

37



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESTUDIO DE LA FIJACION DEL NITROGENO EN EL
FORRAJE HIDROPONICO DE TRIGO (*Triticum
sativum* L.) DESTINADO PARA LA ALIMENTACION
ANIMAL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

JUAN PONCE SALAZAR

ASESORES: M.C. JUAN MANUEL CERVANTES SANCHEZ
M.C. SERGIO ANGELES CAMPOS.
DR. RONALD FERRERA-CERRATO.



MEXICO, D. F.

2000

276301



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Dedico este trabajo a DIOS,
ya que sin el me sería imposible concebir la existencia.**

**A mis padres, tíos, hermanos y primos,
por el apoyo que me han dado.**

**A mis abuelos,
por haber sido siempre un ejemplo de trabajo, dedicación y amor.**

**A mis profesores, amigos y compañeros,
por haber confiado en mí.**

A todas aquellas personas que ven en su profesión la oportunidad de ayudar a quien lo necesita.

Agradezco a todas aquellas personas que me brindaron su apoyo para la realización de este trabajo de tesis.

En la Sección de Microbiología del Centro de Edafología del Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas a las siguientes personas:

DR. Ronald Ferrera-Cerrato.
M.C. Roberto Quintero L.
M.C. Jesus Perez Moreno.
M.C. Juan Jose Almaraz.
Q.B. Patricia González.

A los técnico Martín, Mundo y Everardo.

En el Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM a las siguientes personas:

M.C. Antonio Diaz Cruz.
M.C. Juan Manuel Cervantes Sanchez.
M.V.Z. Lucas Melgarejo Velazquez.
M.V.Z. Francisco Castrejón Pineda.
Q.F.B. Maria Antonieta Aguirre.
M.V.Z. Juan Manuel Orta Ramirez.
M.V.Z. Juan Antonio Hernández Gonzaga.
Tec Lab. Fermina Palma A.
Tec. Lab. Alberto Ramirez O.
Tec. Lab. Aurelia Cruz.

En el CIMMYT por las facilidades para obtener la semilla de trigo con la cual se realizo esta investigación:

I.A. Javier Peña.

CONTENIDO

	<u>Página.</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
MATERIAL Y METODOS.....	12
RESULTADOS.....	30
DISCUSION.....	38
CONCLUSIONES.....	42
LITERATURA CITADA.....	43
CUADROS.....	49
GRAFICAS.....	80
FOTOGRAFIAS.....	88

RESUMEN

PONCE SALAZAR JUAN. Estudio de la fijación del nitrógeno en el forraje hidropónico de trigo (Triticum sativum L.) destinado para la alimentación animal. Cervantes S., J.M., Angeles C., S.C., Ferrera-Carrato, R.

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo se determinó que la inoculación de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno (BFN) incrementó la Proteína Cruda en el Forraje Hidropónico (FH) ,al día 15 este incrementó, estadísticamente significativo $P (\leq 0.05)$, fue de por lo menos 22% en todos los tratamientos y en el testigo llegó a un 20% ya que de este se aislaron endobacterias que resultaron ser BFN. Se utilizaron tres diferentes cepas de BFN: Azospirillum brasilense SP-7, Beijerinckia indica S5-BE y Enterobacter agglomerans S4-AT, que fueron inoculadas en semilla de trigo variedad Culiacán T-89, a la cual se le evaluó previamente su carga fúngica y bacteriana. Se determinó la Cinética de Crecimiento Bacteriano de las cepas utilizadas, se cuantificó la carga bacteriana en la rizósfera y endorrizósfera del FH inoculado, la cual se realizó a los 0, 5 10 y 15 días de crecimiento, al mismo tiempo se aplicaron pruebas de nitrogenasa en el FH para determinar las capacidades de fijación de nitrógeno atmosférico de las BFN en

el forraje inoculado. En cada tiempo de muestreo se realizaron pruebas para determinar la Proteína Cruda (PC), Proteína Verdadera (PV), Fibra Cruda (FC) , Extracto Etéreo (EE), Extracto Libre de Nitrógeno (ELN), Cenizas (C) y Biomasa. La semilla utilizada antes de ser germinada tuvo en promedio 14.41% de PC y 9.17% de PV. En el FH los niveles de PV fueron mayores en el testigo que en los tratamientos, al alcanzar 10.10% en comparación con el Azospirillum brasilense SP-7 que promedió 9.38%, Beijerinckia indica S5-BE con 9.49%, Enterobacter agglomerans S4-AT con 9.92% y la mezcla de las tres bacterias con 9.38%.

INTRODUCCION

En México se han identificado fuertes problemas de desnutrición por falta de consumo de alimentos proteínicos, la Comisión Nacional de la Alimentación, indica que en las zonas de mas alto grado de marginación persisten considerables problemas de desnutrición como es en los estados de Chiapas, Oaxaca, Hidalgo, Puebla y Tabasco (1), aunque estas condiciones se reportan en toda la república.

En 1973 el consumo per cápita del conjunto de las principales carnes (aves, bovinos, cerdos, ovinos y caprinos), correspondió en su conjunto a 28.52 Kg., para 1983 por este mismo concepto fue de 41.14 Kg. (2), en 1993 esta cifra se redujo a 32.98 Kg. (3).

La superficie total de México es de 1'958,201 Km², la cual se encuentra dividida en 6 climas principales que son: cálido húmedo con 4.7%, cálido subhúmedo con 23.0%, seco con 28.3%, muy seco con 20.8%, templado subhúmedo con 20.5% y templado húmedo con 2.7% (4).

La producción pecuaria depende de la producción agrícola ya que los ingredientes utilizados para la alimentación del ganado son, en su mayor parte, productos o subproductos del campo. En nuestro país la principal limitante de la producción agrícola es la falta de agua, en 1992 de las 19'561,815 has. cultivadas a nivel nacional, tan solo 5'344,072 has. fueron utilizadas bajo condiciones de riego, lo cual representó el 27.31% (5).

México cuenta con aproximadamente la mitad de su territorio (49.1%) con clima árido y semiárido. Las regiones del norte y noroeste que comprenden los estados Baja California, Baja California Sur, Coahuila, Chihuahua, Sinaloa y Sonora en los cuales se localiza la totalidad del clima muy seco y una porción del clima seco, abarcan en conjunto una superficie de 719,368 Km², es decir el 36.73% de la superficie nacional, sin embargo en estos estados la superficie total tanto de riego como de temporal, de cultivos cíclicos y perennes en 1992, fue de 3284,067 has., es decir tan solo el 4.56% de la superficie de los estados citados (4, 5).

Una alternativa para este tipo de climas sería la captación de aguas superficiales y su uso altamente eficiente a través de la producción de forrajes que utilizan un mínimo de agua como son los "forrajes hidropónicos" (FH), estos son plántulas de pocas semanas de edad que se pueden desarrollar con o sin sustrato como por ejemplo el rastrojo de maíz, los cuales se le brindan al animal inmediatamente después de su cosecha. Con esta técnica el agua y los nutrientes disueltos en ella no se pierden por filtración (6). Estos FH deben producirse en áreas que precipiten el agua evapotranspirada al mismo cultivo o al agua de riego, con esta técnica se tiene la ventaja de poder contar con forraje fresco en cualquier época del año (7).

El FH comparativamente con el convencional, tiene la ventaja de utilizar casi la totalidad del agua en la producción de forraje fresco (8), mientras que el convencional requiere de constantes suministros de agua necesarios para mantener la humedad

durante la germinación y el crecimiento del cultivo, además para restablecer las pérdidas por filtración y evapotranspiración. Los requerimientos de un cultivo convencional son variables y difieren en función del tipo y característica de estructura del suelo, de la especie y variedad del cultivo, del microclima, de la cantidad y profundidad de riego, etc. (9).

En las investigaciones realizadas con FH se han utilizado semillas de la familia de las gramíneas, entre las que destacan la avena (10, 11, 12, 13, 14), la cebada (15, 11, 14, 16), trigo (11, 14, 15, 17) y triticale (14, 15). La mayor parte de estos trabajos han sido enfocados a aspectos de composición química en relación con pretratamientos para reducir la incidencia de aflatoxinas (10), sobre la tasa de fermentación (12), digestibilidad in vitro (13, 14), y digestibilidad in vivo (17), principalmente.

Entre los resultados reportados en los análisis químicos proximales (AQP) realizados a los FH, destacan los incrementos en la proteína cruda (PC). En la semilla de cebada el incremento pasó del 17.07% al 22.32% del día 10 al día 25, utilizando rastrojo como sustrato. Este mismo se evaluó sin la utilización de rastrojo y los resultados fueron de 15.26 y 20.18% respectivamente (13).

En el FH de avena, López en 1990 reportó un incremento de PC adicionando potasio, se utilizaron 200 ppm y se registró un 12.92% de PC en base seca, en comparación con el 10.94%, 12.07%, 11.72% y 11.06% con concentraciones de 00, 100, 300, y 400 ppm

respectivamente (13), aunque no se reportan los valores de la PC con los que inicia en semilla. Por otro lado, en 1989, se reporta que al aplicar roca fosfórica en presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN), en cultivos tradicionales de trigo, se incrementan los niveles de fijación de nitrógeno molecular (18). De esta manera se podría explicar el incremento en los niveles de PC reportados por López en 1990.

Se ha observado que los niveles de EE del FH en diferentes especies, incluido el trigo, se reducen al avanzar el ciclo germinativo (6).

Sin embargo en el FH de cebada, se reporta incremento en el extracto etéreo (EE) del día 10 al 25 de edad (19).

Los valores de fibra cruda (FC) se incrementan conforme aumenta la edad del FH, variando estos niveles según la especie y variedad de la semilla. En el FH de cebada la FC fue del 12.84% a los 10 días, la cual se incrementó a 15.98% a los 25 días (19).

El extracto libre de nitrógeno (ELN) lo conforma en su mayor parte el almidón, y al igual que en el EE se reportan reducciones en sus niveles en diferentes especies conforme aumenta la edad del cultivo (6).

Pruebas realizadas en cultivos de trigo han identificado el efecto de la bacteria Azospirillum brasilense como fijadora de nitrógeno en gramíneas (20), como también el de favorecer la absorción de nutrientes cuando se asocia con micorrizas (21). Esta bacteria a sido aislada en varias partes del

mundo, identificándose en Europa, Africa, Asia y América, de donde se han desarrollado investigaciones enfocadas a la fijación del nitrógeno atmosférico (20, 22, 23, 24). Sin embargo, recientemente se han aislado en nuestro país cepas de bacterias de Beijerinckia indica y Enterobacter agglomerans que han mostrado ser altamente fijadoras de nitrógeno al realizarles pruebas de la reducción del acetileno in vitro (25). Existe muy poca información sobre la fijación del nitrógeno por parte de la bacteria Enterobacter agglomerans, se considera a esta como una BFN no tradicional, que al combinarse con otras bacterias diazotróficas llega a tener un efecto sinérgico, además de que la capacidad de fijación de nitrógeno comparativamente es mayor cuando se mezclan algunas cepas de Azospirillum y Azotobacter (23).

No se encontró información alguna sobre el efecto de bacterias fijadoras de nitrógeno en cultivos de FH, pero su presencia se puede suponer en los resultados de la PC realizados a éstos, y donde el elevado valor proteínico no se justifica, debido a que no se utilizan fertilizantes nitrogenados.

Se indica que en el FH de cebada se obtuvo un incremento en los niveles de PC, al pasar de un 12 a un 21% a los 10 días de edad aplicando solo agua en el riego (8), sin indicar la presencia de algún tipo de bacteria en el forraje.

La importancia en el uso de algunas bacterias FN como las utilizadas en esta investigación, radica en que no solo fijan nitrógeno atmosférico, sino que algunas de estas sintetizan

hormonas de crecimiento, lo cual favorece el incremento de la biomasa (25).

El Azospirillum brasilense se ha identificado como una especie afín al trigo, se comporta como biofertilizador (23, 26) y como promotor de crecimiento en esta misma especie vegetal (24, 26). Tiene efecto en el incremento de la biomasa en algunas especies de la tribu triticeae (27). En esta especie bacteriana ya se tienen identificados los genes que codifican para la fijación de nitrógeno, los cuales son *gusA* y *nifH*, e incluso se ha monitoreado la fusión de estos genes (28). La carga bacteriana del Azospirillum brasilense ha sido determinada en suelo mediante la técnica del marcaje con transposones TN5 mutantes, su número varió a diferentes tiempos cuantificándose 107 bacterias por gramo de suelo a los 100 días de su inoculación (28). La determinación del número de bacterias también se ha realizado en la rizósfera y endorizósfera de varias cepas de Azospirillum brasilense obteniendo diferentes resultados dependiendo de la distancia de la raíz y la cepa de la que se determinó la carga bacteriana (29). La inoculación del Azospirillum brasilense produce cambios en la raíz de trigo, reduciendo el potencial de membrana particularmente en la zona de elongación de donde se liberan compuestos orgánicos y se forman pequeños nódulos (30, 31), los exudados producidos por la raíz del trigo y analizados cualitativa y cuantitativamente fueron el ácido succínico, el ácido málico y el ácido oxalacético (32). Utilizando la técnica del ^{15}N se supo que la planta de trigo utilizó del 13 al 17% del nitrógeno fijado en el crecimiento de la raíz (31). Los

mucigales que se liberan de la zona radicular son predominantemente polisacáridos que organizados en formas fibrosas, intervienen en la transferencia de nutrientes disueltos en el suelo hacia la raíz (33, 34).

En los cultivos de FH, la temperatura controlada y la humedad relativa alta, favorecen el crecimiento de hongos, los cuales pueden llegar a ser nocivos para los animales que lo consumen (10), algunas de las BFN tienen la capacidad de actuar contra el crecimiento de hongos (25), se cree que sea por las concentraciones de amonio que se generan por el nitrógeno fijado (35), o por la producción de fungicidas naturales.

