

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingeniería

**Evaluación del crecimiento y contenido de proteína después de la
aplicación de fertilizantes orgánicos en pastos de Machachi,
Pichincha, Ecuador.**

Aylin Isabella Mancheno Ruales

Ingeniería en Agronomía

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito

para la obtención del título de

Ingeniero Agrónomo

Quito, 20 de diciembre de 2023

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingeniería

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Evaluación del crecimiento y contenido de proteína después de la
aplicación de fertilizantes orgánicos en pastos forrajeros de
Machachi, Pichincha, Ecuador.**

Aylin Isabella Mancheno Ruales

Nombre del profesor, Título académico:

Antonio León Reyes, PhD

Quito, 20 de diciembre de 2023

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Aylin Isabella Mancheno Ruales

Código: 00213096

Cédula de identidad: 1726829714

Lugar y fecha: Quito, 20 de diciembre de 2023

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: el presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETheses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETheses>.

RESUMEN

La producción lechera es uno de los rubros más importantes del país, ya que es fuente de empleos directos e indirectos. Un importante factor que determina la producción lechera es el porcentaje de nitrógeno disponible para el forraje destinado al consumo de ganado lechero, pues este compuesto determina en gran medida la proteína disponible para los animales. Una de las principales fuentes de nitrógeno utilizada en la industria lechera es la aplicación de fertilizantes sintéticos nitrogenados. El costo de estos insumos ha incrementado su valor, reduciendo la rentabilidad de la industria ganadera, aparte de ello, el uso indiscriminado de fertilizantes sintéticos ha desencadenado en graves impactos ambientales tales como la contaminación de aguas subterráneas, eutrofización, degradación del suelo, etc. El objetivo del presente estudio fue evaluar el crecimiento y contenido de proteína en el pasto con diferentes alternativas orgánicas, incluyendo el uso de *Azospirillum brasilense*, ácidos húmicos y como control fertilizante sintético.

Dentro de las alternativas orgánicas evaluadas se ha considerado el uso de la bacteria *Azospirillum. brasilense*, y el uso de ácidos húmicos y como control se utilizó fertilizante sintético. Para la evaluación en campo se utilizó un diseño de bloques completamente al azar con 4 tratamientos y 4 repeticiones, con un total de 16 unidades experimentales, se evaluaron las variables peso fresco, peso seco, contenido de nitrógeno y proteína.

Para la variable de peso fresco, el mejor tratamiento fue *A. brasilense* con un rendimiento de $15916.28 \text{ kg/ha}^{-1}$, y para las variables de porcentaje de nitrógeno y porcentaje de proteína se obtuvo los mejores resultados con la aplicación de fertilizante sintético. El uso de *A. brasilense* permitió un mayor desarrollo del pasto.

Palabras clave: *Azospirillum brasilense*, fertilizante sintético, nitrógeno, peso fresco, proteína.

ABSTRACT

Dairy production is one of the most important industries in the country, as it is a source of direct and indirect employment. An important factor determining milk production is the percentage of nitrogen available for forage for dairy cattle consumption, as this compound determines to a large extent the protein available to the animals. One of the main sources of nitrogen used in the dairy industry is the application of synthetic nitrogen fertilizers. The cost of these inputs has increased their value, reducing the profitability of the livestock industry. In addition, the indiscriminate use of synthetic fertilizers has led to serious environmental impacts such as groundwater contamination, eutrophication, soil degradation, etc. The objective of the present study was to evaluate the growth and protein content of grass with different organic alternatives, including the use of *Azospirillum brasilense*, humic acids and synthetic fertilizer as a control.

Among the organic alternatives evaluated, the use of the bacterium *Azospirillum brasilense* and the use of humic acids were considered, and synthetic fertilizer was used as a control. For the field evaluation, a completely randomized block design was used with 4 treatments and 4 replicates, with a total of 16 experimental units, and the variables fresh weight, dry weight, nitrogen and protein content were evaluated.

For the fresh weight variable, the best treatment was *A. brasilense* with a yield of $15916.28 \text{ kg/ha}^{-1}$, and for the nitrogen percentage and protein percentage variables, the best results were obtained with the application of synthetic fertilizer. The use of *A. brasilense* allowed a better development of the grass.

Key words: *Azospirillum brasilense*, fresh weight, protein, synthetic fertilizer, nitrogen.

TABLA DE CONTENIDO

I. Introducción:	12
1.1 Antecedentes:	12
1.2 Justificación:	15
II. Marco Teórico	17
2.1 Mezclas Forrajeras	17
2.2 El nitrógeno en el forraje	19
2.3 Relación entre el nitrógeno y la producción lechera	20
2.4 Fertilizantes sintéticos	22
2.5 Biofertilizantes	22
2.5.1 Género Azospirillum	23
2.8 Método Kjeldahl	24
III. Objetivos e hipótesis	25
3.1 Objetivo general:	25
3.2 Objetivos específicos:	25
3.3 Hipótesis general:	26
IV Materiales y métodos	26
4.1 Material biológico	26
4.1.1 Azospirillum brasilense	26
4.1.2 Mezcla forrajera	26
4.1.3 Ácidos húmicos	27
4.2 Fertilizante sintético	27
4.3 Manejo del experimento	27
4.3.1 Caracterización, y estandarización del cultivo para <i>A. brasilense</i>	27
4.3.2 Aplicación de los tratamientos en campo	31

4.3.4 Evaluación del efecto de los diferentes tratamientos en el peso fresco, seco, porcentaje de nitrógeno y proteína.....	32
V. Resultados de las variables.....	33
5.1 Diseño experimental y Método estadístico.....	33
5.2 Peso fresco.....	33
5.3 Peso seco y porcentaje de materia seca.....	35
5.4 Porcentaje de nitrógeno y proteína.....	36
VI. Discusión.....	38
VII Conclusiones.....	39
VIII Recomendaciones.....	40
Bibliografía:.....	40
Anexos:.....	48
Anexo A: Composición del medio R2.....	48
Anexo B: Composición del medio YEM.....	49
Anexo C : crecimiento de <i>A. brasilense</i> en placa.....	49
Anexo D: <i>A. brasilense</i> bajo microscopio.....	49
Anexo E: tratamiento de control (izquierda) y <i>A. brasilense</i> (derecha) listos para la aplicación ..	50
Anexo F: mochila de fumigar utilizada para la inoculación.....	50
Anexo G: inoculación de <i>A. brasilense</i> en la mezcla forrajera.....	51
Anexo H: Cuadrado de 1 m² usado para la cosecha del forraje.....	51
Anexo I: Cosecha del forraje.....	52
Anexo J: Secado de muestras.....	52
Anexo K: Peso en seco.....	52
Anexo L: peso de muestras para la determinación del porcentaje de nitrógeno bajo el método Khejdal.....	53
Anexo M: Muestras en tubos de mineralización con tabletas antiespumante y catalizadora.....	54

Anexo N: Máquina digestora para la determinación del porcentaje de nitrógeno bajo el método Khejdal.....	54
Anexo O: máquina destiladora	55
Anexo P: Muestra previa destilada previa a volurimetría	55
Anexo Q: Reacción del nitrógeno con HCl para determinar su porcentaje por medio de volumetría	56
Anexos R: pruebas estadísticas para el peso fresco	56
Anexo R. 1: Peso fresco por tratamiento por tratamientos.....	56
Anexo R. 2: Promedio del peso fresco por tratamiento	56
Anexo R. 3: análisis estadísticos.....	57
Anexo R. 4: Agrupaciones	57
Anexo S: Pruebas estadísticas para peso seco	58
Anexo S. 1: Peso seco registrado.....	58
Anexo S. 2: Porcentaje de materia seca por tratamiento	58
Anexo S. 3: análisis estadístico.....	58
Anexo T: porcentaje de nitrógeno y proteína.....	59
Anexo T. 1: ANOVA del porcentaje de nitrógeno	59
Anexo T. 2: Agrupaciones de tratamientos	60
Anexo T. 3: análisis de los datos obtenidos para proteína.....	60
Anexo T. 4: Agrupaciones:.....	61

Índice de figuras

Figura 1: Proceso de rehidratación de la bacteria.	28
Figura 4: Curvas de crecimiento.....	30
Figura 5: Mapa de la aplicación de los tratamientos	31
Figura 6: Resultados de peso fresco expresado en kilogramos por hectárea,	34

Figura 7: Diferencia óptica del forraje en fresco de los tratamientos	34
Figura 8: Peso seco en kg por hectárea en cada tratamiento	35
Figura 9: Porcentaje de materia seca.....	36
Figura 10: Porcentaje de nitrógeno disponible en cada tratamiento	37
Figura 11: Gramos de proteína disponible	37

I. Introducción:

1.1 Antecedentes:

A medida que la población mundial aumenta, se ha incrementado la demanda de alimentos, los cuales en un 90% deberán provenir de los campos que ya se encuentran cultivados, es por ello que el uso de nuevos sistemas agrícolas y mejoras tecnológicas es de vital importancia para el sector agropecuario. Por esta razón, las mejoras enfocadas en el campo agropecuario están direccionadas en poder proveer de alimento a una población que se encuentra en constante crecimiento y a su vez poder generar rentabilidad para el agricultor. (FAO, 1992).

El sector ganadero es de gran importancia en América Latina y el Caribe, ya que éste es una fuente de alimentos básicos que proporciona la seguridad alimentaria a estas poblaciones. A nivel mundial, más de 1 billón de personas tienen dependencia económica del sector ganadero. América Latina cuenta con extensas áreas dedicadas a pasturas, un régimen climático favorable y mientras se mantenga un uso eficiente de los insumos como por ejemplo los fertilizantes, esta región puede continuar siendo un importante productor pecuario, para garantizar la alimentación tanto regional como mundial. (FAO, 2023).

El poder definir la contribución exacta de los fertilizantes para mejorar la producción agrícola es de suma importancia ya que en este proceso interactúan diferentes factores como las dosis de aplicación, compuestos, etc. Sin embargo, se calcula que a nivel mundial del 37% al 43% del suministro de proteínas provienen del nitrógeno sintético. Si el suelo dispone de una amplia disponibilidad de nutrientes es muy probable que los cultivos se desarrollen de mejor manera y serán más productivos (FAO, 1992).

Para poder mantener los rendimientos de los cultivos, se han realizado aplicaciones masivas de fertilizantes y se ha llegado a generar un grado de dependencia de estos. Esta fuente de nutrientes para los cultivos contiene minerales solubles que son capaces de liberarse lentamente para que las plantas puedan aprovecharlo al máximo. Sin embargo, por efecto del exceso de aplicación de estos compuestos se ha generado eutrofización, contaminación del aire, desequilibrios biológicos, reducción de la biodiversidad, contaminación de aguas subterráneas, menor cantidad de microorganismos en el suelo, etc. (González, P. 2019).

El empleo de nitrógeno en un sistema ganadero dedicado a la producción lechera es uno de los más importantes, es por ello que se lo aplica a manera de fertilización, a su vez se buscan agentes con la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico para poder aprovechar de mejor manera los recursos tanto naturales como adicionados por el hombre, una enmienda o actividad cultural que se suele llevar a cabo para adicionar nitrógeno de manera orgánica consta en dispersar las heces del ganado bovino por el potrero, pues este contiene nitrógeno que puede ser aprovechable por la planta. Constantemente se adiciona nitrógeno en el campo ya sea a manera de fertilización o de enmiendas orgánicas, pues el contenido de nitrógeno disponible en la atmósfera es insuficiente para el correcto desarrollo de los cultivos. La importancia del nitrógeno radica en que este es parte de los aminoácidos que forman proteínas para los organismos lo que hace que tenga un impacto directamente con la producción lechera (Elizondo, J. 2006).

Las necesidades proteicas de un ser vivo dependen de la edad y especie que se esté tratando. Los animales necesitan una cierta cantidad de proteína para su etapa de crecimiento,

mantenimiento y producción, siendo esta última etapa, donde ocurre todo el proceso de preñez, crecimiento y lactación. A su vez, los microorganismos que interactúan en el rumen también necesitan de nitrógeno para poder desarrollarse (Elizondo, 2006).

