



**UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO**  
**UNIDAD DE ESTUDIOS A DISTANCIA**  
**MODALIDAD SEMIPRESENCIAL**  
**CARRERA INGENIERÍA AGROPECUARIA**



**TESIS DE GRADO**

**EMPLEO DE RIZOBACTERIAS COMO PROMOTORES DE  
CRECIMIENTO VEGETAL EN LA ASOCIACIÓN DEL PASTO RAY  
GRASS (*Lolium perenne L.*) CON ALFALFA (*Medicago sativa*) Y  
TREBOL ROJO (*Trifolium pratense*)**

**AUTOR**

**VÍCTOR ORLANDO CHICAIZA MORALES**

**DIRECTORA**

**ING. MSc. MARLENE MEDINA VILLACIS DE SALCEDO**

**QUEVEDO – ECUADOR**

**2012**

**UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO  
UNIDAD DE ESTUDIOS A DISTANCIA  
MODALIDAD SEMIPRESENCIAL  
CARRERA INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**TESIS DE GRADO**

**EMPLEO DE RIZOBACTERIAS COMO PROMOTORES DE  
CRECIMIENTO VEGETAL EN LA ASOCIACIÓN DEL PASTO RAY  
GRASS (*Lolium perenne L.*) CON ALFALFA (*Medicago sativa*) Y  
TRÉBOL ROJO (*Trifolium pratense*)**

Presentada al Honorable Comité Técnico Académico Administrativo de la  
Unidad de Estudios a Distancia, como requisito previo para la obtención del  
título de:

**INGENIERO AGROPECUARIO**

**MIEMBROS DE TRIBUNAL**

Ing. Geovanny Suarez Fernández M Sc

**PRESIDENTE DE TRIBUNAL**

---

Ing. Lauden Rizzo Zamora M Sc

**MIEMBRO DE TRIBUNAL DE TESIS**

---

Ing. Dominga Rodríguez Angulo M Sc

**MIEMBRO DE TRIBUNAL DE TESIS**

---

Ing. MSc. Marlene Medina Villacis de Salcedo

**DIRECTOR DE TESIS**

---

**Quevedo – Los Ríos – Ecuador**

**2012**

## DECLARACIÓN

Yo, **VÍCTOR ORLANDO CHICAIZA MORALES** declaro, que la tesis aquí descrita es de mi autoría que va acorde a la carrera de Ingeniería Agropecuaria y que no ha sido previamente presentada para ningún grado o calificación profesional; y que las referencias que se incluyen en este documento han sido consultadas.

A través de esta declaración cedo los derechos de propiedad intelectual y de campo correspondiente a este trabajo, a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, de la Unidad de Estudios a Distancia, según lo establecido por la ley de propiedad intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.

---

**VÍCTOR ORLANDO CHICAIZA MORALES**

## CERTIFICACIÓN

Ing. MSc. Marlene Medina Villacis de Salcedo, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Unidad de Estudios a Distancia, **CERTIFICO** que el señor **VÍCTOR ORLANDO CHICAIZA MORALES** bajo mi dirección realizaron la Tesis de Grado titulada: **“EMPLEO DE RIZOBACTERIAS COMO PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL EN LA ASOCIACIÓN DEL PASTO RAY GRASS (*Lolium perenne L.*) CON ALFALFA (*Medicago sativa*) Y TRÉBOL ROJO (*Trifolium pratense*)”**

Habiendo cumplido con todas las disposiciones y reglamentos legales establecidas por la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, para optar por el Título de Ingeniero Agropecuario.

---

**Ing. MSc. Marlene Medina Villacis de Salcedo**

**DIRECTOR DE TESIS**

## AGRADECIMIENTO

El autor de esta obra deja constancia de su agradecimiento a las siguientes personas:

- La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, especialmente a la Unidad de Estudios a Distancia.
- Ing. M. Sc Roque Luis Vivas Moreira, Rector de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo
- Ing. M. Sc. Guadalupe Del Pilar Murillo Campuzano, Vicerrectora Administrativa y ex Directora de la Unidad de Estudios a Distancia.
- Eco. M. Sc Roger Tomás Yela Burgos, Director de la Unidad de Estudios a Distancia.
- Ing. M.Sc. Geovack Lauden Rizzo Zamora, Coordinador de la Carrera Agropecuaria.
- Ing. MSc. Marlene Luzmila Medina Villacis de Salcedo, Directora de Tesis
- A mis padres, esposa e hijo, los cuales siempre nos brindaron su apoyo moral e incondicional

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis de grado a Dios y a mis padres, a mi esposa e hijo. A Dios porque ha estado conmigo a cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar, a mis padres, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación

A mi esposa e hijo porque han sido mi apoyo en todo momento. Depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un solo momento en mi inteligencia y capacidad.

Los amo con mi vida.

**VÍCTOR ORLANDO CHICAIZA MORALES**

## **RESPONSABILIDAD**

El autor deja constancia que los resultados, conclusiones y recomendaciones son responsabilidad directa y pertenecen a su autoría.

---

**VÍCTOR ORLANDO CHICAIZA MORALES**

## ÍNDICE GENERAL

| Contenido                                                                       | Página |
|---------------------------------------------------------------------------------|--------|
| CARÁTULA.....                                                                   | i      |
| CONTRACARÁTULA.....                                                             | ii     |
| DECLARACIÓN.....                                                                | iii    |
| CERTIFICACIÓN.....                                                              | iv     |
| AGRADECIMIENTO.....                                                             | v      |
| DEDICATORIA.....                                                                | vi     |
| RESPONSABILIDAD.....                                                            | vii    |
| I. INTRODUCCIÓN.....                                                            | 1      |
| 1.1. Objetivos.....                                                             | 2      |
| 1.1.1. Objetivo General.....                                                    | 2      |
| 1.1.2. Objetivos Específicos.....                                               | 3      |
| 1.4. Hipótesis.....                                                             | 3      |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA.....                                                 | 4      |
| 2.1. Generalidades.....                                                         | 4      |
| 2.1.1. Bacterias del suelo.....                                                 | 4      |
| 2.2. Tipos de Bacterias.....                                                    | 5      |
| 2.2.1. Descomponedoras.....                                                     | 5      |
| 2.2.2. Fijadores de nitrógeno.....                                              | 5      |
| 2.3. Efecto de los microorganismos en la estructura y fertilidad del suelo..... | 6      |
| 2.3.1. Nitrificación.....                                                       | 6      |
| 2.3.2. Fijación no simbiótica del nitrógeno.....                                | 7      |
| 2.3.3. Fijación simbiótica del nitrógeno.....                                   | 7      |
| 2.3.4. Mecanismos y factores influyentes de la nitrificación.....               | 7      |
| 2.3.5. Reacción del suelo y presencia de diversos elementos.....                | 8      |
| 2.3.6. Aireación del suelo.....                                                 | 8      |
| 2.3.7. Humedad del suelo.....                                                   | 9      |
| 2.4. Interacciones entre microorganismos y plantas.....                         | 9      |
| 2.5. Efectos de las raíces en las poblaciones de microorganismos.....           | 9      |
| 2.6. Rizobacterias.....                                                         | 10     |

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.7. Microorganismos, biofertilizantes y biofertilización .....                                            | 12 |
| 2.7.1. Inoculante bacteriano .....                                                                         | 13 |
| 2.7.2. Azotobacter spp. ....                                                                               | 14 |
| 2.7.2.1. Producción de sustancias fisiológicamente activas y aplicación<br>práctica de Azotobacter sp..... | 16 |
| 2.8. Efectos de la inoculación de Azotobacter spp .....                                                    | 18 |
| 2.9. Pseudomona fluorescens .....                                                                          | 21 |
| 2.10. Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) .....                                                             | 23 |
| 2.11. Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> ) .....                                                      | 23 |
| 2.12. Pasto Raygrass perenne ( <i>Lolium perenne L.</i> ) .....                                            | 23 |
| 2.13. Investigaciones realizadas.....                                                                      | 24 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS.....                                                                             | 27 |
| 3.1. Localización y duración del experimento .....                                                         | 27 |
| 3.2.....                                                                                                   | 27 |
| Condiciones meteorológicas.....                                                                            | 27 |
| 3.3. Materiales y equipos.....                                                                             | 28 |
| 3.4. Factores en estudio y tratamientos.....                                                               | 28 |
| 3.5. Diseño experimental.....                                                                              | 29 |
| 3.6. Mediciones Experimentales.....                                                                        | 31 |
| 3.6.1. Análisis de suelo .....                                                                             | 31 |
| 3.6.2. Longitud de la raíz (cm).....                                                                       | 31 |
| 3.6.3. Peso de raíz (g).....                                                                               | 31 |
| 3.6.4. Peso de forraje (g).....                                                                            | 31 |
| 3.6.5. Composición química y valor nutritivo .....                                                         | 31 |
| 3.6.6. Población de bacterias y hongos/Tratamiento.....                                                    | 32 |
| 3.7. Colecta de nódulos y almacenamiento .....                                                             | 32 |
| 3.8. Aislamiento de bacterias y hongos desde el nódulo .....                                               | 32 |
| IV. RESULTADOS .....                                                                                       | 34 |
| 4.1. Efecto simple .....                                                                                   | 34 |
| 4.1.1. Efecto simple de las edades.....                                                                    | 34 |
| 4.1.2. Efecto simple de la asociación pasto – leguminosa .....                                             | 34 |
| 4.1.3. Efecto simple de los inoculantes .....                                                              | 35 |
| 4.2. Longitud de raíz leguminosa (cm).....                                                                 | 37 |

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2.1. Interacción de Pasto + Leguminosa x inoculantes .....              | 37 |
| 4.2.2. Interacción de Edad x Pasto + Leguminosa .....                     | 37 |
| 4.2.3. Interacción de Edad x inoculantes.....                             | 38 |
| 4.2.4. Interacción Pasto + Leguminosa x inoculantes x edad.....           | 39 |
| 4.3. Longitud de raíz pasto (cm) .....                                    | 39 |
| 4.3.1. Interacción Pasto + Leguminosas x Inoculantes .....                | 39 |
| 4.3.2. Interacción Edad x Pasto + leguminosas .....                       | 40 |
| 4.3.3. Interacción Edad x inoculantes.....                                | 41 |
| 4.3.4. Interacción Pasto + Leguminosa x inoculantes x edad.....           | 41 |
| 4.4. Peso de raíz leguminosa (g) .....                                    | 42 |
| 4.4.1. Interacción Pasto + Leguminosas x Inoculantes .....                | 42 |
| 4.4.2. Interacción Edad x Pasto + leguminosas .....                       | 43 |
| 4.4.3. Interacción Edad x inoculantes en peso de raíz de leguminosa (g) . | 43 |
| 4.4.4. Interacción Pasto + Leguminosa x inoculantes x edad.....           | 44 |
| 4.5. Peso de raíz pasto (g) .....                                         | 45 |
| 4.5.1. Interacción Pasto + Leguminosas x Inoculantes .....                | 45 |
| 4.5.2. Interacción Edad x Pasto + leguminosas .....                       | 46 |
| 4.5.3. Interacción Edad x inoculantes.....                                | 46 |
| 4.5.4. Interacción Pasto + Leguminosa x inoculantes x edad.....           | 47 |
| 4.6. Peso forraje leguminosa (g).....                                     | 48 |
| 4.6.1. Interacción Pasto + Leguminosas x Inoculantes .....                | 48 |
| 4.6.2. Interacción Edad x Pasto + leguminosas .....                       | 48 |
| 4.6.3. Interacción Edad + inoculantes .....                               | 49 |
| 4.6.4. Interacción Pasto + Leguminosa x inoculantes x edad.....           | 50 |
| 4.7. Peso forraje pasto (g) .....                                         | 50 |
| 4.7.1. Interacción Pasto + Leguminosas x Inoculantes .....                | 50 |
| 4.7.2. Interacción Edad x Pasto + leguminosas .....                       | 51 |
| 4.7.3. Interacción Edad + inoculantes .....                               | 52 |
| 4.7.4. Interacción Pasto + Leguminosa x inoculantes x edad.....           | 52 |
| 4.8. Total forraje .....                                                  | 53 |
| 4.8.1. Interacción Pasto + Leguminosas x Inoculantes .....                | 53 |
| 4.8.2. Interacción Edad x Pasto + leguminosas .....                       | 54 |
| 4.8.3. Interacción Edad + inoculantes .....                               | 54 |

|                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| 4.8.4. Interacción Pasto + Leguminosa x inoculantes x edad..... | 55 |
| 4.9. Análisis Bromatológico .....                               | 56 |
| 4.10. Composición microbiológica .....                          | 56 |
| V. DISCUSIÓN.....                                               | 61 |
| VI. CONCLUSIONES.....                                           | 63 |
| VII. RECOMENDACIONES.....                                       | 65 |
| VIII. RESUMEN.....                                              | 66 |
| XI. SUMMARY .....                                               | 68 |
| X. BIBLIOGRAFÍA.....                                            | 70 |
| XI. ANEXO .....                                                 | 74 |

## ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro |                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Página |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1      | Condiciones Meteorológicas del sitio de investigación..                                                                                                                                                                                                                                                      | 27     |
| 2      | Esquema del Análisis de Varianza.....                                                                                                                                                                                                                                                                        | 29     |
| 3      | Esquema del experimento.....                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 30     |
| 4      | Efecto simple de edades en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> ).....                                                           | 34     |
| 5      | Efectos simple asociación pastos – leguminosas en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> ) .....                                   | 35     |
| 6      | Efectos simples de inoculantes en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> )....                                                     | 36     |
| 7      | Composición bromatológica de dos asociaciones de pastos con leguminosas a los 45 días en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> ). | 57     |
| 8      | Composición bromatológica de dos asociaciones de pastos con leguminosas a los 60 días en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> ). | 58     |
| 9      | Composición microbiológica de dos asociaciones de pasto-leguminosa.....                                                                                                                                                                                                                                      | 59     |
| 10     | Poblaciones totales de bacterias, hongos y actinomicetos en las asociaciones de pasto- leguminosas.....                                                                                                                                                                                                      | 60     |

## ÍNDICE DE FIGURA

| Figura |                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Página |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1      | Pasto + Leguminosas x Inoculantes en longitud de raíz leguminosa cm en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> ).....        | 37     |
| 2      | Edad x Pasto + leguminosas en longitud de raíz leguminosa (cm) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> ).....             | 38     |
| 3      | Edad + inoculantes en longitud de raíz leguminosa (cm) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> ).....                     | 38     |
| 4      | Pasto + Leguminosa x inoculante x edad en longitud de raíz leguminosa (cm) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> )..... | 39     |
| 5      | Pasto + Leguminosas x Inoculantes en Longitud de raíz pasto (cm) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> ).....           | 40     |
| 6      | Edad x Pasto + Leguminosas en Longitud de raíz pasto (cm) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> ).....                  | 40     |
| 7      | Edad + inoculantes en Longitud de raíz pasto (cm) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> ).....                          | 41     |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 8  | Pasto + Leguminosa x inoculantes x edad en Longitud de raíz pasto (cm) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> )..... | 42 |
| 9  | Pasto + Leguminosas x Inoculantes en peso de raíz de leguminosa (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> ).....    | 42 |
| 10 | Edad x Pasto + leguminosas en peso de raíz de leguminosa (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> ).....           | 43 |
| 11 | Edad + inoculantes en peso de raíz de leguminosa (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> ).....                   | 44 |
| 12 | Pasto + Leguminosa x inoculantes x edad en peso de raíz leguminosa (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> )..... | 45 |
| 13 | Pasto + Leguminosas x Inoculantes en Peso de raíz pasto (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> ).....            | 45 |
| 14 | Edad x Pasto + leguminosas en Peso de raíz pasto (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> ).....                   | 46 |
| 15 | Edad + inoculantes en Peso de raíz pasto (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> ).....                           | 47 |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 16 | Pasto + Leguminosa x inoculantes x edad en peso de raíz leguminosa (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> )..... | 47 |
| 17 | Pasto + Leguminosas x Inoculantes en Peso forraje leguminosa (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> ).....       | 48 |
| 18 | Edad x Pasto + leguminosas en Peso forraje leguminosa (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> ).....              | 49 |
| 19 | Edad + inoculantes en Peso forraje leguminosa (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> ).....                      | 49 |
| 20 | Pasto + Leguminosa x inoculantes x edad en Peso forraje leguminosa (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> )..... | 50 |
| 21 | Pasto + Leguminosa x inoculantes en Peso forraje pasto (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> ).....             | 51 |
| 22 | Edad x Pasto + leguminosas en Peso forraje pasto (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> ).....                   | 51 |
| 23 | Edad + inoculante en Peso forraje pasto (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> ).....                            | 52 |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 24 | Pasto + Leguminosa x inoculantes x edad en Peso forraje pasto (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> )..... | 53 |
| 25 | Pasto + Leguminosas x Inoculantes en Total forraje en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> ).....                | 53 |
| 26 | Edad x Pasto + leguminosas en Total forraje en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> ).....                       | 54 |
| 27 | Edad x Pasto + leguminosas en Total forraje en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> ).....                       | 55 |
| 28 | Pasto + Leguminosa x inoculantes x edad en Total forraje en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray grass ( <i>Lolium perenne</i> L.) con Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) y Trébol rojo ( <i>Trifolium pratense</i> ).....          | 55 |

## ÍNDICE DE ANEXO

| <b>Anexos</b> |                                                  | <b>Pág.</b> |
|---------------|--------------------------------------------------|-------------|
| 1             | Lugar de la investigación.....                   | 74          |
| 2             | Distribución de las unidades experimentales..... | 74          |
| 3             | Distribución de los tratamientos.....            | 75          |
| 4             | Semillas Ray gras + Alfalfa.....                 | 75          |
| 5             | Mediciones experimentales.....                   | 76          |
| 6             | Peso de raíz.....                                | 76          |
| 7             | Conteo de nódulos.....                           | 77          |
| 8             | Toma de muestras de pastos.....                  | 77          |
| 9             | Presupuesto de la investigación.....             | 78          |

## I. INTRODUCCIÓN

El crecimiento de las plantas en los suelos agrícolas está influenciada por una multitud de factores bióticos y abióticos. Mientras que los productores utilizan de manera rutinaria métodos físicos para manejar el ambiente del suelo y el rendimiento de los cultivos, la aplicación de productos microbianos para este fin es menos común.

En consecuencia, la rizosfera apoya activamente las poblaciones microbianas y de gran capacidad para ejercer un beneficio, o perjudiciales efectos neutrales sobre el crecimiento de las plantas. Estos microorganismos beneficiosos pueden ser un componente importante de las prácticas de gestión para alcanzar el rendimiento posible, que se ha definido como el rendimiento del cultivo limitado por el entorno físico natural del cultivo y su potencial genético innato. **Beniziri, et al; (2001).**

En las condiciones medioambientales adecuadas, las bacterias fijadoras de nitrógeno producen enzimas que toman el nitrógeno en su forma gaseosa de la atmósfera, y, con los azúcares que obtienen de la planta, fijan el nitrógeno dentro de la biomasa bacteriana. **Garland, (2006).**

Se dan dos grandes divisiones de bacterias fijadoras de nitrógeno: las bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas y las bacterias fijadoras de nitrógeno asociativas. Las bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas, tales como el *Rhizobium*, se dan en las leguminosas. Estas bacterias forman nódulos en las raíces de las plantas. Y estos nódulos son fáciles de contar. Las bacterias fijadoras de nitrógeno asociativas ocupan los espacios entre las células de las raíces de la planta, y no alteran la arquitectura de la raíz en absoluto. **Sonrensen, et al; (2001).**

Las bacterias PGPR o Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal comenzaron a ser aisladas, clasificadas y estudiadas hacia fines del siglo XIX. Durante el siglo XX se profundizaron los conocimientos sobre las

características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas y genéticas de cada uno de estos grupos bacterianos. La importancia de las poblaciones microbianas de la rizosfera de mantenimiento de la salud de las raíces, la absorción de nutrientes, y la tolerancia del estrés ambiental se reconoce ahora. **Beniziri, et al (2001)**

Los microorganismos descubiertos y estudiados son numerosos y sabemos que quedan muchos por aislar e investigar. No obstante ello, hoy disponemos de grupos bacterianos que son capaces de proporcionarnos impactos productivos interesantes en cultivos. Uno de éstos es el de *Pseudomonas* spp, y particularmente, un pequeño grupo de cepas denominadas *Pseudomonas fluorescens*. **Fyo.com, (2009).**

La posibilidad de manipular las poblaciones microbianas de la rizosfera de cultivos mediante la inoculación de bacterias beneficiosas para aumentar el crecimiento de las plantas ha demostrado una promesa considerable en los estudios de laboratorio e invernadero, pero las respuestas han sido variables en el campo. Sin embargo los beneficios ambientales potenciales de este enfoque, da lugar a una reducción en el uso de productos químicos agrícolas. **Basan, (2008).**

## **1.1. Objetivos**

### **1.1.1. Objetivo General**

- Determinar la población microbiana en la asociación de pastos con leguminosas mediante la inoculación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal.

