



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE PUEBLA

PROGRAMA ACADÉMICO DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**“EVALUACIÓN DE BIOFERTILIZANTE A BASE DE BIOCHAR Y *Actinomicetos*
FIJADORES DE NITRÓGENO”**

PROYECTO DE FIN DE CARRERA

PRESENTADO POR:

ISRAEL DE JESUS FLORES

PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

DIRECTOR DEL PROYECTO:

DR. JAVIER CRUZ HERNANDEZ

REVISORES:

M. EN C. LUIS FELIPE PERÉZ HIDALGO

M. EN C. FRANCISCO JAVIER ANAYA PUEBLA

Estadía Profesional, dentro del marco de la Carrera e Ingeniería en Biotecnología, en el Invernadero y laboratorios del Colegio de Posgraduados Campus Puebla. Carretera Federal México – Puebla Km. 125.5, Santiago Momoxpan, C.P 72760 Puebla, Pue.

PUEBLA, PUEBLA, 20 DE AGOSTO DE 2018

El presente proyecto de investigación titulado: “**EVALUACIÓN DE BIOFERTILIZANTE A BASE DE BIOCHAR Y *Actinomicetos* FIJADORES DE NITRÓGENO**” y realizado por **Israel De Jesus Flores**, ha sido revisada y aprobada por el siguiente consejo particular, para obtener el Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Consejo Particular:

Firma

Director: Dr. Javier Cruz Hernández

Revisor: M. en C. Francisco Javier Anaya Puebla

Revisor: M. en C. Felipe Pérez Hidalgo

Puebla, Puebla, México. 20 de Agosto de 2018

El presente trabajo forma parte del Cuerpo Académico denominado: **Ingeniería en Biotecnología** y de la Línea de Investigación: **Evaluación de Fertilizante a Base de Biochar y *Actinomicetos* Fijadores de Nitrógeno**. Dicho trabajo, fue financiado por: **Colegio De Posgraduados Campus Puebla**

DEDICATORIA

- A dios por darme las fuerzas, paciencia, sabiduría y entendimiento para poder salir adelante, por enfrentar cada uno de los obstáculos que se interfirieron en mi camino como estudiante, por no dejarme caer cuando sentía que ya no podía más, por siempre darme la oportunidad de corregir mis errores.
- A mis padres por el apoyo incondicional que siempre me brindaron, por el cariño y paciencia que me tuvieron todos estos años por ver lograr mi objetivo, por darme palabras de apoyo para continuar mi camino, porque siempre me enseñaron el valor de la humildad, por ser los mentores de este gran hombre que ahora soy, a mi madre por creer en mí en todo momento y siempre apoyarme anímicamente, a mi padre por siempre mostrarme la confianza necesaria para seguir adelante GRACIAS, porque siempre están cuando más los necesito. LOS AMO Y ADORO CON TODO EL CORAZON.
- A mis hermanos por siempre mostrarme los caminos que debía tomar, por ser el ejemplo a seguir en esta vida, por sus regaños, por sus obsequios por su apoyo anímico y económico cuando más lo necesitaba, Antonio por demostrarme como ser una persona con principios y valores, a Montserrat por siempre estar ahí con apoyo sobre todas las cosas, por hacerme sonreír cuando más necesitaba y por demostrarme que una hermana vale oro y en especial a mi hermana Gloria muchas gracias por confiar mí, por ser mi ejemplo a seguir, porque eres una mujer única, con capacidades únicas que demuestran ser una Excelente hermana, amiga y consejera.
- A mis amigos que siempre me mostraron que no iba a ser un camino fácil, porque fueron pieza fundamental brindándome apoyo con su amistad y consejos, en especial a mi amigo Juan Antonio con el que obtuve los mejores consejos de vida, a mis compañeros del deporte tan amado por mí que es el futbol. A todos mis amigos que aún siguen sacando las mejores risas de mí Alfredo y Edwin que siempre están presente desde hace muchos años en mi vida.
- A una persona muy especial, que me apoyo brindándome amor y comprensión, gracias Xo por estar conmigo en los momentos que más te necesite y por regañarme cuantas veces fueran necesarias para entender, te admiro, muchas gracias de todo corazón.

- A dos grandes ángeles que me acompañan desde el cielo, que siempre me protegen, que siempre me cuidan en todo momento, porque gracias a ellos obtuve tantas habilidades, gracias a ellos conocí lo que es amor por el prójimo, gracias muchas gracias a mis ABUELOS TERESITA Y MODESTO gracias por dedicarme los mejores años de mi vida, donde sea que se encuentres lo amo con todo el corazón, muchas gracias de verdes abuelitos.
- A mis profesores a cada uno de los profesores por compartir sus experiencias y conocimiento para poder cumplir este objetivo en mi vida; por guiarme en el camino de una ingeniería por inspirarme a ser un mejor estudiante día a día.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a las personas que formaron parte de este recorrido, aquellos que aceptaron y me brindaron apoyo, conocimiento y experiencia.

Al colegio de posgraduados campus Puebla por brindarme la oportunidad de desempeñar mi estadía profesional y de manera especial al director del proyecto Dr. Javier Cruz Hernández por el apoyo incondicional para trabajar a su lado.

A la universidad politécnica de Puebla ya que gracias a sus excelentes instalaciones, tuve la oportunidad de aprender mucho en el transcurso de mi carrera.

Índice

| | |
|---|----|
| RESUMEN..... | 13 |
| I.-INTRODUCCIÓN..... | 14 |
| II.- JUSTIFICACIÓN..... | 15 |
| III.- OBJETIVOS..... | 16 |
| IV.- HIPOTESIS..... | 17 |
| V. REVISIÓN DE LITERATURA..... | 18 |
| 5.1 Definición de biol (digerido de fermentación de estiércol)..... | 18 |
| 5.1.1 Características de un biol..... | 18 |
| 5.1.2 Efecto de biol en germinación..... | 19 |
| 5.2 Biochar..... | 20 |
| 5.2.1 Características del Biochar..... | 21 |
| 5.2.3 Efectos de biochar como fertilizante..... | 23 |
| 5.2.4 Efecto de biochar en Germinación de Cultivos..... | 26 |
| 5.3 Actinomicetos..... | 27 |
| 5.3.1 Aplicaciones de <i>Actinomicetos</i> | 28 |
| 5.3.2 <i>Actinomicetos</i> fijadores de Nitrógeno..... | 29 |
| 5.3.3 Fijación de Nitrógeno..... | 30 |
| 5.4 Biofertilizante Microbianos..... | 33 |
| VI. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 38 |
| 6.1 Sitio de estudio..... | 40 |
| 6.2 Determinación Físicoquímica..... | 40 |
| 6.2.1 pH..... | 40 |
| 6.2.2 Conductividad Eléctrica..... | 41 |
| 6.2.3 Grados Brix..... | 41 |

| | |
|---|----|
| 6.2.4 Determinación de Nitratos (NO ₃) con Kit LAQUAtwin..... | 42 |
| 6.2.5 Materia Orgánica Oxidable | 42 |
| | 44 |
| | 44 |
| 6.2.6 Cenizas | 44 |
| 6.3 Análisis Microbiológico | 45 |
| 6.3.1 Actinomicetos..... | 45 |
| 6.3.2 <i>Actinomicetos</i> Fijadores de nitrógeno..... | 46 |
| 6.3.3 Coliformes totales..... | 47 |
| 6.3.4 E. coli..... | 48 |
| 5.3.5 Levaduras y Mohos | 48 |
| 6.3.6 Bacterias Totales..... | 49 |
| 6.4 Aislamiento, identificación, observación, conservación e inoculación de <i>Actinomicetos</i> fijadores de Nitrógeno..... | 50 |
| 6.4.1 Aislamiento..... | 50 |
| 6.4.2 Identificación..... | 50 |
| 6.4.3 Observación..... | 51 |
| 6.4.4 Conservación..... | 51 |
| 6.4.5 Multiplicación e inoculación | 52 |
| 6.5 Determinación de Toxicidad | 53 |
| 6.5.1 Determinación de toxicidad invernadero..... | 53 |
| 6.5.2 Prueba de toxicidad de digestores | 54 |
| 6.5.3 Determinación de toxicidad en Laboratorio | 55 |
| 6.5.4 Determinación de toxicidad de maíz | 56 |
| 6.6 Análisis Estadístico | 59 |

| | |
|---|----|
| VII. RESULTADOS Y DISCUSION | 59 |
| 7.1 Determinación Microbiológica de 11 digeridos en combinación con biochar a distintas concentraciones, y con y sin inoculación de <i>Actinomicetos</i> Fijadores de N ² | 59 |
| 7.1.1 Bacterias totales de 11 digeridos en combinación con biochar a distintas concentraciones, y con y sin inoculación de <i>Actinomicetos</i> Fijadores de N ² | 60 |
| 7.1.2 Hongos y Levaduras de 11 digeridos en combinación con biochar a distintas concentraciones, y con y sin inoculación de <i>Actinomicetos</i> Fijadores de N ² | 61 |
| 7.1.3 Coliformes totales de 11 digeridos en combinación con biochar a distintas concentraciones, y con y sin inoculación de <i>Actinomicetos</i> Fijadores de N ² | 61 |
| 7.1.4 <i>E. coli</i> de 11 digeridos en combinación con biochar a distintas concentraciones, y con y sin inoculación de <i>Actinomicetos</i> Fijadores de N ² | 62 |
| 7.1.5 <i>Actinomicetos</i> totales de 11 digeridos en combinación con biochar a distintas concentraciones, y con y sin inoculación de <i>Actinomicetos</i> Fijadores de N ² | 63 |
| 7.1.6 <i>Actinomicetos</i> fijadores de nitrógeno de 11 digeridos en combinación con biochar a distintas concentraciones, y con y sin inoculación de <i>Actinomicetos</i> Fijadores de N ² | 64 |
| 7.2. Bioensayo de laboratorio de digerido ovino y vacuno con inoculación y a distintas concentraciones de biochar..... | 66 |
| VIII.- CONCLUSIÓN | 62 |
| IX BIBLIOGRAFIA..... | 71 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|---|--------------------------------------|
| Tabla 1 Composición bioquímica de biol Fuente (Suchest, 2013)..... | 18 |
| Tabla 2 Características de Streptomyces | 67 |
| Tabla 3 Contenido de digestor..... | 52 |
| Tabla 4 Determinación de toxicidad en invernadero..... | 54 |
| Tabla 5 Determinación de toxicidad en digestores de semilla rábano (Raphanus sativus) .. | 55 |
| Tabla 6 Determinación de toxicidad en laboratorio de semilla de rábano (Raphanus sativus), cebolla (Allium cepa)..... | 56 |
| Tabla 7 Determinación de toxicidad en laboratorio de semilla de Maíz (Zea maíz)..... | 57 |
| Tabla 8 Tabla 9 componentes del medio Ashby..... | ¡Error! Marcador no definido. |

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

| | |
|---|----|
| Ilustración 1 Biol (digerido de fermentación de estiércol Vacuno) Colpos campus puebla | 20 |
| Ilustración 2 Biochar esterilizado Colegio de Posgraduados Campus Puebla. | 22 |
| Ilustración 3 efectos del uso de biochar como enmienda orgánica de suelos..... | 24 |
| Ilustración 4 Producción de biochar de origen en la pirolisis de cualquier tipo de biomasa. | 25 |
| Ilustración 5 Efecto en suelo por biochar | 26 |
| Ilustración 6 Ciclo de germinación de Actinomicetos..... | 29 |
| Ilustración 7 Ciclo del Nitrógeno | 33 |
| Ilustración 8 Actinomicetos A) Actinomicetos Colpos Campus puebla B) Actinomicetos manual de Bergey | 66 |
| Ilustración 9 Turba biofertilizante más comercial..... | 34 |
| Ilustración 10 Colegio de Posgraduados Campus Puebla | 40 |
| Ilustración 11 Medición de pH y CE | 41 |
| Ilustración 12 Medición de grados Brix | 42 |
| Ilustración 13 Kit LAQUAtwin con buffer 150 ppm NO3 | 42 |
| Ilustración 14 Determinación de materia orgánica..... | 44 |
| Ilustración 15 Determinación de cenizas..... | 45 |
| Ilustración 16 Contador electrónico y cuantificación de Actinomicetos totales. | 46 |
| Ilustración 17 Actinomicetos fijadores de nitrógeno..... | 47 |
| Ilustración 18 Cuantificación de coliformes totales | 47 |

| | |
|---|----|
| Ilustración 19 E coli en placa con medio EPD | 48 |
| Ilustración 20 Cuantificación de levaduras y mohos en agar PDA acidificado | 49 |
| Ilustración 21 Cuantificación de bacterias totales en agar nutritivo..... | 49 |
| Ilustración 22 Aislamiento Actinomicetos fijadores de nitrógeno en agar Ashby..... | 50 |
| Ilustración 23 Técnica de micro cultivo | 51 |
| Ilustración 24 Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno..... | 51 |
| Ilustración 25 Método de conservación agua estéril | 52 |
| Ilustración 26 Digestores | 52 |
| Ilustración 27 Prueba toxicidad Invernadero..... | 53 |
| Ilustración 28 Prueba toxicidad Laboratorio | 55 |
| Ilustración 29 Prueba toxicidad de Maíz | 57 |
| Ilustración 30 Cuantificación Log UFC/g de bacterias totales a 11 tratamientos de digeridos | 60 |
| Ilustración 31 Cuantificación Log UFC/g de Hongos y Levaduras a 11 tratamientos de digeridos | 61 |
| Ilustración 32 Cuantificación Log UFC/g de coliformes totales a 11 tratamientos de digeridos | 62 |
| Ilustración 33 Cuantificación Log UFC/g de E. coli totales a 11 tratamientos de digeridos | 62 |
| Ilustración 34 magen 32: Cuantificación Log UFC/g de Actinomicetos a 11 tratamientos de digeridos | 63 |
| Ilustración 35 Cuantificación Log UFC/g de Actinomicetos fijadores de nitrógeno a 11 tratamientos de digeridos..... | 64 |
| Ilustración 36 magen 32: Comparacon en Log UFC/g de Actinomicetos y E. coli | 63 |
| Ilustración 37 Comparacion de Log UFC/g de Actinomicetos fijadores de nitrógeno y E.coli en tiempo | 64 |

EVALUACIÓN DE BIOFERTILIZANTE A BASE DE BIOCHAR Y *Actinomicetos* FIJADORES DE NITRÓGENO

RESUMEN

La capacidad y el mantenimiento productivo del suelo requieren integrar prácticas de mejora y nutrición vegetal mediante el uso de biofertilizantes, para obtener alimentos sanos, sin generar efectos negativos al ambiente. El objetivo del presente trabajo fue evaluar características fisicoquímicas, biológicas y microbiológicas a once biofertilizantes trabajados con anterioridad en el proyecto “Caracterización fisicoquímicas y microbiológicas en árboles frutales” los cuales fueron preparados en base de digeridos de estiércol en combinación con biochar y *Actinomicetos* fijadores de nitrógeno, como: pH, NO₃-, grados Brix, CE, cenizas, materia orgánica total y carbono orgánico oxidable, conteo en placa de coliformes totales, hongos, levaduras, *E. coli*, bacterias totales, *Actinomicetos* totales y fijadores de nitrógeno, así como el grado de toxicidad de los biofertilizantes (ovino y vacuno) con y sin inoculación de *Actinomicetos* fijadores de nitrógeno mediante bioensayos de germinación utilizando semillas de rábano (*Raphanus sativus*), cebolla (*Allium cepa*) y Maíz (*Zea maíz*). En la multiplicación de *Actinomicetos* fijadores sobre digeridos de fermentación de estiércol ovino y vacuno con diferentes concentraciones de biochar, se obtuvo un mayor crecimiento microbiano en el digerido ovino al 2.5 y 5% de biochar, con los resultados obtenidos en las pruebas de toxicidad se determinó que el digerido Vacuno es el más toxico, pero una combinación con biochar al 2.5% redujo significativamente la toxicidad y mejoro la germinación de semillas de rábano (*Raphanus sativus*), cebolla (*Allium cepa*) y Maíz (*Zea maíz*) En conclusión se pude hablar que un biofertilizante Ovino con una concentración al 2.5 de biochar y con un inculo de *Actinomicetos* fijadores de Nitrógeno otorga características favorables para el crecimiento de cultivos sanos y con un buen índice de crecimiento.

Palabras clave: biofertilizante, biochar, microbiano, digeridos, toxicidad.

ABSTRACT

The capacity and productive maintenance of the soil require the integration of plant nutrition and improvement practices through the use of biofertilizers, to obtain healthy food, without generating negative effects to the environment. The objective of the present work was to evaluate physicochemical, biological and microbiological characteristics of eleven biofertilizers based on digested manure in combination with biochar and *Actinomyces* nitrogen fixers, such as: pH, NO₃⁻, Brix degrees, EC, density, ash, total organic matter and oxidizable organic carbon, plate count of total coliforms, fungi, yeasts, E. coli, total bacteria, total *Actinomyces* and nitrogen fixatives, as well as the degree of toxicity of biofertilizers (sheep and cattle) with and without multi-plate inoculation nitrogen fixers by germination bioassays using seeds of radish (*Raphanus sativus*), onion (*Allium cepa*) and Maize (*Zea mays*). In the multiplication of fixative *Actinomyces* on digested fermentation of sheep and cattle manure with different concentrations of biochar, a higher microbial growth was obtained in the bovine digest to 2.5 and 5% of biochar, with the results obtained in the toxicity tests was determined that the Ovino digested is the most toxic, but a combination with 2.5% biochar significantly reduced the toxicity and improved the germination of seeds of radish (*Raphanus sativus*), onion (*Allium cepa*) and Maize (*Zea mays*). In conclusion we could say that an Ovine biofertilizer with a concentration of 2.5 biochar and an inoculum of Nitrogen-fixing actinomyces gives favorable characteristics for the growth of healthy crops and with a good growth rate.

Keywords: fertilizer, biochar, microbial, digested, toxicity.

I.- INTRODUCCIÓN

La capacidad y el mantenimiento productivo del suelo requieren integrar prácticas de nutrición vegetal y de mejoramiento del suelo que permitan un manejo adecuado de los nutrimentos para evitar su carencia, para este fin se requiere generar alternativa como los biofertilizantes que favorezcan las características del suelo en diferentes condiciones ambientales (*Calderón, 2002*).

La forma más común de incorporar nutrientes al suelo han sido mediante el uso de fertilizantes químicos, cuyo uso indiscriminado ha alterado significativamente los constituyentes orgánicos, vivos del suelo y con ello el equilibrio ecológico (toxicidad de cultivos); debido a esto se han buscado alternativas agrícolas que favorezcan el desarrollo de suelos fértiles llevando a una sostenibilidad agrícola, que represente beneficios para el hombre y el balance ecológico., Un factor importante a considerar son los microorganismos del suelo, ya que estos mantienen la fertilidad y mineralización de los elementos esenciales para el crecimiento de cultivos. (*Anderson, 1993*).

En el proceso de producción de un biofertilizante con características especiales para la recuperación de nutrientes es necesario un elemento que proporcione dichos aspectos, tal es el caso del biochar que es el producto de la degradación térmica de materia orgánica en ausencia de aire, la pirolisis, teniendo un mejoramiento de nutrientes en el suelo. (*Lehmann, 2009*).

Los procesos de germinación son directos al combinar Sustrato y digerido desde la germinación, al trabajar con semillas de rábano existen especificaciones prácticas para una asimilación de nutrientes y una germinación rápida, para la determinación de toxicidad la siembra de semillas de rábano. Deberán estar enterradas a 12,5 mm y separadas a unos 25 mm. Regando los rábanos a medida que crezcan. Manteniendo los arriates de rábanos húmedos, no empapados, Cosechando los rábanos midiendo las características de longitud de brote y raíz, para determinar los valores de toxicidad, bioensayos.

II- JUSTIFICACIÓN

La creación de biofertilizantes a base de estiércol en combinación con biochar a distintas concentraciones e inoculados tiene como efecto reducir significativamente la toxicidad creada por el uso irracional de fertilizantes químicos.