Se ha determinado en el Enterobacter agglomerans con capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico, el gen *nif* HDK mediante la técnica del DNA recombinante (36) y utilizando los transposones TN1725 y TN5 se pudo determinar la presencia del plásmido PEA9. (37).

En el caso de Beijerinckia indica, a nivel internacional no se cuenta con reportes sobre la capacidad de fijación de nitrógeno que tiene esta bacteria, la información encontrada corresponde a González, P. (1995), en la que señaló el aislamiento de varias especies de BFN en las raíces adventicias del maíz olotón del estado de Oaxaca el cual presentó un mayor crecimiento de lo normal. En el área de microbiología del Colegio de Postgraduados, se aislaron, identificaron y probaron las bacterias localizadas en el mucigel excretado por la planta, al igual que de la rizósfera. Es este trabajo de donde se obtiene la

Beijerinckia indica a la cual se le identifica como S5-BE y al Enterobacter agglomerans S4-AT (25).

Los incrementos en el desarrollo de las plantas inoculadas con Azospirillum brasilense, son la respuesta a las auxinas, y en particular, el ácido indolacético (hormonas de crecimiento) producida por esta bacteria (38). Esta especie bacteriana puede ser identificada rápidamente mediante la técnica de ELISA aún encontrándose en muy pequeñas cantidades (39), ya que de otra forma su identificación lleva varios días, debido a que se requiere de diferentes pruebas bioquímicas (40 , 25).

Se sabe que la inoculación con Azospirillum brasilense a plantas de trigo y otras gramíneas, producen excreciones de amonio por la raíz (41, 42), es por ello que se pueda explicar el incremento en la PC que se determina durante los AQP que se desarrollan a los FH, sin embargo, no se sabe que es lo que sucede con los cambios en la PV ya que cuando se determina la PC, se cuantifica tanto el nitrógeno protéico como el no protéico.

HIPOTESIS

"En el forraje hidropónico de trigo se incrementa la proteína verdadera al inocular la semilla con bacterias fijadoras de nitrógeno".

OBJETIVOS.

1.- Aislar y cuantificar las bacterias y hongos de la superficie de la semilla de trigo utilizada para la producción de FH.

2.- Determinar la cinética de crecimiento bacteriano de las especies Azospirillum brasilense SP-7, Beijerinckia indica S5-BE y Enterobacter agglomerans S4 AT.

3.- Determinar la capacidad de fijación del nitrógeno in vitro de las bacterias a inocular, mediante la técnica de la reducción del acetileno (prueba de la nitrogenasa) en el medio de Carbono Combinado.

4.- Determinar la capacidad de fijación del nitrógeno en el FH de trigo inoculado y no inoculado mediante la prueba de la nitrogenasa.

5.- Determinar la carga bacteriana en la semilla de trigo inoculada, con diferentes bacterias fijadoras de nitrógeno tanto en el rizoplaneo (superficie de la raíz) como en la endorrizósfera (interior de la raíz) del FH a los 0, 5, 10 y 15 días de edad.

6.- Determinar el incremento de la biomasa en el forraje hidropónico de trigo inoculado y no inoculado.

7.- Realizar los análisis químicos proximales (P.C., F.C., E.E. E.L:N. y C.) y de P.V. al FH de trigo inoculado y no inoculado con BFN a los 0, 5, 10 y 15 días de edad.

MATERIALES Y METODOS**MATERIALES**

La semilla de trigo utilizada fue de la variedad Culiacán T-89 donada por el CIMMYT con el propósito de estandarizar la producción del FH.

I. Para la determinación de la nitrogenasa en el FH de trigo inoculado se requirió de lo siguiente:

45 bolsas de 150 gramos de semilla de trigo limpia (7 kg de semilla de trigo, variedad Culiacán T-89, obtenida del CIMMYT).

45 charolas perforadas de 25 x 37.5 cm en las que se desarrollaron los FH con los diferentes tratamientos.

45 charolas no perforadas de 25 x 37.5 cm utilizadas para contener a las charolas perforadas y controlar el agua drenada por éstas durante el riego.

45 mantas blancas de 25 X 37.5 cm.

45 frascos de cristal de un litro, para dejar remojando con el inóculo la semilla del FH.

45 tapas para frascos de un litro, con diafragma para inyectar acetileno a muestras de FH para realizar la prueba de la nitrogenasa.

45 frascos de 200 ml para contener el inóculo de los diferentes tratamientos.

45 plásticos de 30 X 42.5 cm.

24 litros de agua destilada estéril, para la desinfección de la semilla de trigo y la dilución de los inóculos.

5 litros de bicloruro de mercurio al 5%, para la desinfección de la semilla de trigo.

3 litros de alcohol al 96%.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno utilizadas para inocular la semilla del FH fueron obtenidas del Banco de Germoplasma Bacteriano de la Sección de Microbiología del Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Las cantidades fueron:

150 ml de inoculante de Azospirillum brasilense SP-7.

150 ml de inoculante de Beijerinckia indica SS-BE.

150 ml de inoculante de Enterobacter agglomerans S4-AT.

90 tubos vacutainer.

1 jeringa de 10 ml.

1 jeringa de 100 ml.

5 cintas teflón.

30 cm de manguera latex del No. 2.

1 cámara de pelota de fútbol para contener gas acetileno.

5000 cm³ de gas acetileno.

II. Para determinar la biomasa en el FH de trigo se requirió de:

1 balanza granataria.

III. Para realizar la prueba de la nitrogenasa de las bacterias en medio de cultivo sólido de Carbono Combinado se requirió de:

21 frascos de 25 ml. con tapón de latex.

21 tapones de algodón con gasa para frascos de 25 ml.

21 sellos de aluminio para frascos de 25 ml.

21 tubos vacutainer de 5 ml.

1 jeringa de 5 ml.

1 cámara de balón de fútbol.

30 cm de manguera latex.

300 cm³ de gas acetileno.

210 ml de medio de cultivo de Carbono Combinado.

6 pipetas de 1 ml en escala de 1/100 ml.

1 frasco de medio de cultivo líquido con 50 ml de bacterias Azospirillum brasilense SP-7 en la fase logarítmica de crecimiento.

1 frasco de medio de cultivo líquido con 50 ml de bacterias Beijerinckia indica S5-BE en la fase logarítmica de crecimiento.

1 frasco de medio de cultivo líquido con 50 ml de bacterias Enterobacter agglomerans S4-AT en la fase logarítmica de crecimiento.

IV. Para determinar la cinética de crecimiento bacteriano se requirió del siguiente material:

9 frascos de 250 ml con tapón de rosca, con 25 ml de medio líquido de Carbono Combinado cada uno.

1 frasco con 50 ml de medio de cultivo líquido con bacterias Azospirillum brasilense SP-7 en la fase logarítmica de crecimiento.

1 frasco con 50 ml de medio de cultivo líquido con bacterias Beijerinckia indica S5-BE en la fase logarítmica de crecimiento.

1 frasco con 50 ml de medio de cultivo líquido con bacterias Enterobacter agglomerans S4-AT en la fase logarítmica de crecimiento.

3 tubos de ensayo de 5 ml.

9 matraces nefelométricos.

V. Para realizar las pruebas de la nitrógenasa a las bacterias aisladas de la raíz de trigo no inoculado se requirió:

8 frascos de 250 ml con tapón de rosca con 25 ml de medio de cultivo de Carbono Combinado, (para obtener el inóculo en fase logarítmica), un frasco por cepa aislada.

24 frascos de 25 ml con tapón de latex.

24 tapones de algodón con gasa para frascos de 25 ml.

16 pipetas de 1 ml con escala de 1/100 ml.

100 ml de medio líquido de Carbono Combinado.

24 tubos vacutainer de 10 ml.

1 jeringa de 10 ml.

1 cámara de balón de fútbol.

30 cm de manguera latex.

120 cm³ de gas acetileno.

VI. Para determinar la carga bacteriana y fúngica de la superficie de la semilla de trigo utilizada para la producción de FH se requirieron de:

63 tubos de ensayo de 15 ml.

63 cajas de petri. (25 ml de medio de cultivo por caja).

21 pipetas de 1 ml con escala de 1/100 ml.

225 ml de medio de cultivo sólido de Azospirillum.

225 ml de medio de cultivo sólido de Beijerinckia.

225 ml de medio de cultivo sólido de Azotobacter.

225 ml de medio de cultivo sólido de Derrxia.

225 ml de medio de cultivo sólido de Bacterias Viables Totales.

225 ml de medio de cultivo sólido de CZAPEK DA.

225 ml de medio de cultivo sólido de Agar Papa Dextrosa.

VII. Para determinar la carga bacteriana a los 0, 5 10 y 15 días de edad, del FH inoculado se utilizaron:

140 cajas de petri.

5 morteros.

15 vasos de precipitado.

1 tijera de disección.

1 pinza de disección.

1 litro de alcohol.

1 litro de bicloruro de mercurio al 1%.

5 litros de agua destilada esteril.

35 pipetas de 1 ml en escala de 1/100.

2625 ml de medio sólido de Carbono Combinado (para 105 cajas de petri con 25 ml de medio cada una).

132 tubos de ensayo con 9 ml de agua esteril cada uno.

1 agitador.

VIII. Para realizar los AQP's., se utilizaron muestras del forraje producido en las charolas de las cuales se tomaron las mismas muestras para la determinación de la nitrogenasa y la carga bacteriana. La determinación de estos AQP's requirió de los siguientes materiales(43):

Humedad;

61 muestras de 100 a 200 g de FH.

61 trozos de 20 x 20 cm de papel aluminio.

1 horno.

1 desecador.

1 balanza granataria.

Cenizas:

61 muestras de 1 g de materia seca molida.

61 crisoles de porcelana.

1 desecador.

1 balanza analitica.

Extracto Estéreo;

61 muestras de 5 g de materia seca molida

61 rodajas de papel filtro.

1.2 litros de éter.

1 extractor de Soxhlet con matraz extractor y condensador.

Fibra Cruda;

61 muestras de 2 g de materia seca molida desangrasada.

61 matraces de Erlenmeyer de 500 cc.

12.2 litros de ácido sulfúrico al 1.25 %.

12.2 litros de NaOH al 1.25 %.

122 rodajas de papel filtro.

1 pizeta.

1 parrilla.

1 embudo.

Proteína Verdadera;

61 muestras de 2 g de materia seca molida.

61 vasos de precipitado de 250 ml.

4.6 litros de agua destilada.

65 ml de ácido clorhídrico al 50 %.

1.5 litros de sulfato de cobre al 6 %.

1.5 litros de hidróxido de sodio al 1.25 %.

61 vidrios de reloj.

61 rodajas de papel filtro.

Proteína Verdadera y Proteína Cruda,

61 muestras de 1 g de materia seca molida desengrasada (PC), y las

61 muestras restantes del punto anterior (PV).

183 g de oxalato de potasio. (X 2).

13 g de sulfato de cobre (X 2).

1.220 litros de ácido sulfúrico puro (X 2).

1.200 litros de agua destilada (X 2).

50 ml de fenoftaleína (X 2).

50 ml de naranja de metilo (X 2).

61 granallas de zinc (X 2).

3.1 litros de ácido sulfúrico al 0.1 N (X 2).

MÉTODOS

1.- La metodología para determinar la carga bacteriana y fúngica de la superficie de la semilla de trigo utilizada para la producción de FH, fue la siguiente:

Se pesaron 100 gr de semilla pura y se depositaron en un frasco de 1 litro, se agregaron 100 ml de agua destilada estéril, se movieron vigorosamente y se tomó 1 ml, se depositó en un tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril repitiéndose 3 veces cuando la dilución correspondió a 1×10^3 y 6 veces cuando fue de 1×10^6 . Para el aislamiento de bacterias se utilizaron diluciones de 10^4 , 10^5 y 10^6 en los medios de cultivo de

Azospirillum, Beijerinckia, Azotobacter, Dervia, bacterias viables totales y CZAPEK DA (25). Cada una de estas diluciones fue cultivada por triplicado. A cada caja de petri se le depositó 0.1 ml de la dilución en la parte central del medio de cultivo y se distribuyó con una varilla de vidrio estéril.

Para el aislamiento de hongos se procedió de manera similar con diluciones de 10^1 , 10^2 , y 10^3 , utilizando PDA como medio de cultivo.

2.- Para determinar la cinética de crecimiento bacteriano se realizó la siguiente metodología:

En las cajas de petri de los cultivos activados de las BFN utilizadas como inóculo, se tomó una azada y se depositó en un frasco con medio líquido de Carbono Combinado, dejándose en una incubadora-agitadora por 48 horas, posteriormente se determinó la densidad óptica del cultivo, depositando 0.1 ml del medio líquido con las bacterias en crecimiento, en 0.9 ml de agua destilada, calibrando el espectrofotómetro a 520 nm para determinar la carga bacteriana en cada uno de los 10 tubos de la escala de Mc Farland. Se depositaron 0.5 ml de cada cultivo a cada matraz nefelométrico, 3 por cepa y 9 en total. Se metieron los matraces nefelométricos a la incubadora-agitadora, sacándolos a las 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 56 y 60 horas para su lectura en el espectrofotómetro.

Para realizar las pruebas de la nitrogenasa a las bacterias aisladas de la raíz de trigo no inoculado se realizó lo siguiente:

De las bacterias aisladas de la raíz del FE no inoculado, (testigo) en la determinación de la carga bacteriana del

forraje inoculado con BFN, se aislaron las BFN ahí encontradas y se les determinó a cada una su capacidad fijadora de igual manera que se les determinó a las bacterias que se utilizaron como inóculo para el FH. como se indica en el siguiente punto.

