



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR  
ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES**

**TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR PREVIO A LA OBTENCIÓN  
DEL TÍTULO DE INGENIERA AGROPECUARIA**

**“EFECTO DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO DE TRES DOSIS  
DE *Rhizobium* spp. EN FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) EN LOS 60 DÍAS DE  
DESARROLLO DEL CULTIVO EN LA CIUDAD DE IBARRA PROVINCIA DE  
IMBABURA”**

**ERIKA CRISTINA PUERRES CAICEDO**

**TUTOR: JOSÉ VALDEMAR ANDRADE CADENA**

**IBARRA – ECUADOR**

**FEBRERO, 2025**

Ibarra, 19 de febrero de 2025

Magister  
Moraima Mera Aguas  
**DIRECTORA DE LA ESCUELA ECAA**

De mi consideración:

Mediante el presente, tengo a bien certificar que el **trabajo de titulación / (integración curricular)** del/la estudiante/s: **ERIKA CRISTINA PUERRES CAICEDO** con el tema: **"EFECTO DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO DE TRES DOSIS DE *Rhizobium spp.* EN FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*) EN LOS 60 DÍAS DE DESARROLLO DEL CULTIVO EN LA CIUDAD DE IBARRA PROVINCIA DE IMBABURA"**

Una vez analizado por la herramienta de detección de coincidencias y prevención del plagio académico utilizada por la institución, **TURNITIN**, obtiene el **6 %** de coincidencia.

Por lo que se encuentra en el rango establecido de acuerdo a los criterios de valoración del porcentaje de similitud establecidos por la PUCE.

Captura:



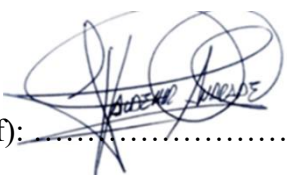
FIRMA  
José Valdemar Andrade Cadena  
C.I. 1001927167  
FECHA: 19 de febrero de 2025

**JOSE  
VALDEMAR  
ANDRADE  
CADENA**

Firmado  
digitalmente por  
JOSE VALDEMAR  
ANDRADE CADENA  
Fecha: 2025.02.19  
08:52:38 -05'00'

## PÁGINA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

El tribunal examinador, aprueba el presente trabajo en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Ibarra:

(f): .....

JOSÉ VALDEMAR ANDRADE CADENA, PhD.

C.C.: 1001927167

(f): .....

SANTIAGO XAVIER MAFLA ANDRADE, Mgtr.

C.C.: 1002658399

(f): .....

EDMUNDO RENÉ RECALDE POSSO, PhD.

C.C.: 1001774494

## ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo, *ERIKA CRISTINA PUERRES CAICEDO*, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 165 del Código Orgánico de Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, que manifiesta textualmente: “Se reconoce facultad de los autores y demás titulares de derechos de disponer de sus derechos o autorizar las utilidades de sus obras o prestaciones a título gratuito y oneroso, según las condiciones que determinen. Esta facultad podrá ejercerse mediante licencias libres, abiertas y otros modelos alternativos de licenciamiento o la renuncia”.

Ibarra, 01 de febrero del 2025



(f): \_\_\_\_\_

*ERIKA CRISTINA PUERRES CAICEDO*

C.C.: 0401576970

## AUTORIA

Yo, *ERIKA CRISTINA PUERRES CAICEDO*, portadora de la cedula de ciudadanía N° 0401576970, declaro que la presente, trabajo de investigación es de total responsabilidad de la autora, y eximo expresamente a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Ibarra de posibles reclamos o acciones legales.



(f):.....

*ERIKA CRISTINA PUERRES CAICEDO*

C.C.: 0401576970

## DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Con profundo respeto y gratitud, quiero dedicar y expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que hicieron posible la realización de esta investigación.

A Dios, por ser mi guía y fortaleza en cada paso de este camino, por darme la sabiduría y la perseverancia necesarias para alcanzar esta meta.

A mi asesor de proyecto, Doctor Valdemar Andrade, por su invaluable apoyo, paciencia y orientación a lo largo de este proceso. Su dedicación ha sido fundamental en la culminación de este trabajo.

A Magíster Lennys Berutti, por ser un pilar de apoyo y una fuente constante de luz y guía a lo largo de mi investigación. Su orientación ha sido esencial en cada paso de este proceso.

A mi pareja, Ingeniero Esteban Cabrera, por ser mi compañero incondicional, por su amor, comprensión y aliento en los momentos difíciles. Gracias por estar siempre a mi lado.

A mi hijo, Ayrton, mi mayor inspiración y motor de vida. Este logro es también para ti, con la esperanza de que algún día encuentres en él un motivo para luchar por tus propios sueños.

A mi madre, Mercedes, por su amor incondicional, sacrificio y apoyo inquebrantable. Sin su ejemplo y fortaleza, este logro no habría sido posible.

A mis hermanos, David y Andrés, por ser mi apoyo constante, y por ser parte esencial en esta etapa.

A mis familiares José, Moncerrate, Pamela, Cecilia, Enrique, Narcisa y Andrea, cuyo acompañamiento y palabras de aliento han dejado una huella profunda en este camino. Siempre estaré agradecida.

A los familiares de mi pareja, Abogada Nadia Monge, Jorge y Josefa, por su generosidad, consejos y el cariño brindado a lo largo de esta etapa. Su respaldo ha sido fundamental en este recorrido.

Erika Puerres

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	vii
ÍNDICE DE TABLAS .....	x
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xi
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
CAPÍTULO I .....	14
INTRODUCCIÓN .....	14
CAPÍTULO II .....	15
OBJETIVOS .....	15
2.1. Objetivo general .....	15
2.2. Objetivos específicos .....	15
2.3. Hipótesis .....	15
CAPÍTULO III .....	16
ESTADO DEL ARTE .....	16
3.1. Frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) .....	16
3.2. Producción del Frijol en Ecuador .....	16
3.3. Fijación de Nitrógeno del Frijol .....	17
3.4. Nitrógeno .....	18
3.5. El nitrógeno y las plantas .....	18
3.6. El ciclo del nitrógeno .....	19
3.6.1. Fijación .....	19
3.6.2. Nitrificación .....	19
3.6.3. Asimilación .....	20
3.6.4. Amonificación .....	20
3.6.5. Desnitrificación .....	20
3.7. Rizobios .....	21
3.7.1. Géneros de rizobios .....	22
3.8. Inoculación de rizobios en leguminosas .....	24
3.8.1. Efectos de la inoculación con aislamientos de rizobios .....	25
3.8.2. Bacterias promotoras de crecimiento en el frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) .....	25
3.8.3. Inoculación de Rizobios en el Frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) .....	26
3.8.4. Requerimientos nutricionales del frijol .....	27
CAPÍTULO IV .....	29
MATERIALES Y MÉTODOS .....	29
4.1. Materiales .....	29
4.1.1 Equipos de laboratorio .....	29

4.1.2	4.1.2 Materiales de laboratorio .....	29
4.1.3	4.1.3. Reactivos .....	29
4.1.4	4.1.4 Materiales de oficina .....	30
4.1.5	4.1.5. Materiales de campo.....	30
4.1.6	4.1.6. Insumos Agrícolas .....	30
4.1.7	4.1.7. Insumos para sistema de riego .....	31
4.1.8	4.1.8. Equipos para colecta de datos.....	31
4.2	4.2. Métodos .....	32
4.2.1	4.2.1. Análisis de Cepas Nativas de <i>Rhizobium</i> spp. en la Provincia de Imbabura .....	32
4.3	4.3. Metodología Experimental para la Selección de Cepas Óptimas de <i>Rhizobium</i> spp. in-vitro.....	32
4.4	4.4. Protocolo de limpieza del material de laboratorio .....	33
4.5	4.5. Primera prueba presuntiva en Starch Agar .....	34
4.6	4.6. Segunda prueba presuntiva en Phenol Red Broth Base .....	35
4.7	4.7. Tercera prueba presuntiva en <i>Rhizobium</i> Agar MicroKit con N.....	35
4.7.1	4.7.1. Manitol (7 g/l).....	36
4.7.2	4.7.2. Fosfato monopotásico (0,15 g/l) .....	36
4.7.3	4.7.3. Fosfato dipotásico (0,4 g/l) .....	36
4.7.4	4.7.4. Yeast Extract (0,5 g/l).....	36
4.7.5	4.7.5. Nitrato amónico (1 g/l) .....	36
4.7.6	4.7.6. Agar-agar (17 g/l): .....	36
4.8	4.8. Cuarta prueba presuntiva con <i>Rhizobium</i> Agar MicroKit sin N .....	37
4.9	4.9. Quinta prueba presuntiva con Yeast Mannitol Agar with Congo Red .....	37
4.10	4.10. Condiciones de incubación y control de asepsia.....	38
4.11	4.11. Selección de la cepa óptima de <i>Rhizobium</i> spp. de cada cantón mediante análisis espectrofotométrico.....	39
4.12	4.12. Incubación de la cepa óptima de <i>Rhizobium</i> spp. ....	40
4.13	4.13. Elaboración de las dosis alta, media y baja de la cepa óptima de <i>Rhizobium</i> spp. ....	40
4.13.1	4.13.1. Dosis alta (100%) .....	41
4.13.2	4.13.2. Dosis media (50%) .....	41
4.13.3	4.13.3. Dosis baja (25%) .....	42
4.14	4.14. Frecuencia de aplicación de la cepa de <i>Rizhobium</i> spp. en el cultivo de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	42
4.15	4.15. Inoculación de las semillas de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) con la cepa óptima de <i>Rizhobium</i> spp. ....	43
4.16	4.16. Inicio de la fase de metodología experimental de campo en invernadero. ....	44
4.17	4.17. Riego por goteo.....	45
4.18	4.18. Requerimientos nutricionales del cultivo de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	48
4.18.1	4.18.1. Fertilizantes .....	49

4.18.2. Densidad de siembra .....	49
4.18.3. Cálculo de Fertilizantes .....	49
4.19. Fertiirrigación de macronutrientes y micronutrientes .....	51
4.20. Variables .....	52
4.20.1. Variable Independiente:.....	52
4.20.2. Variable dependiente .....	52
4.21. Análisis estadístico .....	53
4.21.1. Diseño experimental.....	53
4.21.2. Tratamientos.....	53
4.21.3. Repeticiones: .....	53
4.21.4. Modelo de análisis de varianza .....	53
4.21.5. Análisis funcional: .....	54
4.21.6. Tamaño de la unidad experimental .....	54
4.22. DELIMITACIÓN ESPACIAL.....	54
CAPÍTULO V .....	56
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	56
5.1. Crecimiento bacteriano de cepas de <i>Rhizobium</i> spp. de la Provincia de Imbabura.....	56
5.2. Crecimiento de halo de inhibición de cepas de <i>Rhizobium</i> spp.....	58
5.3. Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza .....	60
5.4. Análisis de varianza de la variable altura .....	61
5.5. Análisis de varianza de la variable medición de clorofila.....	72
5.6. Análisis de varianza de la variable días a la floración .....	84
5.7. Análisis de varianza de la variable días a la formación de vaina .....	86
5.8. Análisis de varianza de la variable número de nódulos .....	88
5.9. Análisis de varianza de la variable masa foliar .....	91
5.10. Análisis de varianza de la variable masa radicular .....	94
CAPÍTULO VI.....	97
CONCLUSIONES .....	97
CAPÍTULO VII .....	99
RECOMENDACIONES .....	99
CAPÍTULO VIII.....	100
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	100
CAPÍTULO IX.....	128
ANEXOS .....	128

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Requerimientos nutricionales para un rendimiento de 2.9 toneladas por hectárea de materia seca para el cultivo de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	28
Tabla 2 Lámina de riego por goteo para frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	47
Tabla 3 Requerimientos de nutrientes para aplicación de Drench en 1 ha para el cultivo de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	48
Tabla 4 Esquema del ANOVA.....	53
Tabla 5 Análisis de varianza de la variable altura de planta de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) a los 15 días.....	61
Tabla 6 Análisis de varianza de la variable altura de planta de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) a los 30 días.....	64
Tabla 7 Análisis de varianza de la variable altura de planta de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) a los 45 días.....	66
Tabla 8 Análisis de varianza de la variable altura de planta de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) a los 60 días.....	69
Tabla 9 Análisis de varianza de la variable medición de clorofila en unidades SPAD de planta de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) a los 15 días.....	72
Tabla 10 Análisis de varianza de la variable SPAD de planta de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) a los 30 días.....	74
Tabla 11 Análisis de varianza de la variable SPAD de planta de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) a los 45 días.....	77
Tabla 12 Análisis de varianza de la variable SPAD de planta de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) a los 60 días.....	80
Tabla 13 Análisis de varianza de la variable días a la floración de planta de frijol( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	84
Tabla 14 Análisis de varianza de la variable días a la formación de vaina de planta de frijol( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	86
Tabla 15 Análisis de varianza de la variable nódulos de planta de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) a los 60 días.....	88
Tabla 16 Análisis de varianza de la variable masa foliar de planta de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) a los 60 días.....	91
Tabla 17 Análisis de varianza de la variable masa radicular de planta de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) a los 60 días.....	94

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema del diseño experimental DBCA .....	45
Figura 2 Compatibilidad de los fertilizantes solubles utilizados en fertirriego .....	52
Figura 3 Mapa de ubicación del ensayo experimental .....	55
Figura 4 Crecimiento bacteriano de cepas de <i>Rhizobium</i> spp. evaluado mediante espectrofotometría.....	56
Figura 5 Crecimiento del halo de inhibición de cepas de <i>Rhizobium</i> spp. medido con calibrador Vernier digital .....	58
Figura 6 Normalidad y homogeneidad de varianza del cultivo de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) .....	60
Figura 7 Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% para la variable altura de planta de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) a los 15 días .....	62
Figura 8 Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% para la variable altura de planta de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) a los 30 días .....	65
Figura 9 Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% para la variable altura de planta de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) a los 45 días .....	67
Figura 10 Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% para la variable altura de planta de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) a los 60 días .....	70
Figura 11 Comparación múltiple de promedios Tukey al 5% de la variable altura de planta en frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) durante los 60 días .....	73
Figura 12 Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% para la variable SPAD de planta de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) a los 15 días .....	73
Figura 13 Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% para la variable SPAD de planta de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) a los 30 días .....	75
Figura 14 Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% para la variable SPAD de planta de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) a los 45 días .....	78
Figura 15 Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% para la variable SPAD de planta de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) a los 60 días .....	81
Figura 16 Comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% para la variable contenido de clorofila en planta de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	85
Figura 17 Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% para la variable días a la floración de planta de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) .....	85
Figura 18 Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% para la variable días a la formación de vaina de planta de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) .....	87
Figura 19 Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% para la variable nódulos de planta de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) a los 60 días .....	88

Figura 20 Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% para la variable masa foliar de planta de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) a los 60 días .....	92
Figura 21 Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% para la variable masa radicular de planta de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) a los 60 días .....	95

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo por objetivo, evaluar el efecto de tres dosis de *Rhizobium* spp. sobre el crecimiento y desarrollo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en la ciudad de Ibarra, provincia de Imbabura, durante un periodo de 60 días. Se evaluaron diversas variables agronómicas, entre las que se incluyen la altura de las plantas, el índice SPAD (que mide el contenido de clorofila en las hojas), el número de nódulos, la masa foliar y la masa radicular. Los resultados obtenidos indicaron que la dosis más baja de *Rhizobium* spp., correspondiente al tratamiento testigo 3 ( $6 \times 10^{2.5}$  UFC/ml), fue la que mostró los mejores efectos en todas las variables evaluadas. Esta dosis favoreció significativamente el desarrollo vegetativo de las plantas, incrementando su altura, el número de nódulos en las raíces, y promoviendo un mayor crecimiento tanto de la masa foliar como radicular, lo que sugirió una optimización de la fijación biológica de nitrógeno. Para asegurar un adecuado suministro de agua y facilitar la absorción de nutrientes, se implementó un sistema de riego por goteo con Drench, lo cual permitió un uso eficiente del recurso hídrico. Además, se realizaron pruebas presuntivas para determinar cuál de las cepas de *Rhizobium* spp. evaluadas tenía una mayor capacidad de fijación de nitrógeno. Los resultados demostraron que la dosis baja de *Rhizobium* spp. no solo mejoró el desarrollo físico del frijol, sino que también mostró su potencial para contribuir a una producción más sostenible de frijol en la región. Estos hallazgos son relevantes para optimizar las prácticas agrícolas en la zona, promoviendo un uso más eficiente de los recursos y reduciendo la dependencia de fertilizantes sintéticos.

**Palabras clave:** 1. *Rhizobium* spp., 2. Fijación biológica de nitrógeno, 3. Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), 4. Masa radicular, 5. Riego por goteo

## ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the effect of three doses of *Rhizobium* spp. on the growth and development of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the city of Ibarra, province of Imbabura, over a period of 60 days. Several agronomic variables were assessed, including plant height, the SPAD index (which measures chlorophyll content in the leaves), the number of nodules, leaf mass, and root mass. The results indicated that the lowest dose of *Rhizobium* spp., corresponding to treatment 3 ( $6 \times 10^{2.5}$  UFC/ml), showed the best effects on all evaluated variables. This dose significantly favored the vegetative development of the plants, increasing their height, the number of nodules in the roots, and promoting greater growth of both leaf and root mass, suggesting an optimization of biological nitrogen fixation. To ensure an adequate water supply and facilitate the absorption of nutrients, a drip irrigation system with Drench was implemented, which allowed efficient use of the water resource. Additionally, presumptive tests were carried out to determine which of the *Rhizobium* spp. strains evaluated had the highest nitrogen fixation capacity. The results demonstrated that the low dose of *Rhizobium* spp. not only improved the physical development of the bean but also showed its potential to contribute to more sustainable bean production in the region. These findings are relevant for optimizing agricultural practices in the area, promoting more efficient use of resources, and reducing the reliance on synthetic fertilizers.

**Keywords:** 1. *Rhizobium* spp., 2. Biological nitrogen fixation, 3. Bean (*Phaseolus vulgaris* L.), 4. Root mass, 5. Drip irrigation

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

El nitrógeno es esencial para el desarrollo de las plantas, ya que forma parte de moléculas clave como la clorofila, los aminoácidos y los ácidos nucleicos (González, 2013). Aunque es el gas más abundante en la atmósfera, las plantas necesitan formas asimilables como amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). En la agricultura convencional, el uso intensivo de fertilizantes nitrogenados ha aumentado los rendimientos, pero también ha generado impactos ambientales como la eutrofización y la emisión de gases de efecto invernadero (Sedolfo et al., 2014).

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) representa una solución sostenible. Este proceso, realizado por bacterias como *Rhizobium* spp. en simbiosis con leguminosas, transforma el nitrógeno atmosférico en formas utilizables, reduciendo la dependencia de fertilizantes sintéticos (Soto Regalado et al., 2022). En el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), un cultivo esencial en países en desarrollo, la FBN mejora la productividad y fomenta la sostenibilidad al conservar la fertilidad del suelo y minimizar el impacto ambiental (Marín Garza et al., 2018).

No obstante, la eficiencia de la FBN depende de factores como la cepa de *Rhizobium* spp. y su adaptación a las condiciones locales (Weil y Brady, 2017). En la provincia de Imbabura, Ecuador, pocos estudios han explorado las cepas nativas de *Rhizobium* spp. y su capacidad para fijar nitrógeno en distintos pisos altitudinales, limitando el potencial para implementar prácticas agrícolas sostenibles (Perusia y Rodríguez, 2017).

Esta investigación evalúa el impacto de diferentes dosis de una cepa nativa de *Rhizobium* spp. en el cultivo de frijol bajo condiciones controladas en invernadero en Ibarra (Antón y Lizaso, 2001). El objetivo es identificar la dosis más eficiente para la FBN, promoviendo un sistema agrícola más sostenible y adaptado a las necesidades de los productores locales, contribuyendo además a enfrentar los desafíos ambientales globales (Carrasquero Ferrer et al., 2018).

## CAPÍTULO II

### OBJETIVOS

#### 2.1. Objetivo general

Evaluar la eficiencia de la fijación biológica de nitrógeno en el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), mediante la inoculación de una misma cepa de *Rhizobium* spp. en sustrato libre de nitrógeno, durante los 60 días de desarrollo del cultivo en la ciudad de Ibarra, provincia de Imbabura.

#### 2.2. Objetivos específicos

- Determinar la mejor dosis de aplicación de *Rhizobium* spp. el desarrollo en los 60 días del cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).
- Analizar el impacto de la inoculación con *Rhizobium* spp. en los 60 días en el desarrollo del cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), a través de la medición de variables de crecimiento bajo condiciones de invernadero.
- Cuantificar la variación en el contenido de clorofila del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculado con *Rhizobium* spp., a través de mediciones del índice SPAD en condiciones controladas de invernadero.

#### 2.3. Hipótesis

(Ha): Existen diferencias significativas en la eficiencia de fijación de nitrógeno entre las dosis de una misma cepa de *Rhizobium* spp. en el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Ibarra provincia de Imbabura.

(Ho): No hay diferencias significativas en la eficiencia de fijación de nitrógeno entre las dosis de una misma cepa de *Rhizobium* spp. en el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Ibarra provincia de Imbabura.

## CAPÍTULO III

### ESTADO DEL ARTE

#### 3.1. Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es una leguminosa originaria de América, reconocida por su adaptabilidad a diversas condiciones agroclimáticas y su valor nutricional (Voyssest, 2000). Esta planta ha sido ampliamente cultivada en todo el mundo, contribuyendo de manera significativa a la seguridad alimentaria en muchas regiones (Ebel et al., 2017).

Además de ser un alimento básico, el frijol es una fuente rica en proteínas vegetales, fibra, vitaminas y minerales esenciales como el hierro y el zinc (Peña Betancourt y Conde Martínez, 2012). Su consumo regular aporta importantes beneficios para la salud, especialmente en dietas donde las proteínas animales son limitadas (González et al., 2011).

En términos de agricultura sostenible, el frijol destaca por su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico en el suelo mediante su asociación con bacterias del género *Rhizobium* (Rivera Vásquez y Pedroza Pacheco, 2020). Esta propiedad no solo mejora la fertilidad del suelo, sino que también reduce la necesidad de fertilizantes nitrogenados sintéticos, promoviendo prácticas agrícolas más ecológicas y económicas (Granda Mora et al., 2016).

#### 3.2. Producción del Frijol en Ecuador

En Ecuador, el frijol es un cultivo significativo en la agricultura familiar y comercial, con una notable producción en las provincias de Imbabura, Carchi, Loja y Chimborazo, las variedades más comunes cultivadas incluyen frijol negro, frijol rojo y frijol blanco, la producción se lleva a cabo tanto en sistemas tradicionales de secano como en sistemas bajo riego (Ministerio de Agricultura y Ganadería [MAG], 2024).

La producción de frijol en Ecuador enfrenta diversos desafíos que incluyen la variabilidad climática, el ataque de plagas y enfermedades, así como la competencia con cultivos más rentables (Torres Navarrete et al., 2014). A pesar de estas dificultades, el frijol sigue siendo un cultivo estratégico tanto para la seguridad alimentaria como para la sostenibilidad agrícola del país, debido a su valor nutricional y su capacidad para contribuir a la fertilidad del suelo a través de la fijación biológica de nitrógeno (Servín

Palestina et al., 2022). Estos factores lo posicionan como un elemento clave en la dieta de las familias ecuatorianas y en la rotación de cultivos (Flores Pacheco et al., 2019).

En los últimos años, se han impulsado esfuerzos para mejorar la productividad del frijol mediante el uso de variedades mejoradas que presentan mayor resistencia a las condiciones adversas y un rendimiento superior (Anaya López et al., 2021). Además, se han implementado prácticas de manejo integrado que combinan técnicas tradicionales con la incorporación de tecnologías que optimizan la eficiencia en el uso de los recursos naturales, como el agua y los fertilizantes (Pérez y Sánchez, 2021). Estas innovaciones buscan no solo aumentar la producción, sino también promover un modelo de agricultura más sostenible y resiliente ante el cambio climático (Huerta Lara et al., 2021).

### **3.3.Fijación de Nitrógeno del Frijol**

El frijol se destaca por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico gracias a una simbiosis con bacterias del género *Rhizobium* (García et al., 2013). Estas bacterias se alojan en los nódulos que se forman en las raíces de la planta, donde llevan a cabo un proceso biológico clave: la conversión del nitrógeno gaseoso del aire en amoníaco, una forma de nitrógeno que la planta puede utilizar para su crecimiento y desarrollo (Oliveira et al., 2020). Este mecanismo natural permite que el frijol cubra parte de sus necesidades nutricionales sin depender de fertilizantes nitrogenados externos (Granda et al., 2016).

Además de beneficiar a la planta, la fijación de nitrógeno tiene un impacto positivo en la fertilidad del suelo (Fernández, 2005). Al final del ciclo de cultivo, parte del nitrógeno fijado permanece en el suelo, lo que favorece el crecimiento de cultivos sucesivos (Morel López et al., 2021). De esta manera, el frijol no solo contribuye a su propio desarrollo, sino que también actúa como un mejorador natural del suelo, promoviendo la sostenibilidad agrícola y reduciendo la necesidad de fertilizantes sintéticos en futuras plantaciones (Tofiño Rivera et al., 2020).

La eficiencia de la fijación de nitrógeno depende de varios factores, incluyendo la cepa de *Rhizobium*, las condiciones del suelo, la disponibilidad de nutrientes y las condiciones agroclimáticas, en Ecuador, la investigación y selección de cepas nativas de *Rhizobium* más eficientes es un área de interés creciente, con el objetivo de maximizar la fijación biológica de nitrógeno y reducir la dependencia de fertilizantes nitrogenados sintéticos, promoviendo así prácticas agrícolas más sostenibles (Lapa Unocc et al., 2023).

### 3.4. Nitrógeno

El nitrógeno es un elemento químico esencial para la vida, siendo el componente principal de la atmósfera (Rodríguez Guarnizo, 1995). Para las plantas, es un nutriente fundamental que interviene en procesos vitales como la fotosíntesis y la formación de proteínas (Gliessman, 2002).

Las plantas lo absorben del suelo en forma de nitrato o amonio, y lo utilizan para crecer y desarrollarse de manera saludable (Spencer et al., 2021). La cantidad de nitrógeno en el suelo influye directamente en la producción agrícola, por lo que su manejo adecuado es crucial para garantizar cultivos abundantes y de calidad (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 2024).

Estas bacterias, como el género *Rhizobium*, convierten el nitrógeno atmosférico en una forma utilizable para la planta, proporcionando un aporte adicional de nitrógeno que contribuye al crecimiento y desarrollo vegetal, a la vez que reduce la necesidad de fertilizantes sintéticos (Hunt, 2020).

### 3.5. El nitrógeno y las plantas

El nitrógeno es un nutriente esencial para las plantas, ya que forma parte fundamental de la clorofila, los aminoácidos, las proteínas y los ácidos nucleicos, los cuales son vitales para el crecimiento y desarrollo vegetal (Pérez Matos, 2020).

Las plantas lo absorben principalmente en forma de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) del suelo, utilizando estos compuestos para sintetizar moléculas indispensables que promueven un crecimiento vigoroso y la producción de frutos (Abdel-Aziz et al., 2016).

Sin embargo, tanto la deficiencia como el exceso de nitrógeno pueden afectar negativamente a las plantas: la deficiencia se manifiesta como clorosis en hojas viejas y un crecimiento reducido, mientras que el exceso puede llevar a un crecimiento desmedido de la parte aérea y a una menor resistencia a plagas y enfermedades (Vitra, 2022).

Por ello, una gestión adecuada del nitrógeno en el suelo es clave para asegurar una producción agrícola eficiente y sostenible (Vega Piqueres et al., 2021).

### 3.6. El ciclo del nitrógeno

El ciclo del nitrógeno es el proceso natural mediante el cual el nitrógeno circula entre la atmósfera, el suelo, las plantas, los animales y los microorganismos (Galván y Ríos, 2013).

Este ciclo incluye varias etapas, como la fijación, nitrificación, asimilación, amonificación y desnitrificación, que transforman el nitrógeno en diferentes formas químicas, haciéndolo accesible y utilizable para los seres vivos (Guamán et al., 2023)

El ciclo del nitrógeno es esencial para la vida, ya que este elemento es un componente clave de proteínas, ácidos nucleicos y otras moléculas vitales (Menichelli García et al., 2023) . Además, ayuda a mantener la fertilidad del suelo y la productividad de los ecosistemas (Montaño et al., 2016).

#### 3.6.1. Fijación

El molibdeno es un micronutriente esencial en la fijación biológica de nitrógeno, ya que es un componente clave de la enzima nitrogenasa, responsable de la conversión del nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) en amonio ( $NH_4^+$ ) (Martín et al., 2007).

Este proceso es llevado a cabo principalmente por bacterias fijadoras de nitrógeno, como las del género *Rhizobium*, que viven en simbiosis con las raíces de leguminosas, o por bacterias de vida libre en el suelo (Guzmán Duchén y Montero Torres, 2021).

También puede ocurrir de manera natural durante tormentas eléctricas, donde la energía de los rayos rompe las moléculas de nitrógeno, facilitando su combinación con oxígeno para formar compuestos que llegan al suelo con la lluvia (Fuentes Yagüe, 1999).

#### 3.6.2. Nitrificación

La nitrificación es un proceso biológico clave en el ciclo del nitrógeno, mediante el cual las bacterias del suelo convierten el amonio ( $NH_4^+$ ) en formas de nitrógeno más accesibles para las plantas, como los nitritos ( $NO_2^-$ ) y nitratos ( $NO_3^-$ ), este proceso es fundamental porque permite que las plantas absorban el nitrógeno en una forma que pueden utilizar para su crecimiento (Macas Guamán y Granja, 2022).

Este proceso se lleva a cabo en dos etapas principales, en la primera, las bacterias del género *Nitrosomonas* oxidan el amonio para convertirlo en nitritos, en la segunda etapa, bacterias como *Nitrobacter* transforman estos nitritos en nitratos, que son la forma final absorbida por las raíces de las plantas (Andrade et al., 2015).

La nitrificación es esencial para garantizar la disponibilidad de nitrógeno en los suelos agrícolas, dado que los nitratos son una de las fuentes más eficientes de este nutriente vital para el desarrollo vegetal, por ello, comprender y promover este proceso es crucial para la sostenibilidad agrícola (Berríos Reyes y Pérez Pastor, 2024).

### **3.6.3. Asimilación**

Durante la asimilación, las plantas absorben los nitratos del suelo a través de sus raíces y los incorporan en moléculas orgánicas, como proteínas y ácidos nucleicos, esenciales para su crecimiento y desarrollo (Mercado et al., 2023).

Este nitrógeno, una vez dentro de las plantas, se transfiere a los animales que las consumen, integrándose así en sus propias biomoléculas (Ipaz Cuastumal et al., 2023).

La asimilación es una de las maneras más directas en que el nitrógeno se mueve desde el suelo a los organismos vivos, formando parte fundamental de su estructura y funciones biológicas (Martín Alonso et al., 2018).

### **3.6.4. Amonificación**

La amonificación es un proceso crucial en el ciclo del nitrógeno, donde el nitrógeno orgánico presente en los restos de organismos muertos y sus excreciones se transforma en amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), este proceso es llevado a cabo por descomponedores, principalmente bacterias y hongos, que transforman la materia orgánica liberando el nitrógeno en forma de amonio (Bernal et al., 2010).

El amonio generado regresa al suelo, donde puede ser absorbido directamente por las plantas o pasar nuevamente por el proceso de nitrificación, transformándose en nitratos, de esta manera, la amonificación asegura que el nitrógeno siga disponible para ser utilizado en los ecosistemas agrícolas y naturales (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO] y Naciones Unidas [ONU], 2024).

Este proceso es esencial para reciclar el nitrógeno en los ecosistemas, evitando su pérdida y manteniendo la fertilidad del suelo, así, la amonificación contribuye a la continuidad del ciclo del nitrógeno, asegurando que este nutriente vital siga circulando en el ambiente (García Velázquez y Gallardo, 2017).

### **3.6.5. Desnitrificación**

La desnitrificación es un proceso biológico que ocurre en condiciones de bajo oxígeno (anaeróbicas), donde bacterias como *Pseudomonas* y *Clostridium* transforman

los nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) presentes en el suelo en nitrógeno gaseoso ( $\text{N}_2$ ) o en óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), este nitrógeno es liberado nuevamente a la atmósfera, completando así una fase clave en el ciclo del nitrógeno (Henri, 2018).

Este proceso es fundamental para cerrar el ciclo del nitrógeno, devolviendo este elemento a su forma gaseosa original en la atmósfera, aunque es una parte natural del ciclo, su impacto en la disponibilidad de nitrógeno en el suelo puede ser considerable, especialmente en sistemas agrícolas donde este nutriente es esencial para el crecimiento de los cultivos (Fonseca López et al., 2019).

Si bien la desnitrificación es necesaria para mantener el equilibrio de nitrógeno en el ecosistema, su efecto de reducir la cantidad de nitratos disponibles puede ser perjudicial para la fertilidad del suelo. Esto plantea un reto en la gestión agrícola, donde es crucial minimizar las pérdidas de nitrógeno para garantizar su disponibilidad para las plantas (Cerón Rincón y Aristizábal Gutiérrez, 2012).

### **3.7. Rizobios**

Los rizobios son un grupo de bacterias que establecen una relación simbiótica con las plantas leguminosas como el frijol, la soja, y las lentejas, para fijar nitrógeno atmosférico y convertirlo en formas que las plantas pueden utilizar, como amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) (Ríos Ruiz et al., 2019).

Esta simbiosis tiene lugar en los nódulos que se desarrollan en las raíces de las plantas, donde el molibdeno desempeña un papel fundamental en la fijación biológica del nitrógeno, como cofactor esencial de la enzima nitrogenasa, el molibdeno permite que esta enzima convierta el nitrógeno atmosférico en una forma utilizable por los cultivos, favoreciendo su crecimiento y desarrollo (Isidra Arellano y Valdés López, 2022).

Esta fijación biológica de nitrógeno es crucial para las plantas, ya que les permite crecer en suelos pobres en nutrientes sin necesidad de fertilizantes nitrogenados adicionales (Paredes, 2013). Además, los rizobios ayudan a mejorar la fertilidad del suelo y reducen la dependencia de fertilizantes minerales, promoviendo prácticas agrícolas más sostenibles y respetuosas con el medio ambiente (López Soto y Ruiz Fierro, 2024).

