mayor peso, 31% que las plantas que fueron regadas solo con agua.

Las plantas de fréjol que fueron irrigadas con una periodicidad de 24 h e inoculadas con la cepa *R. phaseoli* mostraron una mayor cantidad de nódulos en 73%, 120% y 265%, comparadas con las plantas que fueron irrigadas en 48, 72 y 96 h respectivamente.

Así mismo, existió un incremento en peso de raíz, las que fueron regadas a las 24 h e inoculadas con la cepa *R. phaseoli* presentaron 37%, 122% y 187% mayor peso de raíz comparadas con las que fueron regadas a las 48, 72 y 96 horas respectivamente.

## RECOMENDACIONES

- En el envasado final del BF utilizar un sistema de filtrado para asegurar la retención de partículas orgánicas. También se debería investigar el tiempo de vida útil del BF con pruebas de campo.
- Realizar nuevos ensayos en dos ambientes de temperatura 9°C y 32°C con dos colores de envases (transparente y ámbar) y más unidades de observación. Deben medirse los siguientes parámetros: temperatura, pH, contenido de humedad, aireación, agitación y conteo de células viables.
- Determinar la composición biológica de los inoculantes microbianos presentes en el biofertilizante y que metabolitos secundarios se están produciendo y su dinámica durante el periodo de almacenamiento.
- Analizar los macros y micronutrientes del biofertilizante y su efecto en el incremento de nutrientes en plantas.
- Continuar con esta investigación hasta la cosecha de fréjol y ver el efecto de la aplicación del biofertilizante sobre producción.
- Realizar evaluación de nitrificación en suelo y verificar que el número de nódulos esté acorde con la cantidad de N en suelo/planta.
- Conducir inoculaciones con las cepas *Rhizobium sp* en otros cultivos de ciclo corto de interés. Se deberían buscar métodos adicionales de extracción para poder detectar de forma simultánea ácido jasmónico y ácido abscísico en las muestras, esto ayudaría a explicar la correlación que existe entre el nivel de sequía con la sobreexpresión de estas fitohormonas.



## R E F E R E N C I A S

1. Bardi, L., and Malusà, E. (2012). Drought and nutritional stresses in plant: alleviating role of rhizospheric microorganisms. *abiotic stress: new research*. Nova Science Publishers Inc., Hauppauge, pp. 1–57
2. Vessey, JK (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255(2):571–586
3. Frey-Klett P, Burlinson P, Deveau A, Barret M, Tarkka M, and Sarniguet A (2011) Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. *Microbiol Mol Biol Rev* 75(4):583–609
4. Mahanty, T., Bhattacharjee, S., and Goswami, M. (2016). Biofertilizers : a potential approach for sustainable agriculture development. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8104-0>
5. Corrales, L., Antolinez, D., Bohórquez, J., and Corredero, A. (2015). Anaerobic bacteria: processes they perform and their contribution to life sustainability on the planet. *Nova*, 13,55–81.  
Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v13n24/v13n24a06.pdf>
6. Herrmann, L., and Lesueur, D. (2013). Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(20), 8859–8873. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5228-8>
7. Rattan, G. K., Librarian, A., Kahn, B., and Nabha, S. (2014). *Asian Journal of Multidisciplinary Studies*. *Asian Journal of Multidisciplinary Studies ISSN:*, 2(2), 35–41.  
Retrieved from:  
[http://scholar.google.co.za/scholar\\_url?url=http://www.ajms.co.in/sites/ajms2015/index.php/ajms/article/view/1558/\\_24&hl=en&sa=X&scisig=AAGBfm2wRVzJ0Cv8MrH-X-kmVb\\_Hc3vzKA&nossl=1&oi=scholaralrt](http://scholar.google.co.za/scholar_url?url=http://www.ajms.co.in/sites/ajms2015/index.php/ajms/article/view/1558/_24&hl=en&sa=X&scisig=AAGBfm2wRVzJ0Cv8MrH-X-kmVb_Hc3vzKA&nossl=1&oi=scholaralrt)
8. Chávez, E., and Peralta, E. (2016). Cacao y campesinos: Experiencias de producción e investigación. Recuperación de cacao fino y de aroma mediante la elaboración y aplicación de fermentados anaérobicos en el litoral ecuatoriano. (pp. 169–183).
9. Brosius, M. R., Evanylo, G. K., Bulluck, L. R., and Ristaino, J. B. (1998). Comparison of commercial fertilizer and organic by-products on soil chemical and

- biological properties and vegetable yields. En S. Brown, J. S. Angle y L. Jacobs (Eds.), *Beneficial Co-Utilization of Agricultural Municipals and Industrial By-Products* (pp. 195-202). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers)
10. Youssef, M., and Eissa, M. (2014). Biofertilizers and their role in management of plant parasitic nematodes . A review, 5(1), 1–6.
  11. Pimentel, D., Hepperly, P., Hanson, J., Douds, D., and Seidel, R. (2005). Environmental, Energetic, and Economic Comparisons of Organic and Conventional Farming Systems. *BioScience*, 55(7), 573.  
Retrieved from:  
[https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2005\)055\[0573:EEAECO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2005)055[0573:EEAECO]2.0.CO;2)
  12. Othman, N. A. (2016). A review the effect of biofertilizer on growth and yield production of paddy (*Oryza Sativa L*). Faculty of Plantation and Agrotechnology, Jasin, Melaka.
  13. FAO. (2015). *World fertilizer trends and outlook to 2018*. Roma: Food And Agriculture Organization Of The United Nations. doi:ISBN 978-92-5-108692-6
  14. Rodríguez, M., and Ticona, D. (2017). Elementos nutricionales en la producción de fertilizante biol con diferentes tipos de insumos y cantidades de contenido ruminal de bovino-matadero municipal de La Paz. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 2(1), 87-90.
  15. Retrieved Feb 5 2018,  
<http://www.expreso.ec/suplementos/semana/guayaquil-salud-alimentosorganicos-nutricion-negocios-salud-tendencia-LF2007058>
  16. Retrieved Feb 5 2018,  
<https://guia.agrocalidad.gob.ec/agrodb/aplicaciones/publico/productos1/consultaRequisitoComercio.php>
  17. Merrill R. and Mckeeon J. (1999). Citado por Jimenez M.I. 2018. Effect of the nutritional status of banana (*Musa sp.*) on leaf disease infestation by *Mycosphaerella fijiensis* Morelet in Ecuador. Universidad Católica de Leuven. Bélgica.138 p.
  18. Vairo Dos Santos A. C. (1992). *Biofertilizante Líquido: o Defensivo Agrícola da Natureza*. Niteroi: EMATER- RÍO 16P. Agropecuaria Fluminense, 8.
  19. Retrieved Feb 5 2018,  
<https://davesgarden.com/guides/terms/go/3587/#b>
  20. Reddy, C. A., and Saravanan, R. S. (2013). Polymicrobial multi-functional approach for enhancement of crop productivity. In *Advances in applied microbiology* (Vol. 82,