3.- Para realizar la prueba de la nitrogenasa de las bacterias en el medio de cultivo sólido de Carbono Combinado la metodología fue la siguiente:

A cada frasco de cristal con capacidad de 25 ml se le agregaron 10 ml de medio de cultivo sólido de Carbono Combinado, se le puso un tapón de gasa y algodón y se esterilizaron. A cada frasco se le agregó 0.2 ml de cultivo de cada bacteria, cuando la prueba fue de dos cepas diferentes, estas se mezclaron en 50% cada una y al ser de tres cepas estas fueron de 33% cada una. De las tres cepas utilizadas, se realizaron 3 repeticiones de cada una, tres repeticiones de las tres cepas mezcladas, tres repeticiones con las cepas uno y dos, y tres repeticiones de las cepas dos y tres, haciendo en total 21 observaciones. Una vez inoculados los frascos estos se cubrieron con los tapones de gasa y algodón y un pequeño trozo de papel aluminio y se dejaron incubar durante 48 horas a 37 °C, posteriormente se les puso a cada frasco su tapón de latex y se les selló, inmediatamente despues se les retiró a cada frasco, con una jeringa, 3 cm³ de aire y se les aplicó 3 cm³ de gas acetileno, este gas se extrajo a través de una manguera conectada a una cámara de balón de futbol que contenía el gas. Los frascos con el gas acetileno se dejaron incubar por 24 horas a 37 °C y posteriormente se les extrajo a cada uno con una jeringa 5 cm³ de

los gases contenidos en su interior, cada muestra de gas se inyectó en un tubo vacutainer identificado, y posteriormente se extrajo de éstos tubos, con una jeringa para insulina 1 ml de la muestra de gas y se le inyectó al cromatógrafo de gases en donde se midió la cantidad de nanomoles de etileno que se produjeron por las BFN al metabolizar el acetileno (44)

4.-Para la determinación de la nitrogenasa en el FH de trigo inoculado se realizó la siguiente metodología (Modificada y propuesta Ferrereza-Cerrato):

Previamente se activaron las bacterias ya descritas, mediante tres cultivos sucesivos hasta que mostraron un crecimiento vigoroso, posteriormente se realizó un cultivo en medio líquido para preparar el inóculo, del cual se tomaron 15 ml de cada uno de los cultivos en su fase logarítmica de crecimiento y en la escala 1 de Mc. Farland, es decir 300×10^6 bacterias por ml, agregándolo a 135 ml de agua destilada estéril, por lo que la carga bacteriana total final será de 45×10^8 bacterias en los 150 ml, es decir 30×10^6 bacterias por ml, los riegos se realizarán con atomizador aplicando agua destilada esteril.

Primero se desinfecta la semilla pura, depositando 150 g de ésta en frascos de un litro, se agrega alcohol hasta cubrir la semilla y se agita vigorosamente durante un minuto, buscando remover la materia orgánica, se elimina el alcohol cuidadosamente para evitar la pérdida de semillas y se enjuaga una vez con agua destilada estéril, se tira el agua y se agrega bicloruro de mercurio al 5% hasta cubrir la semilla se deja durante un minuto,

agitando constantemente el frasco y posteriormente se enjuaga por 6 ocasiones con agua destilada estéril. Por último se agrega agua destilada estéril hasta la mitad del frasco y se deja remojando la semilla durante 18 horas, se elimina el excedente de agua y se agrega el inóculo, dejando éste durante 6 horas, posteriormente se pasa la semilla a las charolas perforadas, distribuyéndola homogéneamente sobre la superficie de la charola y se cubre con una manta limpia y húmeda, a la charola con la manta se le cubre con un plástico para mantener la humedad relativa alta. La manta y la cubierta plástica se retiran cada que se aplica el riego y después se ponen en su lugar, al tercer día se dejan de poner la manta y la cubierta de plástico, los riegos se realizan cada 12 horas con 100 ml por riego de agua destilada.

Las muestras para las pruebas de la nitrogenasa y para los AQP's. se tomaron a los 5, 10 y 15 días de edad del cultivo. Para la prueba de la nitrogenasa se utilizan 3 muestras del 10% cada una del FH producido en cada charola. Cada tratamiento tuvo 3 charolas de repetición. Para determinar la carga bacteriana, las muestras se tomaron de igual manera que para la nitrogenasa y a estos mismos tiempos y de las mismas charolas.

5.- Para determinar la carga bacteriana a los 0, 5 10 y 15 días de edad, del FH inoculado se realizó la siguiente metodología:

Para el día 0 (semilla) se realizaron diluciones de 10^1 , 10^2 y 10^3 .

Para determinar la carga bacteriana en la rizósfera se hicieron diluciones de 10^4 , 10^5 y 10^6 , realizando por triplicado cada

una de las diluciones en cada una de las cepas a los 5, 10 y 15 días. Para las diluciones se partió de 1 g de muestra de raíz la cual fue separada de la plántula con tijeras y pinzas (FOTO 2) y pesada en una balanza granataria.

En la determinación de la carga bacteriana en la endorrizósfera las diluciones fueron 10^1 , 10^2 , y 10^3 . Las repeticiones, los tiempos y el peso de la muestra de igual manera que como se realizó en el rizopiano, sin embargo la muestra antes de ser macerada y diluida se desinfectó con el mismo procedimiento como se desinfectó la semilla, a excepción del tiempo en el bicloruro de mercurio al 1% el cual fue de 30 segundos.

Todos los cultivos se realizaron en el medio de Carbono Combinado, haciendo las lecturas a las 36 horas de incubadas las cajas de Petri*¹.

6.- Para determinar la biomasa en el FH de trigo se realizó la siguiente metodología:

Del forraje producido en las charolas, este fue pesado a los 0, 5, 10 y 15 días de edad, obteniendo el valor de la biomasa por diferencia del peso final con el inicial.

7.- Para la realización de los AQP's se desarrolló la siguiente metodología (43):

Humedad. Se pesaron de 100 a 200 g de FH., se dejaron secar en un horno a 50 °C durante 24 horas, ya seca la muestra se dejó enfriar en un desecador hasta alcanzar un peso constante. El cálculo de la humedad se hizo obteniendo la diferencia del peso

*INFORMACION PERSONAL Ferrera-Cerrato.

original y el peso constante seco. Los resultados se expresaron en centesimales y por diferencia de 100 se obtuvo su correspondiente en materia seca (MS).

Canizas. Esta fracción corresponde a los minerales contenidos en la muestra. Se obtuvo su valor pesando un gramo de MS molida, se puso en un crisol de porcelana numerado y a un peso constante, habiéndolo secado previamente y dejado enfriar en un desecador, se calcinó la muestra en la mufla a 600 °C durante media hora. Se dejó enfriar en un desecador hasta alcanzar un peso constante, se pesó y se destaró el peso del crisol, el cálculo es expresado en porcentaje, y se obtiene multiplicando el peso de las cenizas encontradas en un gramo de materia seca por el porcentaje de MS de la muestra.

Extracto Etéreo. Se pesaron 5 g de MS molida. Se colocaron en una rodaja de papel filtro, se metieron en un cartucho tarado, de papel filtro y se les identificaron, el cartucho se depositó en el extractor de Soxhlet y a su vez se colocaron en la cámara de extracción, se conectó el extractor al condensador y al matraz, se cargó con éter, por el extremo superior del condensador, con una cantidad suficiente para que se vaciara tres veces el extractor por medio del sifón. Se calentó el matraz para detectar que no haya fugas de gases de éter, la duración de la extracción fue de 4 horas, después de este tiempo se suspendió el calentamiento y se desconectaron las diferentes partes del dispositivo, se sacó la rodaja del cartucho del extractor y se desecó dejándolo en el horno por media hora, se metieron al

dsecador hasta alcanzar su peso constante. El cálculo del extracto etéreo se realizó determinando la diferencia de pesos, dividida entre el peso de la muestra y multiplicada por el porcentaje de MS.

Fibra Cruda. Se pesaron dos gramos de materia seca desengrasada, se colocó en un matraz de Erlenmeyer de 500 cc, se agregó 200 cc de solución de ácido sulfúrico al 1.25% y se agitó la mezcla, se adaptó el matraz a un condensador de reflujo, se calentó el contenido del matraz y se dejó hervir por 30 minutos exactos, posteriormente se apagó la parrilla, se desconectó el matraz del condensador y se dejó enfriar. Se filtró la muestra en una rodaja de papel filtro sobre un embudo de Buchner adaptado a un matraz de filtración conectado a una bomba de vacío, se lavó la muestra con agua destilada hasta alcanzar su neutralidad. Se colocaron el papel con el residuo en la pared de un embudo amplio, dispuesto sobre un matraz de Erlenmeyer de 500cc y se arrastró la mayor parte del residuo por medio de una espátula, se midieron 200cc de la solución caliente a 60 °C de NaOH al 1.25% y se colocaron en un frasco lavador, se arrastraron con un chorro de esta solución las partículas de forraje adheridas al papel filtro utilizado. Se repitió el calentamiento y el lavado del forraje, el papel que se utilizó para filtrar la muestra, la segunda ocasión se pesó hasta los diezmiligramos, usando el siguiente procedimiento: se desprendieron cuidadosamente las rodajas de papel filtro y se colocó en una caja de porcelana a la cual se le pasó al horno a 100 °C hasta que quedó completamente seca, se pasó a un desecador y se determinó su peso constante. La muestra en la rodaja se pesó al

diezmiligramo y se destaró el peso del papel. El cálculo de la FC se realizó dividiendo la cantidad restante entre dos y se multiplicó por el porcentaje de materia seca, al cual se le había restado el porcentaje de grasa y el porcentaje de cenizas.

Proteína Cruda. Se pesó un gramo de la muestra seca y molida, se depositó en un matraz de Kjehldal junto con tres gramos de oxalato de potasio o de sodio y 0.1 a 0.2 g de sulfato de cobre, evitando que se adhieran al cuello del matraz. Se agitó la mezcla y se agregaron 20 cc de ácido sulfúrico puro, se dejaron calentar en la parrilla hasta que adquirieron un color transparente azulado, con mucho cuidado se pasó el matraz a una campana de gases y se dejó enfriar, se agregaron 200 cc de agua destilada al matraz de Kjehldal y de 3 a 5 gotas de fenoftaleína al 10% y una granalla de zinc o piedra pómez. En un matraz de Erlenmeyer de 200 cc se agregan 50 cc de solución 0.1 N de ácido sulfúrico y 5 gotas de anaranjado de metilo. Se vierte en el matraz de destilación la suficiente cantidad de sosa concentrada hasta lograr la coloración violeta por la fenoftaleína, y se toma rápidamente para unirlo al resto del dispositivo siguiente. El matraz de destilación descansa sobre la parrilla de calor gradualmente o suspendido de ella por medio de un soporte de manera que la ebullición no sea muy marcada, se tapa con un tapón perforado en el que se adapta una alargadera de Kjehldal unida, mediante un tubo de hule a un condensador, el cual termina en un tubo adicional de desprendimiento, que quedará sumergido en la solución 0.1 N de ácido sulfúrico contenido en el matraz receptor de Erlenmeyer, se enciende la parrilla y el

amoníaco desalojado del sulfato de amonio por la sosa pasa en la forma de hidróxido de amonio a través del condensador hasta el ácido sulfúrico 0.1 N; cuando el contenido del matraz alcance el triple, 150 cc, de su volumen inicial, se apaga la parrilla. La titulación del contenido del matraz con solución 0.1 N de sosa contenida en una bureta de 50 cc hasta que toma un color amarillo. El cálculo se determina con la diferencia entre la cantidad de ácido 0.1 N puesta originalmente en el matraz receptor y la cantidad de sosa utilizada para la titulación, se multiplica por el diezmilliequivalente del nitrógeno (0.0014) y el resultado se multiplica por el coeficiente nitrogenado de las sustancias protéicas (6.25); finalmente se multiplica por el porcentaje de NB lo cual nos dará el porcentaje de proteína cruda de la muestra.

Extracto Libre de Nitrógeno. Se determina por la diferencia entre 100 y la suma de las proporciones centesimales de los componentes: agua, cenizas, fibra cruda, proteína cruda y grasa.

Proteína Verdadera. Se pesan 2 g de muestra seca y molida, se depositan en un vaso de precipitado de 250 cc y se le agregan 75 cc de agua caliente mas 1 cc de HCl al 50%, se deja calentar en una parrilla hasta que ebulle durante 10 minutos, se le agregan 25 ml de sulfato de cobre al 6% y se deja de nuevo en la parrilla hasta que llegue a la ebullición, se retira de la parrilla y se le agregan 25 ml de NaOH al 1.25% normal, se le tapa con un vidrio de reloj y se le deja que precipite durante 16 horas, finalmente se le filtra en una rodaja de papel filtro en un embudo

conectado a una bomba de vacío, se deposita la muestra en un matraz Kjehldal y se le realiza el mismo procedimiento que se realiza para la determinación de la proteína cruda.

Las BFN para su uso como inóculo fueron activadas en el medio nutritivo de Carbono Combinado (40).

Diseño Estadístico: (44, 45)

Este experimento se analizó estadísticamente mediante un diseño factorial completamente al azar con 3 niveles del factor tiempo (5, 10 y 15 días) y 5 niveles del factor tratamiento (4 tratamientos con BFN y un testigo) con 4 repeticiones para cada tratamiento.

Modelo Estadístico: (45)

El modelo de efectos fijos para el diseño completamente aleatorizado de 2 factores (tiempo de cosecha y BFN), es el siguiente:

$$X_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

$$i = 1, 2, \dots, a ; j = 1, 2, \dots, b ; k = 1, 2, \dots, n$$

donde: X_{ij} = una observación típica.