La utilización de estos biofertilizantes genera un impacto benéfico ambiental por la reducción de liberación de sustancias químicas al ambiente.

La implementación de uso de biofertilizantes en cultivos acelera la significativamente el crecimiento de estos.

El uso razonable de biofertilizantes con *Actinomicetos* aumenta una mayor fijación de nitrógeno al suelo teniendo un crecimiento óptimo en los cultivos.

III.- OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Realizar una caracterización físico-química, biológica y microbiológica a once tipos de biofertilizante trabajados con anterioridad en el proyecto “Caracterización fisicoquímicas y microbiológicas en árboles frutales” a base de digeridos de fermentación de estiércol en combinación con biochar y *Actinomicetos* fijadores de nitrógeno, y determinar el grado de toxicidad de los biofertilizantes con bioensayos de germinación con semillas de rábano (*Raphanus sativus*), cebolla (*Allium cepa*) y Maíz. (*Zea maíz*).

2.2. Objetivos particulares

- Realizar una caracterización fisicoquímica y microbiológica mediante la determinación de pH, NO₃⁻, CE, grados Brix, densidad, materia orgánica total y carbono orgánico oxidable, conteo en placa de coliformes totales, hongos, levaduras, bacterias totales, *E. coli*, *Actinomicetos* totales y fijadores de nitrógeno de dos digeridos de fermentación de estiércol (ovino y vacuno) a tres concentraciones de Biochar (0, 2.5 y 5%), con y sin inoculación de multicepas fijadores de nitrógeno.

- Realizar Bioensayos de germinación con semillas de rábano, cebolla y maíz, en laboratorio e invernadero, para determinar el grado de fitotoxicidad de dos digeridos de fermentación a base de estiércol ovino y vacuno a tres concentraciones de Biochar (0, 2.5 y 5%), con y sin inoculación de *Actinomicetos* fijadores de nitrógeno (concentrado y 15%).
- Identificar, aislar, multiplicar, y conservar multicepas de *Actinomicetos* Fijadores de Nitrógeno.

IV.- HIPOTESIS

- La inoculación de multicepas de Fijadores de Nitrógeno en combinación con Biochar a distintas concentraciones, reduce significativamente la toxicidad de digeridos de fermentación de estiércol ovino y vacuno, detectada mediante bioensayos de germinación con semilla de rábano (*Raphanus sativus*), cebolla (*Allium cepa*) y Maíz (*Zea maíz*).
- Las características fisicoquímicas, biológicas y microbiológicas resultan superiores en los biofertilizantes dependiendo del tipo de digerido y la concentración de biochar.

V. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Definición de biol (digerido de fermentación de estiércol)

Es la fracción líquida resultante del fango proveniente del fermentador o biodigestor este fango es decantado o semidecantado obteniéndose una parte líquida a la cual se le llama “Biol”. Aproximadamente el 90% del material que ingresa al biodigestor se transforma a Biol. Esto depende naturalmente del tipo de material a fermentar y de las condiciones de fermentación. (Pótsch, 2014).

El uso del Biol es principalmente como promotor y fortalecedor del crecimiento de la planta, raíces y frutos, gracias a la producción de hormonas vegetales, las cuales son desechos del metabolismo de las bacterias típicas de este tipo de fermentación anaeróbica. Estos beneficios hacen que se requiera menor cantidad de fertilizante mineral u otro empleado, las hormonas vegetales o fitohormonas se definen como fitoreguladores del desarrollo producidas por las plantas. A bajas concentraciones regulan los procesos fisiológicos y promueven el desarrollo físico de las plantas. (Daubresse, 2008)

Tabla 1: *Composición bioquímica de biol Fuente (Suchest, 2013).*

| Componentes |
|---------------------|
| Acido indio acético |
| Giberelina |
| Purinas |
| Timina |
| Ácido fólico |
| Inositol |
| Biotina |

4.1.1 Características de un biol

Algunas características principales de un biol, el cual es una alternativa natural, capaz de promover y estimular el desarrollo de las plantas y sobre todo mejora y activa el poder germinativo de las semillas, este puede ser diseñado y enriquecido en dependencia de las necesidades nutricionales y fisiológicas que requiera el cultivo. Puede ser elaborado sin mucha dificultad a través de un proceso de fermentación anaerobia con una válvula de escape de gases el cual puede ser almacenado para su utilización como biocombustible. Para ello se tiene en cuenta la disponibilidad de la materia prima

a utilizar, algunas de las más importantes son el estiércol de animales, restos de alimentos, de cosechas, de podas, entre otras; a las que se les añade otros componentes tales como: agua, melaza, leche y leguminosa. Y pueden añadirse además otros componentes de origen natural que actúen como repelentes contra plagas. (*Callicava, 2015*).

Sin embargo, han surgido técnicas agrícolas amigables con el ambiente, entre las que se encuentran la utilización de biofertilizantes, que contienen microorganismos benéficos para mejorar el crecimiento vegetal, además de suministrar nutrientes y mantener la calidad del suelo, sin afectar los rendimientos. (*Huayta, 2013*)

4.1.2 Efecto de biol en germinación

El biol se encuentra en diferentes formas y varía dependiendo en el digestor y las sustancias alimenticias que contiene. El biol completamente digerido se identifica fácilmente (al igual que el compostaje: huele bien, es de color marrón o negro, puede contener pequeños organismos vivos y no es posible identificar las sustancias que contiene) y se puede utilizar como estiércol para mejorar la fertilidad del suelo e incrementar el rendimiento del suelo y la producción. Todas las sustancias alimenticias, las dosis de aplicación, la programación y los fertilizantes químicos afectan la producción de los cultivos y por tanto, estos temas se tratan de resolver con ayuda proporcionada por un Biol. (*Callicava, 2015*).

La forma líquida se puede aplicar por medio de la pulverización foliar, un cubo o un canal de riego y se puede aplicar directamente a los cultivos. También se lo puede aplicar al suelo como fertilizante de fondo y/o revestimiento superficial. Si se aplica a un cultivo estándar, tiene que ser diluido en varias proporciones, dependiendo en el tipo de biodigestor disponible de lo contrario, la alta concentración de amoníaco y fósforo soluble en el Biol generará efectos tóxicos para el crecimiento de la planta y quemará las hojas. (*SNV25, 2011*)

La irrigación tiene sus límites debido a que a lo largo de todo el año no siempre está disponible para los agricultores, cuando la irrigación se aplica de un cultivo a otro, el Biol puede asentarse en el primer cultivo debido a la disminución del grado de la aplicación resultando en una distribución no uniforme y, es difícil de transportar (*Centre for Energy Studies, 2001*). Por lo tanto, este método es el adecuado para aquellos agricultores que cultivan vegetales en su huerta. (*Centre for Energy Studies, 2001*).

Igualmente, la aplicación del biol tiene muchos efectos beneficiosos para los cultivos de campo, los vegetales y las frutas en relación con el crecimiento, la calidad y la resistencia a enfermedades. Además, algunos sistemas de producción que utilizan el Biol líquido requieren de la conversión del amoníaco y/o ser suplementados para su disponibilidad de nutrientes ya que la forma líquida contiene menos amoníaco y nitrógeno. (Adesemove, 2009)

Ilustración 1: Biol (digerido de fermentación de estiércol Vacuno) Colpos campus puebla



4.2 Biochar

El biochar (biocarbón o carbón vegetal) es un producto que se conoce desde la antigüedad, pero que hoy en día despierta gran interés entre la comunidad científica. Son muchos los investigadores que trabajan con este material, desde como optimizar su fabricación al estudio de sus propiedades para su aplicación en campos tan variados como la agricultura o la generación de energía.

El biochar es un producto orgánico muy complejo químicamente hablando. Viene de la pirolisis o combustión de biomasa (cualquier material orgánico vale: madera, hojas, residuos orgánicos, estiércoles, etc.) en unas condiciones de baja temperatura (<700°C) y oxigenación, es decir, muy reductoras. Las condiciones exactas de la pirolisis (temperatura, tiempo, concentración de oxígeno, presión, etc.) dependen en gran medida de la biomasa inicial y de la tecnología que se utilice. Esta tecnología es ligeramente similar a la que se usa

en la producción de energía a partir de carbón. De hecho, la materia orgánica sufre una carbonización que produce una reorganización de los átomos de carbono para dar estructuras parecidas al grafito. Además, tiene como finalidad última obtener un producto orgánico que pueda ser aprovechado como enmendante del suelo (mejorador de alguna de sus propiedades). (*Mayoral, 2015*).

4.2.1 Características del Biochar

Las características de cada biochar pueden variar considerablemente dependiendo del material de partida y de las condiciones de pirolisis, sin embargo, los Biochars comparten una serie de características comunes, Los biochars poseen un contenido elevado de C recalcitrante, en su mayor parte condensado en anillos aromáticos (*Sombroek, 2013*) lo que le confiere su elevado potencial de secuestro de C (*Lehmann, 2009*). También cabe destacar la presencia de nutrientes asociados a su fracción mineral (K, Ca, Mg, P, S, etc.) (*Joseph, 2009*) La mayoría de los biochars son alcalinos ($\text{pH} > 7$) y dependiendo de la dosis aplicada al suelo, pueden ejercer un efecto de encalado sobre el mismo. (*Zwieten, 2010*). En general, los biochars son materiales porosos, poco densos, y caracterizados por una elevada área superficial específica. (*Lehmann, 2009*). Esta propiedad determina la reactividad y la capacidad del biochar para retener iones en su superficie. Por su parte, los poros son también responsables de la elevada capacidad de retención de agua del biochar han definido y propuesto un conjunto de características con el objetivo de definir la calidad del biochar para su uso en agricultura. Estos parámetros incluyen la distribución del tamaño de partículas del biochar, el pH, el área específica, la porosidad, el contenido de C y nutrientes, así como el contenido de contaminantes (metales pesados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, etc.). Muy pocos países poseen una normativa específica para este tipo de materiales. (*Kookana, 2011*)

Ilustración 2: Biochar esterilizado Colegio de Posgraduados Campus Puebla.



4.2.2 Usos de Biochar

En el uso del Biochar en suelos con carecería se destaca la importancia de la implementación de biochar con tecnología adecuada y moderna que asegure la no liberación de gases de efecto invernadero u otras sustancias como hollín que pueden ser nocivas para la salud. Los siguientes beneficios ocurren cuando se adiciona biochar al suelo:

- Agiliza el crecimiento de las plantas
- Reduce las emisiones de metano
- Disminuye las emisiones de óxido de nitrógeno aproximadamente en un 50%
- Reduce la necesidad de fertilizantes alrededor de un 10%
- Reduce la pérdida de nutrientes
- Baja la acidez del suelo
- Disminuye la toxicidad del aluminio
- Mejoran las características del suelo con respecto a la retención de agua
- Aumenta la respiración microbiana del suelo
- Incrementa la biomasa microbiana del suelo

Estos estudios también hacen referencia al escaso conocimiento acerca de la posible presencia de dioxinas e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) en las partículas de biochar. También es destacable la cuestión acerca de la reducción del albedo en los suelos

enmendados con biochar (suelos más negros), si bien sería contrarrestada por el mayor desarrollo de la cubierta vegetal. No parece preocupante este aspecto, pero da una idea del tipo de estudios que se están realizando sobre este material, lo que sugiere que se analizan con detalle sus efectos en el sistema suelo-biosfera-atmósfera para garantizar un uso sostenible. (*Anderson, 1993*)

4.2.3 Efectos de biochar como fertilizante

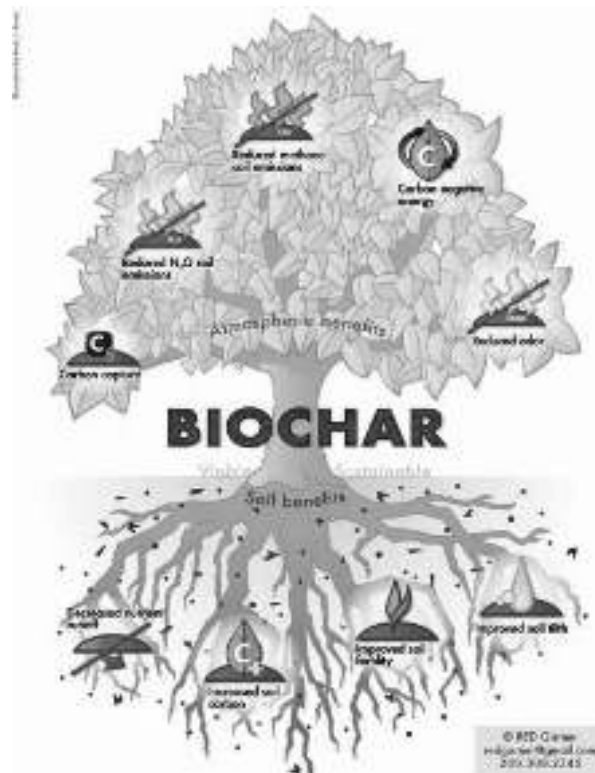
Una de las ventajas del uso del biochar como enmienda del suelo es que el C puede ser almacenado durante cientos de años, dada la estabilidad del biochar, mejorando el crecimiento de las plantas y el secuestro de carbono en el suelo. (*Lehmann, 2009*)

De este modo se ha sugerido que el biochar estaría formado por componentes estables y otros que en cambio, serían degradables. Las condiciones de combustión, así como las características de la materia prima utilizada en la producción de biochar, serían los aspectos que determinarían la proporción de componentes relativamente lábiles en el biochar, sin olvidar los objetivos principales que se planteen para el proceso de pirolisis: obtención de energía o biochar, ya que también influiría sobre la estabilidad del biochar producido al ser éste de diferentes características en función del tipo de pirolisis. (*Sohi, 2009*)

Otros aspectos estudiados son el aumento de la disponibilidad de nutrientes para las plantas en parte por la mejora de la capacidad de intercambio catiónico en el suelo (CIC), así como la estimulación de los procesos biológicos que permiten mejorar la estructura del suelo y la capacidad de almacenamiento de agua. (*Centre for Energy Studies, 2001*).

Atendiendo al efecto de enmienda orgánica que produce la aplicación del biochar en suelos, la reducción en la densidad aparente y el aumento de materia orgánica permitirían reducir el laboreo mecánico. Además, también se reducirían costes en irrigación debido al aumento en la capacidad de retención de agua. (*Glaser, 2002*).

Ilustración 3: efectos del uso de biochar como enmienda orgánica de suelos.



En este sentido, se encontró que en suelos de tierra Preta una capacidad de retención de agua superior en un 18% en comparación a los suelos adyacentes. Por lo general, el biochar aumenta la productividad y calidad del suelo, sobre todo en suelos ácidos y pobres en nutrientes, como por ejemplo los oxisoles. (Sohi, 2009).

En cuanto a beneficios en la producción y requerimiento de nutrientes, se ha encontrado que el biochar permite obtener igual rendimiento de cosecha con una dosis más baja de fertilización que aquellos cultivos en los cuales se aplica la dosis óptima de fertilización. (Sohi, 2009).

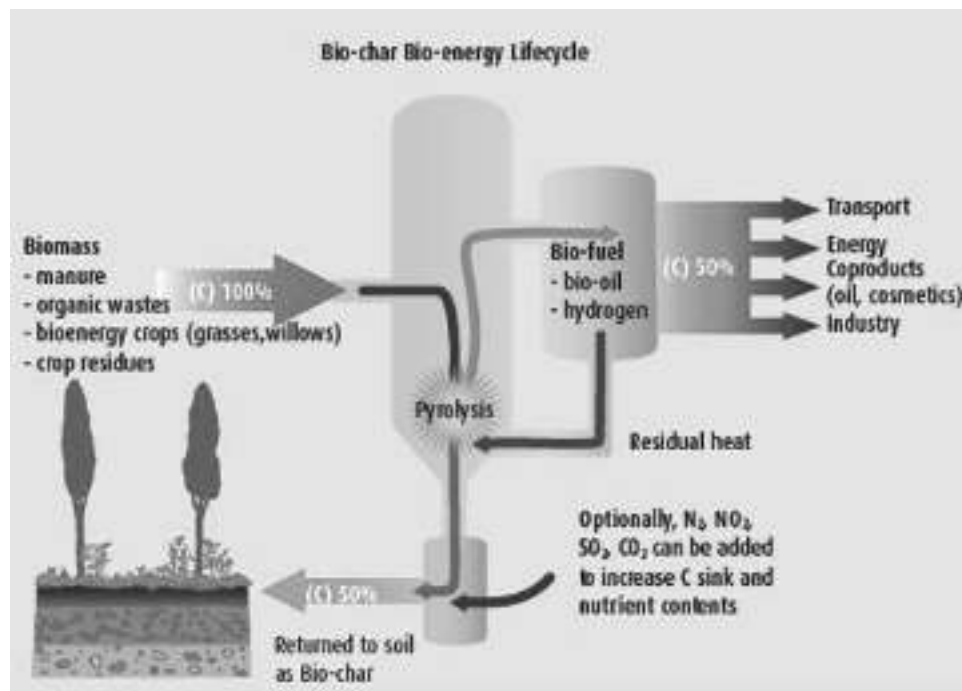
El objetivo de aplicación de biochar en suelos de cultivos no sería tanto para aumentar la producción, sino más bien para asegurar un equilibrio de las cosechas, frente a eventos climáticos como por ejemplo sequías. (Lehmann y Rondon 2006) encontraron incrementos en la absorción por plantas de P, K, Ca, Zn y Cu en cultivos tropicales en los cuales se había aplicado biochar. La naturaleza y el mecanismo básico que explique las interacciones entre cosecha, tipo de suelo, tipo de materia prima para la producción de biochar, método de

pirolisis y dosis de aplicación tiene que ser ampliamente estudiado para ganar capacidad de predicción en la aplicación de biochar en suelos, y así abrir la posibilidad de aplicación a escalas más amplias. Por otra parte, la interacción del biochar con los fertilizantes, así como los efectos sobre la biota del suelo y sus implicaciones sobre la ecología del mismo son factores todavía poco conocidos y en este sentido, la investigación de los efectos de la aplicación del biochar en suelos es reciente. (Lehmann, 2009).

Las investigaciones al respecto están orientadas al estudio de la estructura física del biochar y las interacciones con microorganismos, como las micorrizas, si bien se ha encontrado variabilidad en los resultados. Algunos estudios han encontrado incrementos de la actividad microbiana en suelos enriquecidos con biochar (Steiner 2008).

Dichos estudios hacen referencia a la capacidad del biochar, debido a su estructura en micro poros, para permitir el establecimiento de colonias microbianas. No obstante, se ha discutido que la biomasa microbiana no es una buena medida de la actividad de la misma, lo cual genera incertidumbre en la valoración de los efectos del biochar, debido a la falta de conocimiento en cuanto a que tipo de comunidad microbiana puede verse favorecida, y lo que es más importante, el tipo de actividad que puedan realizar en el ecosistema edáfico. (Garcia, 2010).

Ilustración 4: Producción de biochar de origen en la pirolisis de cualquier tipo de biomasa.