### 3.7.1. Géneros de rizobios

- ***Rhizobium***

Las bacterias del género *Rhizobium* son las más estudiadas en la fijación biológica de nitrógeno (Young et al., 2023). Son Gram-negativas y tienen una forma bacilar (Kondorosi et al., 2013). Estas bacterias se encuentran comúnmente en el suelo y son capaces de reconocer las señales químicas emitidas por las raíces de sus plantas hospedadoras (Lei et al., 2022).

Simbiosis: *Rhizobium* entra en las raíces de leguminosas a través de los pelos radicales, formando estructuras llamadas nódulos donde fijan el nitrógeno atmosférico en formas que la planta puede utilizar, como amoníaco (Laffont y Frugier, 2024).

Especies comunes: *Rhizobium leguminosarum* (frijol, lentejas), *Rhizobium etli* (frijol), *Rhizobium phaseoli* (Bécquer, 2004).

- ***Bradyrhizobium***

Estas bacterias tienen un ciclo de vida más largo y crecen más lentamente en comparación con *Rhizobium*, son adaptables a condiciones de suelos pobres y ácidos, lo que las hace útiles en regiones con suelos difíciles (Klepa et al., 2021).

En la simbiosis forman nódulos en las raíces de leguminosas como la soja y el maní, proporcionando un aporte significativo de nitrógeno, lo que es crucial para cultivos en suelos con baja fertilidad (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO] y Federación Internacional de Agricultura [IFA], 2024).

Las especies más comunes son: *Bradyrhizobium japonicum* (soja), *Bradyrhizobium elkanii* (Klepa et al., 2022).

- ***Sinorhizobium (Ensifer)***

Anteriormente conocido solo como *Sinorhizobium*, el nombre *Ensifer* ahora se utiliza oficialmente, son rizobios rápidos y altamente efectivos en la formación de nódulos, especialmente con leguminosas forrajeras (Geddes et al., 2021).

La simbiosis con plantas se asocia como la alfalfa y el meliloto, son eficientes en la fijación de nitrógeno y son muy estudiados por su importancia en mejorar la calidad del forraje (Baxter et al., 2021).

Las especies comunes son *Sinorhizobium meliloti* (alfalfa), *Sinorhizobium fredii* (Taiz y Zeiger, 2006).

- ***Mesorhizobium***

Estas bacterias son conocidas por su capacidad para fijar nitrógeno en leguminosas que crecen en condiciones ambientales difíciles, como suelos áridos o semiáridos (Laranjo et al., 2014).

En la simbiosis forman nódulos en las raíces de plantas como la acacia y otras leguminosas arbóreas, jugando un papel crucial en la rehabilitación de suelos degradados (Jarvis et al., 1997).

Sus especies comunes se conocen como *Mesorhizobium ciceri* (garbanzo), *Mesorhizobium loti* (tréboles) (Hill et al., 2021).

- ***Azorhizobium***

Es un género distintivo porque puede fijar nitrógeno tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, lo cual es raro entre los rizobios (Haskett et al., 2022).

La simbiosis se asocia principalmente con leguminosas acuáticas como *Sesbania rostrata*, donde puede colonizar tanto las raíces como los tallos, ofreciendo una gran flexibilidad adaptativa (Hernández, 2015).

Las especies comunes: *Azorhizobium caulinodans* (Lloret y Martínez Romero, 2005).

- ***Allorhizobium***

Es un género menos común y menos estudiado. Se caracteriza por su capacidad de nodulación en leguminosas tropicales y su adaptación a nichos específicos (Habbadi et al., 2020).

En simbiosis forma nódulos en un número limitado de plantas hospedadoras, generalmente en entornos tropicales (Willems, 2006).

Las especies comunes: *Allorhizobium undicola* (Li et al., 2023).

- ***Neorhizobium***

Recientemente clasificado, este género incluye rizobios que se distinguen genéticamente de otros géneros tradicionales y que establecen simbiosis con algunas leguminosas (Kumar et al., 2023).

En simbiosis estas bacterias forman nódulos y fijan nitrógeno en algunas leguminosas específicas, aunque todavía se está investigando su potencial completo y aplicaciones (Soenens et al., 2019).

Las especies comunes: *Neorhizobium galegae* (Liu et al., 2020).

Cada uno de estos géneros posee características únicas que les permiten adaptarse a diferentes condiciones ambientales y leguminosas, contribuyendo de manera significativa a la fertilidad del suelo y a la sostenibilidad agrícola (Vaishnav et al., 2017).

### **3.8. Inoculación de rizobios en leguminosas**

La inoculación de rizobios en leguminosas es una técnica esencial para optimizar la fijación biológica de nitrógeno en los cultivos (Nápoles Vinent et al., 2021). Este proceso permite que las bacterias simbióticas del género *Rhizobium* colonicen las raíces de las plantas y formen nódulos donde convierten el nitrógeno atmosférico en formas disponibles para las leguminosas (Vásquez et al., 2023). Al garantizar la presencia de cepas específicas y efectivas, esta práctica no solo mejora la nutrición del nitrógeno de las plantas, sino que también reduce la dependencia de fertilizantes de síntesis, lo cual favorece a una agricultura más sostenible (Rey et al., 2005).

La inoculación tiene múltiples beneficios, entre los que destaca el incremento en la disponibilidad de nitrógeno, el mejoramiento del rendimiento del cultivo y la regeneración del suelo degradado (Crespo Flores et al., 2021). Las leguminosas inoculadas con rizobios contribuyen a enriquecer la biodiversidad microbiana del suelo y a disminuir las emisiones de gases de efecto invernadero asociadas al uso intensivo de fertilizantes sintéticos (Toniutti y Fornasero, 2020). Además, esta técnica es una solución económica y eficiente, especialmente en regiones con suelos pobres en nitrógeno (Malvarez et al., 2017).

El proceso de inoculación implica aplicar un inoculante que contiene rizobios seleccionados sobre las semillas, en el suelo o en las raíces de las plantas (Valdez Nuñez

et al., 2022). Es fundamental elegir cepas específicas que sean compatibles con la especie de leguminosa y las condiciones agroclimáticas locales (Becquer et al., 2012). Además, se debe garantizar que las condiciones del suelo sean adecuadas para la supervivencia de los rizobios, incluyendo un nivel óptimo de pH y humedad (Ortega García et al., 2023). De este modo, la inoculación asegura una interacción eficiente entre la planta y la bacteria, logrando sistemas agrícolas más productivos y sostenibles (Colás Sánchez et al., 2018).

### **3.8.1. Efectos de la inoculación con aislamientos de rizobios**

Este estudio tuvo como propósito analizar el efecto de aislados de *Rhizobium*, previamente caracterizados e identificados genéticamente, en los parámetros morfológicos, fisiológicos y la fijación de nitrógeno de dos genotipos de frijol común: ICA Pijao y BAT-304 (Broughton et al., 2003). Las evaluaciones se llevaron a cabo bajo condiciones controladas, enfocándose en la nodulación y el desempeño fisiológico de las plantas (Graham & Vance, 2000).

Los resultados demostraron que las cepas aisladas de *Rhizobium* lograron una nodulación abundante en ambos genotipos de frijol, destacándose el beneficio particular de *Rhizobium etli* y de los aislados provenientes de Santa Clara y Camajuaní-1, así como de *Rhizobium pisi* del aislado Camajuaní-2 (Esquivel López et al., 2014). Estas cepas mostraron su potencial como agentes promotores del crecimiento vegetal (Bernal Cabrera, 2014).

Además, se evidenció una fuerte correlación positiva entre las cepas más eficientes y el genotipo BAT-304, que superó en respuesta al genotipo ICA Pijao (Remans et al., 2007). Estos hallazgos subrayan la importancia de seleccionar cepas específicas según la variabilidad genotípica, lo que puede ser clave para maximizar la fijación biológica de nitrógeno y mejorar la productividad agrícola (Granda Mora et al., 2016).

### **3.8.2. Bacterias promotoras de crecimiento en el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)**

Las leguminosas son esenciales para la agricultura mundial debido a su capacidad para asociarse con rizobios, logrando fijar nitrógeno atmosférico y convertirlo en formas orgánicas aprovechables por las plantas (He et al., 2018). En este estudio, se evaluó la efectividad simbiótica de dos cepas de *Rhizobium* spp. (LMT10 y LMT15), una cepa

nativa y un tratamiento de fertilización nitrogenada ( $100 \text{ kg N ha}^{-1}$ ) en cuatro variedades de frijol: Canario Centenario, Canario CIFAC, Blanco Molinero y Rojo Molinero.

Los resultados revelaron que las variedades con mayores rendimientos fueron Blanco Molinero ( $2.636 \text{ kg ha}^{-1}$ ) y Canario Centenario ( $2.523 \text{ kg ha}^{-1}$ ) (Devi et al., 2020). Además, la interacción entre fuente de nitrógeno y variedad resultó significativa para el número de vainas por planta y el índice de cosecha (Wang et al., 2020). El tratamiento más destacado fue Canario Centenario con fertilización nitrogenada, obteniendo un rendimiento de  $3.062 \text{ kg ha}^{-1}$ , 21,4 vainas por planta y un índice de cosecha del 65% (Khalil et al., 2021).

A pesar de no haber diferencias significativas entre las fuentes de nitrógeno, las cepas inoculadas demostraron alta efectividad simbiótica y especificidad hacia ciertas variedades, como Blanco Molinero (Ganesan y Xu, 2017). Los rendimientos de los tratamientos inoculados alcanzaron el 90% de los obtenidos con fertilización química, lo que sugiere su potencial para reducir el uso de fertilizantes sintéticos (Meenu et al., 2023). Esto no solo promueve una agricultura sostenible, sino que también ofrece una opción económica y ecológica para los agricultores (Cantaro Segura et al., 2019).

### **3.8.3. Inoculación de Rizobios en el Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)**

El objetivo del trabajo fue evaluar el impacto de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) en la germinación de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Para ello, se implementó un diseño experimental completamente aleatorizado en condiciones de laboratorio, utilizando placas de Petri (Crespo Flores et al., 2022). Los tratamientos incluyeron la inoculación con cepas de *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, y combinaciones de estas bacterias, con cuatro réplicas por tratamiento (Labandera, 2003).

Los resultados indicaron que las rizobacterias mejoraron notablemente la germinación de las semillas de frijol (Perticari, 2006). Las combinaciones de *Rhizobium/Azotobacter* y *Rhizobium/Azospirillum* se destacaron por su efectividad al incrementar los índices de germinación (Taco Taype y Zúñiga Dávila, 2020). Sin embargo, se observó que el crecimiento en longitud de las raíces se vio afectado negativamente en los tratamientos inoculados con PGPR (Sosa et al., 2004).

En contraste, los tratamientos que incluyeron *Azospirillum* y su combinación con *Rhizobium* favorecieron significativamente la formación de raíces laterales en comparación con los tratamientos inoculados únicamente con *Azotobacter* o el testigo (Fernández Pascual et al., 2006). Estos hallazgos sugieren que el uso combinado de PGPR tiene un potencial considerable para mejorar algunos parámetros de desarrollo inicial en el frijol común, lo que podría traducirse en beneficios a largo plazo en la productividad agrícola (Torres et al., 2017).

#### **3.8.4. Requerimientos nutricionales del frijol.**

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es un cultivo que depende de un suministro adecuado de nutrientes para lograr un crecimiento vigoroso y maximizar su rendimiento (Ríos Betancourt et al., 2003). Entre los nutrientes esenciales, el nitrógeno (N) juega un papel crucial en la formación de proteínas y el desarrollo vegetativo de la planta (Ayala, 2006). Se recomienda aplicar entre 60 y 80 kg de nitrógeno por hectárea, ya que este elemento promueve un follaje saludable y una estructura fuerte, factores clave para alcanzar altos rendimientos (Federación Internacional de Agricultura [IFA] et al., 1992). La capacidad del frijol para fijar nitrógeno a través de sus asociaciones con bacterias del género *Rhizobium* puede también ayudar a reducir la necesidad de fertilización nitrogenada adicional (Bertsch, 2006.)

El fósforo ( $P_2O_5$ ) es otro nutriente indispensable, con aplicaciones recomendadas entre 40 y 60 kg por hectárea (Vergara Díaz et al., 2017). Este elemento es esencial para el desarrollo de un sistema radicular robusto y la formación de semillas, lo que asegura una buena producción de vainas (Calvache Ulloa et al., 2017). Una deficiencia de fósforo puede limitar el crecimiento temprano de la planta y afectar negativamente la calidad de las semillas producidas (Yanza, 2020). Además, el potasio ( $K_2O$ ) también es importante en dosis de 40 a 80 kg por hectárea, ya que regula el equilibrio hídrico de la planta y fortalece los tejidos, lo que la hace más resistente a factores de estrés como la sequía y las enfermedades (Burbano y Utreras, 2015).

Además de los macronutrientes principales, el frijol requiere cantidades menores pero cruciales de otros nutrientes (Muñoz Jáuregui et al., 2009). El magnesio (10 a 15 kg/ha) es fundamental para la fotosíntesis, ya que es un componente clave de la clorofila (Solano Reynoso et al., 2020). El azufre (10 a 20 kg/ha) apoya la síntesis de proteínas y el desarrollo enzimático, mientras que el calcio (50 a 80 kg/ha) contribuye a la estructura

celular y la salud general del suelo (Gaibor Lucio et al., 2023). Estas cantidades pueden ajustarse de acuerdo con el análisis del suelo y las condiciones específicas de cada zona de cultivo, garantizando así una nutrición equilibrada y un crecimiento saludable del frijol (Santos Hidalgo et al., 2023).

**Tabla 1**

*Requerimientos nutricionales para un rendimiento de 2.9 toneladas por hectárea de materia seca para el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)*

Nutriente	Símbolo	Cantidad requerida (kg/ha)
Nitrógeno	N	163 kg/ha
Fósforo	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	63 kg/ha
Potasio	K <sub>2</sub> O	121 kg/ha
Magnesio	Mg	37.3 kg/ha
Azufre	S	9 kg/ha
Calcio	CaO	165.5 kg/ha

**Nota:** Cantidad requerida de fertilización para una hectárea (Bertsch, 2009).

## CAPÍTULO IV

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1. Materiales

Para la ejecución de esta investigación, se emplearon diversos materiales que fueron seleccionados cuidadosamente para garantizar la adecuada implementación de los procedimientos.

##### 4.1.1 Equipos de laboratorio

- Estufa BioBase modelo BJPX-Spring
- Cámara de flujo laminar (N-Biotek)
- Autoclave vertical (N-Biotek modelo: NB-1080)
- Espectrofotómetro
- Balanza analítica (ADAM modelo: PW 254)

##### 4.1.2 Materiales de laboratorio

- Cajas Petri
- Lámpara de alcohol
- Papel Parafilm y Kraft
- Tubos de ensayo
- Frasco Boeco de 100ml, 250ml, 500ml, 1000ml.
- Probeta de 10ml
- Asa bacteriológica
- Micropipetas de 100 microlitros
- Puntas para micropipetas
- Tapones de goma

##### 4.1.3. Reactivos

- Agar Starch Agar
- Phenol Red Broth Base
- *Rizhobium* Agar con N MicroKit

- Rizhobium Agar sin N MicroKit
- Manitol 7g/l
- Fosfato monopotásico 0,15g/l
- Fosfato dipotásico 0,4 g/l
- Yeats Extract 0,5 g/l
- Nitrato Amónico 1g/l
- Agar-Agar 17g/l
- Yeast Mannitol Agar with Congo Red
- Nutrient Broth
- Alcohol al 70%
- Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>)

#### **4.1.4 Materiales de oficina**

- Cuaderno de campo
- Hojas cuadriculadas
- Esferos
- Lápiz
- Borrador
- Regla

#### **4.1.5. Materiales de campo**

- Invernadero
- Semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad centenario
- Pomina
- Humus
- Tierra negra
- Fundas de vivero 9x14

#### **4.1.6. Insumos Agrícolas**

- Óxido de calcio (CaO)
- Boro (B) 1%
- Fosfato monopotásico (MKP)

- Sulfato de potasio ( $K_2SO_4$ )
- Sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ )

#### **4.1.7. Insumos para sistema de riego**

- 50 m de manguera de 16mm
- 1 flotador
- 1 codo
- 2 acople de media
- 4 codos de media
- 1 reducción de una pulgada a media
- 1 universal de media
- 1 T de media
- 1 llave de media
- 5 T Flex de 16mm
- 5 codos Flex de 16mm
- 40 goteros auto compensados de 4 salidas
- 15 goteros auto compensados de 2 salidas
- 150 estacas
- 80 m de Manguera espagueti
- 1 taípe pequeño
- 1 teflón de tres cuartos
- 1 interruptor

#### **4.1.8. Equipos para colecta de datos**

- Computador portátil
- Impresora
- Cámara de fotos
- Calibrador Vernier digital
- Metro
- Termohigrómetro
- SPAD

## **4.2. Métodos**

### **4.2.1. Análisis de Cepas Nativas de *Rhizobium* spp. en la Provincia de Imbabura**

La presente investigación se desarrolló en el laboratorio de Microbiología y Biotecnología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, sede Ibarra (Oña Villarreal et al., 1988). Este laboratorio forma parte de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales, ubicada en el cantón Ibarra, en la provincia de Imbabura (Saráuz Estévez et al., 2019). La ubicación estratégica del laboratorio permitió un entorno controlado para el manejo y análisis de las muestras, garantizando la rigurosidad y precisión necesarias en cada etapa experimental (Osorio, 2009).

Las cepas utilizadas en este estudio fueron obtenidas a partir de un trabajo previo de colectas, donde se va a identificar seis cepas nativas de *Rhizobium* spp. provenientes de diferentes cantones de la provincia de Imbabura. Cada cepa fue recolectada en un cantón específico: Antonio Ante, Ibarra, Cotacachi, Otavalo, Urcuquí y Pimampiro (Villarreal Gutiérrez, 1984). Esta diversidad geográfica permitió evaluar la variabilidad genética y funcional de las cepas en relación con las condiciones agroclimáticas propias de cada cantón (Albuja Galindo, 1979).

La selección y análisis de las cepas se estructuraron en torno a la realización de cinco pruebas presuntivas (Vargas Fernández et al., 2022). Estas pruebas fueron fundamentales para evaluar y comparar las características funcionales de cada cepa, con el objetivo de identificar la más eficiente en términos de su actividad simbiótica (Vargas Fernández et al., 2022). Este proceso constituyó la primera fase del experimento, siendo crucial para establecer una base sólida en la evaluación de la capacidad de fijación biológica de nitrógeno de estas cepas nativas.

### **4.3. Metodología Experimental para la Selección de Cepas Óptimas de *Rhizobium* spp. in-vitro.**

En investigaciones previas, se llevó a cabo la prospección y aislamiento de *Rhizobium* spp. en campos de cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) ubicados en diversas zonas agroecológicas de la Provincia de Imbabura (Abrahamovich et al., 2014). Estas etapas iniciales incluyeron la recolección de muestras nódulos, así como su análisis para garantizar la pureza y viabilidad de las cepas bacterianas (Gonzales et al., 2019). Los resultados obtenidos proporcionaron un banco de cepas previamente caracterizadas,

sentando las bases para las pruebas posteriores y evitando la redundancia de estas fases en el presente estudio (Gómez et al., 2017).

La evaluación de esta investigación inicia con las analíticas en laboratorio bajo condiciones controladas, empleando las cepas ya aisladas y seleccionadas previamente (Alcarraz et al., 2020). Estas pruebas se enfocan en medir la eficiencia de las cepas de *Rhizobium* spp. mediante pruebas presuntivas (Villanueva y Quintana, 2012). Adicionalmente, se lleva a cabo un análisis mediante espectrofotometría para confirmar la presencia de cepas de *Rhizobium* spp., fortaleciendo la caracterización inicial y priorizando aquellas cepas con mayor potencial (Aguilar Ramírez et al., 2019).

Posteriormente, las cepas con mejor desempeño en laboratorio son evaluadas en invernadero bajo un diseño experimental de bloques completos al azar (Lara Capistrán et al., 2019). Los tratamientos consisten en la inoculación con las cepas seleccionadas y se compara su impacto en el desarrollo vegetativo, la productividad y la eficiencia de absorción de nitrógeno en las plantas (Ángeles Núñez y Cruz Acosta, 2017). Este enfoque garantiza que los resultados sean relevantes para las condiciones agroclimáticas específicas, aportando información clave para la implementación de prácticas agrícolas sostenibles (Valero et al., 2023).

#### **4.4. Protocolo de limpieza del material de laboratorio**

Se implementó un protocolo de asepsia en el laboratorio de Microbiología para garantizar la validez de los resultados experimentales y prevenir la contaminación cruzada (Zayas Infante et al., 2019). Este protocolo incluyó la limpieza exhaustiva y la esterilización de todos los materiales utilizados, entre ellos 72 cajas Petri y 18 tubos de ensayo (Granda Mora et al., 2024). La preparación previa de los instrumentos fue clave para mantener un entorno controlado, minimizando la interferencia de microorganismos externos durante el desarrollo de las pruebas experimentales (Chanaguano Punina et al., 2021).

La esterilización de los medios de cultivo y utensilios se realizó utilizando una autoclave vertical (N-Biotek modelo NB-1080), para procedimientos microbiológicos (Santoyo Pizano et al., 2021). Operando a una presión de 15 psi (aproximadamente 103 kPa) y a una temperatura de 121 °C, la autoclave eliminó eficazmente los microorganismos presentes en los materiales (Balgorry, 2015). Para garantizar su óptimo

desempeño, se llenó la autoclave con agua destilada, que al generar vapor permitió alcanzar las condiciones requeridas para una esterilización completa y segura (Abril y Casp, 2010).

Además, se emplearon medidas adicionales de desinfección para maximizar la asepsia en el laboratorio (López et al., 2018). Antes de la manipulación de los materiales, las superficies y herramientas de trabajo, como el asa bacteriológica, se desinfectaron con alcohol al 70% (Alejos et al., 2021). Esta práctica complementó el proceso de esterilización al reducir el riesgo de contaminación durante el manejo de los medios de cultivo y utensilios, asegurando así la calidad y la confiabilidad de los experimentos realizados (Cárdenas, 2016).

#### **4.5. Primera prueba presuntiva en Starch Agar**

En esta etapa inicial del experimento, las cepas seleccionadas de *Rhizobium* spp. fueron sometidas a una prueba presuntiva en el medio de cultivo Starch Agar (Pérez Uz, 2010). Este medio permite evaluar características específicas de las cepas relacionadas con su actividad metabólica (Hernández, 2020). Para ello, se utilizaron 18 cajas Petri, asegurando una replicación adecuada y condiciones controladas para el análisis comparativo entre las diferentes cepas (Parts, 2005).

La técnica de Kirby-Bauer, adaptada para este propósito, consistió en la inoculación precisa de las cepas en cuatro puntos definidos dentro de las placas de agar (Rodríguez y Zhurbenko, 2018). Este procedimiento garantizó una distribución uniforme y minimizó la posibilidad de contaminación cruzada (Medina, 2012). Las cepas analizadas provenían de diferentes pisos altitudinales de la provincia de Imbabura, lo que permitió explorar su diversidad funcional en relación con las condiciones geográficas de origen (Bertran, 2022).

El objetivo de esta prueba fue observar la capacidad de las cepas para generar halos de inhibición en el medio de cultivo, un indicador preliminar de su actividad funcional (C. Quevedo et al., 2008). Estos resultados son cruciales para identificar las cepas más prometedoras, que serán seleccionadas para las siguientes fases experimentales (Nápoles et al., 2006).

#### **4.6. Segunda prueba presuntiva en Phenol Red Broth Base**

La segunda prueba presuntiva se realizó utilizando el medio de cultivo Phenol Red Broth Base, un medio líquido que permite evaluar la capacidad metabólica de las cepas de *Rhizobium* spp. en condiciones diferentes a las de los medios sólidos (Rodríguez et al., 2021). En esta fase del experimento, se emplearon 18 tubos de ensayo como soporte para las cepas seleccionadas (Gutiérrez, 2001) Al igual que en la prueba anterior, se utilizó la técnica de Kirby-Bauer para inocular las cepas, asegurando una distribución homogénea de las bacterias en el medio de cultivo (Gallegos et al., 2014).

El Phenol Red Broth Base es un medio útil para observar cambios en el pH, ya que contiene un indicador de pH (fenol rojo) que cambia de color dependiendo de la actividad metabólica de las bacterias (Chung Guin Po, 2024). Si las cepas de *Rhizobium* spp. son capaces de fermentar los azúcares presentes en el medio, se producirá un cambio en el pH que se reflejará en un cambio de color del medio (Romero Torres y Sandoval Herrera, 2024). Este resultado permite identificar la capacidad de las cepas para realizar fermentación y su capacidad metabólica en un entorno líquido (Rojas et al., 2009).

#### **4.7. Tercera prueba presuntiva en *Rhizobium* Agar MicroKit con N**

En la tercera prueba presuntiva, se utilizó el medio *Rhizobium* Agar MicroKit con nitrógeno en 18 cajas Petri, con el objetivo de evaluar las características de crecimiento de las cepas de *Rhizobium* spp. bajo condiciones específicas, especialmente en presencia de una fuente externa de nitrógeno (Microkit, 2017). Para ello, las cepas fueron inoculadas utilizando la técnica de Kirby-Bauer, garantizando una distribución uniforme de las bacterias en el medio de cultivo (Montero Recalde et al., 2018a).

Este medio, diseñado específicamente para el crecimiento de bacterias como *Rhizobium* spp., está compuesto por varios componentes esenciales que favorecen su desarrollo y permiten analizar su respuesta a un suministro de nitrógeno adicional (Alencastro Pavón y Ayala Colimba, 2023). A continuación, se describen los componentes del *Rhizobium* Agar MicroKit utilizado:

#### **4.7.1. Manitol (7 g/l)**

El manitol actúa como una fuente de carbono para las bacterias, favoreciendo su metabolismo y crecimiento (Boron y Boulpaep, 2017).

#### **4.7.2. Fosfato monopotásico (0,15 g/l)**

Proporciona fósforo, que es esencial para el crecimiento bacteriano y para la síntesis de ácidos nucleicos y ATP (Blucher et al., 2020).

#### **4.7.3. Fosfato dipotásico (0,4 g/l)**

Ayuda a mantener el pH adecuado del medio y proporciona un suministro adicional de fósforo, que es crucial para el desarrollo bacteriano (Atlas, 2004).

#### **4.7.4. Yeast Extract (0,5 g/l)**

Es una fuente rica en vitaminas y aminoácidos (Jacob et al., 2019). Estos nutrientes favorecen el crecimiento de las bacterias (Tao et al., 2023).

#### **4.7.5. Nitrato amónico (1 g/l)**

Es la fuente de nitrógeno que se añade al medio para evaluar la capacidad de las cepas de *Rhizobium* spp. para crecer en presencia de este nutriente (Risco Arias et al., 2016). El nitrógeno es un elemento esencial para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos en las bacterias (Ramos Payán y Ocaña González, 2022).

#### **4.7.6. Agar-agar (17 g/l):**

Este agente gelificante proporciona la estructura sólida al medio, permitiendo la correcta inoculación y el aislamiento de las colonias bacterianas (Chaudhary et al., 2020).

El objetivo de esta prueba fue observar cómo las cepas de *Rhizobium* spp. se comportan cuando se les suministra nitrógeno adicional en forma de nitrato amónico (Wong Villarreal et al., 2017). En condiciones naturales, estas bacterias fijan nitrógeno atmosférico, pero la inclusión de una fuente externa de nitrógeno permite evaluar su capacidad para adaptarse y crecer en presencia de nitrógeno ya disponible en el medio (Gaviria Giraldo et al., 2018). Los resultados de este ensayo proporcionan información

valiosa sobre el metabolismo de las cepas en ambientes con fuentes de nitrógeno disponibles, lo cual es crucial para su desempeño en condiciones agrícolas reales, donde el nitrógeno a menudo se aplica en forma de fertilizantes (Pérez et al., 2021).

#### **4.8. Cuarta prueba presuntiva con *Rhizobium* Agar MicroKit sin N**

La cuarta prueba presuntiva se llevó a cabo utilizando el medio *Rhizobium* Agar MicroKit sin nitrógeno en 18 cajas Petri (Bello Gil y Brandl, 2007). En este caso, se retiraron componentes clave como el nitrato amónico y el extracto de levadura, lo que permitió evaluar el comportamiento de las cepas de *Rhizobium* spp. en un medio sin fuentes externas de nitrógeno (Pérez et al., 2008). El objetivo de este ensayo fue observar la capacidad de las cepas para crecer en ausencia de nitrógeno adicional, lo que pone a prueba su habilidad para fijar nitrógeno atmosférico de manera simbiótica, en asociación con las plantas, o autónoma, sin la necesidad de una fuente externa de nitrógeno (Clavijo et al., 2012).

Para la inoculación de las cepas, se empleó nuevamente la técnica de Kirby-Bauer, lo que facilitó una distribución uniforme de las bacterias en las cajas Petri (Arratia Mendoza y Fernández Chávez, 2018). Los resultados obtenidos en esta prueba permitieron analizar la eficiencia de las cepas para sobrevivir y crecer en condiciones donde el nitrógeno no estaba disponible de forma externa, simulando un escenario más natural en el que las bacterias deben depender de su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico (Li et al., 2022). Esta prueba fue crucial para determinar qué cepas tienen el potencial de realizar una fijación biológica de nitrógeno eficiente en condiciones de campo sin la adición de fertilizantes nitrogenados (Amalia et al., 2020)

#### **4.9. Quinta prueba presuntiva con Yeast Mannitol Agar with Congo Red**

La última prueba presuntiva se llevó a cabo utilizando el medio Yeast Mannitol Agar with Congo Red, distribuyéndolo en 18 cajas Petri (Hamza et al., 2017). Este medio específico fue elegido para evaluar características adicionales de las cepas, como su capacidad para interactuar con polisacáridos y su tolerancia a los tintes, en este caso, el Congo Red (Pervin et al., 2017). Este ensayo proporcionó información sobre la habilidad de las cepas de *Rhizobium* spp. para metabolizar manitol y su comportamiento frente a la presencia del tinte, lo que puede ser indicativo de propiedades relacionadas con la formación de colonias y la resistencia a compuestos externos (Acosta Saldaña, 2017).

Al igual que en las pruebas anteriores, las cepas fueron inoculadas utilizando la técnica de Kirby-Bauer, garantizando la uniformidad y precisión en el proceso experimental (Begom et al., 2021). Este protocolo permitió una correcta distribución de las cepas en las cajas Petri, asegurando que se pudieran observar con claridad las características de crecimiento y tolerancia de cada cepa bajo las condiciones de este medio específico (Kawaka et al., 2014). La prueba también ayudó a identificar cepas con características particulares que podrían ser útiles en futuros estudios o aplicaciones, como la capacidad para formar colonias en presencia de compuestos complejos (Kebede et al., 2022).

#### **4.10. Condiciones de incubación y control de asepsia**

Las pruebas presuntivas se llevaron a cabo en un ambiente controlado dentro de una cámara de flujo laminar (N-Biotek), lo que permitió mantener condiciones estériles durante la inoculación de las cepas (Herrera y Campos, 2005). Esta cámara proporciona un entorno libre de contaminantes externos, esencial para evitar la interferencia de microorganismos no deseados en las muestras (González Herrera et al., 2019). Para asegurar la asepsia, también se utilizó una lámpara de alcohol, que se empleó para esterilizar las herramientas de trabajo, como el asa bacteriológica. Esta herramienta fue utilizada para realizar la inoculación de las cepas en los medios de cultivo, garantizando una distribución uniforme de las bacterias sobre las superficies de las cajas Petri (López Méndez, 2023).

Después de la inoculación, las cajas Petri fueron selladas cuidadosamente con Parafilm, lo que previno cualquier tipo de contaminación cruzada durante el periodo de incubación. El sellado con Parafilm también ayudó a evitar la evaporación de los medios, lo que podría alterar el pH o las condiciones nutricionales del cultivo. Las muestras fueron luego ubicadas en una Estufa BioBase modelo BJPX-Spring, donde se mantuvieron a una temperatura constante de 38°C durante 24 horas (Silva et al., 2009). Este control térmico es crucial para favorecer el crecimiento adecuado de las colonias bacterianas de *Rhizobium* spp. (Fearnside, 2008).

El uso de estos equipos y métodos de asepsia no solo garantizó un ambiente libre de contaminantes, sino que también permitió crear condiciones óptimas para que las cepas de *Rhizobium* spp. pudieran desarrollarse y manifestar sus características fisiológicas

(Junges, 2023). El control riguroso de las condiciones experimentales aseguró que los resultados fueran precisos y fiables, facilitando la posterior interpretación de la capacidad de las cepas para fijar nitrógeno y su adaptabilidad a los diferentes medios utilizados en el estudio (Gutiérrez et al., 2023).

#### **4.11. Selección de la cepa óptima de *Rhizobium* spp. de cada cantón mediante análisis espectrofotométrico.**

Para llevar a cabo este análisis, se procedió a tomar una muestra de cada una de las 18 cepas, realizando el muestreo por triplicado (Soares & Cunha, 2019). Cada muestra se destinó a diferentes propósitos: una para conservación, otra para el muestreo, una más para reproducción y la última para la medición de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en Phenol Red Broth Base (Vieira et al., 2021). En el laboratorio de Biotecnología, se utilizó el espectrofotómetro para evaluar el crecimiento bacteriano a lo largo de 10 horas, comenzando desde la hora cero y realizando mediciones cada hora (Aristizábal Hernández, 2014).

Utilizando la micropipeta de 100  $\mu$ L, se tomó una muestra de cada cepa de *Rhizobium* spp., asegurando que se desechara la punta de la pipeta entre cada toma para evitar la contaminación cruzada entre las muestras (Ramirez Gil, 2021). Posteriormente, cada muestra fue colocada en un plato Elisa y luego insertada en el espectrofotómetro para su medición. Los datos obtenidos fueron procesados utilizando el programa GEN y luego tabulados en Excel para crear la curva de crecimiento de las cepas (Lima y Hamzagic, 2022).