μ = constante.

α = efecto debido al factor tiempo.

β = efecto debido al factor BFN.

$(\alpha\beta)$ = interacción debido a los factores A y B.

ϵ_{ijk} = error experimental.

El experimento cuenta con una muestra de 15 poblaciones.

Hipótesis Estadística:

$$H_0: (\alpha\beta)_{ij} = 0$$

$$H_A: \text{no todos los } (\alpha\beta)_{ij} = 0$$

El Análisis de Varianza se desarrollo con el programa SPSS-6 para Windows.

RESULTADOS

La semilla utilizada presentó 2.55% de impurezas y semillas rotas, 97.45% de semilla pura, con una germinación del 88.25%, 2265 semillas en 100 gramos y un vigor de crecimiento alto.

No se aislaron bacterias en ninguno de los 6 diferentes medios de cultivo utilizados para *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Azotobacter*, *Derxia*, Bacterias Viables Totales y CZAPEK DA en diluciones de 10^4 , 10^3 y 10^2 c/u. De esta semilla se aislaron y cuantificaron 2 hongos y 1 actinomiceto en promedio, a una dilución de 10^2 en FDA (CUADRO 1).

La Cinética de Crecimiento Bacteriano de las BFN para su uso como inóculo se presenta en el cuadro 2, utilizando la escala de Mc Farland.

Las lecturas realizadas indicaron que el *Enterobacter agglomerans* S4-AT desarrolló su crecimiento logaritmico entre las 4 y 10 horas de iniciado su cultivo, llegando a una fase estacionaria máxima entre las 14 y las 35 horas y logrando una máxima concentración de 160×10^6 a las 36 horas. *Beijerinckia indica* S5-HE, inicio su fase de crecimiento logaritmico entre las 8 y 20 horas, llegando a su fase estacionaria máxima entre las 20 y 28 horas, logrando la más alta de las concentraciones de las tres cepas con 360×10^6 bacterias/ml a las 24 horas y *Azospirillum brasilense* SP-7 logro su fase logaritmica de las 12 a las 20 horas, la fase máxima la presentó de las 24 a las 28 horas y su máxima concentración fue de 348×10^6 bacterias/ml a las 28 horas (CUADRO 3) (GRAFICA 1).

En las pruebas de la reducción del acetileno en el medio de cultivo de Carbono Combinado, para determinar la capacidad de fijación del nitrógeno de las bacterias, las lecturas a las 24 horas de incubación postaplicación del acetileno, indican que hubo potencial de fijación del nitrógeno en estas. En esta prueba las BFN no se desarrollaron igual que como se desarrollaron en la raíz de los FH ya que algunas presentaron mayor o menor afinidad, dependiendo de la especie vegetal que hospedaron. En estas pruebas se realizaron todas las mezclas posibles de las tres bacterias, haciendo un total de 7 diferentes combinaciones con tres repeticiones cada una. La mayor capacidad de fijación del nitrógeno la presentó la mezcla de Beijerinckia indica S5-BE y Enterobacter agglomerans S4-AT con 1248 nmoles/24 h/vial, a esta le siguió la Beijerinckia indica S5-BE sola con un promedio de 1233 nmoles/24 h/vial, la tercera fue la mezcla de Beijerinckia indica S5-BE y Azospirillum brasilense SP-7 con una fijación promedio de 1197 nmoles/24 h/vial ; el Azospirillum brasilense SP-7 con Enterobacter agglomerans S4-AT registró una fijación promedio de 134 nmoles/24 h/vial, la mezcla de las tres bacterias fue de 103.27 nmoles/24 h/vial; la bacteria sola de Enterobacter agglomerans S4-AT con un promedio de 85.92 nmoles/24 h/vial y la bacteria sola de Azospirillum brasilense SP-7 con una fijación promedio de 10.68 nmoles/24 h/vial (CUADRO 4) (GRAFICA 2). La fijación del nitrógeno en el forraje hidropónico se pudo registrar hasta el día 15 (FOTO 1), ya que en los días 0, 5 y 10 se determinaron en todos los tratamientos 0.0 nmoles/24 h/frasco de fijación. En estas pruebas

la bacteria con mayor capacidad de fijación de nitrógeno fue la Beijerinckia indica S5-BE con 55.2 nmoles/24 h/frasco, le siguió Azospirillum brasilense SP-7 con 363.1 nmoles/24 h/frasco en promedio, en seguida fue la mezcla de las tres bacterias con 333.9 nmoles/24 h/frasco en promedio, seguida del Enterobacter agglomerans S4-AT con un promedio de 141.5 nmoles/24 h/frasco y el testigo con 8.9 nmoles/24 h/frasco de fijación promedio (CUADRO 5) (GRAFICA 3).

La biomasa registrada en los FH inoculados no mostró mucha diferencia en sus resultados (FOTO 3). Se partió de 150 g de semilla por charola, la evaluación se realizó a los días 1, 5, 10 y 15, los valores promedio fueron respectivamente los siguientes (CUADRO 6) (GRAFICA 4):

Azospirillum brasilense SP-7: 259.58 g, 284.81 g, 569.20 g y 659.42 g. (FOTO 4).

Beijerinckia indica S5-BE: 256.11 g, 281.52 g, 550.07 g y 631.66 g. (FOTO 5).

Enterobacter agglomerans S4-AT: 247.26 g, 302.27 g, 538.62 g y 605.99 g. (FOTO 6).

Mezcla: 263.46 g, 299.23 g, 497.95 g y 593.84 g. (FOTO 7).

Testigo: 258.11 g, 302.54 g, 545.28 g y 611.91 g. (FOTO 8).

La bacteria que mayor biomasa produjo fue el Azospirillum brasilense SP-7, con 659.42 g y la de menor fue la mezcla con 593.89 g, ambos a los 15 días de edad (FOTO 3).

La carga bacteriana registrada se evaluó en la semilla inoculada (CUADRO 7), y en 1 g de raíz de los tratamientos

en el FH tanto en el rizoplano como en la endorrizósfera (FOTO 2), la evaluación se realizó el día 5 (CUADRO 8), el día 10 (CUADRO 9) y el día 15 (CUADRO 10). Los valores promedio en la semilla inoculada con Azospirillum brasilense SP-7 en el rizoplano y a los 0, 5, 10 y 15 días fue la siguiente:

153 X 10³ , 54 X 10⁶ , 79 X 10⁶ y 223 X 10⁶ respectivamente, en la endorrizósfera la carga bacteriana a los 5, 10 y 15 días fue de 75 X 10³ , 59 X 10³ y 308 X 10³.

El FH inoculado con Beijerinckia indica S5-BE tuvo en el rizoplano a los 0, 5, 10 y 15 días 28 X 10³ , 11 X 10⁴ , 34 X 10⁶ y 422 X 10⁶. En la endorrizósfera registró en promedio a los 5, 10 y 15 días 3 X 10⁴ , 1 X 10⁴ y 1 X 10³.

El Enterobacter agglomerans S4-AT inoculado en el FH a los 0, 5, 10 y 15 días en el rizoplano registró 39 X 10² , 155 X 10⁶, 88 X 10⁶ y 422 X 10⁶, y en endorrizósfera se registró 36 X 10³ , 34 X 10³ y 96 X 10³ a los 5, 10 y 15 días respectivamente.

La carga bacteriana con la mezcla de las tres bacterias, a los 0, 5, 10 y 15 días registró en el rizoplano 41 X 10³ , 184 X 10⁶ , 62 X 10⁶ y 339 X 10⁶, en la endorrizósfera a los 5, 10 y 15 días fue de 57 X 10³ , 128 X 10³ y 155 X 10³.

Con respecto al testigo, el cual no se inoculó, estos datos son muy importantes ya que la semilla había sido desinfectada para eliminar tanto las bacterias y los hongos de la superficie que podrían contaminar estos forrajes, sin embargo con respecto a las bacterias (endobacterias) que la semilla adquirió desde su formación en la panícula, no se podría asegurar su presencia, y

mucho menos esperar que estas fueran fijadoras de nitrógeno como fue en este caso.

Los resultados de la carga bacteriana en el rizoplaneo del testigo a los 0, 5, 10 y 15 días fue de 18×10^2 , 268×10^4 , 341×10^6 y 108×10^6 , y en la endorrizósfera a los 5, 10 y 15 días fue de 32×10^3 , 34×10^3 y 29×10^3 respectivamente.

De las bacterias aisladas en el rizoplaneo y endorrizósfera, se determinaron sus capacidades de fijación del nitrógeno (CUADRO 11) (GRAFICA 5), Los resultados de la prueba de la nitrogenasa o reducción del acetileno fueron de las 8 cepas aisladas en orden de fijación de nitrógeno y de mayor a menor el siguiente: 76.32, 68.86, 61.76, 46.44, 43.00, 32.14, 27.48 y 26.86 nanomoles de etileno.

Debido a que el testigo obtuvo un mayor porcentaje de proteína verdadera, la hipótesis se considera falsa.

El Análisis de Varianza realizado a los resultados de los AQP. no mostraron diferencias significativas a un valor de $P \leq 0.05\%$.

La semilla de trigo reportó los siguientes resultados en promedio: PC: 14.41%, FV:09.17%, FC: 1.60%, EE: 6.70%, ELN: 75.48%, C: 1.81%, MS: 93.23%.

Los AQP. que se realizaron al FH el día 5 se muestran en el Cuadro 12, (GRAFICA 6), día 10 (Cuadro 13) (GRAFICA 7) y día 15 (CUADRO 14) (GRAFICA 8). Se registraron ligeros cambios entre uno y otro tratamiento. Los valores medios de PC en

Azospirillum brasilense SP-7 a los 5, 10 y 15 días fueron de 12.97, 16.19 y 22.60 %; en PV fueron 8.09, 7.43 y 9.38 %.

Beijerinckia indica S5-BE a los mismos tiempos registró en PC 12.84, 16.28 y 22.62 % en promedio, los valores de PV fueron 9.08, 8.03 y 9.49 % respectivamente.

Enterobacter agglomerans S4-AT registró en PC 13.01, 15.85 y 22.90%, y los valores de PV fueron respectivamente 9.24, 8.10 y 9.92%.

En la mezcla de las tres bacterias los resultados de PC a los 5, 10 y 15 días fueron de 12.76, 17.06 y 21.35%, y en PV correspondieron respectivamente a 9.54, 8.65 y 9.38%.

El testigo mostró en este caso los efectos de las BFN que se le aislaron, ya que los cambios en la PC fueron los siguientes 13.10, 16.92 y 20.66% y sus correspondientes valores en PV fueron 9.13, 8.88 y 10.10%.

Los resultados en la FC en todos los tratamientos del día 5 variaron entre 3.5% como máximo para la Beijerinckia indica S5-BE, y como mínimo 2.9% para la mezcla. Al día 10 el valor promedio máximo fue de 6.95% para la mezcla y 6.02% para el Enterobacter agglomerans S4-AT, y al día 15 el valor máximo fue de 7.79% para la mezcla y 5.19% como mínimo para el Azospirillum brasilense SP-7.

El EE al día 5 fue mayor en la mezcla con 2.92% y el menor fue para el Azospirillum brasilense SP-7 con 1.61%. Al día 10 el EE fue mayor para el testigo con 3.03% y el menor fue para la Beijerinckia indica S5-BE con 2.22%. Al día 15 el resultado mayor

fue para Enterobacter agglomerans S4-AT con 5.36% y el menor para la mezcla con 4.72%.

El ELN al día 5 el valor promedio mayor fue para el Azospirillum brasilense SP-7 con 77.14% y el menor para el Enterobacter agglomerans S4-AT con 69.96%. Al día 10 el valor promedio mayor fue para Enterobacter agglomerans S4-AT con 52.15% y el menor fue para el testigo con 48.25%. En el día 15 el valor promedio mayor fue para la mezcla con 14.09% y el valor menor lo registró Enterobacter agglomerans S4-AT con 6.16%.

Los valores de Ceniza al día 5 fueron de 1.78% como máximo en Azospirillum brasilense SP-7 y de 1.34% como mínimo en el Enterobacter agglomerans S4-AT. Al día 10 el valor máximo fue para la mezcla con 2.53% y el menor para la Beijerinckia indica S5-BE con 2.15%. Para el día 15 el valor promedio mayor fue para el Azospirillum brasilense SP-7 con 3.34% y el menor correspondió para la mezcla con 3.17 %.

Los resultados de MS se expresan en porcentaje con relación al peso original de la semilla que fue de 150 g por charola. Al día 5 correspondieron en su mayor valor promedio al Azospirillum brasilense SP-7 con 96.53 % y como menor con el 89.37% para el Enterobacter agglomerans S4-AT. Para el día 10 el valor promedio mayor fue para Beijerinckia indica S5-BE con 79.12% y el valor promedio menor fue para el Azospirillum brasilense SP-7 con 75.64%. Para el día 15 el valor promedio mayor de MS fue del 51 % y correspondió para la mezcla y el valor promedio menor lo registró el Enterobacter agglomerans S4-AT con 43.82%.

Durante el crecimiento del FH se observó una pérdida constante de mucigelos que se desprendían las raíces de todos los tratamientos, siendo más notorios en los FH inoculados con Beijerinckia indica S5-BE y Enterobacter agglomerans S4-AT (FOTOS 4, 5, 6, 7 Y 8).

Los Análisis de Varianza fueron realizados con base en los resultados de laboratorio para la prueba de la nitrogenasa de las bacterias para inóculo (CUADRO 15), biomasa (CUADRO 16 y 17), cenizas (CUADRO 18 y 19), E.E. (CUADRO 20 y 21), E.L.N. (CUADRO 22 y 23), F.C. (CUADRO 24 y 25), M.S. (CUADRO 26 y 27), P.C. (CUADRO 28 y 29) Y P.V. (CUADRO 30 y 31), demostrándose diferencias significativas para la prueba de Tukey con una significancia $P \leq .05$.