- pp. 53-113). Academic Press.
21. Retrieved Feb 10 2018,  
<https://definitions.uslegal.com/b/biofertilizer/>
  22. Adriano, A. L., Trejo, R. G., and Rosas, Q. R. (2017). A cycle of organic fertilization of cashew trees improves the yield and quality of the products. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 39(5).
  23. Niranjana Kumar VS. (2016). Performance Study of Production bio fertilizer from biofuel waste. *International Research Journal of Engineering and Technology (IRJET)*, 3(7), 2145.
  24. López, E., Calero, A., Gómez, Y., and Gil, U. Z. (2017). Efecto agronómico del biosólido en cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*): control biológico de *Rhizoctonia solani*. *Cultivos Tropicales*, 38(1), 13-23.
  25. Hipólito, R. (2017). Efecto de inoculantes bacterianos edáficos mixtos en el desarrollo temprano de cultivares mejorados de cacao (*Theobroma cacao* L.) en un sistema agroforestal tradicional del norte de Oaxaca, México. *Revista Argentina de Microbiología*.
  26. Grageda, C., Díaz, F., Peña, C., and Vera, N. (2012). Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(6).
  27. Carvajal-Muñoz J S and Carmona-García C E 2012: Benefits and limitations of biofertilization in agricultural practices. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 24, Article #43.  
Retrieved May 2, 2018, from <http://www.lrrd.org/lrrd24/3/carv24043.htm>
  28. Tropicales, C. (2014). Revisión bibliográfica. Generalidades de los abonos orgánicos : Importancia del bocashi como alternativa nutricional para suelos y plantas. *Review Generalities of the organic manures : Bocashi's importance like nutritional alternative for soil and plants* , 35(4), 52–59.
  29. Savci, S. (2012). An Agricultural Pollutant : Chemical Fertilizer, 3(1), 11–14.
  30. Creus, C. M. (2017). Inoculantes microbianos: piezas de un rompecabezas que aún requiere ser ensamblado. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(3), 207-209.
  31. Rojas Aparicio, A., Vázquez Jacinto, J. M., Romero Gomezcaña, N., Rodríguez Barrera, M. Á., Toribio Jimenez, J., and Romero Ramírez, Y. (2016). Evaluación de compost con presencia de metales pesados en el crecimiento de *Azospirillum brasilense* y *Glomus intraradices*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(8).
  32. Velasquez, Y. L., and Ortega, N. D. C. (2017). Características físicas y químicas de

- humus obtenido de biosólidos provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales. *Revista Prueba*, 90(2), 7-17.
33. Velasco, J., Aguirre, G., and Ortuño, N. (2016). Humus líquido y microorganismos para favorecer la producción de lechuga (*Lactuca sativa* var. Crespa) en cultivo de hidroponía. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 4(2), 71-83.
  34. Brar, S. K., Sarma, S. J., and Chaabouni, E. (2012). Shelf-life of biofertilizers: an accord between formulations and genetics. *J Biofertil Biopestici*, 3(5).
  35. Kuusik, A., Pachel, K., Kuusik, A., and Loigu, E. (2017). Possible agricultural use of digestate. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*, 66(1), 64.
  36. González. (2017). Modelo factorial para el control de calidad de biofertilizantes de importancia agrícola.
  37. Nieto, C. N., Litvak, S., and Meital, V. (2017). Caracterización preliminar de la actividad microbiana solubilizadora de fosfato del biofertilizante Tierra Nueva. Universidad ORT Uruguay, Facultad de Ingeniería.
  38. Apáez, P. (2016). Producción y calidad nutrimental de vaina del frijol chino, (*Vigna unguiculata* L.) Walp, en función de arreglo topológico y tipo de fertilización. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo*, 48(2), 31-42.
  39. González, L. M. (2016). Efecto de productos bioactivos en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) biofertilizadas. *Cultivos Tropicales*, 37(3), 165-171.
  40. Pérez, J. (2014). Uso de los fertilizantes y su impacto en la producción agrícola (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín). Colombia.
  41. Quito Avila, D. F. (2006). Estudio Comparativo de dos Biofertilizantes Líquidos en Condiciones in vitro e Invernadero en Plantas de Banano y su Efecto en el Desarrollo de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) (Bachelor's thesis, Espol).
  42. Fernandes, J. P., Da Silva, J. E., Da Silva, J. S., Silva, D., CE, S., Oliveira, P., and Xavier, G, (2012). Performance of polymer compositions as carrier to *Compea* rhizobial inoculant formulations: Survival of rhizobia in pre-inoculated seeds and field efficiency. *African Journal of Biotechnology*, 11(12), 2945-2951.
  43. Chaves. B. N., and Gutiérrez, S. V. (2017). Crop physiological responses to high temperature stress. I. Molecular, biochemical and physiological aspects. *Agron. Mesoam* vol.28 n.1 San Pedro Jan./Jun.
  44. Olivar. R. D, (2015). Comportamiento de la incidencia y la severidad del Tizón común en planta de frijol en cultivo bajo tratamiento con extractos inductores de

- resistencia.
45. Abarza. S., Altamirano. F., Boccardo. R., and Britos. J, (2017). Fertilización biológica con *Trichoderma* spp y *Azospirillum* spp en maíz. *Agrotecnia*, 35, 31.
  46. Araújo, E. D. (2017). Silício como atenuador do estresse hídrico em feijão-caupi por meio do mecanismo antioxidante e desempenho agrônômico. Brasil.
  47. Afshar. R., Hadi. H., and Pirzard. A, (2013). Effect of nanoiron on the yield and yield component of cowpea (*Vigna unguiculata*) under end season water deficit. *Int. J. Agric. Res. Rev*, 3(1), 27-34.
  48. Claeys. H., and Inzé. D, (2013). The agony of choice: how plants balance growth and survival under water limiting conditions. *Plant Physiology*, 162, 1768-1779.
  49. Meriño. H. Y., Boicet. F. T., Boudet. A. A., and Cedeño, A. A, (2017). Respuesta agronómica de dos cultivares de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) bajo diferentes condiciones de humedad del suelo en la provincia de Granma. *Centro Agrícola*, 44(2), 22-28.
  50. Quintero. Z. E, (2014). Análisis proteómico de la resistencia inducida por micorrización al patógeno foliar *Sclerotinia sclerotiorum* en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).
  51. Cruz. T. R, (2017). Effect of different doses of vigortop in two varieties of bean (*Vicia faba* L.), in the municipality of Achocalla of the department of La Paz. *Apthapi*, 3(2), 552-561.
  52. Quintana Blanco, W. A, (2017). Effect of thermal phosphate on growth and production of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista udca Actualidad & Divulgación Científica*, 20(1), 51-59.
  53. FIRA. (2016). Panorama Agroalimentario. Frijol 2016. México.
  54. Villalobos. A. G, (2016). Comportamiento agroproductivo de diferentes variedades de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) en la finca Las Maria del Municipio Primero de Enero. *Universidad & Ciencia*, 5(2), 52-78.
  55. Espinoza García, (2016). Contenido de minerales en semilla de poblaciones nativas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista fitotecnia mexicana*, 3, 215-223.
  56. FENALCE, (2015). Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas. Bogotá D.C. : Departamento económico y apoyo a la comercialización. Indicadores cerealistas.
  57. Garcés, F. A, (2013). Enfermedades y componentes de rendimiento en dieciséis genotipos de fréjol en Quevedo, Ecuador. *Ciencia y Tecnología*, 6(2), 31-39.
  58. Damián Chuqui, D. L, (2017). Efecto del control de maleza y su impacto en la