### 1.1.2. Objetivos Específicos

- Inocular las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal: *Azotobacter chroococum*, *Azotobacter Vinelandii*, *Beijerinckii*, *fluorescens* en las asociaciones gramíneas-leguminosas en estudio.
- Identificar las poblaciones de bacterias y hongos existentes en las asociaciones gramínea-leguminosa: pasto Ray Grass (*Lolium perenne* L.) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol Rojo (*Trifolium pratense*) por cada inoculante bacteriano aplicado, y en dos edades de cosecha (45 y 60 días).
- Realizar análisis bromatológicos para determinar el valor nutricional; por inoculante bacteriano aplicado y estado de madurez; gramínea – leguminosa: pasto Ray Grass (*Lolium perenne* L.) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol Rojo (*Trifolium pratense*)

### 1.4. Hipótesis

- La asociación gramínea-leguminosa: pasto Ray Grass (*Lolium perenne* L.) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol Rojo (*Trifolium pratense*) inoculada con *Azotobacter chroococum* mostrará la mayor población microbiana.
- El valor nutritivo de la asociación gramínea-leguminosa: pasto Ray Grass (*Lolium perenne* L.) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol Rojo (*Trifolium pratense*), inoculada con *Azotobacter chroococum* será superior en las dos edades de cosecha.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Generalidades

#### 2.1.1. Bacterias del suelo

Las bacterias representan menos del 10% de la biomasa del suelo, lo puede alcanzar entre 300 y 3.000 Kg/ha<sup>-1</sup>. Se estima que un gramo de suelo puede contener de 10<sup>8</sup> a 10<sup>10</sup> bacterias, cuantificadas por métodos directos, mientras que en conteos indirectos, sobre medios de cultivo las cantidades son menores dada la imposibilidad de tener medio de cultivo universal que satisfaga plenamente las necesidades nutricionales de todos los grupos. **Atlas, et al; (2002).**

Algunas especies de bacterias son muy frágiles y pueden morir por leves cambios en el ambiente del suelo, otras especies son muy resistentes, capaces de soportar calores intensos, el frío o el secado, algunas pueden permanecer latentes durante décadas de espera para condiciones favorables. Otros pueden extraer nitrógeno directamente del aire o descomponer algunas sustancias tóxicas. **Smith, et al; (2009).**

Las poblaciones de microbios pueden disminuir por espacios de unos días en respuesta a los cambios en el suelo, la humedad, la temperatura del suelo o sustrato de carbono. Para obtener una ventaja en este proceso, muchos microbios liberan sustancias antibióticas para suprimir partículas competidoras. De esta manera algunas especies pueden suprimir otras enfermedades que causan los microorganismos. **Atlas, et al; (2002).**

## 2.2. Tipos de Bacterias

### 2.2.1. Descomponedoras

Las bacterias desempeñan un papel importante en la descomposición de muchos materiales orgánicos, sobre todo en las primeras etapas de descomposición cuando los niveles de humedad son altos. En las últimas etapas de descomposición, los hongos tienden a dominar.

*Bacillus subtilis* y *Pseudomona fluorescens* son ejemplos de bacterias descomponedoras. La adición de estas bacterias no se ha demostrado para acelerar la formación del compost o humus en el suelo. **Atlas, et al; (2002).**

### 2.2.2. Fijadores de nitrógeno

Las bacterias *Rhizobium* pueden realizar la inoculación en semillas de leguminosas para la fijación de nitrógeno en el suelo. Estas bacterias fijadoras de nitrógeno viven en nódulos de las raíces de leguminosas. Extraen el nitrógeno del aire y lo convierten en formas que la planta puede usar. Esta forma de fijación de nitrógeno puede añadirse a un equivalente de más de 100 Kg de nitrógeno por hectárea y por año.

*Axotobacter*, *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Gluconobacter*, *Flavobacterium* y *Herbaspirillum* son ejemplos de vida libre que fijan el nitrógeno asociado con leguminosas. Hasta la fecha la inoculación del suelo con estos organismos no ha demostrado ser un medio eficaz. **Atlas, et al; (2002).**

## 2.3. Efecto de los microorganismos en la estructura y fertilidad del suelo

### 2.3.1. Nitrificación

En el proceso de nitrificación participan bacterias, hongos y actinomicetos. Por la actividad enzimática de los microorganismos, azúcares y otros de la materia orgánica, se forma un producto final llamado  $(\text{NH}_4^+)$ . **Arias, (2007).**

Se necesitan dos pasos distintos para que esto suceda.

1. Las *Nitrosomonas* sp. oxidan el amonio en un producto intermedio, el nitrito.
2. Las *Nitrobacter* sp. transforman el nitrito en nitrato.

Las bacterias nitrificantes se consideran bacterias autótrofas, o bacterias que utilizan el  $\text{CO}_2$  como fuente de carbono para su crecimiento. **Jiménez, (2007).**

La primera etapa se conoce como amonificación. Los iones de amonio pueden ser absorbidos por las raíces de las plantas, o bien son absorbidos a las partículas de arcilla y humus, o pueden perderse por lavado con las fuertes lluvias. En la segunda etapa de la nitrificación el amonio se oxida y pasa a formar nitrito ( $\text{NO}_2$ ) por actividad de la bacteria *nitrosoma*. La tercera y última etapa de la nitrificación es del nitrito ( $\text{NO}_2$ ) a nitrato ( $\text{NO}_3$ ) por oxidación. La bacteria responsable de esta reacción se llama *nitrobacter*. **Arias, (2007).**

Las bacterias que participan en el proceso de nitrificación son aeróbicas (necesitan oxígeno) y por lo tanto exigen suelos aireados y bien drenados. Cuando un suelo está mal drenado, se satura con agua y ocurre que se activan otras bacterias anaeróbicas que toman el oxígeno de los nitratos y forman óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) o nitrógeno libre ( $\text{N}_2$ ), ambos son gases que se escapan por difusión gaseosa a la atmosfera y se pierde así el nitrógeno del suelo. **Navarro, (2003).**

### **2.3.2. Fijación no simbiótica del nitrógeno**

Existen bacterias y algas capaces de fijar el nitrógeno atmosférico incorporándolo a su propio organismo y al morir la bacteria o el alga, el nitrógeno se incorpora al suelo. Las bacterias *clostridium* y *azobacter* son representantes de esta forma no simbiótica de fijar nitrógeno. **Arias, (2007).**

### **2.3.3. Fijación simbiótica del nitrógeno**

La bacteria llamada *Rhizobium* tiene la capacidad de vivir en las raíces de las leguminosas, y allí forma nódulos en las células corticales habitadas por las bacterias.

La bacteria captura el nitrógeno gaseoso y lo incorpora a su citoplasma, la planta proporciona carbohidratos a la bacteria. Estos carbohidratos posteriormente se oxidan y brindan energía a la bacteria. A cambio, la bacteria proporciona a la planta proteínas y aminoácidos. Esta fijación de nitrógeno es posible solo mediante el intercambio (simbiosis) de la planta y la bacteria. **Jiménez, (2007).**

### **2.3.4. Mecanismos y factores influyentes de la nitrificación**

Cuando las condiciones son favorables, una parte del amonio liberado en el proceso de amonificación es inmediatamente oxidado a nitrato, que es la forma principal de utilización del nitrógeno por los vegetales superiores. En suelos apropiados para el desarrollo de microorganismos nitrificantes, esta oxidación es tan rápida que el amoniaco casi no puede detectarse, y es muy difícil ponerlo en evidencia en cantidades apreciables.

Esta oxidación la efectúan un conjunto de bacterias muy sensibles a los agentes externos y comprendidos en un grupo bastante reducido de especies aerobias. **Navarro, (2003).**

### **2.3.5. Reacción del suelo y presencia de diversos elementos**

Las bacterias nitrificantes aparecen en mayor cantidad en suelos fértiles. Su número depende en gran manera de la reacción del suelo. En este aspecto una reacción ligeramente alcalina es la más favorable. Los límites de pH entre los que la nitrificación tiene lugar se sitúan entre 5'5 y 8, con un óptimo de 6'9 y 7'5. A medida que aumenta la acidez del suelo, la nitrificación se debilita debida a la sensibilidad de los organismos nitrificantes a bajo pH. **Jiménez, (2007).**

Las bacterias nitrificantes requieren también un suministro adecuado de calcio, fósforo, cobre y magnesio, aunque no se ha determinado sus exactas necesidades. Otros oligoelementos como hierro, molibdeno, boro wolframio y vanadio, se consideran estimulantes en concentraciones bajas, pero se transforman en inhibidores en concentraciones superiores al 1%. Un exceso de cloruros paraliza la acción de estos microorganismos. **Arias, (2007).**

### **2.3.6. Aireación del suelo**

Las bacterias nitrificantes son microorganismos aeróbicos típicos. No producen nitratos en ausencia de oxígeno molecular. Por ello cualquier procedimiento que aumente la aireación del suelo favorecerá la nitrificación del suelo. El arado y prácticas de cultivo son operaciones favorables para ella, ya que permiten la rápida difusión del aire hacia el exterior y hacia el interior del suelo. **Navarro, (2003).**

Los suelo que son de textura gruesa, o que poseen una buena estructura, facilitan este movimiento y aseguran un suministro adecuado de oxígeno para las nitrobacterias.

Los resultados experimentales obtenidos en condiciones controladas de laboratorio, permiten afirmar que la máxima nitrificación aparece cuando el

porcentaje de oxígeno en el aire del suelo es del 20%, casi igual al que posee la atmósfera terrestre. **Jiménez, (2007).**

### **2.3.7. Humedad del suelo**

La actuación de la nitrobacterias está altamente controlada por el contenido de agua en el suelo. En general la nitrificación tiende a disminuir tanto en condiciones de excesiva humedad, como aquellas de escasez. **Navarro, (2003).**

En realidad, existe para cada suelo un óptimo de humedad por encima y por debajo del hay más lentitud en la producción de nitratos. **Navarro, (2003).**

## **2.4. Interacciones entre microorganismos y plantas**

Las raíces de las plantas son unos hábitats propicios para el desarrollo de microorganismos. Son muchas y muy variadas las poblaciones microbianas que se encuentran asociadas a las raíces de las plantas. Las interacciones entre los microorganismos del suelo y las raíces de las plantas satisfacen requerimientos nutritivos básicos para la planta y para las comunidades microbianas asociadas a ella. Esto se evidencia por el elevado número de microorganismos que se hallan en el rizoplasma. **Atlas, et al; (2002).**

## **2.5. Efectos de las raíces en las poblaciones de microorganismos**

La estructura del sistema radical contribuye a establecer la población microbiana en la rizosfera. Las interacciones entre las raíces y los microorganismos de la rizosfera se basan principalmente en la modificación interactiva del ambiente del suelo por procesos como: captación de agua por la planta, liberación de compuestos orgánicos al suelo por las raíces, producción microbiana de factores de crecimiento vegetal, captura de nutrientes minerales por parte de los microorganismos. **Wild, (2005).**

En la rizosfera, las raíces de las plantas tienen una influencia directa en la composición y en la densidad de la microbiota del suelo; a lo que se conoce como efecto rizosférico. Este efecto puede verse como la relación entre el número de microorganismos en el suelo de la rizosfera(R) y el número de microorganismos en el suelo alejado de las raíces (S). Generalmente la relación R/S oscila entre 5 y 20, pero es normal encontrar valores R/S de 100, es decir, poblaciones microbianas 100 veces mayores en la rizosfera que en el suelo sin raíces de los alrededores. **Taiz, et al; (2006).**

El alcance real del efecto rizosférico depende de cada planta en particular y de su estado de madurez fisiológica.

Las raíces rodeadas por microorganismos excretan una cantidad de materiales orgánicos mucho mayor que las raíces estériles. A pesar de que algunos de estos materiales inhiben a los microorganismos, la mayoría estimulan su crecimiento. La influencia de los materiales liberados por las plantas al suelo se pone de manifiesto porque las poblaciones bacterianas de la rizosfera presentan propiedades nutritivas muy distintas de las poblaciones que crecen en el suelo sin raíces. **Taiz, et al; (2006).**

## 2.6. Rizobacterias

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) se definieron por primera vez por Kloepper y Schroth para describir las bacterias del suelo que colonizan las raíces de las plantas después de la inoculación a la semilla, y que mejoran el crecimiento de las plantas. **Bowen, et al; (2007).**

En años recientes se ha caído en cierta controversia, ya que no se sabe hasta qué punto se puede considerar una Rizobacteria como PGRP, por lo que se han establecido 4 características que definen este grupo:

- a. Que no requieran de la invasión interna de los tejidos en plantas, como ocurren en hongos micorrízicos con la formación de arbusculos o nódulos en el caso de *Rhizobium*

- b. Que tengan una elevada densidad poblacional en la rizósfera después de su inoculación, ya que una población que declina rápidamente tiene una baja capacidad competitiva con la microflora nativa del suelo.
- c. Que presenten capacidad de colonización efectiva en la superficie de la raíz, y como consecuencia, puedan influir positivamente en el crecimiento de la planta.
- d. Que no produzcan daños al hombre ni a otros microorganismos.

A continuación están implícitos en el proceso de colonización: la capacidad para sobrevivir en la inoculación de semillas, que se multiplican en el espermosfera (región que rodea a la semilla) en respuesta a los exudados de semillas, para fijar a la superficie de la raíz, y colonizar el sistema radicular en desarrollo. **Bowen, et al; (2007).**

Una variedad de características de bacterias y genes específicos contribuyen a este proceso, pero sólo unos pocos han sido identificados. Estos incluyen la motilidad, la quimiotaxis y exudados de raíz las semillas, la producción de las fimbrias o pili, la producción de componentes específicos en la superficie celular, la capacidad de utilizar los componentes específicos de los exudados de las raíces, la secreción de proteínas, así como la detección de quórum.

Las PGPR pueden actuar de manera directa e indirecta:

Mecanismos indirectos: Los metabolitos producidos por las PGPR pueden funcionar como determinantes antagónicos, involucran aspectos de control biológico, suprimen o inhiben el crecimiento de microorganismos perjudiciales para el desarrollo de la planta, vía producción de sideróforos, antibióticos, acción de enzimas líticas, glucanazas, quitinasas) o inducción de mecanismos de resistencia, **Sorensen, et al; (2001)**

Mecanismos directos: ocurre cuando los metabolitos producidos por algunas cepas de rizobacterias son utilizados como reguladores de crecimiento o precursores de estos por parte de la planta.

La conjunción de ambos mecanismos de acción ha dado como resultado la producción evidente del crecimiento en plantas; se ha observado un incremento en la emergencia, el vigor y peso de las plántulas, un mayor desarrollo en sistemas radiculares y un incremento de hasta 30% en la producción de cultivos de interés comercial, tales como papa, rábanos, jitomate, trigo y soya.

La mayoría de las investigaciones realizadas en este ámbito se han enfocado a la elucidación de estos mecanismos involucrados en el control biológico, y relativamente poco en el conocimiento relacionado con la promoción directa. **Bowen, et al; (2007).**

Esto ha dejado pauta para realizar estudios que consideren principalmente la densidad del inóculo, fisiología de la cepa promotora, temperatura, propiedades del suelo, cultivo y genotipo de la planta; el objetivo es entender de manera clara los mecanismos de promoción de crecimiento de plantas inducido por cepas PGPR, con el propósito de aislar y seleccionar nuevas cepas que representen una fuente exitosa de inoculantes biológicos en la agricultura, así como en la elaboración de productos comerciales. **Kloepper, (2008).**

## **2.7. Microorganismos, biofertilizantes y biofertilización**

Los biofertilizantes pueden considerarse como tecnologías “apropiables”, término creado por FAO para las herramientas biotecnológicas que contribuyen al desarrollo sostenible y que proveen beneficios tangibles a los destinatarios, son ambientalmente seguras y socioeconómicas y culturalmente adaptables. **Kloepper, (2008).**

### 2.7.1. Inoculante bacteriano

Son formulaciones que contienen uno o más géneros bacterianos (o especies) en un portador de fácil uso ya sea orgánico o sintetizado a partir de moléculas definidas. El inoculante es el medio de transporte bacteriano desde la fábrica o almacén hacia las plantas, con el fin de mejorar la planta de crecimiento, ya sea:

- La liberación de los nutrientes del suelo para las plantas.
- Entrando en simbiótica relación con los sistemas de raíces de las plantas.
- Actuando como antagonistas organismos contra los patógenos de plantas.

El suelo inoculantes utilizados más comúnmente son rizobacterias que viven en simbiosis con las legumbres como los guisantes, habas, etc. Estas bacterias viven dentro de nódulos especializados en los sistemas radiculares de las leguminosas, donde el proceso atmosférica de nitrógeno en una forma disponible para las plantas para su uso. **Kloepper, (2008)**. Otro grupo de inoculantes del suelo comunes son micorrizas hongos, que se unen a las raíces de muchas especies de plantas y ayudar a conducir el agua y los nutrientes para las plantas para su uso.

Los efectos deseados del inoculante sobre el crecimiento de las plantas puede incluir la fijación del nitrógeno en leguminosas, biocontrol de patógenos procedentes del suelo, degradación de minerales del suelo, incremento de la asimilación de nutrientes, efectos nutricionales u hormonales y otros. **Smith, (2009)**.

### 2.7.2. *Azotobacter* spp.

Las bacterias aerobias de vida libre fijadoras de N<sub>2</sub> más conocidas se encuentran formando parte de las familias Azotobacteriaceae, Spirillaceae y Bacillaceae.

Del género *Azotobacter* se han descrito varias especies: *Azotobacter chroococcum* (Beijerinckii 1901), *A. vinelandii* (Lipman 1903), *A. agilis* (Beijerinckii; Winogradsky 1938) y *A. paspali* (Döbereiner 1966); sin embargo no todas tienen características perfectamente definidas. **Martínez, et al; (2000).**

Según González y Lluch (1992) los microorganismos del género *Azotobacter* se describieron por primera vez por Beijerinckii en 1901, desde este momento hasta nuestros días, estas bacterias han llamado la atención de numerosos investigadores por su importancia tanto teórica como práctica. La morfología de *Azotobacter* ha sido y es, uno de los apartados de estudio más atractivo de este género bacteriano. **González, et al; (2002).**

Así, la citología de estas bacterias no solo se altera por las condiciones ambientales, sino que más bien varía de una forma extrema. Winogradski en 1938 observó que la presencia en el medio de cultivo de compuestos carbonados como el n-butanol daba lugar a la formación de células vegetativas normales, pero en función del periodo de incubación se originaban células cocoides denominadas quistes. Pochon y Tchan en 1948, consideraron a estos quistes como formas de reposo. Más tarde Socolofsky y Wyss en 1962, demostraron la característica de resistencia de estas formas quísticas. **Martínez, et al; (2000).**

Este género comprende bacterias grandes, levaduriformes, aerobias estrictas, no esporógenas y Gram negativos; son mesófilas y su temperatura óptima de desarrollo es de 30 °C. La eficacia media en relación con el N<sub>2</sub> fijado por unidad de azúcar descompuesto es de 5 – 10 g, lo cual se cataloga como bajo.

El pH óptimo de crecimiento es de 6 y a niveles inferiores disminuyen las cantidades de N<sub>2</sub> fijado y hasta puede inhibirse su actividad metabólica.

La capacidad de fijación de N<sub>2</sub> por estas bacterias varía considerablemente en dependencia de la composición del medio, su acidez, temperatura y aireación, de la presencia de N combinado, de la naturaleza de las fuentes de carbono, micro elementos y de la acción de organismos antagónicos en el medio.

El efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la fijación de N<sub>2</sub> por esta especie depende de la estructura de las sustancias orgánicas y de las reservas de energía química utilizable que contiene, siendo también importantes los procesos de oxidación de la materia orgánica durante la respiración. **Martínez, et al; (2000).**

La propagación de estas bacterias está relacionada estrechamente con la presencia en el medio de suficientes cantidades de fósforo (P) y potasio (K), siendo mayor el efecto del P, cuya escasez o ausencia puede hasta inhibir el desarrollo del cultivo. Este elemento estimula el metabolismo del carbono, la multiplicación y la fijación de N<sub>2</sub>. Las cantidades necesarias de K son menores, cuando existen altas concentraciones de este en el suelo se inhibe el desarrollo de las bacterias fijadoras, dependiendo del grado de toxicidad de la fracción aniónica de sal. **Rodelas, et al; (2009).**

Los requerimientos de micro elementos son notables, el molibdeno (Mo) es esencial para la mayoría de las cepas de este género, tanto cuando crecen sobre medios libre de nitrógeno como cuando se desarrollan sobre nitratos, aunque las necesidades son mayores en ausencia de nitrógeno combinado.

Según Rodelas (2001), dentro del grupo de los fijadores de vida libre el género *Azotobacter* presenta la capacidad de fijar N<sub>2</sub> atmosférico cuando en el suelo existen suficientes cantidades de materia orgánica, ya que en suelos poco fértiles con escaso contenido de materia orgánica no se obtiene efecto agronómico positivo (19). González y Lluch (1992) reportan que el género

Azotobacter presenta alta capacidad de biodegradación, muy especialmente para la oxidación de compuestos fenólicos sustituidos. **González, et al; (2002).**

Este hecho resulta de especial interés, basándose en recientes observaciones que muestran como estas bacterias aumentan su actividad biológica (incluyendo la capacidad fijadora de N<sub>2</sub>) en suelos agrícolas adicionados de residuos que poseen un alto contenido en sustancias fenólicas, pudiéndose sugerir que estos microorganismos pueden contribuir a la biotransformación de este tipo de residuos cuando se usen como fertilizantes.