DISCUSION

El objetivo de la utilización de semilla certificada obtenida del CIMYT, fue para tener un mejor control de la calidad del FH a producir. Los resultados de las investigaciones mencionadas en la introducción nos indican de alguna manera la influencia de BFN, cuando el incremento en la PC así lo sugiere; sin embargo, no en todos los casos se puede suponer la presencia de endobacterias que influya en el desarrollo de la planta, aunque por supuesto estas favorezcan el crecimiento y los rendimientos en los cultivos tradicionales. Los resultados expuestos por Ponce-Salazar, J. (6) en el FH de trigo no muestran cambios tan drásticos en la PC considerando que los FH de esta investigación se produjeron de igual forma, también existen diferencias en cuanto a los niveles de EE y ELN reportados en ese experimento en el cual no se inoculó la semilla.

En cuanto a los resultados de la Cinética de Crecimiento Bacteriano se aprecia como estos se reflejan cuando se determina la carga bacteriana en la rizósfera y endorrizósfera del FH. La cepa de Azospirillum brasilense SP-7, de uso a nivel internacional, inicia más rápidamente su crecimiento, pero este no llega a las mismas concentraciones como en el caso de Beijerinckia indica S5-BE y Enterobacter agglomerans S4-AT, como se muestra en los resultados del día 10 en la rizósfera del FH, y debido al vigoroso crecimiento de Beijerinckia indica S5-BE, aunque un poco más tardado, este supera posteriormente en número al Azospirillum brasilense SP-7 y al Enterobacter agglomerans S4-AT. Posiblemente

sea debido a la mayor capacidad de crecimiento que tiene Beijerinckia indica S5-BE que la hace la de mayor capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico.

Las pruebas de la nitrogenasa en el medio de cultivo de Carbono Combinado, nos indican que Beijerinckia indica S5-BE y la mezcla de esta con Azospirillum brasilense SP-7 y la mezcla de Beijerinckia indica S5-BE con Enterobacter agglomerans S4-AT fueron las que mayor capacidad de fijación de nitrógeno mostraron.

El Azospirillum brasilense SP-7 fue la cepa que mayor biomasa generó, posiblemente por la producción de ácido indolacético que ésta reporta, pero la mezcla de las tres bacterias inoculadas al FH no tuvo el comportamiento sinérgico que se hubiera esperado, tal como se aprecia en prueba de la nitrogenasa realizada en el medio de la prueba de Carbono Combinado.

Al inicio de la investigación, no se contempló la aplicación de la prueba de la nitrogenasa a las bacterias aisladas del rizoplasma y endorrizósfera del FH de trigo durante la determinación de la carga bacteriana, por lo que esta se debía realizar obligadamente ya que el medio en el que se cuantificó el número de bacterias es específico para el crecimiento de BFN; fue así como se aislaron este tipo de bacterias para la prueba de la nitrogenasa. Por los resultados obtenidos en esta prueba en el medio de Carbono Combinado, se observó que algunas cepas aisladas del testigo, registraron similares capacidades de fijación del nitrógeno como el Azospirillum brasilense SP-7 y el Enterobacter agglomerans S4-AT.

Las características morfológicas de las colonias de las cepas inoculadas al FH son específicas en cada una, y las encontradas en el FH del testigo, no correspondían a las características de las cepas inoculadas. En la cuantificación de la carga bacteriana en el FH inoculado, no se apreciaron, en las diluciones realizadas otro tipo de BFN, posiblemente debido a que la carga bacteriana, inoculada a la semilla, fue alta y por otro lado, estas bacterias se encontraban en la fase logarítmica de su crecimiento, aunque esto no significa que no pudieran haber estado presentes.

Los resultados obtenidos en los AQP's son estadísticamente significativos en todos los tratamientos, incluso en el testigo, comparándolos con los resultados que se reportan en la prueba de la nitrogenasa realizado al FH inoculado. En el caso de Beijerinckia indica S5-BE, la capacidad de fijación del nitrógeno en el medio de Carbono Combinado es mayor en más de un 1000% que Azospirillum brasilense SP-7 y Enterobacter agglomerans S4-AT, los incrementos en los resultados de la PC no son similares a los incrementos de la FV. La cantidad con la que se inicia de FV en la semilla es de 9.17%, y en el FH al día 15, es el testigo el que obtiene la mayor cantidad al reportar 10.10% en comparación con el 9.38% de Azospirillum brasilense SP-7, 9.49% de Beijerinckia indica S5-BE, 9.92% de Enterobacter agglomerans S4-AT y 9.38% de la mezcla.

La determinación de la P.C. y la P.V., no corresponden a los niveles esperados de la fijación de nitrógeno registrada en

las pruebas de la nitrogenasa que se realizaron a los FH inoculados, de esta forma se puede suponer que parte de este nitrógeno no registrado en los AQP., se encuentra en forma de amonio y de proteína bacteriana que se elimina por la planta en forma de mucigales (FOTO 9) como bien se aprecia entre las raíces de los cultivos del FH inoculado (FOTOS 4, 5, 6 y 7), comparativamente con el forraje no inoculado (FOTO 8).

Las plantas pueden hacer uso del nitrógeno en forma de amonio, sin embargo se requieren de microminerales para que este pueda ser utilizado eficientemente, posiblemente si se incluyera microminerales en el agua de riego, se obtendrían mayores incrementos en la proteína verdadera al inocular la semilla con BFN. Se sugiere en lo futuro hacer en todos los AQP. de FH la determinación de la PV, ya que se puede tener una mayor información sobre la calidad de los FHs producidos aunque estos no hayan sido inoculados con BFN.

CONCLUSIONES

-El incremento en la Proteína Cruda fue mayor en los Forrajes Hidropónicos inoculadas con Bacterias Fijadoras de nitrógeno que en el testigo.

-El incremento en la proteína verdadera fue menor en los forrajes hidropónicos inoculados con bacterias fijadoras de nitrógeno que en el testigo.

-La semilla utilizada contenía endobacterias fijadoras de nitrógeno, cuyos cambios en los diferentes elementos nutritivos, son específicos para las bacterias que presentó.

-Se deja abierta la posibilidad de seguir investigando esta área de la producción de forrajes hidropónicos por no ser concluyentes los resultados en el uso de bacterias, debido a que las condiciones de laboratorio en las que se trabajó, puedan ser modificadas para un mejor resultado en rendimiento de materia seca y de proteína verdadera, para su posterior aplicación en condiciones de invernadero.

LITERATURA CITADA

- 1.- I.N.E.G.I. El Sector Alimentario en México. Comisión Nacional de la Alimentación. I.N.E.G.I.. México. 1993.
- 2.- I.N.E.G.I. Resumen Estadístico de la Producción Agropecuaria 1972-1989. I.N.E.G.I. México. 1990
- 3.- I.N.E.G.I. Avance Estadístico de la Producción Pecuaria 1993. I.N.E.G.I. S.A.G.H. México. 1990.
- 4.- I.N.E.G. Datos Básicos de la Geografía de México. I.N.E.G.I. México. 1994.
- 5.- I.N.E.G. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. I.N.E.G.I. México. 1993.
- 6.- Ponce-Salazar,-J. "Producción y evaluación de germinados hidropónicos" Reporte de Servicio Social. Agronomía. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México D.F. 1993.
- 7.- Sanchez M., Sanchez C. "Estudio preliminar de la técnica de producción intensiva de forraje hidropónico". Chapingo, Nueva Epoca. México. 1981.
- 8.- Sáenz C.A. "Alumbramiento sin problemas con germinados de cebada" Ranchos y Fierros. México. Año IV vol IV No. ---53. México (1984).
- 9.- Aguilar C. M. y Martínez E. R. "Relación Agua, Suelo, Planta, Atmósfera" UACH. México 1986.
- 10.- Camargo P.C. "Efecto de Pretratamientos y distintas láminas de riego sobre la composición química del Forraje Hidropónico y producción de aflatoxinas". Tesis de Licenciatura. Escuela de Química. Universidad Motolinía de

México. 1991.

11.- Ceballos O.A.; Cervantes S.,J.M.; Troncoso, A.H. "Evaluación Nutricional del Forraje Hidropónico de avena, cebada, trigo y triticale en laboratorio"XVII Memorias del Congreso Nacional de Buiatría, Villahermosa Tabasco, México 1992.

12.- Fabregat V.S.T. "Efecto de diferentes niveles de nitrógeno sobre la composición bromatológica y tasa de fermentación de forraje hidropónico de avena (Avena sativa L.)". Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México. D.F., 1990.

13.- López S.,M.G. "Evaluación Nutricional in vitro de forraje hidropónico de avena con diferentes concentraciones de potasio como sustrato" Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 1990.

14.- Manzanarez G.,M.D. "Evaluación Nutricional in vitro en forraje hidropónico en 4 cereales (avena, cebada, trigo y triticale) con una solución nutritiva" Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 1990.

15.- Ceballos O.A. "Evaluación Nutricional del Forraje Hidropónico de avena, cebada, trigo y triticale en laboratorio" Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México. D.F. 1989.

16.- Ortega O.F.J. "Evaluación Nutricional en laboratorio en Forraje Hidropónico de cebada" Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 1990.

- 17.-Cubillas D.R. "Comparación de la Composición Química Proximal, digestibilidad y balance de nitrógeno en ovinos, del germinado de trigo a 12 y 8 días con sustrato de rastrojo de maíz" Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 1990.
- 18.- El-Demerdash,-M.E; Abdel-Hafez, -A.E.; Mostafa, -M;Ishac-Y.Z. Response of Wheat plants to inoculation with rhizobia and associative diazotrophs in the presence of rock-phosphate as a P-fertilizer. Annals of Agricultural Science. 37: 2, 379-388. (1992).
- 19- Boddey, R.M.; Dobreiner J.; Nitrogen fixing bacteria in association with wheat (Triticum sativum L.) Wheat for the nontraditional warm areas. CIMMYT. 372 - 389. (1991).
- 20.- Al-Nahidh,-SI; Gomah-ABM. Response of Wheat to dual inoculation with VA-micorrhiza and Azospirillum, fertilized with NPK and irrigated with sewage effluent. Arid Soil Research and rehabilitation. 5:2, 83;96. (1991).
- 21.- Nikogosyan-V.G. Azospirillum in the soil of Armenia. Biologischeski Zhurnal Armenii. 43; 2, 155-157. (1990).
- 22.- Fayed, M. Untraditional N-2 Fixing bacteria as biofertilizers for wheat and barley. Folia Microbiological. 35;3 218-226. (1990).
- 23.- Gano T., Toriyama.-S. Isolation of Azospirillum spp from the roots of gramineous plants and growth-promoting effect. Bulletin of the National Institute of Agrobiological Resources. No. 5, 37-58. (1989).

- 24.- González R, L.P.; Ferrera-Carrato, R, Rodríguez M.,M.N. Caracterización de microorganismos de mucigel de raíces adventicias y suelo rizo esférico de maíz olotón de la región Mixe, Oaxaca. Tesis de Licenciatura. Escuela de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca. México, 1994.
- 25.- Gao T. Azospirillum spp from crop rots; a promoter of plant growth. Agricultural Research Quarterly. 24:4, 253-259. (1991).
- 26.- Stancheva, I.; Dinev, -N. Effects of inoculation of maize and special of tribe Triticeae with Azospirillum brasilense. Journal of Plant Physiology. 5, 550-552: (1992).
- 27.- Broek, A.; Michiels, J.; Gool, A.; Vanderleyden, J.; Vanda-Broek, A. Spatial-temporal colonization patterns of Azospirillum brasilense on the wheat root surface and expression of the bacterial nifH gene during association. Molecular Plant Microbel Interactions. 6:5, 592-600; (1993).
- 28.- Sukiman, H.I.; New P.B. Relationship between root colonization and initial adsorption of Azospirillum to plant roots. Microbial Ecology. 20: 1, 65-74; (1990).
- 29.- Bashan,-Y; Levanony,-H. Alterations membrane potential and in proton efflux in plant roots induced by Azospirillum brasilense. Plant and Soil. 137: 1, 99-103; (1991).
- 30.- Bashan,-Y; Levanony,-H. Influence of Azospirillum brasilense on root membranes. Bulletin SROP. 14: 8, 143-146; (1991).