- producción del cultivo del fréjol *Phaseolus vulgaris* L. 14-32. Machala: Universidad Técnica de Machala.
59. Polón Pérez, (2017). Effects of Water Stress on Grain Yield in the Vegetative Phase of bean Cultivation (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 26(1), 66-70.
  60. Orellana. T., Manzano. P., Chávez. E., Ruiz. O., León. R., Manzano. A. and Peralta, Esther, (2010). Caracterización de los Parámetros físico-químicos en el proceso de fermentación y maduración artesanal de bioles 480, 3–7.
  61. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Part 4000. Manual (1999). Inorganic nonmetallic constituents Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.
  62. Magdama Tobar. F, (2010). Estudio del efecto de Bioles y cepas de *Trichoderma sp.* aisladas de zonas cacaoteras, como alternativas de control de *Moniliophthora roreri*, en condiciones in vitro (Bachelor's thesis, Espol).
  63. Núñez. V. M, (2014). Análogos espirostánicos de brasinoesteroides y sus potencialidades de uso en la agricultura. *Cultivos Tropicales*, 35 (2), 34-42. doi:ISSN 0258-5936
  64. Remmler, L., Clairmont, L., Rolland-Lagan, A. G., and Guinel, F. C, (2014). Standardized mapping of nodulation patterns in legume roots. *New Phytologist*, 202(3), 1083–1094. <https://doi.org/10.1111/nph.12712>
  65. Mahdi, S. S., Hassan, G. I., Samoon, S. A., Rather, H. A., Dar, S. A., & Zehra6, B, (2010). Bio-Fertilizers In Organic Agriculture. *Journal of Phytology*, 2(10), 42–54.
  66. Ngampimol, H., and Kunathigan, V. (2008). The Study of Shelf Life for Liquid Biofertilizer from Vegetable Waste. *Assumption University Journal of Technology*, 11(4), 204–208.
  67. Santhosh, G. P, (2015). Formulation and shelf life of liquid biofertilizer inoculants using cell protectants. *Introduction* :, II(7), 243–247.
  68. Ramalho, R., Lora, F., and Beltrán, D. J, (1996). Tratamiento de aguas residuales. Retrieved from 18 May 2018. <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=REPIDISA&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=91337&indexSearch=ID>
  69. Jiménez M.I. 2007. Effect of the nutritional status of banana (*Musa* sp.) on leaf disease infestation by *Mycosphaerella fijiensis* Morelet in Ecuador. Universidad

- Católica de Leuven. Bélgica.138 p.
70. Jimenez, M., Van der vecken, L., Neiryneck, H., Rodríguez, H., Ruiz, O., and Swennen, R, (2007). Organic banana production in Ecuador: Its implications on black Sigatoka development and plant-soil nutritional status. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 22(4), 297–306. <https://doi.org/10.1017/S1742170507001895>
  71. Hoitink H., Van Doren D.M., and Schimithenner A.F. 1977. Citado por Magdama Tobar, F, (2010). Estudio del efecto de Bioles y cepas de *Trichoderma sp.* aisladas de zonas cacaoteras, como alternativas de control de *Moniliophthora roreri*, en condiciones in vitro (Bachelor's thesis, Espol).
  72. Merrill R. and Mckeon J, (1999.) Citado por Jimenez M.I. 2018. Effect of the nutritional status of banana (*Musa sp.*) on leaf disease infestation by *Mycosphaerella fijiensis* Morelet in Ecuador. Universidad Católica de Leuven. Bélgica.138 p.
  73. Ramirez-perez, J. (2015). Optimization of Anaerobic Digestion for Production of Biofertilizer- Biofungicide To Biocontrol *Mycosphaerella fijiensis*
  74. Harish, S., Krushi, H., Jaysukh, V, and Jivabhai, B, (2017). Fermentation: A Process for Biofertilizer Production. *Microorganisms for Green Revolution. Microorganisms for Sustainability*, vol 6. Springer, Singapore
  75. Alvarez, R., Espinoza, L., Ruiz, O., and Peralta, E. L, (2007). Efecto de los Biofertilizantes Líquidos de Producción Local “ Bioles ”, sobre el Desarrollo de Síntomas Causados por el Virus del Mosaico de la Calabaza ( SqMV ) en el Cultivo de Melón (*Cucumis melo* L.) var . Edisto, (1).  
Retrieved from 20 Apr 2018  
[http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/17063/1/Robert Alvarez Artículo Tesis 14 Sep Versión Final.pdf](http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/17063/1/Robert%20Alvarez%20Articulo%20Tesis%2014%20Sep%20Versi3n%20Final.pdf)
  76. Rajasekaran. S., Sundaramoorthy. P., and Sankar Ganesh. K, (1989) Efecto de los fertilizantes FYM, N, P y biofertilizantes sobre la germinación y el crecimiento del arroz (*Oryza sativa*. L)
  77. Ahuja, I. and C.P. Mallik, (1977). Effect of *Brassino steroïda* and *Paleobutrazole* on chlorophyll content in development of *Brassic tuornefortii*. *J. Plant Sci. Res.*, 13: 31-34.
  78. Singh, O.P., T.P. Singh and A.L. Yadav, (1999). Variability and co-heritability and estimates for agronomical and quality traits in Opium poppy (*P. somniferum* L.). *Sci. Cult.*, 64(3-4): 107-109.
  79. Wu SC, Cao ZH, Li ZG, Cheung KC, and Wong MH, (2005) Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a

- greenhouse trial. *Geoderma* 125:155–166. Doi: 10.1016/j.geoderma.2004.07.003
80. Sánchez JM, Ruíz JF, Cuautle F, (1987) Comportamiento de dos tipos de Tepetates bajo la adición de abonos orgánicos y abonos verdes en condiciones de invernaderos. En: *Uso y Manejo de Tepetates para el Desarrollo Rural*. Universidad Autónoma de Chapingo, Texcoco: 50- 68.
  81. Neelamegam, P., K. Malarvizhi, S. Sreelaja and G. Christopher, (2007). Effect of biofertilizers on seed germination and early seedling growth of *blackgrams*. *Ecobiol.*, 20(2): 111-115.
  82. Kumar. R, and Chandra.R, (2008). Influence of PGPR and PSB on *Rhizobium leguminosarum* Bv., viciae strain competition and symbiotic performance in lentil. *World J Agric.,Sci.vol.*, 4 p- 297- 301.
  83. Nishita G and Joshi N,C, (2010). Growth and yield response of chick pea (*Cicer arietinum*) to seed inoculation with *Rhizobium* Sp. *Nat., Sci.*, 8 :-232-236.
  84. Singh A. Poonam and Ghose. A.K, (2012). Assesment and Identification of phosphate solubulizing microbes as potential biofertilizer. *Asian journal of experimental biology*. Vol3(4)p 790-798.
  85. Sahu. K., Dikshit.N and Sharma.G, (2014). Effect of chemical fertilizers, organic and biofertilizers on growth, yield and soil nutrient statis of *Guava*. *Int., Journal of research in Environ.,sci, and research*.Vol 4(4) 111-113.
  86. Zahir, Z. A., M. K. Shah, M. Naveed, M.J. Akhter, (2010a). Substrate-dependent auxin production by *Rhizobium phaseoli* improves the growth and yield of *Vigna radiata* L. under salt stress conditions. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20:1288– 1294.
  87. Shahzad, H., and Akhtar, N, (2013). Potential of *Rhizobium* species to enhance growth and fodder yield of maize in the presence and absence of L-Tryptophan potential of rhizobium species to enhance growth and fodder yield of maize in the presence and absence of l-tryptophan, 23(October), 1448–1454.
  88. Hussain, M.B. I. Mehboob, Z.A. Zahir, M. Naveed and H.N. Asghar, (2009). Potential of *Rhizobium* spp. for improving growth and yield of rice (*Oryza sativa* L.). *Soil & Environ.* 28(1): 49-55
  89. Rojas, F., & Tapias, R. (2008). TESIS - Estandarización de un medio de cultivo complejo para la multiplicación de la cepa C50 de *Rhizobium* sp., 1–122.
  90. Córdoba, U. N. de. (1999). *Fitohormonas y reguladores de crecimiento vegetal*. Retrieved from, 5 Jun 2018.  
[http://www.fca.proed.unc.edu.ar/pluginfile.php/17291/mod\\_resource/content/1/](http://www.fca.proed.unc.edu.ar/pluginfile.php/17291/mod_resource/content/1/)