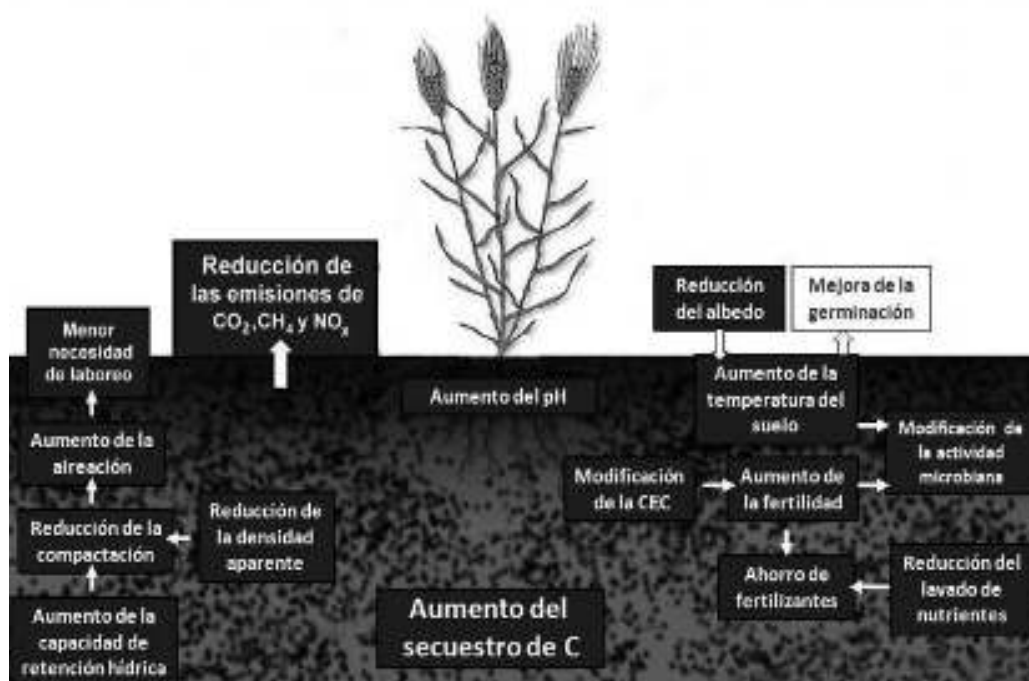
4.2.4 Efecto de biochar en Germinación de Cultivos

Un aspecto clave del que depende la implantación del proceso de producción de biochar y su uso como enmienda de suelos es evaluar su rentabilidad de germinación, (Joseph, 2009) lo que demuestra su complejidad debido al gran número de variables que intervienen. Sin embargo, la mayoría de estos estudios coinciden en aquellos aspectos que aportarían al biochar mayor rentabilidad para germinación.

Estas mejoras también incluyen un aumento de la porosidad del suelo que puede mejorar su capacidad de infiltración y su permeabilidad, contribuyendo positivamente al desarrollo de la raíz y a la respiración microbiana y favoreciendo el intercambio gaseoso y las condiciones de oxigenación. (Glaser, 2002 & Brewer, 2011).

El biochar también puede alterar la fertilidad del suelo por medio de un aporte directo de nutrientes o aumentando la capacidad de intercambio catiónico (CEC) del suelo, (Joseph, 2009) lo que favorece la retención de nutrientes y evita pérdidas por lixiviación. Por otro lado, los cambios del biochar sobre el pH y las condiciones redox del suelo, así como sobre la actividad biológica del suelo también pueden aumentar la disponibilidad de nutrientes para la planta. (Chan, 1999).

Ilustración 5: Efecto en suelo por biochar



El color oscuro que el biochar le confiere al suelo puede favorecer la absorción de las radiaciones solares y reducir el albedo, aumentando su temperatura. (*Genesisio, 2012*)

Este aumento podría reducir la humedad, pero este efecto parece estar compensado por la alta capacidad de retención de agua del biochar (*Laird, 2010 & Genesisio, 2012*). El aumento de la temperatura del suelo junto con el aumento de la capacidad de retención de agua y del contenido de nutrientes tras la adición del biochar puede beneficiar a la germinación de las semillas y a la actividad microbiana. (*Downie, 2009*)

4.3 Actinomicetos

Los *Actinomicetos* son un grupo de microorganismos unicelulares, muy abundantes en el suelo, aguas estancadas, estiércoles y, en general en lugares donde los restos vegetales se descomponen aeróbicamente. Son un grupo de bacterias filamentosas, que tienen similitud con los hongos, por su morfología, tipo de reproducción y crecimiento en medios de cultivo sólido y líquidos. Son bacterias Gram positivas (que tienen en su pared celular peptidoglicano), resistentes a la penicilina, lo que constituye la principal diferencia con los hongos filamentosos. Pese a que etimológicamente actinomiceto significa hongo en forma de rayo de sol, actualmente se les engloba dentro del grupo de los Esquizomicetos, donde constituyen el orden de los Actinomicetales. La principal característica de los Actinomicetales es su capacidad para formar filamentos delgados ramificados o un micelio ramificado similar a los hongos (aunque de menor diámetro). Además, al igual que los hongos, producen esporas. (*Garrigo, 2009*)

Es interesante destacar que las condiciones climáticas controlan su número y variedad poblacional. La mayoría son seres aerobios estrictos, que crecen bien a temperaturas del orden de los 25°C, son por tanto, microorganismos mesófilos; y a pH ácido (pH ≈ 6). En estas condiciones pueden alcanzarse densidades de población entre 10⁸ y 10¹¹ UFC/gramo de suelo. (*Garrigo, 2009*)

Actualmente, los actinomicetos se clasifican en diferentes familias, según el manual de (*Bergey, 2000*)

Las más importantes por su abundancia son:

1. *Streptomyces*: constituyen el 95% de los Actinomicetales. Tienen hifas no fragmentadas, un micelio aéreo extenso, esporas o conidias en cadena. Los géneros representativos son: *Streptomyces*, *Microeliobosporia* y *Sporichthya*.

2. *Actinomyces* del tipo *Nocardia*: constituyen el 1,98% de los Actinomicetales. Poseen hifas fragmentadas con pequeñas estructuras redondeadas. Los géneros más representativos son: *Pseudonocardia*, *Nocardioides* y *Terrabacter*.

Estos microorganismos son un grupo muy importante desde el punto de vista biotecnológico debido a que producen vitaminas (principalmente del grupo B), antibióticos y pigmentos de gran interés industrial (Jacob, 2009)

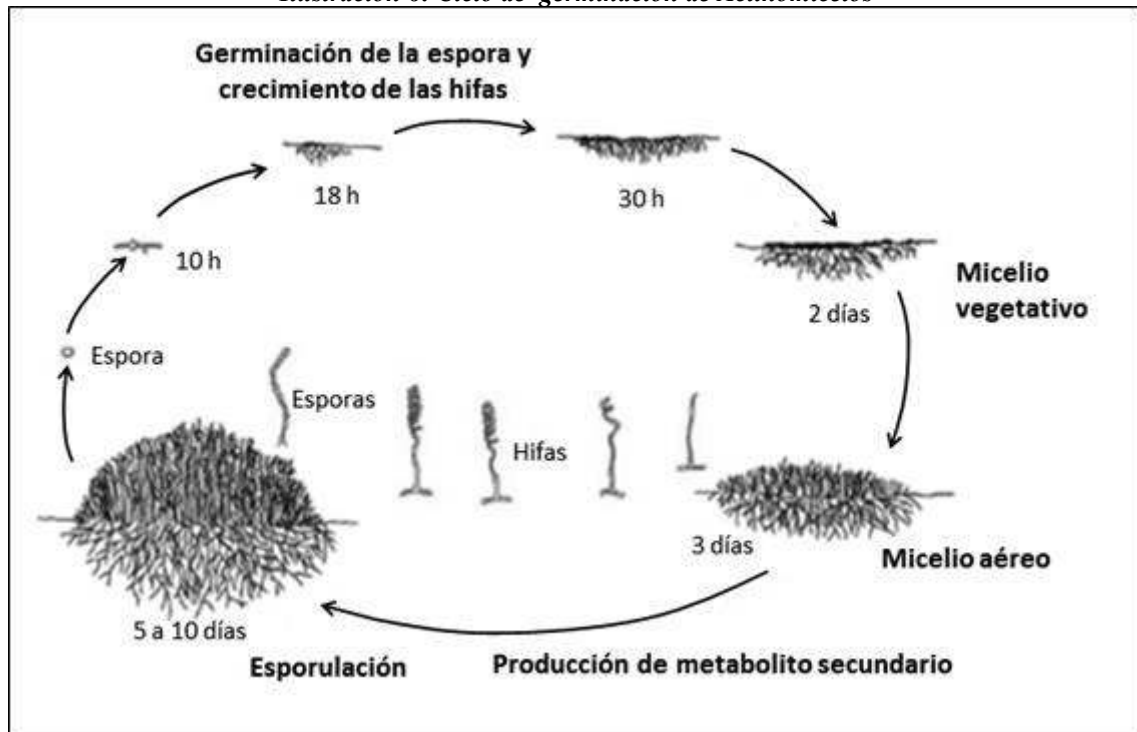
4.3.1 Aplicaciones de Actinomicetos

Aplicaciones Algunos *Actinomicetos* han sido descritos como agentes de biocontrol por la capacidad de producir enzimas degradadoras como quitinasas, glucanasas, peroxidasas y otras, (Tokata, 2002) Entre este grupo se encuentran los *Streptomyces* por ser capaces de ejercer biocontrol sobre hongos Fito patógenos, como *Alternaria* sp. *Botrytis cinerea* y *Rhizoctonia solani*, (Montesinos, 2007). Los *Streptomyces* también son importantes a la hora de promover la nodulación y ayudar a los bacteriodes de *Rhizobium* a la asimilación del hierro en la fijación de nitrógeno en leguminosas, contribuyendo indirectamente a la promoción de crecimiento vegetal, (Tokata et al., 2002). Otros géneros han sido reportados como fijadores de nitrógeno atmosférico, el *Actinomiceto* del género *Frankia* y algunas cepas pertenecientes a las familias *Thermomonosporaceae* y *Micromonosporaceae*, (Valdés, 2005)

Los microorganismos del suelo, son los componentes más importantes de este ya que constituyen su parte viva y son los responsables de la descomposición, mineralización de complejos orgánicos, translocación de bioproductos y elementos minerales así como contribuir a la Fijación de Nitrógeno Atmosférico. En un solo gramo de tierra fértil, se encuentran millones de microorganismos benéficos para los cultivos, entre los cuales se pueden encontrar: bacterias, actinomicetos, hongos, algas, protozoarios y virus que ejercen control sobre las poblaciones bacterias, (Germina, 193). La mayoría de los suelos contienen

entre 10^{-9} y 10^{-10} microorganismos por gramo, (Madigan, 2004), las bacterias son las más numerosas llegando a 10^8 individuos y pueden estar representados por más de 10^4 y 10^6 especies diferentes. Solo las bacterias del tipo Actinomicetos llegan a representar entre 10^6 y 10^7 individuos por gramo, (Sylvia et al, 1999).

Ilustración 6: Ciclo de germinación de Actinomicetos



4.3.2 Actinomicetos fijadores de Nitrógeno

4.3.2.1 Streptomyces

El género *Streptomyces* es uno de los géneros más característicos y conocidos de la división Actinobacteria. Se caracterizan por poseer una morfología particular en donde se diferencian dos formas de crecimiento, una primaria o asimiladora y una secundaria o reproductiva.

Las esporas reproductivas asexuales de *Streptomyces* se forman en los extremos de los filamentos aéreos. Si cada espora se deposita en un sustrato adecuado, puede germinar y formar una colonia nueva. Estos microorganismos son aerobios estrictos. A menudo producen enzimas extracelulares que les permiten utilizar las proteínas, polisacáridos como el almidón, la celulosa y diversas materias orgánicas halladas en el suelo. De un modo característico producen un compuesto gaseoso llamado geosmina, que le confiere al suelo su típico aroma a suelo. El género es de gran importancia biotecnológica debido a que produce

metabolitos secundarios como los antibióticos que son de amplio uso en medicina humana y veterinaria, así como compuestos represores de tumores, enzimas y vitaminas, (Tohme, 2000).

4.3.2.2 Nocardia

Nocardia es un género de bacteria Gram positiva que se encuentra en suelos ricos en materia orgánica, así como en aguas o materia orgánica en descomposición. Se pueden hallar principalmente en zonas tropicales y subtropicales, mientras que son poco frecuentes en zonas templadas o frías. Ciertas especies de *Nocardia* tienen gran importancia clínica como agentes patógenos para el hombre y los animales. Forman filamentos y ramificaciones muy desarrolladas. Poseen micelio vegetativo que se fragmenta en elementos bacilares y conidias. Los filamentos profundos se separan y toman forma de rosario en cambio, los filamentos aéreos al fragmentarse producen células similares a esporas unicelulares que se dispersan y forman aerosoles. Estos microorganismos pueden reconocerse en el laboratorio por la formación ya sea de colonias lisas, duras, adherentes, cerasas o secas que se desarrollan después de tres días a dos semanas de incubación. Se ha descrito que el género *Nocardia* fija nitrógeno atmosférico en el suelo usando como fuentes de carbono glucosa, sacarosa, manitol y celulosa, (Negrón, 2014).

4.3.3 Fijación de Nitrógeno

La fijación de nitrógeno puede ser abiótica o biológica. La primera se da por procesos químicos espontáneos como la oxidación de nitrógeno atmosférico por acción de rayos solares, descargas eléctricas o por combustión de compuestos orgánicos y por medio de aguas lluvia son arrastrados hacia la biosfera. En tanto, la fijación biológica de nitrógeno (FBN) es un proceso llevado a cabo por organismos denominados diazótrofos, en donde el nitrógeno molecular es reducido a amonio e incorporado a la biosfera. Esta propiedad está restringida sólo a procariontes y se encuentra muy repartida entre los diferentes grupos de 36 bacterias y algunas arqueobacterias. Es un proceso que consume mucha energía y ocurre con la mediación de la enzima nitrogenasa, (Cuervo, 2010).

La fijación de nitrógeno en la biosfera se estima en unos 275 millones de toneladas anuales, de las cuales 175 corresponden a la fijación biológica y 100 a la abiótica. Por lo tanto la

fijación biológica supone más del 60% del nitrógeno fijado y por ello es el proceso más importante (Rodríguez, 2009).

4.3.3.1 Ciclo del Nitrógeno

El ciclo del Nitrógeno es uno de los más importantes, ya que este elemento se encuentra en varias formas y se llevan a cabo en él una serie de procesos químicos en los que es tomado del aire y es modificado para finalmente ser devuelto a la atmósfera, (Cabrera, 2007). Se encuentra en forma libre y en mayor abundancia en la atmósfera (78 %). Es uno de los principales elementos biogeoquímicos, sin embargo, gracias a su gran estabilidad, apenas se combina con otros elementos y, por tanto, es difícil que los organismos lo asimilen, ya que primero debe ser desdoblado y empezar así la síntesis de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos (ADN y ARN) y otras moléculas fundamentales para el metabolismo, (Cabrera, 2007). En este sentido, se necesita de una gran cantidad de energía para desdoblarlo y combinarlo con otros elementos como el carbono y el oxígeno. Esta ruptura puede hacerse por dos mecanismos: descargas eléctricas y fijación fotoquímica, que proveen suficiente energía como para formar nitratos (NO^{-3}), (Cabrera, 2007).

Sin embargo, existe una tercera forma de fijación del nitrógeno que es llevada a cabo por bacterias que usan enzimas en lugar de la luz solar o descargas eléctricas. Estas bacterias son las que viven libres en el suelo o aquellas que en simbiosis, forman nódulos con las raíces de las plantas para fijar el nitrógeno, destacando los géneros *Rhizobium sp* o *Azotbacter sp*. Otro grupo son las cianobacterias acuáticas y las bacterias quimio sintéticas, tales como el género *Nitrosoma sp* y *Nitrosococcus sp*, que juegan un papel muy importante en el ciclo de este elemento, al transformar el amonio en nitrito, mientras que el género *Nitrobacter sp* continúa con la oxidación del nitrito (NO^{-2}) a nitrato (NO^{-3}), el cual queda disponible para ser absorbido o disuelto en el agua, pasando así a otros 37 ecosistemas. Todas las bacterias pertenecientes a estos géneros fijan nitrógeno, tanto como nitratos (NO^{-3}) o como amonio (NH^3), (Cabrera 2007).

Hoy en día la Fijación biológica de Nitrógeno cobra más valor dentro del contexto de la agricultura sostenible, pudiéndose evitar el uso abusivo de fertilizantes nitrogenados que perjudican considerablemente la salud del suelo, (Wheeler, 1990)

4.3.3.2 Fases del Ciclo

El ciclo del nitrógeno tiene seis etapas, de las cuales sólo la asimilación no es realizada por bacterias:

4.3.3.3 Fijación

La fijación biológica del nitrógeno consiste en la incorporación del nitrógeno atmosférico, a las plantas, gracias a algunos microorganismos, principalmente bacterias y cianobacterias que se encuentran presentes en el suelo. Esta fijación se da por medio de la conversión de nitrógeno gaseoso, en amoníaco o nitratos, Estos organismos usan la enzima nitrogenasa para su descomposición, (Zagal, 2009).

4.3.3.4 Nitrificación o mineralización

Existen dos formas de nitrógeno que son asimilables por las plantas, el nitrato, y el amonio. Las raíces pueden absorber ambas formas, aunque pocas especies prefieren absorber nitratos que amoníaco. El amonio es convertido a nitrato gracias a los microorganismos por medio de la nitrificación, (Zagal, 2009).

4.3.3.5 Asimilación

La asimilación ocurre cuando las plantas absorben a través de sus raíces, nitrato o amoníaco, elementos formados por la fijación de nitrógeno o por la nitrificación. Luego, estas moléculas son incorporadas tanto a las proteínas, como a los ácidos nucleicos de las plantas. Cuando los animales consumen los tejidos de las plantas, también asimilan nitrógeno y lo convierten en compuestos animales, (Zagal 2009).

4.3.3.6 Amonificación

Los compuestos proteicos constituyen en mayor medida la materia nitrogenada aportada al suelo, pero tienen poco valor para las plantas al ser añadidos directamente. En cambio, cuando los organismos producen desechos que contienen nitrógeno como la orina (urea), desechos de aves u organismos muertos, éstos son descompuestos por bacterias presentes en el suelo y en el agua, liberando el nitrógeno al medio, bajo la forma de amonio. En este nuevo proceso de integración de nitrógeno al ciclo, las bacterias fijadoras llevan a cabo la digestión enzimática, por lo que el amonio se degrada a compuestos aminados, como proteasas, peptonas y al final, en aminoácidos, (Zagal 2009).

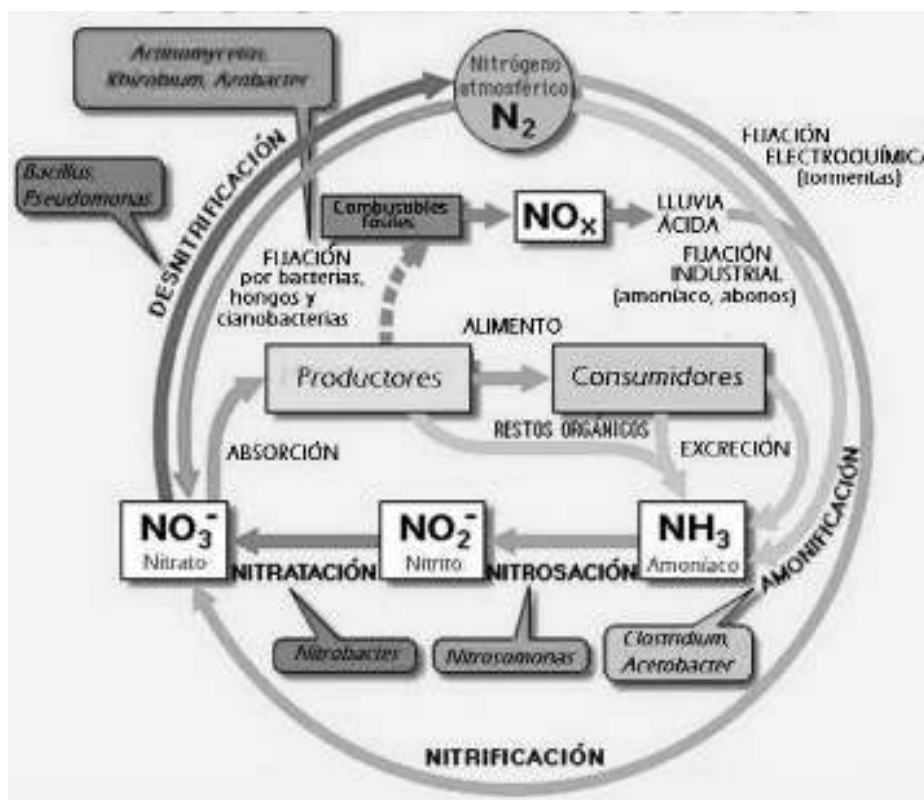
4.3.3.7 Inmovilización

Es el proceso contrario a la mineralización, por medio del cual las formas inorgánicas son convertidas a nitrógeno orgánico y, por tanto, no asimilables, (Zagal 2009).