En este contexto estos diazótrofos están considerados por algunos investigadores como bacterias ciertamente ideales para los procesos de descontaminación de suelos agrícolas con sustancias xenobióticas. **Torres, (2005).**

#### **2.7.2.1. Producción de sustancias fisiológicamente activas y aplicación práctica de Azotobacter sp.**

Desde el punto de vista histórico, es Azotobacter el microorganismo que de una forma más amplia ha sido utilizado en la agricultura. Las primeras aplicaciones de estas bacterias datan de 1902, alcanzando una amplia utilización durante las décadas del 40, 50 y 60, particularmente en los países de Europa del Este. **González, et al; (2002).**

La aplicación práctica de la inoculación de este diazotrófo ha sido positiva, observándose notables incrementos en los rendimientos en diferentes cultivos, principalmente en cereales.

Estos resultados obtenidos, especialmente con la inoculación de Azotobacter chroococcum y Azospirillum brasilense, no deben atribuirse exclusivamente a la ganancia de N<sub>2</sub> por las plantas, ya que estos microorganismos en determinadas condiciones su efecto beneficioso se debe fundamentalmente a la capacidad de solubilizar fosfatos y sintetizar sustancias estimuladoras del

crecimiento vegetal, tales como, vitaminas y hormonas vegetales que intervienen directamente sobre el desarrollo de las plantas. **Puertas, et al; (2009).**

De este modo *A. chroococum* sintetiza tiamina de 50–100 mg g<sup>-1</sup> de sustancia celular seca; ácido nicotínico de 200–600 mg g<sup>-1</sup> de sustancia celular seca y ácido pantoténico y biotina; ácido indolacético (AIA); ácido giberélico y citoquininas. **Rodelas, et al; (2009).**

La producción de estas sustancias por *Azotobacter*, se ve influenciada por el estado fisiológico de la bacteria y por la edad de los cultivos, habiéndose demostrado que la presencia de nitrógeno combinado modifica la producción de auxinas y giberelinas. Concretamente la presencia de nitrato inhibe la liberación de auxinas, mientras que en sentido contrario incrementa la producción de giberelinas.

La adición de exudados radicales de ciertos cereales colonizados por *Azotobacter*, determinan aumentos significativos en la producción de auxinas, giberelinas y citoquininas, siendo este efecto más evidente cuando los exudados se obtienen de plantas de más de 30 días de crecimiento. **González, et al; (2002).**

Además de los compuestos mencionados, estos diazótrofos son capaces de sintetizar sustancias fungistáticas que, al inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos del suelo, promueven indirectamente el desarrollo de las plantas, especialmente en las etapas tempranas del cultivo.

Estos compuestos tienen acción sobre hongos pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium* y *Rhizoctonia*, variando su acción antagónica con la cepa bacteriana utilizada. Mediante su acción conjunta, estas sustancias son capaces de estimular la germinación de las semillas y acelerar el crecimiento de las plantas siempre y cuando sea adecuada la concentración de organismos en la rizosfera de las plantas. **Mayea, et al; (2008).**

## 2.8. Efectos de la inoculación de *Azotobacter* spp

El efecto de la inoculación con *Azotobacter chroococum* sobre la germinación y crecimiento de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) en suelos Ferralíticos Rojos resulta coincidente para todas las variedades analizadas. La población de plántulas por m<sup>2</sup> aumentó entre 36% (Cambell-28) y 78% (CI-289-RA) respectivamente, así como la altura se incrementó en 34% (C-28-V) y 96% (Nova-2) y el diámetro del tallo entre 37% (C-28-V) y 100% (Tropical-3).

El número de hojas aumentó entre 22% (Tropical-1) y 42% (Línea-94) y el peso seco de 50 plántulas entre 38% (Nova-2) y 27.6% (Tropical-3). Estos resultados indican la posibilidad de acortar el periodo que transcurre entre la siembra del semillero y el momento en que las plántulas están aptas para el trasplante. **Martínez, et al; (2000).**

Estos resultados coinciden con los analizados por Puertas y González (1999), donde al estudiar la efectividad de cepas de *Azotobacter chroococum* aisladas de la rizosfera de plántulas de tomate en suelos Pardos y Vertisoles, se apreció que todas estimularon en mayor o menor cuantía, al menos uno de los indicadores del crecimiento evaluados, lo que sugiere que la producción de sustancias fisiológicamente activas, constituye un factor común a dichas cepas. **Puertas, et al; (2009).**

En este sentido Abbass y Okon (1993) encontraron similares resultados, pero con diferentes cepas de *Azotobacter paspali* y señalaron que la diversidad de origen no tiene que estar siempre asociada a la diversidad genética.

En estudios realizados sobre la eficiencia de la fijación de N<sub>2</sub> y la susceptibilidad a bacteriófagos de *Azotobacter chroococum* libre y encapsulado con alginato, en condiciones controladas (in vitro) y bajo condiciones de campo (in vivo), en la Estación Experimental de la Facultad Agrícola de la Universidad de Minia, Egipto, demostró que en condiciones in

vitro, las células encapsuladas exhibieron mayor actividad del sistema nitrogenasa que en la forma libre.

Varios son los cultivos en los cuales la aplicación de *Azotobacter chroococum* como biofertilizante ha resultado satisfactoriamente positiva. Rodríguez y Blanco (1994) realizaron un trabajo experimental en condiciones semicontroladas en viveros de café (*Coffea arabica*), demostrando que con el uso de *Azotobacter chroococum* hay una mejor uniformidad en las posturas de este cultivo, así como un mayor vigor de las mismas, las cuales en el momento de la extracción del vivero hacia el campo presentaban un color uniforme en su sistema radicular, características de posturas sanas, vigorosas y con alto valor ecológico. **Höfflich, et al; (2006).**

En este sentido González et al. (1994) al analizar los resultados de la inoculación de 8 cepas de *Azotobacter* sobre los parámetros de crecimiento y desarrollo de vitroplantas de piña (*Anana comosa*), cv Cayena lisa, durante la fase de adaptación demostraron que en sentido general todas las cepas estudiadas estimularon el crecimiento de las vitroplantas, con valores significativamente superiores al testigo, lo que permite acortar el periodo de adaptación de las mismas. **González, et al; (2002).**

En el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta*) Roque et al. (1994) al analizar la respuesta a la fertilización nitrogenada y su combinación con biofertilizantes en el clon CMC-40 en suelo Ferralítico Rojo hidratado, demostraron que los mejores resultados se obtuvieron con la combinación biofertilizante-fertilización mineral, destacándose *Azotobacter* como biofertilizante. Los máximos rendimientos en la primera cosecha oscilaron entre 43 y 46 t ha<sup>-1</sup>, se alcanzaron al aplicar 100 kg. ha<sup>-1</sup> de N con *Azotobacter* y fosforina individualmente o combinados. **Roque, et al; (2007).**

En papa (*Solanum tuberosum*) Del Castillo y Montes de Oca (1994) estudiaron el efecto del uso de bacterias solubilizadoras de fósforo (P) y fijadores de N<sub>2</sub> sobre el rendimiento de este cultivo en las variedades Atlantic y Desiree de

producción nacional sobre suelos Ferralítico Púrpura seleccionado con diferentes valores de pH y P soluble, donde se analizaron diferentes dosis de fertilizantes minerales a 50 y 100% con aplicación de fosforina (Fb) y Azotobacter (AZ), solos y combinados en diferentes dosis y momentos de aplicación. **Del Castillo, et al; (2007).**

Los resultados obtenidos muestran que la mejor respuesta a los fertilizantes minerales se encontró con el 50%, similar a los obtenidos con solo aplicar AZ; sin embargo los mejores rendimientos se obtuvieron al combinar el 100% del fertilizante mineral con ambos biopreparados, con incrementos entre 4 y 5 t ha<sup>-1</sup>. El pH del suelo influyó en la cosecha, tanto para AZ como la Fb, con incrementos del rendimiento donde el mismo era neutro a ligeramente ácido contra el ácido entre 0.84 a 1.35 t ha<sup>-1</sup> respectivamente; mientras cuando se combina el pH neutro con un contenido de P soluble bajo hay incrementos de 1.10 t.

Otros estudios son los efectuados con combinaciones microbianas, donde se ha podido comprobar la potenciación de la estimulación en el crecimiento y demás parámetros en las plantas con la aplicación de Azotobacter conjuntamente con hongos micorrizógenos.

Un trabajo realizado a partir de vitroplantas de ñame (*Dioscorea alata L.*) var. Criollo Blanco, las cuales durante la fase de preadaptación fueron sometidas a tratamientos con 2 cepas de MVA (IES-12 e IES-14) inoculadas a razón de 10 g / planta e inmersión de las raíces en un biopreparado de Azotobacter sp. al 20% durante 10 minutos, obtuvieron que la aplicación de biopreparados favorecieron los parámetros morfológicos evaluados (número de hojas, longitud del tallo y el limbo mayor, longitud del peciolo mayor y número de ramas por plantas) al compararlos con el testigo sin aplicación, comportándose como mejor tratamiento la combinación Azotobacter al 20% más la inoculación de la cepa IES-12 (*Glomus caledonicum*). **Andresson, et al; (2005).**

Así mismo Sánchez et al. (1994) , con el objetivo de determinar el efecto de 4 cepas de hongos Micorrizógenos combinados con niveles de Azotobacter sp y

2 proporciones de humus de lombriz sobre el crecimiento de posturas de café (*Coffea arabica*) producidas por el sistema de moteo con poda de raíz, determinaron que la combinación *Glomus fasciculatum* y *Glomus pelú* con *Azotobacter* en la proporción 5/1 mostró los mayores incrementos con respecto a la altura, el diámetro del tallo y el área foliar de las posturas, resultando superiores a los tratamientos testigos. **Sánchez, et al; (2006).**

Se realizó un estudio en suelos Ferralítico Rojo lixiviado típico de montaña y suelos Fersialítico Pardo rojizo en la zona del Escambray, con el objetivo de determinar el efecto de varias cepas de micorrizas y la inoculación de *Azotobacter chroococum* en el cultivo del cafeto.

Los resultados arrojaron que la inoculación simple y combinada de micorrizas y *Azotobacter chroococum*, aunque por lo general resulto positiva, estuvo determinada por la riqueza del sustrato utilizada, obteniéndose en todas las variantes los mejores resultados con la relación 5:1 de suelo-materia orgánica. Con estas alternativas se logra reducir el costo de producción de las posturas de cafeto en viveros. **Días, et al; (2000).**

## 2.9. *Pseudomona fluorescens*

Es un bacilo Gram-negativo, recto o ligeramente curvado pero no vibrioide, es saprófito, (todo lo que ingiere pasa a través de la pared de su citoplasma).

Se puede encontrar en suelo y agua.

Es incapaz de formar esporas y crece aeróbicamente. La temperatura óptima para su funcionamiento es de 25 a 30 °C, aunque puede crecer desde los 5 hasta los 42 °C aproximadamente. No crece bajo condiciones ácidas ( $\text{pH} \leq 4.5$ ) y necesita preferentemente pH neutro. Tiene movimiento activo en líquido por sus flagelos polares (más de 1). Su pigmento fluorescente (fluoresceína) la hace reaccionar frente a la luz ultravioleta, aunque recién cultivada o después de varios cultivos de laboratorio, puede ser que no reaccione. **Sonrensen, et al; (2001).**

Las *Pseudomonas* pueden crecer en un medio mineral con iones de amonio o nitrato y un solo compuesto orgánico que funciona como única fuente de carbono y energía. La ganancia energética es obtenida por respiración aeróbica, no por fermentación y su crecimiento es rápido.

Abundan en la superficie de las raíces, ya que son versátiles en su metabolismo y pueden utilizar varios sustratos producidos por las mismas, pero no establecen una relación simbiótica con la planta.

Una de las características de la *Pseudomonas fluorescens* es su alta capacidad de solubilización del fósforo y la realizan por dos vías: la primera es la producción de ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido oxálico, ácido glucónico) que actúan sobre el pH del suelo favoreciendo la solubilización del fósforo inorgánico y liberando el fosfato a la solución del suelo. **Stanier, et al; (2006).**

La otra vía de acción es a través de las fosfatasas que son enzimas hidrolasas (Monoesterasas y Diesterasas Fosfóricas) que actúan sobre las uniones ésteres liberando los grupos fosfatos de la materia orgánica a la solución del suelo. Ambas vías generan una mayor cantidad de fosfato para ser absorbido por las raíces de las plantas.

Otro aspecto destacable es la posibilidad de que las *Pseudomonas fluorescens* posean la virtud de producir sustancias estimuladoras del crecimiento, ya que las *Pseudomonas* en general pertenecen a un grupo llamado “estimuladores del crecimiento vegetal (MECV)” que poseen la propiedad de producir estas sustancias, cuyas principales ventajas son las de estimular la germinación de las semillas, acelerar el crecimiento de las plantas especialmente en sus primeros estadios, inducir la iniciación radicular e incrementar la formación de raíces y pelos radiculares. **Gamazo, et al; (2005).**

Las principales sustancias estimuladoras producidas son de tipo hormonal como auxinas, giberelinas y citoquininas, pero también producen sustancias

de otro tipo como aminoácidos y promotores específicos del crecimiento. Estos efectos se dan siempre que sea adecuada la concentración de organismos en el sistema radicular y en el suelo haya suficiente cantidad de materia orgánica.

Por último, una propiedad complementaria de la *Pseudomonas fluorescens* es la de producir ciertas sustancias -antibióticos y sideróforos- que actúan limitando el crecimiento y desarrollo de los patógenos fúngicos que pueden afectar al cultivo. **Rodríguez, et al; (2005).**

### **2.10. Alfalfa (*Medicago sativa*)**

Adaptación: 2.400-3.200 m.s.n.m. Densidad: 50-80 lb/ha en monocultivo. Producción de forraje: 24% de proteína y 3540 calorías por kilo. De 6 a 10 cortes al año. Uso: corte, pastoreo, ensilaje y/o henolaje. Características: altamente resistente a pulgones, azul, verde, moteado, Phytophthora, Fusarium, Verticillium y nematodos de la raíz y tallo. De crecimiento erecto con rápida recuperación después del corte, corona amplia, soporta el pisoteo, excelente vigor de rebrote. Duración de la pradera: 4-6 años.

### **2.11. Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

Adaptación: 2.000-3.200 m.s.n.m. Densidad: 5-7 kg/ha al voleo mezclado con gramíneas. Uso: heno, pastoreo o ensilaje. Intervalos de corte: 45 días. Producción de forraje: rápido establecimiento y sistema radicular profundo, buena capacidad de rebrote.

### **2.12. Pasto Raygrass perenne (*Lolium perenne* L.)**

Adaptación: 2.000-3.200 m.s.n.m. Densidad: 100-150 lb/ha<sup>-1</sup>. Duración de la pradera: 5-6 años. Capacidad de Carga: 4-6 Animales/ha<sup>-1</sup>. Producción: 150-170 TM F.V/ha/ año. Intervalos de Corte: 45-50 días Uso: corte o pastoreo. Asocia con: Ray grass anual.

### 2.13. Investigaciones realizadas

Al final de la primera temporada la práctica de inoculación de las semillas de leguminosas con rhizobium específico no mostró efectos significativos en las producciones acumuladas de MS de trébol blanco, trébol subterráneo y trebo rosado, pero sí tuvo efecto ( $P \leq 0,01$ ) en la alfalfa. En la temporada posterior tampoco hubo efecto de la inoculación en ninguna de las leguminosas. Ello indicaría que el suelo presentaba inicialmente una población adecuada de rhizobium para estas especies, a excepción de la alfalfa, situación que posteriormente se revirtió una vez que la cepa inoculada alcanzó predominancia en el suelo.

Un factor fundamental en la aplicación exitosa de las técnicas isotópica con  $^{15}\text{N}$  para estimar la capacidad de FBN de las leguminosas, es la elección del cultivo de referencia. Para resolver esta interrogante, durante la primera temporada se evaluaron tres especies gramíneas que normalmente se siembran en la región. Al comparar la FBN (%) de las leguminosas basado en el uso de las tres especies gramíneas, se observó una gran similitud en los valores estimados, independientemente de la gramínea utilizada como referencia. Adicionalmente, los valores de fijación fueron elevados en todas las leguminosas, variando entre el 80 y 95%, al margen de la inoculación. Es importante destacar que los valores de coeficiente de variación obtenidos en cada corte fueron muy pequeños y similares también para todas las gramíneas.

Cuando se estableció la comparación del manejo con o sin inoculación de las especies leguminosas, para la estimación de la FBN mediante contrastes ortogonales, se observó una respuesta similar entre los tres cultivos de referencia utilizados se detectó efecto significativo ( $P < 0,01$ ) de la inoculación solamente para trébol subterráneo, situación que en las temporadas siguientes desapareció. Con las otras leguminosas no hubo efecto de la inoculación sobre la FBN. Está ampliamente establecido que la selección del cultivo de referencia es menos crítica en la medición de la FBN en cultivos altamente fijadores. De acuerdo a estos resultados, se decidió utilizar ballica perenne como cultivo de

referencia para la estimación de la FBN, puesto que su ciclo de desarrollo y producción se asemeja más al de las leguminosas estudiadas en este experimento. Adicionalmente, la literatura señala ampliamente a esta especie como un cultivo de referencia adecuado para estas especies leguminosas.

En las siguientes temporadas los índices de BFN se mantuvieron elevados, confirmando así la alta eficiencia de operación del mecanismo biológico en las condiciones del experimento. Durante la tercera y última temporada de evaluación se observaron algunos efectos significativos ( $P \leq 0,05$ ) del manejo de la inoculación, principalmente en el tercer corte. Sin embargo, no fue posible establecer aquí un patrón coherente de respuesta. Es importante recordar que esta situación se expresó en la tercera temporada de evaluación de las parcelas, cuando el trébol rosado presentaba una declinación natural en su población de plantas. También pudo haber influido la variación en la cobertura del suelo alcanzada por las leguminosas al momento de muestreo.

El N fijación ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) por las distintas leguminosas a lo largo de las tres temporadas. Con excepción de la primera temporada en trébol subterránea y alfalfa, no hubo efecto de la inoculación en este índice de FBN, lo cual confirma los resultados de porcentajes de FBN. En el caso de trébol subterráneo, el mejor comportamiento sin inoculación es difícil de explicar con los datos disponibles; sin embargo, este efecto desapareció en las dos temporadas siguientes. Respectos a la alfalfa, es importante recordar que el sitio experimental provenía de un sistema de rotación intensiva de cultivos anuales e históricamente no registraba siembra de alfalfa, razón por la cual el suelo no presentaba infección natural con cepas de rhizobio específicas para esta leguminosa. Ello explicaría el efecto inicial de la inoculación en la primera temporada. **Campillo, (2003).**

El uso del isótopo estable  $^{15}\text{N}$  es considerado una herramienta indispensable para investigar la fijación de  $\text{N}_2$  atmosférico por leguminosa y para trazar el destino de fertilizante nitrogenados en sistemas suelo y planta. En este trabajo se describen los métodos más comúnmente usados para determinar el proceso

de fijación de nitrógeno por leguminosas forrajeras y se destacan las diferencias más importantes entre ellos. A fin de entender las técnicas isotópica disponible, la revisión describe detalladamente los métodos de abundancia natural de  $^{15}\text{N}$ , la disolución isotópica de  $^{15}\text{N}$ , la técnica de diferencia de N, la determinación de reducción de acetileno y el método perfecto para evaluar la fijación de  $\text{N}_2$  se considera útil una descripción detallada de las técnicas disponibles, que facilite la selección del método más conveniente según las condiciones específicas del experimento. Se mencionan las ventajas y desventajas y se discute la aplicación de los métodos. Se destacan que una cuidadosa elección del método dará resultados más precisos y confiables, lo que a su vez disminuirá la probabilidad de errores. **Valles de la mora, (2003).**

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Localización y duración del experimento

La presente investigación se llevó a cabo, en la parroquia Marcos Espinel del cantón Píllaro provincia de Tungurahua. El terreno está ubicado a dos kilómetros de la cabecera cantonal con las coordenadas geográficas este 77° 51' 23'' y norte 98° 70' 29''. A una altura de 2879 msnm. Con una duración de 120 días.

#### 3.2. Condiciones meteorológicas

El sitio experimental presenta las siguientes condiciones meteorológicas, que se detalla en el Cuadro 1.