## Fitohormonas y Reguladores del Crecimiento.pdf

91. Mohod, S., Lakhawat, G. P., Deshmukh, S. K., & Ugwekar, R. P., (2015). Production of Liquid Biofertilizers and its Quality Control, 2(2), 158–165.
92. Akhtar, N., I. Arshad, M. A. Shakir, M. A. Qureshi, J. Sehrish and L. Ali, (2013). Co-inoculation with *Rhizobium* and *Bacillus* sp to improve the phosphorus availability and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.). The J. Anim. and Plant Sciences, 23(1): 190-197.
93. Vance, C. P., (1983). *Rhizobium* infection and nodulation: A Beneficial plant disease, (d), 399–424
94. Kloepper J W, Schroth M N, (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria. Station de Pathologie Végétale et de Phytobactériologie, anger, 27 August–2 September
95. Swaraj, K., S. Dhandi, and S. Sheokand, (1995). Relationship between defense mechanism against activated oxygen species and nodule functioning with progress in plant and nodule development in *Cajanus cajan* L., Millsp. Plant Sci. 112: 65-74.
96. Serraj, R., Sinclair, T.R., and Purcell, L.C., 1999. Symbiotic N<sub>2</sub> fixation response to drought. Journal of Experimental Botany 50, 143–155.
97. Hunt, P.G., Wollum, A.G., and Matheny, T.A., (1981). Effects of soil water on *Rhizobium japonicum* infection nitrogen accumulation and yield in bragg soybean. Agronomy Journal 73, 501–505.
98. Fuhrmann, J., Davey, C.B., and Wollum, A.G., (1986). Desiccation tolerance in clover rhizobia in sterile soils. Soil Science Society of America Journal 50, 639–644
99. Mnasri, B., Mrabet, M., Laguerre, G., Aouani, M.E., and Mhamdi, R., (2006). Salt-tolerant rhizobia isolated from a Tunisian oasis that are highly effective for symbiotic N<sub>2</sub>-fixation with *Phaseolus vulgaris* constitute a novel biovar (bv. mediterranense) of *Sinorhizobium meliloti*. Archives of Microbiology 187, 79–85.
100. Zahran, H.H. and Sprent, J.I., (1986). Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*. Planta 167, 303–309.

## ANEXOS

### Anexo 1: Análisis de varianza multivariado (MANOVA) del BF sobre los ambientes, color de los envases y tiempo de almacenamiento

F.V.	Estadístico	F	gl (num)	gl (den)	P
Ambientes	10,91	523,61	8	768	<0,0001
Envase	0,1	4,75	8	768	<0,0001
Meses	15,52	185,95	32	1534	<0,0001
Ambientes*Envase	0,15	3,63	16	1534	<0,0001

### Anexo 2: Análisis de varianza (ANOVAs) de los parámetros físicos-químicos sobre los ambientes, color de los envases y tiempo de almacenamiento

Variable dependiente: Conductividad Eléctrica

Fuente de variación	Suma de cuadrados tipo III	Df	Cuadrado medio	F	Sig
Modelo	456,97 <sup>a</sup>	16	28,56	214,19	<0,0001
Ambientes	33,51	2	16,75	125,65	<0,0001
Envase	2,58	2	1,29	9,68	0,0001
Meses	419,28	8	52,41	393,05	<0,0001
Ambientes*Envase	1,59	4	0,40	2,99	0,0189
Error	51,74	388	0,13		
Total	508,7	404			

a. R<sup>2</sup> = 0,90 ( R<sup>2</sup> ajustado = 0,89)

Variable dependiente: Sólidos totales

Fuente de variación	Suma de cuadrados tipo III	Df	Cuadrado medio	F	Sig
Modelo	112,88 <sup>a</sup>	16	7,05	214,78	<0,0001
Ambientes	7,57	2	3,79	115,3	<0,0001
Envase	0,58	2	0,29	8,87	0,0002
Meses	104,49	8	13,06	397,64	<0,0001
Ambientes*Envase	0,23	4	0,06	1,76	0,1363
Error	12,74	388	0,03		
Total	125,62	404			

a. R<sup>2</sup> = 0,90 ( R<sup>2</sup> ajustado = 0,89)

Variable dependiente: Salinidad

Fuente de variación	Suma de cuadrados tipo III	Df	Cuadrado medio	F	Sig
Modelo	212,9 <sup>a</sup>	16	13,31	308,66	<0,0001
Ambientes	49,71	2	24,85	576,54	<0,0001
Envase	0,82	2	0,41	9,54	0,0001
Meses	161,88	8	20,24	469,39	<0,0001
Ambientes*Envase	0,49	4	0,12	2,83	0,0246
Error	16,73	388	0,04		
Total	229,63	404			

a. R2 = 0,93 ( R2 ajustado = 0,92)

Variable dependiente: pH

Fuente de variación	Suma de cuadrados tipo III	Df	Cuadrado medio	F	Sig
Modelo	7,85 <sup>a</sup>	16	0,49	295,28	<0,0001
Ambientes	4,71	2	2,35	1415,93	<0,0001
Envase	0,02	2	0,01	4,68	0,0098
Meses	3,09	8	0,39	232,2	<0,0001
Ambientes*Envase	0,04	4	0,01	6,4	0,0001
Error	0,64	388	1,70E-03		
Total	8,5	404			

a. R2 = 0,93 ( R2 ajustado = 0,92)

**Anexo 3: Análisis de varianza (ANOVAs) de las mediadas repetidas (9 meses) de las mejores condiciones para mantener las características del BF según los parámetros físicos-químicos que tuvieron interacción (ambientes \* envases)**

Variable dependiente: Conductividad Eléctrica

Fuente de variación	Suma de cuadrados tipo III	Df	Cuadrado medio	F	Sig
Modelo	90,3 <sup>a</sup>	8	11,29	132,26	<0,0001
Medidas repetidas (9 meses)	90,30	8	1,29	132,26	<0,0001
Error	10,75	126	0,09		
Total	101,06	134			

a. R2 = 0,89 ( R2 ajustado = 0,89)

Variable dependiente: Sólidos totales

Fuente de variación	Suma de cuadrados tipo III	Df	Cuadrado medio	F	Sig
Modelo	24,37 <sup>a</sup>	8	3,05	148,35	<0,0001
Medidas repetidas (9 meses)	24,37	8	3,05	148,35	<0,0001
Error	2,59	126	0,02		
Total	26,96	134			

a. R2 = 0,90 ( R2 ajustado = 0,90)