- 31.- Christiansen-Weninger, -C; Groneneman, -A.F.; Veen, -J.A.-van; Van-Veen, -J.A. Associative N₂ fixation and root exudation of organic acids from wheat cultivars of different aluminium tolerance. Plant and Soil. 139: 2, 167-174: (1992).
37: 2, 379-388. (1992).
- 32.- Gessa C.; Deiana S. Fibrillar structure and comparison with natural root mucilage. Plant and Soil 140: 1-13, (1992).
- 33.- Fedi, S., Montaini, P., Favilli, F. Chemotactic response of *Azospirillum* toward root exudates of C3 and C4 plants. *Symbiosis-Rehovot*. 13: 1-3, 101-105; 1992.
- 34.- Howell C.R., Beier R.C. y Stipanovic R.D. Production of Ammonia by Enterobacter cloacae and Its possible role in the biological control of *Phythyum* preemergence damping-off by the Bacterium. *Research plant pathologist and research chemists, Phytopathology* 78: 1075-1078. (1988).
- 35.- Kreuzer, R.; Steibl-B.D.; Dayananda, S; Appe, R.; Balda, L.; Buck, M.; Klingmuller, W. Genetic characterization of nitrogen fixation in *Enterobacter* strains from the rhizosphere of cereals. Proceeding of the Symposium on Nitrogen Fixation with non-Legumes, 25-36; Vol 48. (1991).
- 36.- Klingmuller, W. Biological monitoring of genetically engineered plants and microbes. Proceeding of the Kiawah Island Conference , 45-53; (1990).
- 37.- Omay, S.H.; Schaidt, W. A.; Martin P.; Bangerth, F. Indolacetic acid production by the rhizosphere bacterium

- Azospirillum brasilense CD under in vitro conditions. 1993. Can J Microbiology. 39: 187-192. (1993).
- 38.- Bashan, Y; Mitiku G. Estimation of minimal numbers of Azospirillum brasilense using time-limited Liquid enrichment combined with Enzyme-Linked immunosorbent assay. Soil Biol. Biochem. 23: 2 135-138, (1991).
- 39.- Krieg N.R. y Holt J.G.. "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" Ed. Board. Baltimore U.S.A. 1990.
- 40.- Christiansen-Weniger, C. N₂-fixation by ammonium-excreting Azospirillum brasilense in auxine-induced root tumours of wheat (Triticum aestivum L.). Biology and Fertility of soils. 13:3, 165-172; (1992).
- 41.- Christiansen-Weniger, C.; Veen, JA.-Van; Van-Veen, J.A. NH₄⁺-excreting Azospirillum brasilense mutants enhance the nitrogen supply of a wheat host. Applied and Environmental Microbiology. 57:100, 3006-3012, (1991).
- 42.- Flores M, J.A. Broematología Animal. Trillas -a ed. México, 1975.
- 43.- Rennie, R.L. A single medium for insolation of acetylen reducting (dinitrogen fixing) bacteria from soils. Can. J. Microbiol. 27; 8-14. (1981).
- 44.- De la Loma, J.L. Experimentación Agrícola. Utaha. ed. México, 1982.
- 45.- Daniel, W. W. Biostatística. Limusa. ed. México, 1987.

CUADRO 1

CUANTIFICACION DE LA CARGA FUNGICA
NATIVA DE LA SUPERFICIE DE LA SEMILLA DE TRIGO/100 g

DILUCION	NUMERO DE COLONIAS	PROMEDIO DE COLONIAS	
10 ¹	1) HONGOS	18	
	ACTINOMICETOS	8	
	2) HONGOS	13	HONGOS 15
	ACTINOMICETOS	9	ACTINOMICETOS 8
	3) HONGOS	14	
	ACTINOMICETOS	8	
10 ²	1) HONGOS	3	
	ACTINOMICETOS	1	
	2) HONGOS	1	HONGOS 2
	ACTINOMICETOS	2	ACTINOMICETOS 1
	3) HONGOS	2	
	ACTINOMICETOS	1	

CUADRO 2

ESCALA DE Mc FARLAND

No. DE TUBO	Absorbancia 520 nm.*	Ba Cl ₂ †	H ₂ SO ₄ ‡	No. de bacterias**
1	0.14	0.1	9.9	9.9
2	0.31	0.2	9.8	9.8
3	0.40	0.3	9.7	9.7
4	0.49	0.4	9.6	9.6
5	0.80	0.5	9.5	9.5
6	0.85	0.6	9.4	9.4
7	1.0	0.7	9.3	9.3
8	1.1	0.8	9.2	9.2
9	1.2	0.9	9.1	9.1
10	1.3	1.0	9.0	9.0

*Valores a una desviación de 520 nm. en el Nefelómetro de Mc Farland.

**1 x 10⁶

CUADRO 3: VALORES PROMEDIO DE LA TURBIDEZ EN LOS TUBOS NEFELOMETRICOS PARA LA DETERMINACION DEL CRECIMIENTO BACTERIANO.

HORAS	<u>Azospirillum b.</u>	<u>Beijerinckia i.</u>	<u>Enterobacter a.</u>
0	0.001	0.001	0.001
4	0.012	0.006	0.011
6	0.016	0.013	0.088
8	0.042	0.156	0.135
12	0.161	0.225	0.150
16	0.267	0.323	0.152
20	0.351	0.373	0.156
24	0.360	0.370	0.160
28	0.360	0.363	0.163
36	0.346	0.360	0.166
56	0.325	0.346	0.162
60	0.312	0.336	0.160

* Valores a 520 nm de desviación en el Nefelómetro de Mc Farland.

CUADRO 4: VALORES PROMEDIO DE LA PRUEBA DE LA NITROGENASA
 REALIZADO A LAS BACTERIAS CULTIVADAS EN EL MEDIO DE CARBONO
 COMBINADO

CEPA	nmoles etileno /24 h/ vial
<u>Azospirillum brasilense</u> . SP-7	10.68
<u>Beijerinckia indica</u> . S5- BE	1233.4
<u>Enterobacter agglomerans</u> . S4	85.92
<u>Azospirillum</u> + <u>Beijerincki</u> + <u>Enterobacter</u> .	103.27
<u>Azospirillum</u> + <u>Beijerincki</u> .	1197.17
<u>Azospirillum</u> + <u>Enterobacter</u> .	134.06
<u>Enterobacter</u> + <u>Beijerinckia</u> .	1248.0

CUADRO 5: VALORES PROMEDIO DEL ANALISIS DE LA NITROGENASA DEL FORRAJE HIDROPONICO DE TRIGO

CEPA	nmoles etileno/24 h/ 100 g FH
<u>Azospirillum brasilense.</u>	363.12
<u>Beijerincki indica.</u>	521.2
<u>Enterobacter agglomerans.</u>	141.5
Mezcla.	333.84
Testigo.	8.9

CUADRO 6: VALORES PROMEDIO DEL ANALISIS DE DICASGA*
 REALIZADO AL FORRAJE HIDROPONICO DE TRIGO
 INOCULADO CON BACTERIAS FIJADORAS DE NITROGENO

CEPA	DIA 1	DIA 5	DIA 10	DIA 15
<u>Azospirillum</u> <u>brasilense.</u>	256.58	284.81	569.19	659.42
<u>Beijerinckia</u> <u>indica.</u>	256.11	281.52	550.06	631.66
<u>Enterobacter</u> <u>agglomerans.</u>	247.26	302.27	538.62	605.98
Mascla.	263.46	299.22	497.95	593.89
Testigo.	258.11	302.53	545.28	611.90

*Valores en g de FH /charola. Con valor inicial en los 5
 tratamientos de 150 g de semilla /charola.

CUADRO 7: VALORES PROMEDIO DEL NUMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA POR GRAMO DE SEMILLA DE TRIGO INOCULADA CON BFN.

CEPA	UFC / g de SEMILLA
<u>Azospirillum brasilense</u> SP-7.	153 x 10 ³
<u>Beijerinckia indica</u> S5-BE.	28 x 10 ³
<u>Enterobacter agglomerans</u> S4-AT.	39 x 10 ²
MEZCLA DE LAS TRES CEPAS.	41 x 10 ³
TESTIGO.	18 x 10 ²

CUADRO 8: VALORES PROMEDIO DE LAS UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA EN EL RIZOPLANO Y EN LA ENDORRIZOSFERA / g DE RAIZ.

DIA 5

CEPA	UFC EN RIZOPLANO	UFC EN ENDORRIZOSFERA
<u>Azospirillum brasilense</u> SP-7.	54 X 10 ⁶	75 X 10 ³
<u>Beijerinckia indica</u> S5-BE.	11 X 10 ⁶	3 X 10 ¹
<u>Enterobacter agglomerans</u> S4-AT.	155 X 10 ⁶	36 X 10 ³
MEZCLA DE LAS TRES CEPAS.	184 X 10 ⁶	57 X 10 ³
TESTIGO.	268 X 10 ⁶	32 X 10 ³

CUADRO 9: VALORES PROMEDIO DE LAS UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA EN EL RIZOPLANO Y EN LA ENDORRIZOSFERA / g DE RAIZ.

DIA 10

CEPA	UFC EN RIZOPLANO	UFC EN ENDORRIZOSFERA
<u>Agosporillum brasilense</u> SP-7.	79 X 10 ⁶	59 X 10 ³
<u>Beijerinckia indica</u> S5-BE.	34 X 10 ⁶	1 X 10 ¹
<u>Enterobacter agglomerans</u> S4-AT.	88 X 10 ⁶	34 X 10 ³
MEZCLA DE LAS TRES CEPAS.	62 X 10 ⁶	128 X 10 ³
TESTIGO.	341 X 10 ⁶	34 X 10 ³

CUADRO 10: VALORES PROMEDIO DE LAS UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA EN EL RIZOPLANO Y EN LA ENDORRIZOSFERA / g DE RAIZ.

DIA 15

CEPA	UFC EN RIZOPLANO	UFC EN ENDORRIZOSFERA
<u>Azospirillum brasilense</u> SP-7.	223 X 10 ⁶	308 X 10 ³
<u>Beijerinckia indica</u> S5-BE.	422 X 10 ⁶	1 X 10 ³
<u>Enterobacter agglomerans</u> S4-AT.	114 X 10 ⁶	96 X 10 ³
MEZCLA DE LAS TRES CEPAS.	339 X 10 ⁶	155 X 10 ³
TESTIGO.	108 X 10 ⁶	29 X 10 ³

CUADRO 11: VALORES PROMEDIO DE LA PRUEBA DE LA NITROGENASA DE LAS
 ENDOBACTERIAS NATIVAS DE LA SEMILLA DE TRIGO*.

No. DE CEPA	nmoles de etileno/ 24 h / vial
1	42.99
2	27.47
3	26.86
4	76.31
5	96.41
6	46.43
7	68.86
8	61.76

* CEPAS NO IDENTIFICADAS Y AISLADAS EN EL MEDIO DE CARBONO
 COMBINADO.

CUADRO 12: RESULTADOS DE LOS ANALISIS QUIMICOS PROXIMALES REALIZADOS AL FORRAJE HIDROPONICO DE TRIGO INOCULADOS CON BACTERIAS FIJADORAS DE NITROGENO. DIA 5.

CEPA	REP	P.C.	P.V.	F.C.	E.E.	E.L.N	C.	M.S.
<u>Azospirillum</u>	1	13.11	7.50	3.09	1.97	76.77	1.57	95.38
"	2	12.65	8.49	3.07	1.43	78.21	1.83	97.21
"	3	12.81	7.27	3.28	1.88	76.46	1.93	96.38
"	4	12.91	9.10	4.16	1.16	77.11	1.78	97.15
<u>Beijerinckia</u>	1	12.80	9.61	3.87	2.91	74.97	1.62	96.21
"	2	12.82	9.53	4.73	1.90	74.54	1.70	95.71
"	3	12.96	8.39	3.08	1.84	75.92	1.55	95.38
"	4	12.77	8.81	2.63	2.47	75.81	1.63	96.74
<u>Enterobacter</u>	1	12.80	8.17	3.34	2.07	69.76	1.26	89.25
"	2	12.80	10.3	2.66	1.95	71.43	1.49	90.31
"	3	13.25	8.44	2.77	2.16	69.66	1.23	89.10
"	4	13.18	10.0	3.73	1.53	68.97	1.38	88.82
MEZCLA	1	12.93	9.89	4.41	2.77	74.72	1.43	95.98
"	2	12.28	9.76	2.34	2.62	77.22	1.58	96.07
"	3	12.94	8.21	2.14	2.55	77.27	1.54	96.49
"	4	12.89	10.3	2.69	3.73	76.19	1.61	97.14
TESTIGO	1	12.92	9.17	3.60	1.51	74.91	1.2	94.16
"	2	13.16	8.71	2.20	1.76	73.43	1.69	92.27
"	3	13.26	9.66	3.19	1.99	74.75	1.74	94.95
"	4	13.08	8.99	3.42	1.45	76.32	1.60	95.90

• M.S. EL 100% CORRESPONDE AL PESO SECO DE LA SEMILLA .

CUADRO 13: RESULTADOS DE LOS ANALISIS QUIMICOS PROXIMALES REALIZADOS
ALFORRAJE HIDROPONICO DE TRIGO INOCULADO CON BACTERIAS FIJADORAS DE
NITROGENO. DIA 10.

CEPA	REP	P.C.	P.V.	F.C.	E.E.	E.L.N.	C.	M.S.
<u>Azospirillum</u>	1	16.06	7.75	5.51	2.47	46.25	2.06	72.38
"	2	15.86	7.90	6.36	2.49	50.52	2.30	77.57
"	3	16.06	7.03	5.75	2.51	46.73	3.09	74.10
"	4	15.96	7.04	6.54	2.43	51.54	2.05	78.51
<u>Beijerinckia</u>	1	16.11	7.82	6.84	2.77	52.51	2.01	80.25
"	2	16.49	7.62	6.46	2.90	52.24	2.03	80.15
"	3	16.78	7.88	6.59	3.14	48.50	2.53	77.57
"	4	15.72	8.81	5.99	2.86	51.89	2.03	78.51
<u>Enterobacter</u>	1	15.67	7.44	6.32	2.59	52.51	2.13	79.25
"	2	15.66	7.94	5.57	2.72	51.43	2.46	77.87
"	3	15.89	7.99	6.02	2.94	48.28	2.07	75.22
"	4	16.19	9.04	6.16	2.74	56.39	1.99	83.50
MEZCLA	1	17.25	8.41	6.28	2.93	46.45	2.28	75.21
"	2	16.70	8.20	6.98	2.65	44.62	2.91	73.89
"	3	17.38	9.10	7.90	3.19	47.52	2.51	78.52
"	4	16.91	8.89	6.64	3.13	48.26	2.42	77.38
TESTIGO	1	16.80	8.00	5.89	3.15	47.57	2.36	75.39
"	2	17.45	9.20	5.50	3.34	47.86	2.33	76.50
"	3	17.19	9.62	7.24	2.78	47.45	2.32	77.01
"	4	16.51	8.69	6.87	2.85	50.13	2.15	78.54

* M.S. EL 100% CORRESPONDE AL PESO SECO DE LA SEMILLA AL MOMENTO DE
INICIAR LA GERMINACION.