**Cuadro 1. Condiciones Meteorológicas del sitio de investigación**

| <b>Datos meteorológicos</b> | <b>Promedio Anual</b> |
|-----------------------------|-----------------------|
| Temperatura °C              | 13,80                 |
| Humedad Relativa %          | 80,00                 |
| Heliofanía, Horas/Luz/año   | 1551,00               |
| Precipitación, cc/año       | 699,20                |
| Topografía                  | Ligeramente Ondulada  |

**Fuente:** Informe meteorológico e hidrología de la Estación Querochaca año 2010

### 3.3. Materiales y equipos

| Concepto                                | Cantidad |
|-----------------------------------------|----------|
| Material de Pasto Raygrass              | 400      |
| Material de Alfalfa                     | 200      |
| Material de Trébol rojo                 | 200      |
| Inoculante Azotobacter chroococum L     | 5        |
| Inoculante Azotobacter vinelandii       | 5        |
| Inoculante Pseudomona fluorescens L     | 5        |
| Inoculante beijerinckii                 | 5        |
| Flexómetro                              | 1        |
| Balanza con capacidad de un kilogramo   | 1        |
| Fundas plásticas de quintal             | 90       |
| Fundas plásticas                        | 300      |
| Fundas de papel                         | 300      |
| Cuaderno                                | 1        |
| Análisis bromatológico                  | 10       |
| Latillas de madera                      | 90       |
| Cartulinas                              | 15       |
| Cinta de embalaje transparente (rollos) | 3        |

### 3.4. Factores en estudio y tratamientos

La investigación plantea la evaluación de tres factores en estudio:

**Factor (A): Dos asociaciones gramínea - leguminosa:**

a1: Pasto Raygrass (*Lolium perenne* L)+ Alfalfa (*Medicago sativa*)

a2: Pasto Raygrass (*Lolium perenne* L)+ Trébol rojo (*Trifolium pratense*)

**Factor (B): Inoculantes bacterianos:**

- b1: Azotobacter chroococum
- b2: Azotobacter vinelandii
- b3: Azotobacter beijerinckii
- b4: Pseudomona fluorescens
- b5: Testigo

**Factor (C): Dos edades de cosecha:**

- c1: 45 días
- c2: 60 días

**3.5. Diseño experimental**

Para el presente estudio se empleó un diseño completamente al azar, con arreglo factorial  $2 \times 5 \times 2$  tomando las dos asociaciones de gramínea-leguminosa, cinco inoculantes y las dos edades de cosecha. Se utilizó tres repeticiones por tratamiento.

El análisis de varianza y el esquema del experimento se presentan en el Cuadro 2. Para la diferencia entre las medias de los tratamientos se empleó la prueba de rangos múltiples de Tukey al 95% de probabilidad.

**Cuadro 2. Esquema del Análisis de Varianza**

| <b>Fuente de variación</b> |                             | <b>G. L</b> |
|----------------------------|-----------------------------|-------------|
| Tratamientos               | $t-1$                       | 19          |
| Factor A                   | $a - 1$                     | 1           |
| Factor B                   | $b - 1$                     | 4           |
| Factor C                   | $c - 1$                     | 1           |
| Interacción A x B          | $(a-1)(b-1)$                | 4           |
| Interacción A x C          | $(a-1)(c-1)$                | 1           |
| Interacción B x C          | $(b-1)(c-1)$                | 4           |
| Interacción A x B x C      | $(a-1)(b-1)(c-1)$           | 4           |
| Error                      | $t(r-1)$                    | 40          |
| <b>Total</b>               | <b><math>t.r - 1</math></b> | <b>59</b>   |

La unidad experimental estuvo constituida por las plantas sembradas en la funda de un quintal, a la cual se le asignaron al azar la fecha de la cosecha (45 y 60 días). El esquema del experimento se detalla en el Cuadro 3.

**Cuadro 3. Esquema del experimento**

| <b>Trat.</b> | <b>Combinación</b>                             | <b>Edad<br/>Cosecha</b> | <b>Repetición</b> | <b>Total</b> |
|--------------|------------------------------------------------|-------------------------|-------------------|--------------|
| 1            | Pasto Raygrass + Alfalfa + A. chroococum       | 45                      | 3                 | 3            |
| 2            | Pasto Raygrass + Alfalfa + A. chroococum       | 60                      | 3                 | 3            |
| 3            | Pasto Raygrass + Alfalfa + A. vinelandii       | 45                      | 3                 | 3            |
| 4            | Pasto Raygrass + Alfalfa + A. vinelandii       | 60                      | 3                 | 3            |
| 5            | Pasto Raygrass + Alfalfa + A. beijerinckii     | 45                      | 3                 | 3            |
| 6            | Pasto Raygrass + Alfalfa + A. beijerinckii     | 60                      | 3                 | 3            |
| 7            | Pasto Raygrass + Alfalfa + P. fluorescens      | 45                      | 3                 | 3            |
| 8            | Pasto Raygrass + Alfalfa + P. fluorescens      | 60                      | 3                 | 3            |
| 9            | Pasto Raygrass I + Alfalfa                     | 45                      | 3                 | 3            |
| 10           | Pasto Raygrass + Alfalfa                       | 60                      | 3                 | 3            |
| 11           | Pasto Raygrass I + Trébol rojo + A. chroococum | 45                      | 3                 | 3            |
| 12           | Pasto Raygrass + Trébol rojo + A. chroococum   | 60                      | 3                 | 3            |
| 13           | Pasto Raygrass + Trébol rojo A. vinelandii     | 45                      | 3                 | 3            |
| 14           | Pasto Raygrass + Trébol rojo + A. vinelandii   | 60                      | 3                 | 3            |
| 15           | Pasto Raygrass + Trébol rojo A. beijerinckii   | 45                      | 3                 | 3            |
| 16           | Pasto Raygrass + Trébol rojo + A. beijerinckii | 60                      | 3                 | 3            |
| 17           | Pasto Raygrass + Trébol rojo + P. fluorescens  | 45                      | 3                 | 3            |
| 18           | Pasto Raygrass + Trébol rojo + P. fluorescens  | 60                      | 3                 | 3            |
| 19           | Pasto Raygrass + Trébol rojo                   | 45                      | 3                 | 3            |
| 20           | Pasto Raygrass + Trébol rojo                   | 60                      | 3                 | 3            |
|              |                                                |                         | <b>Total</b>      | <b>60</b>    |

### **3.6. Mediciones Experimentales**

Para efectuar la evaluación, de las siguientes variables se procedió a través del método destructivo, el que consistió en la utilización de la unidad experimental para efectuar la medición de cada variable en todas las edades de corte.

#### **3.6.1. Análisis de suelo**

Se tomaron muestras de suelo, con el fin de realizar el análisis correspondiente para determinar la microflora existente y los niveles de nutrientes.

#### **3.6.2. Longitud de la raíz (cm)**

Se midió longitudinalmente con un flexómetro en todas las edades, desde la superficie del suelo hasta el tope de la planta tanto para leguminosa como para los forrajes.

#### **3.6.3. Peso de raíz (g)**

Se peso a los 45 y 60 días en cada una de las asociaciones de pasto con leguminosas para lo cual se empleo una balanza de precisión

#### **3.6.4. Peso de forraje (g)**

Se realizó en el pasto Ray Grass y en cada una de las leguminosas con los inoculantes bacterianos a las dos edades de corte.

#### **3.6.5. Composición química y valor nutritivo**

Se efectuó el análisis de la composición química mediante el análisis proximal propuesto por la AOAC (2001), fracciones de fibra.

### **3.6.6. Población de bacterias y hongos/Tratamiento**

En esta variable se cuantificó la población de bacterias y hongos presentes por cada tratamiento.

### **3.7. Colecta de nódulos y almacenamiento**

Recolección de nódulos en el campo: Se seleccionaron plantas con las mejoras características (robustas, verdes y sanas), se limpió un área de 15 cm alrededor de la planta y con la ayuda de un pico manual se excavó hasta exponer sus raíces.

Se recogieron los nódulos de la raíz principal, cortando con 1cm de raíz hacia los lados, posteriormente se colocaron en tubos universales que contenían silica-gel y una capa de algodón; finalmente se taparon e identifican los tubos para ser llevados al laboratorio.

Paralelamente se realizó el estudio de la nodulación; tomando como referente que la nitrogenasa es sensible al oxígeno y el *Rhizobium* es anaerobio, la leghemoglobina se encarga de regular la tensión del oxígeno, por lo tanto la coloración del nódulo activo fue de color rojo. Así mismo se determinó la abundancia y tamaño de los nódulos. **Guamán et al (2007)**

### **3.8. Aislamiento de bacterias y hongos desde el nódulo**

Utilizando el plato multiwell; se colocó un nódulo por orificio de este plato, se añadió una gota de agua destilada y con una varilla de vidrio se presionó el nódulo hasta macerarlo.

Previamente se preparó medio de Levadura manitol agar (LMA) + rojo congo y dispersarlo en cajas petri para que solidifique; con la varilla de vidrio que sirvió para macerar el nódulo se inocular mediante estría simple o compuesta, se selló con parafilm e identificaron, este procedimiento se realizó en la cámara de

aislamiento. Se colocan las cajas petri invertidas (para evitar condensación) en la estufa a 28°C, hasta establecimiento de colonias. **Guamán *et al* (2007)**

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Efecto simple

#### 4.1.1. Efecto simple de las edades

Al analizar el efecto simple de las variables podemos observar que presentan diferencia estadística ( $P \geq 0,05$ ) los mayores valores se presentan a los 60 días en cada una de las variables dentro de la investigación. Cuadro 4.

**Cuadro 4. Efecto simple de edades en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass (*Lolium perenne* L.) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

| Variables              | Edades (días) |          |        |
|------------------------|---------------|----------|--------|
|                        | 45            | 60       | CV (%) |
| Long raíz leg (cm)     | 19.07 b       | 26.43 a  | 24.35  |
| Long raíz pasto (cm)   | 22.53 a       | 24.03 a  | 56.46  |
| Peso raíz leg (g)      | 0.74 b        | 1.22 a   | 55.57  |
| Peso raíz pasto (g)    | 3.87 b        | 6.67 a   | 66.77  |
| Peso forraje Leg (g)   | 1.78 a        | 2.23 a   | 49.67  |
| Peso forraje Pasto (g) | 5.75 b        | 7.78 a   | 44.26  |
| Peso total forraje (g) | 178.30 b      | 249.60 a | 17.95  |

Promedios con letras iguales no presentan diferencias estadísticas ( $P > 0.05$ )

#### 4.1.2. Efecto simple de la asociación pasto – leguminosa

En los efectos simples de la asociación pasto – leguminosa se puede observar que presentan diferencia estadística ( $P \geq 0,05$ ) en los resultados obtenidos, los mayores valores se registran en el Pasto Ray grass + Alfalfa para cada una de las variables estudiadas. Cuadro 5.

**Cuadro 5. Efectos simple asociación pastos – leguminosas en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass (*Lolium perenne* L.) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

| Variables              | Asociación             |                       | CV (%) |
|------------------------|------------------------|-----------------------|--------|
|                        | Ray grass +<br>Alfalfa | Ray grass +<br>Trébol |        |
| Long raíz leg (cm)     | 25.37 a                | 20.13 b               | 26.96  |
| Long raíz pasto (cm)   | 25.00 a                | 21.57 a               | 56.05  |
| Peso raíz leg (g)      | 1.27 a                 | 0.69 b                | 52.95  |
| Peso raíz pasto (g)    | 5.67 a                 | 4.87 a                | 71.62  |
| Peso forraje Leg (g)   | 2.68 a                 | 1.33 b                | 37.79  |
| Peso forraje Pasto (g) | 7.35 a                 | 6.18 a                | 45.99  |
| Peso total forraje (g) | 202.68 a               | 225.22 a              | 24.10  |

Promedios con letras iguales no presentan diferencias estadísticas (P>0.05)

#### 4.1.3. Efecto simple de los inoculantes

En los efectos simples de los inoculantes se menciona que dentro de los resultados obtenidos no se presentan diferencia estadística ( $P \geq 0,05$ ), en la longitud raíz leguminosa el valor mas alto se reporto en el *A. beijerinckii* con 24.08 cm, en las variables longitud raíz pasto y peso forraje pasto se observa los valores de 31.92 cm y 6.88 g respectivamente con el inoculante *A. Chroococum*; en el peso raíz leguminosa y peso forraje leguminosa el mayor valor se reporta en el *P. fluorescens* con 1.21 y 250. G, para el peso raíz pasto con 5.96 con el inoculante *A. vinelandii*; seguido del peso forraje total con 224.50. Cuadro 6.

**Cuadro 6. Efectos simples de inoculantes en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass (*Lolium perenne* L.) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

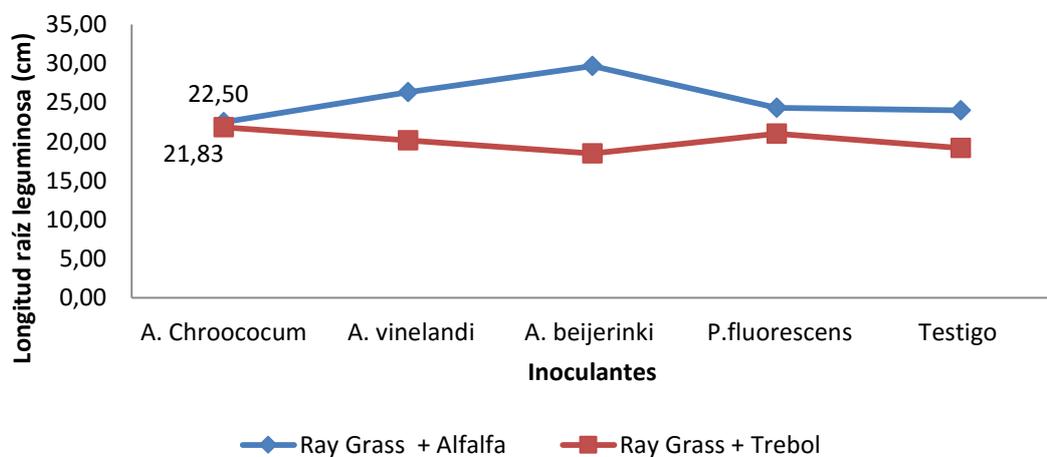
| Variables              | Inoculantes          |                      |                        |                       |          | CV (%) |
|------------------------|----------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|----------|--------|
|                        | <i>A. chroococum</i> | <i>A. vinelandii</i> | <i>A. beijerinckii</i> | <i>P. fluorescens</i> | Testigo  |        |
| Long raíz leg (cm)     | 22.17 a              | 23.25 a              | 24.08 a                | 22.67 a               | 21.58 a  | 29.92  |
| Long raíz pasto (cm)   | 31.92 a              | 21.33 a              | 20.75 a                | 21.83 a               | 20.58 a  | 54.72  |
| Peso raíz leg (g)      | 1.04 a               | 0.80 a               | 0.88 a                 | 1.21 a                | 0.96 a   | 60.72  |
| Peso raíz pasto (g)    | 5.50 a               | 5.96 a               | 4.67 a                 | 5.13 a                | 5.08 a   | 73.47  |
| Peso forraje Leg (g)   | 1.92 a               | 1.54 a               | 2.17 a                 | 2.50 a                | 1.92 a   | 49.67  |
| Peso forraje Pasto (g) | 6.88 a               | 6.71 a               | 6.83 a                 | 6.58 a                | 6.83 a   | 48.05  |
| Peso total forraje (g) | 216.17 a             | 212.50 a             | 224.50 a               | 210.13 a              | 206.46 a | 25.17  |

Promedios con letras iguales no presentan diferencias estadísticas (P>0.05)

## 4.2. Longitud de raíz leguminosa (cm)

### 4.2.1. Interacción de Pasto + Leguminosa x inoculantes

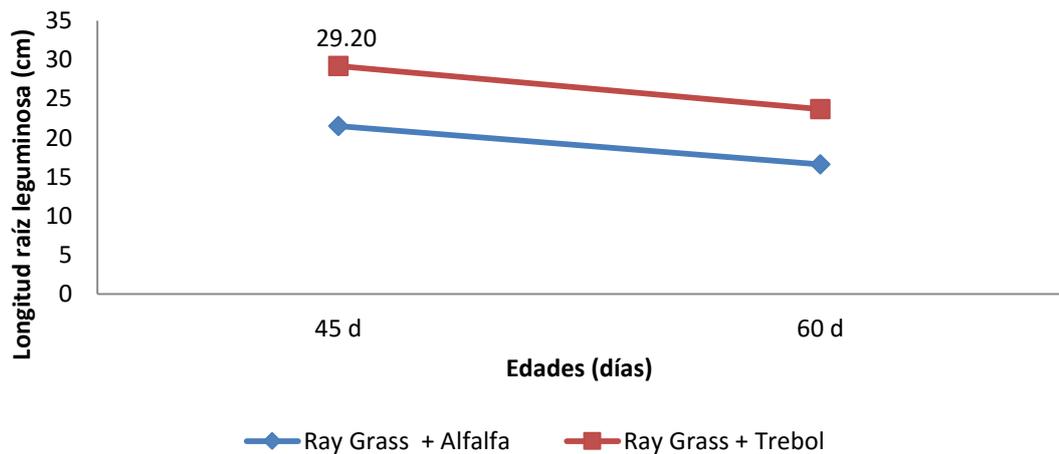
En las interacciones Pasto x Inoculantes en la longitud de raíz (cm) se puede observar que en la investigación hay interacción en los Pasto Ray grass + Alfalfa y Ray grass + Trébol con el inoculante *A. Chroococum* con 21.83 y 22.50 cm. Figura 1.



**Figura 1. Pasto + Leguminosas x Inoculantes en longitud de raíz leguminosa cm en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass (*Lolium perenne* L.) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

### 4.2.2. Interacción de Edad x Pasto + Leguminosa

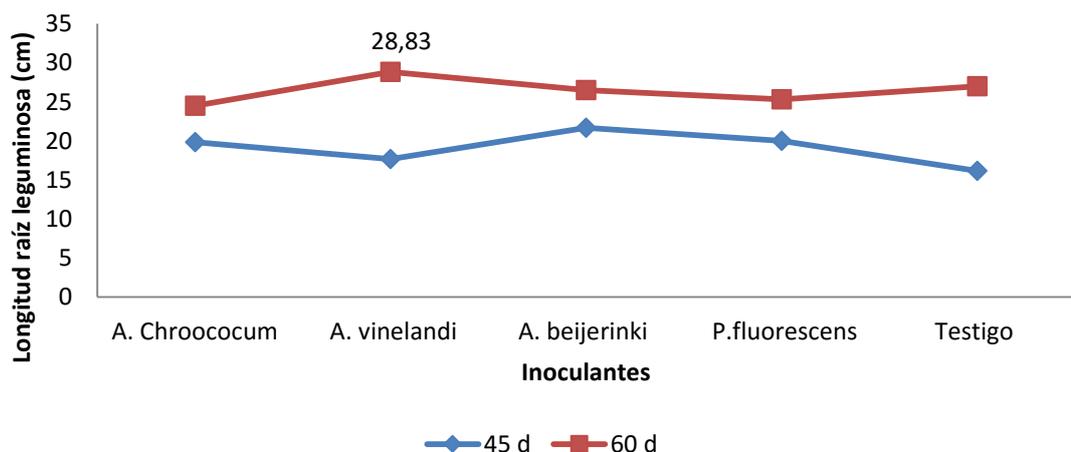
En lo que corresponde a la Edad x Pasto + Leguminosas en longitud de raíz (cm) se puede constatar que los mayores valores se presentan en el pasto Ray Grass + Trébol con 29.20 cm a los 60 días. Figura 2.



**Figura 2. Edad x Pasto + leguminosas en longitud de raíz leguminosa (cm) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass (*Lolium perenne* L.) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

#### 4.2.3. Interacción de Edad x inoculantes

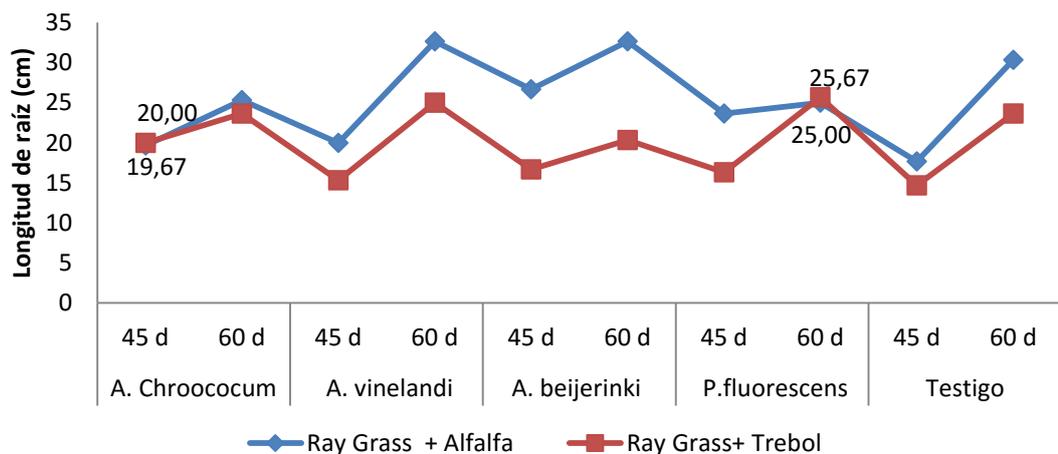
En la figura 3 sobre la Edad + inoculantes en longitud de raíz (cm) se puede observar que a los 60 días demuestra el mayor valor con el inoculante *A. vinelandii* con 28.83



**Figura 3. Edad + inoculantes en longitud de raíz leguminosa (cm) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass (*Lolium perenne* L.) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

#### 4.2.4. Interacción Pasto + Leguminosa x inoculantes x edad

En lo que corresponde a la interacción del pasto + Leguminosa x inoculantes x edad se puede observar que hay interacción a los 45 días con el pasto los Pasto Ray grass + Alfalfa con Ray grass + Trébol con el inoculante *A. Chroococum* con 19.67 cm y 20.00 cm; seguido del inoculante *P. fluorescens* a los 60 días con 25.00 cm y 25.67 cm. Figura 4.