Variable dependiente: Salinidad

Fuente de variación	Suma de cuadrados tipo III	Df	Cuadrado medio	F	Sig
Modelo	43,84 <sup>a</sup>	8	5,48	149,75	<0,0001
Medidas repetidas (9 meses)	43,84	8	5,48	149,75	<0,0001
Error	4,61	126	0,04		
Total	48,96	134			

a. R2 = 0,90 ( R2 ajustado = 0,90)

Variable dependiente: pH

Fuente de variación	Suma de cuadrados tipo III	Df	Cuadrado medio	F	Sig
Modelo	0,89 <sup>a</sup>	8	0,11	47,61	<0,0001
Medidas repetidas (9 meses)	0,89	8	0,11	47,61	<0,0001
Error	0,30	126	2,30E-03		
Total	1,19	134			

a.  $R2 = 0,75$  ( $R2$  ajustado = 0,74)

#### Anexo 4: Análisis microbiológico de *Listeria* sp.

Identificación de la muestra / etiqueta				
Nombre: BIO FERTILIZANTE MUESTRA INV A / INV B			Código muestra: 17-11/0014-M004	
Marca comercial: S/M			Lote: N/A	
Referencia: VARIOS			Fecha elaboración: 08/11/2017	
Envase: BOTELLA DE PLÁSTICO			Fecha expiración: N/A	
Conservación de la muestra: Ambiente Fresco y Seco - Zona Climática IV			Fecha recepción: 08/11/2017	
Fecha análisis: 08/11/2017			Vida útil: N/A	
Contenido neto declarado: 150ml				
Contenido neto encontrado: N/A				
Presentaciones: N/A				
Condiciones climáticas del ensayo: Temperatura 22.5 °C ± 2.5 °C Y Humedad Relativa 55% ± 15%				
Análisis Microbiológicos				
Ensayos realizados	Unidad	Resultado	Requisitos	Métodos/Ref.
Listeria spp *	Ausencia/Presencia	AUSENCIA	---	API-5.8-04-01-00M38. (AOAC 041101) *
Los resultados emitidos corresponden exclusivamente a la muestra proporcionada por el cliente.				
Las opiniones / interpretaciones / etc. que se indican a continuación, están FUERA del alcance de acreditación del SAE.				
* Observaciones: Se realizó el parámetro microbiológico solicitado por el cliente. Los datos microbiológicos se encuentran registrados en el cuaderno interno de trabajo de microbiología, en la página 17-05638.				
Los ensayos marcados con (*) NO están incluidos en el alcance de la acreditación del SAE.				
^ Representa el Exponente				
* Subcontratado				
En microbiología los valores expresados como < 1.8, < 2, < 3, y < 10 se estiman ausencia				

**Anexo 5: Análisis de varianza (ANOVA) del BF sobre el porcentaje de inhibición de *M. royeri* en medio sólido**

Variable dependiente: Porcentaje de PICR de *M. royeri*

Fuente de variación	Suma de cuadrados tipo III	Df	Cuadrado medio	F	Sig
Modelo	55565,77 <sup>a</sup>	9	6173,97	773,28	<0,0001
Meses	54,68	3	18,23	2,28	0,0791
Ambientes	128,19	2	64,10	8,03	0,0004
Envase	50,38	2	25,19	3,15	<0,0440
Concentración	55332,52	4	27666,26	3465,14	<0,0001
Error	2507,03	314	7,98		
Total	58072,8	323			

a. R2 = 0,96 ( R2 ajustado = 0,96)

**Anexo 6: Interacciones del BF sobre el PICR de *M. royeri* en medio sólido**

Variable dependiente: Interacciones PICR

Fuente de variación	Suma de cuadrados tipo III	Df	Cuadrado medio	F	Sig
Modelo	57335,47 <sup>a</sup>	107	535,85	156,97	<0,0001
Envase	50,38	2	25,19	7,38	0,0144
Concentración	55332,52	2	27666,26	8104,76	<0,0001
Ambientes	128,19	2	64,10	18,78	<0,0001
Envase*Concentración	149,57	4	37,39	10,95	<0,0001
Envase*Ambientes	113,96	4	28,49	8,35	<0,0001
Concentración*Ambientes	40,14	4	10,04	2,94	0,0215
Envase*Concentración*Ambientes	518,21	8	64,78	18,98	<0,0001
Error	737,33	216	3,41		
Total	58072,8	323			

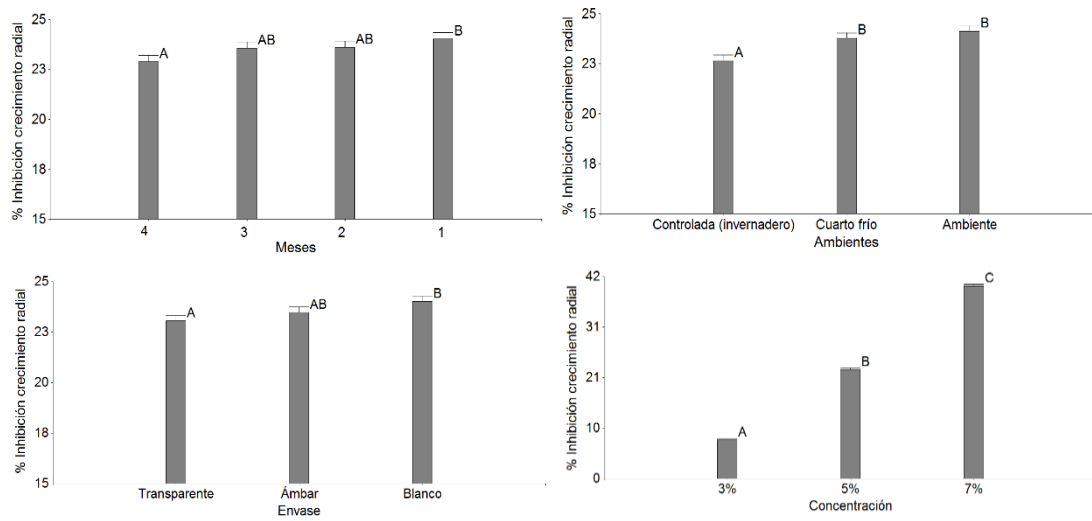
a. R2 = 0,99 ( R2 ajustado = 0,98)

**Anexo 7: Medias de la interacción (Ambientes \* Envases \* Concentración)**

<b>Ambientes</b>	<b>Envase</b>	<b>Concentración</b>	<b><math>\bar{X}</math></b>
Ambiente	Ámbar	3%	8,08 (B)
Ambiente	Blanco	3%	10,92 (B)
Ambiente	Transparente	3%	7,67 (AB)
Controlada (Invernadero)	Ámbar	3%	7,00 (A)
Controlada (Invernadero)	Blanco	3%	6,58 (A)
Controlada (Invernadero)	Transparente	3%	8,25 (AB)
Cuarto frío	Ámbar	3%	8,17 (AB)
Cuarto frío	Blanco	3%	6,42 (A)
Cuarto frío	Transparente	3%	8,83 (AB)
Ambiente	Ámbar	5%	23,50 (C)
Ambiente	Blanco	5%	21,25 (C)
Ambiente	Transparente	5%	25,67 (D)
Controlada (Invernadero)	Ámbar	5%	20,17 (C)
Controlada (Invernadero)	Blanco	5%	23,33 (CD)
Controlada (Invernadero)	Transparente	5%	21,58 (C)
Cuarto frío	Ámbar	5%	21,58 (C)
Cuarto frío	Blanco	5%	26,08 (D)
Cuarto frío	Transparente	5%	20,42 (C)
Ambiente	Ámbar	7%	39,50 (EF)
Ambiente	Blanco	7%	41,33 (FG)
Ambiente	Transparente	7%	39,25 (EF)
Controlada (Invernadero)	Ámbar	7%	39,25 (EF)
Controlada (Invernadero)	Blanco	7%	39,17 (EF)
Controlada (Invernadero)	Transparente	7%	38,58 (EF)
Cuarto frío	Ámbar	7%	44,08 (G)
Cuarto frío	Blanco	7%	41,17 (FG)
Cuarto frío	Transparente	7%	37,33 (E)