4.3.3.8 Desnitrificación

La reducción de los nitratos a nitrógeno gaseoso, y amonio a amoniaco, y es llevado a cabo por las bacterias desnitrificadoras que revierten la acción de la Fijadoras de nitrógeno, regresando el nitrógeno a la atmósfera en forma gaseosa, (Zagal 2009).

Ilustración 7: Ciclo del Nitrógeno



4.4 Biofertilizante Microbianos

Los biofertilizantes más comercializados en la actualidad, son inocuos para el hombre y el ambiente, y la mayor respuesta agronómica se ha encontrado en suelos de baja fertilidad. Son más económicos y de fácil transportación, en comparación con los fertilizantes de origen químico sintético que utilizan los productores. (Calderón A. , 2013).

Existen varias presentaciones para su comercialización. Los más comunes son los que se aplican a la semilla y van impregnados en turba (materia orgánica de líquenes), pero también

pueden distribuirse en suelo molido, medios de agar, caldos nutritivos, liofilizados, o en medios de aceite. (Calderón A. , 2013).

Los microorganismos que se utilizan en la agricultura, como es el caso de las bacterias, pueden impregnarse en los soportes elegidos y éstos pueden estar o no esterilizados.

El soporte o transportador donde se impregnan las bacterias deben tener la capacidad de almacenar la humedad, además de tener uniformidad química y física, no se tóxico, de fácil esterilización y debe ser biodegradable. (SNV25, 2011)

Además de las bacterias fijadoras de nitrógeno como *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y los hongos *micorrízicos* que transportan fósforo y otros nutrimentos y agua, también se utilizan como biofertilizantes los microorganismos *Azotobacter*, *Anabaena*, *Frankia*, *Bacillus* y *Pseudomonas* entre otros. (SNV25, 2011)

Se han utilizado en diferentes cultivos anuales y perennes y en diferentes sistemas de manejo debido a sus importantes y diversas funciones en la agricultura, como es la nutrición, especialmente con nitrógeno y fósforo. (Calderón A. , 2013)

Un biofertilizante microbiano puede ser usado en prácticas de agricultura regenerativa, ofreciendo beneficios significativos tanto para los productores agrícolas como para el clima mundial. (Mayoral, 2015)

Los biofertilizantes microbianos pueden aumentar el crecimiento y la productividad de los cultivos al mejorar la disponibilidad de nutrientes en el suelo. Sus microorganismos trabajan con la fertilidad nativa del suelo y los nutrientes orgánicos y minerales agregados por los agricultores. (Calderón A. , 2013)

Ilustración 8: Turba biofertilizante más comercial



4.5 Rábano (*Raphanus sativus*)

Raphanus sativus, el rábano, es una especie de planta del género *Raphanus* en la familia Brassicaceae que se cultiva por sus raíces comestibles. El género podría concebirse como constituido por una sola especie, *Raphanus raphanistrum*, muy polimorfa, de la que habría surgido, por domesticación, el rábano cultivado (*Raphanus sativus*) que, aquí, sí se considera una especie aunque no esté reconocida aún como tal, y su validez sujeta a revisión el propósito de evaluar su efecto sobre el crecimiento y rendimiento del cultivo de rábano en el proceso de germinación tiene un efecto favorable en condiciones estrictas de ambiente. Para la determinación de toxicidad la siembra de semillas de rábano. Deberán estar enterradas a 12,5 mm y separadas a unos 25 mm. Regando los rábanos a medida que crezcan. Manteniendo los arriates de rábanos húmedos, no empapados, Cosechando los rábanos (*Raphanus sativus*) (SNV25, 2011).

4.6 cebolla (*Allium cepa*)

Allium cepa, comúnmente conocida como cebolla, es una planta herbácea bienal perteneciente a la familia de las amarilidáceas. Es la especie más cultivada del género *Allium*, el cual contiene varias especies que se denominan cebollas y que se cultivan como alimento. Ejemplos de las mismas son la cebolla de verdeo (*Allium fistulosum*), la cebolla escalonia (*Allium ascalonicum*). El proceso de germinación tiene un efecto favorable en condiciones básicas de clima húmedo. Para la determinación de toxicidad la siembra de semillas de cebolla. Deberán estar enterradas a 18,5 mm y separadas a unos 40 mm. Regando las cebollas a medida que crezcan. Manteniendo los arriates de cebolla húmedos, no empapados, Cosechando las cebollas (*Allium cepa*) (SNV25, 2011).

4.7 Maíz. (*Zea maíz*)

El maíz, es una gramínea anual originaria y domesticada por los pueblos indígenas en el centro de México desde hace unos 10 000 años, e introducida en Europa en el siglo XVII. Los indígenas taínos del Caribe denominaban a esta planta *mahís*, que significa literalmente 'lo que sustenta la vida. Actualmente, es el cereal con el mayor volumen de producción a nivel mundial, superando incluso al trigo y al arroz. El proceso de germinación tiene un efecto favorable en condiciones de clima cálido. Para la determinación de toxicidad la siembra de semillas de maíz. Deberán estar enterradas a 9,5 mm y separadas a unos 30 mm.

Regando las cebollas a medida que crezcan. Manteniendo los arriates de maíz húmedos, no empapados, Cosechando maíz (*Zea maíz*) (SNV25, 2011).

4.8 Efecto de toxicidad en suelo

El efecto de toxicidad se debe a que existen algunos elementos que son esenciales para las plantas pero en altas concentraciones pueden ser tóxicos, la toxicidad depende de las condiciones del suelo, el material original, el manejo de los cultivos (fertilización, riego etc.) y de la cercanía de zonas industriales o mineras, algunos elementos esenciales sin los que las plantas no podrían realizar sus ciclos de vida en altas concentraciones puede llegar a ser tóxicos, como es el caso de micronutrientes (hierro, manganeso, boro, zinc y níquel) (Glaser, 2002 & Brewer, 2011).

4.8.1 Efectos de toxicidad en las plantas

La presencia de determinadas sales en el suelo, incluso a bajas concentraciones, puede provocar efectos tóxicos en las plantas. Normalmente, los cultivos leñosos o arbóreos presentan mayor toxicidad que los cultivos anuales. Las sales que ocasionan más problemas para los cultivos son el sodio, el boro y el cloruro. La toxicidad de cada uno de ellos es diferente para cada cultivo así como los síntomas que producen en las plantas. Por lo tanto, conociendo los síntomas se pueden detectar ciertos problemas de toxicidad (Calderón A. , 2013).

4.8.2 Efectos de toxicidad en germinación

El bioensayo de toxicidad con semillas, es una prueba estática de toxicidad aguda en el que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Como puntos finales para la evaluación de los efectos fitotóxicos, se determina la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocotilo. Es importante destacar que durante el período de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y el desarrollo normal de la planta, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos. Por otra parte, muchas de las reacciones y procesos involucrados son generales para la gran mayoría de las semillas, por lo que la respuesta y los datos a partir de la aplicación de

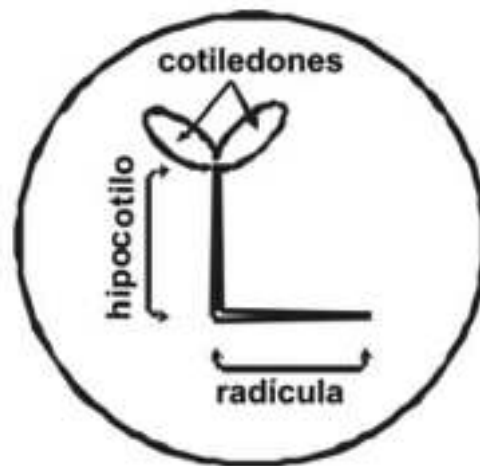
esta prueba son en gran medida representativos de los efectos en semillas o plántulas en general. La evaluación del desarrollo de la radícula y del hipocotilo constituye indicadores representativos para determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta. (Glaser, 2002 & Brewer, 2011).

4.8.3 Verificación de la viabilidad de las semillas

Previo a la implementación de la prueba, es recomendable verificar que cada lote nuevo de semillas que se utilice tenga un porcentaje de germinación superior al 90%, sincronización en la germinación y baja variabilidad de la elongación de la radícula e hipocotilo coeficiente de variación. (Calderón A. , 2013)

Es necesario además caracterizar las condiciones de germinación del lote de semillas, evaluando la respuesta frente a la luz (fotoblastismo positivo o negativo: germinación en presencia o ausencia de luz, respectivamente) y la temperatura óptima de germinación. Con el fin de reducir la variabilidad en los resultados, para el caso de semillas no seleccionadas y que presenten gran heterogeneidad en el tamaño, es conveniente realizar una selección previa descartando las fracciones de mayor y menor tamaño y utilizando solamente la fracción más numerosa y de tamaño intermedio. La fracción de menor tamaño puede presentar un alto porcentaje de semillas vanas, mientras que las semillas de mayor tamaño pueden ser más vigorosas, variando la sensibilidad frente a los compuestos tóxicos. (Calderón A. , 2013)

Ilustración 9: elongación de hipocotilo y radícula a medir en ensayos de toxicidad.



8.9 *E. coli* en plantas

Algunas cepas de *Escherichia coli*, normalmente habitantes del tracto gastrointestinal de los mamíferos, han adoptado estrategias de transmisión ligeramente diferentes, estando algunas mejor adaptadas que otras para vivir en las plantas.

La *E. coli* mayormente habita en ambientes cálidos, húmedos y ricos en nutrientes, como los que se encuentran en el tracto gastrointestinal de animales de sangre caliente. Pero para migrar de un organismo a otro, las bacterias deben salir al mundo exterior. Hay evidencias de que algunas cepas de *E. coli* pueden sobrevivir durante varias semanas fuera de un organismo, y crecer incluso en agua o en tierra si las condiciones son las adecuadas. Pero lo que más preocupa de la *E. coli* a las autoridades sanitarias y a la población en general es su potencial para colonizar vegetales, ya que aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas, la presencia de cepas patógenas en frutas y hortalizas presenta un riesgo para la seguridad de los alimentos.

8.9.1 efectos de *E. coli* en plantas

La presencia de bacterias patógenas en frutas y hortalizas es muy común a pesar de los grandes esfuerzos realizados para prevenir la contaminación microbiológica. En la actualidad, se sabe que *E. coli* O157:H7 puede colonizar de forma pasiva plantas comestibles. Una vez, que este patógeno, se adhiere a la superficie de la planta, puede introducirse al tejido, para después movilizarse y multiplicarse. Una visión general de los mecanismos de interacción entre el tejido vegetal y *E. coli* O157:H7. Se considera que este patógeno ha mejorado su competencia ecológica en plantas comestibles, sin perder su virulencia para el ser humano. Además, se identificaron áreas de oportunidad para futuros trabajos de investigación. [accessed Aug 18 2018].

VI.- MATERIALES Y MÉTODOS

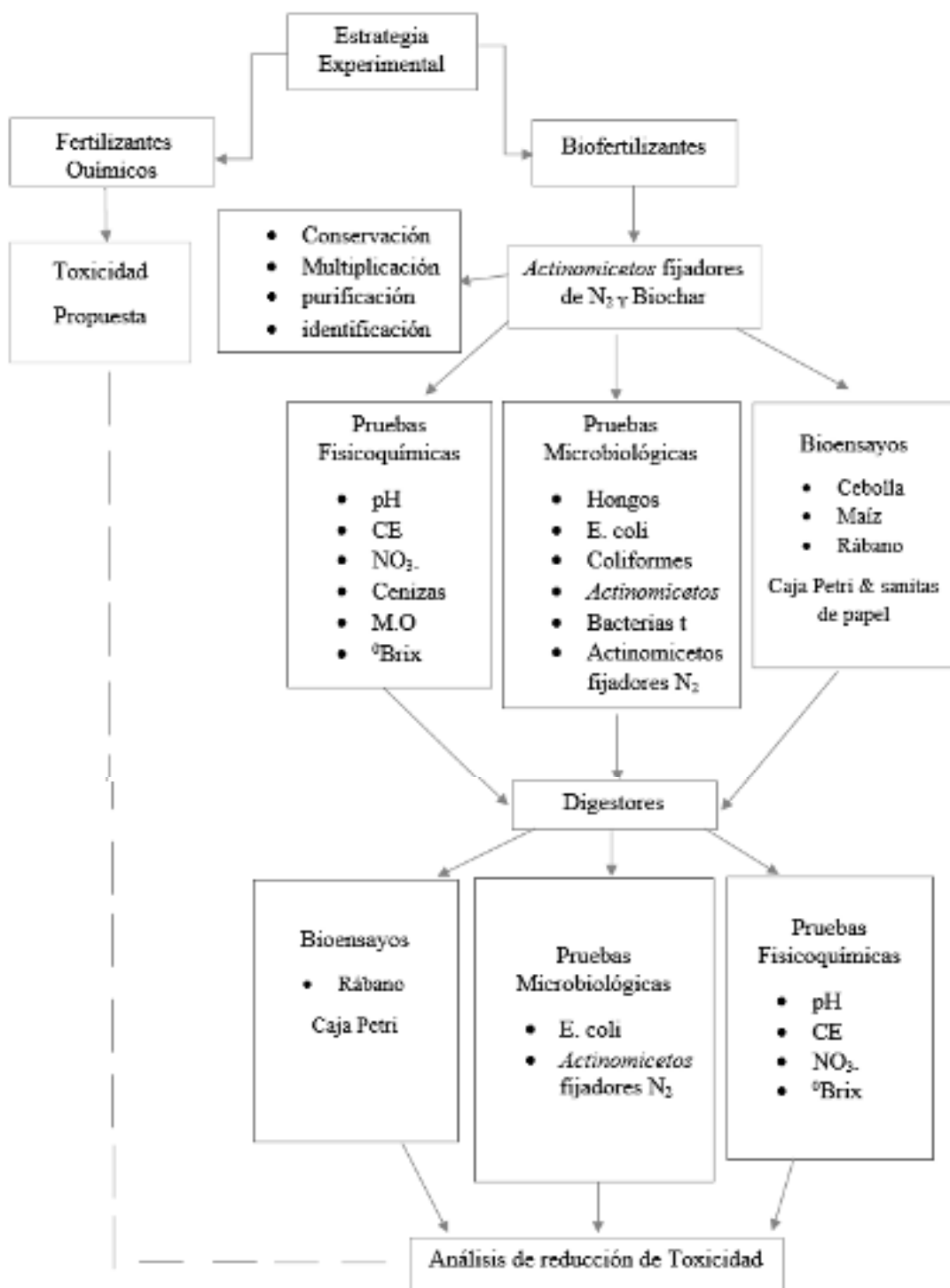


Imagen 10: estrategia experimental de biofertilizantes con *Actinomicetos* fijadores de nitrógeno y Biochar

5.1 Sitio de estudio

El trabajo de campo se llevó a cabo en laboratorio Semi-restringido y en el invernadero del Colegio de Posgraduados Campus Puebla, en el municipio de Santiago Momoxpan, Puebla-México. Km. 125.5, Carretera Federal México-Puebla, Santiago Momoxpan, 72760 Puebla, Pue.

Ilustración 9: Colegio de Posgraduados Campus Puebla



5.2 Determinación Fisicoquímica de 11 digeridos en combinación con biochar a distintas concentraciones, y con y sin inoculación de *Actinomicetos* Fijadores de N₂

La determinación Fisicoquímica de las características de dos digeridos de fermentación de estiércol (ovino y vacuno) a tres concentraciones de Biochar (0%, 2.5% y 5%) y una fuente de carbono (Melaza) se realizó mediante la implementación de técnicas analíticas que permitieran la obtención de resultados de las características físicas y químicas.

5.2.1 pH

Se realizó bajo el método indicado en la norma mexicana NMX-AA-009-SCFI-2000 Del diario Oficial de la Federación. Se utilizó para medir la acidez o alcalinidad de los tratamientos de dos digeridos de fermentación de estiércol (ovino y vacuno) a tres concentraciones de Biochar (0%, 2.5% y 5%) y una fuente de carbono (Melaza), potenciómetro llamado CONDUCTRONIC PC18, el cual se utilizó para la medición de todas las muestras líquidas utilizadas en bioensayos, pruebas fisicoquímicas, biológicas y microbiológicas.

Se enjuagó con agua destilada el electrodo, se calibra en sus 3 buffers (4, 7 y 10) y posteriormente con el electrodo se toma el resultado de pH.

Ilustración 10: Medición de pH y CE



5.2.2 Conductividad Eléctrica

La determinación de conductividad eléctrica se realizó de acuerdo a como se describe en la metodología indicada por *Marín C.M.A (2011)*.

Se utilizó para medir la conductividad Eléctrica de los tratamientos de dos digeridos de fermentación de estiércol (ovino y vacuno) a tres concentraciones de Biochar (0%, 2.5% y 5%) y una fuente de carbono (Melaza), un potenciómetro tipo CONDUCTRONIC PC18, el cual se utilizó para la medición de todas las muestras líquidas utilizadas en bioensayos, pruebas fisicoquímicas, biológicas y microbiológicas. Se enjuagó el electrodo con agua destilada y posteriormente con el electrodo se tomó la medición de conductividad.

5.2.3 Grados Brix

La determinación de grados Brix se realizó de acuerdo a como se describe en la metodología indicada por *Marín C.M.A 2009*. Se utilizó un medidor de grados Brix de tipo HANNA instrument, donde se determinó el cociente total de materia seca (generalmente azúcares) disuelta en un líquido de manera indirecta.

Ilustración 11: Medición de grados Brix



5.2.4 Determinación de Nitratos (NO_3^-) con Kit LAQUAtwin

La determinación de Nitratos se realizó con el Kit LAQUAtwin como está indicado en el manual HANNA instrument, el kit LAQUAtwin se calibró con un buffer a 150 ppm y otro con 2000 ppm una vez calibrado se tomó 1 ml de muestra líquida de los distintos tratamientos de dos digeridos de fermentación de estiércol (ovino y vacuno) a tres concentraciones de Biochar (0%, 2.5% y 5%) y una fuente de carbono (Melaza) y se corrió la muestra, se obtuvieron resultados de la concentración de partes por millón de nitratos de cada Tratamiento.

Ilustración 12: Kit LAQUAtwin con buffer 150 ppm NO_3^- .



5.2.5 Materia Orgánica Oxidable

La determinación de este parámetro se realizó con base al método indicado por *Walkley y Black según C.M.A 2011*

Se preparó una serie de reactivos en este caso Dicromato de potasio 1 M, sulfato ferroso amónico al 0.5 N y el indicador Difenilamina. Se disolvió 0.5 g de (C6H5) NH en 20 ml de agua y 100 ml de H2SO4. Se pesaron 0.500 g de las muestras de suelo para analizar y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, ha cada matraz se le agregó 10 ml de la solución de dicromato de potasio, posteriormente se agregó a la mezcla 20 ml de ácido sulfúrico concentrado para agitar por 1 minuto, la mezcla se dejó enfriar aproximadamente 30 min. Una vez transcurrido el tiempo de enfriamiento y teniendo la mezcla a temperatura ambiente se agregó una cantidad de 200 ml de agua destilada, dejándose enfriar nuevamente aproximadamente 20 min, al término de este tiempo se agregaron 10 ml de ácido fosfórico concentrado a la mezcla, al término de estos pasos se colocaron de 10 a 20 gotas de indicador Difenilamina, finalmente se tituló con sulfato ferroso de amónico todas las muestras de suelo. Con la mezcla de ácidos se obtuvo un resultado de vire, cambiando de color negro a verde indicando la presencia de materia orgánica Se determinó el % de materia. Se utilizó como punto final los resultados obtenidos y se emplearon en la fórmula indicada a materia orgánica:

$$\%C = \frac{V(1 - \frac{M}{B}) \cdot 0.003}{Pm} \quad \text{Ec. 1}$$

Dónde: %C = porcentaje

V = Volumen de dicromato de potasio empleado en la muestra y el blanco.

M = Volumen de sulfato ferroso gastado en la titulación de la muestra.

B = Volumen de sulfato ferroso gastado en la titulación del blanco.