Durante la primera mitad del año 2022 el valor en dólares de las importaciones de fertilizantes químicos en América Latina y el Caribe incrementó en promedio 136,6 % en comparación de los primeros 6 meses del año 2021, sin embargo, el volumen en toneladas métricas de importaciones creció en 4%. Este incremento del costo es producto de la crisis político-social por el conflicto entre Rusia y Ucrania, así como por aumento de la demanda de insumos que se originó a principios de la pandemia. Este encarecimiento de precios y caída de volumen importado afectó directamente los costos de producción, el rendimiento y la rentabilidad agropecuaria (IICA. 2023)

Como alternativa para poder incrementar la fijación de nitrógeno en el forraje y proveer a los animales de una fuente proteica que cubra sus necesidades, así como reducir los costos en su producción se ha evaluado el cultivo de forrajes que contengan especies de gramíneas las cuales son capaces de absorber nutrientes del suelo, tales como el nitrógeno y mantenerlos disponibles para los animales una vez que estos consuman la planta. Otra alternativa para proveer nitrógeno a las mezclas forrajeras es emplear fuentes inorgánicas alternativas, tales como la roca fosfórica, este tratamiento ha demostrado tener buenos resultados en suelos ácidos y de baja fertilidad (Espinoza, F. 2020).

Otra alternativa con la capacidad de incrementar la disponibilidad de nitrógeno en el suelo es el uso de microorganismos benéficos ya que han demostrado ser de vital importancia no solo para la salud del suelo, sino también para fijar nitrógeno. Existen ciertas bacterias con la capacidad de generar simbiosis con las plantas para que estas sean capaces de fijar nitrógeno.

Estas bacterias aprovechan directamente el nitrógeno que se encuentra disponible en el aire, proporcionándole a la planta compuestos orgánicos nitrogenados (Calvo, S. 2011).

El género de bacterias *Azospirillum* se caracteriza por fijar de manera efectiva el nitrógeno y se encuentra distribuida casi por todo el mundo, se las han podido detectar en zonas tropicales, templadas y subtropicales. Se suelen asociar a la rizosfera de varios cultivos, entre los cuales se puede destacar los pastos forrajeros. La inoculación con esta bacteria causa que las plantas desarrollen tanto raíces laterales como adventicias, promueve el desarrollo de las plantas y aumenta la capacidad de absorción de minerales y agua. Esta bacteria pertenece al grupo de Gram Negativas con una estructura celular en forma de bacilos, su diámetro puede oscilar entre 1.0 micra (μm) x 2,1-3,8 μm . Se encuentran en el grupo de los diazotrofos, endófitos facultativos por su potencial para ingresar a la raíz y colonizar los espacios intercelulares. La capacidad de la bacteria para fijar nitrógeno es gracias a la presencia del complejo enzimático de nitrogenasa (Aguilar, L. 2020).

1.2 Justificación:

El ganado bovino representa un 40% de la producción agropecuaria a nivel mundial y es el sustento de la seguridad alimentaria de alrededor de 1 300 millones de personas. Este es uno de los sectores con mayor crecimiento en la economía mundial, este crecimiento representa oportunidades para el desarrollo del sector agropecuario, ya que permite la generación de nuevas tecnologías con posible aplicación en este campo que permita un desarrollo más eficiente y sostenible (FAO, 2017).

Según Batallas (2009), la ganadería ocupa la mayor extensión de tierras agrícolas a nivel mundial por su uso en pastoreo y cultivos forrajeros. A nivel nacional, la producción lechera representa un importante rubro y se ha evidenciado un incremento constante en el consumo

de leche para la alimentación de la población. La industria lechera a nivel nacional genera alrededor de 1,2 millones de empleos tanto directos como indirectos, a su vez, proporciona un aporte al PIB de alrededor 4%. Acorde con el Servicio de Rentas Internas, en el año 2021 el sector de producción lechera presentó un incremento del 10.92% a comparación del año 2020. En Ecuador, el consumo de leche fluida es en promedio 110 litros por persona al año, considerándose una cantidad baja ya que instituciones como la FAO y OMS recomiendan un consumo de 180 litros por persona por año (Centro de la Industria Láctea del Ecuador. 2021).

Para poder proporcionar al ganado lechero una fuente de alimento que cubra sus necesidades y de esta manera poder mantener una producción lechera rentable, bajando los costos de producción, se han evaluado varias alternativas, entre ellas el uso de bacterias nitrificantes, ya que estas cumplen una función crucial en el suelo, pues son las encargadas de oxidar el NH_3 para que sean fácilmente asimilables, mediante la oxidación el amoniaco se transforma en nitrato (Rodríguez, N.et al. 2007).

Las plantas se pueden asociar con diversos organismos que se encuentran tanto en la rizósfera como en la filósfera para crear interacciones benéficas. Los efectos benéficos pueden ser diversos, como por ejemplo la fijación de nitrógeno, producción de sideróforos y fitohormonas, solubilización del fósforo, promover el crecimiento de brotes y raíces, etc. Dentro de los microorganismos comúnmente utilizados en la agricultura destacan las *Pseudomonaas*, *trichoderma*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, y micorrizas (Chávez, J. et al. 2020)

Las bacterias del grupo *Azospirillum* ayudan y promueven el crecimiento vegetal. Dicha bacteria, se encuentra distribuida por varias regiones alrededor del mundo. Esta bacteria se asocia directamente a las raíces de las plantas e influyen tanto en la producción como a la productividad del cultivo, pues actúan de manera benéfica en el crecimiento aéreo de las

plantas, así como el sistema radicular. Los beneficios de estas bacterias, se deben a la excreción de los fitonutrientes de crecimiento, como las auxinas. En el caso de gramíneas forrajeras, el inocularlas con esta bacteria proporciona mayores ganancias en la biomasa con una considerable menor cantidad de nitrógeno aplicado en la fertilización, lo cual asegura la sostenibilidad de producción de pasto (Domingues, C. et, al. 2020).

Estudios demuestran que la aplicación de organismos benéficos, como *Azospirillum* incrementa la cantidad de nitrógeno absorbida por la planta, de esta manera, se podría disminuir la cantidad de fertilizantes aplicados, permitiendo mayor rentabilidad en el sector agropecuario y menor impacto ambiental (Conislla, M. et al. 2023).

Es por ello que en este trabajo se desea evaluar el efecto que tiene la aplicación de *A. brasilense* y compararlo con otras fuentes de nitrógeno como el fertilizante sintético y los ácidos húmicos para determinar su efecto en el forraje destinado a ganado lechero.

II. Marco Teórico

2.1 Mezclas Forrajeras

Estadísticas del año 2013 demuestran que alrededor del 40% de la superficie del sector rural nacional se destina a la producción y consumo de pastos mejorados y naturales lo que demuestra que la ganadería se ha convertido en una de las principales actividades del agro ecuatoriano, sobre todo en la región andina, pues el 80% de la producción de bovinos se encuentra en la sierra, el 13% en la costa y un 7% se distribuye por el resto del país. A su vez, alrededor del 55,5% de explotaciones ganaderas son destinadas a la producción lechera (Zambrano. et al, 2017).

Las mezclas forrajeras podrían definirse como una población creada de manera artificial que está compuesta por distintas especies cuyas características difieren entre sí ya sean

morfológica o fisiológicamente, usualmente al menos una de las especies utilizadas para esta mezcla es de ciclo perenne. Actualmente existe gran diversidad de mezclas forrajeras entre Reygrases, leguminosas, cereales, gramíneas, etc. La mezcla se la define según la zona donde se vaya a sembrar y qué especie animal va a consumir el forraje. Usualmente la mezcla más utilizada es Reygrás, trébol, gramíneas y kikuyo. Dentro de las principales ventajas de las mezclas, se destaca la producción prolongada y viable en el tiempo, así como la disminución de malezas, y un mayor balance del valor nutritivo (Saldanha, S. 2011).

El consumo de mezclas forrajeras es de vital importancia para el sector ganadero. La nutrición debe ser completa en todas las etapas del desarrollo del animal, de esta manera se desarrollan animales con alta capacidad de producción. Los forrajes disponibles para el pastoreo son una de las principales fuentes de nutrientes para los animales y en ciertos casos la única fuente de alimentación (Garzón, Y y Rico, A. 2022).

El Reygrass es un pasto adaptado a climas templados, sus orígenes se remontan a Medio Oriente, Europa, y Asia central, ha demostrado ser una especie funcional para la producción de forraje, así como para el pastoreo de ganado. Este pasto desarrolla un macollo, el cual da origen a tres hojas, a demás, su base no es perjudicada o dañada por efectos de pastoreo. (Lee, J. et al. 2012). Este pasto contiene altos niveles de proteína cruda y carbohidratos no fibrosos, lo cual permite la producción de proteína a nivel microbial, la cuál es del mejor grupo de proteínas consumible para los animales rumiantes (Villalobos, L. y Sánchez, J. 2010). Estas condiciones nutricionales y de adaptación hacen que el pasto sea adecuado tanto como para el experimento como para la producción lechera.

El trébol blanco (*Trifolium repens*) es una planta herbácea de carácter perenne, adaptada al clima templado. Esta planta es nativa de Europa, África y Asia Occidental. Se ha evidenciado

un crecimiento rastrero. Sus raíces se caracterizan por tener una raíz principal de la cuál nacen raíces adventicias, este pasto presenta hojas pecioladas y trifoliadas cuyos foliolos son de forma ovalada. El trébol es de fácil adaptabilidad siempre que el sitio de siembra presente una adecuada humedad, a su vez, al tener un hábito estolonífero, se adapta fácilmente al pastoreo, razón por la cual, se suele utilizar para el pastoreo rotacional o en asociación con otros pastos como el Kikuyo; Por otra parte, se ha evidenciado que el uso de esta leguminosa incrementa potencialmente la producción de leche (Vibrans, H. 2009).

Por último, el kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) es un pasto de carácter perenne originario de África, esta especie adaptada a clima frío ha demostrado un rápido crecimiento, tolerancia a la sequía y alto contenido proteico. Dentro de las características de este pasto, se puede destacar su resistencia al daño animal por el pisoteo, pues tiene una fuerte red de raíces lo que le permite renovar fácil y rápidamente su parte aérea, a su vez su alto contenido proteico (11-22%) y alta digestibilidad (65-80%) lo hace un pasto ideal para el pastoreo (Martinez F. 2020).

2.2 El nitrógeno en el forraje

Un forraje de buena calidad debe contener la dosis correcta de aplicación de nitrógeno para poder desarrollarse. Este nutriente es fundamental para la producción de cualquier tipo de planta, pues se ve involucrado en varios procesos como el desarrollo foliar, la emisión de polen, la aparición de estigmas, rendimiento, formación de proteínas, y aminoácidos (Ube, J. 2021).