A lo largo del proceso, se registraron los valores de absorbancia a cada hora, lo que permitió obtener la curva de crecimiento de cada una de las 18 cepas estudiadas (Santos et al., 2023). Los datos obtenidos fueron contrastados con los resultados de las cinco pruebas presuntivas realizadas previamente, incluidas las mediciones de halos de inhibición (Quevedo et al., 2021). Este análisis permitió identificar las cepas más óptimas de cada cantón. En total, se seleccionaron seis cepas, una por cantón, basándose en su desempeño en las pruebas. Estos resultados constituyen la base para la segunda fase de la investigación, en la cual se evaluará en condiciones de campo una cepa seleccionada entre las seis, utilizando diferentes dosis (alta, media y baja) para determinar su eficiencia y adaptabilidad (Marchetti et al., 2023).

#### **4.12. Incubación de la cepa óptima de *Rhizobium* spp.**

Se seleccionó la cepa más óptima entre las seis analizadas (Santos et al., 2008). Esta fue cultivada en medio Nutrient Broth empleando el método de Kirby-Bauer (Fearnside, 2002). Durante el procedimiento, se utilizaron frascos Boeco manipulados dentro de una cámara de flujo laminar (N-Biotek), garantizando condiciones de absoluta esterilidad para evitar posibles contaminaciones externas y asegurar la precisión del experimento (Furtado y Medeiros, 1980).

Se prepararon 100 ml del medio de cultivo, que fueron inoculados con la cepa de *Rhizobium* spp. seleccionada (Berardo y Marino, 1999). Posteriormente, el frasco con la mezcla fue colocado en una estufa BioBase modelo BJPX-Spring para su incubación (Prema Nandini y Sujatha, 2023). Esta etapa se realizó a una temperatura constante de 38 °C durante 48 horas, proporcionando un entorno controlado ideal para el crecimiento óptimo de la cepa.

Adicionalmente, se suministró CO<sub>2</sub> durante el proceso de incubación, con el fin de mantener las condiciones específicas necesarias para el desarrollo adecuado de los microorganismos (Ahmed et al., 2022). Este manejo preciso en el cultivo de la cepa asegura la obtención de un inóculo de calidad para ser utilizado en las etapas posteriores de estudio (Muriady et al., 2022).

#### **4.13. Elaboración de las dosis alta, media y baja de la cepa óptima de *Rhizobium* spp.**

Para la preparación de la dosis, se determinaron las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de la cepa de *Rhizobium* spp. seleccionada (Samputri et al., 2020). Esto se realizó mediante medición en un espectrofotómetro, obteniendo un total de  $6 \times 10^9$  UFC/ml, que representó la concentración final de la solución (Richland College, 2011).

Mediante la técnica conocida como ley de diluciones se realizaron las tres dosis de *Rhizobium* spp. se utilizó la fórmula:

$$C1V1 = C2V2$$

Donde:

- $C1 = 6 \times 10^9$  UFC/ml es la concentración inicial de la solución madre
- $C2$  es la concentración deseada para cada dilución.
- $V1$  es el volumen de la solución madre necesario para preparar la dilución.
- $V2 = 100\text{ml}$  es el volumen final de cada solución.

#### 4.13.1. Dosis alta (100%)

Para esta dosis, se utiliza directamente la solución madre sin realizar dilución, ya que la concentración deseada es la misma que la inicial:

$$C1 = C2 = 6 \times 10^9 \text{ UFC/ml}$$

Por lo tanto, el volumen de la solución madre requerido es igual al volumen final

$$V1 = V2 = 100\text{ml}$$

100ml de la solución madre se utilizaron para esta dosis.

#### 4.13.2. Dosis media (50%)

Para la dosis media, se requiere diluir la solución madre a la mitad de la concentración máxima, es decir:

$$C2 = 6 \times 10^{4,5} \text{ UFC/ml}$$

Usando la fórmula de diluciones:

$$V1 = \frac{C2 \times V2}{C1}$$

Sustituyendo los valores:

$$V1 = \frac{(6 \times 10^{4,5}) \times 100}{6 \times 10^9}$$

$$V1 = 0,00316\text{ml (aproximadamente } 3,16 \mu\text{l)}$$

Se utilizaron 0,00316 ml (aproximadamente 3,16  $\mu$ l) de la solución madre, completando con agua destilada hasta obtener 100 ml.

#### 4.13.3. Dosis baja (25%)

Para esta dosis, se requiere diluir la solución madre a una concentración equivalente al 25% de la concentración máxima, es decir:

$$C2 = 6 \times 10^{2,25} \text{ UFC/ml}$$

Con la fórmula de diluciones:

$$V1 = \frac{C2 \times V2}{C1}$$

Sustituyendo los valores:

$$V1 = \frac{(6 \times 10^{2,25}) \times 100}{6 \times 10^9}$$

$$V1 = 0,00018 \text{ ml (aproximadamente } 0,018 \mu\text{l)}$$

Se utilizaron 0,000018 ml (aproximadamente 0,018  $\mu$ l) de la solución madre, completando con agua destilada hasta obtener 100 ml.

#### 4.14. Frecuencia de aplicación de la cepa de *Rizhobium* spp. en el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

Para esta investigación, se diseñaron tres soluciones correspondientes a las dosis establecidas: baja, media y alta, utilizando la técnica de diluciones para ajustar las concentraciones según los objetivos experimentales (Trisia et al., 2018b). Cada solución contiene *Rhizobium* spp. en diferentes concentraciones para observar los efectos diferenciados en las variables de estudio.

Independientemente de la concentración de cada solución, el volumen de aplicación será constante: 10 ml de solución por tratamiento cada 15 días. Este enfoque permite mantener la uniformidad en la administración del tratamiento, mientras que las

variaciones en las concentraciones permitirán evaluar su impacto sobre las variables del estudio (Pliego et al., 2003).

Dosis baja: 10 ml con la menor concentración del tratamiento activo con  $6 \times 10^{2.25}$  UFC/ml (Campillo et al., 2003).

Dosis media: 10 ml con una concentración intermedia con  $6 \times 10^{4.5}$  UFC/ml .

Dosis alta: 10 ml con la mayor concentración del tratamiento activo con  $6 \times 10^9$  UFC/ml (Smith y Río Escurra, 1982).

#### **4.15. Inoculación de las semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con la cepa óptima de *Rizhobium* spp.**

Se inocularon semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizando talco comercial para mayor adhesión de las diferentes dosis de las cepas de *Rhizobium* spp., la proporción utilizada fue de (1:2), lo que implica la aplicación de 1 ml de la solución de *Rhizobium* spp. correspondiente al tratamiento (alto, medio o bajo) junto con 2 g de talco comercial (Ortega Centeno et al., 2010). Este método permitió garantizar una distribución uniforme del inoculante sobre las semillas, favoreciendo el contacto eficaz de los microorganismos con las raíces durante la siembra (Trisia et al., 2018a).

Se prepararon e inocularon 360 semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), distribuidas equitativamente entre los tres tratamientos definidos: dosis alta, media y baja (Montero Recalde et al., 2018b). Cada grupo de semillas fue tratado con la mezcla de inoculante y talco de acuerdo con las concentraciones específicas establecidas, asegurando la correcta proporción de microorganismos para cada dosis (Sangkoy et al., 2023).

Esta técnica de inoculación, combinando la cepa de *Rhizobium* spp. con talco comercial, constituye una estrategia eficiente y práctica para asegurar la adherencia del microorganismo a las semillas y promover la fijación biológica del nitrógeno (Silva et al., 2022). Este enfoque fue clave para homogeneizar las condiciones iniciales de cada tratamiento y garantizar resultados comparables a lo largo del ciclo vegetativo del cultivo (Silva et al., 2022).

#### **4.16. Inicio de la fase de metodología experimental de campo en invernadero.**

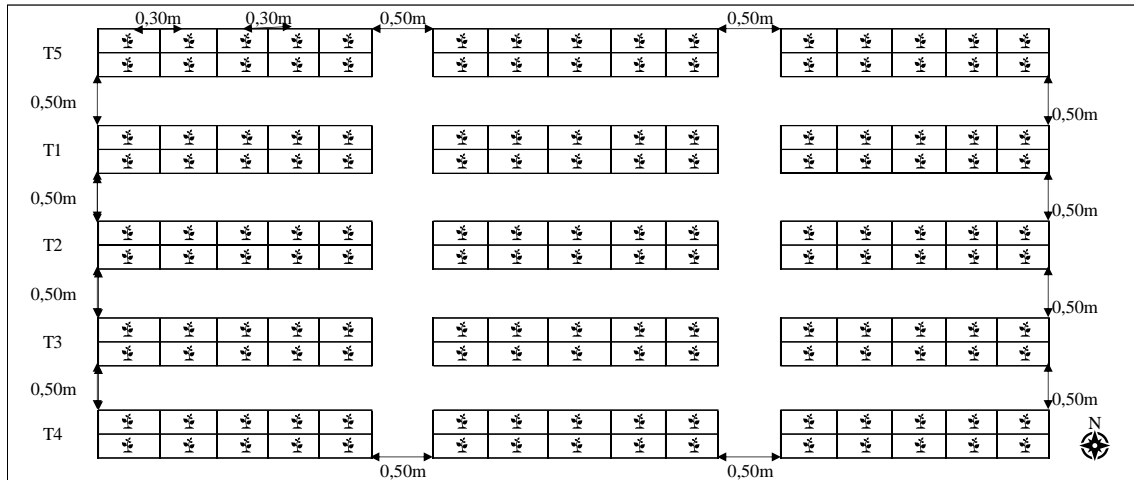
Se comenzó con la limpieza meticulosa del área del invernadero, que cubre un total de 27,5 m<sup>2</sup>. Esta fase fue esencial para asegurar un entorno adecuado para el desarrollo de la fase de campo. La limpieza permitió eliminar posibles contaminantes y preparar el espacio para recibir los materiales y condiciones necesarias para los tratamientos experimentales. Esta etapa inicial fue fundamental para garantizar la validez de los resultados que se obtendrán durante la investigación.

Una vez que el área del invernadero estuvo lista, se procedió al llenado de 150 fundas de vivero, cada una con un tamaño de 9x14 cm. En total, se distribuyeron estas fundas de acuerdo con los distintos sustratos requeridos para cada uno de los tratamientos establecidos. En el Tratamiento 1, se utilizó 30 fundas de pomina junto con 120 semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Centenario obtenida de semilleras certificadas, inoculadas con la cepa de *Rhizobium* spp. a una dosis alta de  $6 \times 10^9$  UFC ml<sup>-1</sup>. En el Tratamiento 2, también se emplearon 30 fundas con pomina, pero en este caso se bajó la dosis de inoculación a media, utilizando 120 semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con cepas de *Rhizobium* spp. a una concentración de  $6 \times 10^{4.5}$  UFC ml<sup>-1</sup>, mientras que el Tratamiento 3 se colocaron otras 30 fundas de pomina con 120 semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculadas con una dosis baja de  $6 \times 10^{2.25}$  UFC ml<sup>-1</sup>.

El Tratamiento 4, que actuó como testigo, consistió en preparar 30 fundas con un sustrato compuesto por una mezcla de 50% de tierra negra, 30% de humus y 20% de pomina, además de la siembra de 120 semillas. En este tratamiento, se evaluó el comportamiento de las plantas bajo condiciones más naturales, sin la inoculación de cepas de *Rhizobium* spp. ni fertilización adicional. Por otro lado, en el Tratamiento 5, también se utilizaron 30 fundas con la misma mezcla de sustrato (50% tierra negra, 30% humus y 20% pomina), pero en este caso las 120 semillas de frijol, fueron sometidas a un proceso de fertilización, sin la inoculación de *Rhizobium* spp. Este diseño experimental tiene como objetivo establecer las condiciones óptimas para el crecimiento y desarrollo de las semillas, permitiendo evaluar el impacto de la inoculación con diferentes dosis de *Rhizobium* spp. en el desarrollo de las plantas.

**Figura 1**

*Esquema del diseño experimental DBCA*



Distancia entre plantas 0,30m x 15 macetas= 4,5m de ancho

Distancia total entre surcos 0,50m x 2 surcos = 1m ancho

Distancia entre plantas 0,30 x 10 macetas= 3m largo

Distancia total entre surcos 0,50m x 4 surcos = 2m largo

Ancho total 4,5m + 1m= 5,5m

Largo total 3m + 2= 5m

Área total: 5,5m x 5m= 27,5m<sup>2</sup>

#### **4.17. Riego por goteo**

El riego por goteo es un método de irrigación que se caracteriza por su alta eficiencia, ya que permite aplicar el agua directamente en la base de las plantas. Este sistema consta de una red de tuberías y emisores que liberan pequeñas cantidades de agua de forma continua y controlada, asegurando que el recurso llegue directamente a la zona de las raíces. A diferencia de otros sistemas de riego, el riego por goteo minimiza las pérdidas por evaporación y escorrentía, lo que lo convierte en una opción ideal para regiones con escasez de agua o para cultivos que requieren un manejo preciso de la humedad.

Una de las principales ventajas del riego por goteo es su capacidad para proporcionar agua de manera uniforme, evitando el estrés hídrico en las plantas. Al ser un sistema ajustable, permite regular el flujo de agua y aplicar nutrientes junto con el riego, lo que facilita la dosificación de fertilizantes líquidos y mejora la absorción de nutrientes por parte de las plantas. Esto resulta en un crecimiento más saludable y una mayor productividad, ya que las plantas reciben el agua y los nutrientes justo donde lo necesitan.

Además, el riego por goteo reduce el desarrollo de malezas y enfermedades en los cultivos, ya que el agua se aplica directamente a las plantas, dejando el resto del suelo seco. Esto también contribuye a un mejor control de plagas y la reducción del uso de agroquímicos. El riego por goteo es una solución sostenible y eficiente que no solo mejora la productividad agrícola, sino que también promueve un uso responsable y optimizado de los recursos hídricos y los insumos agrícolas.

Con base en los cálculos realizados en la Tabla 2, se determina que el caudal del sistema de riego para el cultivo de frijol es de 0.09 litros por segundo ( $l\ s^{-1}$ ), lo que equivale aproximadamente a 216 litros por hora ( $l\ h^{-1}$ ). El tiempo de riego requerido es de 0.45 horas, es decir, cerca de 26 minutos. Además, se estima que el volumen total de agua que necesita aplicarse para satisfacer la demanda del área es de 150 litros, los cuales se deben distribuir en un intervalo de 3 días.

**Tabla 2***Lámina de riego por goteo para frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)*

DESCRIPCIÓN	SÍMBOLO	UNIDAD	FÓRMULA	VALORES
Evapotranspiración cultivo	ETc	mm	$ETc = ETo * kc$	2
Evapotranspiración gotero	ETg	mm	$ETg = ETc * PAR$	2
Lámina de riego	Lr	mm	$Lr = (CC - PmP) / 100 * Pr * da$	17,6
Lámina neta de riego	Ln	mm	$Ln = ETg * Ir$	0,3334
Lámina bruta de riego	Lb	mm	$Lb = Ln / Ef$	0,34
Intensidad de aplicación	la	mm/hora	$la = qe / (dl * de)$	10,00
Tiempo de riego	T	horas	$T = Lb / la$	0,03
Área del sector con riego	A	m <sup>2</sup>	$A = AT * \%At$ riego	27,5
Volumen necesario	V	l	$V = A * Lb$	9,26
Caudal del proyecto	Q	l/s	$Q = V / (T * 3600)$	0,08

En el presente proyecto, se implementará la aplicación de Drench con una frecuencia de tres riegos diarios, programados en la mañana, al medio día y por la tarde. Este sistema de riego tiene como objetivo asegurar una distribución uniforme de los nutrientes esenciales, facilitando su absorción por parte de las plantas. Al realizar tres aplicaciones diarias, se garantiza que el agua y los nutrientes estén disponibles en las fases críticas del cultivo, optimizando su desarrollo. Este enfoque también minimiza el riesgo de escorrentías, promoviendo un uso más eficiente del recurso hídrico.

El caudal del sistema de riego es de  $0.08 \text{ l s}^{-1}$ , lo que resulta adecuado para cubrir el volumen total de agua requerido, que se estima en 9.26 litros. Este caudal debe mantenerse para asegurar que el volumen necesario se distribuya correctamente en el área de cultivo, manteniendo las plantas en condiciones óptimas de riego. Dado que el sistema

opera con alta eficiencia, se evita la saturación de agua y se maximiza la absorción por parte de las raíces.

El tiempo de riego estimado es de 0.03 horas o aproximadamente 1.8 minutos, lo que indica la brevedad con que debe realizarse cada ciclo de riego. Este corto período se debe a la alta eficiencia del sistema de riego por goteo, que permite entregar el volumen requerido en un tiempo reducido, optimizando el uso del agua. Además, la lámina bruta de riego de 0.34 mm asegura que se aplique la cantidad necesaria de agua, considerando las pérdidas inherentes al sistema, como la evaporación o el drenaje superficial.

#### 4.18. Requerimientos nutricionales del cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

El requerimiento de nutrientes y fertilizantes para el cultivo por hectárea se ha calculado en función de tres riegos diarios. Se aplicarán los siguientes nutrientes: óxido de calcio (CaO) en una cantidad de 13.5 kg, boro (B) 2 kg, fosfato monopotásico (MKP) con un total de 115 kg, sulfato de potasio (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) en 173 kg y sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>) en 411 kg. Estos fertilizantes son esenciales para asegurar un adecuado desarrollo del cultivo, optimizando el suministro de calcio, boro, potasio y magnesio en el sistema radicular a través del riego.

**Tabla 3**

*Requerimientos de nutrientes para aplicación de Drench en 1 ha para el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)*

<b>Nutriente/Fertilizante</b>	<b>Requerimiento por 1 ha (kg)</b>
<b>Riego</b>	Tres riegos al día
Óxido de calcio (CaO)	13.5
Boro (B)	2
Fosfato monopotásico (MKP)	115
Sulfato de potasio (K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	173
Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> )	411

**Nota:** Requerimientos de nutrientes para frijol para una hectárea (Bertsch, 2009).

#### 4.18.1. Fertilizantes

Según Bertsch (2009), para los tratamientos testigo (T5) y los tratamientos T1, T2, y T3, se aplicarán los siguientes fertilizantes por hectárea: 450.9 kg de nitrato de amónico, 13.5 kg de óxido de calcio, 2 kg de boro, 115 kg de fosfato monopotásico, 173 kg de sulfato de potasio y 411 kg de sulfato de magnesio. Esta combinación de nutrientes garantiza un aporte equilibrado y adecuado para el desarrollo óptimo del cultivo. Cabe destacar que en los tratamientos T1, T2 y T3 no se aplicará nitrato de amonio, ya que estos están inoculados con dosis de *Rhizobium* spp., los cuales favorecen la fijación biológica del nitrógeno en lugar de depender de fertilizantes nitrogenados.

#### 4.18.2. Densidad de siembra

Siembra= En frijol 0,50m entre líneas y 0,30 entre plantas

$$\frac{100}{0,5} = 200 \text{ surcos}$$

$$\frac{100}{0,3} = 333,33 \text{ plantas}$$

$$200 \text{ surcos} \times 333,33 \text{ plantas} = 66666,66 \text{ plantas/ha}$$

#### 4.18.3. Cálculo de Fertilizantes

- Óxido de calcio (CaO):

$$13,5\text{kg} \times \frac{1000\text{g}}{1\text{kg}} = 13,500 \text{ g}$$

$$13,500\text{g} \times \frac{120\text{plantas}}{66666,66 \text{ plantas/ha}} = 24,30 \text{ g plantas} - 1 \text{ ha} - 1$$

$$100 \text{ días ciclo del cultivo} - 15 \text{ días de germinación} = 85 \text{ días}$$

Se prepara 10 L de agua:

$$\frac{10000\text{cm}^3}{85 \text{ días}} = 117,64 \text{ cm}^3 \text{ maceta diaria}$$

$$\frac{117,64\text{cm}^3}{120 \text{ plantas}} = 0,98\text{cm}^3 \text{ plantas} - 1$$

En una mezcla de 10 litros de H<sub>2</sub>O, se incorporan 24,30 g de óxido de calcio (CaO). Diariamente, se aplicará al cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) aproximadamente 0,98 cm<sup>3</sup> por planta, utilizando una jeringuilla, durante los 85 días del ciclo del cultivo. De manera similar, se realizarán las aplicaciones correspondientes de los demás fertilizantes, ajustándose a los cálculos específicos establecidos para cada uno. Esto garantiza un suministro adecuado y continuo de nutrientes esenciales para el desarrollo óptimo del cultivo.

- **Boro (B):**

$$2kg \times \frac{1000g}{1kg} = 2000 g$$

$$2000g \times \frac{120plantas}{66666,66 plantas/ha} = 3,60 g plantas - 1 ha - 1$$

Se coloca en 10 litros de agua, 3,60 g de boro (B). Diariamente, se administra al cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) una dosis de 0,98 cm<sup>3</sup> por planta, utilizando una jeringuilla, durante los 85 días del ciclo del cultivo.

- **Fosfato monopotásico (MKP)**

$$115kg \times \frac{1000g}{1kg} = 115000 g$$

$$115000g \times \frac{120plantas}{66666,66 plantas/ha} = 207 g plantas - 1 ha - 1$$

En 10 litros de agua, se disuelven 207 g de MKP. Cada día, se aplica al cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) una cantidad de 0,98 cm<sup>3</sup> por planta, utilizando una jeringuilla, a lo largo de los 85 días que dura el ciclo del cultivo.

- **Sulfato de potasio (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)**

$$173kg \times \frac{1000g}{1kg} = 173000 g$$

$$173000g \times \frac{120plantas}{66666,66 plantas/ha} = 311,40 g plantas - 1 ha - 1$$

En una solución de 10 litros de agua, se mezclan 311,40 g de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Diariamente, se distribuye al cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) una dosis de 0,98 cm<sup>3</sup> por planta, empleando una jeringuilla, durante los 85 días del ciclo del cultivo.

- **Sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>)**

$$411kg \times \frac{1000g}{1kg} = 411000 g$$

$$411000g \times \frac{120plantas}{66666,66 plantas/ha} = 739,80 g plantas - 1 ha - 1$$

En 10 litros de agua, se disuelven 739,80 g de MgSO<sub>4</sub>. Cada día, se administra al cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) una cantidad de 0,98 cm<sup>3</sup> por planta, utilizando una jeringuilla, a lo largo de los 85 días que abarca el ciclo del cultivo.

- **Nitrato amónico NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>**

$$450kg \times \frac{1000g}{1kg} = 450000 g$$

$$450000g \times \frac{30plantas}{66666,66 plantas/ha} = 202,5 g plantas - 1 ha - 1$$

En una mezcla de 10 litros de agua, se disuelven 202,50 g de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Diariamente, se aplica al cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) una dosis de 0,98 cm<sup>3</sup> por planta, utilizando una jeringuilla, durante los 85 días del ciclo del cultivo.

#### **4.19. Fertiirrigación de macronutrientes y micronutrientes**

En la investigación que se propone sobre el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), la compatibilidad de macronutrientes y micronutrientes es clave para garantizar que los fertilizantes utilizados, como el óxido de calcio (CaO), el fosfato monopotásico (MKP), el sulfato de potasio (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y el sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>), se apliquen de manera eficiente sin interacciones negativas que afecten su disponibilidad para las plantas. Este enfoque asegura un suministro balanceado de nutrientes, promoviendo un crecimiento óptimo y favoreciendo el desarrollo sostenible del cultivo en combinación con las cepas de *Rhizobium* spp. utilizadas.

**Figura 2**

*Compatibilidad de los fertilizantes solubles utilizados en fertirriego*

FERTILIZANTES	Urea	Nitrato de Amonio	Sulfato de amonio	Nitrato de Calcio	Nitrato de magnesio	Fosfato monoamónico	Fosfato monopotásico	Nitrato de potasio	Sulfato de potasio	Cloruro de potasio	Ácido fosfórico	Ácido nítrico	Ácido sulfúrico	Sulfatos Fe, Cu, Mn, Zn	Quelatos
Nitrato de Amonio	c														
Sulfato de amonio	I	c													
Nitrato de Calcio	c	c	I												
Nitrato de magnesio	c	c	c	c											
Fosfato monoamónico	c	c	c	I	I										
Fosfato monopotásico	c	c	c	I	I	I	c								
Nitrato de potasio	c	c	R	c	c	c	c								
Sulfato de potasio	c	c	R	I	I	I	c	c							
Cloruro de potasio	c	c	c	I	c	c	c	c	R						
Ácido fosfórico	c	c	c	I	I	I	c	c	c	c					
Ácido nítrico	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c					
Ácido sulfúrico	c	c	c	I	I	I	c	c	R	c	c	c			
Sulfatos Fe, Cu, Mn, Zn	c	c	c	I	I	I	c	c	R	c	c	c	c		
Quelatos	c	c	c	R	R	R	c	c	c	c	R	I	c	c	
Sulfato de Magnesio	c	c	c	I	I	I	c	c	R	c	c	c	c	c	c

C: Compatible, R: Se reduce la solubilidad, I: Incompatible.

**Nota:** Guía para compatibilidad de fertilizantes (Técnica Huasco et al., 1998).

La aplicación de fertilizantes se llevará a cabo de la siguiente manera: en la mañana, se administrará el Fosfato monopotásico (MKP) junto con el Sulfato de potasio ( $K_2SO_4$ ) a los tratamientos T1, T2, T3 y T5, además del Nitrato amónico únicamente al tratamiento testigo T5. Al mediodía, se aplicará el Óxido de calcio (CaO) a los tratamientos T1, T2, T3 y T5. En la tarde, se distribuirán el Boro (B) y el Sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ ) a los mismos tratamientos. Cabe destacar que el tratamiento T4 no recibirá ningún tipo de fertilización ni inoculación, mientras que los tratamientos T1, T2 y T3 serán inoculados con la cepa de *Rhizobium* spp. cada 15 días contando a partir de la siembra durante el ciclo de vida del cultivo.

**4.20. Variables**

**4.20.1. Variable Independiente:**

Dosis de aplicación

**4.20.2. Variable dependiente**

- Se midió la altura del frijol a los 15, 30, 45 y 60 días usando un metro, desde la base del tallo principal hasta el punto más alto de la planta (Anaya López et al., 2021).

- La masa foliar y radicular se extrajo a los 60 días del ciclo del cultivo, separando las partes foliares y las raíces. En una estufa se secaron durante 24 horas y se pesaron en estado vivo y seco para determinar la materia seca (Kebede et al., 2022).

- Contenido de nitrógeno foliar se midió a los 15, 30, 45 y 60 días del ciclo del cultivo utilizando un medidor de clorofila SPAD (Silva et al., 2011).

- Los días a la floración y formación de vaina se evaluaron observando el 70% de las plantas en floración y vaina (Flores de la Cruz et al., 2018).

- Los nódulos se evaluaron a los 60 días del cultivo, contando los nódulos formados en las raíces de cada tratamiento (Gómez et al., 2017).

#### 4.21. Análisis estadístico

##### 4.21.1. Diseño experimental

En la presente investigación se utilizará el Diseño de Bloques Completamente al Azar.

##### 4.21.2. Tratamientos

- T1= Dosis alta óptima de  $6 \times 10^9$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  al 100% determinada in vitro.
- T2= Dosis media óptima de  $6 \times 10^{4,5}$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  al 50% determinada in vitro.
- T3= Dosis baja óptima de  $6 \times 10^{2,25}$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  al 25% determinada in vitro.
- T4= Testigo en sustrato (50% tierra negra, 30% humus y 20% pomina, sin fertilización).
- T5= Dosis testigo fertilización mineral (requerimiento de la especie) y en sustrato (50% tierra negra, 30% humus y 20% pomina).

##### 4.21.3. Repeticiones:

La presente investigación constará de 3 repeticiones

Unidades experimentales:

Se implementarán 15 unidades experimentales; cada unidad experimental constará de 10 fundas, para un total de 150 fundas de 2,5l con cascajo (pomina).

##### 4.21.4. Modelo de análisis de varianza

#### Tabla 4

*Esquema del ANOVA*

<i>Fuente de Variación (FV)</i>	<i>Grados de Libertad (GL)</i>
<i>Total</i>	14
<i>Tratamiento</i>	4
<i>Bloque</i>	2
<i>Error experimental</i>	8

#### **4.21.5. Análisis funcional:**

- Coeficiente de variación
- Prueba de normalidad de Shapiro Wilks
- Prueba de comparación múltiple de medias de Tukey al 5%

#### **4.21.6. Tamaño de la unidad experimental**

El total de unidades experimentales es de 15 fundas, cada unidad experimental constó de 10 fundas de polietileno negro con capacidad para 2,5 l que estarán llenas de sustrato inerte (pomina o cascajo), y recibirán riego localizado (gotero pinchado de 2 l h<sup>-1</sup> con espagueti individual a cada funda (cada funda recibirá 1l de agua por hora y se completará el riego según la lámina de riego calculada para el cultivo)). Se aplicó la dosis de *Rhizobium* spp. en donde se procedió al inóculo en la semilla 48h antes de la siembra según cada dosis determinada in-vitro y luego se colocará cada 15 días hasta los 60 días de vida del cultivo.

Área del experimento sería de 27,5 m<sup>2</sup>.

#### **4.22. DELIMITACIÓN ESPACIAL**

La investigación se centra en la Provincia de Imbabura, situada en el norte de Ecuador. En esta región, el estudio se enfoca en los diferentes pisos altitudinales en los que se cultiva el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y donde se pueden identificar y evaluar una misma cepa de *Rhizobium* spp. Esta delimitación es esencial para comprender cómo las condiciones locales, tales como el clima, la altitud y el tipo de suelo, influyen en la eficiencia de la fijación biológica de nitrógeno de una misma cepa de *Rhizobium* spp. en el cultivo de frijol y para implementar prácticas agrícolas sostenibles adaptadas a la región.

El trabajo de campo y las pruebas de inoculación se llevaron a cabo en el invernadero de la granja ECAA perteneciente a la PUCE-SI, lo que permitirá un control adecuado de las variables ambientales y una evaluación precisa de una misma cepa bajo condiciones específicas de la provincia.

**Figura 3**

*Mapa de ubicación del ensayo experimental*



*Nota:* Tomado de Google earth 10 de febrero de 2025

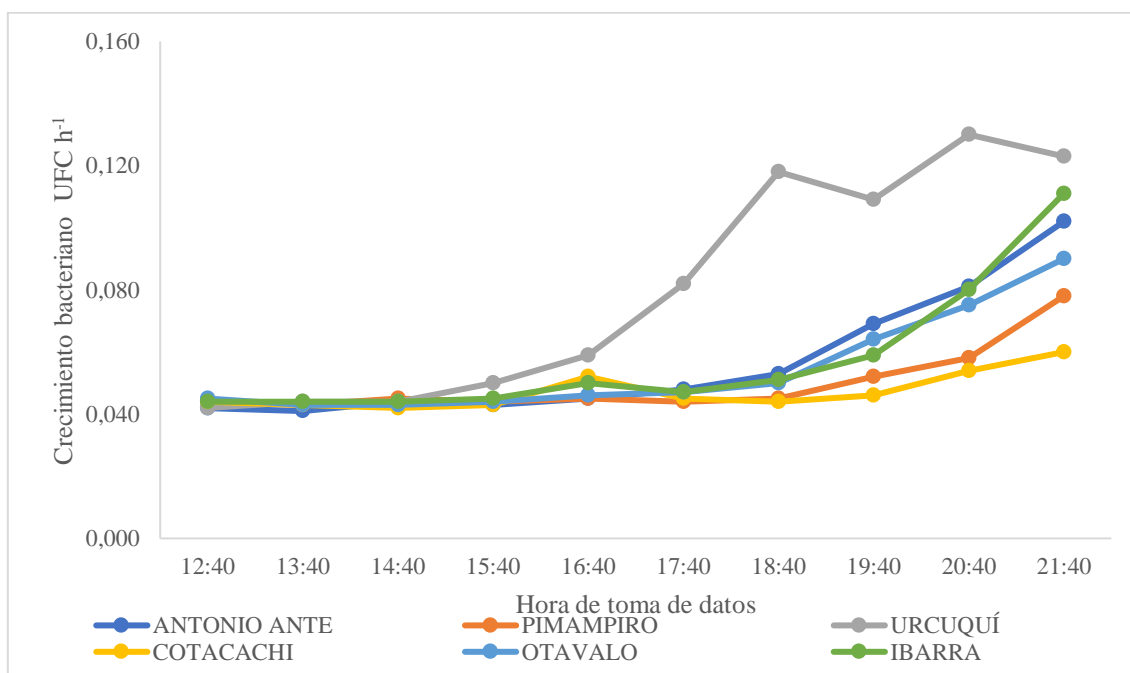
## CAPÍTULO V

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.1. Crecimiento bacteriano de cepas de *Rhizobium* spp. de la Provincia de Imbabura

Figura 4

Crecimiento bacteriano de cepas de *Rhizobium* spp. evaluado mediante espectrofotometría



En el presente estudio se evaluó el crecimiento bacteriano de 18 cepas de *Rhizobium* spp. expresado en UFC h<sup>-1</sup>, estas fueron aisladas en distintos lugares por lo que se selecciona una de las mejores cepas provenientes de cada uno de los cantones Antonio Ante, Pimampiro, Urcuquí, Cotacachi, Otavalo e Ibarra. La selección se realizó con base en el criterio de turbidez que fue un indicador visual de la densidad bacteriana observado en laboratorio, ya que una mayor turbidez indica una mayor presencia de *Rhizobium* spp. en el medio de cultivo in vitro. La cepa proveniente de Urcuquí destacó significativamente sobre las demás, mostrando un crecimiento más acelerado y sostenido según las mediciones obtenidas con un espectrofotómetro durante un período de 10 horas. Este comportamiento contrasta notablemente con las diferencias de crecimiento observadas entre las otras cinco cepas seleccionadas, evidenciando la potencialidad de esta cepa como bioinoculante eficiente.