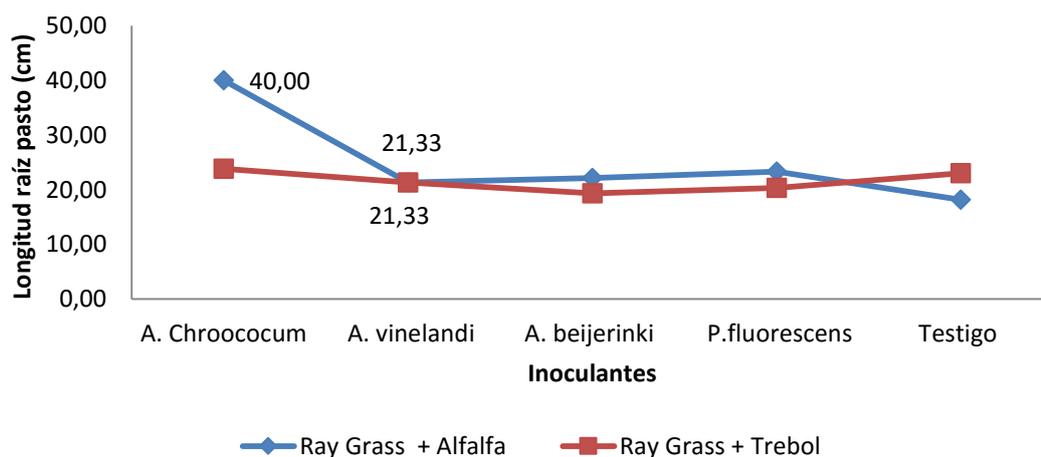


**Figura 4. Pasto + Leguminosa x inoculante x edad en longitud de raíz leguminosa (cm) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass (*Lolium perenne L.*) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

### 4.3. Longitud de raíz pasto (cm)

#### 4.3.1. Interacción Pasto + Leguminosas x Inoculantes

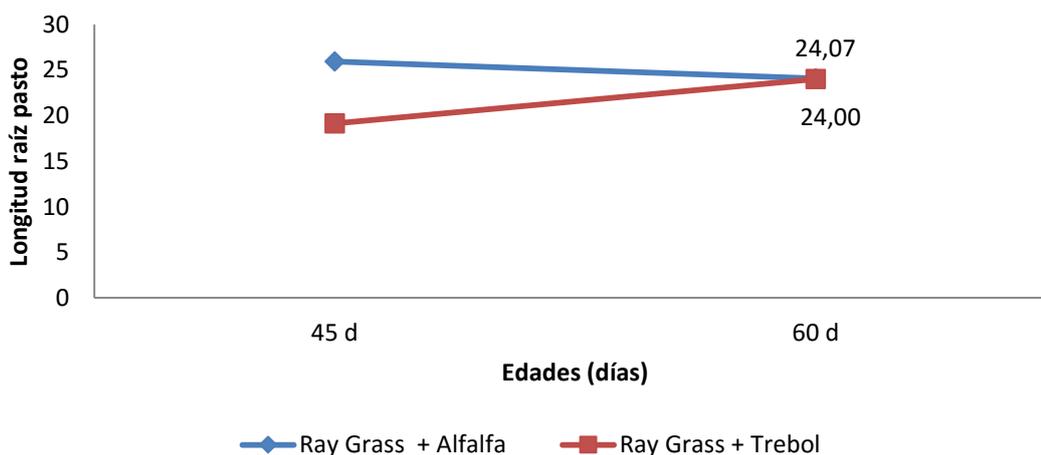
En la investigación realizada a los Pasto + Leguminosas x Inoculantes en Longitud de raíz pasto (cm) se puede observar que existe interacción estadística en los pastos Ray grass + Alfalfa con Ray grass + Trébol con el inoculante *A. vinelandii* con 21.33 cm y su mayor resultados con el inoculante *A. chroococum* con el pastos Ray grass con 40.00 cm. Figura 5.



**Figura 5. Pasto + Leguminosas x Inoculantes en Longitud de raíz pasto (cm) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass (*Lolium perenne L.*) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

#### 4.3.2. Interacción Edad x Pasto + leguminosas

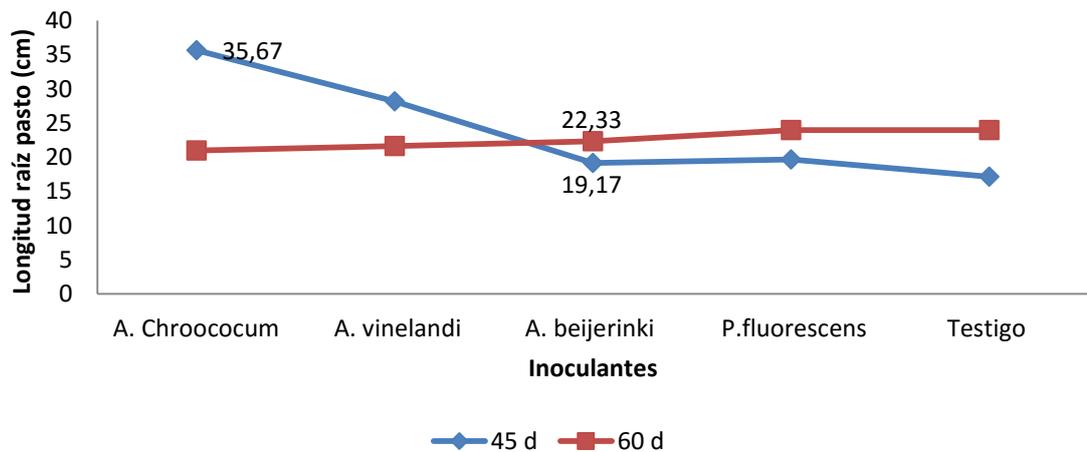
En lo que corresponde a la Edad x Pasto + Leguminosa en Longitud de raíz pasto (cm) se puede constatar que hay interacción a los 60 días en los pastos Ray grass + Alfalfa con Ray grass + trébol con 24.00 cm y 24.07 cm. Figura 6



**Figura 6. Edad x Pasto + Leguminosas en Longitud de raíz pasto (cm) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass (*Lolium perenne L.*) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

### 4.3.3. Interacción Edad x inoculantes

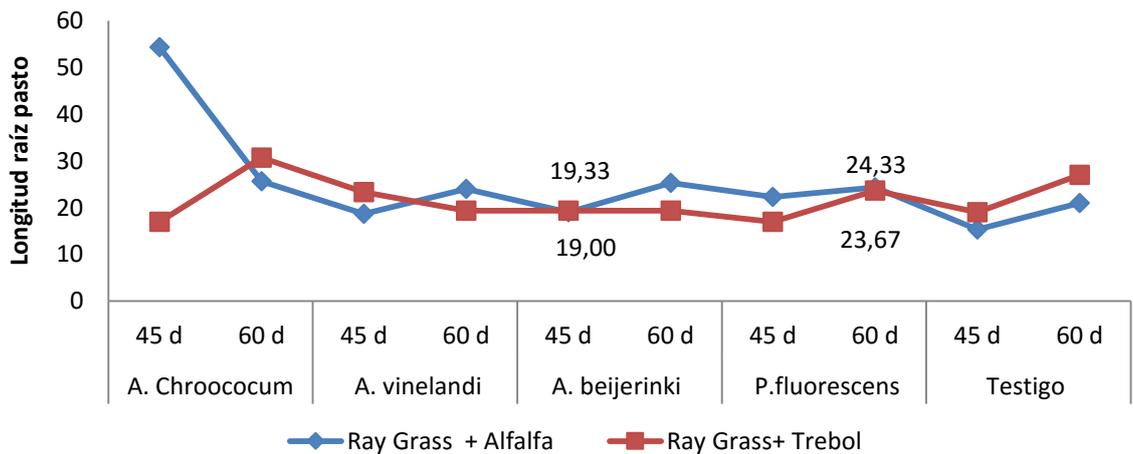
En los resultados obtenidos de la investigación realizada en la edad + inoculantes en longitud de raíz pasto (cm) muestra su mayor valor a los 45 días con el inoculante *A. vinelandii* con 35.67 cm; mientras que a los 45 y 60 días hay interacción en el inoculante *A. beijerinckii* con 19.17 y 22.33 cm respectivamente. Figura 7.



**Figura 7. Edad + inoculantes en Longitud de raíz pasto (cm) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass (*Lolium perenne* L.) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

### 4.3.4. Interacción Pasto + Leguminosa x inoculantes x edad

En la figura 8 de la interacción Pasto + Leguminosa x inoculantes x edad se puede observar que hay interacción a los 45 días con el pasto Ray grass + Alfalfa con Ray grass + Trébol con el inoculante *A. beijerinckii* con 19.00 y 19.33 cm; seguido del inoculante *P. fluorescens* a los 60 días con 23.67 y 24.33 cm

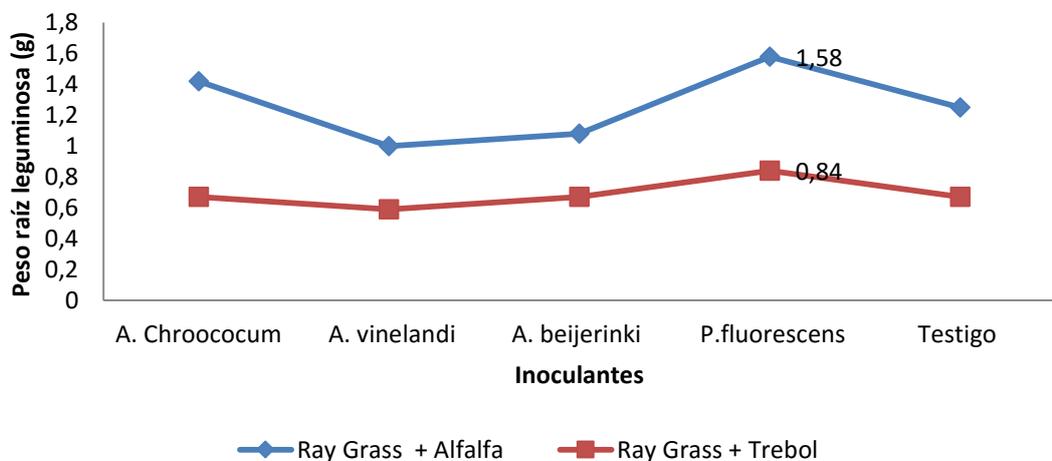


**Figura 8. Pasto + Leguminosa x inoculantes x edad en Longitud de raíz pasto (cm) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass (*Lolium perenne L.*) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

#### 4.4. Peso de raíz leguminosa (g)

##### 4.4.1. Interacción Pasto + Leguminosas x Inoculantes

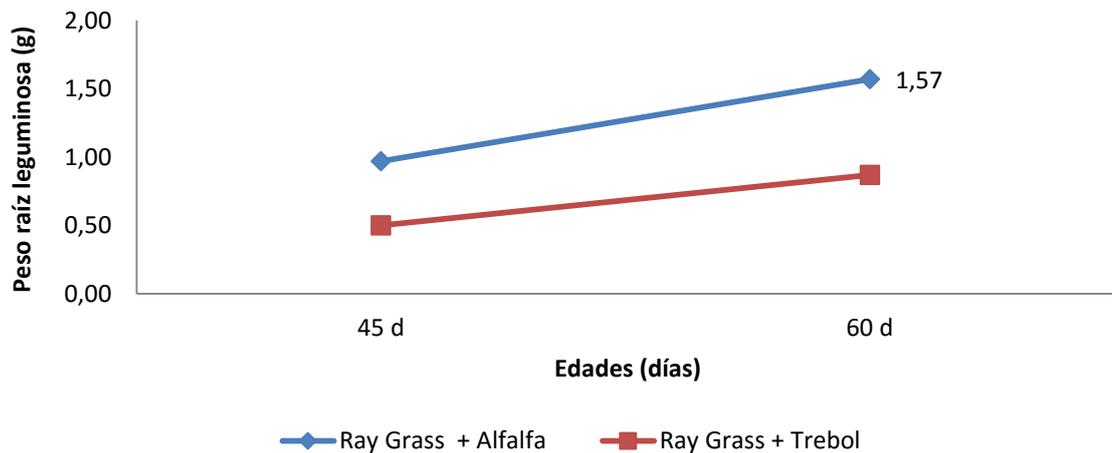
En la figura 9 dentro de la investigación realizada a los Pasto + Leguminosas x Inoculantes en peso de raíz de leguminosa (g) se puede observar que el mayor valor se registra en el inoculante *P. fluorescens* con 1.58 g con el pasto Ray Grass + Alfalfa.



**Figura 9. Pasto + Leguminosas x Inoculantes en peso de raíz de leguminosa (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass (*Lolium perenne L.*) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

#### 4.4.2. Interacción Edad x Pasto + leguminosas

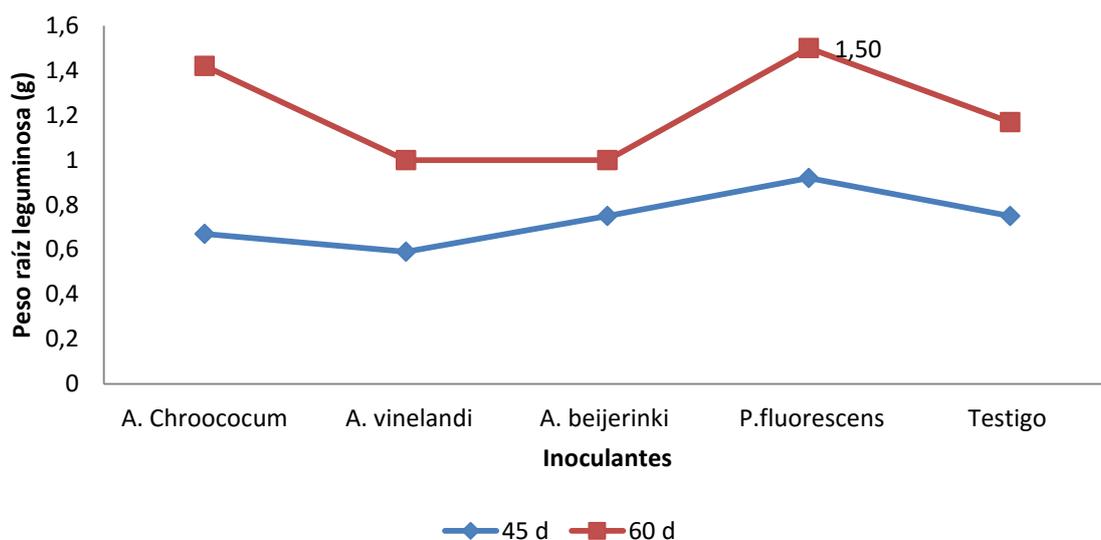
En la Edad x Pasto + leguminosas en peso de raíz de leguminosa (g) se puede observar que hay interacción a los 60 días con el Pasto Ray Grass + Alfalfa con 1.57 g. Figura 10.



**Figura 10. Edad x Pasto + leguminosas en peso de raíz de leguminosa (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass (*Lolium perenne* L.) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

#### 4.4.3. Interacción Edad x inoculantes en peso de raíz de leguminosa (g)

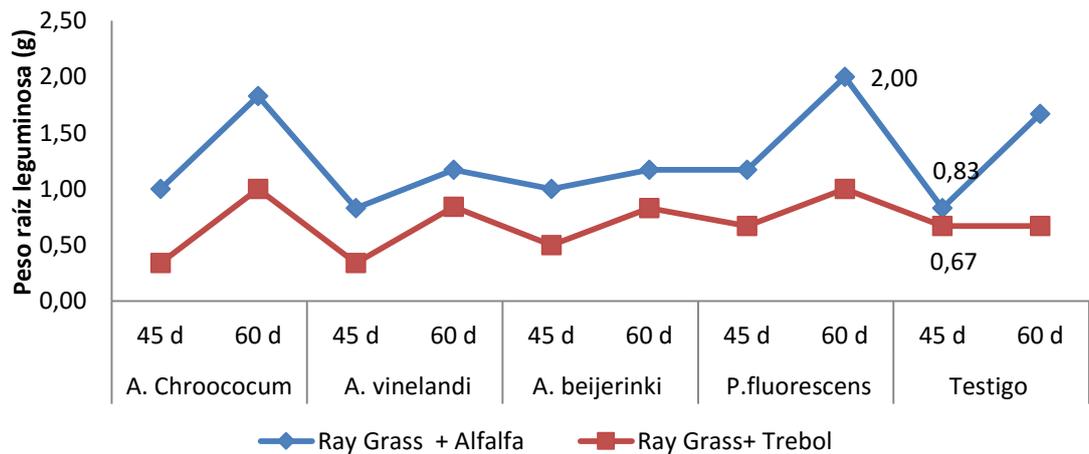
En la investigación realizada a la edad + inoculantes en peso de raíz de leguminosa (g) a los 60 días se refleja el mayor valor en el inoculante *P. fluorescens* 1.50 g Figura 11.



**Figura 11. Edad + inoculantes en peso de raíz de leguminosa (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass (*Lolium perenne* L.) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

#### 4.4.4. Interacción Pasto + Leguminosa x inoculantes x edad

De la investigación realizada se puede observar que existe interacción en Pasto + Leguminosa x inoculantes x edad a los 45 y 60 días en el pasto Ray grass + Alfalfa con Ray grass + Trébol con el Testigo con 0.67 y 0.83 g respectivamente en peso de raíz de leguminosa. También se observar el mayor valor que recae en el Pasto Ray Grass + Alfalfa a los 60 días con el inoculante *P. fluorescens* con 2.00 g. Figura 12.

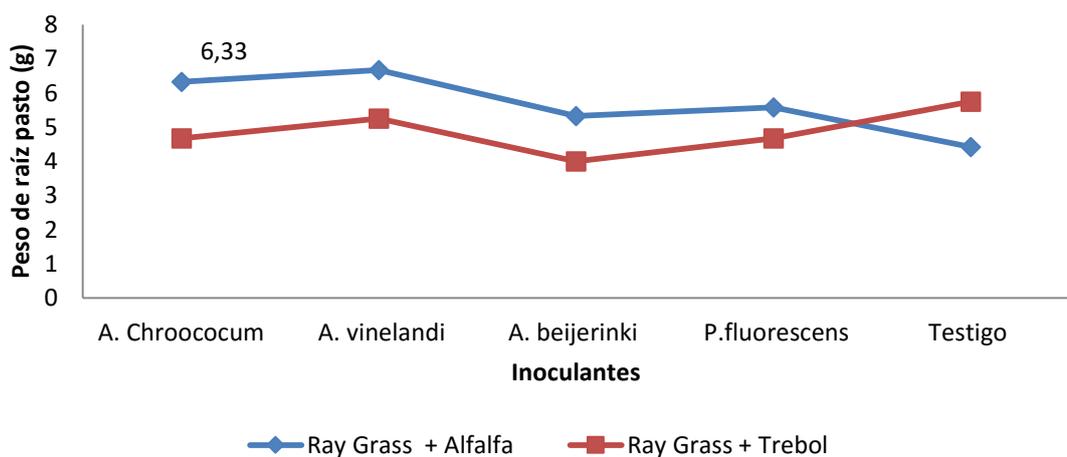


**Figura 12. Pasto + Leguminosa x inoculantes x edad en peso de raíz leguminosa (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass (*Lolium perenne L.*) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

#### 4.5. Peso de raíz pasto (g)

##### 4.5.1. Interacción Pasto + Leguminosas x Inoculantes

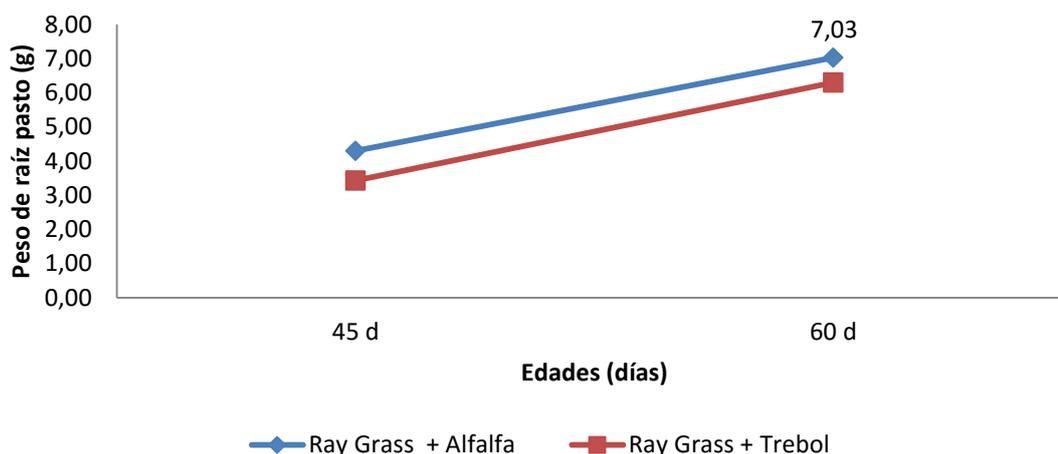
Dentro de la investigación realizada a los pastos + leguminosas x inoculantes en peso de raíz pasto (g) se refleja el mayor valor en el Pasto Ray Grass + Alfalfa con 6.33 g. Figura 13



**Figura 13. Pasto + Leguminosas x Inoculantes en Peso de raíz pasto (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass (*Lolium perenne L.*) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

#### 4.5.2. Interacción Edad x Pasto + leguminosas

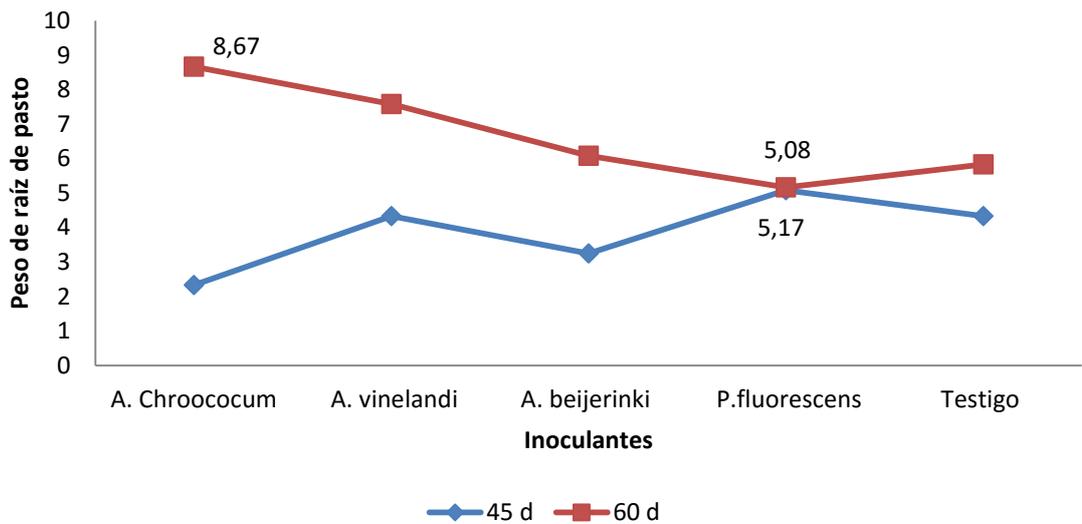
En la figura 14 de la Edad x Pasto + leguminosa en Peso de raíz pasto (g) se puede observar que el mayor valor se registra a los 60 días con el Pasto Ray Grass + Alfalfa con 7.03 g.