El nitrógeno es de vital importancia para los pastos y es ampliamente usado para estimular su crecimiento. Este compuesto presente en la atmósfera, no se encuentra directamente a disposición de las plantas, a pesar de ser el principal componente de la misma; para que el nitrógeno pueda ser aprovechado por la planta necesita atravesar un proceso complejo. Este compuesto necesita de bacterias y otros organismos procariontes para que conviertan el

nitrógeno libre (N_2) disponible en la atmósfera en su forma biológicamente utilizable, dicho proceso se lo conoce como fijación de nitrógeno (YARA, 2023). Algunas de estas bacterias se encuentran naturalmente en el suelo, agua y en menor cantidad dentro de las plantas. Estos microorganismos fijadores de nitrógeno, son capaces de capturar el nitrógeno disponible en la atmósfera y transformarlo en amoníaco (NH_3), dicho compuesto puede ser aprovechado por las plantas para que estas produzcan moléculas orgánicas. Las moléculas nitrogenadas formadas dentro de las plantas son absorbidas por los animales cuando estos se alimentan de ellas, una vez consumidas estas sustancias pueden ser aprovechadas por el animal en forma de proteína o se pueden degradar y ser desechada (Fowler, S. et al. 2013)

Una vez que las plantas y otros organismos vivos mueren, diferentes grupos de microorganismos se encargan de transformar esta materia, en este proceso se libera nitrógeno a manera de iones de amonio, las bacterias nitrificantes tienen la capacidad de transformar los iones de nitrito o nitrato, por el proceso de nitrificación. Existen bacterias encargadas del proceso opuesto, es decir, transformar los nitratos en el suelo en gas nitrógeno, dicho proceso es conocido como desnitrificación, en este proceso se devuelve el nitrógeno a la atmósfera para que pueda continuar su ciclo (Libretexts, 2022)

2.3 Relación entre el nitrógeno y la producción lechera

La fijación y disponibilidad del nitrógeno garantiza el aumento de proteína dentro del pasto ya que el nitrógeno tiene la capacidad de proporcionar la formación y mantenimiento de los órganos y tejidos celulares, induce la producción de hormonas, enzimas y anticuerpos, a su vez, es un constituyente de las proteínas lo que quiere decir que estas no se pueden formar en ausencia del elemento (Proain, 2020). Dentro de la sintomatología que presentan los pastos cuando existe una ausencia de nitrógeno, se puede destacar el color amarillento en la base de la

hoja, reducción del crecimiento y poca cobertura del pasto en el suelo, estas deficiencias pueden tener un mayor efecto en condiciones de bajo contenido de materia orgánica, sequía, altas precipitaciones, suelos arenosos o poco densos, pH demasiado elevados o bajos, etc. (YARA, 2023).

En un estudio realizado por Gutiérrez, F. et al. (2018) se evaluaron diferentes contenidos de nitrógeno y la relación con la producción de leche, se evidenció que a mayor contenido de nitrógeno mayor era la producción lechera, sin embargo, cuando éste llega a su límite de absorción, provoca excesos de nitratos en el rumen del animal. Por otra parte, un bajo contenido de nitrógeno no es adecuado para la producción lechera, pues una deficiencia de proteína afecta a las reservas proteicas disponibles en la sangre, músculos e hígado lo que disminuye notablemente la capacidad de producir leche y el contenido proteico en ella.

El uso del nitrógeno en el ganado lechero cubre dos necesidades básicas, proporcionar una fuente adecuada de este compuesto y de carbohidratos necesarios para el correcto crecimiento de microorganismos ruminales, así como la producción de proteína cruda microbiana, aparte de ello, el nitrógeno desempeña un papel fundamental en la disponibilidad de los aminoácidos disponibles en el intestino delgado (Chase, L. 2020). Las proteínas son macromoléculas de gran importancia para el sustento animal, estas difieren en su forma, tipo y tamaño, a su vez cumplen diversas funciones biológicas, sin embargo, todas ellas están formadas por un número y combinación diferente de un grupo de 20 aminoácidos, dichos compuestos necesitan de por lo menos un átomo de nitrógeno en su estructura (Elizondo, J. 2006).

Se suele referir a la proteína dentro de una dieta como la proteína cruda, la misma que en el caso de materias primas (como el caso del pasto) y alimentos es igual al contenido de

nitrógeno multiplicado por un factor de conversión el cuál en este caso es 6.25, obteniendo como resultado final los gramos de proteína disponible en 100 gr de muestra (Elizondo, J. 2006).

2.4 Fertilizantes sintéticos

Los fertilizantes químicos son sustancias con macro y micronutrientes que permiten mejorar las características del suelo, estos compuestos son ampliamente utilizados en la agricultura pues permite corregir deficiencias de nutrientes específicos al poder proporcionarle al suelo concentraciones químicas exactas (JACTO. 2023).

Dadas las ventajas del uso de los fertilizantes para el aumento de la producción en los diferentes cultivos, es muy común que los agricultores apliquen más fertilizante que el necesario, lo que afecta directamente a la calidad del suelo, acumulando nitritos, contaminando de aguas subterráneas, e incrementando la salinidad del suelo. (Risco, D. et al. 2016). En un estudio realizado por García. et al. (2020), el exceso de fertilizantes nitrogenados puede contaminar el suelo y cuerpos de agua cuando estos excedentes son lavados ya que contienen amonio (NH_4^+), nitrato (NO_3^-) o úrea ($CO(NH_2)_2$) los cuales son compuestos con la capacidad de movilizarse lo cual afecta al balance de los ecosistemas (Galindo, L. et al. 2020).

2.5 Biofertilizantes

Como una alternativa al uso de fertilizantes y para disminuir el impacto ecológico que estos tienen, se ha considerado el uso de biofertilizantes, los cuales son una opción biotecnológica en la cual se hace uso de microorganismos que favorecen la disponibilidad de nutrientes en el suelo. Estos microorganismos pueden aplicarse a las semillas, superficie de las plantas o directamente al suelo, de esta manera, llegan a colonizar la rizosfera, el interior de la planta y estimulan su crecimiento, pues aumentan la disponibilidad de nutrientes primarios tales como el nitrógeno (Chávez. Et al. 2021). Existen varios grupos de biofertilizantes según el aporte

que estos realizan, por ejemplo tenemos los biofertilizantes fijadores de nitrógeno como *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, también se encuentran los microorganismos solubilizadores de fosfato como *Pseudomonas fluorescens*, *Aspergillus niger*, por otra parte existe otro grupo de biofertilizantes promotores del crecimiento vegetal como *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, así mismo el grupo de movilizadores de fosfato o micorrizas como *Antrophospora*, *Glomus Escutellaspara*, entre otros, y por último tenemos el grupo de movilizadores de zinc y potasio como *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Rhizobium* (Afanador, L. 2017).

Dependiendo de su relación con las plantas, los microorganismos se pueden clasificar en: a) saprofitos, b) simbioses parasíticas c) simbioses benéficas. Estos últimos son de gran ayuda para la estimulación de las semillas y del enraizamiento, incremento en el suministro y disponibilidad de nutrientes, suplir al suelo con agregados estables, actúan como sustancia buffer para las plantas ante sequía o estrés abiótico (Acuña, et al. 2006).

2.5.1 Género Azospirillum

Azospirillum es un género bacteriano perteneciente al grupo de las promotoras del crecimiento vegetal, y se la ha encontrado en varias regiones del globo terrestre. Este grupo de bacterias una vez asociado a las raíces de las plantas, promueven la producción, el crecimiento, la excreción de fitohormonas, y mayor ganancia de materia verde en forrajes, con menor aplicación de fertilizante nitrogenado lo cual permite una producción sostenible de pastos (Domingues, C. et al. 2020).

El género *Azospirillum* fue reportado por primera vez en 1925 por Martinus Beijerinck, pero no fue hasta 1973, donde se impulsaron los estudios científicos sobre esta bacteria. Las especies del género *Azospirillum* son descritas como rizobacterias fijadoras de nitrógeno, con la

capacidad para incrementar el rendimiento de varios cultivos de importancia económica en diversas regiones del mundo (Lifeder, 2021).

Dentro de las principales características de la bacteria se puede mencionar que ésta presenta una forma bacilar o de varilla, es parte del grupo de bacterias gran negativas y presenta un movimiento vibratorio con un patrón flagelar mixto, su tamaño varía de 0.8 a 1 μm de largo y de 2 a 4 μm de ancho. Esta bacteria, se la puede encontrar comúnmente en asociación con las raíces de pastos y cereales distribuidos alrededor del mundo. La morfología de la bacteria varía dependiendo de las condiciones nutricionales que esta tenga, así como de la edad del cultivo a la que ésta esté asociada. Este microorganismo forma parte del grupo de diazótrofos endofíticos facultativos, y es capaz de colonizar el interior de las raíces haciendo que sus células penetren en el interior de las mismas, y también pueden colonizar el mucigel (área alrededor de la raíz) (Licea, J. et al. 2020).

2.7 Ácidos húmicos

Los ácidos húmicos son el resultado de la degradación de la materia orgánica como por ejemplo los residuos vegetales y animales. Los ácidos húmicos se encuentran distribuidos en los suelos, sedimentos y aguas naturales. Este compuesto es capaz de mejorar el crecimiento y nutrición de las plantas, ya que retiene los nutrientes, por un mayor periodo de tiempo en el suelo para que puedan ser aprovechados por las plantas (Lifeder. 2019).

2.8 Método Kjeldahl

El método Kjeldahl es empleado para determinar el contenido de nitrógeno tanto en muestras orgánicas como inorgánicas, este método puede ser empleado en alimentos, cereales, debidas y forrajes para poder obtener el contenido de proteína, este es un método oficial y

acepado por varias normativas como AOAC, ISO, Din, etc. Este método se separa en tres etapas, primeramente tenemos la digestión, donde el nitrógeno orgánico de la muestra evaluada es convertido a NH_4^+ , ya que se rompen los enlaces de nitrógeno unido de manera orgánica y son transformados a iones de amonio, para esto la muestra es mezclada con ácido sulfúrico y se eleva la temperatura a alrededor de $400^\circ C$, para acelerar el proceso se adicionan catalizadores, el tiempo de este proceso depende de la muestra que se esté evaluando y de su estructura química. El siguiente paso es la destilación, donde el objetivo principal es destilar el NH_3 y aislarlo en un recipiente receptor, en este paso la muestra es desnaturalizada por efecto del hidróxido de sodio, durante este proceso, los iones de NH_4^+ son transformados a NH_3 y son arrastrados hasta el vaso receptor gracias a una corriente de vapor de agua, dentro de este vaso receptor se encuentra ácido bórico el cuál actúa como una solución absorbente. El último paso de este proceso es la valoración donde finalmente se determina el porcentaje de nitrógeno disponible mediante una relación ácido-base usando una solución previamente estandarizada de ácido clorhídrico (ITW Reagents. 2020).

III. Objetivos e hipótesis

3.1 Objetivo general:

- Evaluar el crecimiento y contenido de proteína después de la aplicación de fertilizantes orgánicos en pastos.

3.2 Objetivos específicos:

- Caracterizar la bacteria *Azospirillum brasilense*
- Estandarizar un cultivo líquido de fertilizante biológico (*A. brasilense*) para ser inoculado en campo como promotor de la fijación de nitrógeno.

- Aplicar los diferentes tratamientos de *A. brasilense*, fertilizante sintético y ácidos húmicos en una mezcla forrajera compuesta por Reygrass perenne y anual, trébol blanco y kikuyo.
- Evaluar el peso fresco y seco, porcentaje de materia seca, nitrógeno y proteína disponible en el forraje luego de la aplicación de los diferentes tratamientos.

3.3 Hipótesis general:

Los tratamientos aplicados demuestran diferencias en la calidad del forraje.

IV Materiales y métodos

4.1 Material biológico

El material biológico utilizado fue la bacteria *Azospirillum brasilense*, una mezcla forrajera conformada por Reygrass perenne (*Lolium perenne*) y Ryegrass anual (*Lolium perenne*), trébol blanco (*Trifolium rapens*) y kikuyo, y ácidos húmicos.

4.1.1 Azospirillum brasilense

La bacteria se la obtuvo del laboratorio alemán DSMZ Leibniz Institute, la cepa utilizada fue la DSM 1690. Se utilizó una concentración de $1 \times 10^8 \frac{UFC}{ml}$ en el medio nutritivo R2 (Anexo A).

4.1.2 Mezcla forrajera

Se utilizó una mezcla forrajera compuesta por Reygrass perenne y anual, trébol blanco, y kikuyo, ubicado en la hacienda Isabella Del Retiro ubicada en la ciudad de Machachi, cantón Mejía, provincia de Pichincha, con coordenadas 0°31'58.6"S 78°31'48.6"O.

4.1.3 Ácidos húmicos

Se utilizó ácidos húmicos a manera de producto sólido en dosis de 2 kg/ha^{-1} , obteniendo una dosis de 20 gr por cada parcela.

4.2 Fertilizante sintético

En este caso, el fertilizante aplicado tenía una composición de 25% de nitrógeno, 4% de fósforo, 3% de potasio, 3% de calcio, 2% de magnesio, 6% de azufre y 0.02% de zinc. La dosis aplicada fue de 150 kg/ha^{-1} , es decir 1.5kg por cada parcela.