CUADRO 14: RESULTADOS DE LOS ANALISIS QUIMICOS PROXIMALES REALIZADOS AL FORRAJE HIDROPONICO DE TRIGO INOCULADOS CON BACTERIAS FIJADORAS DE NITROGENO. DIA 15.

CEPA	REP	P.C.	P.V.	F.C.	E.E.	E.L.N.	C.	M.S.
<u>Azospirillum</u>	1	22.04	8.74	6.64	5.75	7.89	3.41	45.78
"	2	23.15	9.10	7.79	4.59	8.57	2.96	47.09
"	3	22.30	9.96	6.53	5.06	11.2	3.74	48.93
"	4	22.89	9.71	7.61	5.19	12.57	3.24	51.52
<u>Beijerinckia</u>	1	23.41	9.93	8.22	5.19	10.43	3.42	50.70
"	2	22.64	9.74	7.28	5.04	11.78	3.12	49.88
"	3	22.04	9.40	7.48	5.62	8.68	3.23	47.07
"	4	22.39	8.88	7.39	4.34	12.63	3.23	49.99
<u>Enterobacter</u>	1	22.22	9.82	6.11	5.54	7.78	3.36	45.03
"	2	23.56	9.60	6.24	5.09	4.66	3.51	43.03
"	3	23.51	9.96	6.89	5.25	5.11	3.47	44.25
"	4	22.30	10.3	5.86	5.56	7.11	2.05	42.91
MEZCLA	1	20.76	9.26	7.53	4.87	15.76	3.14	52.07
"	2	21.31	9.94	7.72	4.79	13.26	3.15	50.25
"	3	21.07	8.87	7.73	4.72	14.41	3.02	50.97
"	4	22.28	9.47	8.18	4.50	12.95	3.38	51.31
TESTIGO	1	21.86	9.55	6.74	5.36	8.60	3.44	46.02
"	2	19.71	10.0	6.63	4.68	10.20	3.49	44.73
"	3	19.91	10.5	6.54	4.71	11.22	2.65	45.05
"	4	21.15	10.2	6.87	5.24	8.41	3.50	45.20

* M.S. EL 100% CORRESPONDE AL PESO SECO DE LA SEMILLA AL MOMENTO DE INICIAR LA GERMINACION.

CUADRO 15

ANALISIS DE VARIANZA PARA EL FACTOR BACTERIA.

BACTERIAS UTILIZADAS COMO INOCULO.

VARIABLE: NITROGENO FIJADO

FUENTE	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS
TRATAMIENTOS	6	6890528	1148421
RESIDUAL	14	158269	11305
TOTAL	20	7048797	

*DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS PARA P (≤ 0.05)

Media	GRUPO	A	E	A+B +E	A+E	A+B	B	E+B
10.68	A							
85.92	E							
103.27	A +B+E							
134.06	A + E							
1197.17	A + B	*	*	*				
1248.00	B	*	*	*				
1233.40	E + B	*	*	*				

Donde: A= Azospirillum. B= Beijerinckia. E= Enterobacter.

CUADRO 16

ANALISIS DE VARIANZA PARA LOS FACTORES A y B. donde:

A= Número de días de crecimiento del FH.

B= Especie de bacteria inoculada y testigo.

BACTERIAS INOCULADAS A LA SEMILLA DEL FORRAJE HIDROPONICO.

VARIABLE: BIOMASA

FUENTE	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS
TRATAMIENTOS	19	1471339	77438.9
RESIDUAL	40	15138.3	378.458
TOTAL	59	1486477	

*DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS PARA P (≤ 0.05)

CUADRO 17: P.TUKEY. BIOMASA. * = Diferencias significativas

MEDIA	GRUPO	E	B	A	T	M	B	A	M	E	T	M	E	T	B	A	M	E	T	B	A	
		1	1	1	1	1	5	5	5	5	5	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
												0	0	0	0	0	5	5	5	5	5	5
247.26	E 1																					
256.11	B 1																					
256.58	A 1																					
258.11	T 1																					
263.46	M 1																					
281.52	B 5																					
284.81	A 5																					
299.22	M 5																					
302.27	E 5																					
302.53	T 5																					
497.95	M 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*											
538.62	E 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*											
545.28	T 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*											
550.06	B 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*										
569.19	A 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*									
593.89	M 15	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*								
605.98	E 15	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
611.90	T 15	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*						
631.66	B 15	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*					
659.42	A 15	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Donde: A= Azospirillum. B= Beijerinckia. E= Enterobacter. M= Mezcla.

T= Testigo. 1, 5, 10 y 15 = Número de días de crecimiento de FH.

CUADRO 18

ANALISIS DE VARIANZA PARA LOS FACTORES A y B. donde:

A= Número de días de crecimiento del FH.

B= Especie de bacteria inoculada y testigo.

VARIABLE: CENIZA

FUENTE	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS
TRATAMIENTOS AB	14	28.5488	2.0392
RESIDUAL	45	3.9546	.0879
TOTAL	59	32.5935	

*DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS PARA P (≤ 0.05)

CUADRO 19: P. TUKEY. CENIZAS. * = Diferencias significativas

Media	GRUPO	E	M	T	B	A	B	E	T	A	M	E	M	B	T	A
		5	5	5	5	5	10	10	10	10	10	15	15	15	15	15
1.3400	E5															
1.5400	M5															
1.5575	T5															
1.6250	B5															
1.7775	A5															
2.1500	B10	*														
2.1625	E10	*														
2.2900	T10	*	*	*												
2.3600	A10	*	*	*	*											
2.5300	M10	*	*	*	*	*										
3.0975	E15	*	*	*	*	*	*	*	*	*						
3.1725	M15	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*					
3.2525	B15	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*					
3.2700	T15	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*					
3.3375	A15	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*					

Donde: A= Azospirillum. B= Beijerinckia. E= Enterobacter. M=Mezcla.

T= Testigo 5, 10 y 15 = Número de días de crecimiento de FH.

CUADRO 20

ANALISIS DE VARIANZA PARA LOS FACTORES A y B. donde:

A= Número de días de crecimiento del PH.

B= Especie de bacteria inoculada y testigo.

VARIABLE: EXTRACTO ESTEREO

FUENTE	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS
TRATAMIENTOS AB	14	101.8842	7.2774
RESIDUAL	45	5.1942	.1154
TOTAL	59	107.0784	

*DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS PARA P (≤ 0.05)

CUADRO 21: P. TUKEY. EXTRACTO ETHEREO. * - Dif. Signif.

Media	GRUPO	A	T	E	B	A	E	B	M	M	T	M	T	B	A	E
		5	5	5	5	10	10	10	5	10	10	15	15	15	15	15
1.6100	A5															
1.6775	T5															
1.9275	E5															
2.2800	B5															
2.4750	A10	*	*													
2.7475	E10	*	*	*												
2.9175	B10	*	*	*												
2.9175	M5	*	*	*												
2.9750	M10	*	*	*												
3.0300	T10	*	*	*												
4.7200	M15	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*					
4.9975	T15	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*					
5.0475	B15	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*					
5.1475	A15	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*					
5.3600	E15	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*					

Donde: A= Azospirillum. B= Beijerinckia. E= Enterobacter. M=Mezcla.

T= Testigo 5, 10 y 15 = Número de días de crecimiento de FH.

CUADRO 22

ANALISIS DE VARIANZA PARA LOS FACTORES A y B. donde:

A= Número de días de crecimiento del PH.

B= Especie de bacteria inculada y testigo.

VARIABLE: EXTRACTO LIBRE DE NITROGENO

FUENTE	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS
TRATAMIENTOS AB	14	42670.3650	3047.8832
RESIDUAL	45	133.3273	2.9628
TOTAL	59	42803.6923	

*DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS PARA P (≤ 0.05)

CUADRO 23: P. TUKEY. EXTRACTO LIBRE DE NITROGENO.

* = Dif. Signif

Media	GRU	E	T	A	B	M	M	T	A	B	E	E	T	B	M	A
	PO	15	15	15	15	15	10	10	10	10	10	5	5	5	5	5
6.1650	E15															
9.6075	T15	*														
10.0475	A15	*														
10.8800	B15	*														
14.0950	M15	*	*	*												
46.7125	M10	*	*	*	*	*										
48.2600	T10	*	*	*	*	*										
48.7600	A10	*	*	*	*	*										
51.2850	B10	*	*	*	*	*	*									
52.1525	E10	*	*	*	*	*	*	*								
69.9550	E5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*					
74.8525	T5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*				
75.3100	B5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
76.3500	M5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
77.1375	A5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			

Donde: A= Azospirillum. B= Beijerinckia. E= Enterobacter.

M= Mezcla. T= Testigo.

5, 10 y 15 = Número de días de crecimiento de FH.

CUADRO 24

ANALISIS DE VARIANZA PARA LOS FACTORES A y B. donde:

A= Número de días de crecimiento del FB.

B= Especie de bacteria inoculada y testigo.

VARIABLE: FIBRA CRUDA

FUENTE	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS
TRATAMIENTOS AB	14	179.7534	12.8395
RESIDUAL	45	16.0287	.3562
TOTAL	59	195.7821	

*DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS PARA P (≤ 0.05)

CUADRO 25: P. TUKEY. FIBRA CRUDA. * = Dif. Signif

Media	GRU	M	T	E	A	B	E	A	E	T	B	T	M	A	B	M
	PO	5	5	5	5	5	10	10	15	10	10	15	10	15	15	15
2.8950	M5															
3.1025	T5															
3.1250	E5															
3.4000	A5															
3.5775	B5															
6.0175	E10	*	*	*	*	*										
6.0400	A10	*	*	*	*	*										
6.2750	E15	*	*	*	*	*										
6.3750	T10	*	*	*	*	*										
6.4700	B10	*	*	*	*	*										
6.6950	T15	*	*	*	*	*										
6.9500	M10	*	*	*	*	*										
7.1425	A15	*	*	*	*	*										
7.5925	B15	*	*	*	*	*	*	*								
7.7900	M15	*	*	*	*	*	*	*	*	*						

Donde: A= Azospirillum. B= Beijerinckia. E= Enterobacter.

M= Mezcla. T= Testigo.

5, 10 y 15 = Número de días de crecimiento de FH.

CUADRO 26

ANALISIS DE VARIANZA PARA LOS FACTORES A y B. donde:

A= Número de días de crecimiento del FH.

B= Especie de bacteria inoculada y testigo.

VARIABLE: MATERIA SECA

FUENTE	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS
TRATAMIENTOS AB	14	22876.5670	1633.8976
RESIDUAL	45	128.0864	2.8464
TOTAL	59	23002.6534	

*DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS PARA P (≤ 0.05)

CUADRO 27: P. TUKEY. MATERIA SECA. * - Dif. signif

Media	GRU PO	E 15	T 15	A 15	B 15	M 15	A 10	M 10	T 10	E 10	B 10	E 5	T 5	B 5	M 5	A 5
42.8200	E15															
45.2500	T15															
48.3300	A15	*														
49.4100	B15	*	*													
51.1500	M15	*	*													
75.6400	A10	*	*	*	*	*										
76.2500	M10	*	*	*	*	*										
76.8600	T10	*	*	*	*	*										
78.9600	E10	*	*	*	*	*										
79.1200	B10	*	*	*	*	*										
89.3700	E5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*					
94.3200	T5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
95.9100	B5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
96.4200	M5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
96.5300	A5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			

Donde: A= Azospirillum. B= Beijerinckia. E= Enterobacter.

M= Mezcla. T= Testigo.

5, 10 y 15 = Número de días de crecimiento de FH.

CUADRO 28

ANALISIS DE VARIANZA PARA LOS FACTORES A y B. donde:

A= Número de días de crecimiento del FH.

B= Especie de bacteria inoculada y testigo.

VARIABLE: PROTEINA CRUDA

FUENTE	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS
TRATAMIENTOS AB	14	864.4694	61.7478
RESIDUAL	45	10.2033	.2267
TOTAL	59	874.6727	

*DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS PARA P (≤ 0.050)

CUADRO 29: P. TUKEY. PROTEINA CRUDA. * - Dif. Signif

Media	GRU	M	B	A	E	T	E	A	B	T	M	T	M	A	B	E
	PO	5	5	5	5	5	10	10	10	10	10	15	15	5	15	15
12.7600	M5															
12.8375	B5															
12.8700	A5															
13.0075	E5															
13.1075	T5															
15.8525	E10	*	*	*	*	*										
15.9900	A10	*	*	*	*	*										
16.2750	B10	*	*	*	*	*										
16.9875	T10	*	*	*	*	*	*									
17.0600	M10	*	*	*	*	*	*	*								
20.6575	T15	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*					
21.3550	M15	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*				
22.5950	A15	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
22.6200	B15	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
22.8975	E15	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		

Donde: A= Azospirillum. B= Beijerinckia. E= Enterobacter.

M= Mezcla. T= Testigo.

5, 10 y 15 = Número de días de crecimiento de FH.

CUADRO 30

ANALISIS DE VARIANZA PARA LOS FACTORES A y B. donde:

A= Número de días de crecimiento del FH.

B= Especie de bacteria inoculada y testigo.