*Medias con las mismas letras no difieren estadísticamente  $p > 0.05$*

### Anexo 8: ANOVAs de los factores en el PICR de *M. royeri*.



*Medias con las mismas letras no difieren estadísticamente  $p > 0.05$*



**Anexo 9: Análisis de varianza (ANOVAs) de los parámetros agronómicos sobre las variables altura de planta, promedio de clorofila y grosor del tallo**

Variable dependiente: Altura de planta

Fuente de variación	Suma de cuadrados tipo III	Df	Cuadrado medio	F	Sig
Modelo.	198092,16 <sup>a</sup>	12	16507,68	167,65	<0,0001
Semanas	154003,09	6	25667,18	260,67	<0,0001
Cepas	18483,94	2	9241,97	93,86	<0,0001
Frecuencia de riego	22768,81	3	7589,60	77,08	<0,0001
Dosis	2836,32	1	2836,32	28,81	<0,0001
Error	48346,72	491	98,47		
Total	246438,88	503			

a. R2 = 0,80 ( R2 ajustado = 0,80)

Variable dependiente: Promedio clorofila

Fuente de variación	Suma de cuadrados tipo III	Df	Cuadrado medio	F	Sig
Modelo.	6827,66 <sup>a</sup>	12	568,97	119,67	<0,0001
Semanas	5618,13	6	936,36	196,95	<0,0001
Cepas	255,05	2	127,52	26,82	<0,0001
Frecuencia de riego	927,38	3	309,13	65,02	<0,0001
Dosis	27,10	1	27,10	5,70	0,0173
Error	2334,40	491	5,70		
Total	9162,06	503			

a. R2 = 0,75 ( R2 ajustado = 0,74)

Variable dependiente: Grosor del tallo

Fuente de variación	Suma de cuadrados tipo III	Df	Cuadrado medio	F	Sig
Modelo.	4,05 <sup>a</sup>	12	0,34	527,02	<0,0001
Semanas	3,56	6	0,59	926,33	<0,0001
Cepas	0,04	2	0,02	30,68	<0,0001
Frecuencia de riego	0,44	3	0,15	228,78	<0,0001
Dosis	0,01	1	0,01	18,58	<0,0001
Error	0,31	491	0,00064		
Total	4,37	503			

a.  $R^2 = 0,93$  (  $R^2$  ajustado = 0,93)

**Anexo 10: Interacciones de los factores parametros agronómicos sobre las variables altura de planta, promedio de clorofila y grosor del tallo**

Variable dependiente: Altura de planta

Fuente de variación	Suma de cuadrados tipo III	Df	Cuadrado medio	F	Sig
Modelo.	223827,89 <sup>a</sup>	167	1340,29	19,92	<0,0001
Semanas	154003,09	6	25667,18	381,42	<0,0001
Cepas	18483,94	2	9242,97	137,34	<0,0001
Frecuencia de riego	22768,81	3	7589,60	112,78	<0,0001
Dosis	2836,32	1	2836,32	42,15	<0,0001
Semanas*Cepas	11674,76	12	972,90	14,46	<0,0001
Semanas*Frecuencia de riego	9423,08	18	523,50	7,78	<0,0001
Semanas*Dosis	1125,79	6	187,63	2,79	0,0117
Cepas*Frecuencia de riego	268,65	6	44,78	0,67	0,6777
Cepas*Dosis	45,30	2	22,65	0,34	0,7144
Frecuencia de riego*Dosis	1093,93	3	364,64	5,42	0,0012
Semanas*Cepas*Frecuencia de riego	457,17	36	12,70	0,19	>0,9999
Semanas*Cepas*Dosis	200,26	12	16,69	0,25	0,9955
Semanas*Frecuencia de riego*Dosis	332,33	18	18,46	0,27	0,9988
Cepas*Frecuencia de riego*Dosis	457,38	6	76,23	1,13	0,3428
Semanas*Cepas*Frecuencia de riego*Dosis	657,09	36	18,25	0,27	>0,9999
Error	22610,99	336	67,29		
Total	246438,88	503			

a.  $R^2 = 0,91$  (  $R^2$  ajustado = 0,86)

Variable dependiente: Promedio de Clorofila

Fuente de variación	Suma de cuadrados tipo III	Df	Cuadrado medio	F	Sig
Modelo.	8533,54 <sup>a</sup>	167	51,10	27,32	<0,0001
Semanas	5618,13	6	936,36	500,56	<0,0001
Cepas	255,05	2	127,52	68,17	<0,0001
Frecuencia de riego	927,38	3	309,13	165,25	<0,0001
Dosis	27,10	1	27,10	14,49	0,0002
Semanas*Cepas	382,71	12	31,89	17,05	<0,0001
Semanas*Frecuencia de riego	941,68	18	52,32	27,97	<0,0001

Semanas*Dosis	58,35	6	9,73	5,20	<0,0001
Cepas*Frecuencia de riego	42,84	6	7,14	3,82	0,0011
Cepas*Dosis	2,48	2	1,24	0,66	0,5156
Frecuencia de riego*Dosis	6,66	3	2,22	1,19	0,3148
Semanas*Cepas*Frecuencia de riego	84,34	36	2,34	1,25	0,1587
Semanas*Cepas*Dosis	22,95	12	1,91	1,02	0,4275
Semanas*Frecuencia de riego*Dosis	45,43	18	2,52	1,35	0,1549
Cepas*Frecuencia de riego*Dosis	27,85	6	4,64	2,48	0,0231
Semanas*Cepas*Frecuencia de riego*Dosis	90,58	36	2,52	1,35	0,0955
Error	628,53	336	1,87		
Total	9162,06	503			

a. R2 = 0,93 ( R2 ajustado = 0,90)