Pm = Peso de la muestra de suelo

Se transforma el contenido de carbono orgánico a contenido de materia orgánica, en porcentaje (%MO), mediante la relación:

$$\%MO = \%C \cdot 1.724 \quad \text{Ec. 2}$$

Donde:

%MO= Porcentaje de materia orgánica

1.724= Factor

Ilustración 13: Determinación de materia orgánica



5.2.6 Cenizas

La determinación de cenizas fue realizada de acuerdo a la norma Mexicana NMX-AA-18-1984 AL AMBIENTE- CONTAMINACION DEL SUELO DE RESIDUOS SÓLIDOS – DETERMINACIÓN DE CENIZAS. Se realizó colocando crisoles a peso constante en la estufa de deshidratación a una temperatura de 105 °C por 24 horas y colocándolos en un desecador para enfriar, transcurrido el tiempo los crisoles fueron pesados. Al tenerlos en peso constante se colocaron 2.5 ml de muestra de digerido y fueron puestos a deshidratar con parrilla de calentamiento en la campana de extracción de gases. Finalizado el tiempo de deshidratación los crisoles fueron colocados dentro de la mufla (Vulcan, A-550), una temperatura de 800 °C durante una hora, una vez transcurrido el tiempo se enfriaron en un desecador hasta temperatura ambiente, finalmente se pesaron nuevamente y se anotaron resultados para utilizar la siguiente fórmula para la determinación de cenizas.

$$\%cenizas = \frac{(P_1 - P_2) \cdot 100}{P - P_2} \quad \text{Ec. 3}$$

Donde:

P= Peso de crisol más la muestra seca en gramos.

P1= Peso del crisol más la muestra calcinada en gramos.

P2= Peso del crisol en gramos.

Ilustración 14: Determinación de cenizas



5.3 Análisis Microbiológico

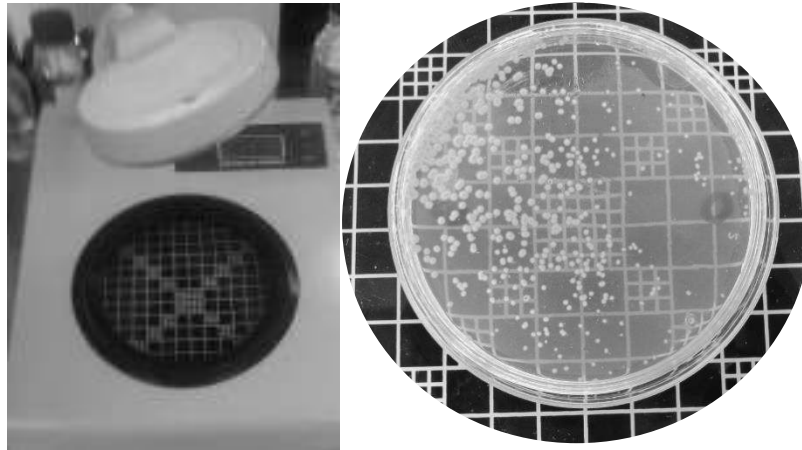
5.3.1 Determinaciones Microbiológicas de 11 digeridos en combinación con biochar a distintas concentraciones, y con y sin inoculación de *Actinomicetos* Fijadores de N₂

Las determinaciones microbiológicas se realizaron en laboratorio del campus, a diferentes tipos de digeridos de fermentación de estiércol (ovino y vacuno), en combinación con diferentes concentraciones de Biochar (0%, 2.5% y 5%) y una fuente de carbono (Melaza). Se llevó a cabo mediante la implementación de técnicas microbiológicas de conteo en placa que permitió la obtención de resultados de las características microbiológicas.

5.3.1 *Actinomicetos*

La cuantificación de *Actinomicetos* se realizó de acuerdo al método indicado por Pérez *et al* 2008. La prueba consistió en realizar un medio de cultivo Agar nutritivo, esterilizado a 121⁰C por 15 min en una autoclave tipo ALL AMERICAN, donde realizó una serie de diluciones a partir de las muestras de Digerido Fermentado de Estiércol (Ovino y vacuno) con y sin inóculo que se encontraron en el invernadero del colegio de posgraduados campus Puebla, las diluciones que se utilizaron fueron 10⁻³ y 10⁻⁶. 1 ml de estas diluciones fue vertido en cajas Petri con agar Nutritivo y se realizó una siembra por expansión esta inoculación fue realizada por duplicado, incubando a 30⁰C en incubadora MECANICAL CONVENTION OVEN. La lectura se realizó en un plazo de 72 horas y una segunda lectura a las 240 horas. Al término del periodo de incubación se realizará un conteo en placas con el contador de colonias electrónico, los datos son expresados en Log UFC/g según por Pérez *et al* (2008).

Ilustración 15: Contador electrónico y cuantificación de Actinomicetos totales.



5.3.2 Actinomicetos Fijadores de nitrógeno

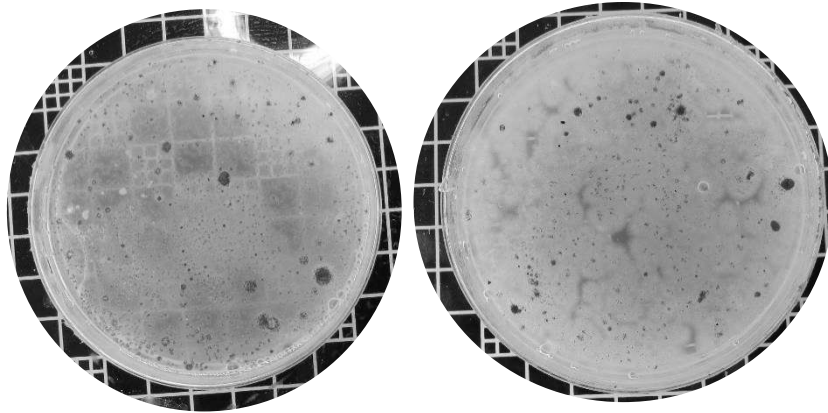
Se utilizó para la determinación de *Actinomicetos* Fijadores de Nitrógeno la metodología descrita por *Salazar Ordoñez (2013)* para el aislamiento de *Actinomicetos* fijadores de nitrógeno. Se realizó en un medio formulado utilizado para la cuantificación llamado medio Ashby, es un medio de cultivo libre de nitrógeno el cual es empleado para el aislamiento de microorganismos con capacidad para fijar nitrógeno atmosférico.

El hecho de que este medio no contenga una fuente de nitrógeno en su composición, permite identificar cepas potenciales con la capacidad de fijar nitrógeno, al observarse si presenta o no crecimiento en el medio.

Una vez observado el crecimiento indica que el microorganismo es capaz de suplir su necesidad metabólica de Nitrógeno haciendo uso del nitrógeno atmosférico presente en la micro atmósfera que encierra la caja Petri y por el contrario cepas con un crecimiento nulo indican que metabólicamente son incapaces de usar este nitrógeno y por consiguiente son descartadas como posibles fijadoras de nitrógeno.

Se realizó el aislamiento a partir de las diluciones 10^{-3} y 10^{-6} , se tomó un ml de estas diluciones y se vertió en cajas Petri que contenían Medio formulado Ashby, se realizó una siembra por expansión, este inóculo se trabajó por duplicado y se incubó a 30°C en incubadora MECANIAL CONVETION OVEN PRECISION, realizando una lectura a las 72 horas y una segunda lectura a las 240 horas. Al término del periodo de incubación se realizó un conteo en placas con el contador de colonias electrónico, los datos fueron expresados en Log UFC/g según *Pérez et al. (2008)*.

Ilustración 16: Actinomicetos fijadores de nitrógeno

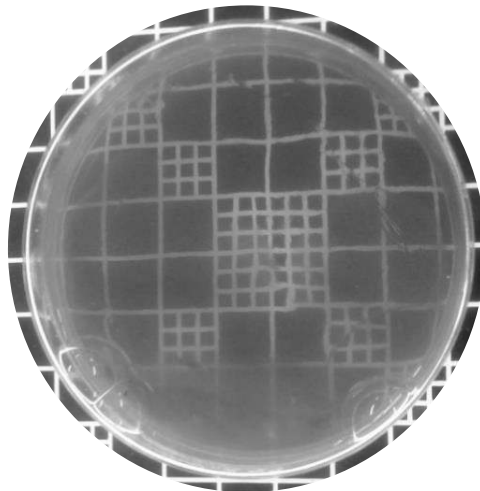


5.3.3 Coliformes totales

Se realizó la cuantificación de coliformes totales en placa Petri en base a la norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994. BIENES Y SERVICIOS. METODO PARA LA CUENTA DE MICROORGANISMOS COLIFORMES TOTALES EN PLACA.

En este análisis microbiológico se utilizó Agar Bilis rojo violeta esterilizado a 121⁰ C por 15 min y vertido en cajas Petri la siembra de coliformes se realizó a partir de las diluciones 10⁻³ y 10⁻⁶ preparada previamente, se tomó 1 ml de cada dilución y se colocó en las cajas Petri, realizando una siembra por expiación, cada dilución se inoculó por duplicado. Se incubó a 35⁰C durante 24 horas en incubadora MECANICAL CONVETION OVEN PRESICION, al cabo de ese tiempo se realizó un conteo de las colonias en placas con contador electrónico, los datos fueron expresados en Log UFC/g según *Pérez et, al., (2008)*.

Ilustración 17: Cuantificación de coliformes totales

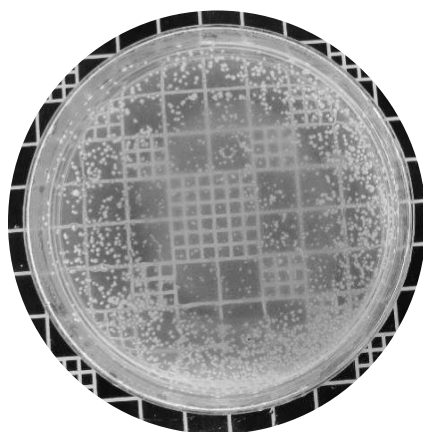


5.3.4 E. coli

La cuantificación se realizó conforme a la norma Oficial Mexicana NOM-2010-SSAI-2014. Productos y Servicios, métodos de pruebas microbiológicas, determinación de microorganismos indicadores, determinación de microorganismos patógenos.

Para la cuantificación de esto microorganismos patógenos se utilizó un medio de cultivo selectivo específico para *E. coli* EPD previamente esterilizado a 121⁰ C por 15 min, se agregó previamente preparada 1 ml de la disolución 10⁻³ y 10⁻⁶ a la cajas Petri con 20 ml de agar solido EPD el método de siembra que se utilizó fue por expansión, se inoculó por duplicado y se incubó a 32⁰C por 44 horas en una incubadora MECANICAL CONVETION OVEN PRECISION, finalmente se realizó un conteo en placa con un contador electrónico, los datos fueron expresados en Log UFC/g según Pérez *et. Al.*, (2008).

Ilustración 18: E coli en placa con medio EPD



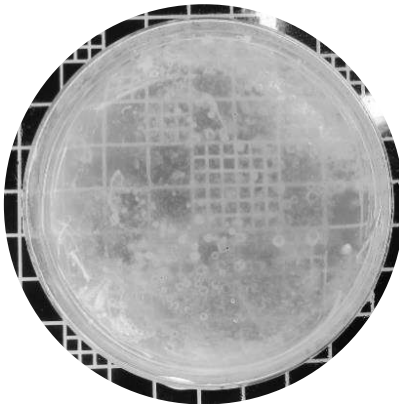
5.3.5 Levaduras y Mohos

Se utilizó la metodología indica por la norma Oficial Mexicana NOM-11SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS, METODO PARA LA CUENTA DE MOHOS Y LEVADURAS EN ALIMENTOS.

Para la determinación de levaduras y mohos se utilizó un medio de cultivo enriquecido Agar Dextrosa – Papa (PDA) acidificado con ácido tartárico al 10 % que fue esterilizado a 121⁰C por 15 min utilizando 1.4 ml por cada 100 ml de medio a utilizar. A partir de las diluciones 10⁻³ y 10⁻⁶ se tomó 1 mL de la dilución y se vertió en cajas Petri con 20 ml de agar solido PDA acidificado, cada dilución se realizó por duplicado y se incubó a 35⁰C por 48 horas en incubadora MECANICAL CONVETION OVEN PRECISION, a finalizar el tiempo se

realizó un conteo de levaduras y mohos los datos obtenidos de cada prueba fueron expresados en Log UFC/g según *Pérez et., al. (2008)*.

Ilustración 19: Cuantificación de levaduras y mohos en agar PDA acidificado

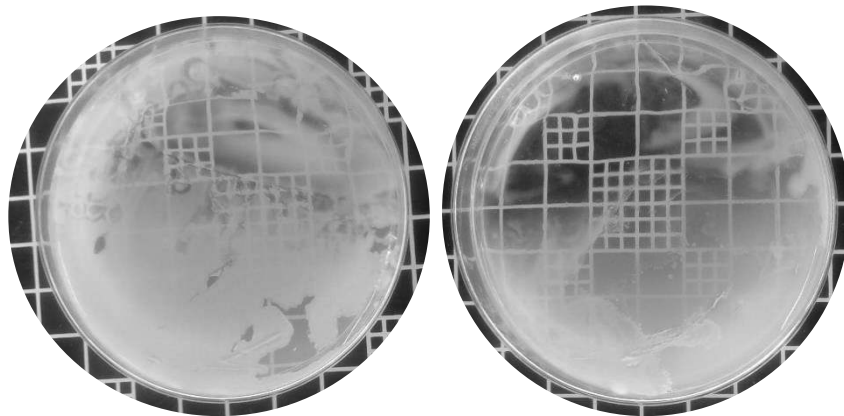


5.3.6 Bacterias Totales

Se realizó una prueba de análisis microbiológico para la obtención de bacterias totales en base a la norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994 BIENES Y SERVICIOS. METODO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA.

Para la cuantificación de bacterias totales se preparó Agar Nutritivo esterilizado a 121⁰ C por 15 min, la siembra se realizada fue por expansión con las diluciones 10⁻³ y 10⁻⁶ de digeridos vacuno y ovino. La siembra fue inoculada por duplicada e incubada a 22⁰C por 72 horas en una incubadora MECANICAL CONVETION OVEN PRECISION, finalmente se realizó una lectura en conteo de placas con un contador electrónico, los resultados obtenidos fueron expresados en Log UFC/g según *Pérez et., al., (2008)*.

Ilustración 20: Cuantificación de bacterias totales en agar nutritivo



5.4 Aislamiento, identificación, observación, conservación e inoculación de *Actinomicetos* fijadores de Nitrógeno

5.4.1 Aislamiento

El aislamiento se realizó en agar Ashby a partir de 11 muestras de los tratamientos de dos digeridos de fermentación de estiércol (ovino y vacuno) a tres concentraciones de Biochar (0%, 2.5% y 5%) y una fuente de carbono (Melaza), realizada de acuerdo a la metodología descrita por (Valdés, 2005), a partir de las diluciones 10^{-3} y 10^{-6} tomando 1 ml de dilución y vertida en condiciones de esterilidad en cajas Petri que contenían 20 ml de medio formulado Ashby. Las diluciones trabajadas por una siembra en expansión, se inocularon por duplicado y se incubaron a 35°C.

Ilustración 21: Aislamiento Actinomicetos fijadores de nitrógeno en agar Ashby



5.4.2 Identificación

La observación de *Actinomicetos* se realizó por medio de un micro cultivo mediante la técnica descrita por (Johnson, 2007) El micro cultivo es el procedimiento idóneo para la identificación de estructuras fúngicas como el caso de *Actinomicetos* fijadores de nitrógeno, una vez realizado un aislamiento de multicepas de *Actinomicetos* se eligieron las cepas de mayor visibilidad en la caja Petri, estas fueron sembradas en agar Ashby eh incubadas a 35°C por 4 días, la técnica se repitió por 3 semanas para obtener cepas de *Actinomicetos* fijadores de nitrógeno lo más puras posibles. Al término de esta técnica se realizó un micro cultivo el cual consiste en Cortar de la placa con medio de Ashby con hoja de bisturí, cuadraditos de agar de 0,5 centímetros con el bisturí se colocó un cuadradito en un equipo de micro cultivo que contiene un triángulo de vidrio esterilizado junto con un porta objetos colocado en el triángulo, el cuadro de agar Ashby fue sembrado por picadura con la cepa de

Actinomicetos purificada, se colocó un cubre objetos en la zona superior del cubo y se añadió 1 ml de agua destilada estéril para que la cepa tuviera humedad, se incubó a 35⁰C por 4 días y posteriormente se observó a microscopio óptico.

Ilustración 22: Técnica de micro cultivo



5.4.3 Observación

La observación se llevó a cabo por la metodología descrita por Valdés (2005), la cual fue removido el cubre del porta del micro cultivo, se colocó rápidamente una gota de colorante de identificación azul de algodón y fue sellado con barniz de uñas transparente en las orillas, la observación se llevó a cabo mediante un Microscopio óptico a 40 X

Ilustración 23: Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno



5.4.4 Conservación

Se seleccionaron 2 cepas *Actinomicetos* visibles en la caja Petri, La técnica empleada fue conservación con agua destilada estéril. La suspensión se obtuvo a partir de un cultivo de actinomicetos purificado, a la que se le añadió 9 ml de agua destilada estéril y se

homogeneizó con el auxilio de un agitador de cristal. La concentración alcanzada fue de 1×10^9 UFC/ml se colocó A un tubo de ensaye de 10 ml con rosca de 5 a 7 ml de agua destilada estéril y 1 ml del inóculo y se almacenó en refrigeración a 4°C la viabilidad se realizó a la hora 0, 24 y 72.

Ilustración 24: Método de conservación agua estéril



5.4.5 Multiplicación e inoculación

Una vez teniendo la caracterización de las muestras de digerido Ovino, vacuno y de *Actinomicetos* fijadores de nitrógeno se realizó la producción de un biofertilizante por fermentación partiendo por pre inóculo ajustado al patrón 7 en escala de Mc Farland. La inoculación de estas Multicepas se realizó con la viabilidad del método de conservación de agua estéril. Se generaron Digestores de Fermentación con capacidades necesarias para la multiplicación de estas cepas el digestor tenia características como toma de muestra, salida de gases con filtración, capacidad de 1 litro 400 ml y era un recipiente libre de luz. Los digestores trabajaron a una temperatura de 28 a 30°C por 168 horas tomando muestras a distintas horas (0, 24, 48, 72, 96 y 168) para verificar la concentración celular de acuerdo a (Peniche, 2005)

Ilustración 25: Digestores en laboratorio



Tabla 2: Contenido de digestor

| Compuestos | Contenido |
|----------------------|--------------|
| Digerido | 900 ml |
| Lignina | 120 ml |
| Quitina | 350 ml |
| Biochar | 70, 35, 0 ml |
| <i>Actinomicetos</i> | 10 ml |

5.5 Determinación de Toxicidad

5.5.1 Determinación de toxicidad invernadero

La determinación de toxicidad en invernadero se realizó mediante la Norma Oficial Mexicana NOM-074-ECOL-1994, que establece el método de prueba de toxicidad en invernadero. Se realizó un bioensayos en charolas por duplicado a distintas fechas en invernadero con semillas de rábano (*Raphanus sativus*), cebolla (*Allium cepa*) desinfectadas con cloro al 1%

En la tabla 4 se utilizó un sustrato combinado, 75% turba (nutrientes) y 25% agrolita (capacidad de retención de humedad) que fueron mezclados con un litro de digerido ovino o vacuno la relación fue 5 litros de mezcla de sustrato por 1 litro de digerido para 2 charolas con 128 alveolos de siembra. Se sembraron 3 semillas por alveolo y la siembra fue por duplicado colocando 125 ml de Biochar a cada repetición. Se utilizaron 4 digeridos Ovino con inoculo, ovino sin inoculo, vacuno con inoculo, vacuno con inoculo, 2 fuentes de carbono Melaza con inoculo, melaza sin inoculo y la prueba testigo turba y agrolita con agua.

Estos fueron cubiertos con bolsas negras en invernadero dejándolos por 5 días, al término de los días fueron medidos 2 factores brote y raíz. Los datos obtenidos fueron expresados en centímetros.