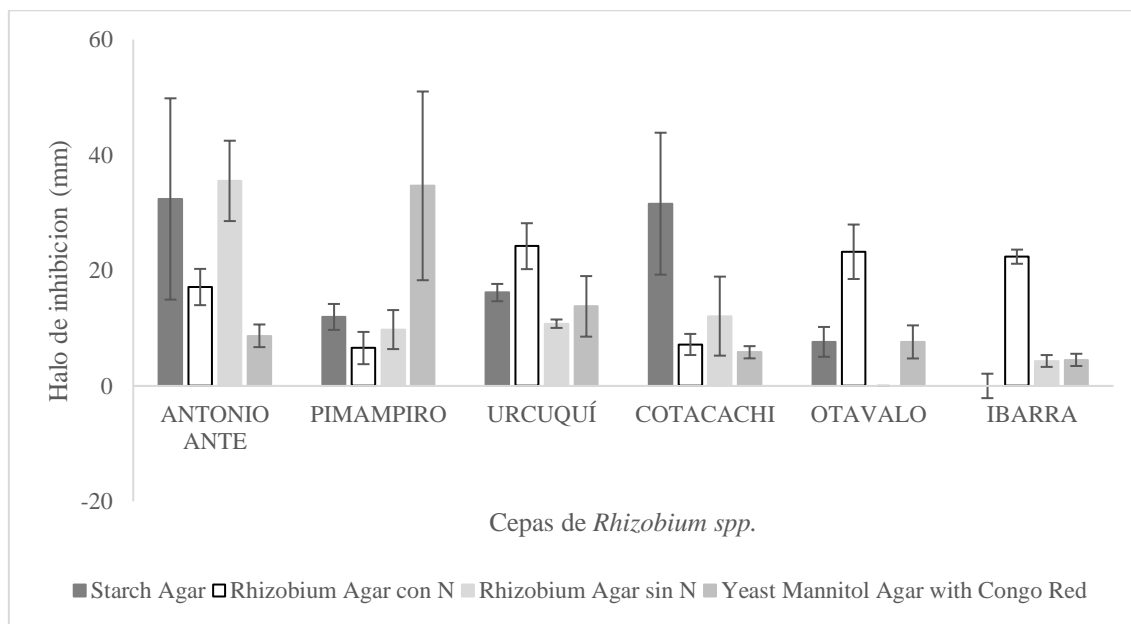
Comparando estos resultados con estudios previos, como la caracterización de 52 cepas mencionada en la literatura, se destaca que la mayoría de rizobios (63,5%) presentan un crecimiento lento, mientras que solo el 36,5% crecen rápidamente. Esto resalta la singularidad de la cepa de Urcuquí al mostrar un perfil de crecimiento rápido y consistente. Además, los resultados subrayan la importancia de identificar cepas con capacidades excepcionales, especialmente considerando que, en estudios similares, únicamente el 23% del total (12 de 52 cepas) fueron identificadas como potenciales bioinoculantes (Cuadrado et al., 2009).

En este sentido, el desempeño de la cepa de Urcuquí indica una ventaja competitiva en términos de eficiencia y potencial para aplicaciones en sistemas agrícolas, particularmente en el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), donde un crecimiento acelerado y uniforme de las bacterias puede mejorar la fijación biológica de nitrógeno y favorecer el desarrollo sostenible del cultivo.

## 5.2. Crecimiento de halo de inhibición de cepas de *Rhizobium* spp.

**Figura 5**

*Crecimiento del halo de inhibición de cepas de Rhizobium spp. medido con calibrador Vernier digital*



Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que la cepa de *Rhizobium* spp. proveniente del cantón Antonio Ante presentó el mayor halo de inhibición, lo que indica una mayor eficiencia en la fijación biológica de nitrógeno. A pesar de que la cepa de Urcuquí exhibió un mayor crecimiento en UFC h<sup>-1</sup>, su capacidad de fijación de nitrógeno fue inferior en comparación con la cepa de Antonio Ante. Estos hallazgos sugieren que la eficiencia de fijación de nitrógeno no está exclusivamente relacionada con el crecimiento de las colonias, sino también con otros factores bioquímicos y fisiológicos. Además, la evaluación in vitro permitió determinar que la cepa de Antonio Ante es la más prometedora para la fijación de nitrógeno, lo que podría traducirse en una mejor absorción de nutrientes y un mayor desarrollo del cultivo de frijol.

Comparando estos resultados con los reportados en la Revista Iberoamericana de Producción Académica y Gestión Educativa (2017), se observa que las cepas aisladas en jarras de Leonard también corresponden a *Rhizobium*, identificadas mediante caracterización bioquímica. Sin embargo, los resultados muestran diferencias en el comportamiento de las cepas, especialmente en el tiempo de crecimiento y la morfología de las colonias. Mientras que las cepas identificadas en el estudio revisado presentan

tiempos de crecimiento entre 3 y 5 días y colonias con características homogéneas, en nuestro estudio se observó que la cepa de Antonio Ante destacó por su mayor halo de inhibición, lo que sugiere una mayor eficiencia en la fijación de nitrógeno. Estas diferencias pueden estar relacionadas con factores genéticos y ambientales que influyen en la adaptación y el desempeño de las cepas (Acosta Saldaña, 2017).

En conclusión, la cepa de Antonio Ante se perfila como una candidata prometedora para futuras aplicaciones en la biofertilización del frijol, dado su alto rendimiento en la fijación de nitrógeno. Sin embargo, para corroborar su eficacia en condiciones de campo, es necesario complementar este estudio con ensayos agronómicos que permitan evaluar su impacto en el crecimiento y rendimiento del cultivo a lo largo del ciclo de desarrollo.

### 5.3. Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza

**Figura 6**

*Normalidad y homogeneidad de varianza del cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)*

Variable	Observaciones	Promedio	Desviación estandar	Shapiro-test		Levene-test	
				W	P-Value	F	P-Value
Altura 15 dds	15	18,491	2,212	0,963	0,748	0,822	0,540
Altura 30 dds	15	47,536	4,981	0,950	0,519	0,164	0,952
Altura 45 dds	15	70,629	5,628	0,909	0,132	0,134	0,966
Altura 60 dds	15	75,018	6,650	0,926	0,236	0,531	0,716
SPAD 15 dds	15	33,308	2,009	0,955	0,609	0,170	0,949
SPAD 30 dds	15	31,987	1,972	0,899	0,091	0,566	0,693
SPAD 45 dds	15	36,717	3,885	0,882	0,051	0,185	0,941
SPAD 60 dds	15	35,709	5,447	0,930	0,270	0,130	0,968
Días a la Floración	15	43,460	0,661	0,924	0,220	0,348	0,840
Días a la formación de vainas	15	47,500	0,919	0,971	0,867	0,571	0,690
Nódulos 60 dds	15	119,517	78,534	0,922	0,203	0,090	0,983
Masa foliar 60 dds	15	5,880	1,487	0,906	0,118	1,170	0,380
Masa radicular 60 dds	15	9,595	4,105	0,965	0,784	0,807	0,548

Luego de realizada la prueba de normalidad por medio del test de Shapiro-Wilk, se observa que los datos provienen de una distribución normal, pues el valor de la probabilidad es superior al  $p > 0,05$ . De la misma forma, el test de homogeneidad de varianza de Levene, determina, que la variable tiene homogeneidad en las varianzas.

#### 5.4. Análisis de varianza de la variable altura

**Tabla 5**

Análisis de varianza de la variable altura de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a los 15 días

<i>Fuente</i>	<i>GL</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrados medios</i>	<i>F</i>	<i>Pr &gt; F</i>	<i>p-values signification codes</i>
<i>Modelo</i>	6	65,457	10,909	28,543	5,533E-05	***
<i>Total corregido</i>	14	68,514				
<i>Tratamiento</i>	4	61,019	15,255	39,912	2,4936E-05	***
<i>Bloque</i>	2	4,438	2,219	5,806	0,0276893	*
<i>Error</i>	8	3,058	0,382			

Calculado contra el modelo  $Y = \text{Media}(Y)$

Signification codes: 0 < \*\*\* < 0.001 < \*\* < 0.01 < \* < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1

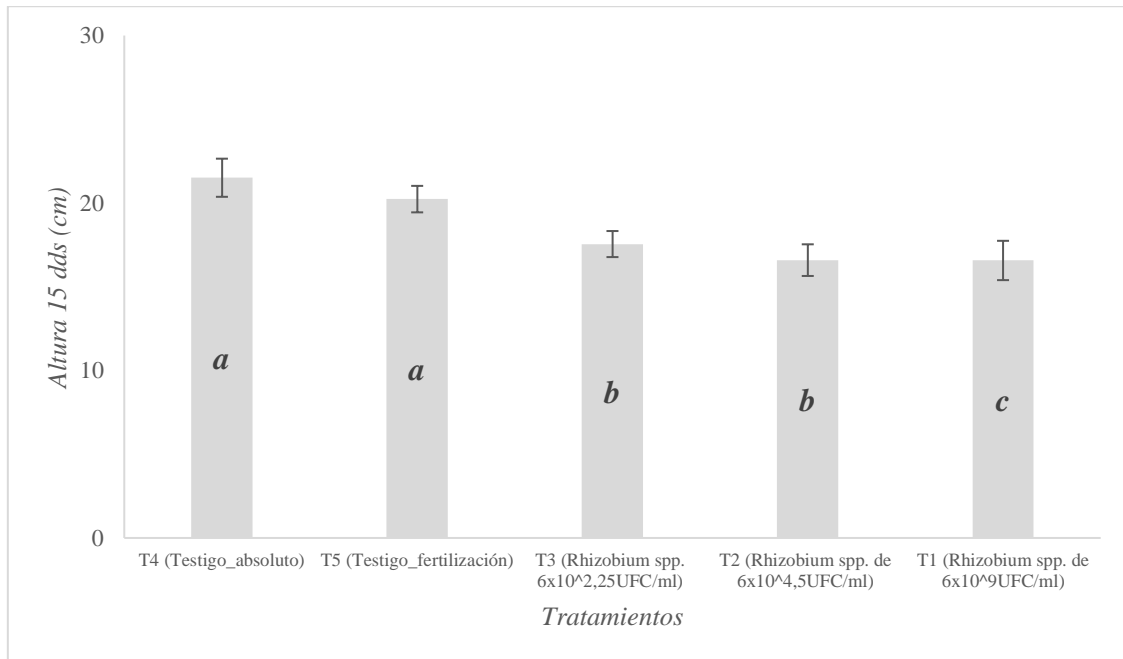
*Promedio (cm)* 18,491

*CV (%)* 3,343

El análisis de varianza de la variable altura de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a los 15 días de germinación, muestra que existe diferencia altamente significativa para tratamientos en estudio (dosis alta, media y baja), y diferencia significativa para bloques. El promedio de esta variable es de 18,491 cm de altura. El coeficiente de variación para esta variable es de 3,343 %, lo que demuestra poca dispersión de los datos respecto del valor promedio.

## Figura 7

Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% para la variable altura de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a los 15 días



**Nota:** Dosis baja al 25% con cepa de *Rhizobium* spp. de  $6 \times 10^{2,25}$  UFC/ml; Dosis media al 50% con cepa de *Rhizobium* spp. de  $6 \times 10^{4,5}$  UFC/ml; Dosis alta al 100% con cepa de *Rhizobium* spp. de  $6 \times 10^9$  UFC/ml.

Al comparar por medio del test de Tukey al 5% la altura de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a los 15 días de germinación, podemos afirmar, que existen tres rangos de significancia. El tratamiento con mayor altura de planta es el T4 sin fertilización solamente en un sustrato (50% tierra negra, 30% humus y 20% pomina), cuyo promedio fue de 21,51 cm de altura; el tratamiento que alcanzó menos altura es el T1 de la dosis alta con 16,57cm de altura.

En un estudio realizado en Sancti Spíritus, Cuba, donde la combinación de microorganismos eficientes y *Rhizobium* incrementó significativamente la altura de la planta, los resultados aquí obtenidos pueden deberse a diferencias en el suelo, variedad del cultivo y método de aplicación. En suelos con menor fertilidad, la inoculación con biofertilizantes puede ser más beneficiosa, mientras que, en sustratos ricos en materia orgánica, como en este estudio, la planta puede crecer mejor sin inoculación adicional (Calero Hurtado et al., 2019).

La respuesta de la altura del frijol a la inoculación con *Rhizobium* spp. varía según el sustrato y la dosis aplicada. Mientras que en suelos menos fértiles la combinación con microorganismos eficientes puede mejorar el crecimiento, en sustratos más ricos la inoculación excesiva podría no ser necesaria. Es crucial evaluar las condiciones específicas para optimizar el desarrollo del cultivo.

**Tabla 6**

*Análisis de varianza de la variable altura de planta de frijol (Phaseolus vulgaris L.) a los 30 días*

<i>Fuente</i>	<i>GL</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrados medios</i>	<i>F</i>	<i>Pr &gt; F</i>	<i>p-values signification codes</i>
<i>Modelo</i>	6	263,848	43,975	4,211	0,03279072	*
<i>Total corregido</i>	14	347,381				
<i>Tratamiento</i>	4	260,126	65,031	6,228	0,01406006	*
<i>Bloque</i>	2	3,723	1,861	0,178	0,83996448	°
<i>Error</i>	8	83,533	10,442			

Calculado contra el modelo  $Y = \text{Media}(Y)$

Signification codes:  $0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1$

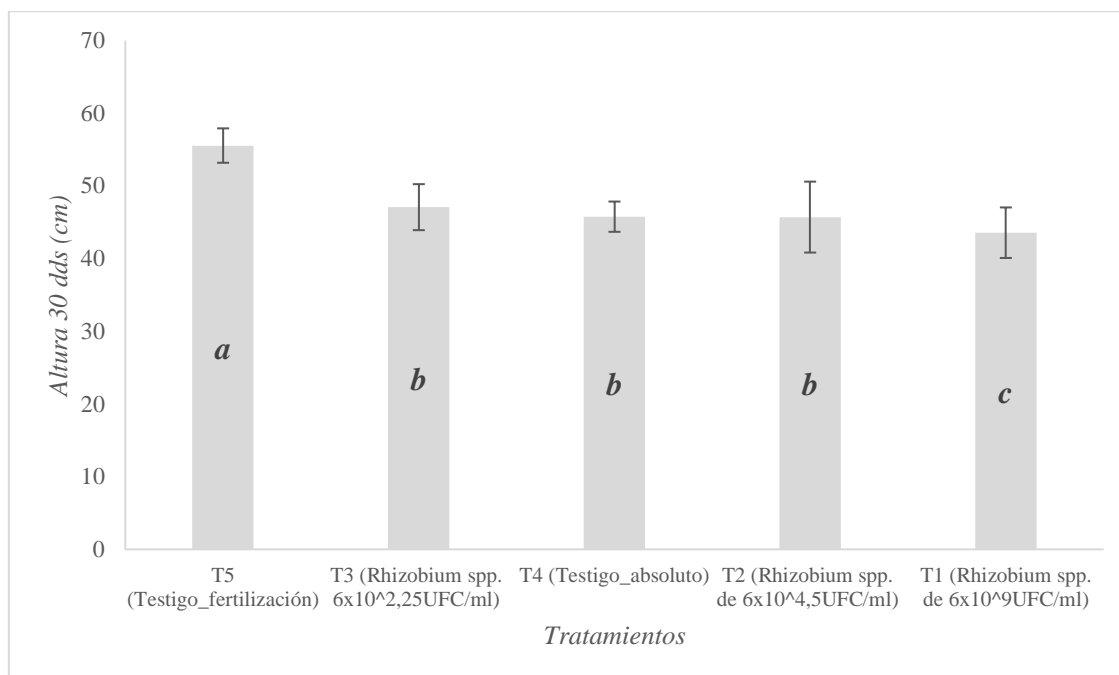
*Promedio (cm)* 47,536

*CV (%)* 6,798

El análisis de varianza de la variable altura de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a los 30 días de germinación muestra que existe diferencia significativa para los tratamientos en estudio ( $p = 0.0141$ ), indicando que las distintas condiciones aplicadas influyen en el crecimiento de la planta. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre bloques ( $p = 0.8399$ ), lo que sugiere que la variabilidad entre ellos no afecta significativamente la respuesta. El promedio de esta variable es de 47.536 cm de altura. El coeficiente de variación para esta variable es de 6.798 %, lo que indica una dispersión moderada de los datos respecto del valor promedio.

**Figura 8**

*Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% para la variable altura de planta de frijol (Phaseolus vulgaris L.) a los 30 días*



Al comparar por medio del test de Tukey al 5% la altura de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a los 30 días de germinación, podemos afirmar, que existen tres rangos de significancia. El tratamiento con mayor altura de planta es el T5 con fertilización y en un sustrato (50% tierra negra, 30% humus y 20% pomina), cuyo promedio fue de 55,55 cm de altura; el tratamiento que alcanzó menos altura es el T1 de la dosis alta con 43,56cm de altura en sustrato de pomina o cascajo.

Estos resultados concuerdan con el estudio realizado en el CNRA de la UNAN-León, donde la combinación de Micorrizas y *Rhizobium* favoreció el crecimiento del frijol, registrando los mayores valores en altura y otras variables morfológicas y productivas. Esto sugiere que la disponibilidad de nutrientes en el sustrato y la combinación adecuada de microorganismos son factores determinantes en el desarrollo del cultivo (Medina Flores et al., 2023).

La altura de la planta de frijol está influenciada tanto por el tipo de sustrato como por la fertilización y la dosis de *Rhizobium* spp. La mayor altura se obtuvo con un sustrato enriquecido y fertilización, mientras que la dosis alta de *Rhizobium*

spp. en un sustrato menos fértil redujo el crecimiento. Estos hallazgos resaltan la importancia de evaluar cuidadosamente la combinación de microorganismos y las condiciones del suelo para optimizar el desarrollo del frijol.

**Tabla 7**

*Análisis de varianza de la variable altura de planta de frijol (Phaseolus vulgaris L.) a los 45 días*

<i>Fuente</i>	<i>GL</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrados medios</i>	<i>F</i>	<i>Pr &gt; F</i>	<i>p-values signification codes</i>
<i>Modelo</i>	6	347,273	57,879	4,818	0,02266898	*
<i>Total corregido</i>	14	443,384				
<i>Tratamiento</i>	4	334,750	83,688	6,966	0,01017044	*
<i>Bloque</i>	2	12,523	6,261	0,521	0,61268251	°
<i>Error</i>	8	96,111	12,014			

Calculado contra el modelo  $Y = \text{Media}(Y)$

Signification codes:  $0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1$

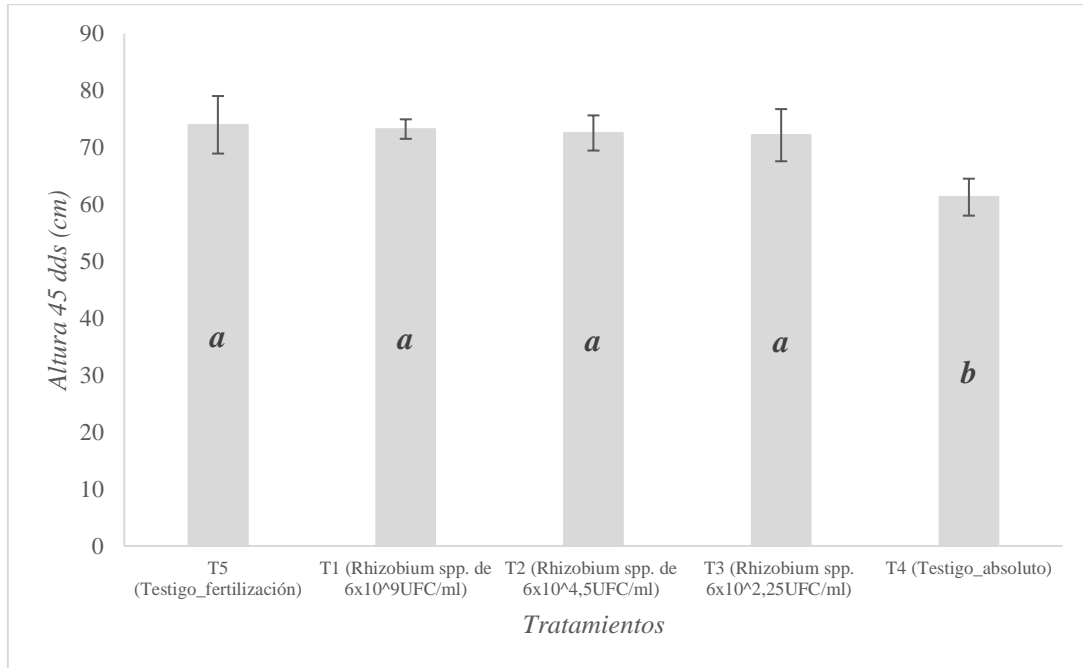
*Promedio (cm)* 70,629

*CV (%)* 4,907

El análisis de varianza de la variable altura de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a los 45 días de germinación muestra que existe diferencia significativa para los tratamientos en estudio ( $p = 0.0102$ ), lo que indica que las distintas condiciones aplicadas influyen en el crecimiento de la planta. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre bloques ( $p = 0.6127$ ), lo que sugiere que la variabilidad entre ellos no afecta significativamente la respuesta. El promedio de esta variable es de 70.629 cm de altura. El coeficiente de variación para esta variable es de 4.907 %, lo que indica una baja dispersión de los datos respecto del valor promedio.

**Figura 9**

*Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% para la variable altura de planta de frijol (Phaseolus vulgaris L.) a los 45 días*



Al comparar por medio del test de Tukey al 5% la altura de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a los 45 días de germinación, podemos afirmar, que existen tres rangos de significancia. El tratamiento con mayor altura de planta es el T5 con fertilización y en un sustrato (50% tierra negra, 30% humus y 20% pomina), cuyo promedio fue de 73,97 cm de altura; el tratamiento que alcanzó menos altura es el T4, testigo sin fertilización con 61,26cm de altura.

El estudio realizado en frijol, donde el tratamiento con *Trichoderma harzianum* mejoró la altura de las plantas al reducir la incidencia de marchitez vascular, se observa que el uso de microorganismos benéficos puede influir positivamente en el crecimiento. En este sentido, la inoculación con *Rhizobium* spp. también ha demostrado ser una estrategia eficaz para mejorar la absorción de nitrógeno y favorecer el desarrollo del frijol. No obstante, su efectividad depende de las condiciones del suelo y su interacción con otros factores, como la fertilización y la presencia de patógenos que puedan afectar la sanidad y crecimiento de las plantas (Campo Arana y Burgos Ayala, 2023).

La disponibilidad de nutrientes y la inoculación con microorganismos benéficos, como *Rhizobium* spp., influyen significativamente en la altura del frijol. Al igual que en el estudio comparado, donde el uso de *Trichoderma harzianum* mejoró el crecimiento, la adecuada combinación de fertilización y bioinoculantes puede optimizar el desarrollo del cultivo, siempre considerando las condiciones del suelo y otros factores ambientales.

**Tabla 8**

Análisis de varianza de la variable altura de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a los 60 días

<i>Fuente</i>	<i>GL</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrados medios</i>	<i>F</i>	<i>Pr &gt; F</i>	<i>p-values signification codes</i>
<i>Modelo</i>	6	560,351	93,392	12,712	0,00104038	**
<i>Total corregido</i>	14	619,124				
<i>Tratamiento</i>	4	558,830	139,707	19,017	0,00037882	***
<i>Bloque</i>	2	1,521	0,761	0,104	0,90281895	°
<i>Error</i>	8	58,772	7,347			

Calculado contra el modelo  $Y = \text{Media}(Y)$

Signification codes:  $0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1$

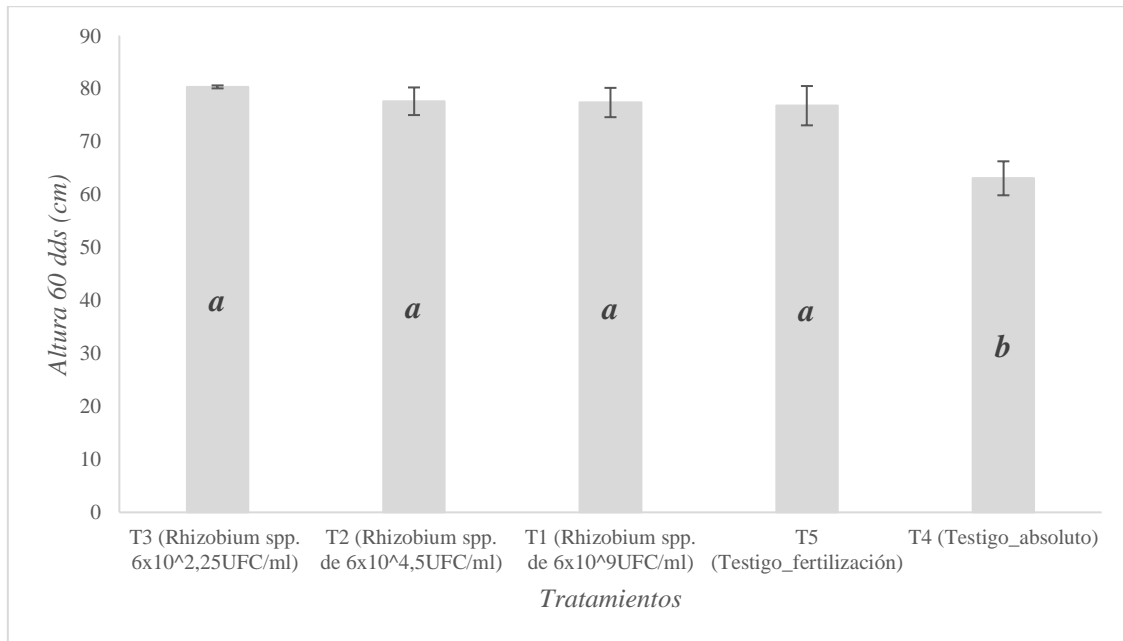
*Promedio (cm)* 75,018

*CV (%)* 3,613

El análisis de varianza de la variable altura de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a los 60 días de germinación muestra que existe diferencia altamente significativa para los tratamientos en estudio ( $p = 0.0004$ ), lo que indica que las diferentes condiciones aplicadas tienen un impacto significativo en el crecimiento de la planta. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre bloques ( $p = 0.9028$ ), lo que sugiere que la variabilidad entre ellos no afecta significativamente la respuesta. El promedio de esta variable es de 75.018 cm de altura. El coeficiente de variación para esta variable es de 3.613 %, lo que indica una baja dispersión de los datos respecto del valor promedio.

## Figura 10

Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% para la variable altura de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a los 60 días



Al comparar por medio del test de Tukey al 5% la altura de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a los 60 días de germinación, podemos afirmar, que existen tres rangos de significancia. El tratamiento con mayor altura de planta es el T3 con dosis baja de inoculación con cepa de *Rhizobium* spp. al 25% y en un sustrato de pomina que se considera un suelo inerte, cuyo promedio fue de 80,31 cm de altura; el tratamiento que alcanzó menos altura es el T4, testigo sin fertilización en un sustrato (50% tierra negra, 30% humus y 20% pomina) con 63,05cm de altura.

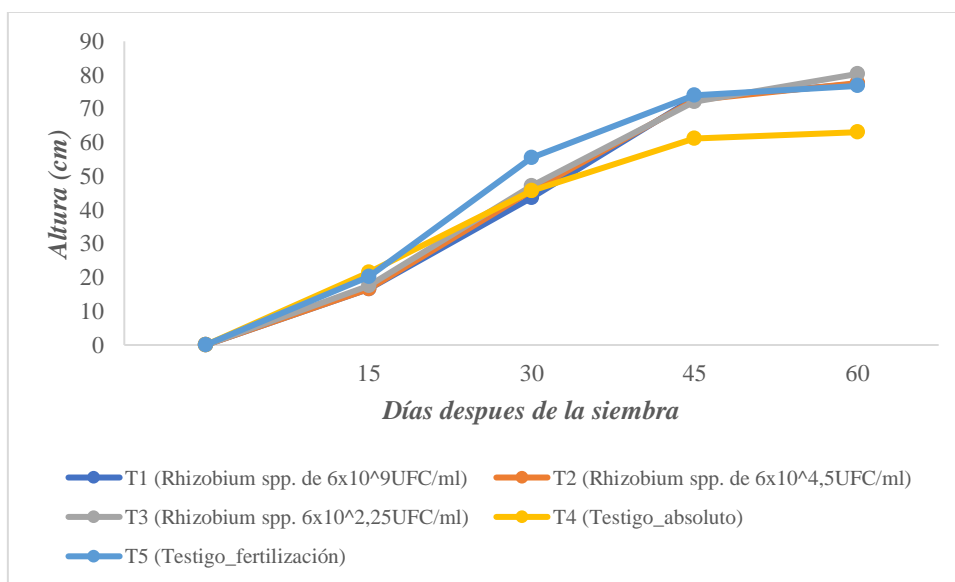
En estudios realizados, muestran que la cepa de *Rhizobium E-10* mostró una interacción altamente significativa en la nodulación y crecimiento del frijol en un suelo con disponibilidad de nutrientes. Estas diferencias sugieren que el efecto del *Rhizobium* spp. depende no solo de la cepa utilizada, sino también del tipo de suelo y la variedad del frijol, lo que resalta la importancia de considerar estos factores en futuras investigaciones (Escudero Acebedo, 2017).

Ambos estudios confirman la relevancia de la fijación biológica de nitrógeno mediante la inoculación con *Rhizobium* spp. en el crecimiento del frijol. Sin embargo, los resultados obtenidos indican que el impacto de la inoculación varía según el tipo de suelo y la cepa utilizada, siendo necesario profundizar en la evaluación de la biomasa, la

nodulación y la eficiencia en la absorción de nutrientes para optimizar el uso de estos microorganismos en la agricultura sostenible.

### Figura 11

Comparación múltiple de promedios Tukey al 5% de la variable altura de planta en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) durante los 60 días.



Los datos muestran la altura de las plantas en diferentes tratamientos a lo largo del tiempo (15, 30, 45 y 60 días). Se observa que los tratamientos con *Rhizobium* spp. (T1, T2 y T3) presentan un crecimiento relativamente similar, con alturas finales entre 77,36 cm y 80,31 cm. El tratamiento con la menor concentración de *Rhizobium* spp. (T3) alcanzó la mayor altura final (80,31 cm). El testigo absoluto (T4), sin inoculación ni fertilización, mostró el menor crecimiento, alcanzando solo 63,06 cm. En contraste, el testigo con fertilización química (T5) tuvo un desarrollo comparable a los tratamientos con *Rhizobium* spp., con una altura final de 76,76 cm (Campo Arana & Burgos Ayala, 2023).

Los resultados sugieren que la inoculación con *Rhizobium* spp. favorece el crecimiento de las plantas en comparación con el testigo absoluto, lo que resalta el papel de estos microorganismos en la fijación biológica de nitrógeno. Sin embargo, el efecto del *Rhizobium* spp. no supera significativamente la fertilización sintética (T5), lo que indica que ambos métodos pueden ser efectivos para promover el crecimiento vegetal. Es interesante notar que la concentración más baja de *Rhizobium* spp. (T3) presentó la mayor

altura final, lo que podría indicar que una menor concentración favorece una mejor simbiosis o evita posibles efectos de competencia entre bacterias.

### 5.5. Análisis de varianza de la variable medición de clorofila

**Tabla 9**

*Análisis de varianza de la variable medición de clorofila en unidades SPAD de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a los 15 días*

<i>Fuente</i>	<i>GL</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrados medios</i>	<i>F</i>	<i>Pr &gt; F</i>	<i>p-values signification codes</i>
<i>Modelo</i>	6	49,985	8,331	10,238	0,00218008	**
<i>Total corregido</i>	14	56,495				
<i>Tratamiento</i>	4	48,487	12,122	14,897	0,00088848	***
<i>Bloque</i>	2	1,498	0,749	0,921	0,4367099	°
<i>Error</i>	8	6,510	0,814			

Calculado contra el modelo  $Y = \text{Media}(Y)$

Signification codes: 0 < \*\*\* < 0.001 < \*\* < 0.01 < \* < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1

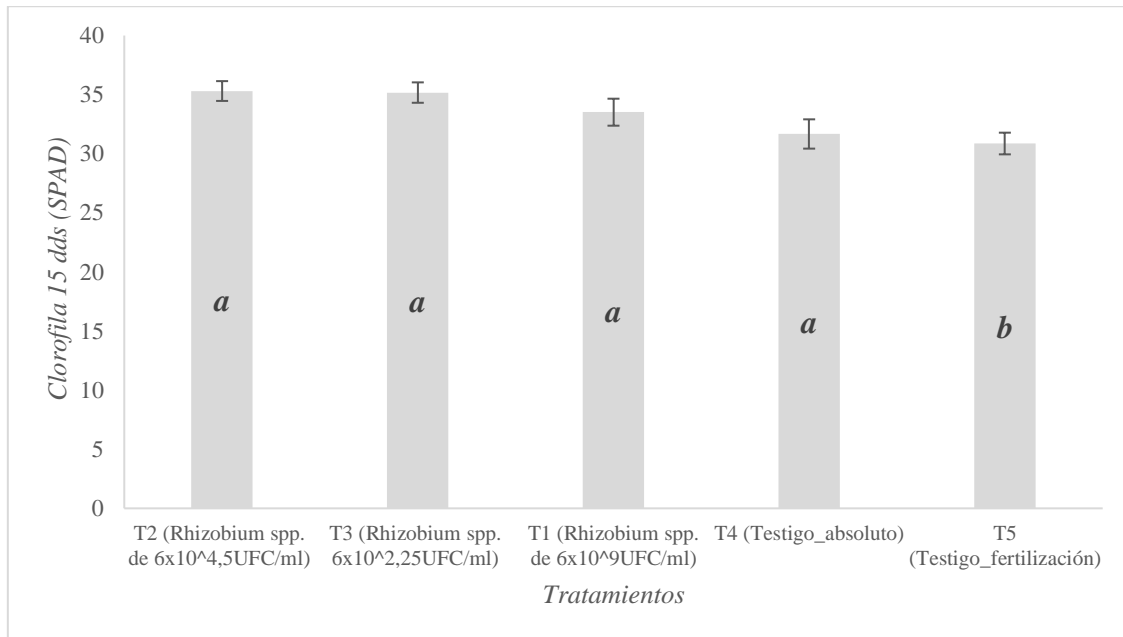
*Promedio (SPAD)* 33,308

*CV (%)* 2,708

El análisis de varianza de la variable medición de clorofila en unidades SPAD de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a los 15 días de germinación muestra que existe diferencia altamente significativa para los tratamientos en estudio ( $p = 0.0009$ ), lo que indica que las diferentes condiciones aplicadas afectan significativamente el contenido de clorofila en las hojas. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre bloques ( $p = 0.4367$ ), lo que sugiere que la variabilidad entre ellos no tiene un efecto relevante sobre la respuesta. El promedio de esta variable es de 33.308 unidades SPAD. El coeficiente de variación para esta variable es de 2.708 %, lo que indica una baja dispersión de los datos respecto del valor promedio.