Variable dependiente: Grosor del tallo

Fuente de variación	Suma de cuadrados tipo III	Df	Cuadrado medio	F	Sig
Modelo.	4,32 <sup>a</sup>	167	0,03	182,43	<0,0001
Semanas	3,56	6	0,59	4186,48	<0,0001
Cepas	0,04	2	0,02	138,64	<0,0001
Frecuencia de riego	0,44	3	0,15	1033,96	<0,0001
Dosis	0,01	1	0,01	83,95	<0,0001
Semanas*Cepas	0,01	12	8,5E-04	6,02	<0,0001
Semanas*Frecuencia de riego	0,08	18	4,4E-03	30,82	<0,0001
Semanas*Dosis	0,01	6	1,6E-03	10,95	<0,0001
Cepas*Frecuencia de riego	0,06	6	0,01	70,27	<0,0001
Cepas*Dosis	4,0E-03	2	2,0E-03	13,93	<0,0001
Frecuencia de riego*Dosis	1,9E-04	3	6,4E-04	0,45	0,7156
Semanas*Cepas*Frecuencia de riego	0,05	36	1,3E-03	9,18	<0,0001
Semanas*Cepas*Dosis	0,02	12	1,3E-03	9,49	<0,0001
Semanas*Frecuencia de riego*Dosis	0,02	18	9,1E-04	6,40	<0,0001
Cepas*Frecuencia de riego*Dosis	3,7E-03	6	6,2E-04	4,35	0,0003
Semanas*Cepas*Frecuencia de riego*Dosis	0,02	36	6,1E-04	4,27	<0,0001
Error	0,05	336	1,4E-04		
Total	4,37	503			

a. R2 = 0,99 ( R2 ajustado = 0,98)

**Anexo 11: Análisis de varianza (ANOVAs) de los parámetros agronómicos sobre las variables peso de raíz y número de nódulos**

Variable dependiente: Peso de raíz

Fuente de variación	Suma de cuadrados tipo III	Df	Cuadrado medio	F	Sig
Modelo.	302,32 <sup>a</sup>	6	50,39	48,51	<0,0001
Cepas	35,00	2	17,50	16,85	<0,0001
Frecuencia de riego	249,50	3	83,17	80,07	<0,0001
Dosis	17,81	1	17,81	17,15	0,0001
Error	67,51	65	1,04		
Total	369,83	71			

a. R2 = 0,82 ( R2 ajustado = 0,80)

Variable dependiente: Número de nódulos

Fuente de variación	Suma de cuadrados tipo III	Df	Cuadrado medio	F	Sig
Modelo.	10415,58 <sup>a</sup>	6	1753,93	50,92	<0,0001
Cepas	780,86	2	390,43	11,45	<0,0001
Frecuencia de riego	9444,6	3	3148,20	92,34	<0,0001
Dosis	190,13	1	190,13	5,58	0,0212
Error	2216,07	65	34,09		
Total	12631,65	71			

a. R2 = 0,82 ( R2 ajustado = 0,81)

**Anexo 12: Interacciones de los factores parametros agronómicos sobre las variables peso de raíz y número de nódulos**

Variable dependiente: Número de nódulos

Fuente de variación	Suma de cuadrados tipo III	Df	Cuadrado medio	F	Sig
Modelo.	10976,32 <sup>a</sup>	23	477,23	13,84	<0,0001
Cepas	780,86	2	390,43	11,32	0,0001
Frecuencia de riego	9444,6	3	3148,20	91,29	<0,0001
Dosis	190,13	1	190,13	5,51	0,0230
Cepas*Frecuencia de riego	356,69	6	59,45	1,72	0,1358
Cepas*Dosis	12,58	2	6,29	0,18	0,8338
Frecuencia de riego*Dosis	17,38	3	5,79	0,17	0,9175
Cepas*Frecuencia de riego*Dosis	174,08	6	29,01	0,84	0,5444
Error	1655,33	48	34,49		
Total	12631,65	71			

a. R2 = 0,87 ( R2 ajustado = 0,81)

Variable dependiente: Peso de raíz

Fuente de variación	Suma de cuadrados tipo III	Df	Cuadrado medio	F	Sig
Modelo.	322,68 <sup>a</sup>	23	14,03	14,28	<0,0001
Cepas	35,00	2	17,50	17,82	<0,0001
Frecuencia de riego	249,50	3	83,17	84,67	<0,0001
Dosis	17,81	1	17,81	18,13	0,0001
Cepas*Frecuencia de riego	11,10	6	1,85	1,88	0,1030
Cepas*Dosis	1,36	2	0,68	0,69	0,5042
Frecuencia de riego*Dosis	6,04	3	2,01	2,05	0,1194
Cepas*Frecuencia de riego*Dosis	1,86	6	0,31	0,32	0,9259
Error	47,15	48	0,98		
Total	369,83	71			

a. R2 = 0,87 ( R2 ajustado = 0,81)

## Anexo 13: Análisis de macronutrientes

 <b>AGROCALIDAD</b> AGENCIA ECUATORIANA DE ASESORAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AGRO	<b>LABORATORIO DE CALIDAD DE FERTILIZANTES</b> Vía Interoceánica Km. 14½ y Eloy Alfaro, Granja del MAGAP, Tumbaco - Quito Teléf.: 02-2372-842/2372-844/2372-845	<b>PGT/F/09-FO01</b>
	<b>Rev. 3</b>	
	<b>INFORME DE ANÁLISIS</b>	

Informe número: LN-F-E17-0969  
 Fecha emisión informe: 10-07-2017

**DATOS DEL CLIENTE**

Persona o Empresa solicitante: EMPRESA PUBLICA DE SERVICIOS ESPOL-TECH-EP

Dirección: Vía perimetral km 30.5

Provincia: Guayas

Cantón: Guayaquil

Teléfono: 04 2269269

Correo Electrónico: rleon@espol.edu.ec

N° Orden de Trabajo: 09-2017-3095

N° Factura/Documento: 002-001-39819

**DATOS DE LA MUESTRA:**

Tipo de muestra: Fertilizante líquido orgánico	Conservación de la muestra: Envase apropiado
Lote: ---	Tipo de envase: botella plástica
Provincia: ---	X: ---
Cantón: ---	Y: ---
Parroquia: ---	Altitud: ---
Muestreado por: ---	
Fecha de muestreo: ---	Fecha de inicio de análisis: 03/07/2017
Fecha de recepción de la muestra: 30/06/2017	Fecha de finalización de análisis: 07/07/2017

**RESULTADOS DEL ANÁLISIS**

CÓDIGO DE MUESTRA LABORATORIO	IDENTIFICACIÓN DE CAMPO DE LA MUESTRA	PARÁMETROS ANALIZADOS	MÉTODO	UNIDAD	RESULTADOS	ESPECIFICACIÓN (FICHA TÉCNICA)
F170920	BTA1	NT	PEE/F/14	%	0.38	---
		P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> *	PEE/F/04	%	0.061	---
		K <sub>2</sub> O*	PEE/F/19	%	0.639	---
F170920	BTA2	NT	PEE/F/14	%	0.39	---
		P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> *	PEE/F/04	%	0.062	---
		K <sub>2</sub> O*	PEE/F/19	%	0.638	---
F170920	TTA1	NT	PEE/F/14	%	0.39	---
		P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> *	PEE/F/04	%	0.062	---
		K <sub>2</sub> O*	PEE/F/19	%	0.638	---
F170920	TTA2	NT	PEE/F/14	%	0.38	---
		P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> *	PEE/F/04	%	0.062	---
		K <sub>2</sub> O*	PEE/F/19	%	0.638	---
F170920	ATA1	NT	PEE/F/14	%	0.38	---
		P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> *	PEE/F/04	%	0.061	---
		K <sub>2</sub> O*	PEE/F/19	%	0.638	---
F170920	ATA2	NT	PEE/F/14	%	0.38	---
		P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> *	PEE/F/04	%	0.062	---
		K <sub>2</sub> O*	PEE/F/19	%	0.638	---