Ilustración 26: Prueba toxicidad Invernadero



Tabla 3: Determinación de toxicidad en invernadero rábano (*Raphanus sativus*), cebolla (*Allium cepa*)

| Tratamiento | Sustrato (%) | Digerido (20%) | Concentración de biochar | Inoculo (<i>Actinomicetos</i>) |
|-------------|------------------------|----------------|--------------------------|----------------------------------|
| T1 | 75/25 turba - agrolita | Ovino | 0 | NO |
| T2 | 75/25 turba - agrolita | Ovino | 2.5% | NO |
| T3 | 75/25 turba - agrolita | Vacuno | 0 | NO |
| T4 | 75/25 turba - agrolita | Vacuno | 2.5% | NO |
| T5 | 75/25 turba - agrolita | Melaza | 0 | NO |
| T6 | 75/25 turba - agrolita | Melaza | 2.5% | NO |
| T7 | 75/25 turba - agrolita | Ovino | 0 | SI |
| T8 | 75/25 turba - agrolita | Ovino | 2.5% | SI |
| T9 | 75/25 turba - agrolita | Vacuno | 0 | SI |
| T10 | 75/25 turba - agrolita | Vacuno | 2.5% | SI |
| T11 | 75/25 turba - agrolita | Melaza | 0 | SI |
| T12 | 75/25 turba - agrolita | Melaza | 2.5% | SI |
| T13 | Agrolita | Blanco (agua) | 0 | NO |
| T14 | Agrolita | Blanco (agua) | 2.5% | NO |

En la tabla 3 se puede observar la combinación de materiales orgánicos en 14 tratamientos para uso específico de bioensayos en invernadero para rábano (*Raphanus sativus*), cebolla (*Allium cepa*)

5.5.2 Prueba de toxicidad de digestores

Una vez obtenido muestra de los digestores a distintas horas (0, 24, 48, 72, 96 y 168) para verificar la concentración celular de acuerdo a (Peniche, 2005) se realizaron pruebas de toxicidad en cada muestra con semillas de rábano (*Raphanus sativus*).

Los bioensayos fueron realizados según la metodología de Correa (2008) colocando un papel filtro seco y cortado en la caja petri de plástico, posteriormente se colocaron 9 ml de una dilución al 20 % de Digerido ovino o vacuno en combinación con biochar 2.5% y 5% inoculado con *Actinomiceto* fijadores de Nitrogeno como se observa en la tabla 5, una vez mojado el papel filtro se colocaron 20 semillas de rábano (*Raphanus sativus*) las cuales fueron tapadas por otro papel filtro en la caja, una vez terminado el procedimiento se colocaron en una cámara de germinación a una temperatura de 25°C por 5 días, transcurrido el tiempo se tomaron los datos de longitud de brote y raíz.

Tabla 4: Determinación de toxicidad en digestores de semilla rábano (*Raphanus sativus*)

| Tratamiento | Sustrato | Digerido (20%) | Concentración de biochar | Inoculo (<i>Actinomicetos</i>) |
|-------------|---------------------------|----------------|--------------------------|----------------------------------|
| T1 | Melaza, quitina, lignina. | Ovino | 0 | SI |
| T2 | Melaza, quitina, lignina. | Ovino | 2.5% | SI |
| T3 | Melaza, quitina, lignina. | Ovino | 5% | SI |
| T4 | Melaza, quitina, lignina. | Vacuno | 0 | SI |
| T5 | Melaza, quitina, lignina. | Vacuno | 2.5% | SI |
| T6 | Melaza, quitina, lignina. | Vacuno | 5% | SI |
| T7 | Agua (blanco) | Agua | 0 | NO |

En la tabla 4 se puede observar la combinación de materiales orgánicos en 7 tratamientos a distintas concentraciones para uso específico de bioensayos en laboratorio para rábano (*Raphanus sativus*).

5.5.3 Determinación de toxicidad en Laboratorio

Método utilizado propuesto por *Correa (2008)* Se realizó con digeridos Ovino y Vacuno al 20% en 200 ml de agua destilada adicionada en placas Petri lavadas y desinfectadas con cloro al 1%. Se colocaron 9 mL de digerido O, V, O c/i, V c/i, M c/i testigo por triplicado en cortes de papel filtro del tamaño de la caja Petri como se indica en la tabla 6, una vez absorbido por el papel filtro se colocarán 20 semillas esparcidas por toda la caja Petri, posteriormente se cubrieron con otro papel filtro fueron rotuladas y enredadas en papel aluminio para no perder capacidad de humedad, estas fueron puesta a una temperatura de 25⁰C en una cámara de germinación por 5 días, una vez transcurrido el tiempo son medidas las características de longitud en brote y raíz de semilla (*Raphanus sativus*), cebolla (*Allium cepa*).

Ilustración 27: Prueba toxicidad Laboratorio

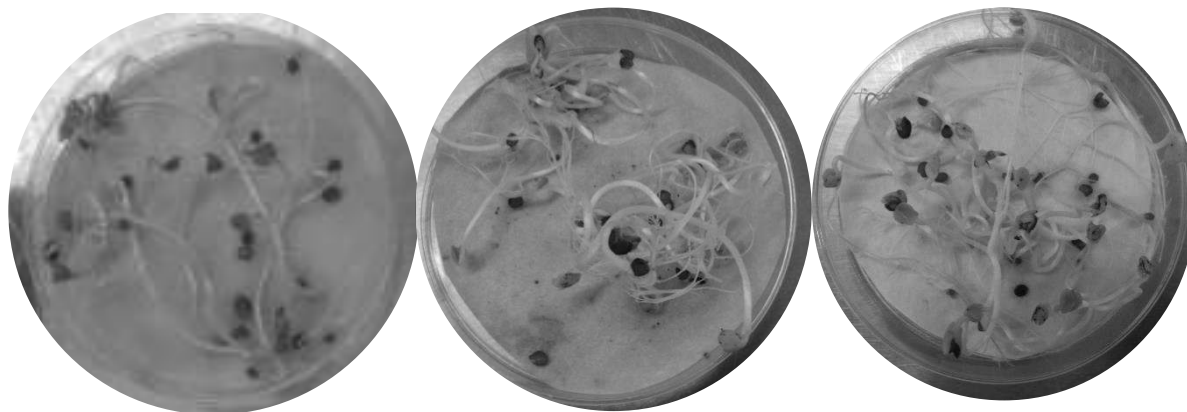


Tabla 5: Determinación de toxicidad en laboratorio de semilla de rábano (*Raphanus sativus*), cebolla (*Allium cepa*).

| Tratamiento | Digerido (20%) | Concentración de biochar | Inoculo (<i>Actinomicetos</i>) |
|--------------------|-----------------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| T1 | Ovino | 0 | NO |
| T2 | Ovino | 0 | Si |
| T3 | Vacuno | 0 | NO |
| T4 | Vacuno | 0 | Si |
| T5 | Melaza | 0 | Si |
| T6 | Ovino | 2.5% | No |
| T7 | Ovino | 2.5% | SI |
| T8 | Vacuno | 2.5% | No |
| T9 | Vacuno | 2.5% | SI |
| T10 | Melaza | 2.5% | SI |
| T11 | Ovino | 5% | NO |
| T12 | Ovino | 5% | Si |
| T13 | Vacuno | 5% | No |
| T14 | Vacuno | 5% | Si |
| T15 | Melaza | 5% | Si |
| T16 | Blanco (agua) | 0 | No |
| T17 | Blanco (agua) | 2.5% | No |
| T18 | Blanco (agua) | 5% | No |

En la tabla 5 se puede observar la combinación de materiales orgánicos en 18 tratamientos a distintas concentraciones para uso específico de bioensayos en laboratorio para rábano (*Raphanus sativus*).

Cebolla (*Allium cepa*).

5.5.4 Determinación de toxicidad de maíz (*Zea maíz*)

Se realizó una prueba de toxicidad en laboratorio propuesto por *Warham.; manual para laboratorio (1999)*. Se realizó un lavado de semilla de maíz con una solución al 1% de cloro y se puso a secar a una temperatura ambiente, una vez seca la semilla de maíz, se trabajó en laboratorio utilizando 3 sanitas de papel las cuales fueron colocadas de manera escalonada, una vez terminado ese punto se colocaron 20 semillas de maíz con dirección a un mismo lugar estas fueron bañadas con 20 ml de digerido O, V, O c/i, V c/i, M c/i diluidas al 20% y como en la tabla 7 está indicado. Testigo este procedimiento se realizó por triplicado, las sanitas fueron enredadas para colocarlas en una bolsa de poli papel e incubar a una temperatura de 25⁰C en una cámara de germinación por 5 días. Una vez transcurrido el tiempo fueron medidas las características de longitud de brote y raíz de Maíz (*Zea maíz*).

Ilustración 28: Prueba toxicidad de Maíz (Zea maíz).

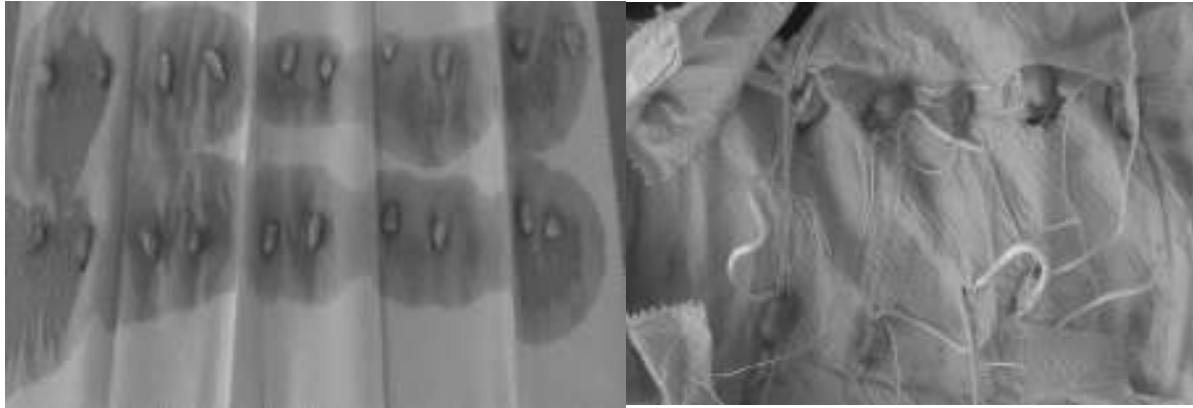


Tabla 6: Determinación de toxicidad en laboratorio de semilla de Maíz (Zea maíz)

| Tratamiento | Digerido (20%) | Concentración de biochar | Inoculo (<i>Actinomicetos</i>) |
|-------------|----------------|--------------------------|----------------------------------|
| T1 | Ovino | 0 | NO |
| T2 | Ovino | 0 | Si |
| T3 | Vacuno | 0 | NO |
| T4 | Vacuno | 0 | Si |
| T5 | Melaza | 0 | Si |
| T6 | Ovino | 0 | Si |
| T7 | Ovino | 2.5% | SI |
| T8 | Ovino | 5% | Si |
| T9 | Vacuno | 0 | SI |
| T10 | Vacuno | 2.5% | SI |
| T11 | Vacuno | 5% | Si |
| T12 | Agua (blanco) | 0 | No |

En la tabla 6 se puede observar la combinación de materiales orgánicos en 12 tratamientos a distintas concentraciones para uso específico de bioensayos en laboratorio para Maíz (*Zea maíz*)

La determinación de toxicidad se realizó mediante las siguientes fórmulas según Zamora & García (2011):

$$GRS (\%) = \frac{\text{Número de semillas germinadas con la muestra de agua problema}}{\text{Número de semillas germinadas en agua dura (testigo)}} \times 100 \quad \text{Ec. 4}$$

$$CRR (\%) = \frac{\text{Longitud promedio de la radícula con la muestra de agua problema}}{\text{Longitud promedio de la radícula en agua dura (testigo)}} \times 100 \quad \text{Ec. 5}$$

$$IG (\%) = \frac{GRS \times CRR}{100} \quad \text{Ec. 6}$$

$$IGN = \frac{Germ_x - Germ_{Testigo}}{Germ_{Testigo}} \quad Ec.7$$

Donde:

% GRS = Porcentaje de Germinación Relativa de la Semilla.

%CRR = Porcentaje de Crecimiento Relativo de la Radícula.

ING = Índice del porcentaje de Germinación residual Normalizado.

Germ x = Promedio de la semilla germinada con muestra.

Germ Testigo = % promedio de semilla Germinada con el testigo.

Índice de Elongación Radical (IER)

$$IER = \frac{Elong_x - Elong_{Testigo}}{Elong_{Testigo}} \quad Ec. 8$$

Donde:

Elong x = Longitud promedio de la radícula de las semillas germinadas con la muestra.

Elong Testigo = Longitud promedio de la radícula de las semillas con el testigo.

Los resultados son comparados con los criterios de interpretación de los IG propuestos por *Zamora y García. (2011)*.

IG > 80% indica ausencia de las sustancias fitotóxicas o están en muy baja concentración.

IG > 50% Indica presencia moderada de dichas sustancias.

IG < 50% Indica una fuerte presencia de sustancias fitotóxicas

Los índices de IGN e IER establecen valores de toxicidad desde -1 a > 0 las siguientes categorías.

0 a -0.25 Baja toxicidad.

-0.25 a -0.5 Toxicidad moderada.

-0.5 a -0.75 Muy toxico.

-0.75 a -1.0 Toxicidad muy alta.

Valores del índice > 0 indican crecimiento de la radícula u hormesis (*Bagur, 2011*)

Los datos de las variables fueron evaluados y registrados en la bitácora del campus, los valores fueron capturados en hojas de cálculo (Excel). Los datos capturados fueron procesados en análisis, y se realizaron comparaciones según prueba tukey con $p < 0.05$ para el sistema evaluado de prueba de toxicidad de laboratorio, se utilizó el paquete estadístico SAS, versión 9.4 para Windows 10.

Las variables serán medidas en porcentaje se harán los ajustes de los datos siguiendo la metodología establecida por molinero (2003) para poder ajustar los datos de dichas variables a una distribución normal.

5.6 Análisis Estadístico

Una vez terminadas las pruebas mencionadas en Materiales y métodos, se muestran una serie de resultados obtenidos capturados en una hoja de cálculo (Excel) dentro del paquete de Microsoft de Office, de la medición de todas las muestras de digeridos Ovino, vacuno, ovino con inculo, vacuno con inculo, melaza y melaza con biochar, en sus distintas concentraciones 2.5 y 5%.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación de medias Tukey utilizando un programa SAS (Statistical analysis System) en la prueba de toxicidad de laboratorio en Semilla de rábano (*Raphanus sativus*).

Las variables serán medidas en porcentaje se harán los ajustes de los datos siguiendo la metodología establecida por *Molinero (2003)* para poder ajustar los datos de dicha variables a una distribución normal.

VII. RESULTADOS Y DISCUSION

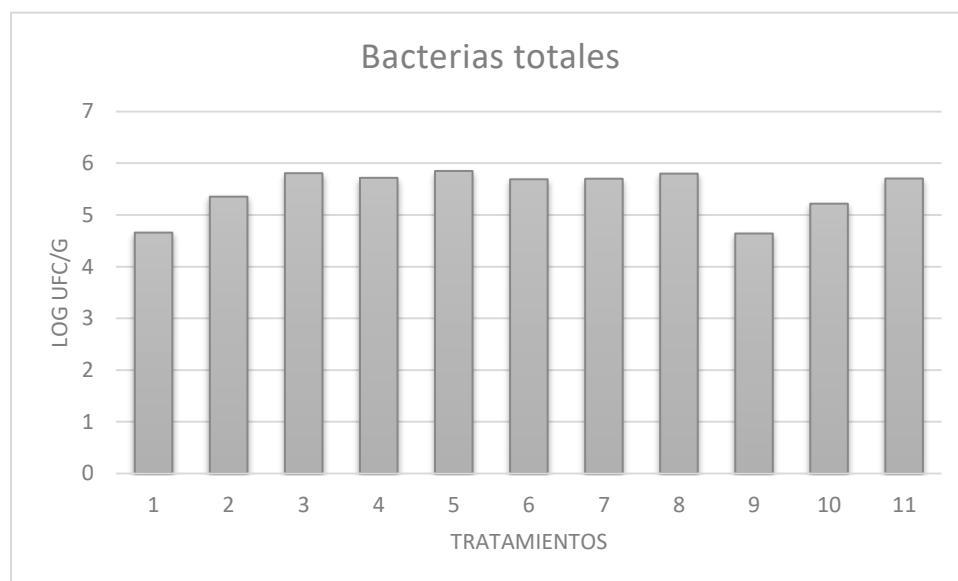
6.1 Determinación Microbiológica de 11 digeridos en combinación con biochar a distintas concentraciones, y con y sin inoculación de *Actinomicetos* Fijadores de N₂

Los resultados obtenidos al realizar pruebas microbiológicas a 11 digeridos en combinación con biochar a distintas concentraciones y *Actinomicetos* fijadores de nitrógeno, son

expresados en graficas analizadas para obtener un resultado que mencione que condiciones son las mejores para la producción de un biofertilizante con efectos favorables para el crecimiento de cultivos sanos libres de patógenos.

6.1.1 Bacterias totales de 11 digeridos en combinación con biochar a distintas concentraciones, y con y sin inoculación de *Actinomicetos* Fijadores de N₂

Ilustración 29: Cuantificación Log UFC/g de bacterias totales a 11 tratamientos de digeridos

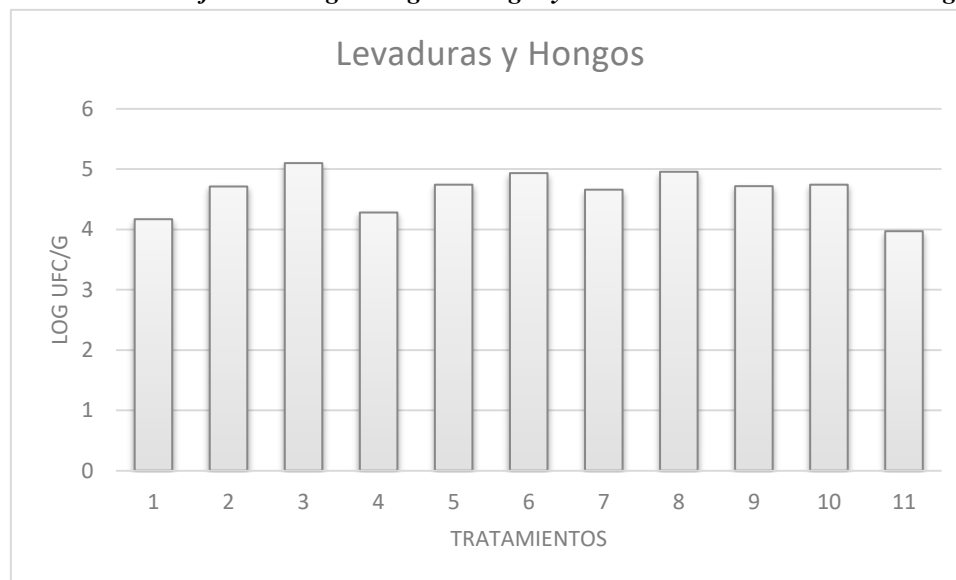


En ilustración 29 se muestra la gráfica de cuantificación Log UFC/g de resultados obtenidos de Bacterias totales de 11 tratamientos.

Según *acuña et al (2006)* el número de bacterias tiene una estrecha relación con algunas propiedades físicas y químicas de la muestra. Como lo son el pH, la CE, altos contenidos de nitratos, el cultivo viejo o nuevo, la temperatura, las condiciones de muestreo y siembra, los resultados obtenidos de bacterias totales indican que todas las muestras contienen una amplia gama de bacterias desconocidas en las cuales podrían estar creciendo *Actinomicetos*. El tratamiento 9 vacuno inoculado sin biochar maneja un menor crecimiento de bacterias, esto se debe alto nivel de pH indicando, en este caso existe una pequeña probabilidad de crecimiento bacteriano y los tratamiento 3 Y 5, vacuno con inoculo y melaza con inoculo son los que tiene un mayor número de bacterias totales expresados en Log UFC/g expresando un favorable resultado puesto que estos tratamientos son inoculados.