**Figura 14. Edad x Pasto + leguminosas en Peso de raíz pasto (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass (*Lolium perenne* L.) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

#### 4.5.3. Interacción Edad x inoculantes

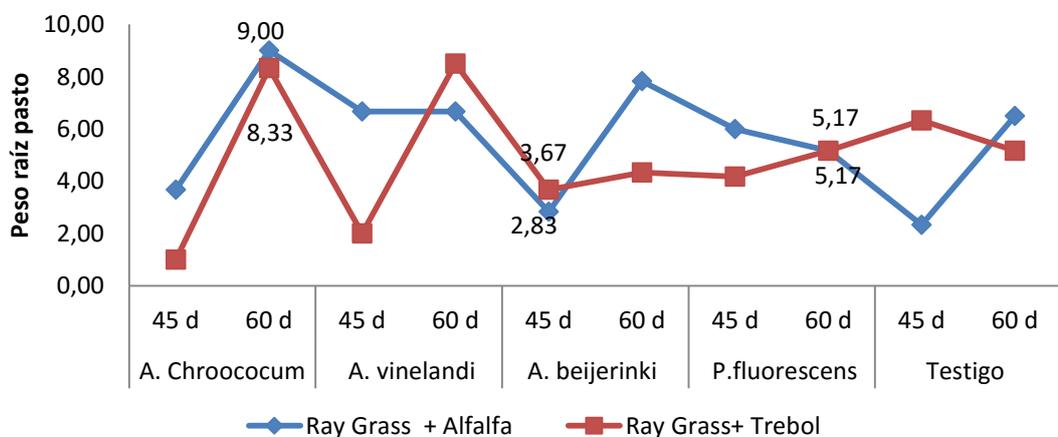
En la investigación realizada a la Edad x inoculante en Peso de raíz pasto (g) se puede observar que hay una fuerte interacción a los 45 y 60 días con el inoculante *P. fluorescens* con 5.17 y 5.08. Y su valor mas representativo que recae en el inoculante *A. chroococum* a los 60 días con 8.67 g Figura 15



**Figura 15. Edad + inoculantes en Peso de raíz pasto (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass (*Lolium perenne L.*) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

#### 4.5.4. Interacción Pasto + Leguminosa x inoculantes x edad

En la figura 16 se puede observar que los mejores resultados obtenidos en la Interacción Pasto + Leguminosa x inoculante x edad hay una fuerte interacción en el inoculante *A. chroococum* a los 60 días con 8.33 y 9,00 g; seguido del inoculante *A. beijerinckii* con 2.83 y 3.67 g a los 45 días y el *P. fluorescens* a los 60 días con 5.17.

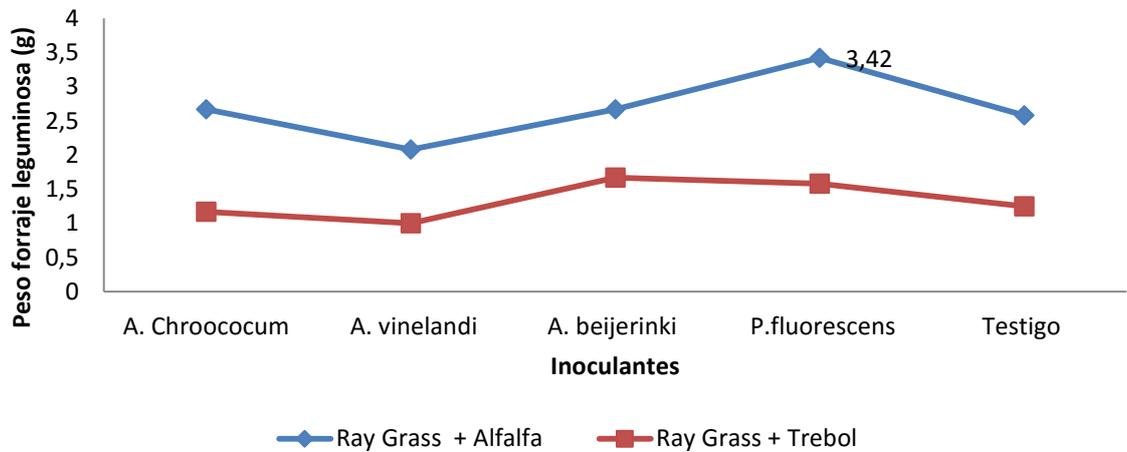


**Figura 16. Pasto + Leguminosa x inoculantes x edad en peso de raíz leguminosa (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass (*Lolium perenne L.*) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

## 4.6. Peso forraje leguminosa (g)

### 4.6.1. Interacción Pasto + Leguminosas x Inoculantes

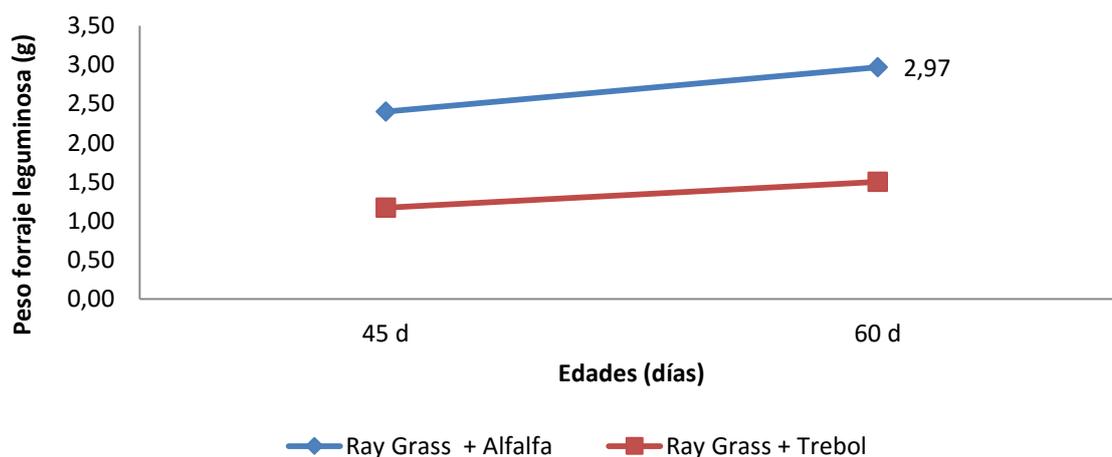
Dentro de los resultados obtenidos de esta variables en los Pastos + Leguminosas x Inoculantes en Peso de forraje leguminosa (g) se puede constatar que el mayor valor se registra en el pasto Ray Grass + Alfalfa con el inoculante *P. fluorescens* con 3.42 g. Figura 17.



**Figura 17. Pasto + Leguminosas x Inoculantes en Peso forraje leguminosa (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass (*Lolium perenne* L.) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

### 4.6.2. Interacción Edad x Pasto + leguminosas

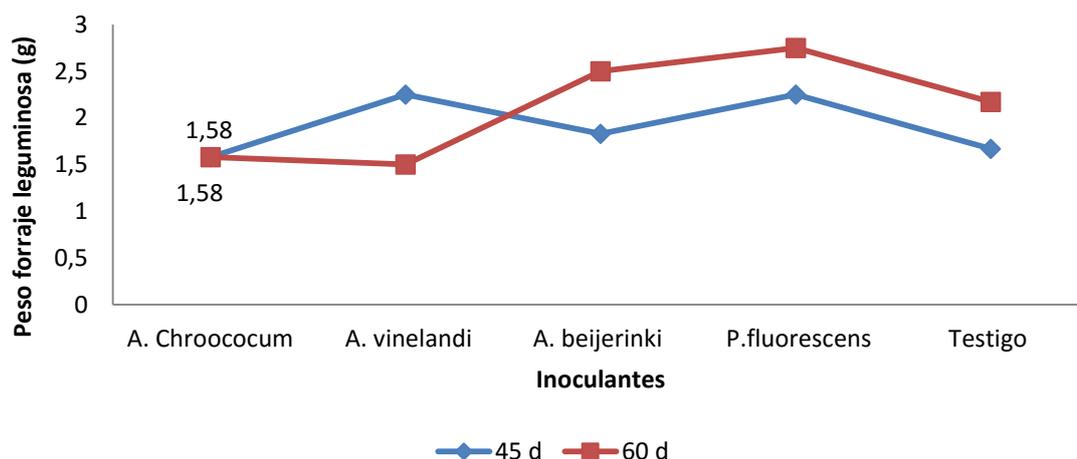
En la Edad x Pasto + leguminosas en Peso de forraje leguminosa (g) se puede observar que el mayor valor se registra a los 60 en el pasto Ray Grass + Alfalfa con 2.97. Figura 18.



**Figura 18. Edad x Pasto + leguminosas en Peso forraje leguminosa (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass (*Lolium perenne* L.) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

#### 4.6.3. Interacción Edad + inoculantes

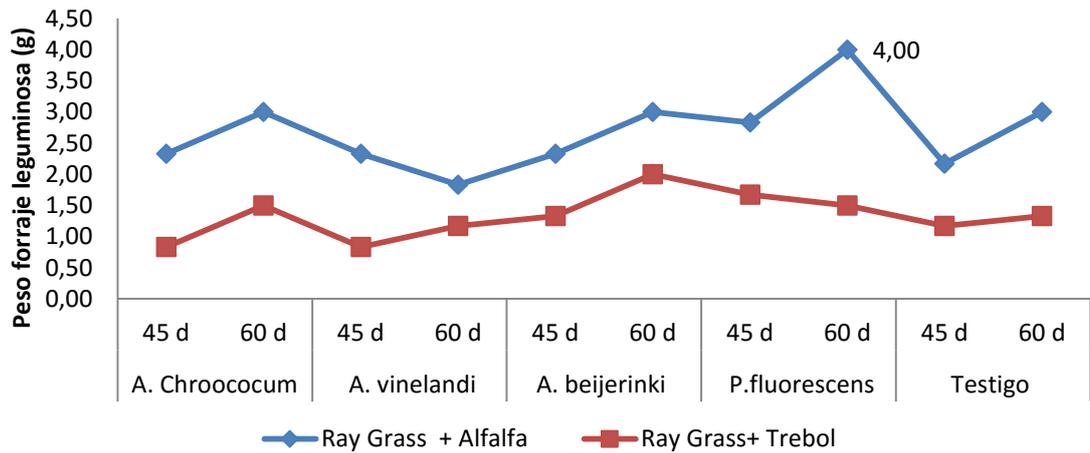
Al observar la figura 19 de la interacción edad + inoculante; se puede constatar que hay una fuerte interacción a los 45 y 60 días con el inoculante A. chroococum con 1.58 respectivamente.



**Figura 19. Edad + inoculantes en Peso forraje leguminosa (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass (*Lolium perenne* L.) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

#### 4.6.4. Interacción Pasto + Leguminosa x inoculantes x edad

En la Interacción Pasto + Leguminosa x inoculantes x edad se puede observar que el mayor valor se registra a los 60 días con el inoculante *P. fluorescens* con 4.00 Figura 20.

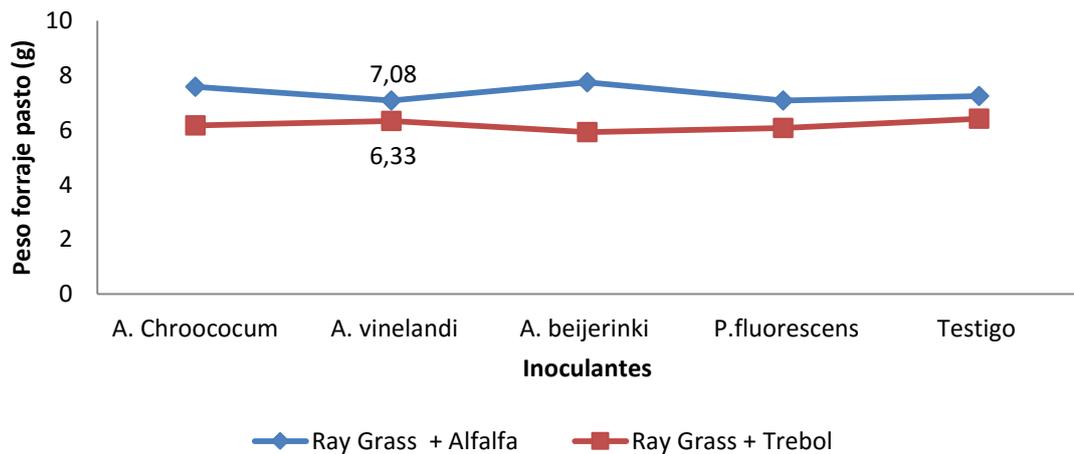


**Figura 20. Pasto + Leguminosa x inoculantes x edad en Peso forraje leguminosa (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass (*Lolium perenne* L.) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

#### 4.7. Peso forraje pasto (g)

##### 4.7.1. Interacción Pasto + Leguminosas x Inoculantes

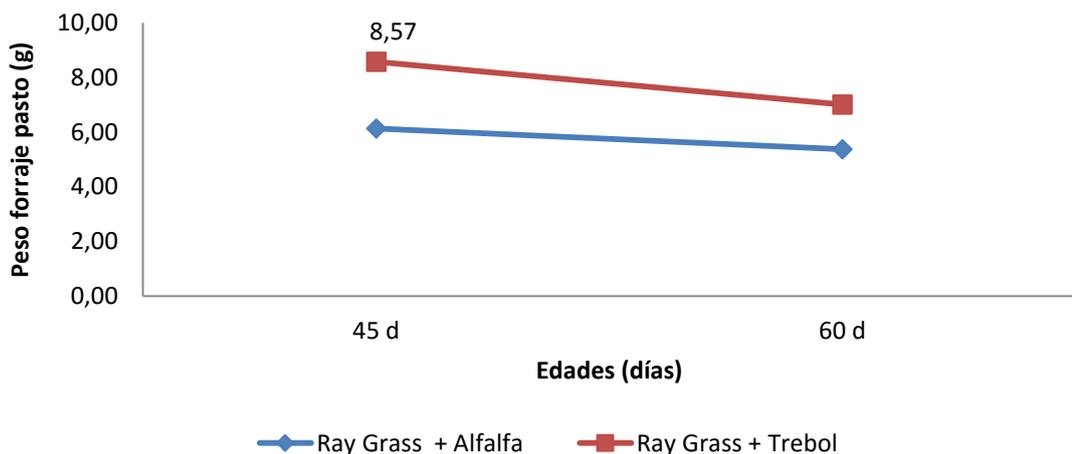
En las interacción Pasto x Inoculantes en Peso forraje pasto (g) se reflejó una similitud estadística en el Pasto Ray grass + Alfalfa con Ray grass + Trébol con el inoculante *A. vinelandii* con 6.33 y 7.08 g. Figura 21.



**Figura 21. Pasto + Leguminosa x inoculantes en Peso forraje pasto (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass (*Lolium perenne* L.) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

#### 4.7.2. Interacción Edad x Pasto + leguminosas

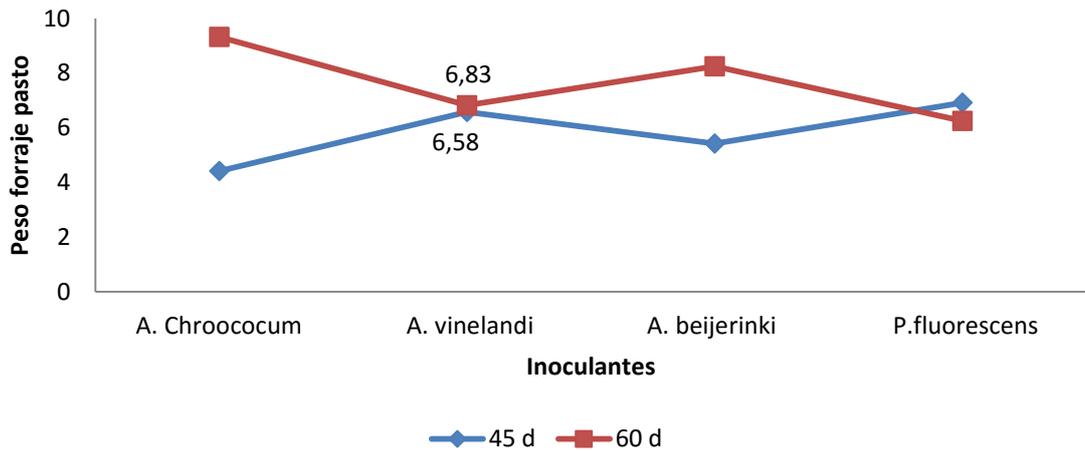
En la interacción Edad x Pasto + leguminosas en Peso forraje pasto (g) en la investigación se reflejó el mayor valor a los 45 días con el Pasto Ray grass + Alfalfa 8.57 g. Figura 22.