**Figura 12**

*Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% para la variable SPAD de planta de frijol (Phaseolus vulgaris L.) a los 15 días*



Al comparar por medio del test de Tukey al 5% el SPAD de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a los 15 días de germinación, podemos afirmar, que existen tres rangos de significancia. El tratamiento con mayor clorofila SPAD es el T2 con dosis media de inoculación con cepa de *Rhizobium* spp. al 50% y en un sustrato de pomina que se considera un suelo inerte, cuyo promedio fue de 35,307 SPAD; el tratamiento que alcanzó menos clorofila SPAD es el T5, testigo con fertilización en un sustrato (50% tierra negra, 30% humus y 20% pomina) con 30,86 SPAD.

En el estudio realizado, se evaluaron diferentes niveles de fertilización nitrogenada en el frijol, encontrando que los tratamientos con mayor rendimiento agronómico fueron aquellos con aplicación de nitrógeno (T2 y T1) (León de la Rocha et al., 2023). Sin embargo, este estudio también consideró otras variables, mostrando que la respuesta del frijol depende no solo de la disponibilidad de nitrógeno, sino también de factores climáticos y edafológicos

La comparación resalta cómo el origen genético y el ambiente influyen en la respuesta del frijol al nitrógeno. Mientras la fertilización química aumentó la biomasa, la inoculación con *Rhizobium* spp. en sustrato inerte mejoró la asimilación de nitrógeno,

reflejada en el SPAD. Esto sugiere que la fijación biológica es una alternativa sostenible para suelos pobres en nutrientes.

**Tabla 10**

*Análisis de varianza de la variable SPAD de planta de frijol (Phaseolus vulgaris L.) a los 30 días*

<i>Fuente</i>	<i>GL</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrados medios</i>	<i>F</i>	<i>Pr &gt; F</i>	<i>p-values signification codes</i>
<i>Modelo</i>	6	34,358	5,726	2,282	0,13897249	°
<i>Total corregido</i>	14	54,437				
<i>Tratamiento</i>	4	32,680	8,170	3,255	0,07295933	.
<i>Bloque</i>	2	1,678	0,839	0,334	0,72537918	°
<i>Error</i>	8	20,079	2,510			

Calculado contra el modelo  $Y = \text{Media}(Y)$

Signification codes: 0 < \*\*\* < 0.001 < \*\* < 0.01 < \* < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1

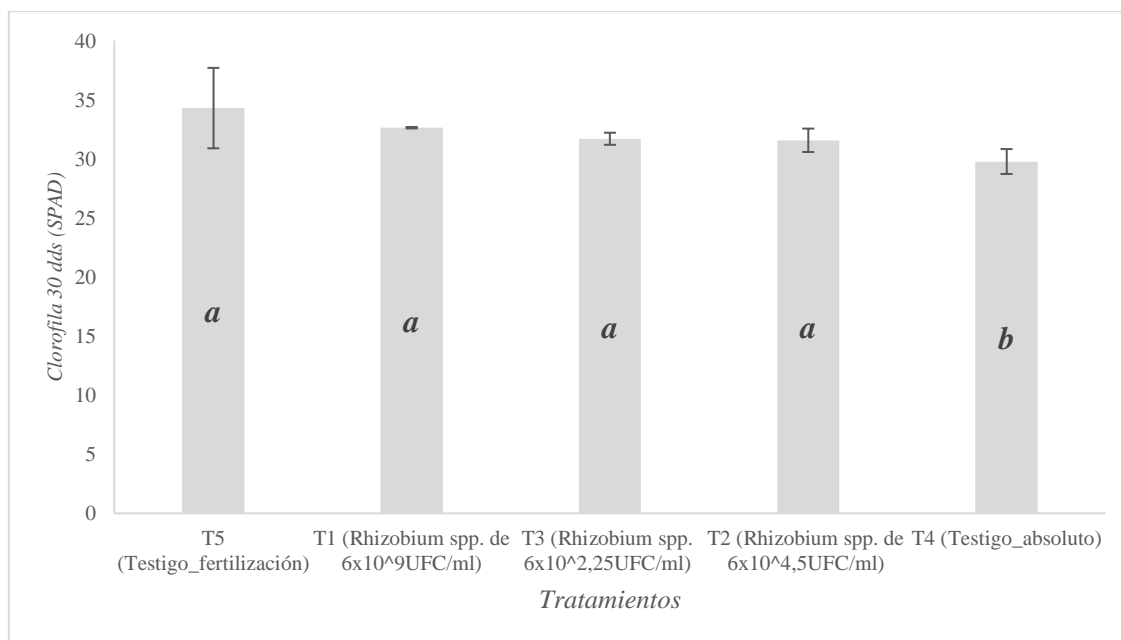
*Promedio (SPAD)* 31,987

*CV (%)* 4,953

El análisis de varianza de la variable SPAD de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a los 30 días de germinación indica que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p = 0.073$ ), aunque existe una tendencia a la significancia. Asimismo, no se hallaron diferencias significativas entre bloques ( $p = 0.7254$ ), lo que sugiere que la variabilidad entre ellos no influye en la respuesta observada. El promedio de esta variable es de 31.987 unidades SPAD. El coeficiente de variación para esta variable es de 4.953 %, lo que indica una variabilidad moderada de los datos respecto del valor promedio.

### Figura 113

Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% para la variable SPAD de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a los 30 días



Al comparar por medio del test de Tukey al 5% el SPAD de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a los 30 días de germinación, podemos afirmar, que existen tres rangos de significancia. El tratamiento con mayor contenido de clorofila SPAD es el T5 con fertilización, en un sustrato de (50% tierra negra, 30% humus y 20% pomina), cuyo promedio fue de 34,28 unidades SPAD; el tratamiento que alcanzó menor contenido de clorofila en unidades SPAD es el T4, testigo sin fertilización en un sustrato (50% tierra negra, 30% humus y 20% pomina) con 29,76 SPAD.

Esto coincide con el estudio sobre la aplicación de quelatos de hierro, donde los tratamientos con EDDHA-Fe y FeSO<sub>4</sub> lograron aumentar el contenido de clorofila en unidades SPAD en frijol, superando al testigo sin hierro adicional. Aunque el enfoque de ambos estudios es distinto, los resultados sugieren que la disponibilidad de nutrientes es clave para la síntesis de clorofila, ya sea a través de una fertilización completa o de la corrección específica de la deficiencia de hierro en suelos alcalinos (Diaz et al., 2018).

Los resultados obtenidos confirman que la fertilización adecuada mejora la producción de clorofila en frijol, reflejado en un mayor índice SPAD. Si bien el estudio no evaluó directamente la disponibilidad de hierro, los datos sugieren que un sustrato enriquecido con materia orgánica puede prevenir deficiencias nutricionales, incluyendo

el hierro. En suelos con problemas de clorosis férrica, la aplicación de EDDHA-Fe y FeSO<sub>4</sub> se presenta como una estrategia efectiva para mantener niveles óptimos de clorofila, tal como se observó en el otro estudio analizado.

**Tabla 11**

*Análisis de varianza de la variable SPAD de planta de frijol (Phaseolus vulgaris L.) a los 45 días*

<i>Fuente</i>	<i>GL</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrados medios</i>	<i>F</i>	<i>Pr &gt; F</i>	<i>p-values signification codes</i>
<i>Modelo</i>	6	197,418	32,903	18,894	0,00025416	***
<i>Total corregido</i>	14	211,349				
<i>Tratamiento</i>	4	188,905	47,226	27,119	0,00010516	***
<i>Bloque</i>	2	8,513	4,256	2,444	0,14845237	°
<i>Error</i>	8	13,932	1,741			

Calculado contra el modelo  $Y = \text{Media}(Y)$

Signification codes: 0 < \*\*\* < 0.001 < \*\* < 0.01 < \* < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1

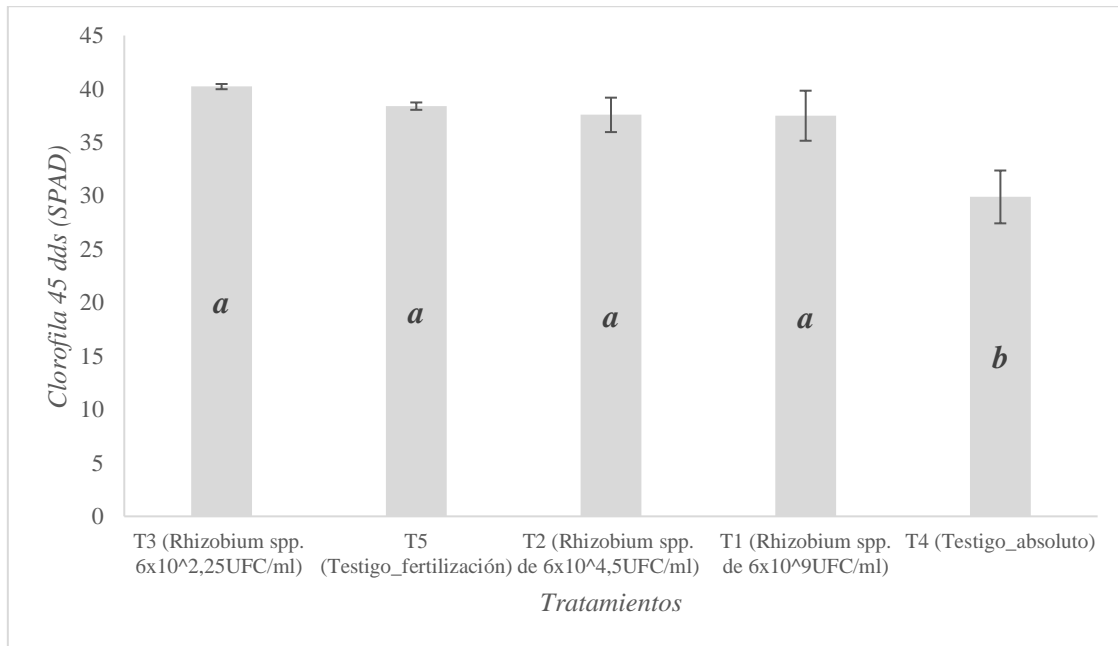
*Promedio (SPAD)* 36,717

*CV (%)* 3,594

El análisis de varianza de la variable contenido de clorofila en unidades SPAD de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a los 45 días de germinación muestra una diferencia altamente significativa entre los tratamientos en estudio ( $p = 0.00010516$ ), lo que indica que estos influyen de manera notable en la variable medida. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre bloques ( $p = 0.1485$ ), lo que sugiere que la variabilidad entre ellos no afecta significativamente los resultados. El promedio de esta variable es de 36.717 unidades SPAD. El coeficiente de variación es de 3.594 %, lo que indica una baja dispersión de los datos respecto al valor promedio.

**Figura 14**

*Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% para la variable SPAD de planta de frijol (Phaseolus vulgaris L.) a los 45 días*



Al comparar por medio del test de Tukey al 5% el contenido de clorofila en unidades SPAD en las plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a los 45 días de germinación, podemos afirmar, que existen tres rangos de significancia. El tratamiento con mayor contenido de clorofila en unidades SPAD es el T3 con dosis de cepa de *Rhizobium* spp. al 25% en sustrato de pomina, cuyo promedio fue de 40,223 unidades SPAD; el tratamiento que alcanzó menor contenido de clorofila en unidades SPAD es el T4, testigo sin fertilización en un sustrato (50% tierra negra, 30% humus y 20% pomina) con un contenido en clorofila de 29,89 en unidades SPAD.

la fijación biológica de nitrógeno por *Rhizobium* spp. tuvo un efecto positivo en la disponibilidad de nitrógeno para la planta, favoreciendo la síntesis de clorofila. Comparando con el estudio sobre sorgo, donde se evidenció que el contenido de clorofila en unidades SPAD aumentó con la fertilización nitrogenada y estuvo altamente correlacionado con el rendimiento, se observa que la disponibilidad de nitrógeno es un factor determinante en la acumulación de clorofila en distintos cultivos. Sin embargo, mientras en sorgo la mayor eficiencia se logró con 192 kg N ha<sup>-1</sup>, en frijol la inoculación con *Rhizobium* spp. permitió mejorar el contenido de clorofila en unidades SPAD sin

necesidad de aplicar nitrógeno sintético, lo que sugiere un mecanismo eficiente de absorción y asimilación del nutriente a través de la simbiosis (Macías Duarte et al., 2021).

Los resultados indican que la fijación biológica de nitrógeno con *Rhizobium* spp. puede ser una alternativa viable para mejorar la nutrición nitrogenada en frijol, reflejada en el aumento del índice en el contenido de clorofila en unidades SPAD. En comparación con el sorgo, donde la fertilización con nitrógeno mineral mejoró el contenido de clorofila en unidades SPAD y el rendimiento, en frijol se logró un incremento significativo del contenido de clorofila en unidades SPAD con la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno. Esto resalta la importancia de estrategias sostenibles que optimicen la disponibilidad de nitrógeno en cultivos sin depender exclusivamente de fertilizantes sintéticos.

**Tabla 12**

*Análisis de varianza de la variable SPAD de planta de frijol (Phaseolus vulgaris L.) a los 60 días*

<i>Fuente</i>	<i>GL</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrados medios</i>	<i>F</i>	<i>Pr &gt; F</i>	<i>p-values signification codes</i>
<i>Modelo</i>	6	408,801	68,134	83,545	8,9058E-07	***
<i>Total corregido</i>	14	415,326				
<i>Tratamiento</i>	4	399,062	99,766	122,332	3,3047E-07	***
<i>Bloque</i>	2	9,739	4,869	5,971	0,02590018	*
<i>Error</i>	8	6,524	0,816			

Calculado contra el modelo  $Y = \text{Media}(Y)$

Signification codes:  $0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < . < 0.1 < ^\circ < 1$

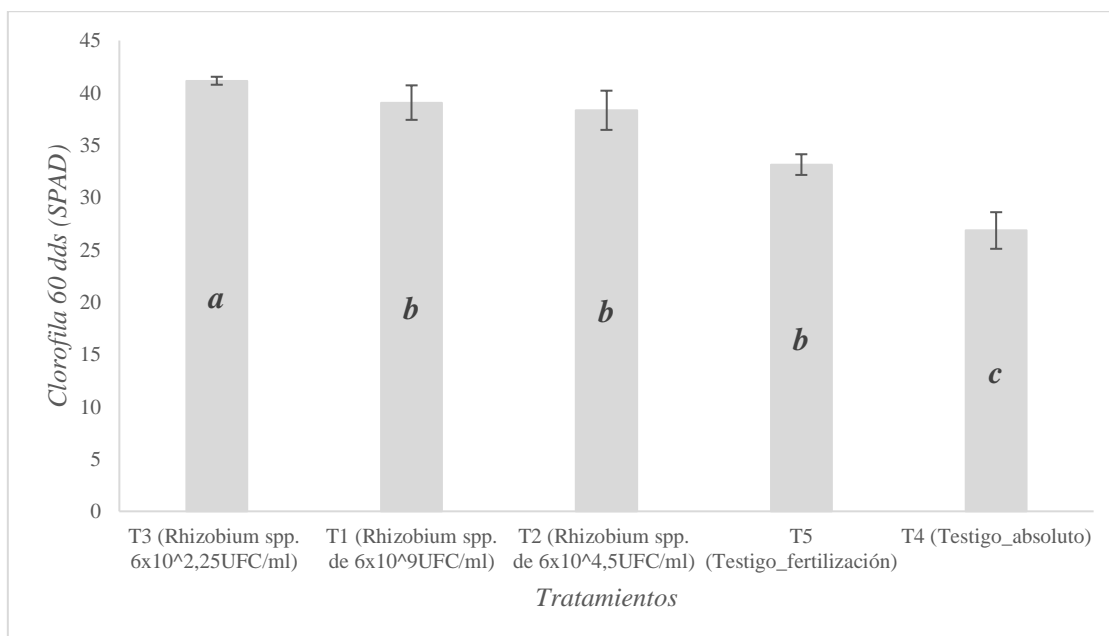
*Promedio (SPAD)* 35,709

*CV (%)* 2,529

El análisis de varianza de la variable contenido de clorofila en unidades SPAD de las plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a los 60 días de germinación muestra diferencias altamente significativas tanto para los tratamientos ( $p = 3.3047E-07$ ), como para los bloques ( $p = 0.0259$ ). Esto indica que tanto los tratamientos aplicados como las variaciones entre los bloques tienen un impacto considerable en el contenido de clorofila en las plantas. El promedio de esta variable es de 35.709 unidades SPAD de contenido de clorofila. El coeficiente de variación es de 2.529 %, lo que sugiere una baja dispersión de los datos con respecto al valor promedio.

**Figura 15**

*Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% para la variable SPAD de planta de frijol (Phaseolus vulgaris L.) a los 60 días*



Al comparar por medio del test de Tukey al 5% el contenido de clorofila en unidades SPAD de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a los 60 días de germinación, podemos afirmar, que existen tres rangos de significancia. El tratamiento con mayor contenido de clorofila SPAD es T3 con dosis de cepa de *Rhizobium* spp. al 25% en sustrato de pomina, cuyo promedio fue de 41,15 unidades SPAD Enel contenido de clorofila; el tratamiento que alcanzó menor contenido de clorofila en unidades SPAD es el T4, testigo sin fertilización en un sustrato (50% tierra negra, 30% humus y 20% pomina) con 26,84 SPAD.

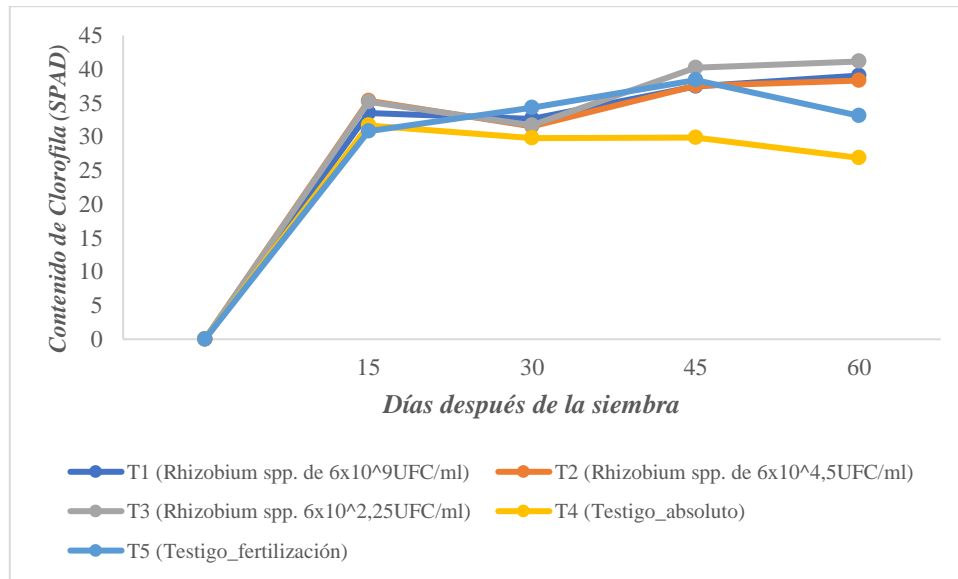
Los resultados muestran que la inoculación con *Rhizobium* spp. al 25% en sustrato de pomina favoreció una mayor asimilación de nitrógeno, reflejada en el índice del contenido de clorofila en unidades SPAD. Esto sugiere que la fijación biológica de nitrógeno puede ser una alternativa eficiente frente a la fertilización química. En comparación, el estudio en papa evidencia que el índice del contenido de clorofila en unidades SPAD varía según la dosis de N, la posición de la hoja y el riego, lo que indica que este parámetro puede ser influenciado por múltiples factores. La diferencia entre ambos estudios resalta la importancia de un manejo adecuado de la fertilización y la

necesidad de establecer protocolos estandarizados para la medición del contenido de clorofila en unidades SPAD (Silva et al., 2011).

La inoculación con *Rhizobium* spp. demostró ser una estrategia efectiva para mejorar la asimilación de nitrógeno en frijol, reflejada en un mayor índice del contenido de clorofila en unidades SPAD. En suelos con baja disponibilidad de nutrientes, la fijación biológica de nitrógeno puede ser una alternativa sostenible para optimizar el crecimiento del cultivo. Además, la variabilidad en las lecturas del contenido de clorofila en unidades SPAD según el estudio en papa subraya la importancia de considerar factores como el tiempo de medición y la humedad del suelo para obtener datos más precisos.

**Figura 16**

Comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% para la variable contenido de clorofila en planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)



Los valores de SPAD (indicador del contenido de clorofila) muestran diferencias entre los tratamientos a lo largo del tiempo. En general, los tratamientos con *Rhizobium* spp. (T1, T2 y T3) presentaron valores de SPAD más altos en comparación con el testigo absoluto (T4), lo que indica una mejor eficiencia en la síntesis de clorofila. Entre estos, T3 (*Rhizobium* spp. en menor concentración) mostró los valores más altos de SPAD al final del experimento (41,16). El testigo absoluto (T4) tuvo los valores más bajos en todas las mediciones, con una disminución progresiva en el tiempo, alcanzando 26,84 en el día 60. Por otro lado, el testigo con fertilización química (T5) mostró valores intermedios, con una tendencia variable y una disminución en la fase final (Macías Duarte et al., 2021).

Los resultados sugieren que la inoculación con *Rhizobium* spp. contribuye a mejorar el contenido de clorofila en las plantas, posiblemente debido a su papel en la fijación biológica de nitrógeno, un nutriente clave para la síntesis de clorofila. El tratamiento con la menor concentración de *Rhizobium* spp. (T3) presentó los valores más altos de SPAD en la fase final, lo que podría indicar que una menor densidad bacteriana optimiza la simbiosis sin generar competencia entre microorganismos. El testigo absoluto (T4) mostró una marcada reducción en los valores de SPAD, lo que sugiere deficiencia nutricional. Aunque el testigo con fertilización química (T5) tuvo valores relativamente altos, su tendencia a la disminución sugiere que la fertilización química puede no sostener

la síntesis de clorofila de manera tan eficiente como la inoculación biológica. Estos hallazgos refuerzan la importancia del *Rhizobium* spp. en la nutrición vegetal y su potencial como alternativa sostenible a la fertilización química.

## 5.6. Análisis de varianza de la variable días a la floración

**Tabla 13**

*Análisis de varianza de la variable días a la floración de planta de frijol (Phaseolus vulgaris L.)*

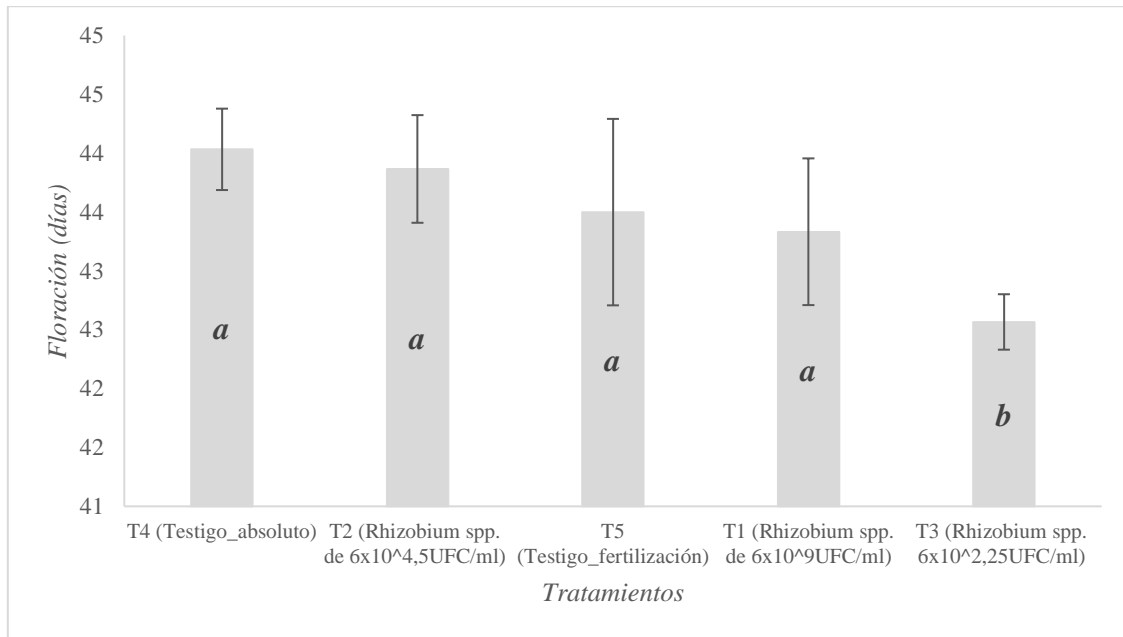
<i>Fuente</i>	<i>GL</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrados medios</i>	<i>F</i>	<i>Pr &gt; F</i>	<i>p-values signification codes</i>
<i>Modelo</i>	6	4,845	0,808	5,084	0,01946171	*
<i>Total corregido</i>	14	6,116				
<i>Tratamiento</i>	4	3,929	0,982	6,185	0,01434221	*
<i>Bloque</i>	2	0,916	0,458	2,884	0,11402398	°
<i>Error</i>	8	1,271	0,159			

Calculado contra el modelo  $Y = \text{Media}(Y)$   
 Signification codes:  $0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1$   
*Promedio (días)* 43,460  
*CV (%)* 0,917

El análisis de varianza de la variable días a la floración del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) muestra una diferencia significativa para los tratamientos ( $p = 0.0143$ ), lo que indica que los tratamientos aplicados influyen de manera notable en el tiempo que tarda en florecer la planta. Sin embargo, no se observó una diferencia significativa para los bloques ( $p = 0.1140$ ), lo que sugiere que las variaciones entre ellos no tienen un impacto relevante en esta variable. El promedio de días a la floración es de 43.460 días. El coeficiente de variación es de 0.917 %, lo que indica una baja dispersión de los datos respecto al valor promedio.

## Figura 17

Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% para la variable días a la floración de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)



Al comparar por medio del test de Tukey al 5% de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a los distintos días de floración, podemos afirmar, que existen dos rangos de significancia. El tratamiento que requiere mayor tiempo para el inicio de la floración, es el T4 que es el tratamiento sin fertilización en un sustrato (50% tierra negra, 30% humus y 20% pomina), cuyo promedio fue de 44 días; el tratamiento que alcanzó menos días al inicio de la floración es el T3, inoculado con dosis de baja de cepa de *Rhizobium* spp. al 25% con 42 días.

Esto sugiere que la fijación biológica de nitrógeno puede acelerar el desarrollo fenológico del frijol, posiblemente al mejorar la disponibilidad de N en las primeras etapas del cultivo. En comparación, el estudio sobre frijol ayocote mostró que los días a la floración y la madurez estuvieron influenciados por factores ambientales como la altitud y la temperatura. Esta variabilidad fenológica resalta la importancia del origen genético y las condiciones de crecimiento en la duración del ciclo del cultivo (Vargas Vázquez et al., 2018).

La inoculación con *Rhizobium* spp. redujo el tiempo para el inicio de la floración del frijol, lo que indica un efecto positivo en su desarrollo. Sin embargo, la respuesta fenológica del cultivo depende tanto de la disponibilidad de nutrientes como de factores

ambientales. Los resultados del estudio en frijol ayocote refuerzan la idea de que el clima y la geografía influyen significativamente en la duración del ciclo de vida del frijol, lo que sugiere la necesidad de considerar estos factores al diseñar estrategias de manejo agronómico.

### 5.7. Análisis de varianza de la variable días a la formación de vaina

**Tabla 14**

*Análisis de varianza de la variable días a la formación de vaina de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)*

<i>Fuente</i>	<i>GL</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrados medios</i>	<i>F</i>	<i>Pr &gt; F</i>	<i>p-values signification codes</i>
<i>Modelo</i>	6	8,136	1,356	2,945	0,08012687	.
<i>Total corregido</i>	14	11,820				
<i>Tratamiento</i>	4	7,620	1,905	4,137	0,0416992	*
<i>Bloque</i>	2	0,516	0,258	0,560	0,59194496	°
<i>Error</i>	8	3,684	0,460			

Calculado contra el modelo  $Y = \text{Media}(Y)$

Signification codes: 0 < \*\*\* < 0.001 < \*\* < 0.01 < \* < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1

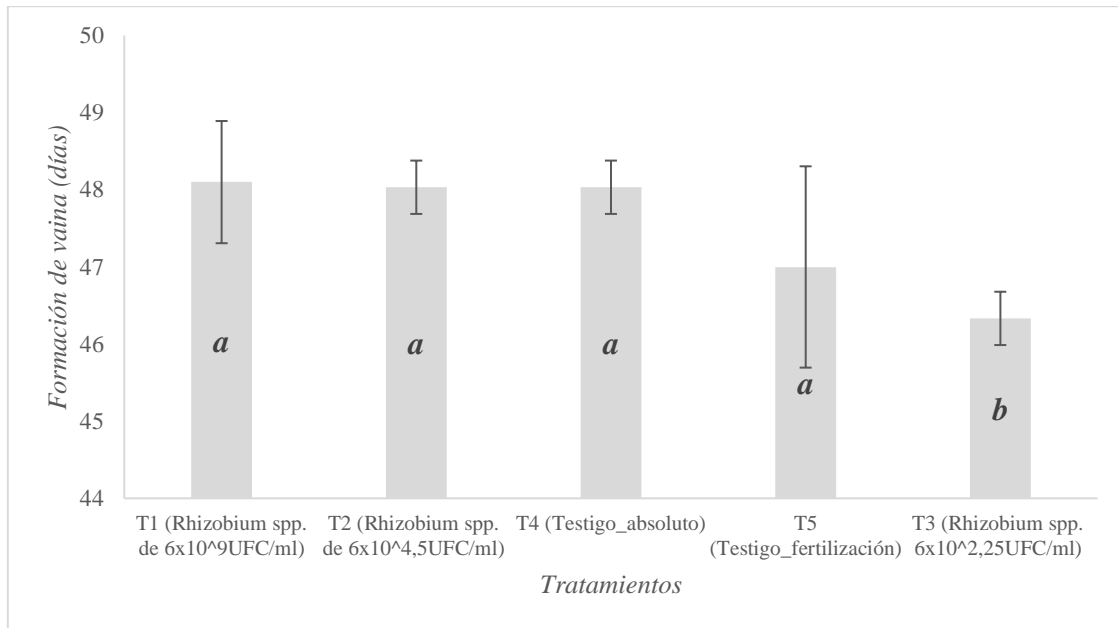
*Promedio (días)* 47,500

*CV (%)* 1,429

El análisis de varianza de la variable días a la formación de vaina de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) muestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados ( $p = 0,0417$ ), lo que indica que las distintas condiciones de tratamiento influyen en el tiempo necesario para la formación de la vaina. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas para los bloques ( $p = 0,5919$ ), sugiriendo que la variabilidad entre bloques no tiene un impacto importante en esta variable. El promedio de días a la formación de vaina es de 47,5 días. El coeficiente de variación para esta variable es de 1,429 %, lo que indica una baja dispersión de los datos con respecto al valor promedio, mostrando consistencia en los resultados obtenidos.

## Figura 18

Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% para la variable días a la formación de vaina de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)



Al comparar por medio del test de Tukey al 5% los días a la formación de la vaina en la planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), podemos afirmar, que existen dos rangos de significancia. El tratamiento con mayor tiempo para el inicio de la formación de vaina, es el T1 con dosis alta de cepa de *Rhizobium* spp. al 100%, en un sustrato inerte de pomina, cuyo promedio fue de 48 días; el tratamiento que necesitó menor tiempo para la formación de la vaina fue T3, la inoculado con dosis baja de una cepa de *Rhizobium* spp. al 25% con un promedio de 46 días.

Los resultados muestran que la dosis alta de *Rhizobium* spp. al 100% en sustrato de pomina prolongó el tiempo de formación de vainas (48 días), mientras que la dosis baja al 25% aceleró este proceso (46 días). Esto podría deberse a la mayor disponibilidad de nitrógeno fijado biológicamente, prolongando la fase vegetativa en T1. En estudios realizados, donde la forma silvestre del frijol presentó un ciclo más largo debido a su mayor duración del área foliar, se puede inferir que la nutrición nitrogenada influye en la precocidad fenológica, como se observó en T3 con una transición más rápida a la fase reproductiva (Flores de la Cruz et al., 2018)

La aplicación de diferentes dosis de *Rhizobium* spp. influyó en el tiempo de formación de vainas del frijol, demostrando que dosis altas pueden extender la fase vegetativa, mientras que dosis bajas favorecen una transición más temprana.