6.1.2 Hongos y Levaduras de 11 digeridos en combinación con biochar a distintas concentraciones, y con y sin inoculación de *Actinomicetos* Fijadores de N₂

Ilustración 30: Cuantificación Log UFC/g de Hongos y Levaduras a 11 tratamientos de digeridos



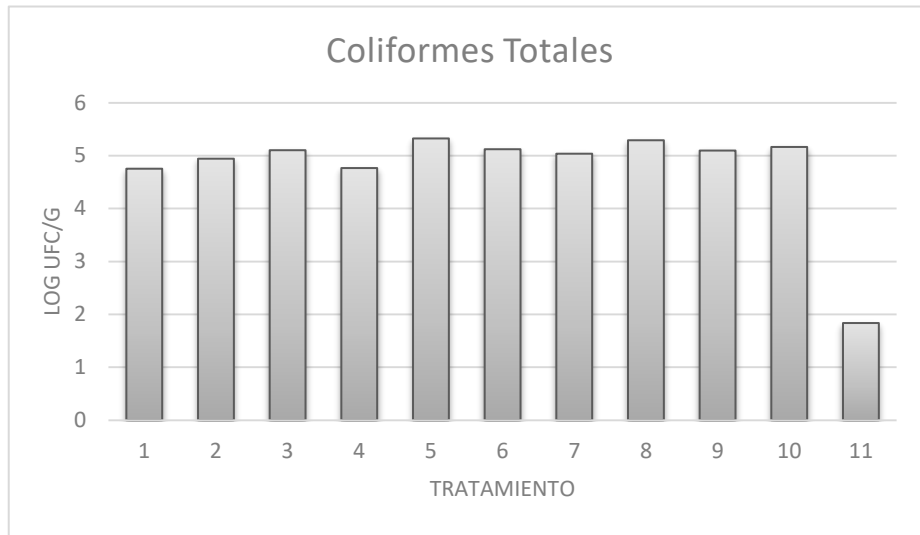
En la ilustración 30 están expresados los resultados obtenidos en Log UFC/g de levaduras y hongos obtenida en un análisis microbiológico en agar PDA acidificado a 11 muestras de digerido Ovino, Vacuno, melaza en combinación con Biochar a distintas concentraciones con y sin *Actinomicetos* fijadores de nitrógeno, en la gráfica se muestra un resultado positivo en crecimiento de Hongos y Levaduras indicando que los 12 tratamientos se encuentran en un resultado entre 5 y 4 Log UFC/g esto se debe a que los tratamientos tiene una gama de nutrientes que son favorables para un crecimiento de biodiversidad microbiana.

6.1.3 Coliformes totales de 11 digeridos en combinación con biochar a distintas concentraciones, y con y sin inoculación de *Actinomicetos* Fijadores de N₂

En la ilustración 30 se muestran resultados obtenidos a través de una prueba microbiológica a 11 digeridos de distintos tratamientos de Coliformes totales aerobios y anaerobios. Presenta resultados positivos en el crecimiento de coliformes en Agar bilis rojo violeta en todas las muestras de digeridos vacuno, ovino, melaza en combinación con biochar a distintas concentraciones e inoculada con y sin *Actinomicetos* fijadores de nitrógeno, indicando que el tratamiento 11 Vacuno 5% biochar con inóculo tiene una menor cantidad de crecimiento bacteriano de Coliformes totales anaerobios indicando un 1.8 Log UFC/g y el tratamiento 8

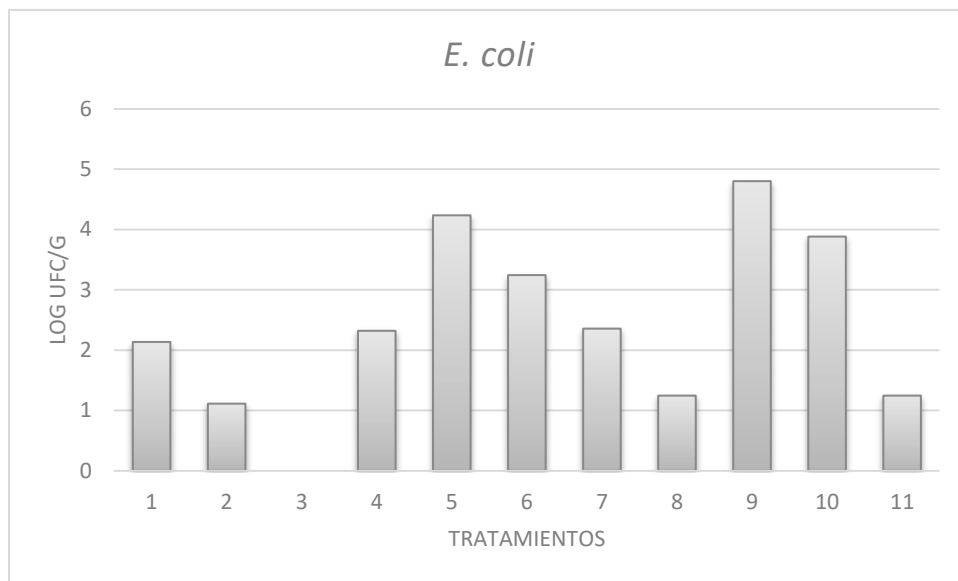
un mayor crecimiento de Coliformes totales indicando 5.3 Log UFC/g. indicando que el tratamiento 8 tiene amplias cualidades específicas para el crecimiento microbiano de especies comunes de coliformes totales.

Ilustración 31: Cuantificación Log UFC/g de coliformes totales a 11 tratamientos de digeridos



6.1.4 *E. coli* de 11 digeridos en combinación con biochar a distintas concentraciones, y con y sin inoculación de *Actinomicetos* Fijadores de N₂

Ilustración 32: Cuantificación Log UFC/g de *E. coli* totales a 11 tratamientos de digeridos



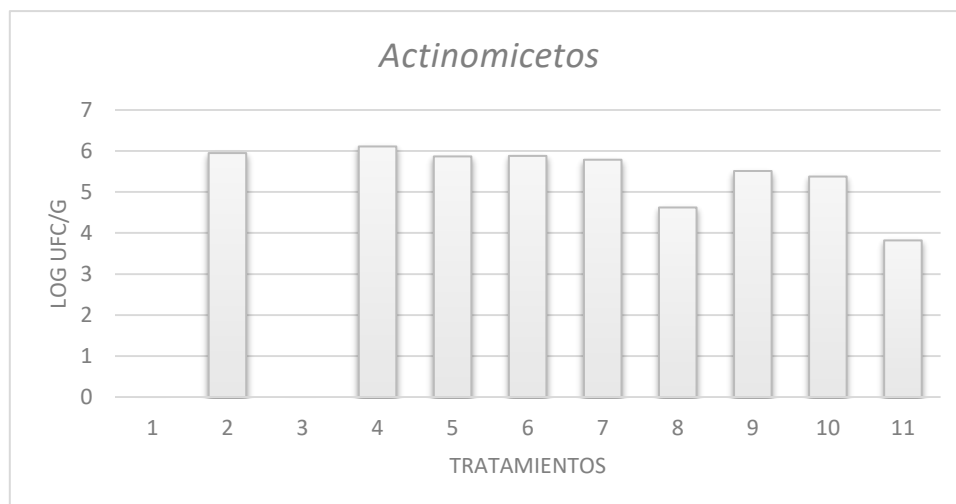
En la ilustración 33 se muestran resultados obtenidos a través de una prueba microbiológica a 11 digeridos de distintos tratamientos de *E. coli* en Log UFC/g donde no hubo crecimiento

de *E. coli* en el tratamiento 3 vacuno con inoculo indicando que este biofertilizante está libre de patógenos que afectan la salud humana, teniendo crecimiento de patógenos en los demás biofertilizantes, en los cuales los tratamientos 2 (ovino sin inoculo) 8 (Ovino con inoculo en combinación con biochar al 5%) y 11 (vacuno 5% biochar con inoculación) tienen resultados aproximadamente de 1 log UFC/g de *E. Coli* que indica que los biofertilizantes, tienen una cantidad moderada de patógenos, y los tratamiento 5 (melaza con inoculo) 9 (vacuno con inoculo) y 10 (vacuno con inoculo al 2.5%) tienen un alto contenido de bacterias patógenas *E. coli*. la presencia de microorganismos patógenos en estos biofertilizantes causa enfermedades en los cultivos debido a que existe una relación entre planta y hospedero esto ocurre cuando existe una penetración mecánica o bajo la acción de enzimas y toxicas, dicha infección puede realizarse mediante hipocolitos radiculares.

6.1.5 *Actinomicetos* totales de 11 digeridos en combinación con biochar a distintas concentraciones, y con y sin inoculación de *Actinomicetos* Fijadores de N₂

En la ilustración 34 se representa la cantidad de *Actinomicetos* totales obtenidas de los 11 biofertilizantes para corroborar la presencia de *Actinomicetos* sin importar el género, donde todos los tratamientos que están inoculados presentan resultados positivos en el crecimiento microbiano de esta especie. Mientras que en los tratamientos 1 (ovino sin inoculación) y 3 (vacuno sin inoculación) muestran resultados de cero crecimientos en las placas con agar nutritivo lo que indica que estos tratamientos son exactamente sin inoculación de *Actinomicetos*.

Ilustración 33: Cuantificación Log UFC/g de *Actinomicetos* a 11 tratamientos de digeridos

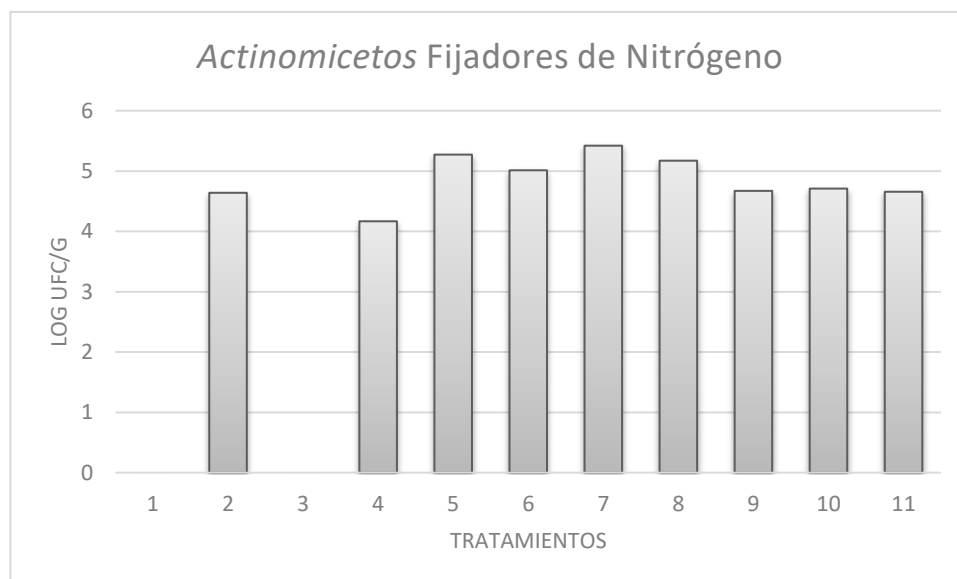


Según (Salazar, 2013) los actinomicetos pueden utilizar fuentes de carbono simple, complejo y compuestos moleculares orgánicos, así mismo utilizan fuente de nitrógeno amonio, nitratos, aminoácidos, peptonas y un gran número de proteínas, se encuentran en suelo secos y cálidos donde logran alcanzar grandes cantidades de población. A su vez son descritos como agentes de biocontrol por la capacidad de producir enzimas biodegradativas.

6.1.6 Actinomicetos fijadores de nitrógeno de 11 digeridos en combinación con biochar a distintas concentraciones, y con y sin inoculación de Actinomicetos Fijadores de N₂

En la ilustración 35 se representa la cantidad de Actinomicetos fijadores de nitrógeno de las muestras de 11 digeridos ovino, vacuno y melaza en combinación con biochar a distintas concentraciones, con y sin Actinomicetos fijadores de nitrógeno donde los resultados obtenidos de los tratamientos 1 y 3 indican que no hubo crecimiento de estas cepas relacionando con exactitud 0 vino y Vacuno sin Biochar y sin inculo, y los tratamientos 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 presentan un crecimiento favorable de estas multicepas Fijadoras de nitrógeno.

Ilustración 34: Cuantificación Log UFC/g de Actinomicetos fijadores de nitrógeno a 11 tratamientos de digeridos

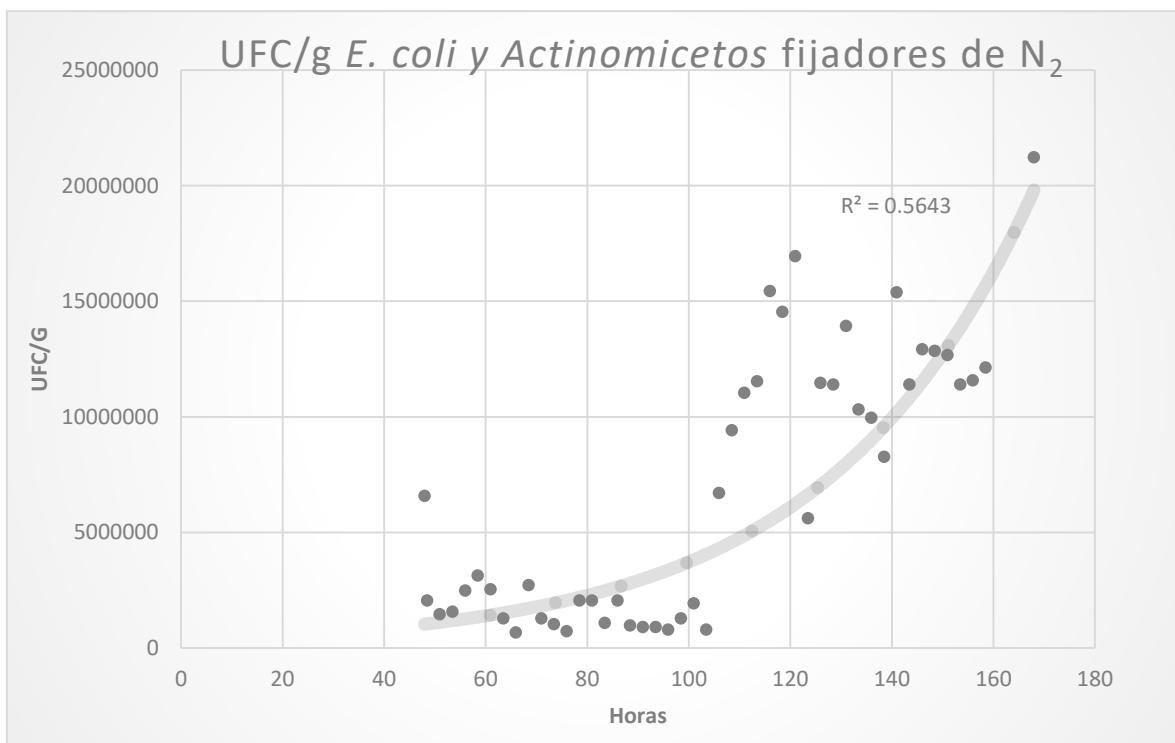


Según (Salazar, 2013) el incremento de la presencia de actinomicetos fijadores de nitrógeno en el suelo o en biofertilizantes es debido a que dentro de la zona existen una mayor adversidad de especies vegetales, un movimiento continuo de nutrientes y acumulación alta

y permanente de residuos de diversas especies vegetales. Dicha fijación se puede realizar de forma abiótica o biótica; en la primera se da por proceso químico espontaneo como oxidación de nitrógeno atmosférico por los rayos solares y la biológica se lleva a cabo mediante microorganismo (actinomicetos fijadores de nitrógeno) denominado diazótrofos donan el nitrógeno es residuo a amonio e incorporarlo a la biosfera.

6.1.7 Comparación microbiana en digestores con *E. coli* y Actinomicetos Fijadores de nitrógeno

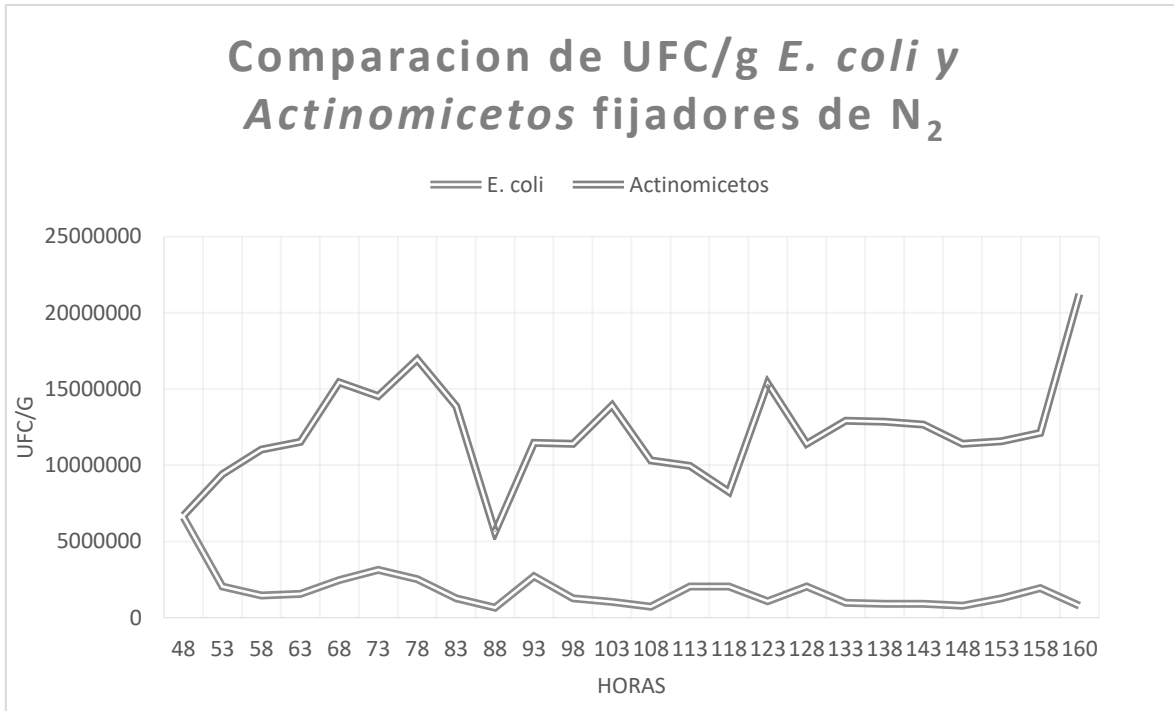
Ilustración 35: Reacción de Actinomicetos fijadores de nitrógeno y E. coli



En la ilustración 36 se encuentran graficados los resultados de multiplicación microbiana en Log/UFC por horas de *E. coli* y *Actinomicetos* fijadores de nitrógeno en la que podemos observar una línea de tendencia exponencial indicando que a un número significativamente pequeño de biodiversidad microbiana al incrementar el tiempo la multiplicación microbiana por ambos cultivos de bacterias crece exponencialmente en la cual lapsos de corto tiempo en el digestor para *Actinomicetos* fijadores de nitrógeno, generan una mayor multiplicación celular, esto resultados es generado gracias a las condiciones nutricionales que contienen los

digestores para *Actinomicetos*, que por el lado contrario *E. coli* reduce significativamente su multiplicación celular no llegando a 0 pero si a niveles bajos como 11 o 15 Log UFC/g.

Ilustración 36 Comparación de UFC/g de *E. coli* y *Actinomicetos* Fijadores de Nitrógeno



En la ilustración 37 se observa la reacción en el crecimiento microbiana de células *E. coli* y *Actinomicetos* fijadoras de nitrógeno, en la cual ninguna depende de la otra, simplemente los rangos obtenidos son el comportamiento de las células en distintos intervalos de horas, en la cual *Actinomicetos* fijadoras de nitrógeno tiende a tener una elevación exponencial justo al final del muestreo, por el otro lado con el tiempo *E. coli* reduce significativamente la multiplicación celular en el digestor debido a distintas condiciones.