4.3 Manejo del experimento

4.3.1 Caracterización, y estandarización del cultivo para *A. brasilense*

La bacteria fue hidratada según la metodología indicada por el distribuidor DMSZ. Para este proceso se inicia aplicando calor poniendo en contacto directo la parte superior de la ampula con fuego, para acto seguido regar unas gotas de agua sobre el material caliente, lo cual debilitó el vidrio. Con la ampula abierta se retiró el tapón de algodón y extrajo la pastilla que contenía a la bacteria para trasladarla a un vial, acto seguido se lo mezcló con 0.5 ml del medio R2 (medio de cultivo para la bacteria) por 30 minutos, una vez que la bacteria estuvo totalmente hidratada, fue sembrada en un medio de cultivo. (Figura 1)

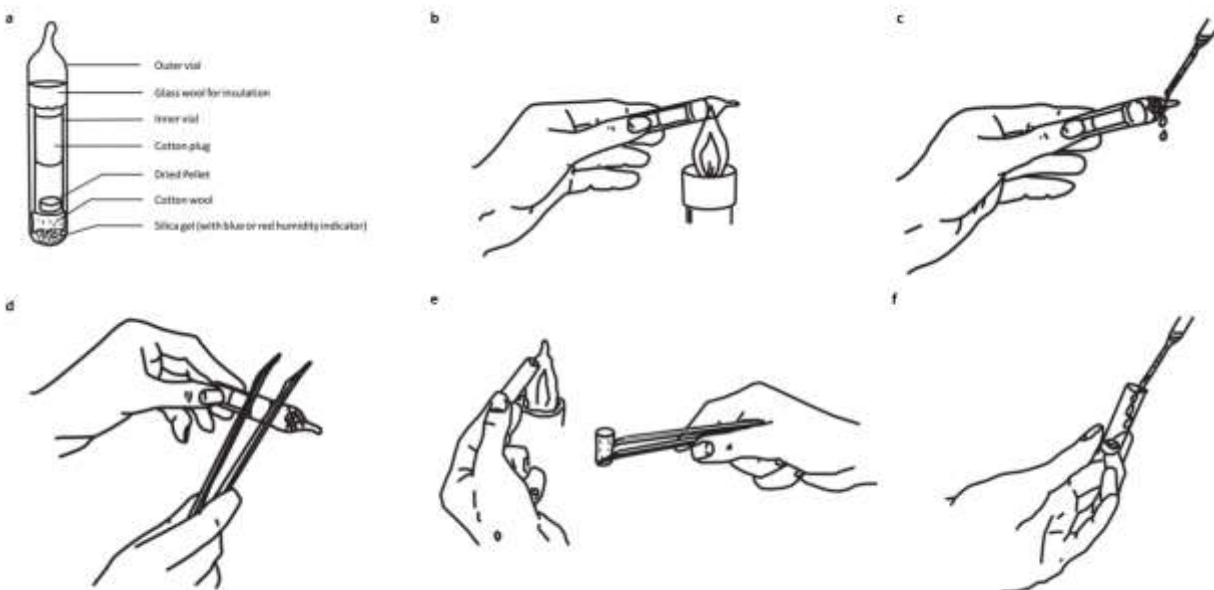


Figura 1: Proceso de rehidratación de la bacteria. a) Bacteria dentro de su ampula de vidrio. b) exposición de la ampula a fuego directo para que esta se caliente. c) aplicación de agua para enfriar y debilitar el vidrio. d) Apertura del ampula mediante ligeros golpes con pinzas. e) extracción del algodón de protección. f) hidratación de la bacteria con 0.5 ml de R2

Para poder realizar las curvas de crecimiento se sembró las bacterias en medios sólidos R2 utilizando el método de estriado, para de esta manera, poder separar las colonias. Al cabo de dos días, ya se evidenció crecimiento de colonias separadas para poder realizar las pruebas de caracterización y de crecimiento. Se observaron colonias con la morfología y características propias de la bacteria, colonias de color blanco y forma circular. (Camacho, R. et al. 2017)

Las pruebas de caracterización de la bacteria se las realizó por medio de pruebas de tinción gran, catalasa y oxidasa. La tinción gram nos permitió identificar la bacteria morfológicamente, por otra parte, la prueba de catalasa se la realizó para comprobar que el organismo contenga la enzima catalasa la cual se puede encontrar en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas, esta prueba se la realiza observando la reacción del organismo con agua oxigenada en una concentración de 30%, de ser positivo la reacción deberá expedir burbujas, de ser negativo no habrá ningún tipo de reacción (Passen, M. 2021). Por otra parte, la

prueba de oxidasa es la forma evidenciar la presencia de la enzima citocromo oxidasa, para ello se ubica la bacteria sobre tabletas con el colorante parafenilendiamina, de ser positivo, esta tableta se tornará de una coloración azul o violeta, las tabletas utilizadas para esta prueba fueron obtenidas de del laboratorio Byoanalyse. (Lifeder, 2023). (Figura 2).



Figura 2. Pruebas de caracterización de *A. brasilense*. a) crecimiento bacterian en placa en medio R2. b) prueba positiva de oxidasa. c) prueba oxidassa positiva. d) tinción gram de *A. brasilense*

Las curvas de crecimiento fueron determinadas bajo densidad óptica, en este caso se inoculó medios de cultivo YEM y R2 (Anexo A). líquidos para incubarlos en un shaker a 37°C y poder medir su crecimiento a las 3, 6, 9, 12, 24 y 30 horas mediante espectrofotometría utilizando el equipo Jenway. Una vez identificado el crecimiento de la bacteria, se llegó a la conclusión que esta tiene un mayor crecimiento en el medio R2. (Figura 3)

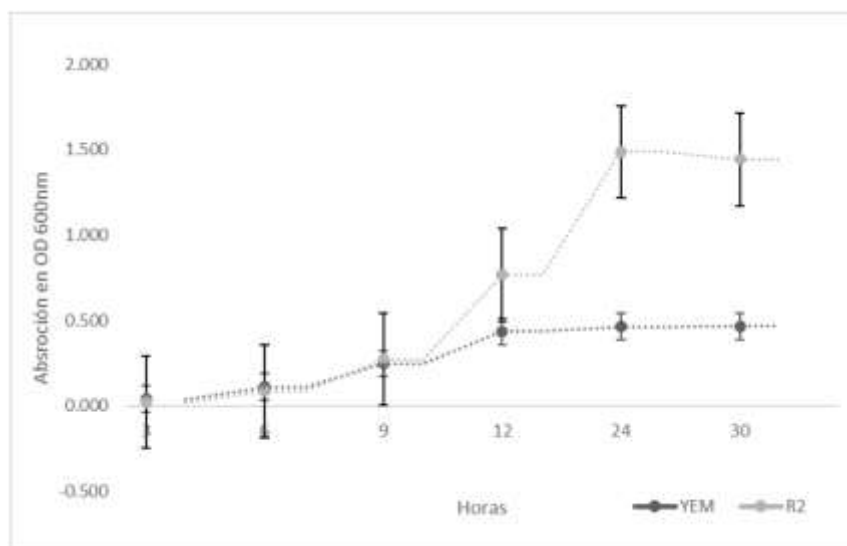


Figura 3: Comparación del crecimiento de *A. brasilense* en medios líquidos R2 y YEM, la línea superior gris representa el medio R2 y la inferior el medio YEM. n:3

Con el medio más apto para su crecimiento se volvió a realizar un ensayo con la finalidad de identificar los picos de crecimiento bacteriano, para ello se inoculó la bacteria únicamente en el medio R2 líquido y sólido, se incubó nuevamente para medir la densidad óptica a las 3, 6, 9, 12, 24, 48, y 72 horas de inoculación mediante densidad óptica. Por otra parte el conteo en placa se realizó mediante siembras de diluciones, se midió las diluciones de 10^{-2} , 10^{-4} , y 10^{-6} , en ambos cas, bacteria llegó a un pico de crecimiento a las 24 horas, a partir de este periodo de tiempo, el crecimiento bacteriano comenzó a decrecer gradualmente. (Figura 4).

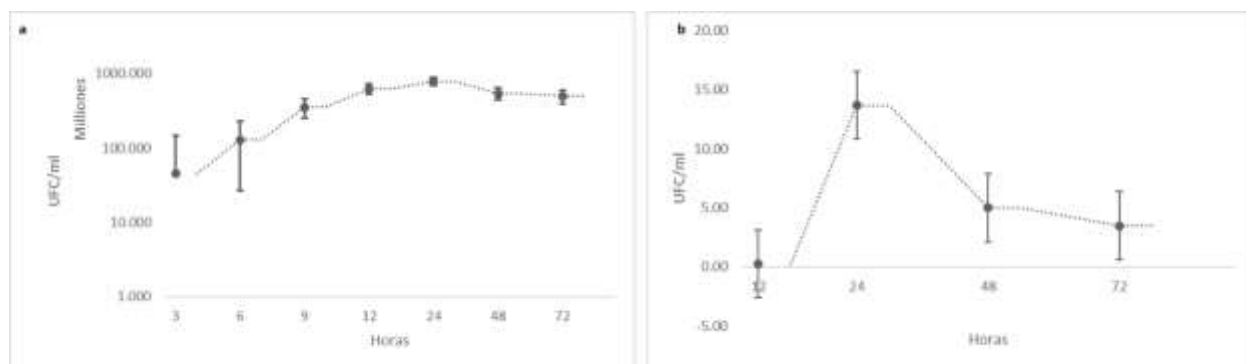


Figura 4: Curvas de crecimiento a) Curva de crecimiento de *A. brasilense* en medio R2 líquido medido por densidad óptica a 600nm en escala logarítmica base 10. b) Crecimiento de *A. brasilense* en placa en medio R2 sólido. Las barras representan el error estándar. n:3

Para poder realizar la aplicación en campo se obtuvo un medio con una concentración de $1 \times 10^8 \frac{UFC}{ml}$, lo cuál es suficiente para que las bacterias puedan inocularse en las plantas (García, J. et al. 2006) .

4.3.2 Aplicación de los tratamientos en campo.

Los tratamientos fueron aplicados en un terreno ubicado en la provincia de Pichincha, cantón Mejía, ciudad de Machachi, a una altura de 3100 msnm, con una temperatura media para los meses de septiembre, octubre y noviembre de 9.2°C y una precipitación promedio de 118 mm. (Climate Data. 2023). El lote se dividió en cuatro bloques, los cuales se dividieron en 4 parcelas, 1 por cada tratamiento y se realizó cuatro repeticiones por tratamiento. Cada una parcela tenía un área de $100 m^2$, obteniendo bloques de $400 m^2$. Se aplicaron cuatro tratamientos, *Azospirillum brasilense*, un fertilizante químico, ácidos húmicos y un control, el cuál fue el medio de cultivo líquido R2 sin inocular. Todos los tratamientos fueron aplicados a manera de fumigación, a excepción del fertilizante el cuál se aplicó de manera edáfica. (Figura 5)

Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4
Control	<i>A. brasilense</i>	A. húmicos	<i>A. brasilense</i>
Fertilizante	A. húmicos	<i>A. brasilense</i>	Fertilizante
A. húmicos	Control	Fertilizante	Control
<i>A. brasilense</i>	Fertilizante	Control	A. húmicos

Figura 5: Mapa de la aplicación de los tratamientos

4.3.4 Evaluación del efecto de los diferentes tratamientos en el peso fresco, seco, porcentaje de nitrógeno y proteína.

Peso fresco y peso seco

Para poder registrar el peso fresco, se utilizó un cuadrado de $1m^2$ de área, se cosechó el pasto dentro de este cuadrado y se extrajeron 6 muestras por parcela, es decir 24 muestras por tratamiento y 96 muestras en total. Se registró el peso fresco en gramos de cada muestra para después introducir las muestras en un horno a $60^{\circ}C$ por dos 48 horas.

Para poder obtener el peso seco se pesaron las muestras dos días después de haber sido introducidas al horno y se las volvieron a pesar al cabo de dos horas, si el peso no tenía variación, se consideró que la muestra llegó a su peso en seco.