**Figura 22. Edad x Pasto + leguminosas en Peso forraje pasto (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass (*Lolium perenne* L.) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

#### 4.7.3. Interacción Edad + inoculantes

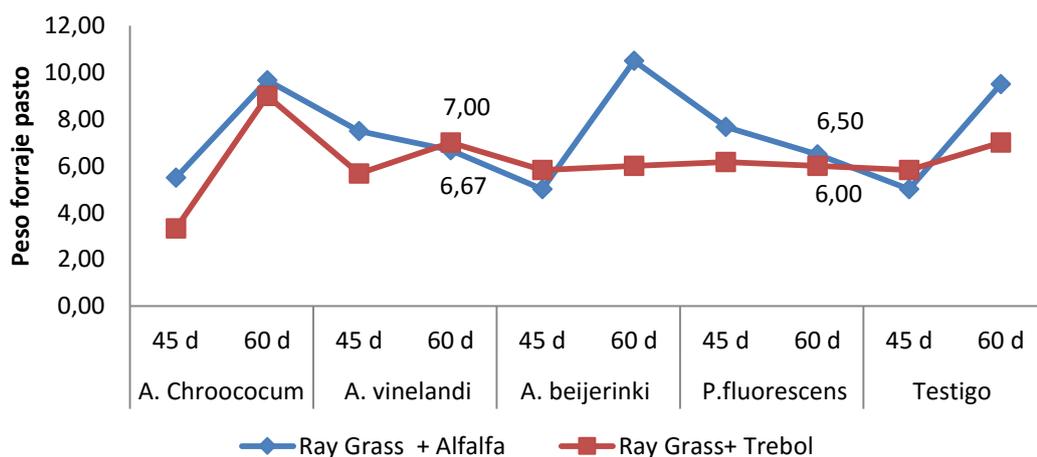
En la figura 23 sobre la interacción Edad + inoculantes en peso forraje pasto (g) se pudo observar que hay una fuerte interacción a los 45 y 60 días con el inoculante *A. vinelandii* con 6.58 y 6.83- Figura 23



**Figura 23. Edad + inoculante en Peso forraje pasto (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass (*Lolium perenne* L.) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

#### 4.7.4. Interacción Pasto + Leguminosa x inoculantes x edad

En lo que corresponde a la interacción del pasto + leguminosa x inoculante x edad se puede observar que hay interacción a los 60 días con el pasto Ray grass + Alfalfa con Ray grass + Trébol con el inoculante *A. vinelandii* a los 60 días con 6.67 y 7.00 cm; seguido del inoculante *P. fluorescens* a los 60 días con 6.00 y 6.50 cm respectivamente. Figura 24

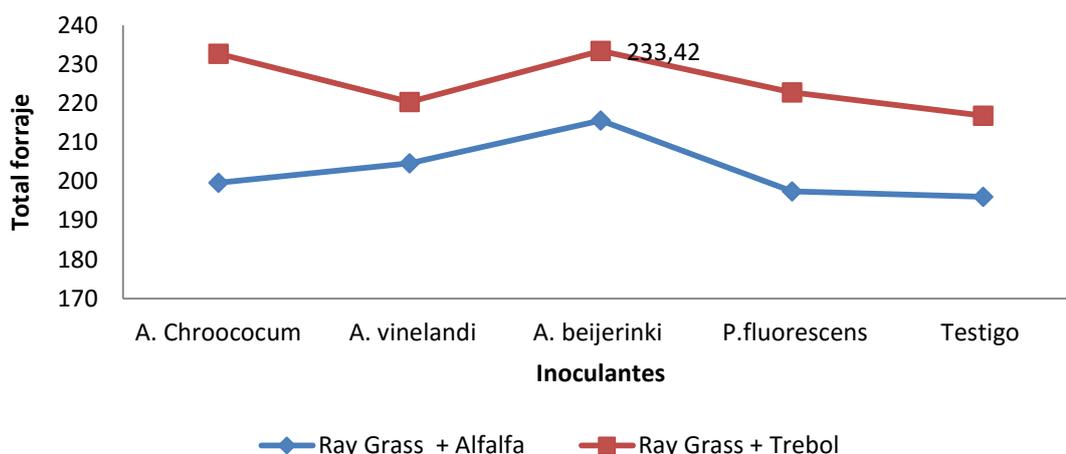


**Figura 24. Pasto + Leguminosa x inoculantes x edad en Peso forraje pasto (g) en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray Grass (*Lolium perenne* L.) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

#### 4.8. Total forraje

##### 4.8.1. Interacción Pasto + Leguminosas x Inoculantes

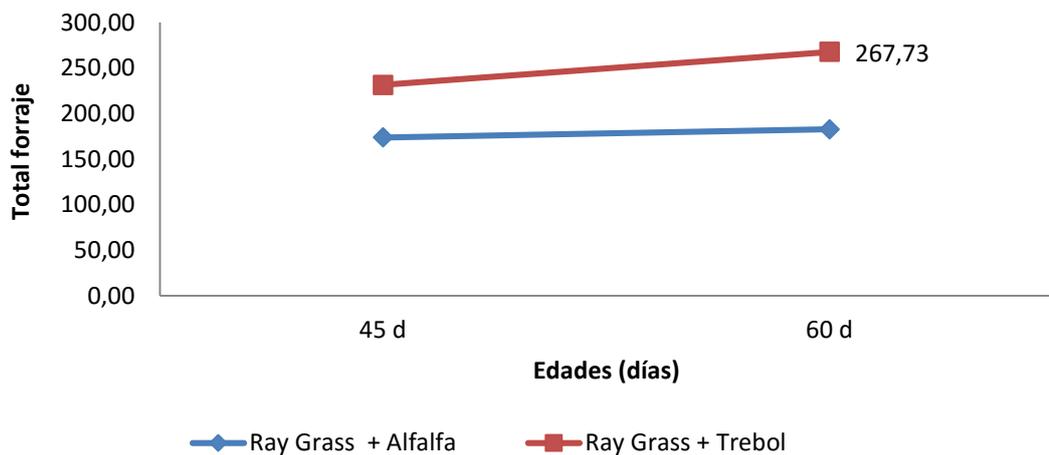
Dentro de la investigación realizada a la Interacción Pasto + Leguminosas x Inoculante donde se reflejó el mayor valor en el pasto Ray grass + Trébol con el inoculante *A. beijerinckii* con 233.42 g. Figura 25



**Figura 25. Pasto + Leguminosas x Inoculantes en Total forraje en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray grass (*Lolium perenne* L.) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

#### 4.8.2. Interacción Edad x Pasto + leguminosas

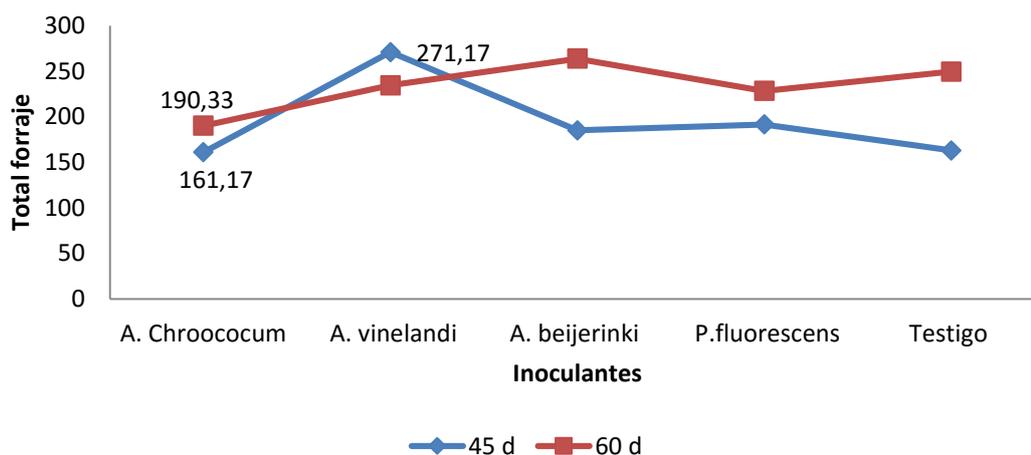
En la figura 26 se puede observar que en la interacción Edad x Pasto + leguminosas el mayor valor la obtiene el pasto Ray Grass + Trébol con 267.73 a los 60 días. Figura 25.



**Figura 26. Edad x Pasto + leguminosas en Total forraje en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray grass (*Lolium perenne L.*) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

#### 4.8.3. Interacción Edad + inoculantes

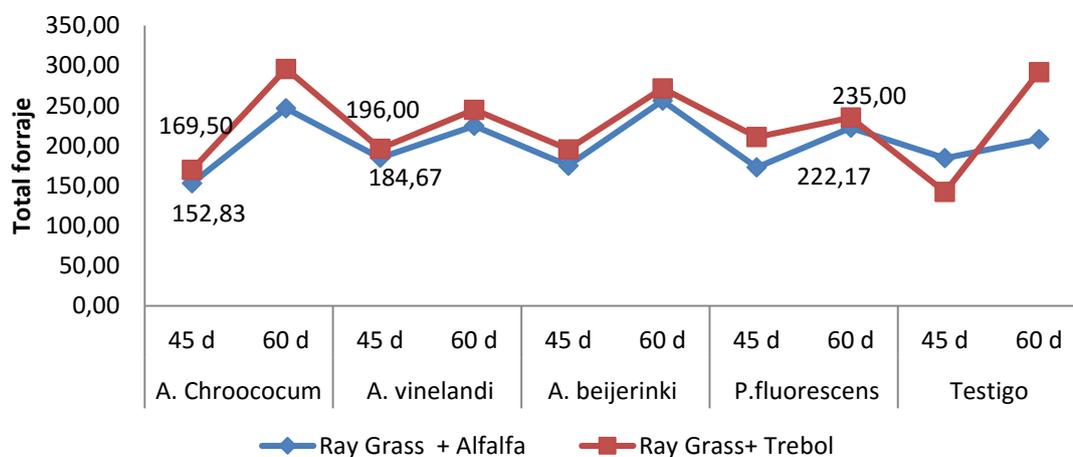
Se puede observar que la Figura 27 de la interacción Edad + Inoculantes hay una similitud estadística en el inoculante *A. chroococum* a los 46 y 60 días con 161.17 y 190.33 dentro de la investigación realizada y su mayor valor a los 45 días con el inoculante *A. vinelandii* con 271.17



**Figura 27. Edad x Pasto + leguminosas en Total forraje en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray grass (*Lolium perenne L.*) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

#### 4.8.4. Interacción Pasto + Leguminosa x inoculantes x edad

De los resultados obtenidos en las interacciones Pasto + Leguminosa x inoculantes x edad se puede observar que hay interacción a los 45 días con el pasto Ray grass + Alfalfa con Ray grass + Trébol con el inoculante A. chroococum con 152.83 y 169.50 seguido del A. vinelandii a los 45 días con 184.67 y 196.00; seguido del inoculante P. fluorescens a los 60 días con 222.17 y 235.00. Figura 28



**Figura 28. Pasto + Leguminosa x inoculantes x edad en Total forraje en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray grass (*Lolium perenne L.*) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

#### 4.9. Análisis Bromatológico

Los mayores niveles de proteína a los 45 días se reportan en el pasto Ray Grass + Alfalfa con 23.12% de proteína respectivamente, para el pasto Ray Grass + Trébol con el inoculante *A. beijerinckii* se reporta el mayor nivel con 26.87% de proteína. Cuadro 7.

A los 60 días el pasto Ray Grass + Alfalfa + *A. beijerinckii* presentan el nivel de proteína mas alto con 16.20% y en el pasto Ray Grass + Trébol reportan el mayor valor de 15.52%. Cuadro 8.

#### 4.10. Composición microbiológica

Los análisis microbiológicos de las asociaciones pasto-leguminosa estudiadas se realizaron en los laboratorios de ANCUPA ubicado en el Km 37 ½ vía Sto. Domingo – Quinindé. De los resultados obtenidos se puede observar que a los 45 días en la asociación del pasto Ray Grass (*Lolium perenne* L.) con Alfalfa (*Medicago sativa*) + Trébol rojo (*Trifolium pratense*) presenta la mejor colonización en el tratamiento Ray grass + Alfalfa + *A. Chroococum* con 86.27%; a los 60 días el mejor tratamiento la obtuvo la asociación Ray Grass + Alfalfa con 4.15%.

Mientras que en la densidad de endófitos su mejor resultados a los 45 días con el tratamiento Ray Grass + Alfalfa + *A. beijerinckii* con 79.31%; seguido del tratamiento Ray Grass + Trébol + *A. vinelandii* con 1.80% obtuvo los mejores resultados a los 60 días. Cuadro 9

**Cuadro 7. Composición bromatológica de dos asociaciones de pastos con leguminosas a los 45 días en empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray grass (*Lolium perenne* L.) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

| Pasto     | Leguminosa | Inoculante      | Humedad | Materia seca | Proteína | Ext. Etéreo | Ceniza | Fibra | E.L.N.N | Otros |
|-----------|------------|-----------------|---------|--------------|----------|-------------|--------|-------|---------|-------|
|           |            |                 | (%)     | (%)          | (%)      | (%)         | (%)    | (%)   | (%)     | (%)   |
| Ray Grass | Alfalfa    | A. Chroococum   | 82.04   | 17.96        | 21.78    | 4.85        | 14.23  | 13.10 | 46.04   |       |
|           | Alfalfa    | A. vinelandii   | 83.53   | 16.47        | 18.12    | 6.33        | 13.93  | 14.60 | 47.02   |       |
|           | Alfalfa    | A. beijerinckii | 86.55   | 13.45        | 17.00    | 6.26        | 15.57  | 16.20 | 44.97   |       |
|           | Alfalfa    | P. fluorescens  | 83.96   | 16.04        | 22.52    | 8.66        | 14.69  | 15.00 | 39.13   |       |
|           | Alfalfa    |                 | 83.44   | 16.56        | 23.12    | 4.33        | 12.90  | 13.70 | 45.95   |       |
|           | Trébol     | A. Chroococum   | 83.60   | 16.40        | 22.50    | 5.94        | 17.89  | 13.50 | 40.17   |       |
|           | Trébol     | A. vinelandii   | 83.96   | 16.04        | 20.62    | 5.76        | 14.69  | 14.20 | 44.73   |       |
|           | Trébol     | A. beijerinckii | 84.31   | 15.69        | 26.87    | 5.50        | 15.37  | 19.00 | 33.26   |       |
|           | Trébol     | P. fluorescens  | 85.15   | 14.85        | 23.40    | 5.54        | 15.47  | 14.10 | 41.49   |       |
|           | Trébol     |                 | 82.81   | 17.19        | 13.00    | 4.50        | 13.74  | 13.00 | 55.76   |       |

**Cuadro 8. Composición bromatológica de dos asociaciones de pastos con leguminosas a los 60 días en el empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray grass (*Lolium perenne* L.) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*)**

| Pasto     | Leguminosa | Inoculante      | Humedad | Materia seca | Proteína | Ext. Etéreo | Ceniza | Fibra | E.L.N.N | Otros |
|-----------|------------|-----------------|---------|--------------|----------|-------------|--------|-------|---------|-------|
|           |            |                 | (%)     | (%)          | (%)      | (%)         | (%)    | (%)   | (%)     | (%)   |
| Ray Grass | Alfalfa    | A. Chroococum   | 86.93   | 13.07        | 11.93    | 8.94        | 35.29  | 22.70 | 21.14   |       |
|           | Alfalfa    | A. vinelandii   | 88.76   | 11.24        | 13.72    | 9.55        | 34.23  | 23.90 | 18.60   |       |
|           | Alfalfa    | A. beijerinckii | 87.31   | 12.69        | 16.20    | 8.62        | 34.55  | 22.00 | 18.63   |       |
|           | Alfalfa    | P. fluorescens  | 89.35   | 10.65        | 16.19    | 8.94        | 38.27  | 23.70 | 12.90   |       |
|           | Alfalfa    |                 | 82.49   | 17.51        | 10.40    | 7.45        | 26.18  | 20.20 | 35.75   |       |
|           | Trébol     | A. Chroococum   | 78.18   | 21.82        | 10.32    | 5.96        | 18.96  | 18.40 | 46.36   |       |
|           | Trébol     | A. vinelandii   | 87.40   | 12.60        | 14.85    | 10.80       | 19.20  | 24.60 | 30.55   |       |
|           | Trébol     | A. beijerinckii | 88.27   | 11.73        | 15.07    | 11.05       | 29.18  | 25.70 | 19.00   |       |
|           | Trébol     | P. fluorescens  | 87.50   | 12.50        | 15.30    | 7.89        | 17.24  | 22.40 | 37.17   |       |
|           | Trébol     |                 | 86.85   | 13.15        | 15.52    | 8.39        | 31.38  | 21.30 | 22.97   |       |

**Cuadro 9. Composición microbiológica de dos asociaciones de pasto-leguminosa en el empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray grass (*Lolium perenne* L.) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*).**

| Tratamientos                          | Colonización (%) |         | Densidad de Endófitos /47.5% |         |
|---------------------------------------|------------------|---------|------------------------------|---------|
|                                       | 45 días          | 60 días | 45 días                      | 60 días |
| Ray grass + Alfalfa + A. Chroococum   | 86.27            | 2.57    | 47.06                        | 0.60    |
| Ray grass+ Alfalfa + A. vinelandii    | 58.00            | 0.76    | 48.48                        | 1.11    |
| Ray grass + Alfalfa + A. beijerinckii | 37.04            | 0.48    | 79.31                        | 1.43    |
| Ray grass + Alfalfa + P. fluorescens  | 65.38            | 3.64    | 45.45                        | 0.59    |
| Ray grass + Alfalfa                   | 83.64            | 4.15    | 74.36                        | 2.51    |
| Ray grass + Trébol + A. Chroococum    | 47.06            | 2.98    | 70.00                        | 0.95    |
| Ray grass+ Trébol + A. vinelandii     | 83.33            | 3.92    | 49.02                        | 1.80    |
| Ray grass + Trébol + A. beijerinckii  | 55.56            | 2.20    | 47.50                        | 0.66    |
| Ray grass + Trébol + P. fluorescens   | 75.93            | 3.44    | 74.19                        | 1.65    |
| Ray grass + Trébol                    | 54.17            | 1.13    | 40.00                        | 0.48    |

En los análisis de poblaciones totales quien obtuvo los mejores resultados reflejados en bacterias es para el Pasto Ray grass + Leguminosa + A. Chroococum con 7.32 a los 45 días seguido de la población de hongos en el Pasto Ray grass + Leguminosa + A. vinelandii con 7.63; en lo referente a los Actinomicetes en el Pasto Ray grass + Leguminosa + A. beijerinckii con 4.94 a los 60 días.

Mientras que en los grupos funcionales los mejores resultados encontrados en Celulíticos con el Pasto Ray grass + Leguminosa + A. beijerinckii con 4.71 a los 60 días; en lo referente a la Fijadores de N de vida libre sus excelentes resultados las reflejo en el Pasto Ray grass + Leguminosa + A. Chroococum con 3.61 a los 60 días. Cuadro 10.

**Cuadro 10. Poblaciones totales de bacterias, hongos y actinomicetos en las asociaciones de pasto- leguminosas en el empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación del pasto Ray grass (*Lolium perenne L.*) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*).**

| Tratamiento                                       |    | Poblaciones Totales* |        |               | Grupos funcionales            |             |                                    |
|---------------------------------------------------|----|----------------------|--------|---------------|-------------------------------|-------------|------------------------------------|
|                                                   |    | Bacterias            | Hongos | Actinomicetos | Solubilizadores<br>de Fósforo | Celulíticos | Fijadores de<br>N<br>de vida libre |
| Pasto Ray grass + Leguminosa + A.<br>Chroococum   | 45 | 7.32                 | 4.76   | 3.23          | 0.00                          | 4.53        | 2.81                               |
|                                                   | 60 | 5.41                 | 5.61   | 2.56          | 0.00                          | 3.34        | 3.61                               |
| Pasto Ray grass + Leguminosa + A.<br>vinelandii   | 45 | 7.46                 | 7.63   | 3.34          | 0.00                          | 4.28        | 2.76                               |
|                                                   | 60 | 6.98                 | 4.78   | 2.80          | 0.00                          | 4.00        | 2.85                               |
| Pasto Ray grass + Leguminosa + A.<br>beijerinckii | 45 | 6.52                 | 4.41   | 3.30          | 0.00                          | 4.34        | 2.77                               |
|                                                   | 60 | 5.28                 | 4.86   | 4.94          | 0.00                          | 4.71        | 2.00                               |
| Pasto Ray grass + Leguminosa + P.<br>fluorescens  | 45 | 6.41                 | 5.90   | 3.28          | 0.00                          | 4.15        | 2.71                               |
|                                                   | 60 | 4.68                 | 4.97   | 2.11          | 0.00                          | 3.51        | 2.46                               |
| Pasto Ray grass + Leguminosa                      | 45 | 4.40                 | 5.15   | 2.51          | 0.00                          | 2.56        | 2.30                               |
|                                                   | 60 | 5.59                 | 5.67   | 3.20          | 0.00                          | 4.51        | 3.04                               |

\*UFC/g suelo= Unidades Formadoras de Colonias por gramo de suelo

## V. DISCUSIÓN

Al estudiar los efectos simples de cada una de las variables en estudio se pudo observar mayor efecto simple de las edades a los 60 días se la presentó en las variables peso total forraje (249.60 g); en lo que corresponde a la asociación pasto – leguminosa los mejores resultados dentro de la investigación es el pasto Ray grass + Trébol en la variable peso total forraje con 225.22 g; en los que tiene que ver con los efectos simples de los inoculantes los mejores resultados obtenidos dentro de la investigación fue el inoculante *A. beijerinckii*; en la variable Peso total forraje con 224.50 y longitud de raíz leguminosa (24.08 cm) y en el pasto fue con *A. Chroococum* con 31.92 cm de longitud de raíz. Al respecto Atlas, *et al*; (2002) aseguran que las raíces de las plantas son un hábitat propicio para el desarrollo de microorganismos. Son muchas y muy variadas las poblaciones microbianas que se encuentran asociadas a las raíces de las plantas. Las interacciones entre los microorganismos del suelo y las raíces de las plantas satisfacen requerimientos nutritivos básicos para la planta y para las comunidades microbianas asociadas a ella. Esto se evidencia por el elevado número de microorganismos que se hallan en el rizoplasma.

En la interacción de pasto + leguminosa x inoculantes x edad se puede observar interacción a los 45 y 60 días con el pasto Ray grass + Alfalfa y pasto Ray grass + Trébol con el inoculante *A. Chroococum* y *A. vinelandii* con 20.00 cm y 19.67 cm, y 25.67 cm y 25.00 cm. Se indica además que en longitud de raíz se obtuvo valores iguales con *A. vinelandii* en las dos asociaciones con 21.33 cm. La Edad x Pasto + Leguminosa en Longitud de raíz pasto (cm) se puede constatar que hay interacción a los 60 días en los pastos Ray grass + Alfalfa con Ray grass + trébol con 24.00 cm y 24.07 cm.

Lo indicado por Campillo Ricardo (2003) que se evaluaron tres especies gramíneas que normalmente se siembran en la región. Al comparar la FBN (%) de las leguminosas basado en el uso de las tres especies gramíneas, se observó una gran similitud en los valores estimados

En bases a los resultados obtenidos **se rechaza** la primera hipótesis “La asociación gramínea-leguminosa: pasto Ray Grass (*Lolium perenne* L) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol Rojo (*Trifolium pratense*) inoculada con *Azotobacter chroococum* mostrará la mayor población microbiana” ya que los mejores resultados recaen en el Pasto Ray grass + Leguminosa + *A. vinelandii*.