6.2 Resultados prueba de micro cultivo

Ilustración 37: *Actinomicetos* A) *Actinomicetos* Colpos Campus puebla B) *Actinomicetos* manual de Bergey

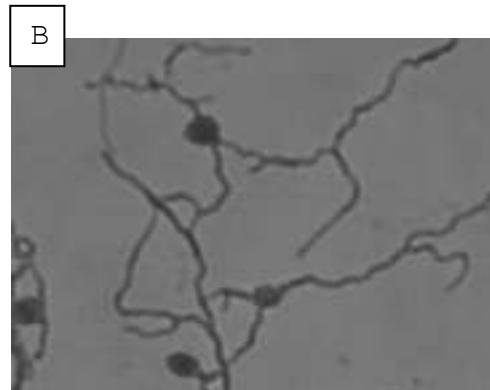
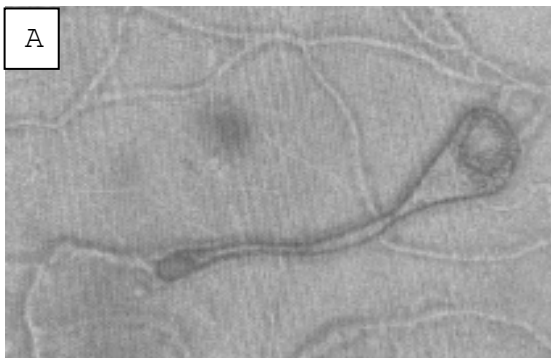


Tabla 7 Características de Streptomyces

| | <i>Actinomicetos Colpos</i> | <i>Actinomicetos Manual</i> |
|---|-----------------------------|-----------------------------|
| Micelio vegetativo | Si | Si |
| Filamentos aéreos no fragmentados | Si | Si |
| Conidióforos | Si | Si |
| Ramificaciones en forma de espirales, | Si | Si |
| Característico del género Streptomyces. | Si | Si |

En la tabla 2 se observa las características morfológicas de Actinomicetos Streptomyces y la comparación con Streptomyces del manual de Bergey donde son similares las tomadas en el colegio de posgraduados a las del manual de Bergey (2008)

6.3 Bioensayo de laboratorio de digerido ovino y vacuno con inoculación y a distintas concentraciones de biochar

En la tabla 8 se presentan los resultados obtenidos de diferencia significativa de la variable respuesta estudiada en la especie de rábano (*Raphanus sativus L.*) donde el digerido vacuno 5% de biochar se representa alta toxicidad en comparación con el digerido ovino en la interacción Digerido/de biochar, no representa significancia.

En el IG representa el producto de la germinación de las semillas por el crecimiento relativo de la radícula, así mismo constituye un indicador para evaluar de manera integral la toxicidad que afecta el crecimiento de la raíz y la toxicidad afecta la germinación de la semilla, los resultados son comparados con criterios de interpretación de los IG propuestos por Zamora y García (2011).

IG > 80% indicara ausencia de las sustancias fitotóxicas o están en muy baja concentración

IG > 50% y < 80% indicara presencia moderada de dichas sustancias.

IG < 50% Indica una fuerte presencia de sustancia fitotóxicas Lárez Ferrer (2013)

Según Pérez et al (2016) los bioles elaborados a partir de estiércol vacuno presentan pH ácido por lo que podrían inhibir la germinación correcta de las semillas.

La fitotoxicidad se debe medir previo a la recomendación generalizada como fertilizante orgánico, ya que se asocia a la presencia de sustancias que pueden ocasionar un efecto negativo en el crecimiento y desarrollo de las plantas, tales como ácidos orgánicos, sales minerales, metales pesados entre otros.

La elevada fitotoxicidad $IG < 50\%$ se relaciona con un bajo grado de madurez de los fertilizantes orgánicos y puede ser detectada de manera indirecta por bioensayo de germinación, el cual resulta un método sencillo, rápido, reproducible y económico

Albuquerque (2012)

Tabla 8 Análisis de varianza germinación de para la determinación de toxicidad en digerido ovino y vacuno realizado en laboratorio

| Tratamientos | PGR | CRR | IG | IGN | IER | Ph | CE | G Brix | NO-3 |
|-----------------|----------|-----------|-----------|----------|---------|----------|----------|---------|------------|
| Blanco | 100.00 a | 100.00 b | 100.00 ab | 0 a | 0.00 b | 7.08 a | 18.62 ba | 0 e | 8 c |
| D. Ovino 0% | 19.96 d | 75.49 b | 17.29 b | -0.74 c | -0.15 b | 5.62 b | 17.91 bc | 5.98 bc | 1164.17 a |
| D. Ovino 2.5% | 31.13 cd | 98.75 b | 35.17 b | -0.67 c | 0.00 b | 5.18 db | 16.93 c | 5.56 dc | 1176.67 a |
| D. Ovino 5% | 37.54 cd | 98.28 b | 28.53 b | -0.61 cb | 0.00 b | 5.23 cde | 18.31 b | 6.25 ba | 1081.67 ab |
| D. Vacuno 0% | 50.76 cb | 90.34 b | 50.15 b | -0.49 cb | 0.09 b | 5.11 e | 19.59 a | 6.71 a | 1016.67 b |
| D. Vacuno 2.5% | 65.53 b | 240.07 a | 182.25 a | -0.34 b | 1.40 a | 5.43 cb | 18.76 ba | 5.16 dc | 1073.33 ab |
| D. Vacuno 5% | 49.22 cb | 78.56 b | 43.53 b | -0.57 cb | -0.18 b | 5.35 cd | 17.10 c | 5.93 bc | 1095.83 ab |
| DMS | 25.21 | 104.95 | 104.53 | 0.2802 | 1.0706 | 0.204 | 1.0748 | 0.4631 | 112.18 |
| ANOVA | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | 0.0002 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 |
| Día | | | | | | | | | |
| 01/08/2018 | 44.94 bc | 99.31 ab | 77.07 a | -0.55 bc | 0.00 ab | 5.65 a | 18.39 ab | 5.38 a | 1034.76 a |
| 02/08/2018 | 55.86 ba | 136.50 a | 74.38 a | -0.39 ba | 0.38 ab | 5.47 c | 18.56 ab | 5.23 b | 936.86 b |
| 03/08/2018 | 62.32 a | 130.49 ab | 77.22 a | -0.37 a | 0.25 ab | 5.55 bc | 17.91 bc | 5.01 c | 898.57 b |
| 06/08/2018 | 39.24 c | 90.26 b | 38.13 a | -0.60 c | -0.09 b | 5.61 ab | 17.83 c | 4.72 d | 910.57 b |
| DMS | 14.832 | 44.506 | 59.137 | 0.1694 | 0.4575 | 0.0967 | 0.4873 | 0.0787 | 54.933 |
| ANOVA | 0.0005 | 0.0347 | 0.2349 | 0.0008 | 0.026 | <.0001 | 0.0003 | <.0001 | <.0001 |
| Digerido | | | | | | | | | |
| Blanco | 100.00 a | 100.00 ab | 100.00 b | 0.00 a | 0.00 ab | 7.08 a | 18.62 a | 0.00 b | 8 c |
| Ovino | 55.17 b | 90.84 b | 30.33 a | -0.67 b | -0.05 b | 5.34 b | 17.71 a | 5.93 a | 1140.83 b |
| Vacuno | 29.54 c | 136.32 a | 91.97 a | -0.44 c | 0.37 a | 7.08 b | 18.48 b | 5.93 a | 1061.94 a |
| DMS | 13.297 | 39.9 | 53.016 | 0.1519 | 0.4102 | 0.0867 | 0.4368 | 0.0706 | 49.247 |
| ANOVA | <.0001 | 0.0027 | 0.0009 | <.0001 | 0.0062 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 |

| C. Biochar | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|----------|----------|----------|---------|---------|--------|---------|--------|-----------|--|
| Blanco | 100.00 a | 100.00 b | 100.00 a | 0.00 a | 0.00 b | 7.08 a | 18.62 a | 0.00 d | 8.00 b | |
| 0% | 35.36 b | 82.91 b | 33.72 c | -0.61 b | -0.12 b | 5.36 b | 18.75 b | 6.35 a | 1090.42 a | |
| 2.50% | 48.33 b | 169.41 a | 108.71 a | -0.51 b | 0.69 a | 5.31 b | 17.85 b | 5.36 c | 1125.00 a | |
| 5% | 43.38 b | 88.42 b | 41.03 C | -0.55 b | -0.09 b | 5.29 b | 17.70 a | 6.09 b | 1088.75 a | |
| DMS | 15.512 | 46.546 | 61.847 | 0.1772 | 0.4785 | 0.1011 | 0.5096 | 0.0824 | 57.45 | |
| ANOVA | 0.0519 | 0.0027 | 0.001 | 0.2098 | <.0001 | 0.0861 | <.0001 | <.0001 | 0.1176 | |
| Interacciones | | | | | | | | | | |
| Día x Digerido | 0.305 | 0.0003 | 0.344 | 0.409 | 0.0002 | 0.0187 | 0.0076 | <.0001 | 0.0572 | |
| Día x C. Biochar | 0.1318 | <.0001 | 0.0081 | 0.2881 | <.0001 | 0.0035 | 0.0022 | <.0001 | 0.2095 | |
| Digerido X C. Biochar | 0.0749 | <.0001 | 0.0029 | 0.1634 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | 0.0003 | |
| Día x Digerido x C. Biochar | 0.8419 | <.0001 | 0.0119 | 0.8134 | <.0001 | 0.0008 | <.0001 | <.0001 | 0.1855 | |

VIII.- CONCLUSIÓN

Todos los biofertilizantes presentan un alto índice de Nitratos en ppm esto indica que existe una amplia toxicidad en los cultivos con los que fueron trabajados, pero los 11 digeridos, ovino y vacuno en combinación con biochar a distintas concentraciones, inoculados o no con *Actinomicetos* fijadores de nitrógeno, presentan valores similares en características físico químicas en el % de materia orgánica, cenizas, en el pH muestran una variación ya que los digeridos no inoculados tienden a ser más alcalinos que los inoculados por *Actinomicetos* fijadores de nitrógeno que tienden a ser ácidos en un nivel muy bajo.

El biofertilizante con mejores características para una producción y comercialización es Vacuno al 2.5 % con inoculación, debido a su bajo nivel de toxicidad.

En la multiplicación de *Actinomicetos* fijadores de nitrógeno sobre digerido de fermentación de estiércol ovino y vacuno con diferentes concentraciones de biochar, es mejor en recipientes que no seas expuesto a la luz, como los realizados con vidrio en el proyecto Caracterización físicoquímicas y microbiológicas en árboles frutales.

En base a las pruebas de morfología macro y microscópica que se realizaron a las muestras de biofertilizantes con *Actinomicetos* se puede identificar como *Streptomyces* el género de la cepa con la que se trajo.

Al realizar pruebas de toxicidad se determinó que el digerido vacuno es el más toxico en comparación con el digerido ovino, al agregar diferentes concentraciones de biochar, disminuye significativamente la toxicidad, siendo la concentración 2.5 % la que presento menor toxicidad en comparación al 0 y 5 %

IX.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña 2008. A la importancia de los microorganismos en calidad y salud Mol Biol Evol (2009) 26 (2): 335-343. doi: 10.1093/molbev/msn247
- desemove., T.A 2009, Manual of Systematic Bacteriology
- AEDES Wu et al 2009. A phylogeny-driven genomic encyclopaedia of Bacteria and Archaea Nature Vol 462|24/31| doi: 10.1038/nature08656
- Albuquerque 'The All-Species Living Tree' Project."16S rRNA-based LTP release 111 (full tree)". Silva Comprehensive Ribosomal RNA Database [3]. Revisado 19-02-2014
- Abel., M 2014. Aislamiento de Micromonospora de nódulos de leguminosas tropicales y análisis de su interés como promotor del crecimiento vegetal. Universidad de Salamanca. Departamento de Microbiología y Genética. Tesis Doctoral.
- Anderson, G., 1993.El transporte de hierro en Streptomyces pilosus mediada por sideróforos ferricromo
- Anderson., J 1993 Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. CDS Centro de Recursos de Información OMS. Ginebra Suiza.
- Bailón z, R; Cervantes, A; 2003. Atlas de Pruebas Bioquímicas para Identificar Bacterias. Universidad Autónoma de México. Facultad de Estudios superiores Zaragoza.
- Bergey., R; A 2003. Informe Técnico „La Calidad contada por la propia semilla“. Instituto Nacional Técnico Agropecuario. Córdoba, Argentina.
- Burbano, S.P1994 2011 Crawford, DL, JM Lynch, JM Whipps, y Ousley MA, 1993. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen.
- Cabrera., A, 2007 Inoculation of Plant Growth-promoting Bacteria in Lettuce
- Callicava, O.L2015 Aislamiento y caracterización de Actinomicetos como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos biofertilizantes comerciales

Centre for Energy Studies, 2001 Caracterización Morfológica de Bacterias Celulolíticas del Rumen de Bovinos Alimentados con Heno de Raigrás

Cerrato R 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícola y ambiental. Editorial Trillas, México. pp. 170-224.

Chan, L 2009 Guía Técnica para la producción del microcultivo de la Lechuga. Instituto de Investigaciones Hortícolas „Liliana Dimitrova“. Asociación cubana de Técnicos Agrícolas y Forestales. Ministerio de Agricultura. La Habana, Cuba.

Cuervo, J, 2010. Aislamiento y Caracterización de Bacillus spp como fijadores biológicos de Nitrógeno y Solubilizadores de Fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas carrera de microbiología agrícola y veterinaria. Bogotá, Colombia.

Downie., R.J 2009 Evaluation of Biochar Effects on Nitrogen Retention and Leaching in Multi-layered Soil Columns. Water, Air & Soil Pollutio. (213): 49-53.

García, J. 2010 La materia orgánica del suelo. Ciencia del suelo principios básicos. Bogotá, Colombia: Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo (pp. 357-372).

Garrigo., A 2008 Brock-Biology of Microorganisms. Prentice Hall, Editions Pearson Education. 150p

Genesio, B. 2012 Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia colombiana.

Germida J, 1993. Cultural methods for soil microorganisms. In: Soil sampling and methods of analysis. M. R. Carter editor. Canadian Society of Soil Science. Lewis Publishers 263-275p.

Glaser., F 2002 Effect of biochar amendment on maize yield and greenhouse gas emissions from a soil organic carbon poor calcareous loamy soil from Central China Plain. Plant and Soil. (351): 263-275.

- Hayakawa, M.; Yoshida, Y. and Iimura, Y. 2004. Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. J. Appl. Microbiol. 96:973-981.
- Huayta., H 2013 Efectos de la aplicación del biochar en el modelo jerárquico de agregación de un suelo forestal bajo condiciones oceánicas. Universidad Autónoma de Barcelona. (pp. 19-24).
- Jacob., J 2010 Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108. As a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. Applied Environment Microbiology 61(8): 3119-3128.
- Joseph, P 2009 Evaluación del efecto de un biofertilizante ligado a un soporte orgánico mineral en un cultivo de lechuga en la Sabana de Bogotá bajo condiciones de invernadero. Rev Colomb Cienc Hortíc. 2015; 9(1): 72-85.
- Kaal, J., S. Brodowski, J. A. Baldock, K. G. J. Nierop, and A. Martínez C. 2008. Characterisation of aged black carbon using pyrolysis-GC/MS, thermally assisted hydrolysis and methylation (THM), direct and cross-polarisation ¹³C nuclear magnetic resonance (DP/CP NMR) and the benzenepolycarboxylic acid (BPCA) method. Org. Geochem. 39: 1415-1426.
- Kookana, M 2011 CA. Manejo integrado de nutrientes en sistemas agrícolas intensivos: revisión. Rev Mex Cienc Agríc. 2015; 6(1); 201-15.
- Laird., J 2010 ontrol biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. Revista de la Academia Mexicana de Ciencias 58(1): 77-88.
- Lehmann., K 2009 Manual de Microbiología. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología. Escuela de Química. Pereira,
- Lehmann, J. 2007. Bio-energy in the black. Front. Ecol. Environ. 5: 381-387.
- Lehmann, J., J .P. da Silva Jr., C. Steiner, T. Nehls, W. Zech, and B. Glaser. 2003. Nutrient availability and leaching in an archaeological anthrosol and a ferralsol of the Central Amazon basin: Fertilizer, manure and charcoal amendments. Plant Soil 249: 343-357.

Madigan, 2004. Estudio sobre el valor fertilizante de los productos del proceso “fermentación anaeróbica” para producción de biogás

Masclaux-Daubresse, 2008 Bioensaios Microbianos Aplicados no Controle de Contaminantes Tóxicos Ambientais; Serie Didáctica, PROCOP 1991, 1-75.

Mayoral., H 2015 Plant Breeding : High or low alkaloid levels ? Proc. 6th Int. Lupin Conf. Temuco, pp 326 – 334

McCarl., J 2009 Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol

Pótsch, M 2014 Antimicrobial activities of *Streptomyces pulcher*, *S. canescens* and *S. citrofluorescens* against fungal and bacterial pathogens of tomato *in vitro*. Folia Microbiol

Sánchez, S., M. Hernández, and F. Ruz. 2011. Alternativas de manejo de la fertilidad del suelo en ecosistemas agropecuarios. Pastos Forrajes 34: 375-392

Schaczenski, J. 2010. Biochar and Sustainable Agriculture. pp. 1-12. In: H. Michels (ed.). National Sustainable Agriculture Information

Schmidt, M. W. I. and A. G. Noack. 2000. Black carbon in soils and sediments: Analysis, distribution, implications, and current challenges. Global Biogeochem. Cycles 14: 777-793.

Schmidt, H. P. and K. Wilson. 2014. The 55 uses of biochar, the Biochar Journal 2014, Arbaz, Switzerland. ISSN 2297-1114. www.biochar-journal.org/en/ct/2 . Version of 12 th May 2014. Accessed: 07.07.2016

SEMARNAT-Colpos (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales-Colegio de Postgraduados). 2003. Evaluación de la degradación del suelo causada por el hombre en la República Mexicana, escala 1:250 000. Memoria Nacional 2001-2002. México.

Sheil, D., I. Basuki, L. German, T. W. Kuyper, G. Limberg, R. K. Puri, B. Sellato, M. van Noordwijk, and E. Wollenberg. 2012. Do anthropogenic dark earths occur in the interior of borneo? Some initial observations from East Kalimantan. Forests 3: 207-209.

S, G.K 2008 Influencia de la aplicación foliar del bioestimulante Liplant sobre algunos indicadores biológicos del suelo. Revista Protección Veg. Vol. 22 No. 2 (2007): 110-117.

Sohi, T. 2009 Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry.

Sombroek., U 2013 Study on bioactive compounds from *Streptomyces* sp. ANU 6277. Polish Journal of Microbiology 57(1): 35-39.

Tohme.,G 2000 Fungicidal activity of marine actinomycetes against Phytopathogenic fungi. Indian Journal of Biotechnology 4: 271-276.

Tokata., L 2002 Principles and applications of soil microbiology. United States of America. Hall Inc. 480p

Vessey , D. M. 2005. Principles and applications of soil microbiology. 2nd (Ed.). Pearson Prentice Hall. USA. 259-306 p.

Valdés, U. L 2005 Relación B-Ca²⁺ en la Fijación Biológica del Nitrógeno. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España.

Wheeler.,J 1990 Intralaboratory experience with a battery of bioassays: Colombia experience. Environm Toxicol 2000;(15):297-303

Zamora; (2011) Strap, C. ; Jung, D. ; Crawford, L.; Salove, L.; Deobald, F. ; Bailey, J. and Morra, J. 2002. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). Appl. Environ. Microbiol. 68:2161-2171.

Zagal., E 2009 Ciencia neoliberalismo y bioeconomía. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, España.

Zwieten., K 2010 Biopreparados para el manejo sostenible de plagas y enfermedades en la agricultura urbana y periurbana Primera Edición, noviembre de 2010.