Porcentaje de nitrógeno y contenido de proteína

El porcentaje de nitrógeno se lo obtuvo mediante el método Kjeldahl, se realizaron tres muestras por tratamiento. Para esto se pesó 0.5 gr de cada muestra para introducirla en tubos de mineralización, junto con una pastilla catalizadora y una antiespumante, a su vez se colocó 12 ml de ácido sulfúrico puro para introducirlo en la máquina digestora, la cual elevó la temperatura a $420^{\circ}c$ por alrededor de 15 minutos. Acto seguido se colocaron las muestras en la máquina destiladora la cuál estuvo cargada con hidróxido sódico, el destilador arrastró el amoniaco formado previamente en el digestor con el vapor de agua y lo inyecta en un Erlenmeyer el cuál contuvo 25 ml de ácido bórico al 4%. A continuación, se aplicó el colorante Tashiro el cual le da a la mezcla un color esmeralda distintivo. Por último, la titulación se la realizó mediante volumetría usando ácido clorhídrico a 0,1 N. A partir de esta valoración, fue posible calcular el equivalente de nitrógeno recogido empleando la siguiente ecuación:

$$\%n = \frac{Vt \times Ct \times Pe}{Pm} \times 100$$

Dónde %N se refiere al porcentaje de nitrógeno, Vt el volumen del titulante, en este caso el ácido clorhídrico, Ct es la concentración del titulante, en este caso 0.1N, Pe es el peso equivalente del nitrógeno y Pm es peso de la muestra.

Para obtener la proteína se multiplicó el resultado obtenido del nitrógeno por un factor de conversión el cuál en el caso de pastos es 6.5, el resultado se obtuvo en gramos de proteína por cada 100 gramos de muestra.

V. Resultados de las variables

5.1 Diseño experimental y Método estadístico

Para esta experimentación se empleó un diseño de bloques completamente al azar, con 4 tratamientos y cuatro bloques; Las variables a medir fueron peso fresco, peso seco, porcentaje de nitrógeno y cantidad de proteína. Para el análisis de los datos, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para cada variable y la prueba estadística de Tukey, la cual tiene un enfoque bidireccional, es decir, es un análisis de regresión, el cual permite clasificar las variables según su diferencia de respuesta. (Benites, L. 2022). Para el registro de los datos y su procesamiento se utilizó el programa de Office Excel.

5.2 Peso fresco

En la variable peso fresco la bacteria *A. brasilense* presentó una media de 15916.28 kg/ha⁻¹ y demostró ser significativamente superior a los tratamientos control y ácidos húmicos con medias de 4915.06 kg/ha⁻¹ y 7158.41 kg/ha⁻¹, respectivamente; sin embargo, no presentó diferencia estadística significativa con el tratamiento de fertilizante sintético cuya media fue de 10738.74 kg/ha⁻¹. (Figura 6 y 7)

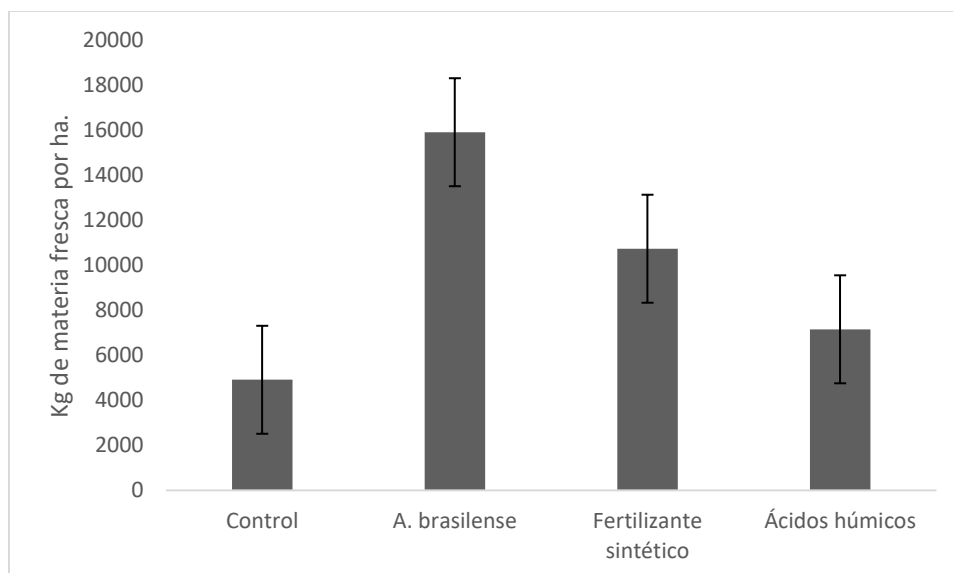


Figura 6: Resultados de peso fresco expresado en kilogramos por hectárea, de cada tratamiento, las barras de error representan la desviación estándar del tratamiento. n: 24



Figura 7: Diferencia óptica del forraje en fresco de los tratamientos, siendo: a) control, b) *A. brasilense*, c) fertilizante sintético y d) ácidos húmicos

5.3 Peso seco y porcentaje de materia seca

El peso de las muestras al igual que en la variable de peso fresco demostró mejores resultados con el tratamiento de *A. brasilense*, con una media de $2272.72 \text{ kg/ha}^{-1}$, seguido por el tratamiento de fertilizante sintético con una media de $1568.22 \text{ kg/ha}^{-1}$, el siguiente tratamiento con la media más alta fue ácidos húmicos con una media de $1154.05 \text{ kg/ha}^{-1}$, por último el tratamiento de control obtuvo una media de $847.24 \text{ kg/ha}^{-1}$. Sin embargo, una vez extraído el porcentaje de materia seca de cada tratamiento los resultados fueron inversamente proporcionales al peso seco, siendo el control el tratamiento con mayor materia seca con media de 17.45%, ácidos húmicos con 16.70%, *A. brasilense* obtuvo una media de 15.05% y por último la media del fertilizante sintético fue de 14.88%, a pesar de la diferencia entre las medias, estas no fueron estadísticamente relevantes. (Figura 8 y 9)

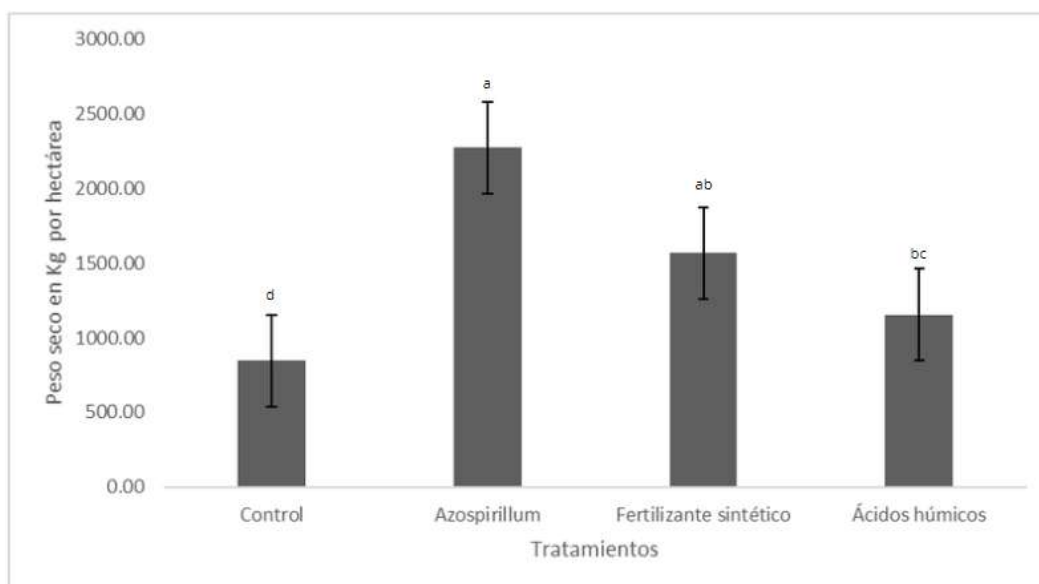


Figura 8: Peso seco en kg por hectárea en cada tratamiento. N=24

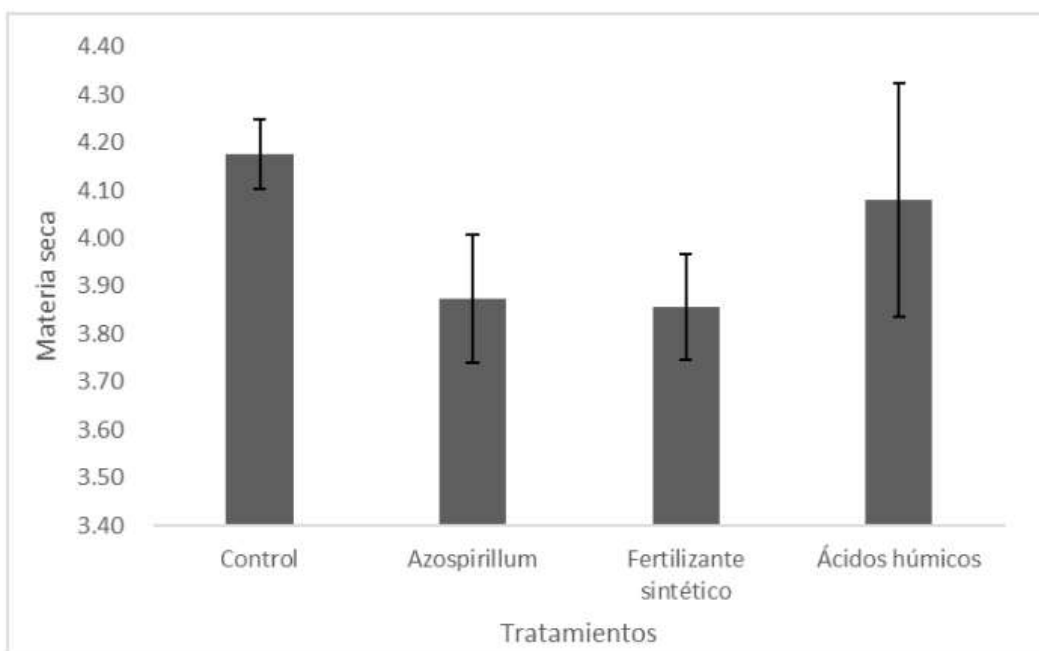


Figura 9: Porcentaje de materia seca, los datos fueron normalizados usando la raíz de los porcentajes de materia seca de cada tratamiento (control: 17.44%, *A. brasilense*: 15.03%, Fertilizante sintético: 14.88 y A. húmicos: 16.7%). En este caso no se evidenciaron diferencias estadísticas. N= 24

5.4 Porcentaje de nitrógeno y proteína

Tanto como para el porcentaje de nitrógeno como para la proteína todos los tratamientos fueron significativamente diferentes. La respuesta al porcentaje de nitrógeno atrapado en la muestra fue mayor en el tratamiento de fertilizante sintético donde la media fue 4.90%, seguido por *A. brasilense* con 4.37%, ácidos húmicos con 3.27% y el control con 2.21%. (Figura 10)