### 5.8. Análisis de varianza de la variable número de nódulos

**Tabla 15** Análisis de varianza de la variable nódulos de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a los 60 días

<i>Fuente</i>	<i>GL</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrados medios</i>	<i>F</i>	<i>Pr &gt; F</i>	<i>p-values signification codes</i>
<i>Modelo</i>	6	85982,200	14330,367	315,835	4,6533E-09	***
<i>Total corregido</i>	14	86345,183				
<i>Tratamiento</i>	4	85751,267	21437,817	472,480	1,5731E-09	***
<i>Bloque</i>	2	230,933	115,467	2,545	0,13952264	°
<i>Error</i>	8	362,983	45,373			

Calculado contra el modelo  $Y = \text{Media}(Y)$

Signification codes:  $0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1$

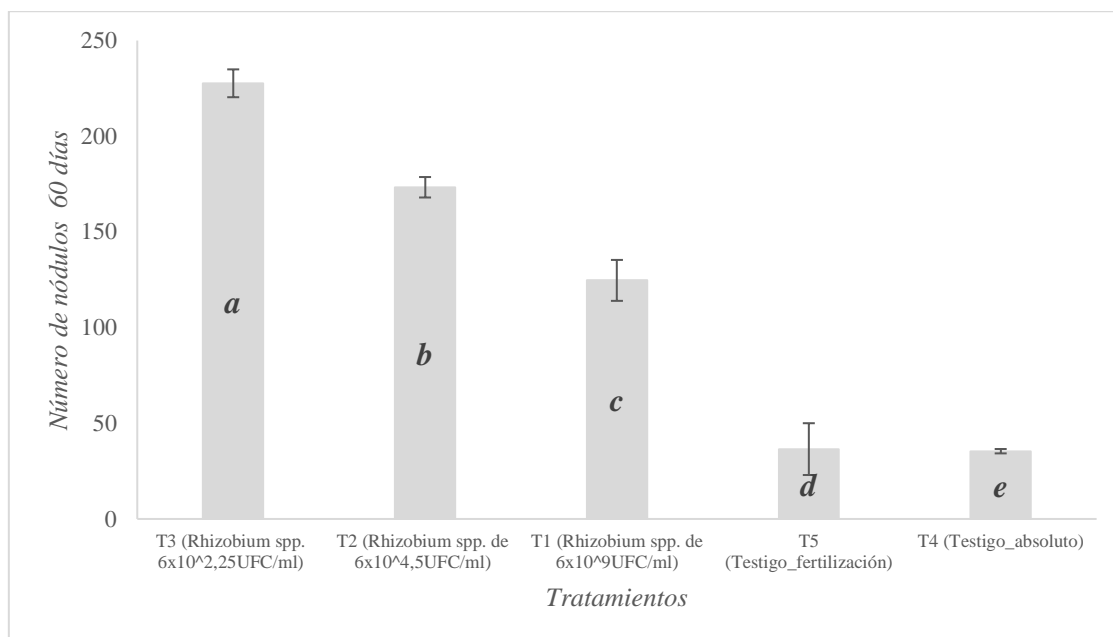
*Promedio (#nod)* 119,517

*CV (%)* 5,636

El análisis de varianza de la variable nódulos de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a los 60 días muestra una diferencia altamente significativa entre los tratamientos ( $p = 1,5731E-09$ ), lo que indica que las distintas dosis o condiciones de tratamiento influyen considerablemente en la cantidad de nódulos formados. No se encontraron diferencias significativas para los bloques ( $p = 0,1395$ ), sugiriendo que la variabilidad entre bloques no afecta de manera relevante a esta variable. El promedio de nódulos es de 119,517 por planta. El coeficiente de variación para esta variable es de 5,636 %, lo que indica una dispersión moderada de los datos con respecto al valor promedio.

**Figura 19**

Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% para la variable nódulos de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a los 60 días



Al comparar por medio del test de Tukey al 5% de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en el número de nódulos a los 60 días, podemos afirmar, que existen cinco rangos de significancia. El tratamiento con mayor cantidad de nódulos, es el T3 inoculado con dosis baja de cepa de *Rhizobium* spp. al 25%, en un sustrato de pomina, cuyo promedio fue de 227 nódulos; el tratamiento que alcanzó menor cantidad de nódulos en las raíces de frijol es el T4, el tratamiento sin fertilización en un sustrato (50% tierra negra, 30% humus y 20% pomina) con 35 nódulos.

Estos resultados coinciden con estudios previos que han demostrado la influencia de la inoculación con *Rhizobium* spp. sobre la nodulación en frijol. En particular, investigaciones han reportado que la aplicación de *Rhizobium* favorece la formación de nódulos en comparación con la combinación de *Rhizobium* spp. y fertilización mineral. Esto sugiere un posible efecto supresor del fertilizante sobre la nodulación, ya que el tratamiento sin fertilización en algunos estudios ha presentado un número superior de nódulos en comparación con plantas sometidas a fertilización mineral (Cabrera Romero et al., 2017).

Además, se puede inferir que la interacción entre el *Rhizobium* spp. inoculado y las cepas nativas presentes en el sustrato no afectó negativamente la nodulación, lo que

refuerza la importancia de seleccionar adecuadamente la cepa y la dosis de inoculación para optimizar la fijación biológica de nitrógeno. La mayor nodulación observada en T3 sugiere que la dosis baja de *Rhizobium* spp. permitió una simbiosis efectiva, lo que puede estar asociado a una menor competencia entre bacterias y a condiciones óptimas del sustrato de pomina para la formación de nódulos.

La aplicación de *Rhizobium* spp. en dosis adecuadas y en sustratos específicos puede potenciar la nodulación en frijol, lo que representa una estrategia viable para mejorar la fijación biológica de nitrógeno y, en consecuencia, la salud del cultivo sin recurrir a fertilización mineral.

## 5.9. Análisis de varianza de la variable masa foliar

**Tabla 16**

Análisis de varianza de la variable masa foliar de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a los 60 días

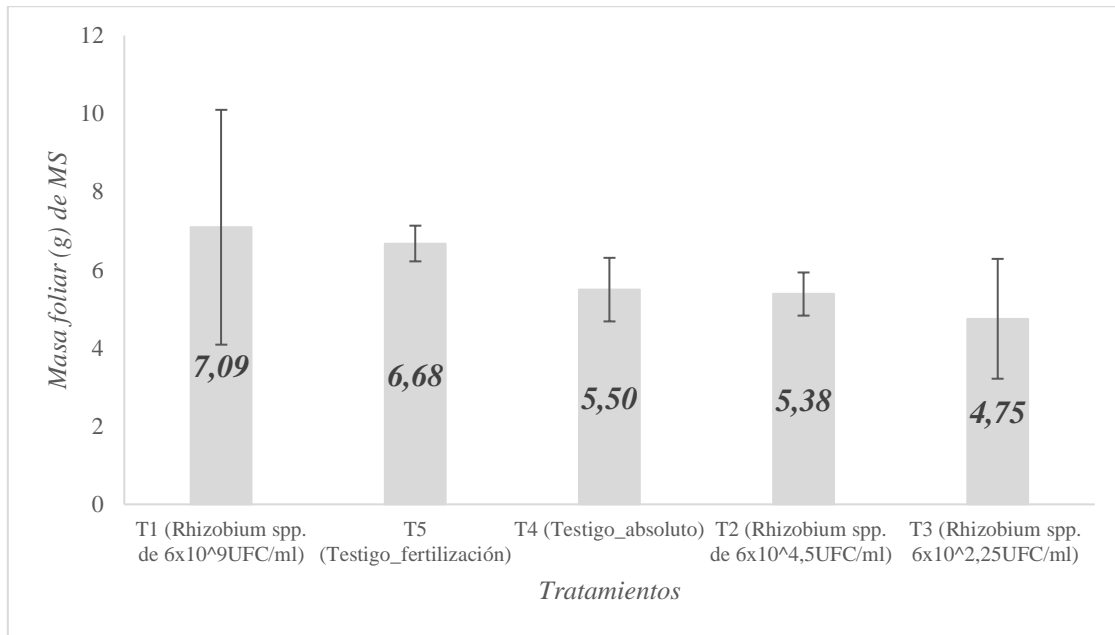
<i>Fuente</i>	<i>GL</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrados medios</i>	<i>F</i>	<i>Pr &gt; F</i>	<i>p-values signification codes</i>
<i>Modelo</i>	6	13,962	2,327	1,096	0,439	°
<i>Total corregido</i>	14	30,949				
<i>Tratamiento</i>	4	11,332	2,833	1,334	0,33668929	°
<i>Bloque</i>	2	2,630	1,315	0,619	0,56226543	°
<i>Error</i>	8	16,987	2,123			

Calculado contra el modelo  $Y = \text{Media}(Y)$   
 Signification codes:  $0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1$   
*Promedio (MS)* 5,880  
*CV (%)* 24,782

El análisis de varianza de la variable masa foliar de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a los 60 días muestra que no existen diferencias significativas ni para los tratamientos ( $p = 0,3367$ ) ni para los bloques ( $p = 0,5623$ ), lo que sugiere que las diferentes condiciones de tratamiento y la variabilidad entre bloques no afectan de manera considerable la masa foliar de las plantas. El promedio de masa foliar es de 5,880 g por planta en función de materia seca. El coeficiente de variación para esta variable es de 24,782 %, lo que indica una alta dispersión de los datos con respecto al valor promedio, lo que podría implicar variabilidad en las condiciones experimentales.

**Figura 20**

*Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% para la variable masa foliar de planta de frijol (Phaseolus vulgaris L.) a los 60 días*



Al comparar por medio del test de Tukey al 5% de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) el porcentaje en gramos en función de materia seca foliar a los 60 días. El tratamiento con mayor porcentaje de materia seca foliar, es el T1 inoculado con alta de cepa de *Rhizobium* spp. al 100%, en un sustrato de pomina, cuyo promedio fue de 7,09g MS; el tratamiento que alcanzó menor porcentaje de materia seca foliar es el T3, inoculado con dosis baja de *Rhizobium* spp. al 25%, en un sustrato de pomina con 4,74g MS.

Los resultados obtenidos indican que la mayor acumulación de materia seca foliar en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a los 60 días de germinación se obtuvo con la dosis alta de *Rhizobium* spp. al 100% (7,09 g MS), mientras que la menor se registró con la dosis baja al 25% (4,74 g MS). Comparando con el estudio realizado en Zapopan, Jalisco, México, donde se evaluó la acumulación de materia seca en diferentes variedades de frijol, se evidencia que la acumulación de biomasa varía según la etapa fenológica y la duración del ciclo biológico. En dicho estudio, la acumulación de materia seca fue lenta en las etapas iniciales, alcanzando su punto máximo en estados intermedios y disminuyendo en la madurez fisiológica. Esto coincide con nuestros hallazgos, donde la mayor biomasa foliar se obtuvo en una fase intermedia del desarrollo (60 días). Además,

las diferencias observadas en la producción de materia seca pueden estar influenciadas por la variedad utilizada, el sustrato y las condiciones ambientales. Los resultados sugieren que la inoculación con *Rhizobium* spp. puede contribuir significativamente a la acumulación de materia seca en las etapas clave del crecimiento del frijol, aunque estudios adicionales podrían explorar su impacto a lo largo de todo el ciclo fenológico (Lépiz Ildelfonso et al., 2018).

La inoculación con *Rhizobium* spp. tiene un efecto positivo en la acumulación de materia seca foliar del frijol, destacando la dosis alta como la más efectiva. No obstante, futuras investigaciones podrían evaluar el efecto de la combinación con microorganismos eficientes para determinar su impacto en el desarrollo vegetativo y productivo del cultivo, permitiendo establecer estrategias agronómicas más eficientes para la optimización del crecimiento y rendimiento del frijol.

## 5.10. Análisis de varianza de la variable masa radicular

**Tabla 17**

*Análisis de varianza de la variable masa radicular de planta de frijol (Phaseolus vulgaris L.) a los 60 días*

<i>Fuente</i>	<i>GL</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrados medios</i>	<i>F</i>	<i>Pr &gt; F</i>	<i>p-values signification codes</i>
<i>Modelo</i>	6	167,749	27,958	3,284	0,062	.
<i>Total corregido</i>	14	235,863				
<i>Tratamiento</i>	4	152,598	38,150	4,481	0,0341564	*
<i>Bloque</i>	2	15,151	7,575	0,890	0,44781782	°
<i>Error</i>	8	68,114	8,514			

Calculado contra el modelo  $Y = \text{Media}(Y)$

Signification codes: 0 < \*\*\* < 0.001 < \*\* < 0.01 < \* < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1

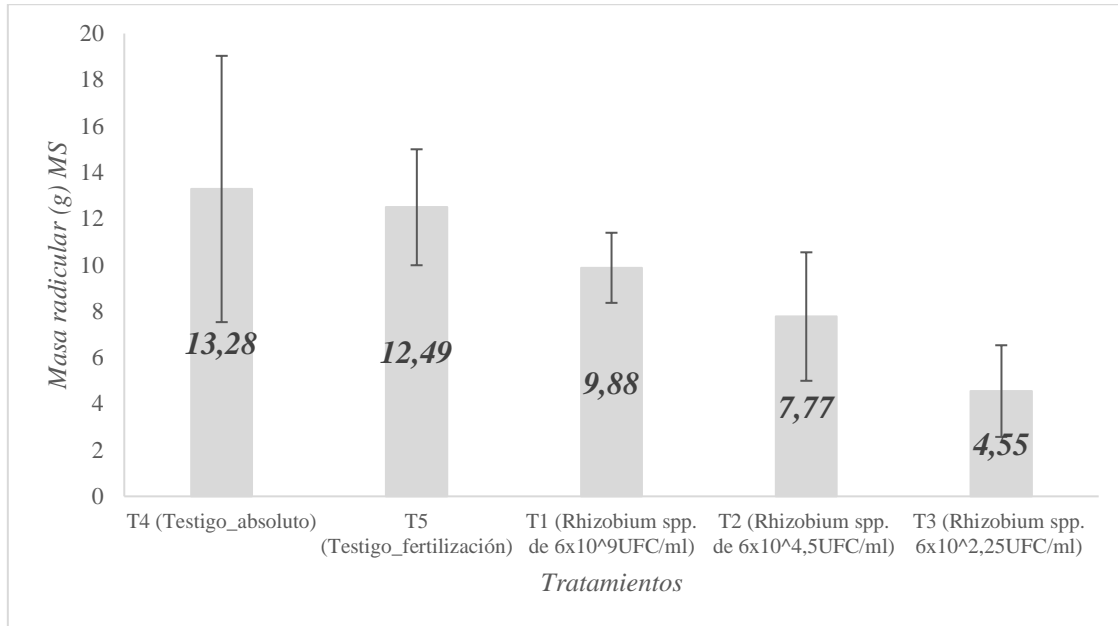
*Promedio (MS)* 9,595

*CV (%)* 30,412

El análisis de varianza de la variable masa radicular de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a los 60 días muestra una diferencia significativa entre los tratamientos ( $p = 0,0342$ ), lo que sugiere que las diferentes condiciones de tratamiento influyen en la masa radicular de las plantas. Sin embargo, no se observan diferencias significativas entre los bloques ( $p = 0,4478$ ). El promedio de masa radicular es de 9,595 g por planta en función de materia seca. El coeficiente de variación para esta variable es de 30,412 %, lo que indica una considerable dispersión de los datos con respecto al valor promedio, lo que podría deberse a factores de variabilidad biológica.

**Figura 21**

*Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% para la variable masa radicular de planta de frijol (Phaseolus vulgaris L.) a los 60 días*



Al comparar por medio del test de Tukey al 5% el SPAD de planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) el porcentaje en gramos en función de materia seca radicular a los 60 días. El tratamiento con mayor porcentaje de materia seca radicular, es el T4 sin inoculación y fertilización en un sustrato (50% tierra negra, 30% humus y 20% pomina), cuyo promedio fue de 13,28g MS; el tratamiento que alcanzó menos porcentaje de materia seca radicular es el T3, inoculado con dosis baja de *Rhizobium* spp. al 25%, en un sustrato de pomina con 4,55g MS.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el mayor porcentaje de materia seca radicular se presentó en el tratamiento T4 (sin inoculación y fertilización), con 13,28 g MS, mientras que el menor porcentaje se observó en el T3 (dosis baja de *Rhizobium* spp.), con 4,55 g MS. Esto sugiere que la inoculación con *Rhizobium* spp. no necesariamente incrementa la acumulación de biomasa radicular en comparación con un sustrato con mayor contenido orgánico. En comparación con el estudio de biomasa en frijol var. Cacahuate-72 en suelo e hidroponía, se observa que la disponibilidad de nutrientes y la retención de humedad influyen significativamente en la acumulación de biomasa en diferentes órganos de la planta. En hidroponía, el acceso inmediato a los

nutrientes favoreció un mayor crecimiento radicular y foliar, lo que podría explicar las diferencias observadas en la producción de biomasa total. La disponibilidad de oxígeno y la estructura del sustrato juegan un papel determinante en la distribución de materia seca entre las diferentes partes de la planta, sugiriendo que la estructura del suelo o sustrato afecta directamente la eficiencia de absorción de nutrientes y el crecimiento del sistema radical (García Esteva et al., 2003).

El estudio demuestra que la composición del sustrato y la inoculación con *Rhizobium* spp. influyen en la acumulación de materia seca en la planta de frijol. La mayor biomasa radicular se obtuvo en el tratamiento sin inoculación y fertilización, lo que sugiere que la fertilización y la calidad del sustrato pueden ser más determinantes en la acumulación de biomasa que la fijación biológica de nitrógeno. Al comparar con el estudio sobre hidroponía y suelo, se observa que el acceso inmediato a los nutrientes y la retención de humedad impactan significativamente la biomasa total. Estos hallazgos destacan la importancia de un adecuado manejo del sustrato y la fertilización para optimizar el crecimiento del frijol y mejorar su eficiencia en la absorción de nutrientes.

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES

-Por los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que, aunque la cepa de *Rhizobium* spp. proveniente del cantón Urcuquí mostró el mayor crecimiento bacteriano en términos de UFC h<sup>-1</sup>, la cepa proveniente de Antonio Ante destacó por su superior capacidad de fijación de nitrógeno, evidenciada por el mayor tamaño del halo de inhibición. Esto sugiere que, a pesar de no presentar el mayor crecimiento en UFC h<sup>-1</sup>, la cepa de Antonio Ante posee un alto potencial para mejorar la fertilidad del suelo y el rendimiento de cultivos mediante la fijación de nitrógeno, posicionándose como una opción prometedora.

-La presente investigación permitió determinar la mejor dosis de aplicación de *Rhizobium* spp. para el desarrollo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en un período de 60 días. Los resultados indicaron que la dosis baja (25%), con una concentración de  $6 \times 10^{2,25}$  UFC/ml, fue la más efectiva en términos de crecimiento y vigor de la planta. A los 60 días de germinación, este tratamiento alcanzó la mayor altura con 80,31 cm, superando a los demás tratamientos, incluidos aquellos con dosis más altas de *Rhizobium* spp. Asimismo, este tratamiento mostró un comportamiento favorable en la acumulación de biomasa y parámetros fisiológicos evaluados, lo que sugiere que una menor concentración de la bacteria favorece una mejor simbiosis con la planta en las condiciones experimentales del estudio.

-La altura del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) durante 60 días varió según la dosis de *Rhizobium* spp. La dosis alta (T1) registró las menores alturas a los 15 y 30 días (16,57 cm y 43,56 cm), sugiriendo un efecto negativo inicial. En cambio, a los 60 días, la dosis baja (T3, 25%) en sustrato de pómima alcanzó la mayor altura (80,31 cm), favoreciendo el desarrollo en un sustrato inerte. El testigo sin fertilización (T4) mostró el mayor crecimiento inicial (21,51 cm a los 15 días) pero el menor al final (63,05 cm), evidenciando que la materia orgánica benefició el crecimiento temprano, pero la falta de fertilización lo limitó a largo plazo. La respuesta del frijol dependió tanto de la dosis de *Rhizobium* spp. como del sustrato, destacando la dosis baja como la más favorable en el tiempo.

-La variación en el contenido de clorofila del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), medida mediante el índice SPAD, dependió de la dosis de *Rhizobium* spp. y el sustrato. La dosis

media (T2, 50%) mostró el mayor SPAD a los 15 días (35,307), mientras que la dosis baja (T3, 25%) en sustrato de pomina alcanzó los valores más altos a los 45 y 60 días (40,223 y 41,15). En contraste, el testigo sin fertilización (T4) presentó los menores SPAD en todas las etapas. Estos resultados confirman que la inoculación con *Rhizobium* spp., especialmente a dosis bajas, mejora el contenido de clorofila en condiciones controladas de invernadero.

-El tratamiento T4 (sin fertilización) presentó los mayores días de floración (44 días), mientras que T3 (dosis baja de *Rhizobium* spp.) alcanzó la floración en 42 días. En la formación de vaina, T1 (dosis alta de *Rhizobium* spp.) mostró los mayores días (48 días), y T3 los menores (46 días). En general, los tratamientos con dosis alta de *Rhizobium* spp. retrasaron tanto la floración como la formación de vaina, mientras que la dosis baja aceleró ambos procesos, con una diferencia promedio de 4 a 6 días entre floración y formación de vaina.

-El tratamiento T3, inoculado con dosis baja de *Rhizobium* spp. (25%) en sustrato de pomina, mostró el mayor número de nódulos (227), mientras que el T4, sin fertilización, presentó el menor número (35 nódulos). Estos resultados refuerzan la idea de que la inoculación con *Rhizobium* spp. favorece la nodulación en frijol, incluso sin la necesidad de fertilización química. La mayor nodulación en T3 sugiere una simbiosis efectiva, probablemente debido a la interacción favorable entre *Rhizobium* spp. y las cepas nativas del sustrato. Esto destaca la importancia de seleccionar adecuadamente la dosis y el sustrato para optimizar la fijación biológica de nitrógeno y la salud del cultivo.

-En base a los resultados obtenidos, el tratamiento T3, con dosis baja de *Rhizobium* spp. al 25%, presentó la mejor altura, SPAD y nodulación, a pesar de tener menor materia seca foliar (4,74 g MS) y materia seca radicular (4,55 g MS) en comparación con otros tratamientos. Esto sugiere que una menor acumulación de materia seca no afecta negativamente el crecimiento y desarrollo del frijol. De hecho, la eficiencia en la fijación de nitrógeno y la absorción de nutrientes puede ser más importante que la cantidad de biomasa acumulada, lo que hace que el tratamiento T3 sea favorable para mejorar el rendimiento del cultivo sin necesidad de altos niveles de materia seca.

## CAPÍTULO VII

### RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar estudios de caracterización genotípica y fenotípica de la cepa de *Rhizobium* spp. de diversas localidades de Urcuquí para identificar los factores que contribuyen a su destacado crecimiento bacteriano.
- Se recomienda continuar con la evaluación de la cepa de Antonio Ante en condiciones de campo no controladas para verificar su eficiencia en la fijación de nitrógeno y su impacto en el crecimiento y rendimiento de cultivos, particularmente en el frijol, con el fin de validar su potencial, como biofertilizante en prácticas agrícolas sostenibles.
- La dosis baja de *Rhizobium* spp. (25%) demostró ser la más eficiente en términos de altura, SPAD y nodulación en frijol. Se recomienda su uso en condiciones similares a las del estudio para optimizar la simbiosis planta-bacteria y mejorar el crecimiento del cultivo.
- La combinación de *Rhizobium* spp. con sustratos inertes como la pomina favoreció el desarrollo del frijol. Se sugiere evaluar esta interacción en diferentes tipos de suelos para determinar su efectividad en condiciones de campo.
- Aunque el tratamiento con dosis baja de *Rhizobium* spp. presentó menor acumulación de materia seca foliar y radicular, no afectó el crecimiento general del cultivo. Se recomienda investigar su impacto en el rendimiento final de grano para validar su eficacia a largo plazo.

## CAPÍTULO VIII

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Aziz, H. M. M., Hasaneen, M. N. A., & Omer, A. M. (2016). Nano chitosan-NPK fertilizer enhances the growth and productivity of wheat plants grown in sandy soil. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 14(1), 1–9. <https://doi.org/10.5424/sjar/2016141-8205>
- Abrahamovich, E., López, A. C., & Alippi, A. M. (2014). Diversidad de cepas de *Agrobacterium rubi* aisladas de arándanos. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(3). [https://doi.org/10.1016/s0325-7541\(14\)70078-1](https://doi.org/10.1016/s0325-7541(14)70078-1)
- Abril, J., & Casp, A. (2010). Estudio de la penetración de calor en alimentos procesados en sistemas de esterilización rotatorios. *Actas cesia*.
- Acosta Saldaña, M. J. (2017). *Isolation and identification of native strains of Rhizobium phaseoli in soil of the dam of the youth of Marin, Nuevo León*.
- Aguilar Ramírez, J. O., Gallegos Morales, G., Hernández Castillo, F. D., Cepeda Siller, M., & Sánchez-Aspeytia, D. (2019). Incidencia y severidad del tizón común en plantas de frijol inoculados con *Rhizobium phaseoli*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(2). <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i2.1594>
- Ahmed, S., Shahnawaz, K., Mandal, T., Ghafir, M., Gummaluri, S., & Vishal, G. (2022). Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of herbal formulations of septilin and triphala with conventional 2% chlorhexidine on root canal and oral commensal bacteria using kirby Bauer method: An in-vitro study. *Contemporary Clinical Dentistry*, 13(4). [https://doi.org/10.4103/ccd.ccd\\_423\\_21](https://doi.org/10.4103/ccd.ccd_423_21)
- Albuja Galindo, A. (1979). *Imbabura en la cultura nacional* - Google Books. [https://www.google.com.ec/books/edition/Imbabura\\_en\\_la\\_cultura\\_nacional/pFwbAAAAYAAJ?hl=es-419&gbpv=1&bsq=imbabura+historia&dq=imbabura+historia&printsec=frontcover](https://www.google.com.ec/books/edition/Imbabura_en_la_cultura_nacional/pFwbAAAAYAAJ?hl=es-419&gbpv=1&bsq=imbabura+historia&dq=imbabura+historia&printsec=frontcover)
- Alcarraz, M., Gonzales, E., & Heredia, V. (2020). *Azotobacter* y *Rhizobium* como biofertilizantes naturales en semillas y plantas de frijol caupí. *Avances*, 22(2).

- Alejos, R., Gaspar, W., Ynga, G., & Niño, A. (2021). Manual de desinfección y esterilización del material de laboratorio de alimento vivo: microalgas. *Inf Inst Mar Perú*, 50–66(1).
- Alencastro Pavón, C., & Ayala Colimba, J. I. (2023). Caracterización morfológica de la cepa nativa de *Rhizobium* spp. obtenida a partir de los nódulos radicales del cultivo de arveja (*Pisum sativum* L.). *AXIOMA*, 1(29). <https://doi.org/10.26621/ra.v1i29.889>
- Amalia, D. A. L., Oedjijono, O., & Purwanto, P. (2020). Eksplorasi Bakteri Diazotrof dari Rizosfer Tanaman Bawah Merah (*Allium ascalonicum* L.) di Brebes, Jawa Tengah. *BioEksakta: Jurnal Ilmiah Biologi Unsoed*, 2(3). <https://doi.org/10.20884/1.bioe.2020.2.3.3480>
- Anaya López, J. L., Ibarra Pérez, F. J., Rodríguez Cota, F. G., Ortega Murrieta, P. F., Acosta Gallegos, J. A., & Chiquito Almanza, E. (2021). Leguminosas de grano en México: variedades mejoradas de frijol y garbanzo desarrolladas por el INIFAP. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 25. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i25.2827>
- Andrade, O. S., Erosa, G. de la V., & Nevárez, M. G. V. (2015). Amonio-Oxidasas Bacterianas Y Arqueales Involucradas En El Ciclo Del Nitrógeno. *Terra Latinoamericana*, 33(3).
- Ángeles Núñez, J. G., & Cruz Acosta, T. (2017). Aislamiento, caracterización molecular y evaluación de cepas fijadoras de nitrógeno en la promoción del crecimiento de frijol. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(5). <https://doi.org/10.29312/remexca.v6i5.588>
- Antón, A., & Lizaso, J. (2001). Nitritos, Nitratos Y Nitrosaminas. *Fundación Ibérica Para La Seguridad Alimentaria*.
- Aristizábal Hernández, J. D. (2014). Validación y evaluación comparativa de la eficiencia de una estufa de leña mejorada bajo condiciones controladas y prueba de campo. *Informador Técnico*, 78(1). <https://doi.org/10.23850/22565035.65>
- Arratia Mendoza, C. R., & Fernández Chávez, C. M. (2018). Efecto del fertilizante té de humus de lombriz en dos variedades de vainita (*Phaseolus vulgaris* L.), en ambiente

- protegido en el Centro Experimental Cota-Cota. *Revistas Bolivianas APThAPI*, 4(2).
- Atlas, R. M. (2004). HAND BOOK OF Microbiological Media: THIRD EDITION. *Hand Book of Microbiological Media: Third Edition*, 1–2051. <https://doi.org/10.1201/9781420039726>
- Ayala, G. (2006). *Raíces Andinas Contribuciones al conocimiento y la capacitación*. [https://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/00\\_Presentacion.pdf](https://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/00_Presentacion.pdf)
- Balgorri, A. (2015). Autoclaves verticales por inundación. *IsPLN*.
- Baxter, L., Roy, P., Picot, E., Watts, J., Jones, A., Wilkinson, H., Schäfer, P., Gifford, M., & Lagunas, B. (2021). Comparative Genomics across Three Ensifer Species Using a New Complete Genome Sequence of the Medicago *Symbiont Sinorhizobium* (Ensifer) *meliloti* WSM1022. *Microorganisms*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9122428>
- Bécquer, C. J. (2004). Descripción y clasificación de rizobios: enfoque histórico, métodos y tendencias actuales. *Revista Biología (La Habana)*, 18(1), 9–29.
- Becquer, C. J., Salas, B., Ávila, U., Palmero, L. A., Nápoles, J. A., Ramos, Y., Pasaron, I., Ulloa, L., Colina, O. L., & Suarez, Y. (2012). Efecto de la inoculación con rizobios procedentes de *Sancti Spiritus*, Cuba, en sorgo (*Sorghum bicolor* L. *Moench*), bajo condiciones de campo. *Pastos y Forrajes*, 35(1).
- Begom, Most. F., Ahmed, Md. G. U., Sultana, R., & Akter, F. (2021). Culture Optimization for Mass Production of *Rhizobium*; Using Bioreactor Made of Readily Available Materials and Agitated by Air Flow. *Agricultural Sciences*, 12(06). <https://doi.org/10.4236/as.2021.126040>
- Berardo, A., & Marino, M. A. (1999). Fertilización fosfatada de alfalfa en el sudeste bonaerense. *Informaciones Agronómicas*, 4.
- Bernal, R., Arias, M., Domínguez, M., Durán, R., Valdés, M., & Sardiñas, A. (2010). Bacterias como herramientas potenciales en el mejoramiento de humedales artificiales para el tratamiento de aguas. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 41(0253–5688).

- Bernal-Cabrera, A. (2014). Respuesta de variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) a la infección por *Uromyces phaseoli* (Pers.) Wint var. *typica* Arth. *Centro Agrícola*.  
[https://www.academia.edu/115687768/Respuesta de variedades de frijol com% C3%BA n Phaseolus vulgaris L a la infecci% C3%B3 n por Uromyces phaseoli \\_Pers\\_Wint\\_var\\_typica\\_Arth](https://www.academia.edu/115687768/Respuesta_de_variedades_de_frijol_com%C3%BAn_Phaseolus_vulgaris_L_a_la_infecci%C3%B3n_por_Uromyces_phaseoli_Pers_Wint_var_typica_Arth)
- Berríos Reyes, P. A., & Pérez Pastor, A. (2024). *Efecto del uso de inhibidores de la nitrificación sobre el crecimiento y producción de lechuga 'Iceberg.'*  
<https://doi.org/10.31428/10317/10277>
- Bertran, P. (2022). Los 20 medios de cultivo para bacterias (características y aplicaciones). *Medico Plus*.
- Bertsch, F. (2009). *Absorción de nutrimentos por los cultivos: información disponible y usos de los estudios de absorción*.
- Blucher, H. ., Ernst, A. ., & Neumann, L. . (2020). *Enciclopedia Química Industrial*.
- Boron, W. F. ., & Boulpaep, E. L. . (2017). *Fisiología médica*.
- Broughton, W. J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., & Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) - Model food legumes. *Plant and Soil*, 252(1), 55–128. <https://doi.org/10.1023/A:1024146710611/METRICS>
- Burbano, L; Utreras, Jose. (2015). “Evaluación de las hojas de canchaquiro (*Tournefortia scabrida*, kunth), presentes en Mojanda (Imbabura-Ecuador), como especie vegetal fijadora de nitrógeno.” In *Tesis*.
- Cabrera Romero, C., Lázaro, Y., Baños, S., & Izquierdo, M. (2017). Efecto de la inoculación de *Rhizobium* sobre el crecimiento de *Phaseolus vulgaris* L. (frijol) en condiciones semicontroladas. *Avances*, 19(1).
- Calero Hurtado, A., Pérez Díaz, Y., Quintero Rodríguez, E., Olivera Vicedo, D., & Peña Calzada, K. (2019). Efecto de la aplicación asociada entre *Rhizobium leguminosarum* y microorganismos eficientes sobre la producción del fríjol común. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 20(2).  
[https://doi.org/10.21930/rcta.vol20\\_num2\\_art:1460](https://doi.org/10.21930/rcta.vol20_num2_art:1460)

- Calvache Ulloa, M. E., Córdova Yanchapanta, V., & Cruz Tobar, S. E. (2017). Soil water deficiency and biological Nitrogen fixation in common bean crop *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 5(2), 94–106. [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2308-38592017000200004&lng=pt&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2308-38592017000200004&lng=pt&nrm=iso&tlng=es)
- Campillo, R., Urquiaga, S., Pino, I., & Montenegro, A. (2003). Estimation of biological nitrogen fixation in forage legumes using a <sup>15</sup>N labeling methodology. *Agricultura Técnica*, 63(2).
- Campo Arana, R. O., & Burgos Ayala, P. R. (2023). Efectos del tratamiento de semillas de frijol caupí *Vigna unguiculata* L. sobre el manejo de la marchitez vascular causada por *Scleroctium rolfsii*. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 25(3). <https://doi.org/10.18271/ria.2023.530>
- Cantaro-Segura, H., Huaranga-Joaquín, A., Zúñiga-Dávil, D., Cantaro-Segura, H., Huaranga-Joaquín, A., & Zúñiga-Dávil, D. (2019). Efectividad simbiótica de dos cepas de *Rhizobium* spp. en cuatro variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Perú. *Idesia (Arica)*, 37(4), 73–81. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292019000400073>
- Cárdenas, R. (2016). Métodos para la Esterilización del material de laboratorio. In 09/06/2016.
- Carrasquero Ferrer, S. J., Rodríguez Ortiz, M. G., Bernal Vergara, J. A., & Diaz Montiel, A. R. (2018). Eficiencia de un reactor biológico secuencial en el tratamiento de efluentes de una planta procesadora de productos cárnicos. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*. <https://doi.org/10.18359/rfcb.3017>
- Cerón Rincón, L. E., & Aristizábal Gutiérrez, F. A. (2012). Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XIV(1), 285–295. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77624081026>
- Chanaguano Punina, B., Llomitoa Gavilanez, A., & Llomitoa Gavilanez, N. (2021). Comportamiento Agronómico De La Mucuna (*Mucuna Pruriens*), a La Aplicación De Dos Diferentes Dosis De Fertilizantes Químicos Nitrogenados En El Centro Experimental Sacha Wiwa De La Parroquia Guasaganda. *Nexo Agropecuario*, 9(1).