 <b>AGROCALIDAD</b> AGENCIA ECUATORIANA DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AGRO	<b>LABORATORIO DE CALIDAD DE FERTILIZANTES</b> Vía Interoceánica Km. 14½ y Eloy Alfaro, Granja del MAGAP, Tumbaco - Quito Teléf.: 02-2372-842/2372-844/2372-845	<b>PGT/F/09-F001</b>
	<b>Rev. 3</b>	
	<b>INFORME DE ANÁLISIS</b>	

Informe número: LN-F-E17-0969  
 Fecha emisión informe: 10-07-2017

#### DATOS DEL CLIENTE

Persona o Empresa solicitante: EMPRESA PUBLICA DE SERVICIOS ESPOL-TECH-EP

Dirección: Vía perimetral km 30.5

Provincia: Guayas

Cantón: Guayaquil

Teléfono: 04 2269269

Correo Electrónico: rleon@espol.edu.ec

N° Orden de Trabajo: 09-2017-3095

N° Factura/Documento: 002-001-39819

#### DATOS DE LA MUESTRA:

Tipo de muestra: Fertilizante líquido orgánico	Conservación de la muestra: Envase apropiado
Lote: ---	Tipo de envase: botella plástica
Provincia: ---	Coordenadas: X: --- Y: --- Altitud: ---
Cantón: ---	
Parroquia: ---	
Muestreado por: ---	
Fecha de muestreo: ---	Fecha de inicio de análisis: 03/07/2017
Fecha de recepción de la muestra: 30/06/2017	Fecha de finalización de análisis: 07/07/2017

#### RESULTADOS DEL ANÁLISIS

CÓDIGO DE MUESTRA LABORATORIO	IDENTIFICACIÓN DE CAMPO DE LA MUESTRA	PARÁMETROS ANALIZADOS	MÉTODO	UNIDAD	RESULTADOS	ESPECIFICACIÓN (FICHA TÉCNICA)
F170920	BT11	NT	PEE/F/14	%	0.28	---
		P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> *	PEE/F/04	%	0.052	---
		K <sub>2</sub> O*	PEE/F/19	%	0.665	---
F170920	BT12	NT	PEE/F/14	%	0.28	---
		P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> *	PEE/F/04	%	0.052	---
		K <sub>2</sub> O*	PEE/F/19	%	0.665	---
F170920	TT11	NT	PEE/F/14	%	0.27	---
		P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> *	PEE/F/04	%	0.051	---
		K <sub>2</sub> O*	PEE/F/19	%	0.665	---
F170920	TT12	NT	PEE/F/14	%	0.27	---
		P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> *	PEE/F/04	%	0.051	---
		K <sub>2</sub> O*	PEE/F/19	%	0.666	---
F170920	AT11	NT	PEE/F/14	%	0.28	---
		P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> *	PEE/F/04	%	0.052	---
		K <sub>2</sub> O*	PEE/F/19	%	0.665	---
F170920	AT12	NT	PEE/F/14	%	0.28	---
		P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> *	PEE/F/04	%	0.052	---
		K <sub>2</sub> O*	PEE/F/19	%	0.665	---

 <b>AGROCALIDAD</b> AGENCIA ECUATORIANA DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AGRO	<b>LABORATORIO DE CALIDAD DE FERTILIZANTES</b> Vía Interoceánica Km. 14½ y Eloy Alfaro, Granja del MAGAP, Tumbaco - Quito Teléf.: 02-2372-842/2372-844/2372-845	<b>PGT/F/09-F001</b>
	<b>Rev. 3</b>	
	<b>INFORME DE ANÁLISIS</b>	

Informe número: LN-F-E17-0969  
 Fecha emisión informe: 10-07-2017

#### DATOS DEL CLIENTE

Persona o Empresa solicitante: EMPRESA PUBLICA DE SERVICIOS ESPOL-TECH-EP

Dirección: Vía perimetral km 30.5

Provincia: Guayas

Cantón: Guayaquil

Teléfono: 04 2269269

Correo Electrónico: rleon@espol.edu.ec

N° Orden de Trabajo: 09-2017-3095

N° Factura/Documento: 002-001-39819

#### DATOS DE LA MUESTRA:

Tipo de muestra: Fertilizante líquido orgánico	Conservación de la muestra: Envase apropiado
Lote: ---	Tipo de envase: botella plástica
Provincia: ---	Coordenadas: X: --- Y: --- Altitud: ---
Cantón: ---	
Parroquia: ---	
Muestreado por: ---	
Fecha de muestreo: ---	Fecha de inicio de análisis: 03/07/2017
Fecha de recepción de la muestra: 30/06/2017	Fecha de finalización de análisis: 07/07/2017

#### RESULTADOS DEL ANÁLISIS

CÓDIGO DE MUESTRA LABORATORIO	IDENTIFICACIÓN DE CAMPO DE LA MUESTRA	PARÁMETROS ANALIZADOS	MÉTODO	UNIDAD	RESULTADOS	ESPECIFICACIÓN (FICHA TÉCNICA)
F170920	BTC1	NT	PEE/F/14	%	0.35	---
		P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> *	PEE/F/04	%	0.062	---
		K <sub>2</sub> O*	PEE/F/19	%	0.618	---
F170920	BTC2	NT	PEE/F/14	%	0.35	---
		P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> *	PEE/F/04	%	0.062	---
		K <sub>2</sub> O*	PEE/F/19	%	0.618	---
F170920	TTC1	NT	PEE/F/14	%	0.36	---
		P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> *	PEE/F/04	%	0.063	---
		K <sub>2</sub> O*	PEE/F/19	%	0.620	---
F170920	TTC2	NT	PEE/F/14	%	0.36	---
		P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> *	PEE/F/04	%	0.063	---
		K <sub>2</sub> O*	PEE/F/19	%	0.620	---
F170920	ATC1	NT	PEE/F/14	%	0.36	---
		P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> *	PEE/F/04	%	0.062	---
		K <sub>2</sub> O*	PEE/F/19	%	0.622	---
F170920	ATC2	NT	PEE/F/14	%	0.36	---
		P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> *	PEE/F/04	%	0.062	---
		K <sub>2</sub> O*	PEE/F/19	%	0.622	---



 <b>AGROCALIDAD</b> AGENCIA ECUATORIANA DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AGRO	<b>LABORATORIO DE CALIDAD DE FERTILIZANTES</b> Vía Interoceánica Km. 14½ y Eloy Alfaro, Granja del MAGAP, Tumbaco - Quito Teléf.: 02-2372-842/2372-844/2372-845	<b>PGT/F/09-FO01</b>
	<b>INFORME DE ANÁLISIS</b>	<b>Rev. 3</b> <b>Hoja 4 de 4</b>

\*: Resultado obtenido por cálculo  
NT = Nitrógeno Total, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> = Fósforo, K<sub>2</sub>O = Potasio

Analizado Por: Ing. Melissa Rea, Ing. Cristina Flores, Ing. Wilson Castro  
Observaciones: Los resultados esta expresados en %p/p

Anexo Gráficos: ---

Anexo Documentos: ---

  
AGROCALIDAD  
AGENCIA ECUATORIANA  
DE ASEGURAMIENTO  
DE LA CALIDAD DEL AGRO  
LABORATORIO DE CALIDAD  
DE FERTILIZANTES

Ing. Wilson Castro  
Responsable Técnico Laboratorio  
de Calidad de Fertilizantes