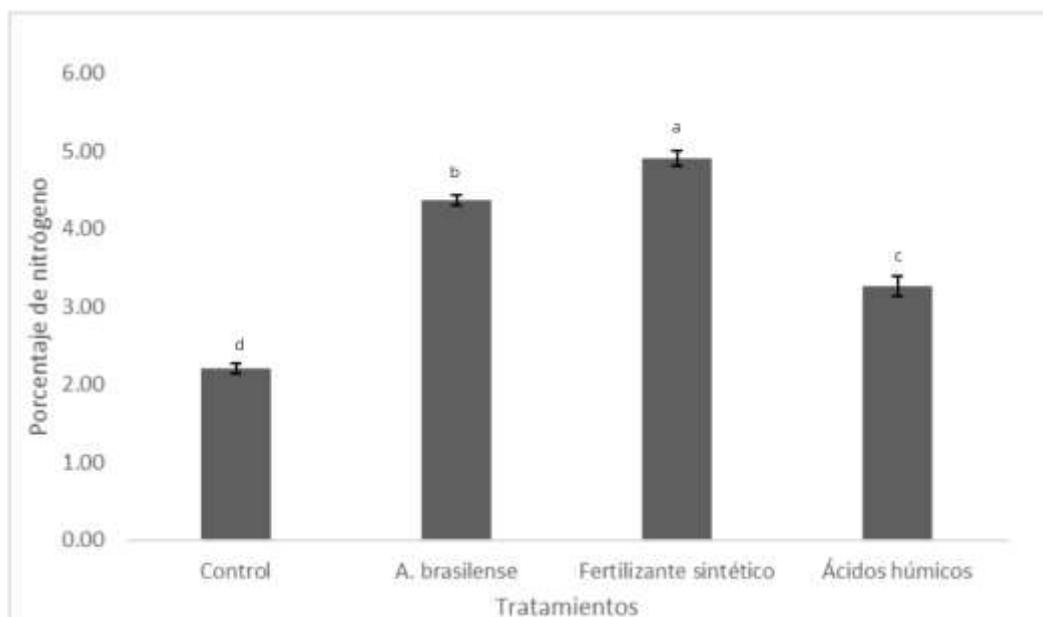


Figura 10: Porcentaje de nitrógeno disponible en cada tratamiento n:3

En cuanto a la cantidad de proteína, al ser una conversión de la cantidad de nitrógeno disponible las agrupaciones fueron iguales, el fertilizante sintético produjo más proteína con una media de 30.63 gr, *A. brasilense* obtuvo 27.29 gr, ácidos húmicos 20.42 gr y el control obtuvo una media de 13.74 gr. (Figura 10)

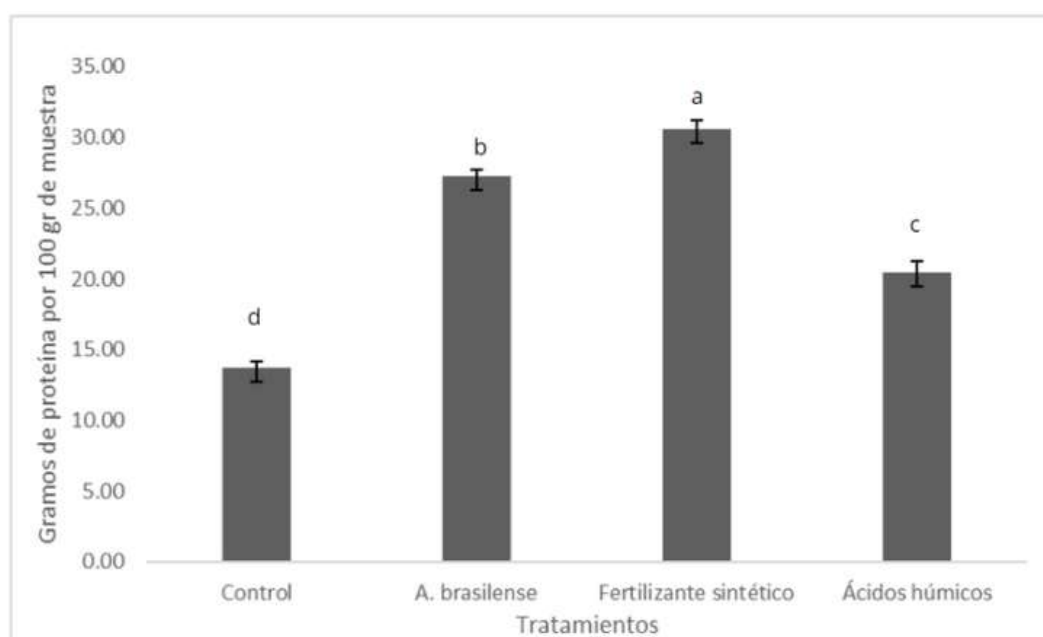


Figura 11: Gramos de proteína disponible en el forraje cada 100 gr de muestra. n:3

VI. Discusión

Al haber obtenido mayor peso fresco en el pasto con el tratamiento de *A. brasilense* ($15916.28 \text{ kg/ha}^{-1}$) se demuestra su efecto como rizobacteria promotora del crecimiento vegetal. A su vez, estudios recientes demuestran que la inoculación de *A. brasilense* en pastos incrementa el número de hojas y macollos en un 9% y 12% respectivamente (Domingues, C. et al. 2020). Siendo esta una de las posibles razones por la cual este tratamiento obtuvo mayor peso en fresco. Los resultados obtenidos en el presente estudio son similares a un estudio realizado por García, J. et al. (2006) donde los resultados demostraron que la inoculación con *A. brasilense*, incrementa la producción de biomasa en un 50% en comparación a los tratamientos no inoculados.

Para la variable peso seco, la bacteria *A. brasilense* obtuvo un rendimiento ($2272.72 \text{ kg/ha}^{-1}$), los resultados difieren a los obtenidos por Reyes, R. et al. (2020) donde a la inoculación con *A. brasilense* y *Rhizoglosum. irregulare*, presentó menor efecto al no usar ninguna dosis de fertilización (3870 kg/ha^{-1}), lo que supera a nuestro tratamiento con *A. brasilense* en $1597.28 \text{ kg/ha}^{-1}$, esta diferencia pudo haber sido provocada por el uso adicional de una bacteria promotora del crecimiento vegetal, como es el caso de *R. irregulare*. ya que esta bacteria tiene la capacidad de incrementar la disponibilidad de fósforo en las plantas, lo que les permite a las plantas un mayor desarrollo de fibra en el pasto. (Villazón, J. et al. 2018). Por otra parte, a pesar de no haber obtenido diferencias estadísticamente significativas en el contenido de materia seca, este fue inversamente proporcional al contenido de nitrógeno, siendo el mejor tratamiento el control (17.45%). Esta relación inversa coincide con el estudio realizado por Reyes, A. et al (2009). Donde se evaluó la materia seca y la concentración protéica en *Brachiaria humidicola*, en dicho estudio, los resultados obtenidos de proteína y materia seca a pesar de no

haber sido significativamente diferentes, se evidencia un mayor porcentaje de materia seca en el tratamiento con menor proteína disponible.

En cuanto al porcentaje de nitrógeno y proteína, la aplicación de fertilizante sintético mostró mejores resultados, lo cual indica que tiene una mayor capacidad de proveer a la planta con nitrógeno, efecto que pudo ser causado por el efecto del fertilizante de inhibidores de nitrificación lo que le permite al forraje mantener una fuente de nitrógeno directa, el cual le permite mantener una fuente directa de nitrógeno por un prolongado periodo de tiempo. (Mula, J. 2012). Los resultados obtenidos para esta variable de contenido de proteína son similares a los obtenidos en un estudio realizado por Villazón, J. et al.(2018) donde se comparó el contenido de proteína utilizando *A. brasilense* en conjunto de *Rhizophagus irregularis*, el estudio demostró un mayor porcentaje de porcentaje de proteína (10.13%) cuando se aplicó fertilizante sintético en conjunto de las bacterias anteriormente mencionadas, sin embargo, no hubo diferencia estadística con tratamiento de únicamente se empleó las bacterias *A. brasilense* y *R. irregularis* sin ninguna dosis de fertilización sintética (9.94%).

VII Conclusiones

- La bacteria *A. brasilense* tiene un mejor desarrollo en el medio nutritivo R2, y esta llega a su pico de producción al haber transcurrido 24 horas desde su inoculación en el medio, la morfología de las colonias formadas por la bacteria fue circular de color blanco.
- Con respecto a la variable peso fresco, el tratamiento con mejor rendimiento fue la aplicación con *A. brasilense*, con una media de $15916.28 \text{ kg/ha}^{-1}$ a comparación del tratamiento de control, el cuál tuvo una media de $4915.06 \text{ kg/ha}^{-1}$, lo que indica que con la finalidad de producir mayor cantidad de materia fresca, *A. brasilense* puede ser aplicada en lugar de los fertilizantes sintéticos.

- No hubo diferencia entre *A. brasilense* y el resto de tratamientos para la variable de peso seco, lo cual es un indicador de que no hubo mayor aporte o efecto por parte de la bacteria.
- El porcentaje de nitrógeno, así como proteína disponible por cada 100 gr de muestra fue significativamente mejor al aplicar el tratamiento de fertilizante sintético (4.90% y 30.63 gr respectivamente) a comparación del tratamiento de control, el cual obtuvo una media de 2.21% de nitrógeno y 13.74 gr de proteína. A pesar de ser estadísticamente diferentes, a los tratamientos de fertilizante sintético y *A. brasilense* no los separa un alto valor, pues la diferencia de la proteína producida entre estos tratamientos es apenas 3,34 gr.

VIII Recomendaciones

- Se recomienda volver a evaluar los tratamientos en un periodo de mayor lluvia, así como en la época seca, para de esta manera determinar si la precipitación tiene algún efecto sobre los tratamientos.
- Se recomienda evaluar el efecto de los trópicos empleados en el presente estudio y de manera adicional un tratamiento con la bacteria *Azotobacter* ya que esta bacteria tiene propiedades fijadoras de nitrógeno similares a *A. brasilense*.
- Se recomienda realizar un análisis económico en base a los resultados obtenidos para determinar la rentabilidad de la aplicación de *A. brasilense* en la mezcla forrajera.

Bibliografía:

Acuña, O. et al. (2006). LA IMPORTANCIA DE LOS MICROORGANISMOS EN LA CALIDAD Y SALUD DE SUELOS IMPORTANCE OF MICROORGANISMS FOR SOILS QUALITY AND HEALTH.

<https://www.uv.mx/personal/tcarmona/files/2010/08/Acu%C3%83%C2%B1a-et-al-2006.pdf>

Afanador, L. (2017). Biofertilizantes: conceptos, beneficios y aplicación en Colombia.

https://www.researchgate.net/publication/331454557_Biofertilizantes_conceptos_benefi

ios_y_aplicacion_en_Colombia

Aguilar, L. (2020). Producción masiva de Azospirillum spp. formulación, control de calidad y su uso en la agricultura: Revisión de Literatura. *Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras*. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/b300293e-14dd4b8d-9a08-60578e467891/content>

Andrade, S. et al. (2015). Amonio-oxidasas bacterianas y arqueales involucradas en el ciclo del nitrógeno. *Terra Latinoam vol.33 no.3*. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S018757792015000300233&script=sci_arttext

Benites, L. (2022). Prueba de Tukey / Procedimiento de Tukey / Diferencia significativa honesta, Statologos. <https://statologos.com/prueba-de-tukey-diferencia-significativa-honesta/>

Burrdman, S. et al. (2000). Surface Characteristics of Azospirillum brasilense in Relation to Cell Aggregation and Attachment to Plant Roots, *Critical Reviews in Microbiology*. <https://doi.org/10.1080/10408410091154200>

Camacho, R.. et al. Biofertilizer formulation from Azotobacter and Azospirillum regional isolates and its effect on sugar cane (*Saccharum officinarum*) in greenhouse. https://www.researchgate.net/publication/319043793_Biofertilizer_formulation_from_Azotobacter_and_Azospirillum_regional_isolates_and_its_effect_on_sugar_cane_Saccharum_officinarum_in_greenhouse

Chase, L. (2020). ENTENDIENDO LA UTILIZACIÓN DEL NITRÓGENO EN VACAS DE LECHE. , Cornell University. <https://ganaderiasos.com/wp-content/uploads/2021/01/ENTENDIENDO-LA-UTILIZACION-DEL-NITROGENO-EN-VACAS-DE-LECHE-.pdf>

Chávez, L. et al. Consideraciones sobre el uso de biofertilizantes como alternativa agro biotecnológica sostenible para la seguridad alimentaria en México.

https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007

09342020000601423

Centro de la Industria Láctea del Ecuador. (2021). El sector lácteo ecuatoriano se reactiva con miras positivas para el 2022. <https://www.cil-ecuador.org/post/el-sector-1%C3%A1lcteo-ecuadoriano-se-reactiva-con-miras-positivas-para-el-2022>

ClimateData. (2023). Clima Machachi (Ecuador). <https://es.climate-data.org/americadel-sur/ecuador/provincia-de-pichincha/machachi-25431/>

Consilla, M. et al. (2023). Aumenta 137% el valor de las importaciones de fertilizantes químicos de América Latina y el Caribe en 2022. Blog del IICA. <https://blog.iica.int/blog/aumenta-137-valor-las-importaciones-fertilizantes-quimicos-america-latina-caribe-en-2022#:~:text=Caribe%20en%202022,Aumenta%20137%25%20el%20valor%20de%20las%20importaciones%20de%20fertilizantes%20qu%C3%ADmicos,y%20el%20Caribe%20en%202022>

Domingues, C. et al. (2020). Azospirillum spp. en gramíneas y forrajeras. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*.

https://www.researchgate.net/publication/339545745_Azospirillum_spp_en_gramineas_forrajeras_Revision

Elizondo, J. (2006). EL NITRÓGENO EN LOS SISTEMAS GANADEROS DE LECHE. *AGRONOMÍA MESOAMERICANA*. Pp 69-77.