De la misma manera al determinar los resultados presentados de análisis bromatológicos **se rechaza** la segunda hipótesis “El valor nutritivo de la asociación gramínea-leguminosa: pasto Ray Grass (*Lolium perenne* L) con Alfalfa (*Medicago sativa*) y Trébol Rojo (*Trifolium pratense*), inoculada con *Azotobacter chroococum* será superior en las dos edades de cosecha” Sin embargo se muestra el mejor valor proteico a los 45 días con la asociación Ray Grass + Trébol y *A. beijerinckii* con 26.87 % de Proteína, y a los 60 días fue la asociación Ray Grass + Alfalfa y *A. beijerinckii* con 16.20 % de proteína frente a los demás tratamientos.

## VI. CONCLUSIONES

- Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal de la rizosfera pueden estimular el crecimiento de las gramíneas y leguminosas a través de mecanismos, como fijación de nitrógeno, producción de sustancias promotoras del crecimiento, solubilización de nutrientes y producción de sideróforos.
- Las bacterias asociadas con la asociación de gramíneas - leguminosas que se han estudiado más, son las de los géneros: *Azotobacter*, *Beijerinckii*, *Pseudomonas*. Algunas de ellas forman estructuras de resistencia para favorecer su supervivencia en condiciones de estrés, en especial sequía.
- La colonización de la raíz por BPCV está relacionada con una mayor disponibilidad de carbono y humedad en la rizosfera, la cual es afectada por el mucílago de las gramíneas. El movimiento microbiano se ha asociado con fenómenos, como quimiotaxis, aerotaxis, adhesión y movimiento debido a la percolación y/o evaporación del agua. No obstante, se requiere mayor conocimiento sobre los mecanismos de colonización y permanencia de las BPCV en la raíz.
- La información sobre la manipulación de las BPCV, a través de inóculos, para la promoción del crecimiento de las plantas en condiciones de campo es inconsistente y no siempre favorable, a diferencia de los experimentos realizados en condiciones de laboratorio e invernadero. Por esta razón, se requieren de mayores estudios sobre el comportamiento de las bacterias inoculadas en condiciones de campo, para conocer los factores ambientales, como tipo de suelo y clima que influyen en colonización satisfactoria de la raíz y que determina su efecto en el desarrollo del cultivo.

- Las mezclas o la combinación de microorganismos utilizados como inóculo de semillas dan mejores resultados en el rendimiento de las gramíneas, que cuando se inoculan los organismos en forma individual. Sin embargo, es necesario realizar investigación de campo sobre los tipos de microorganismos que producen efectos sinérgicos y su aplicación en gramíneas.
- El uso de microorganismos capaces de promover el crecimiento de los pastos puede representar una opción importante para el establecimiento y para la producción de pastos forrajeros, en especial en condiciones de estrés de humedad y temperatura.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Desarrollar estudios sobre el efecto de la inoculación con *Azotobacter* sp. en otras etapas del crecimiento de las plantas, como la producción de semillas y su asimilación en la especie animal que se administra.
2. Aislar cepas nativas de bacterias fijadoras de nitrógeno de diversos lugares, para comprobar la capacidad de fijación de las mismas, y posteriormente sacar al mercado productos comerciales adecuados a cada rango de temperatura y altitud.
3. Analizar el efecto de *Azotobacter* sp. en las variables morfológicas y fisiológicas de otros cultivos importantes para la economía del país.

## VIII. RESUMEN

Los pastos y forrajes son la base de la alimentación del ganado y de otros el aprovechamiento eficiente del pasto podría satisfacer gran parte de las necesidades nutritivas del ganado.

La presente investigación se realizó en la parroquia Marcos Espinel del cantón Píllaro provincia de Tungurahua tuvo una duración de 60 días como objetivo general Determinar la población microbiana en la asociación de pastos con leguminosas mediante la inoculación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal y como objetivo específico Inocular las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal: *Azotobacter chroococum*, *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter beijerinckii paspali* y *Pseudomonas fluorescens* en las asociaciones gramíneas-leguminosas en estudio, utilizando un diseño completamente al Azar (DCA) con dos asociaciones de gramíneas, cinco inoculantes y dos edades de cosecha.

En lo que corresponde la interacción del pasto + Leguminosa x inoculantes x edad se puede observar que hay interacción a los 45 días con el pasto los Pasto Ray grass + Alfalfa con Ray grass + Trébol con el inoculante A. Chroococum con 19.67 cm y 20.00 cm; seguido del inoculante P. fluorescens a los 60 días con 25.00 cm y 25.67 cm; en lo referente a la interacción Pasto + Leguminosa x inoculante se puede observar que hay interacción a los 45 días con el pasto Ray grass + Alfalfa con Ray grass + Trébol con el inoculante A. beijerinckii con 19.00 y 19.33 cm; seguido del inoculante P. fluorescens a los 60 días con 23.67 y 24.33 cm.

Se puede observar que existe una similitud estadística en Pasto + Leguminosa x inoculantes x edad a los 45 y 60 días en el pasto Ray grass + Alfalfa con Ray grass + Trébol con el Inoculantes Testigo con 0.67 y 0.83 g en Peso de raíz leguminosa; lo que demuestra el Peso de raíz pasto los mejores resultados obtenidos en la Interacción Pasto + Leguminosa x inoculante x edad hay una fuerte interacción en el inoculante P. fluorescens a los 60 días con 5.17. Quien

a su vez no indica la mejor interacciones Peso forraje leguminosa (g) se observa que hay similitud estadística en los pastos Ray grass + Alfalfa con Ray grass + Trébol a los 60 días con el inoculante *A. vinelandii* con 1.17 y 1.83.

En lo referente a los mejores resultados obtenidos al Peso forraje pasto (g) se observa hay interacción a los 60 días con el pasto Ray grass + Alfalfa con Ray grass + Trébol con el inoculante *A. vinelandii* a los 60 días con 6.67 y 7.00 cm; seguido del inoculante *P. fluorescens* a los 60 días con 6.00 y 6.50 cm

## XI. SUMMARY

Pastures and fodder are the staple food of cattle and other grazing use efficiency could meet much of the nutritional requirements of livestock.

This research was conducted in the parish of the canton Marcos Espinel Píllaro Tungurahua province lasted 60 days overall objective determine the microbial population in the association of grasses and legumes by inoculation of plant growth promoting rhizobacteria and specifically targeted Inoculate the plant growth promoting rhizobacteria: *Chroococum*, *Azotobacter*, *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter* and *Pseudomonas beijerinckii paspali fluorescens* in grass-legume associations in study, using a completely randomized design (CRD) with two associations of grasses, five inoculants and two crop ages .

In the corresponding interaction grass + legume inoculants x age x can be seen that there is interaction at 45 days with the grass the grass + Grass Ray Ray Alfalfa grass + clover inoculant A. *Chroococum* with 19.67 cm and 20.00 cm, followed by the inoculant *P. fluorescens* a 60 days with 25.00 cm and 25.67 cm, with regard to the interaction Pasto + legume inoculant x we see that there is interaction at 45 days with grass grass + Ray Ray Alfalfa with grass + clover inoculant A. 19.00 and 19.33 with *beijerinckii* cm followed by the inoculant *P. fluorescens* at 60 days with 23.67 and 24.33 cm.

It can be seen that there is a statistical similarity in Pasto + legume inoculants x age x at 45 and 60 days on pasture grass + Ray Grass Alfalfa + Clover grass with Witness Inoculants with 0.67 and 0.83 g in legume root weight, the demonstrating the grass root weight the best results obtained in the Grass + Interaction Legume inoculant x age x there is a strong interaction in the inoculants *P. fluorescens* at 60 days with 5.17. Who in turn does not indicate the best forage legume interactions Weight (g) shows that there is statistical

similarity in pastures Ray Ray Alfalfa grass + grass + clover at 60 days with the inoculant A. with 1.17 and 1.83 vinelandii.

With regard to the best results obtained when grass forage weight (g) shows no interaction at 60 days with grass grass + Ray Ray Alfalfa with grass + clover inoculant A. vinelandii at 60 days with 6.67 and 7.00 cm, followed by the inoculant P. fluorescens at 60 days with 6.00 and 6.50 cm

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Arias C. 2007. "Suelos tropicales". Universidad Estatal a Distancia, San José, Costa Rica. Págs. 70-73.
- Atlas R y Bartha R. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Editorial Addison Wesley. Pág: 97 -100.
- Basán, Y. 2008. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. Inoculantes de crecimiento de las plantas-la promoción de las bacterias para su uso en la agricultura. Biotechnol. Biotechnol. Adv. Adv. 16:729-770. Pág. 729-770.
- Benizri, E., Baudoin, E. y Guckert, A. 2001. Root colonization by inoculated plant growth promoting rhizobacteria. colonización en las raíces de crecimiento de las plantas inoculadas rizobacterias promotoras. Biocontrol Sci. Biocontrol Ciencia. Technol. 11:557-574. Tecnología. Págs.557-574.
- Bowen, GD y Rovira, AD 2007. The rhizosphere and its management to improve plant growth. La rizosfera y su gestión para mejorar el crecimiento de las plantas. Adv. Agron. 66:1-102. 66:1-102.
- Del Castillo, P. A. y Montes de Oca, F. Efecto del uso de bacterias solubilizadoras de fósforo y fijadoras de nitrógeno sobre el rendimiento de la papa (*Solanum tuberosum*). II Taller sobre biofertilización en los trópicos. 16-18 de noviembre. La Habana. Cultivos Tropicales 15 (3). 2007: 67.
- Días, A.; Pérez, C.; Suárez, Claribel y Sánchez, C. Efecto de distintas combinaciones de micorrizas arbusculares (MA) y *Azotobacter chroococum* sobre diferentes sustratos en la producción de cafeto (*Coffea arabica* L.). XII Seminario Científico, Programa y Resúmenes. 14 -17 noviembre. La Habana. INCA 2000: 116.

- Fyo.com. 2009. Microorganismos del rizobium. Disponible en: <http://www.fyo.com/granos/ampliar.asp?IdNoticia=92416&IdAutor=97220&idtipoinformacion=22>. Consultado el 2 de Diciembre del 2010
- Gamazo C., López I, y Díaz R. 2005. Manual práctico de Microbiología. Editorial Masson. Barcelona – España.
- Garland, JL 2006. Patterns of potential C source utilization by rhizosphere communities. Los patrones de utilización de C fuente potencial de las comunidades rizosfera. Soil Biol. Biol. suelo. Biochem. Biochem. 28:223-230. 28:223-230.
- González, J. y Lluch, Carmen. 2002. Biología del Nitrógeno. Interacción Planta-Microrganismo. Ed. Rueda. Madrid. España.
- Höfflich, G.; Wieke, W. y Kühn, G. Plant growth stimulation by inoculation with symbiotic and associative rhizosphere microorganisms. Experientia 50. 2006: 897-905. (<http://zea.chapingo.mx/somefi/RFM/20-1-es.html#Art4>).
- Jiménez A. 2007. Suelos tropicales. Editorial Universidad Estatal a Distancia, San José. San José - Costa Rica. Pág. 70-73.
- Kloepper, JW 2008. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. Crecimiento de las plantas-la promoción de rizobacterias como agentes de control biológico. Pages 255-274 in: Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management. Páginas 255-274 en: Ecología microbiana del suelo: Aplicaciones en Gestión Ambiental y Agrícola. FB Metting, Jr., ed. Metting FB, Jr., ed. Marcel Dekker Inc., New York, USA. Marcel Dekker Inc., Nueva York, EE.UU.
- Martínez-Viera, R.; Dibut, B.; Casanova, Irma y Ortega, Marisel. 2000. Acción estimuladora de *Azotobacter chroococum* sobre el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mil.) en suelo Ferralítico Rojo. Efecto sobre el semillero. Agrotecnia de Cuba 27 (1): 23.

- Navarro G. 2003. Química Agrícola. Editorial Mundi – prensa. Madrid - España. Pág. 204
- Puertas, Ana y González, L. M. Aislamiento de cepas nativas de *Azotobacter chroococcum* en la provincia de Granma y evaluación de la actividad estimuladora en plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum*). Cultivos Tropicales 20 (2). 2009: 5.
- Rodelas, María Belén; González. J.; Martínez, M. V.; Pozo, C. y Salmeron, V. 2009. Influence of Rhizobium-Azospirillum and Rhizobium-Azotobacter combined inoculation on mineral composition of faba bean (*Vicia faba* L.). En: (<http://193.146.205.198/sefin/Ecologia/Rodelas.html>).
- Rodríguez E., Gamboa M., Hernández F. y García J. 2005. Bacteriología general: principios y prácticas de Laboratorio. Editorial Universidad de Costa Rica. Págs. 213-215 páginas.
- Roque, Adilén; Marrero, Virginia; Guzmán J.; Castillo, A. y Bueno, A. Respuesta de la yuca (*Manihot esculenta*) a la fertilización nitrogenada y combinación con biofertilizantes. Resultados preliminares. Cultivos Tropicales 15 (3). 2007: 66.
- Sánchez, C.; González, C.; Bustamante, C.; Rivera, R.; Fernández, F. y Herrera, R. Utilización de las Micorrizas VA y *Azotobacter* sp. en la producción de posturas de *Coffea arabica* L. II Taller sobre biofertilización en los trópicos. 16-18 de noviembre. La Habana. Cultivos Tropicales 15 (3). 2006: 69.
- Smith, PK, y Goodman, RM 2009. Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. Anfitrión de variación para las interacciones con los beneficios del consumo de los microbios de la planta. Ann. Ann. Rev. Phytopathol. Phytopathol Apocalipsis. 37:473-491. 37:473-491.
- Sorensen, J. Jensen, LE, y Nybroe, O. 2001. Soil and rhizosphere as habitats for *Pseudomonas* inoculants: New knowledge on distribution, activity and physiological state derived from micro-scale and single-cell studies.

Suelo y rizosfera como hábitat de inoculantes *Pseudomonas*: Los nuevos conocimientos sobre la distribución, actividad y estado fisiológico derivado de una sola célula estudios de escala y micro. *Plant Soil* 232:97-108. Planta de suelo Págs.:97-108.

Stanier R, Ingraham J., Wheelis M., y Painter P. 2006. *Microbiología*. Editorial reverté. Págs. 67-68

Taiz L. y Zeiger E. *Fisiología vegetal* 2006. Publicaciones Universitat Jaume. Madrid –España. Págs. 516-517.

Torres, R. 2005. Inoculación combinada de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* y *Azotobacter chroococum* en el cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Evento de Ciencia y Técnica, UCLV.

Wild A. 2005. Condiciones del suelo y desarrollo de las pantas según Russel. Ediciones Mundi – prensa. Madrid – España. Pág. 556 – 559.

## **XI. ANEXO**



**Anexo 1. Lugar de la investigación**



**Anexo 2. Distribución de las unidades experimentales**



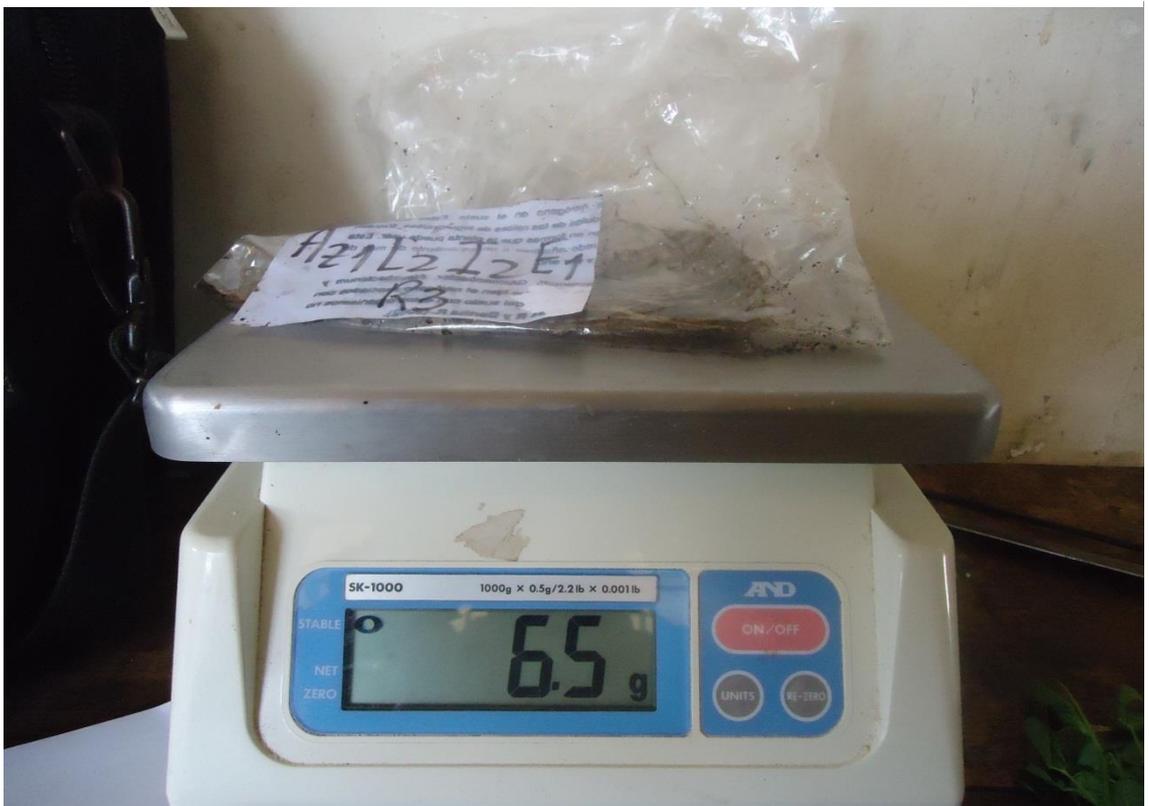
**Anexo 3. Distribución de los tratamientos**



**Anexo 4. Semillas Ray gras + Alfalfa**



**Anexo 2. Mediciones experimentales**



**Anexo 3. Peso de raíz**



**Anexo 4. Conteo de nódulos**



**Anexo 6. Toma de muestras de pastos para análisis bromatológico**

## PRESUPUESTO

| Descripción                            | Cantidad | Valor Unitario<br>USD | Valor total<br>USD |
|----------------------------------------|----------|-----------------------|--------------------|
| <b>Mano de obra</b>                    |          |                       |                    |
| Jornales                               | 100      | 6,00                  | 600,00             |
| Movilización                           | 75       | 5,00                  | 375,00             |
| Manutención                            | 75       | 5,00                  | 375,00             |
| Viajes                                 | 5        | 30,00                 | 150,00             |
| <b>Subtotal A</b>                      |          |                       | <b>1500,00</b>     |
| <b>Materiales de campo</b>             |          |                       |                    |
| Material vegetativo de Ray grass (g)   | 500      | 3,00                  | 3,00               |
| Material vegetativo de Alfalfa (g)     | 500      | 3,00                  | 3,00               |
| Material vegetativo de Trébol rojo (g) | 500      | 3,00                  | 3,00               |
| Inoculante Azotobacter chroococum (L)  | 2        | 15,00                 | 30,00              |
| Inoculante Azotobacter vinelandii (L)  | 2        | 15,00                 | 30,00              |
| Inoculante beijerinckii (L)            | 2        | 15,00                 | 30,00              |
| Inoculante Pseudomona fluorescens (L)  | 2        | 15,00                 | 30,00              |
| Flexómetro                             | 1        | 5,00                  | 5,00               |
| Fundas de papel                        | 1000     | 0,01                  | 10,00              |
| Fundas plásticas                       | 1000     | 0,01                  | 10,00              |
| Fundas de quintal                      | 500      | 0,50                  | 250,00             |
| Estacas de caña                        | 1000     | 0,10                  | 100,00             |
| Machetes                               | 2        | 6,00                  | 12,00              |
| Lima                                   | 2        | 2,00                  | 4,00               |
| Glifosato L                            | 2        | 2,50                  | 5,00               |
| Baldes                                 | 10       | 1,50                  | 15,00              |
| Cabo m                                 | 10       | 1,00                  | 10,00              |
| Polea                                  | 1        | 25,00                 | 25,00              |
| <b>Subtotal B</b>                      |          |                       | <b>575,00</b>      |
| <b>Materiales de Oficina</b>           |          |                       |                    |
| Cuadernos                              | 2        | 2,00                  | 4,00               |
| Cartulinas                             | 20       | 0,20                  | 4,00               |
| Cinta de embalaje                      | 2        | 2,50                  | 5,00               |
| Hojas resmas                           | 3        | 4,00                  | 12,00              |
| Cartuchos de Tinta                     | 2        | 38,00                 | 76,00              |
| Recarga                                | 2        | 10,00                 | 20,00              |
| Carpetas                               | 20       | 0,10                  | 2,00               |
| Copias                                 | 500      | 0,03                  | 15,00              |
| <b>Subtotal C</b>                      |          |                       | <b>138,00</b>      |
| <b>Análisis de laboratorio</b>         |          |                       |                    |
| Análisis microbiológicos               | 40       | 80,00                 | 3200,00            |
| Análisis bromatológicos                | 40       | 25,00                 | 1000,00            |
| <b>Subtotal D</b>                      |          |                       | <b>4200,00</b>     |
| Total A+B+C+D                          |          |                       | 6413,00            |
| Imprevistos 3%                         |          |                       | 192,39             |
| <b>Total</b>                           |          |                       | <b>6605,39</b>     |