- Chaudhary, J., Thakur, S., Sharma, M., Gupta, V. K., & Thakur, V. K. (2020). Development of biodegradable agar-agar/gelatin-based superabsorbent hydrogel as an efficient moisture-retaining agent. *Biomolecules*, *10*(6). <https://doi.org/10.3390/biom10060939>
- Chung Guin Po, P. (2024). Crecimiento miceliar in vitro de 2 cepas de *Grifola garga* en diferentes medios de cultivo y niveles de pH. *Ciencia & Investigación Forestal*. <https://doi.org/10.52904/0718-4646.2023.599>
- Clavijo, C., Chipana, V., Centeno, J., Zúñiga, D., & Guillén, C. (2012). AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS DE LA RIZÓSFERA DEL CULTIVO DE *Olea europea* “OLIVO” EN TACNA PERÚ. *Ecología Aplicada*, *11*(1–2). <https://doi.org/10.21704/rea.v11i1-2.429>
- Colás Sánchez, A., Díaz Pérez, B., Rodríguez Urrutia, A., Gatorno Muñoz, S., & Rodríguez López, O. (2018). Efecto de la biofertilización en la morfo fisiología y rendimiento del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Centro Agrícola*, *45*(4).
- Crespo Flores, G., Ramírez Tobias, H. M., Vallejo Pérez, M. R., Méndez Cortés, H., & González Cañizares, P. J. (2022). Inoculación con rizobios y hongos micorrízicos arbusculares en plantas de *Leucaena leucocephala* en etapa de vivero y en sustrato con pH neutro. *Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales*, *10*(2). [https://doi.org/10.17138/TGFT\(10\)98-108](https://doi.org/10.17138/TGFT(10)98-108)
- Crespo Flores, G., Ramírez-Tobias, H. M., Vallejo-Pérez, M. R., & Méndez-Cortés, H. (2021). Coinoculación con rizobios y hongos micorrízicos arbusculares en plántulas de *Prosopis laevigata*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, *12*(7). <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i7.2910>
- Cuadrado, B., Rubio, G., & Santos, W. (2009). *Caracterización de cepas de Rhizobium y Bradyrhizobium (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de frijol caupi (Vigna unguiculata) como potenciales bioinóculos*. <http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v38n1/v38n1a06.pdf>
- de Oliveira, L. A., Pereira, V. J., Dos Santos, M. G. P., Lana, R. M. Q., & Aguilar, A. S. (2020). Efecto del molibdeno en el frijol común de invierno (*Phaseolus vulgaris* L.):

- fertilización foliar y semillas enriquecidas. *Idesia (Arica)*, 38(3), 69–76.  
<https://doi.org/10.4067/S0718-34292020000300069>
- Devi, M., Dhanalakshmi, S., Thillai Govindarajan, G. E., Tanisha, B. A., Sonalika, T., Ruth, J. E., Avinash, T., Jethendra Sri, C., Logeswaran, K., & Nithish Ramasamy, M. (2020). A review on *Phaseolus vulgaris* linn. In *Pharmacognosy Journal* (Vol. 12, Issue 5). <https://doi.org/10.5530/PJ.2020.12.163>
- Diaz, A., Espinosa, M., & Ortiz, F. (2018). Corrección de la clorosis férrica con quelato EDDHA en cultivos sembrados en suelo alcalino y calcáreo. *Revista Terra Latinoamericana*, 36(1).
- Dos Santos, M. A., Rosa, L. P., Matvienko, B., dos Santos, E. O., Rocha, C. H. E. D., Sikar, E., Silva, M. B., & Junior, A. M. P. B. (2008). Emissões de gases de efeito estufa por reservatórios de hidrelétricas. *Oecologia Australis*, 12(01).  
<https://doi.org/10.4257/oeco.2008.1201.11>
- Ebel, R., Pozas Cárdenas, J. G., Soria Miranda, F., & Cruz González, J. (2017). Manejo orgánico de la milpa: rendimiento de maíz, frijol y calabaza en monocultivo y policultivo. *REVISTA TERRA LATINOAMERICANA*, 35(2).  
<https://doi.org/10.28940/terra.v35i2.166>
- Escudero Acebedo, K. M. (2017). *Efecto de la inoculación de cepas de Rhizobium spp., en el crecimiento de Frijol (Phaseolus vulgaris L.) var. Canario, a escala piloto, SJJL, 2017.*
- Esquivel López, A., Lamadrid Mandado, L. J., Díaz Martín, B., & Torres Gutiérrez, R. (2014). (PDF) *Efecto de la fertilización mineral y biológica sobre tres genotipos de frijol común en un suelo Ferralítico Rojo Típico* *Effect of mineral and biological fertilization on three genotypes of common bean in an oxisol soil.*  
[https://www.researchgate.net/publication/267028167\\_Efecto\\_de\\_la\\_fertilizacion\\_mineral\\_y\\_biolgica\\_sobre\\_tres\\_genotipos\\_de\\_frijol\\_comun\\_en\\_un\\_suelo\\_Ferralitico\\_Rojo\\_Tipico\\_Effect\\_of\\_mineral\\_and\\_biological\\_fertilization\\_on\\_three\\_genotypes\\_of\\_common\\_bean](https://www.researchgate.net/publication/267028167_Efecto_de_la_fertilizacion_mineral_y_biolgica_sobre_tres_genotipos_de_frijol_comun_en_un_suelo_Ferralitico_Rojo_Tipico_Effect_of_mineral_and_biological_fertilization_on_three_genotypes_of_common_bean)
- FAO. (2024). *Mejorando la nutrición a través de huertos y granjas familiares.*  
<https://www.fao.org/4/v5290s/v5290s30.htm>
- FAO, & IFA. (2024). *Los fertilizantes y su uso.* <http://www.fertilizer.org>

- FAO, & ONU. (2024). *Propiedades Biológicas / Portal de Suelos de la FAO / Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. <https://www.fao.org/soils-portal/soil-survey/propiedades-del-suelo/propiedades-biologicas/es/>
- Fausto, P., Unocc, L., Melissa, L., Lucas, L., Eveling, R., Paucar, S., Ines, P., & Barillas, S. (2023). Evaluación de la Efectividad de Cepas Nativas de Rizobios en la Producción de Diferentes Especies de Leguminosas. *Revista de Investigación Cañetana*, 2(1), 26–31. <https://doi.org/10.60091/RIC.2023.V2N1.04>
- Fearnside, P. M. (2002). Fogo e emissão de gases de efeito estufa dos ecossistemas florestais da Amazônia brasileira. *Estudos Avançados*, 16(44). <https://doi.org/10.1590/s0103-40142002000100007>
- Fearnside, P. M. (2008). HIDRELÉTRICAS COMO “FÁBRICAS DE METANO”: O PAPEL DOS RESERVATÓRIOS EM ÁREAS DE FLORESTA TROPICAL NA EMISSÃO DE GASES DE EFEITO ESTUFA. *Oecologia Australis*, 12(01). <https://doi.org/10.4257/oeco.2008.1201.10>
- Fernández, L. (2005). La fijación simbiótica de nitrógeno en soja: nodulación, inoculantes y métodos de inoculación. *Ciencia Hoy*, 14(84).
- Fernández-Pascual, M., de María, N., & de Felipe, M. R. (2006). Fijación Biológica del Nitrógeno: Factores Limmitantes. *Ciencia y Medio Ambiente*.
- Flores de la Cruz, M. J., García Esteva, A., García Nava, J. R., Kohashi Shibata, J., & Ybarra Moncada, Ma. C. (2018). Diferencias fenológicas, morfológicas y de componentes del rendimiento entre una forma silvestre y una domesticada de frijol común. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(1). <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i1.854>
- Flores Pacheco, J. A., Lazo Sánchez, W. J., & Méndez Sevilla, J. J. (2019). Necesidades hídricas del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) INTA rojo en condiciones del trópico húmedo de Nicaragua. *La Calera*, 19(32). <https://doi.org/10.5377/calera.v19i32.8436>
- Fonseca López, D., Vivas Quila, N. J., & Balaguera López, H. E. (2019). Técnicas aplicadas en la investigación agrícola para cuantificar la fijación de nitrógeno: una

- revisión sistemática. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 21(1).  
[https://doi.org/10.21930/rcta.vol21\\_num1\\_art:1342](https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num1_art:1342)
- Fuentes Yagüe, J. Luis. (1999). Acidez y basicidad del suelo. *El Suelo y Los Fertilizantes*.
- Furtado, G. L., & Medeiros, A. A. (1980). Single-disk diffusion testing (Kirby-Bauer) of susceptibility of *Proteus mirabilis* to chloramphenicol: Significance of the intermediate category. *Journal of Clinical Microbiology*, 12(4).  
<https://doi.org/10.1128/jcm.12.4.550-553.1980>
- Gaibor Lucio, V., Galeas Vega, J., Silva García, D., & Román Ramos, A. (2023). Tolerancia del Fréjol a Mancha Angular en la Provincia Bolívar. *Magazine de Las Ciencias: Revista de Investigación e Innovación*, 8(3).  
<https://doi.org/10.33262/rmc.v8i3.2924>
- Gallegos, L., González, A., López-Urbina, T., Gonzales- Gustavson, E., Gómez-Puerta, L., & Arroyo, G. (2014). COMPARACIÓN DE LA EFICACIA DE TRES MEDIOS DE CULTIVO in vitro PARA EL DESARROLLO DE *Blastocystis* spp. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 24(4).  
<https://doi.org/10.15381/rivep.v24i4.2749>
- Galván J., L. A., & Ríos O., L. A. (2013). *Vista de Procesos, bacterias y arqueobacterias involucrados en el ciclo biológico del nitrógeno para la eliminación de compuestos nitrogenados en ecosistemas de agua dulce, una revisión sistemática*.  
<https://revistas.udea.edu.co/index.php/hm/article/view/20095/16975>
- Ganesan, K., & Xu, B. (2017). Polyphenol-rich dry common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and their health benefits. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/ijms18112331>
- García, A., Dueñas, G., Hernández, G., Herrero, G., Nuviola-Montoya, A., Méndez, N., & Zapata, F. (2013). Efecto del encalado en la respuesta vegetal y fijación simbiótica del nitrógeno en frijol común. *Agronomía Mesoamericana*, 14(2).  
<https://doi.org/10.15517/am.v14i2.11950>
- García Esteva, A., Kohashi Shibata, J., Baca Castillo, G., & Escalante Estrada, J. (2003). Rendimiento y asignación de materia seca de una variedad de frijol en un sistema hidropónico y suelo. *Terra Latinoamericana*, 21.

- García-Velázquez, L., & Gallardo, A. (2017). El ciclo global del nitrógeno. Una visión para el ecólogo terrestre. *Ecosistemas*, 26(1), 4–6. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=54050575002>
- Gaviria Giraldo, J., Restrepo Franco, G. M., Galeano Vanegas, N. F., & Hernández Rodríguez, A. (2018). Bacterias diazotróficas con actividad promotora del crecimiento vegetal en *Daucus carota* L. *Ciencia y Agricultura*, 15(1). <https://doi.org/10.19053/01228420.v15.n1.2018.7753>
- Geddes, B. A., Kearsley, J. V. S., Huang, J., Zamani, M., Muhammed, Z., Sather, L., Panchal, A. K., diCenzo, G. C., & Finan, T. M. (2021). Minimal gene set from *Sinorhizobium* (Ensifer) meliloti pSymA required for efficient symbiosis with *Medicago*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(2). <https://doi.org/10.1073/PNAS.2018015118>
- Gliessman, S. R. (2002). *Agroecología: procesos ecológicos en agricultura sostenible*. [https://www.google.com.ec/books/edition/Agroecolog%C3%ADa\\_procesos\\_ecol%C3%B3gicos\\_en\\_ag/rnqan8BOVNAC?hl=es-419&gbpv=1](https://www.google.com.ec/books/edition/Agroecolog%C3%ADa_procesos_ecol%C3%B3gicos_en_ag/rnqan8BOVNAC?hl=es-419&gbpv=1)
- Gómez, E., Ruiz-Díez, B., Fajardo, S., Eichler-Loebermann, B., Samson, R., Van Damme, P., López, S., & Fernández-Pascual, M. (2017). CARACTERIZACIÓN DE RIZOBIOS AISLADOS DE NÓDULOS DE FRIJOL CAUPÍ, EN SUELOS SALINOS DE CUBA. *Cultivos Tropicales*, 38(4).
- Gonzales, E., Alcarraz, M., Castro, A., & Casas, S. (2019). Efecto del biofertilizante *azotobacter-rhizobium* en tarwi (*Lupinus mutabilis* SWEET.), como alternativa a la fertilización química. *Ciencia e Investigación*, 21(2). <https://doi.org/10.15381/ci.v21i2.15855>
- González, L. (2013). Nitrógeno amoniacal, importancia de su determinación. *Revistas Académicas UTP*.
- González Herrera, S. L., Lozada Méndez, M., & Hernández García, N. A. (2019). Protocolo de limpieza y desinfección de mesas de trabajo en los laboratorios de enseñanza de Ciencias de la Salud-Xalapa. *UVserva*, 7. <https://doi.org/10.25009/uvserva.v0i7.2607>

- González, L. K. G., Restrepo, J., & Pachón, H. (2011). Caracterización del consumo de maíz y frijol en familias del departamento del Cauca, Colombia. *Perspectivas En Nutrición Humana*, 12(1), 87–98. <https://doi.org/10.17533/udea.penh.9418>
- Graham, P. H., & Vance, C. P. (2000). Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Research*, 65(2–3), 93–106. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(99\)00080-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00080-5)
- Granda, K., Colas, A., Gutiérrez, Y., Cupull, R., Alvarado, Y., & Torres, R. (2016). Efecto de aislados de *Rhizobium* sobre parámetros fenotípicos y la fijación de nitrógeno en genotipos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Centro Agrícola*, 572(1).
- Granda- Mora, Caridad, M., García, N., Rolando, Á., Carrión, R., Alvarado-Capó, Y., Torres Gutiérrez, R., Alvarado, J., La, / N, Loja, A., & Letra, C. (2016). Respuesta de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Mantequilla a la inoculación de cepas de *Rhizobium* nativas de Ecuador en casas de cultivo. *Centro Agrícola*, 43(4).
- Granda Mora, K., Correa Ullauri, C., Collahuazo Reinoso, Y., & Robles Carrión, Á. (2024). Inoculantes microbianos comerciales con PGPR sobre variables productivas y económicas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agronomía Mesoamericana*. <https://doi.org/10.15517/am.2024.55654>
- Granda Mora, K. I., Colás Sánchez, A., Gutiérrez Sánchez, Y., Cupull Santana, R., Alvarado Capó, Y., & Torres Gutiérrez, R. (2016). Efecto de aislados de *Rhizobium* sobre parámetros fenotípicos y la fijación de nitrógeno en genotipos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Centro Agrícola*, 43(1), 62–70. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-57852016000100009&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-57852016000100009&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Guamán, P., Basante, C., & Mármol, J. L. (2023). Ventajas de la aplicación de cobertura vegetal en los cultivos agroecológicos: Advantages of the application of vegetation cover in agroecological crops. *Latam: Revista Latinoamericana de Ciencias Sociales y Humanidades*, ISSN-e 2789-3855, Vol. 4, N°. 2, 2023 (Ejemplar Dedicado a: LATAM VI; 1–13), 4(2), 417. <https://doi.org/10.56712/latam.v4i2.1032>
- Gutiérrez, J., Chica, E., & Pérez, J. F. (2023). Análisis de varianza y coeficiente de variación como criterios de repetibilidad de una estufa de cocción basada en

- gasificación de pellets. *Revista UIS Ingenierías*, 22(3).  
<https://doi.org/10.18273/revuin.v22n3-2023009>
- Gutiérrez, S. (2001). Laboratorio De Microbiología Preparación De Medios De Cultivo. *Organización Panamericana de Salud*, 1(1).
- Guzmán Duchén, D., & Montero Torres, J. (2021). Interacción de bacterias y plantas en la fijación del nitrógeno. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 8(2). <https://doi.org/10.53287/uyxf4027gf99e>
- Habbadi, K., Duplay, Q., Chapulliot, D., Kerzaon, I., Benkirane, R., Benbouazza, A., Wisniewski-Dyé, F., Lavire, C., Achbani, E. H., & Vial, L. (2020). Characterization and phylogenetic diversity of *Allorhizobium vitis* isolated from grapevine in Morocco. *Journal of Applied Microbiology*, 128(3).  
<https://doi.org/10.1111/jam.14523>
- Hamza, T. A., Hussein, Z., Mitku, R., Ayalew, P., & Belayneh, T. (2017). Isolation and Characterization of Nitrogen Fixing Bacteria from Rhizosphere Soil Collected from Shell Mele Agricultural Center, Southern Ethiopia. *Journal of Agricultural Science and Food Technology*, 3(7).
- Haskett, T. L., Karunakaran, R., Batista, M. B., Dixon, R., & Poole, P. S. (2022). Control of nitrogen fixation and ammonia excretion in *Azorhizobium caulinodans*. *PLoS Genetics*, 18(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010276>
- He, S., Simpson, B. K., Sun, H., Ngadi, M. O., Ma, Y., & Huang, T. (2018). *Phaseolus vulgaris* lectins: A systematic review of characteristics and health implications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(1).  
<https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1096234>
- Henri. (2018). Nitrificación–Desnitrificación (NDN). *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952.
- Hernández, M. (2020). Preparación De Medios De Cultivo Medios De Cultivo. *Ugr.Es*.
- Hernández, V. M. (2015). Caracterización proteómica de *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*. *Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos Universidad Politécnica de Madrid*.

- Herrera, L. M., & Campos, M. (2005). *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños / 40 (1) 2005 Control de la Calidad para un Laboratorio de Microbiología.*
- Hill, Y., Colombi, E., Bonello, E., Haskett, T., Ramsay, J., O'Hara, G., & Terpolilli, J. (2021). Evolution of Diverse Effective N<sub>2</sub>-Fixing Microsymbionts of *Cicer arietinum* following Horizontal Transfer of the *Mesorhizobium ciceri* CC1192 Symbiosis Integrative and Conjugative Element. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(5). <https://doi.org/10.1128/AEM.02558-20>
- Huerta Lara, M., Reyes-López, D., Bautista-Calles, J., Hernández Zepeda, J. S., Parraguirre Lezama, J. C., & Romero Arenas, O. (2021). Supervivencia y rendimiento de variedades de frijol con resistencia horizontal a estrés hídrico en la Sierra Nororiental de Puebla. *Nova Scientia*, 13(27). <https://doi.org/10.21640/ns.v13i27.2920>
- Hunt, Santana. (2020). *El Ciclo del Nitrógeno. The Nitrogen Cycle*. 32.
- IFA, & FAO. (1992). *Los fertilizantes y su uso*. <http://www.fertilizer.org>,
- Ipaz Cuastumal, C. M., Gómez-Ramírez, L. F., & Tauta Muñoz, J. L. (2023). Productividad hídrica de *Megathyrsus maximus* cv bajo fertirriego en un suelo con pH variable en el Caribe seco colombiano. *Ingeniería y Competitividad*, 25(3). <https://doi.org/10.25100/iyc.v25i3.13019>
- Isidra Arellano, M. C., & Valdés López, O. (2022). *¿Cómo controlan las leguminosas el número de nódulos para evitar comprometer su crecimiento y desarrollo?*
- Jacob, F. F., Striegel, L., Rychlik, M., Hutzler, M., & Methner, F. J. (2019). Spent yeast from brewing processes: A biodiverse starting material for yeast extract production. *Fermentation*, 5(2). <https://doi.org/10.3390/fermentation5020051>
- Jarvis, B. D. W., Van Berkum, P., Chen, W. X., Nour, S. M., Fernandez, M. P., Cleyet Marel, J. C., & Gillis, M. (1997). Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(3), 895–898. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-3-895>

- Junges, A. L. (2023). O ‘efeito estufa’ numa perspectiva histórica: Jean Baptiste Joseph Fourier e o problema da temperatura terrestre. *A Física Na Escola*, 21. <https://doi.org/10.59727/fne.v21i1.105>
- Kawaka, F., Dida, M. M., Opala, P. A., Ombori, O., Maingi, J., Osoro, N., Muthini, M., Amoding, A., Mukaminega, D., & Muoma, J. (2014). Symbiotic Efficiency of Native Rhizobia Nodulating Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Soils of Western Kenya. *International Scholarly Research Notices*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/258497>
- Kebede, E., Amsalu, B., Argaw, A., & Tamiru, S. (2022). Nodulation potential and phenotypic diversity of rhizobia nodulating cowpea isolated from major growing areas of Ethiopia. *Agrosystems, Geosciences and Environment*, 5(4). <https://doi.org/10.1002/agg2.20308>
- Khalil, R., Haroun, S., Bassyoini, F., Nagah, A., & Yusuf, M. (2021). Salicylic acid in combination with kinetin or calcium ameliorates heavy metal stress in *Phaseolus vulgaris* L. plant. *Journal of Agriculture and Food Research*, 5. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2021.100182>
- Klepa, M. S., Helene, L. C. F., O’hara, G., & Hungria, M. (2022). *Bradyrhizobium cenepequi* sp. nov., *Bradyrhizobium semiaridum* sp. nov., *Bradyrhizobium hereditatis* sp. nov. and *Bradyrhizobium australafricanum* sp. nov., symbionts of different leguminous plants of Western Australia and South Africa and definition of three novel symbiovars. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(7). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005446>
- Klepa, M. S., Helene, L. C. F., O’hara, G., & Hungria, M. (2021). *Bradyrhizobium agreste* sp. Nov., *Bradyrhizobium glycinis* sp. nov. and *Bradyrhizobium diversitatis* sp. nov., isolated from a biodiversity hotspot of the genus glycine in Western Australia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(3). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004742>
- Kondorosi, E., Mergaert, P., & Kereszt, A. (2013). A Paradigm for endosymbiotic life: Cell differentiation of *rhizobium* bacteria provoked by host plant factors. *Annual Review of Microbiology*, 67, 611–628.

- Kumar, S. C., Singh, P., Kumar, M., Singh Rajawat, M. V., Ansari, W. A., Rao, D. L. N., & Saxena, A. K. (2023). Population and diversity of *Pigeonpea rhizobia* from the Indo-Gangetic plains of India. *Symbiosis*, 90(2). <https://doi.org/10.1007/s13199-023-00931-x>
- Labandera, C. (2003). SOJA: Inoculantes e Inoculación. *Revista Del Plan Agropecuario*.
- Laffont, C., & Frugier, F. (2024). *Rhizobium* symbiotic efficiency meets CEP signaling peptides. *New Phytologist*, 241(1). <https://doi.org/10.1111/nph.19367>
- Lara Capistrán, L., Hernández Montiel, L. G., Reyes Pérez, J. J., Preciado Rangel, P., & Zulueta Rodríguez, R. (2019). Respuesta agronómica de *Phaseolus vulgaris* L. a la biofertilización en campo. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(5). <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i5.936>
- Laranjo, M., Alexandre, A., & Oliveira, S. (2014). Legume growth-promoting rhizobia: an overview on the *Mesorhizobium* genus. *Microbiological Research*, 169(1), 2–17. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2013.09.012>
- Lei, Z., Li, Q., Tang, Y., Zhang, H., Han, C., Wang, X., Zhao, X., & Shi, G. (2022). Selenium enhanced nitrogen accumulation in legumes in soil with rhizobia bacteria. *Journal of Cleaner Production*, 380, 134960. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2022.134960>
- León de la Rocha, J. F., Díaz López, E., Bravo Delgado, H. R., Báez Rodríguez, I., Francisco, N., & Morales Ruiz, A. (2023). Plasticidad fenotípica del frijol bajo cuatro niveles de nitrógeno en Tehuacán. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 14(2). <https://doi.org/10.29312/remexca.v14i2.3138>
- Lépiz Ildefonso, R., Chavarín Espinoza, I. E., López Alcocer, J. de J., & Rodríguez Guzmán, E. (2018). ACUMULACIÓN DE MATERIA SECA DURANTE LAS ETAPAS DE DESARROLLO DE VARIEDADES DE FRIJOL. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 41(3). <https://doi.org/10.35196/rfm.2018.3.275-283>
- Li, F., Yu, L., Su, X. Y., Wang, Q. Z., Huang, S. S., Qin, X. L., & Tuo, L. (2023). *Allorhizobium sonneratae* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from the root of *Sonneratia apetala*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 73(2). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005641>

- Li, J., Zhang, B., Wang, B., & Zhang, X. (2022). Pd nanoparticles supported over agar-agar functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> as a biodegradable composite nanomedicine for the in-vitro anti-human oral cancer application. *Journal of Materials Research and Technology*, 21. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2022.11.086>
- Lima, L. J. B., & Hamzagic, M. (2022). Gases de efeito estufa e poluição do ar: semelhanças e diferenciais. *Revista Científica Multidisciplinar Núcleo Do Conhecimento*. <https://doi.org/10.32749/nucleodoconhecimento.com.br/meio-ambiente/gases-de-efeito-estufa>
- Liu, L., Shi, S., Liang, L., Xu, L., Chi, M., Zhang, X., & Li, L. (2020). Neorhizobium lilium sp. nov., an endophytic bacterium isolated from *Lilium pumilum* bulbs in Hebei province. *Archives of Microbiology*, 202(3). <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01774-1>
- Lloret, L., & Martínez-Romero, E. (2005). edigraphic.com microbiología. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. Lloret, L. y Martínez-Romero, E., 47 No.1-2(Evolución y filogenia de *Rhizobium*).
- López, A., Meléndez, E., & Gámez, J. (2018). Esterilidad comercial de una conserva enlatada de lomos curados de curito (*Hoplosternum littorale*). *Revista MANGIFERA*, 1(June).
- López Méndez, L. (2023). Arroyo Lemus, E. Manual para el rescate de colecciones patrimoniales en caso de desastres por fenómenos naturales. Pintura mural. *Revista PH*. <https://doi.org/10.33349/2023.109.5309>
- López Soto, N., & Ruiz Fierro, A. (2024). Aislamiento y caracterización molecular de microorganismos obtenidos de nódulos de frijol en el norte de Sinaloa, México. *Ra Ximhai*, 83–101. <https://doi.org/10.35197/RX.20.03.2024.04.NL>
- Macas Guamán, K., & Granja, F. (2022). Influencia de podas y nutrición nitrogenada en el desarrollo vegetativo del arándano (*Vaccinium corymbosum* L. cv. Biloxi). *CEDAMAZ*, 12(2). <https://doi.org/10.54753/cedamaz.v12i2.1325>
- Macías Duarte, R., Grijalva Contreras, R. L., Robles Contreras, F., Núñez Ramírez, F., Cárdenas Salazar, V. A., & Mendóza Pérez, C. (2021). Índice SPAD, nitratos y rendimiento en sorgo en respuesta al suministro de nitrógeno. *Agronomía Mesoamericana*. <https://doi.org/10.15517/am.v32i1.39712>

- MAG. (2024). *Productores buscan elevar volumen de producción de frejol – Ministerio de Agricultura y Ganadería*. <https://www.agricultura.gob.ec/productores-buscan-elevar-volumen-de-produccion-de-frejol/>
- Malvarez, R. A., Cossoli, M. R., Romero, A. M. E., & Iglesias, M. C. (2017). Inoculación de *Prosopis alba* con rizobios aislados a partir de plantas trampa de *Vigna unguiculata*. *Agrotecnia*, 25. <https://doi.org/10.30972/agr.0252487>
- Marchetti, F. F., Cassia Santos Araújo Lopes, K., Guyot, M., Sorrentino, M., & Rogério Lopes, P. (2023). AGROECOLOGIA. *Revista Brasileira de Agroecologia*, 18(1). <https://doi.org/10.33240/rba.v18i1.23714>
- Marín-Garza, T., Gómez-Merino, F. C., Aguilar-Rivera, N., Murguía-González, J., Trejo-Téllez, L. I., Pastelín-Solano, M. C., & Castañeda-Castro, O. (2018). Composición bioactiva de hojas de café durante un ciclo anual. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 41(4). <https://doi.org/10.35196/rfm.2018.4.365-372>
- Martín Alonso, N. J., Llerena Hidalgo, Á. B., & Acosta Mesa, J. L. (2018). Influencia de los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA), Abonos Orgánicos y Sacarosa en el cultivo del fríjol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Alternativas*, 19(2). <https://doi.org/10.23878/alternativas.v19i2.233>
- Martín, G. M., Rivera, R. A., & Mujica, Y. (2007). Estimación de la fijación biológica del nitrógeno de la *Canavalia ensiformis* por el método de la diferencia de N total. *Cultivos Tropicales*, 28.
- Medina Flores, Randalth. C., Bárcenas, Miguel. J., Sánchez Miranda, María. D., Lagos Morales, A. T., & Aquino Jiménez, M. (2023). Evaluación del potencial de hongos micorrizas y bacterias *Rhizobium* spp. en el desarrollo fenológico y rendimiento del cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Nexo Revista Científica*, 36(06). <https://doi.org/10.5377/nexo.v36i06.17436>
- Medina, M. (2012). Medios de Cultivo en un Laboratorio de Microbiología. *Revista de Investigación*, 2(4).
- Meenu, M., Chen, P., Mradula, M., Chang, S. K. C., & Xu, B. (2023). New insights into chemical compositions and health-promoting effects of black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Frontiers*, 4(3). <https://doi.org/10.1002/fft2.246>

- Menichelli García, D., Novaira, A. I., Malpassi, R. N., Grassi, E. M., Aguirre, L. E., Castillo, E. A., di Santo, H. E., Gorjon, J. F., Ganum Gorriz, M. J., del Basconsuelo, S. C., Grossi Vanacore, M. F., & Bianco, L. (2023). Evaluation of the biological Nitrogen fixation of *Adesmia bicolor* (Leguminosae) associated with *Festuca arundinacea* (Gramineae). *Lilloa*, 60(2), 335–347. <https://doi.org/10.30550/J.LIL/1855>
- Mercado, M. I., Buedo, S. E., González, D. A., Powell, P. A., & González, J. A. (2023). Estrategias fotosintéticas y morfo-anatómicas foliares de *Ligustrum sinense* (Oleaceae), una especie exótica invasora en el sotobosque de la selva de yungas. *Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica*, 58(2). <https://doi.org/10.31055/1851.2372.v58.n2.40335>
- Microkit, S. L. (2017). *Rhizobium Agar Usal*. <http://www.microkit.es>
- Montaño, N. M., Ayala, F., Bullock, S. H., Briones, O., Oliva, F. G., Sánchez, R. G., Maya, Y., Perroni, Y., Siebe, C., Torres, Y. T., & Troyo, E. (2016). Almacenes Y Flujos De Carbono En Ecosistemas Áridos Y Semiáridos De México: Síntesis Y Perspectivas. *Terra Latinoamericana*, 34.
- Montero Recalde, M., Vayas, L., Avilés Esquivel, D., Pazmiño, P., & Erazo Gutierrez, V. (2018a). Evaluación de dos métodos para medir la sensibilidad de inhibición de crecimiento de la cepa certificada de *Staphylococcus aureus* subsp. aureus. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 29(4). <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i4.15185>
- Montero Recalde, M., Vayas, L., Avilés Esquivel, D., Pazmiño, P., & Erazo Gutierrez, V. (2018b). Evaluation of two methods for measuring the sensitivity of growth inhibition of the certified *Staphylococcus aureus* subsp. Aureus Strain. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 29(4). <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i4.15185>
- Morel López, E., Pistilli, R. E., Barrios Valiente, E., Caballero Casuriaga, O., Servin, A., Dasilva, M. O., Lugo, W., & Huerta, Á. (2021). Eficacia de biofertilizantes en la producción de variedades de fréjol. *Idesia (Arica)*, 39(3). <https://doi.org/10.4067/s0718-34292021000300013>

- Muñoz Jáuregui, A. M., Ramos, F., & Ortiz Ureta, C. A. (2009). Evaluación del contenido nutricional de algunos alimentos consumidos por los pobladores de la región Selva. *Horizonte Médico (Lima)*, 9(2). <https://doi.org/10.24265/horizmed.2009.v9n2.08>
- Muriady, Meilina, H., & Faisal, M. (2022). Antibacterial activity of liquid smoke powder from rice husk. *International Journal of GEOMATE*, 23(95). <https://doi.org/10.21660/2022.95.7522>
- Nápoles, M. C., Martínez, J., Costales, D., Gómez, G., & Somers, E. (2006). Efecto de diferentes medios de cultivo en la multiplicación celular de *Bradyrhizobium elkanii*. *Cultivos Tropicales*, 27(1).
- Nápoles Vinent, S., Milanes Riquene, S., González Cobas, L., Alarcón Méndez, C. O., Fernández Aguilera, R. de J., & González Aguilera, J. (2021). Inoculación de rizobios favorecen el crecimiento de plántulas de *Coffea arabica* L. injertadas en vivero. *Research, Society and Development*, 10(6). <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i6.15722>
- Oña Villarreal, H., & Ruales de Oña, K. (1988). *Historia y geografía de la Provincia de Imbabura* - Google Books. [https://www.google.com.ec/books/edition/Historia\\_y\\_geograf%C3%ADa\\_de\\_la\\_Provincia\\_de/Ei8xAAAAIAAJ?hl=es-419&gbpv=1&bsq=provincia+de+imbabura&dq=provincia+de+imbabura&printsec=frontcover](https://www.google.com.ec/books/edition/Historia_y_geograf%C3%ADa_de_la_Provincia_de/Ei8xAAAAIAAJ?hl=es-419&gbpv=1&bsq=provincia+de+imbabura&dq=provincia+de+imbabura&printsec=frontcover)
- Ortega Centeno, S., Guillén Sánchez, D., Ramos García, M., Troncoso Rojas, R., Villanueva Arce, R., Bosquez Molina, E., Barrera Necha, L., & Bautista Baños, S. (2010). *Métodos de inoculación y evaluación de extractos botánicos e isotiocianatos de la familia Brassicacea en el control de la roya del gladiolo*. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1027-152X2010000100003](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2010000100003)
- Ortega García, M., Ríos Rocafull, Y., Zelaya Molina, L., Lara Aguilera, J., Ortega Garibay, R., & Nápoles García, M. C. (2023). Identificación de rizobios promotores del crecimiento vegetal asociados a garbanzo (*Cicer arietinum* L.). *Agronomía Mesoamericana*. <https://doi.org/10.15517/am.v34i2.50929>

- Osorio, R. D. (2009). Practice 2 density of liquids. *Manual of Chemical Laboratory Techniques*, 48–53.  
[https://books.google.com/books/about/Manual\\_de\\_t%C3%A9cnicas\\_de\\_laboratorio\\_qu%C3%ADmicos.html?hl=es&id=vvwFC4vNUC](https://books.google.com/books/about/Manual_de_t%C3%A9cnicas_de_laboratorio_qu%C3%ADmicos.html?hl=es&id=vvwFC4vNUC)
- Paredes, M. C. (2013). Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas. *Universidad Católica de Argentina*.
- Parts, G. (2005). Medios de cultivo. *Microbiología Clínica*.
- Peña-Betancourt, S. D., & Conde-Martínez, V. (2012). Contenido de aflatoxinas y proteína en 13 variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(1), 201–206.  
<https://doi.org/10.29312/REMEXCA.V3I1.1494>
- Pérez, G., Gómez, G., Nápoles, M. C., & Morales, B. (2008). Aislamiento y caracterización de cepas de rizobios aisladas de diferentes leguminosas en la región de Cascajal, Villa Clara. *Pastos y Forrajes*, 31(2).
- Pérez Matos, A. (2020). *Evaluación de cinco cultivares de frijol común (Phaseolus vulgaris L.): fundamentos teóricos*. 42. <https://elibro.net/es/ereader/uce/71667>
- Pérez, R., Pérez Martínez, S., & Almeida Acosta, I. (2021). Efecto de la inoculación de PGPR aisladas de maíz en el crecimiento de este cultivo bajo condiciones controladas. *Cultivos Tropicales*, 42(3).
- Pérez Uz, B. (2010). Metodología de esterilización en el laboratorio microbiológico. *Reduca (Biología). Serie Microbiología*, 3(5).
- Pérez, Y. T. A., & Sánchez, G. P. Z. (2021). Custodios de variedades de frijol (*Phaseolus lunatus*, *P. coccineus*, *P. vulgaris*) y prácticas de conservación en Antioquia, Colombia. *Sociedad y Ambiente*, 24, 1–28.  
<https://doi.org/10.31840/SYA.VI24.2230>
- Perticari, A. (2006). Pasturas De Alfalfa: Importancia De Una Adecuada Inoculación. *Segundo Congreso Nacional de Conservación y Uso de Forrajes.*, 40.
- Perusia, O., & Rodríguez, R. (2017). Nitratos y nitritos. *Sociedad Mexicana de Toxicología*.