<https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso/article/view/5068/4875>

Espinoza, F. (2020). Estrategias de fertilización en pasturas tropicales.

[https://www.researchgate.net/publication/365869058_Estrategias_de_fertilizacion_en_p
sturas_tropicales](https://www.researchgate.net/publication/365869058_Estrategias_de_fertilizacion_en_pasturas_tropicales)

FAO. (1992). Los Fertilizantes y su uso. IFA, Asociación Internacional de la Industria de los Fertilizantes.

FAO. (2023). Producción Animal. <https://www.fao.org/animal-production/es/>

FAO. (2023). Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe.

<https://www.fao.org/americas/prioridades/produccion-pecuaria/es/>

Fawler, S. et al. (2013). Concepts of Biology. [https://openstax.org/books/concepts
biology/pages/20-2-biogeochemical-cycles](https://openstax.org/books/concepts-biology/pages/20-2-biogeochemical-cycles)

García, J. et al. (2006). Biofertilización con *Azospirillum brasilense* en sorgo, en el norte de México. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0568
25172006000200001](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S056825172006000200001)

García, L. et al. (2020). Dialnet. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7368100>

García, S. C. (2011). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. Cuadernos del Tomás, (3), 173-186.

Garzón, Y y Rico, A. (2022). Importancia del correcto manejo y establecimiento de praderas destinadas a ganadería de leche en clima frío.

<https://repositorio.ucundinamarca.edu.co/handle/20.500.12558/4308>

González, P. (2019). Consecuencias ambientales de la aplicación de fertilizantes. Biblioteca del Congreso Nacional de Chile/BCN.

https://obtienearchivo.bcn.cl/obtienearchivo?id=repositorio/10221/27059/1/Consecuencias_ambientales_de_la_aplicacion_de_fertilizantes.pdf#:~:text=Los%20principales%20impactos%20negativos%20de%20los%20fertilizantes%20sobre,de%20la%20estructura%20el%20suelo%20y%20deterioro%20microfauna.

Gutiérrez, F. et al. (2018). Mejoramiento De La Eficiencia de la Proteína de los Pastos en Bovinos de Leche Utilizando Cuatro Formulaciones de Balanceados. Universidad Politécnica Salesiana. La granja, Revista de ciencias de la vida, vol 2 no 28 pp 115-122.
<https://www.redalyc.org/journal/4760/476056688010/html/#gf3>

IICA. (2023). Aumenta 137% el valor de las importaciones de fertilizantes químicos de América Latina y el Caribe en 2022. <https://blog.iica.int/blog/aumenta-137-valor-las-importaciones-fertilizantes-quimicos-america-latina-caribe-en-2022>

ITW Reagents. (2020). Determinación de Nitrógeno por el método Kjeldahl.
https://www.itwreagents.com/download_file/brochures/A173/es/A173_es.pdf

Lee, J. et al. (2012). Perennial ryegrass breeding in New Zealand: a dairy industry perspective.
<https://www.publish.csiro.au/CP/CP11282>

LibreTexts. (2022). Ciclo de Nitrógeno
https://espanol.libretexts.org/Educacion_Basica/Biologia/06%3A_Ecolog%C3%ADa/6.8%3A_Ciclo_de_Nitr%C3%B3geno

Lifeder. (2021). Azospirillum. <https://www.lifeder.com/azospirillum/>

Lifeder. (2019). Ácido húmico: estructura, propiedades, obtención, usos.
<https://www.lifeder.com/acido-humico-estructura-propiedades-obtencion-usos/>

Lifeder. (2023). Prueba de oxidasa. <https://www.lifeder.com/prueba-de-oxidasa/>

Licea, J. et al. (2020). IMPACT OF AZOSPIRILLUM BRASILENSE, A RHIZOBACTERIUM STIMULATING THE PRODUCTION OF INDOLE-3-ACETIC ACID AS THE MECHANISM OF IMPROVING PLANTS' GROW IN AGRICULTURAL CROPS. <https://www.redalyc.org/journal/4263/426363282005/html/>

JACTO. (2023). Fertilizantes químicos: ventajas y desventajas. <https://bloglatam.jacto.com/fertilizantes-quimicos/>

Martinez, F. (2020). Ficha Técnica del Pasto Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*). <https://infopastosyforrajes.com/pasto-de-pastoreo-de-clima-frio/pasto-kikuyo-pennisetum-clandestinum/>

Mula, J. (2012). La importancia de los inhibidores de la nitrificación. <https://www.agromatica.es/inhibidores-de-la-nitrificacion/>

Passen, M. (2021). Prueba de catalasa: principio, procedimiento, tipos, resultados, usos. <https://microbiio.info/prueba-de-catalasa/>

Proain Tecnología Agrícola. (2020). DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL/ PROTEÍNAS MEDIANTE EL MÉTODO KJELDAHL. <https://proain.com/blogs/notas-tecnicas/determinacion-de-nitrogeno-total-proteinas-mediante-el-metodo-kjeldahl>

Reyes, A. et al. (2009). PRODUCCIÓN DE MATERIA SECA Y CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN 21 GENOTIPOS DEL PASTO HUMIDÍCOLA *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick Universidad y Ciencia, vol. 25, núm. 3, diciembre, 2009, pp. 213-224. <https://www.redalyc.org/pdf/154/15416281003.pdf#:~:text=Por%20otra%20parte%2C%>

0la%20concentraci%C3%B3n%20de%20prote%C3%ADna%20mostr%C3%B3,en%20
%20biomasa%20a%C3%A9rea%20total%20de%20la%20planta

Reyes, R. et al. (2020). Biofertilization with *Azospirillum brasilense* and *Rhizoglyphus irregularis* and reduction of nitrogen fertilization in *Urochloa hybrid* cv. Mulatto II.

http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S2079-34802020000400611&script=sci_arttext

Risco, D. et al. (2016). Crecimiento, producción y calidad en brócoli cultivado bajo diferentes dosis de abono nitrogenado. <http://scielo.iics.una.py/scielo.php?pid=S2305>

06832016000100007&script=sci_arttext

Rodríguez, J. et al. (2020). Microorganismos benéficos en la agricultura. CEICKOR.

<https://www.centrouniversitarioceickor.edu.mx/home/2020/01/10/microorganismos>

[beneficos en-la](#)

[agricultura/#:~:text=Entre%20los%20organismos%20ben%C3%A9ficos%20utilizados,](#)

[2C%20especies%20de%20Streptomyces%2C%20micorrizas](#)

Rodríguez, N. et al. (2007). ESTANDARIZACIÓN DE CONDICIONES PARA LA PRUEBA CUANTITATIVA DEL NMP CON BACTERIAS NITRIFICANTES Y

DENITRIFICANTES USANDO COMO MATRIZ COMPOST. *UNIVERSITAS*

SCIENTIARUM. Revista de la Facultad de Ciencias Vol. 12 N° 2, 69-81.

<file:///C:/Users/aylin/Downloads/adminpujojs,+4867-17783-1-CE.pdf>

Saldanha, S. (2011). Mezclas Forrajeras. Dpto. PAYP- Pasturas- EEFAS.

<http://prodanimal.fagro.edu.uy/cursos/PASTURAS%20CRS/11%20>

[%20Mezclas%20forrajeras.pdf#:~:text=MEZCLA%20FORRAJERA%3A%20Poblaci](#)

C3%B3n%20artificial%20formada%20por%20varias%20especies,menos%20una%20e%20de%20h%C3%A1bito%20de%20vida%20perenne.

Sembralia. (2020). Cuáles son los Efectos de los Ácidos Húmicos en suelo y plantas.

<https://sembralia.com/blogs/blog/acidos-humicos>

Sharma, S. et al. The interaction between Rhizoglosum irregulare and hyphae attached phosphate solubilizing bacteria increases plant biomass of Solanum lycopersicum.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501320304249>

Ube, J. (2021). Importancia del nitrógeno para el crecimiento, desarrollo y rendimiento del cultivo de café (Coffea spp.) en Ecuador. Universidad Técnica de Babahoyo.

<http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/9351>

Vibrans, H. (2009). Fabaceae = Leguminosae en parte Trifolium repens L. Trébol blanco.

<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/fabaceae/trifolium-repens/fichas/ficha.htm>

Villalobos, L. y Sánchez, J. (2019). Evaluación agronómica y nutricional del pasto ryegrass perenne tetraploide (Lolium perenne) producido en lecherías de las zonas altas de Costa Rica. II. Valor nutricional. https://www.mag.go.cr/rev_agr/v34n01_043.pdf

Villazón, J. et al. (2018). INFLUENCIA DEL FÓSFORO EN EL CONTENIDO DE MATERIA SECA DE LA BIOMASA AÉREA APORTADA AL SUELO POR LA CAÑA DE AZÚCAR.

https://www.researchgate.net/publication/328964783_INFLUENCIA_DEL_FOSFORO_EN_EL_CONTENIDO_DE_MATERIA_SECA_DE_LA_BIOMASA_AEREA_APORTADA_AL_SUELO_POR_LA_CANA_DE_AZUCAR

Vivanco, O. et al. (2021). Efecto de la aplicación de Azospirillum sp. y Azotobacter sp. sobre el crecimiento y productividad de kikuyo (*Pennisetum clandestinum*).

<https://revistabionatura.com/files/2021.06.04.4.pdf#:~:text=La%20aplicaci%C3%B3n%20de%20Azospirillum%20sp.%20mostr%C3%B3%20un%20incremento,de%20cultivo%20y%20al%20cuidado%20del%20medio%20ambiente>

Yara. (2023). Nitrógeno y calidad de pasto. <https://www.yara.com.mx/nutricion-vegetal/praderas/nitrogeno-y-calidad-de-pasto/>

Yara. (2023). Deficiencia de nitrógeno.-Pastos. <https://www.yara.es/nutricion-vegetal/praderas/deficiencias-pastos/deficiencia-de-nitrogeno-vs-el-optimo-pastos/>

Zambrano, D. et al. (2017). La producción de leche en Ecuador y Chimborazo: nuevas oportunidades e implicaciones ambientales.

https://www.researchgate.net/publication/322756060_La_produccion_de_leche_en_Ecuador_y_Chimborazo_nuevas_oportunidades_e_implicaciones_ambientales

Anexos:

Anexo A: Composición del medio R2

Yeast extract	0.50	g
Proteose peptone (Difco no. 3)	0.50	g
Casamino acids	0.50	g
Glucose	0.50	g
Starch (soluble)	0.50	g
Na-pyruvate	0.30	g
K ₂ HPO ₄	0.30	g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0.05	g
Agar	15.00	g
Distilled water	1000.00	ml

Fuente: DMSZ. (2023)

Anexo B: Composición del medio YEM

Composition**

Ingredients	Gms / Litre
Yeast extract	1.000
Mannitol	10.000
Dipotassium hydrogen phosphate	0.500
Magnesium sulphate	0.200
Sodium chloride	0.100
Agar	15.000
Final pH (at 25°C)	7.0±0.2

**Formula adjusted, standardized to suit performance parameters

Anexo C : crecimiento de *A. brasilense* en placa



Anexo D: *A. brasilense* bajo microscopio



Anexo E: tratamiento de control (izquierda) y *A. brasilense* (derecha) listos para la aplicación



Anexo F: mochila de fumigar utilizada para la inoculación



Anexo G: inoculación de *A. brasilense* en la mezcla forrajera



Anexo H: Cuadrado de 1 m² usado para la cosecha del forraje



Anexo I: Cosecha del forraje**Anexo J: Secado de muestras****Anexo K: Peso en seco**



Anexo L: peso de muestras para la determinación del porcentaje de nitrógeno bajo el método Khejdal



Anexo M: Muestras en tubos de mineralización con tabletas antiespumante y catalizadora.



Anexo N: Máquina digestora para la determinación del porcentaje de nitrógeno bajo el método Khejdal



Anexo O: máquina destiladora**Anexo P: Muestra previa destilada previa a volurimetría**

Anexo Q: Reacción del nitrógeno con HCl para determinar su porcentaje por medio de volumetría



Anexos R: pruebas estadísticas para el peso fresco

Anexo R. 1: Peso fresco por tratamiento por tratamientos

	kg/ha	Promedio		kg/ha	Promedio		kg/ha	Promedio		kg/ha	Promedio
Bloque 1 (control)	4,135.30	8,975.95	Bloque 1 (Azospirillum)	10,296.44	17,614.41	Bloque 1 (AH)	8,422.82	8,620.64	Bloque 1 (azospirillum)	12,428.27	18,884.46
	10,295.34			7,484.24			7,027.82			23,827.85	
	5,828.43			23,887.73			10,750.44			17,584.94	
	7,144.04			19,844.58			6,078.11			18,393.07	
	6,645.09			18,143.60			11,793.38			18,030.20	
6,690.43	20,829.83	14,696.32	20,842.46								
26,217.30	8,845.01	21,091.94	6,939.93								
17,989.48	8,789.27	5,942.03	7,847.11								
7,144.04	4,820.73	3,359.43	11,290.18								
16,646.75	4,288.43	4,351.78	8,711.61								
11,747.98	5,579.56	12,791.24	11,428.57								
6,690.43	8,640.99	5,967.39	11,090.38								
6,596.72	4,201.78	3,482.13	4,139.71								
5,379.23	4,445.58	5,533.80	2,245.27								
7,519.59	3,822.84	6,690.45	2,041.16								
7,484.24	2,698.86	4,309.82	4,836.72								
11,430.47	4,038.95	9,480.03	4,082.31								
6,032.75	3,125.77	8,965.26	3,884.15								
20,547.63	16,892.02	2,449.39	5,297.72								
16,086.24	8,416.77	5,647.20	8,191.50								
19,340.61	9,797.54	3,039.09	2,494.75								
31,206.99	12,042.81	3,702.10	5,828.63								
9,230.58	10,477.83	9,230.58	2,449.59								
4,820.73	8,787.54	2,494.75	11,294.39								

Anexo R. 2: Promedio del peso fresco por tratamiento

Tratamiento	Promedio por parcela	Promedio de tratamiento	sd
Control	6,973.95	4,915.06	1225.302286
	3,745.90		
	4,427.17		
	4,513.22		
Azospirillum	17,209.96	15,916.28	3496.023832
	17,614.41		
	9,956.30		
	18,884.46		
Fertilizante	14,397.70	10,738.74	2695.884955
	11,574.10		
	6,928.59		
	10,054.58		
Ácidos Húmicos	7,076.00	7,158.41	1513.200873
	6,327.58		
	9,620.64		
	5,609.40		

Anexo R. 3: análisis estadísticos

Tratamientos	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Suma de tratamientos
Control	6,973.95	3,745.90	4,427.17	4,513.22	19,660.24
Azospirillum	17,209.96	17,614.41	9,956.30	18,884.46	63,665.14
Fertilizante	14,397.70	11,574.10	6,928.59	10,054.58	42,954.97
A. húmicos	7,076.00	6,327.58	9,620.64	5,609.40	28,633.62
Suma de bloques	45,657.61	39,261.99	30,932.70	39,061.66	154,913.97

gran total	154,913.97
Factor de corrección	1,499,896,150.36
Suma de cuadrados total	1,869,321,653.10
Suma de cuadrados corregida	369,425,502.74
suma de cuadrados de bloque	6,108,767,255.63
Dividido por el n. de tratamier	1,527,191,813.91
S. de cuadrados de bloques c.	27,295,663.54
Suma de cuadrados de tr.	7,104,788,678.10
Dividido por el n. de bloques	1,776,197,169.52
suma de cuadrados de tr c	276,301,019.16
Suma de cuadrados del error e	65,828,820.03
Suma de cuadrados total	369,425,502.74

ANOVA					
Fuente de variacion	grados de libertad	Suma de cuadrados	cuadrados medios	f calculada	f tabular
Total	15	369,425,502.74			
Bloques	3	27,295,663.54	9,098,554.51	1.243938302	3.86
Tratamientos	3	276,301,019.16	92,100,339.72	12.59179577	
Error experimental	9	65,828,820.03	7,314,313.34		

Anexo R. 4: Agrupaciones

Agrupaciones		
Tratamientos	Media	Grupo
Azopsirillum	15,916.28	a
Fertilizante	10,738.74	ab
A. Húmicos	7,158.41	bc
Control	4,915.06	c

Anexo S: Pruebas estadísticas para peso seco

Anexo S. 1: Peso seco registrado

	Peso seco		P. seco		P. Seco		P.seco
Bloque 1 (control)	952.8	Bloque 1 (Azospirillum)	1125	Bloque 1 (AH)	1890.8	Bloque 1 (azospirillum)	1789
	1707		1368		1409.4		3722
	1088.8		3329		1423		2450
	1210.2		2954.3		925.8		3077
	1152.3		2200.5		1406.6		2517
	1192.21		3590		2204.6		2888
Bloque 2 (fertilizante)	3250	Bloque 2 (a.h)	1004	Bloque 2 (Azospirillum)	2518.3	Bloque 2 (fertilizante)	972.8
	2479.8		782		1853		1362
	998.1		657		1089		1822
	2256.1		694		652		1449
	1656.1		757		2114.4		2004
	956.1		1226.8		919.7		1522
Bloque 3 (a. H.)	871	Bloque 3 (Control)	836	Bloque 3 (Fertilizante)	1138	Bloque 3(control)	803
	705.8		815		812		422
	966.4		651.9		1015		399
	2475.3		512		713		843
	1720		578		1277.2		696
	1242.3		486		1052		1545
Bloque 4 (Azospirillum)	1019	Bloque 4 (Fertilizante)	2726	Bloque 4 (Control)	396.5	Bloque 4 (a.h)	935.3
	3250		1150		996.7		1067
	3788.7		2357		530.3		416.9
	4195		1640		666		853.5
	1220.3		1688		1605.1		503.7
	956		1361		449		1579

Anexo S. 2: Porcentaje de materia seca por tratamiento

	Tratamientos				Promedio ms
Control	17.88	16.47	17.44	17.99	17.45
Azospirillum	14.83	14.00	16.77	14.51	15.03
Fertilizante	13.64	15.96	14.67	15.25	14.88
Acidos humicos	19.27	13.74	17.09	16.69	16.70

Anexo S. 3: análisis estadístico

Factor de corrección	4102.57
Suma de cuadrados total	20,577.59
Suma de cuadrados corregida	16,475.02
suma de cuadrados de bloque	16,431.65
Dividido por el n. de tratamientos	4,107.91
S. de cuadrados de bloques c.	5.34
Suma de cuadrados de tr.	16,486.80
Dividido por el n. de bloques	4,121.70
suma de cuadrados de tr c	19.13
Suma de cuadrados del error experimental	16,450.55
Suma de cuadrados total	16,475.02

ANOVA					
Fuente de variación	grados de libertad	Suma de cuadrados	cuadrados medio	f calculada	f tabular
Total	15	16,475.02			
Bloques	3	5.34	1.78	0.000973	3.86
Tratamientos	3	19.13	6.38	0.003488	
Error experimental	9	16,450.55	1,827.84		

Anexo T: porcentaje de nitrógeno y proteína

Muestra	lt de Hcl	% nitrógeno	Promedio	Proteína g/100 g	Promedio
Control 1	0.007	2.12	2.209	13.24	13.74
Control 2	0.0075	2.27		14.18	
Control 3	0.0073	2.21		13.80	
A. húmicos 1	0.0106	3.21	3.267	20.04	20.42
A. húmicos 2	0.0104	3.15		19.67	
A. húmicos 3	0.0114	3.45		21.56	
Azospirillum 1	0.0148	4.48	4.367	27.99	27.29
Azospirillum 2	0.014	4.24		26.47	
Azospirillum 3	0.0145	4.39		27.42	
Fertilizante 1	0.016	4.84	4.901	30.25	30.63
Fertilizante 2	0.0161	4.87		30.44	
Fertilizante 3	0.0165	4.99		31.20	

Anexo T. 1: ANOVA del porcentaje de nitrógeno

Tratamientos	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Suma de tratamientos
Control	2.12	2.27	2.21	6.60
Azospirillum brasilense	4.48	4.24	4.39	13.10
Fertilizante químico	4.84	4.87	4.99	14.70
Ácidos húmicos	3.21	3.15	3.45	9.80
Suma de bloques	14.64	14.52	15.04	44.20
Suma de bloques al cuadrado				1953.80

ANOVA	
Suma de cuadrados total	175.91
Suma de cuadrados corregida	13.09
suma de cuadrados de bloque	651.41
Dividido por el número de tratamientos	162.85
Suma de cuadrados de bloques corregida	0.04
Suma de cuadrados de tratamiento	527.40
Dividido para el numero de bloques	175.80
Suma de cuadrados tratamiento corregid	12.98
Suma de cuadrados del error experimental	0.07
Suma de cuadrados total corregida	13.09

ANOVA				
Fuente de varia	grados de libertad	Suma de cuadra	cuadrados m	f calculada
Total	11	13.09	no hay	
Bloques	2	0.04	0.0180778	1.56
Tratamientos	3	12.98	4.33	374.11
Error experimen	6	0.07	0.012	

Anexo T. 2: Agrupaciones de tratamientos

Agrupaciones		
Tratamientos	Media	Grupo
Fertilizante químico	4.90	a
Azospirillum	4.37	b
Ácidos húmicos	3.27	c
Control	2.21	d

Anexo T. 3: análisis de los datos obtenidos para proteína

Tratamientos	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Suma de tratamientos
Control	13.24	14.18	13.80	41.22
Azospirillum brasilense	27.99	26.47	27.42	81.88
Fertilizante quimico	30.25	30.44	31.20	91.90
Ácidos húmicos	20.04	19.67	21.56	61.27
Suma de bloques	91.52	90.76	93.98	276.26
Suma de bloques al cuadrado				76320.22
Gran total	276.26			
Factor de correccion	6360.02			

Suma de cuadrados total	6871.33
Suma de cuadrados corregida	511.31
suma de cuadrados de bloque	25445.72
Dividido por el número de tratamientos	6361.43
Suma de cuadrados de bloques corregida	1.41
Suma de cuadrados de tratamiento	20601.61
Dividido para el numero de bloques	6867.20
Suma de cuadrados tratamiento corregid	507.18
Suma de cuadrados del error experimental	2.71
Suma de cuadrados total corregida	511.31

ANOVA				
Fuente de variación	grados de libertad	Suma de cuadrados	cuadrados medios	f calculada
Total	11	511.31	no hay	
Bloques	2	1.41	0.7061652	1.5626374
Tratamientos	3	507.18	169.0615	374.10769
Error experimental	6	2.71	0.451906	

Anexo T. 4: Agrupaciones:

Agrupaciones		
Tratamientos	Medias	Grupo
Fertilizante	30.63	a
Azospirillum	27.29	b
Ácidos húmicos	20.42	c
Control	13.74	d