- Pervin, S., Jannat, B., & Sanjee, S. Al. (2017). Characterization of Rhizobia from Root Nodule and Rhizosphere of *Lablab purpureus* and *Vigna sinensis* in Bangladesh. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 5(1). <https://doi.org/10.24925/turjaf.v5i1.14-17.743>
- Pliego, L., Ocaña, A., & Lluch, C. (2003). Crecimiento, fijación de nitrógeno, acumulación y asimilación de nitratos con dosis de nitrógeno en frijol. Growth, Nitrogen Fixation, Nitrate Accumulation and Assimilation with Nitrogen Levels in Common. *Terra Latinoamericana*, 21.
- Prema Nandini, R. Sujatha. (2023). “Phenotypic evaluation of antifungal susceptibility pattern of candida albicans isolated from different clinical samples by kirby-bauer disc diffusion and broth microdilution method to fluconazole and amphotericin b.” *Journal of Pharmaceutical Negative Results*. <https://doi.org/10.47750/pnr.2023.14.02.337>
- Quevedo, C. A., Cristancho, E. A., & Ahumada, D. A. (2021). Guía para la determinación de materia seca en aguacate Hass por secado en estufa convencional. In *Instituto Nacional de Metrología* (Vol. 26).
- Quevedo, C., Morales, S., & Acosta, A. (2008). Crecimiento de *scenedesmus sp* en diferentes medios de cultivo para la *scenedesmus sp* growth in different culture mediums. *Vitae, Revista de La Fac. de Medicina Farmaceutica*, 15(1).
- Ramirez Gil, R. J. (2021). Evaluación del desempeño térmico de una estufa solar parabólica. *LADDE*, 2(2). <https://doi.org/10.17981/ladee.02.02.2022.02>
- Ramos Payán, M. D., & Ocaña González, J. A. (2022). Separación de los compuestos inorgánicos que forman parte de una muestra sólida empleando diferentes disolventes de manera sucesiva. *Portal de Vídeo Didáctico de La Universidad de Sevilla*. <https://doi.org/10.35466/vid2022n7279>
- Remans, R., Croonenborghs, A., Torres Gutierrez, R., Michiels, J., & Vanderleyden, J. (2007). Effects of plant growth-promoting *rhizobacteria* on nodulation of *Phaseolus vulgaris* L. are dependent on plant P nutrition. *New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research*, 341–351. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6776-1\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6776-1_9)

- Rey, A. M., Chamorro, D. R., & Ramirez, M. (2005). Efecto de la doble inoculación de rizobios y micorrizas sobre la producción y calidad del forraje de *Leucaena leucophala*. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 6(2). [https://doi.org/10.21930/rcta.vol6\\_num2\\_art:49](https://doi.org/10.21930/rcta.vol6_num2_art:49)
- Richland College. (2011). Kirby-Bauer Test for Antibiotic Susceptibility. *Kirby-Bauer Test for Antibiotic Susceptibility*.
- Ríos Betancourt, M. J., Quirós Dávila, J. E., & Arias Restrepo, J. H. (2003). *Frijol - Google Books*. <https://www.google.com.ec/books/edition/Frijol/ZiXT4hxZIEgC?hl=es-419&gbpv=1&dq=requiremientos+nutricionales+del+frijol&pg=PA20&printsec=frontcover>
- Ríos Ruiz, W. F., Valdez Nuñez, R. A., Bedmar, E. J., & Castellano Hinojosa, A. (2019). *Utilization of Endophytic Bacteria Isolated from Legume Root Nodules for Plant Growth Promotion*. 145–176. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-30926-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-30926-8_6)
- Risco Arias, D., Gutiérrez Albán, A. C., & Buenaño Sánchez, M. E. (2016). Crecimiento, producción y calidad en brócoli cultivado bajo diferentes dosis de abono nitrogenado. *Investigación Agraria*, 18(1). <https://doi.org/10.18004/investig.agrar.2016.junio.44-48>
- Rodríguez, C., & Zhurbenko, R. (2018). Manual de medios de cultivo. *BioCen*, 2(4).
- Rodríguez, G., Gómez, A., Anaya, J., Velásquez, C., & Miniet, A. (2021). Elaboración de medios de cultivo alternativos y viables para el crecimiento microbiano del *Bacillus Subtilis*. *La U Investiga*, 8(1). <https://doi.org/10.53358/lauinvestiga.v8i1.472>
- Rodríguez Guarnizo, J. (1995). *Estequiometría química: (leyes fundamentales de la Química; Teoría Atómico-molecular)*. 100–106. <https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=dYdElFxneloC&oi=fnd&pg=PA115&dq=estequiometria+quimica&ots=u2ah6Aemnr&sig=Wm3cuTG0x0vc2X7jZcpr9Rnf2JQ#v=onepage&q=estequiometria%20quimica&f=false>
- Rojas, D. F., Garrido, M. F., & Bonilla, R. R. (2009). Estandarización de un medio de cultivo complejo para la multiplicación de la cepa C50 de *Rhizobium* spp. *Ciencia*

- Romero Torres, N., & Sandoval Herrera, J. A. (2024). Biofertilizante a partir de *Chlorella vulgaris*. *Revista Mutis*, 14(1). <https://doi.org/10.21789/22561498.2048>
- Rubén Ismael Rivera Vásquez, L., & Enrique Pedroza Pacheco, M. (2020). Evaluación de la Soberanía y Seguridad Alimentaria y Nutricional de las familias en las comunidades rurales del municipio de La Concepción, departamento de Masaya en el periodo de mayo a diciembre del año 2015. *Revista Torreón Universitario*, 9(24), 69–83. <https://doi.org/10.5377/TORREON.V9I24.9725>
- Samputri, R. D., Toemon, A. N., & Widayati, R. (2020). Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol biji kamandrah (*Croton tilgium* L.) Terhadap Pertumbuhan *Salmonella typhi* Dengan Metode Difusi Cakram (Kirby-Bauer). *Herb-Medicine Journal*, 3(3). <https://doi.org/10.30595/hmj.v3i3.6393>
- Sangkoy, W. J., Simbala, H. E. I., & Rumondor, E. M. (2023). Aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun pinang yaki (*Areca vestiaria*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa*. *Pharmacon*, 12(1).
- Santos, D., Araújo Amarante, P., & Araújo Amarante, J. C. (2023). Diagnóstico das emissões de gases de efeito estufa pela pecuária paraibana. *Caderno de Geografia*, 33(75). <https://doi.org/10.5752/p.2318-2962.2023v33n75p1359>
- Santos Hidalgo, K., Gavilánez Bunay, T., Salazar Arias, P. J., Andrade Valencia, A. J., & Romero Macías, A. A. (2023). Almacenamiento de semillas de interés agrícola en banco de germoplasma y evaluación agronómica en campo. *Revista Multidisciplinaria Para El Desarrollo Agropecuario, Tecnológico, Empresarial y Humanista*, 5(02).
- Santoyo Pizano, G., Hernández Mendoza, J. L., Márquez Benavides, L., De Luna Esquivel, G., & Sánchez Yáñez, J. M. (2021). *Rhizobium phaseoli* tolerante a un insecticida en el crecimiento de *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 12(1). <https://doi.org/10.36610/j.jsars.2021.120100030>
- Sedolfo José, C.-F., Nancy Coromoto, R.-L., Altamira Rosa, D.-M., & María Carolina, P.-S. (2014). Monitoreo de la remoción biológica de nitrógeno en efluentes de

- tenerías usando un reactor por carga secuencial. *Ingeniería, Investigación y Tecnología*, 15(2). [https://doi.org/10.1016/s1405-7743\(14\)72217-6](https://doi.org/10.1016/s1405-7743(14)72217-6)
- Servín Palestina, M., Salazar Moreno, R., López Cruz, I., Medina García, G., & Cid Ríos, J. Á. (2022). Predicción de la producción y rendimiento de frijol, con modelos de redes neuronales artificiales y datos climáticos. *Biotecnia*, 24(2), 104–111. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v24i2.1664>
- Silva, C. N. da, Lobato, A. C., Lago, R. M., Cardeal, Z. de L., & Quadros, A. L. de. (2009). Ensinando a Química do Efeito Estufa no Ensino Médio: Possibilidades e Limites. *Química Nova Na Escola*, 10(10).
- Silva, M. C. de C., Coelho, F. S., Braun, H., & Fontes, P. C. R. (2011). Índice SPAD em função de diferentes horários e posições no folíolo da batata sob fertilização nitrogenada. *Revista Ciencia Agronómica*, 42(4). <https://doi.org/10.1590/s1806-66902011000400020>
- Silva, R., Grácio, J., Moreira, S., Serra, N., & Chagas, R. (2022). Práticas para a Mitigação do Impacto da Agropecuária nas Alterações Climáticas. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, 7(1).
- Smith, R. S., & Río Escurra, G. A. del. (1982). Título en español. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, 66(4). <https://doi.org/10.46429/jaupr.v66i4.7671>
- Soares, T. C., & Cunha, D. A. da. (2019). Emissões de gases de efeito estufa e eficiencia ambiental no Brasil. *Nova Economía*, 29(2). <https://doi.org/10.1590/0103-6351/3795>
- Soenens, A., Gomila, M., & Imperial, J. (2019). *Neorhizobium tomejilense* sp. nov., first non-symbiotic *Neorhizobium* species isolated from a dryland agricultural soil in southern Spain. *Systematic and Applied Microbiology*, 42(2). <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.09.001>
- Solano Reynoso, W. M., Soca Flores, R., & Torres Huaripaucar, N. (2020). Análisis de las firmas espectrales de algunas especies vegetales mediante sus derivadas, provincia de Huamanga, 2019. *Investigación*, 28(1). <https://doi.org/10.51440/unsch.revistainvestigacion.28.1.2020.383>

- Sosa, A., Bocourt, R., Sarmiento, M., & Noda, A. (2004). Evaluación del método de conservación de rizobios en sílica gel en cepas nativas aisladas de leguminosas rastreras. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 38(4).
- Soto-Regalado, E., Dávi la-Guzmán, N. E., & Cervantes, C. V. (2022). Producción de carbón activado a partir de la cáscara de frijol de soya para su aplicación como adsorbente en el tratamiento de aguas residuales contaminadas con metales pesados. *Química Hoy*, 10(4). <https://doi.org/10.29105/qh10.4-267>
- Spencer, M., Forster, B., & Jankuloski, L. (2021). Manual de mejoramiento por mutaciones. *Organización de Las Naciones Unidas Para La Alimentación y La Agricultura*, 1(3), 1–263. <https://www.fao.org/publications/card/es/c/I9285ES/>
- Taco-Taype, N., & Zúñiga-Dávila, D. (2020). Efecto de la inoculación de plantas de Tarwi con cepas de *Bradyrhizobium* spp. aisladas de un lupino silvestre, en condiciones de invernadero. *Revista Peruana de Biología*, 27(1). <https://doi.org/10.15381/rpb.v27i1.17577>
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). El ácido abscísico: una señal de maduración de la semilla y de antiestrés. *Fisiología Vegetal*, 1338. [https://books.google.com.pe/books?id=7QIbYg-OC5AC&printsec=frontcover&hl=es&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=7QIbYg-OC5AC&printsec=frontcover&hl=es&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
- Tao, Z., Yuan, H., Liu, M., Liu, Q., Zhang, S., Liu, H., Jiang, Y., Huang, D., & Wang, T. (2023). Yeast Extract: Characteristics, Production, Applications and Future Perspectives. In *Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 33, Issue 1). <https://doi.org/10.4014/jmb.2207.07057>
- Técnica Huasco, O., San Joaquín, C., & Postal, A. (1998). *Fondo Nacional de Desarrollo Regional (FNDR) Gobierno Regional de Atacama Comisión Nacional de Riego (CNR) (Departamento de Proyectos) Instituto De Investigaciones Agropecuarias Centro Regional De Investigacion Intihuasi*.
- Tofiño Rivera, A. P., Carbone Murgas, R. E., Melo Ríos, A. E., & Merini, L. J. (2020). Effect of glyphosate on microbiota, soil quality and biofortified bean crop in Codazzi, department of Cesar, Colombia. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(1), 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.01.006>

- Toniutti, M. A., & Fornasero, L. V. (2020). Efecto de la inoculación con rizobios y la fertilización fosfatada sobre la nodulación y producción de alfalfa (*Medicago sativa* L.) en el centro de Santa Fe (Argentina). *AgriScientia*, 37(2). <https://doi.org/10.31047/1668.298x.v37.n2.24067>
- Torres Navarrete, E. D., Sánchez Laiño, A., Cedeño Briones, A., Haro Chong, A., Torres Navarrete, A., González Osorio, B., Quisphe Caiza, D., & Reyes Bermeo, M. (2014). Caracterización de la producción de frijol en la provincia de Cotopaxi Ecuador: caso comuna Panyatug. *Ciencia y Tecnología*, 6(1). <https://doi.org/10.18779/cyt.v6i1.88>
- Torres, R., Pérez, C., & Suárez, N. (2017). Influencia de la inoculación de *Rizobacterias* sobre la germinación de semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *V Congreso Forestal Español. Montes y Sociedad: Saber Qué Hacer*, 30(2).
- Trisia, A., Philyria, R., & Toemon, A. N. (2018a). Antibacterial Activity Test of Ethanol Extract from Kalanduyung Leaf (*Guazuma ulmifolia* Lam.) on *Staphylococcus aureus* growth with Diffussion Method (Kirby-Bauer). *Anterior Jurnal*, 17(2).
- Trisia, A., Philyria, R., & Toemon, A. N. (2018b). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kalanduyung (*Guazuma ulmifolia* Lam.) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus Aureus* Dengan Metode Difusi Cakram (Kirby-Bauer). *Anterior Jurnal*, 17(2). <https://doi.org/10.33084/anterior.v17i2.12>
- Vaishnav, A., Hansen, A. P., Agrawal, P. K., & Choudhary, D. K. (2017). *Perspektif Bioteknologi Legum – RhizobiumSymbiosis*. 247–256.
- Valdez-Nuñez, R. A., Ríos-Ruiz, W. F., & Bedmar, E. J. (2022). Más allá del nódulo: potencial agro-biotecnológico del microbioma endofítico en nódulos simbióticos de leguminosas. *QuantUNAB*, 1(1). <https://doi.org/10.52807/qunab.v1i1.11>
- Valero, N. O., Chima Martínez, K. A., & Gómez, J. A. (2023). Efecto bioestimulante de una chalcona sintética sobre frijol guajiro (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 21(2). <https://doi.org/10.18684/rbsaa.v21.n2.2023.2153>
- Vargas Fernández, J. P., Wang Wong, A., & Muñoz Fonseca, M. (2022). Microorganismos asociados a la enfermedad conocida como pudrición suave del fruto de banano (*Musa sp.*) y alternativas de control microbiológicas y químicas a nivel in vitro. *Agronomía Costarricense*. <https://doi.org/10.15517/rac.v46i2.52046>

- Vargas Vázquez, Ma. L. P., Muruaga Martínez, J. S., Mayek Pérez, N., Pérez Guerrero, A., & Ramírez-Sánchez, S. E. (2018). Caracterización de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.) del Eje Neovolcánico y la Sierra Madre Oriental. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(2). <https://doi.org/10.29312/remexca.v5i2.959>
- Vásquez, S. I., Cossoli, M. R., & Romero, A. M. E. (2023). Efectos de la inoculación con aislamientos de rizobios y su interacción con el basalto sobre el crecimiento de *Medicago polymorpha* L. *Agrotecnia*, 33. <https://doi.org/10.30972/agr.0336894>
- Vega Piqueres, J. M., Márquez Cabeza, A. J., Vígara, J. A., Vilchez Lobato, C., & Garbayo Nores, I. (2021). *Avances en el Metabolismo del Nitrógeno: De los microorganismos a las plantas*. [https://www.google.com.ec/books/edition/AVANCES\\_EN\\_EL\\_METABOLISMO\\_DEL\\_NITR%C3%93GENO/Gt5DEAAAQBAJ?hl=es-419&gbpv=1&dq=\(Vega+Piqueres,+M%C3%A1rquez+Cabeza,+Vígara,+Vilchez+Lobato+y+Garbayo+Nores,+2021\)&pg=PA4&printsec=frontcover](https://www.google.com.ec/books/edition/AVANCES_EN_EL_METABOLISMO_DEL_NITR%C3%93GENO/Gt5DEAAAQBAJ?hl=es-419&gbpv=1&dq=(Vega+Piqueres,+M%C3%A1rquez+Cabeza,+Vígara,+Vilchez+Lobato+y+Garbayo+Nores,+2021)&pg=PA4&printsec=frontcover)
- Vergara Díaz, N. S., Orellana Intriago, F. R., Vizueta Tomalá, V. H., Mata Lopez, D. A., Bernal Paredes, D. A., San Andrés Reyes, P. R., & Terranova Mera, J. (2017). Propuesta de productos alimenticios no tradicionales de fréjol. *INNOVA Research Journal*, 2(1). <https://doi.org/10.33890/innova.v2.n1.2017.111>
- Vieira, K. H., Lima, F. R., Melo, R. de, Pereira, K. C., Oliveira, C. D., Mendes, C. F., Pinto, N. A. V. D., & Souza, P. M. de. (2021). Caracterização da farinha de semente de abóbora obtida por secagem em micro-ondas e estufa / characterization of pumpkin seed flour obtained by drying in microwaves and oven. *Brazilian Journal of Development*, 7(3). <https://doi.org/10.34117/bjdv7n3-100>
- Villanueva, E. E., & Quintana, A. (2012). Aislamiento y selección de bacterias nativas de rizobios fijadores de nitrógeno, a partir de nódulos radiculares de *Phaseolus vulgaris* L. *Rebiol*, 32(1).
- Villarroel Gutiérrez, F. (1984). *El Ecuador que Ud. no ha visto: Imbabura* - Google Books. [https://www.google.com.ec/books/edition/El\\_Ecuador\\_que\\_Ud\\_no\\_ha\\_visto\\_Imbabura/qkVJAQAAIAAJ?hl=es-](https://www.google.com.ec/books/edition/El_Ecuador_que_Ud_no_ha_visto_Imbabura/qkVJAQAAIAAJ?hl=es-)

[419&gbpv=1&bsq=ecuador+provincia+imbabura&dq=ecuador+provincia+imbabura&printsec=frontcover](#)

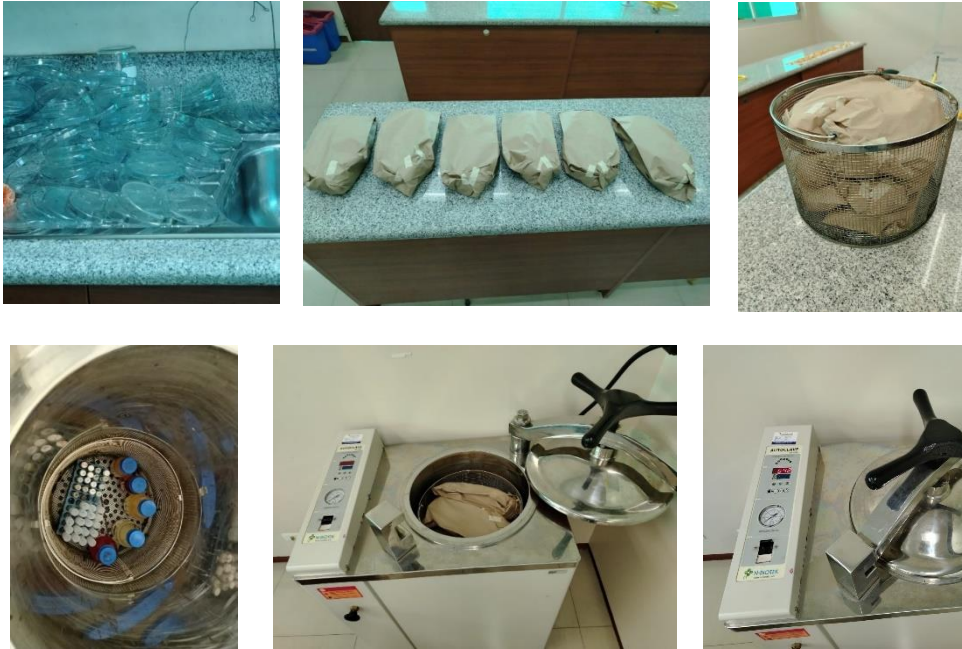
- Vitra. (2022). *La gran importancia del nitrógeno en las plantas*. [www.agrovitra.com](http://www.agrovitra.com).
- Voysesst, O. (2000). *Mejoramiento genético del frijol (Phaseolus vulgaris L.): Legado de variedades de América Latina 1930-1999*. <https://hdl.handle.net/10568/54161>
- Wang, S., Chen, L., Yang, H., Gu, J., Wang, J., & Ren, F. (2020). Regular intake of white kidney beans extract (*Phaseolus vulgaris* L.) induces weight loss compared to placebo in obese human subjects. *Food Science and Nutrition*, 8(3). <https://doi.org/10.1002/fsn3.1299>
- Weil, R. R., & Brady, N. C. (2017). Naturaleza y propiedades de los suelos. *Researchgate*.
- Willems, A. (2006). The taxonomy of rhizobia: An overview. In *Plant and Soil* (Vol. 287, Issues 1–2). <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9058-7>
- Wong Villarreal, A., Méndez, E. S., Hernández Núñez, E., Yáñez Ocampo, G., Giácoman Vallejos, G., González Sánchez, A., Ramírez González, S., Espinosa Zaragoza, S., & López Báez, O. (2017). Degradación de Fenantreno por bacterias del género *Burkholderia* y *Rhizobium* aisladas de nódulos de mimosas. *Nova Scientia*, 9(19). <https://doi.org/10.21640/ns.v9i19.995>
- Yanza, J. P. (2020). Determinación del potencial agrícola del suelo para el cultivo de maíz, papa y frejol a través de datos edafoclimáticos en la parroquia Guaytacama. In *Potencial Agrícola*.
- Young, J. P. W., Jorriin, B., Moeskjær, S., & James, E. K. (2023). *Rhizobium brockwellii* sp. nov., *Rhizobium johnstonii* sp. nov. and *Rhizobium beringeri* sp. nov., three genospecies within the *Rhizobium leguminosarum* species complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 73(7), 005979. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005979/cite/refworks>
- Zayas Infante, S., Boeckx, P., & Vargas Rodriguez, H. (2019). Comportamiento productivo en agroecosistemas de intercalamiento yuca-frijol en el municipio “Calixto García”, provincia Holguín. *Cultivos Tropicales*, 40(1).

## CAPÍTULO IX

### ANEXOS

#### Anexo 1

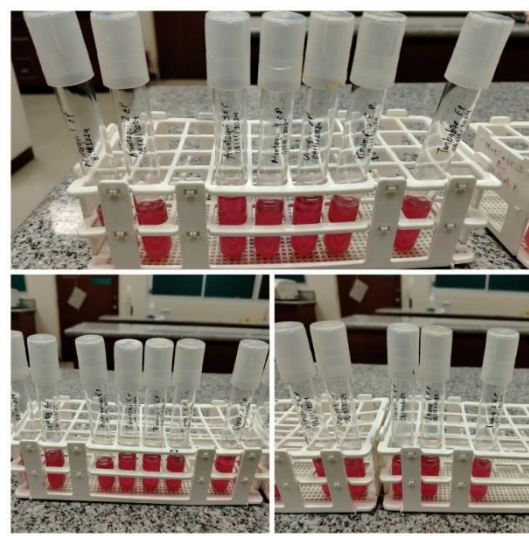
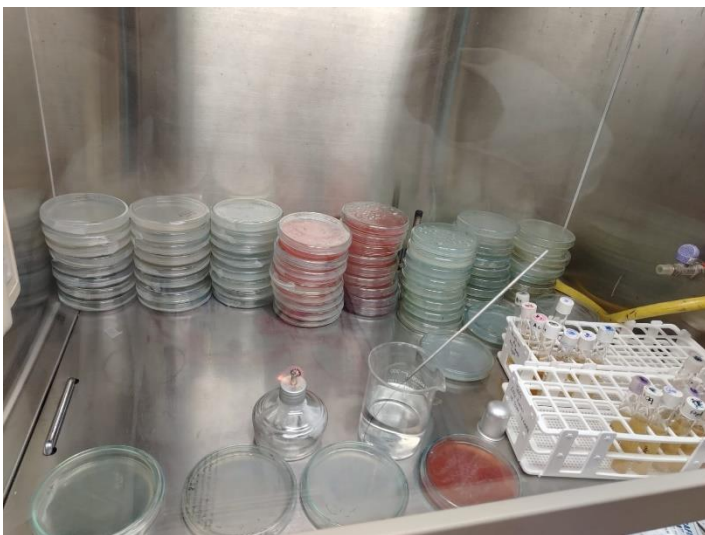
*Fase de laboratorio, limpieza y esterilización de cajas Petri y tubos de ensayo*



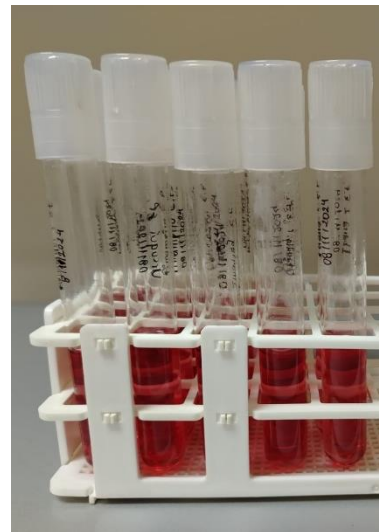
*Preparación de medios de cultivo microbiológicos: Starch Agar, Phenol Red Broth Base, Rhizobium Agar con y sin N, Yeast Mannitol Agar with Congo Red para pruebas presuntivas*



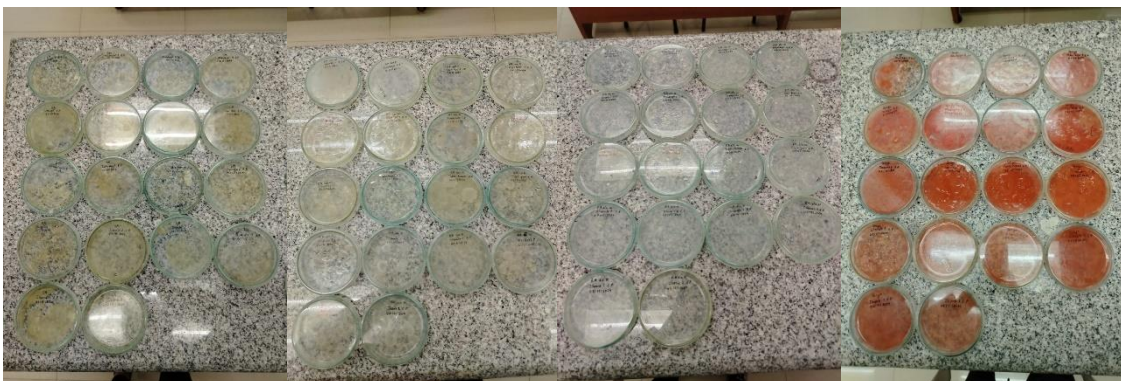
Siembra de cepas de *Rhizobium* spp. por el método de Kirby-Bauer. en cámara de flujo laminar (N-Biotek) y conservación en estufa BioBase modelo BJPX-Spring.



*Análisis mediante espectrofotómetro con muestras de cepas de Rhizobium spp.*



*Pruebas presuntivas realizadas en laboratorio de microbiología.*



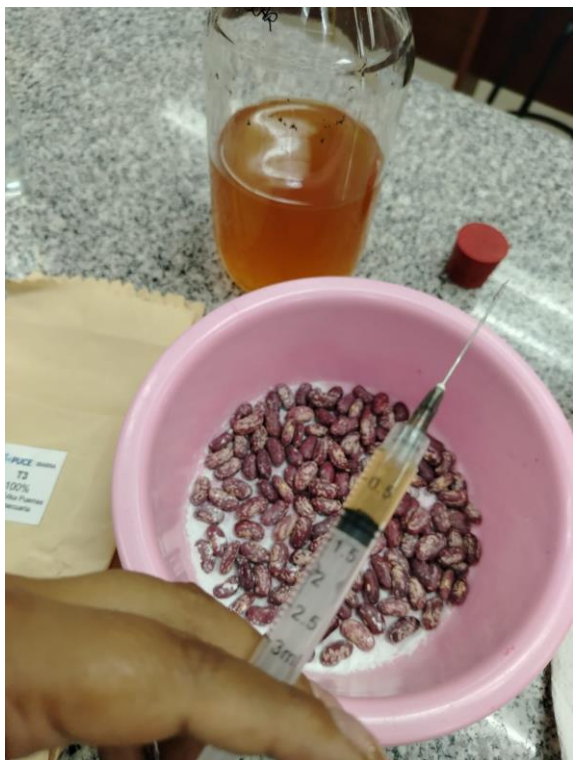
*Medición de halo de inhibición de cepa de Rhizobium spp. de todas las pruebas presuntivas con Calibrador Vernier digital*



*Elaboración de caldo microbiológico y dosis de cepa de Rhizobium spp. en ambiente anaerobio con CO<sub>2</sub>*



*Inoculación de semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con cepa de *Rhizobium* spp. del catón Antonio Ante y talco en relación (1:2)*



## Anexo 2

*Fase dos de campo, acondicionamiento de área de trabajo, llenado y etiquetado de fundas de vivero 9 x14, sorteo de bloques según DBCA, riego por goteo.*



### Anexo 3

Siembra de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad centenario, inoculación con *Rhizobium* spp.



## Anexo 4

*Ciclo fenológico del cultivo de frijol (Phaseolus vulgaris L.) día 1,15,30,45,60*



## Anexo 5

*Actividades de inoculación y medición de altura y clorofila*



## Anexo 6

*Nódulos a los 60 días del cultivo de frijol (Phaseolus vulgaris L.) de T1, T2, T3, T4, T5*



## Anexo 7

*Muestras foliar y radicular antes y después para análisis de Materia seca.*



## Anexo 8

*Datos de las variables medidas durante la investigación*

Tratamiento	Bloque	Altura 15 dds	Altura 30 dds	Altura 45 dds	Altura 60 dds	SPAD 15 dds	SPAD 30 dds	SPAD 45 dds	SPAD 60 dds	Días a la Floración	Días a la formación de vainas	Nódulos 60 dds	Masa foliar 60 dds	
Inoculación	1	17,53	43,69	71,64	75,01	33,91	32,6	35,42	37,66	42,80	47,80	114	6,32	
	2	15,47	40,43	73,37	77,18	34,27	32,59	37,51	38,97	43,90	48,90	128	4,91	
100%	1	16,71	46,57	74,66	79,89	32,37	32,69	39,56	40,57	43,30	47,60	132	10,05	
	2	17,15	40,84	69,72	75,32	34,52	30,67	38,08	37,97	43,80	48,10	177	5,68	
Inoculación 50%	2	16,99	47,26	75,17	77,55	35,41	32,42	35,97	36,89	43,50	47,70	168	4,82	
	2	15,63	49,04	72,72	79,93	35,99	31,6	38,68	40,14	44,30	48,30	175	5,65	
Inoculación 25%	3	18,29	50,27	76,28	80,41	34,3	31,22	40,24	41,2	42,40	46,40	225	4,27	
	3	17,43	45,92	71,98	80,49	35,69	31,74	40,43	40,8	42,50	46,60	223	6,28	
	3	16,93	45,05	68,19	80,03	35,54	32,12	40,00	41,47	42,80	46,00	235	3,7	
Sin fertilización	4	1	22,64	47,15	64,53	66,28	30,41	28,9	30,63	27,48	44,10	48,10	35,25	6,07
	4	2	21,18	43,68	59,15	60,95	32,26	30,75	27,44	25,08	43,70	47,70	36,5	4,69
Con fertilización	4	3	20,71	46,48	60,11	61,94	32,35	29,65	31,62	27,97	44,30	48,30	34,5	5,73
	5	1	20,42	54,79	70,92	75,86	31,62	35,86	38,41	33,73	43,00	45,80	23	6,33
	5	2	20,82	57,92	79,1	80,4	30,97	30,82	38,08	32,14	43,20	47,10	40,75	6,58
	5	3	19,46	53,95	71,9	74,03	30,01	36,18	38,69	33,56	44,30	48,10	45,75	7,12