VARIABLE: PROTEINA VERDADERA

FUENTE	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS
TRATAMIENTOS AB	14	32.0766	2.2914
RESIDUAL	45	17.4312	.3874
TOTAL	59	49.5108	

*DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS PARA P (≤ 0.05)

CUADRO 31: P. TUKEY. PROTEINA VERDADERA. * - Dif. Signif

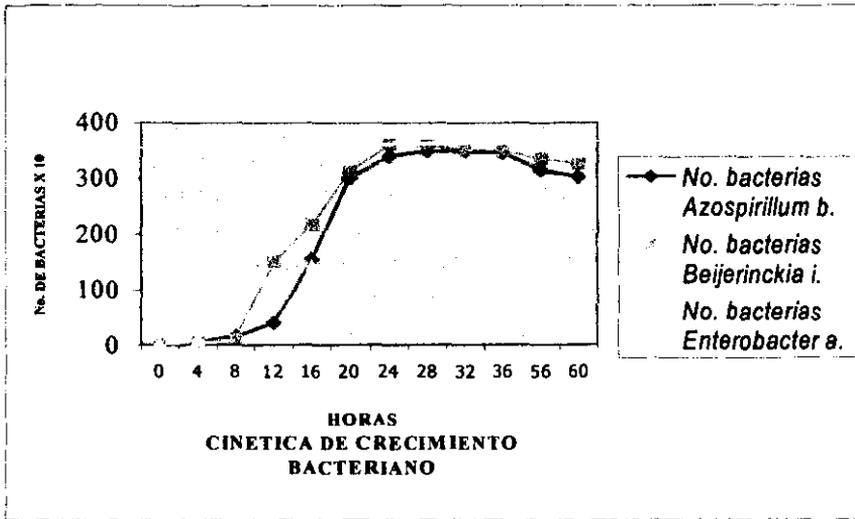
Media	GRU	A	B	A	E	M	T	B	T	E	A	M	B	M	E	T
	PO	10	10	5	10	10	10	5	5	5	15	15	15	5	15	15
7.4300	A10															
8.0325	B10															
8.0900	A5															
8.1025	E10															
8.6500	M10															
8.8775	T10	*														
9.0850	B5	*														
9.1325	T5	*														
9.2275	E5	*														
9.3775	A15	*														
9.3850	M15	*														
9.4875	B15	*														
9.5400	M5	*														
9.9200	E15	*	*	*	*											
10.062	T15	*	*	*	*											

Donde: A= Azospirillum. B= Beijerinckia. E= Enterobacter.

M= Mezcla. T= Testigo.

5, 10 y 15 = Número de días de crecimiento de FR.

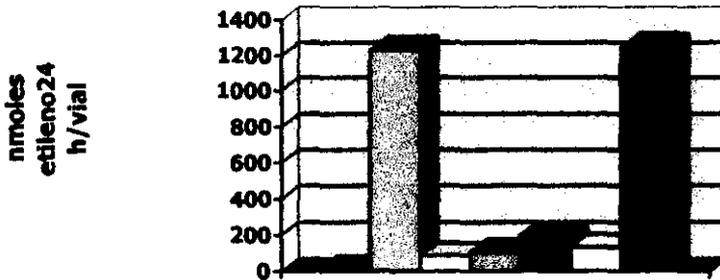
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



GRAFICA 1

HORAS	Azospirillum	Beijerinckia	Enterobacter
0	0.96	0.96	0.96
4	5.83	5.8	10.64
8	15.48	12.58	85.16
12	40.68	150.96	130.64
16	155.8	217.74	145.16
20	300.00	312.58	147.03
24	339.67	360.96	150.96
28	348.38	358.06	154.83
32	348.39	351.29	157.34
36	344.83	348.38	160.64
56	314.51	334.86	156.77
60	301.93	325.16	154.83

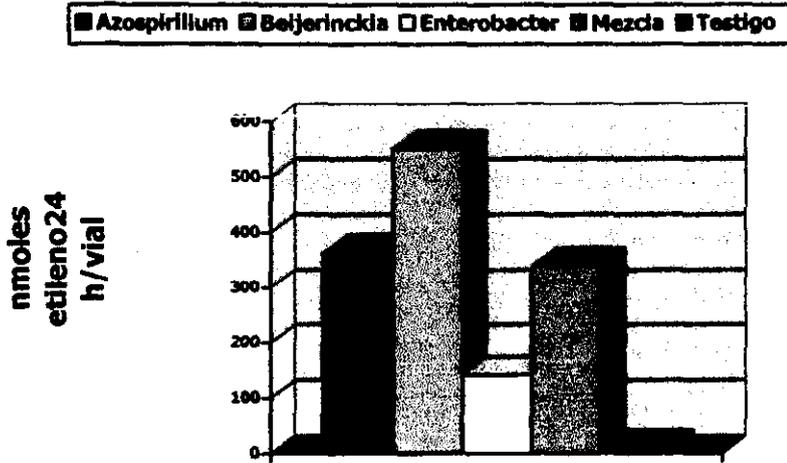
■ Azospirillum □ Beijerinckia □ Enterobacter ■ A.+B.+E. ■ A.+B. □ A.+E. ■ B.+E.



RESULTADOS DEL ANALISIS DE LA NITROGENASA A LAS BACTERIAS INOCULADAS EN EL MEDIO DE CARBONO COMBINADO.

GRAFICA 2

	Azosp.	Beijer.	Enterob.	Azosp.+Beijer. + Enterob.	Azosp. +Beijer.	Azosp. + Enterob.	Enterob. + Beijer.
	1	2	3	1+2+3	1+2	1+3	1+2
Nmoles/ Etileno	10.68	1233.4	85.92	103.27	1197.1	134.06	1248.3

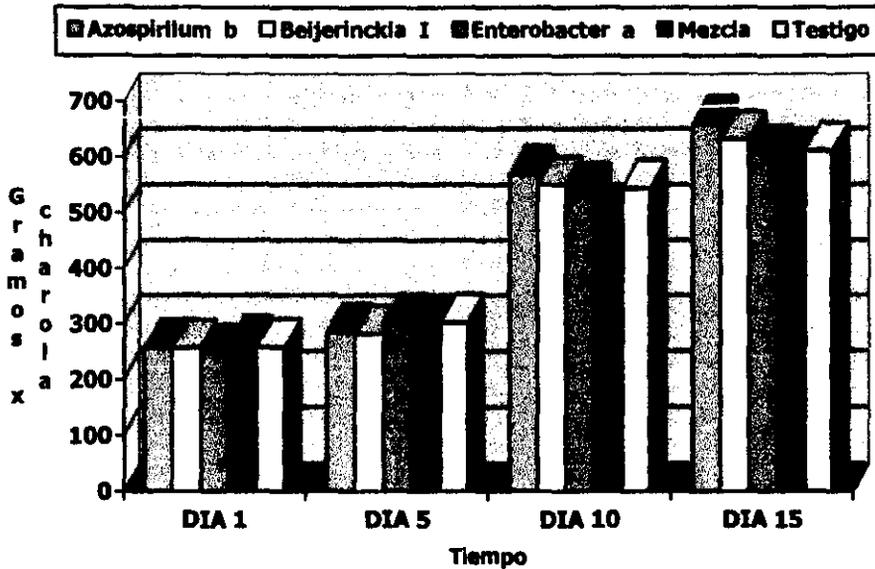


**RESULTADOS DEL ANALISIS DE LA NITROGENASA AL FORRAJE
HIDROPONICO DE TRIGO.**

DIA 15

GRAFICA 3

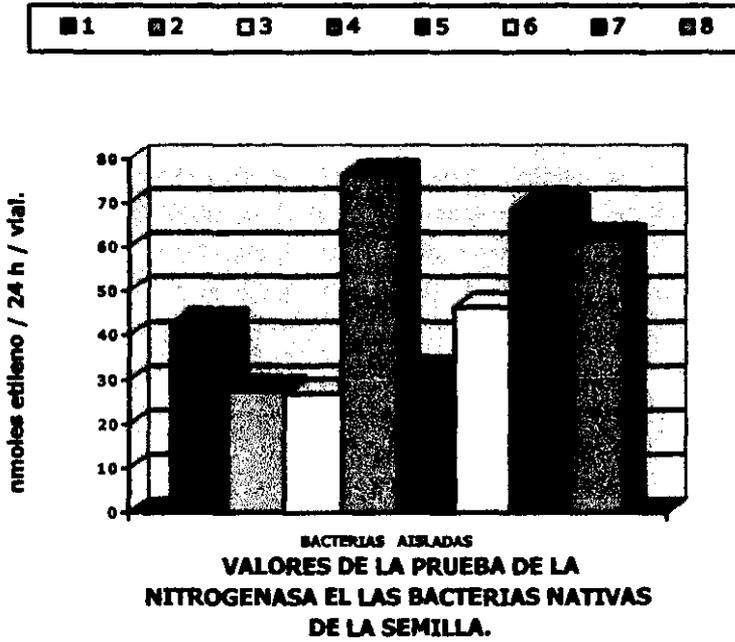
CEPA	Azospirillum	Beijerinckia	Enterobacter	Mezcla	Testigo
DIA 15	363.1	551.0	141.5	333.9	8.9



RESULTADOS DE LA BIOMASA EN EL FORRAJE INOCULADO

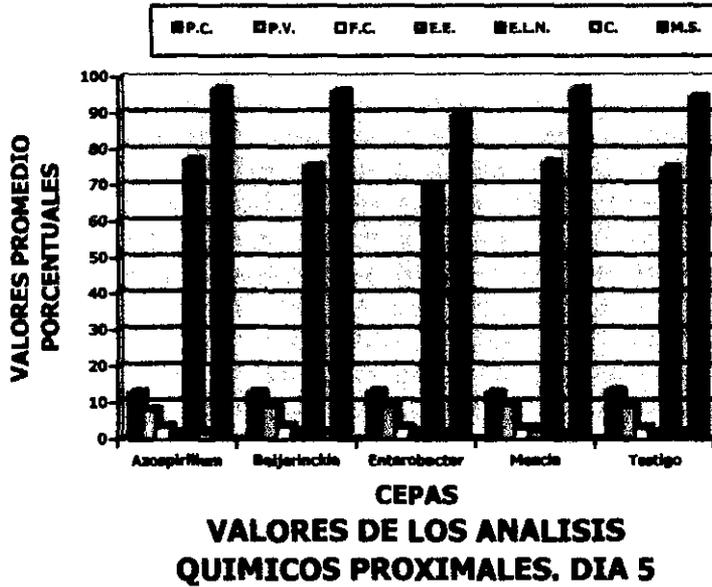
GRAFICA 4

CEPA	DIA 1	DIA 5	DIA 10	DIA 15
<u>Azospirillum</u>	256.58	284.81	569.2	659.42
<u>Beijerinckia</u>	256.11	281.52	550.07	631.66
<u>Enterobacter</u>	247.26	302.27	538.62	605.99
Mezcla	263.46	299.23	497.95	593.89
Testigo	258.11	302.54	545.28	611.91

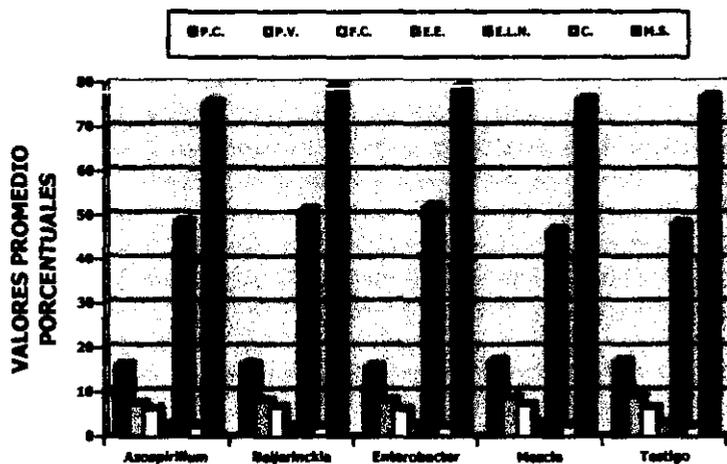


GRAFICA 5

1	43.00
2	27.48
3	26.86
4	76.32
5	32.14
6	46.44
7	68.86
8	61.76



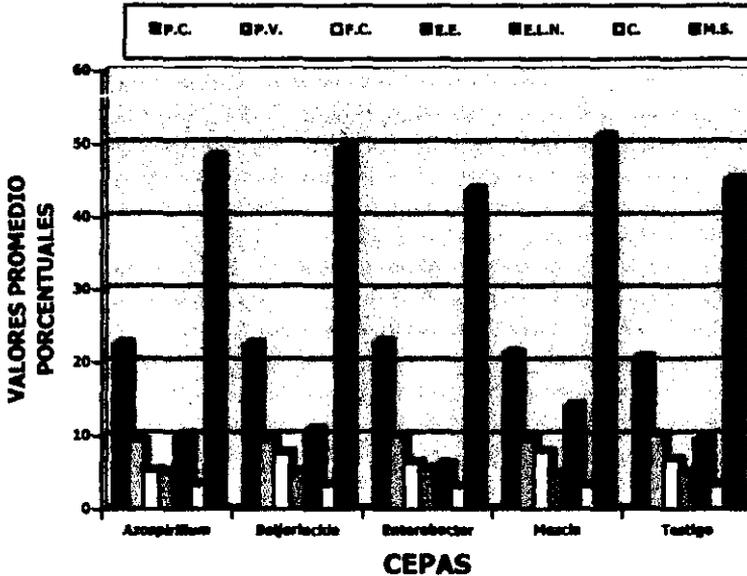
CEPA	P.C.	P.V.	F.C.	E.E.	E.L.N.	C.	M.S.
<u>Azospirillum</u>	12.87	8.09	3.40	1.61	77.14	1.78	96.53
<u>Beijerinckia</u>	12.84	9.08	3.58	2.28	75.31	1.63	95.91
<u>Enterobacter</u>	13.01	9.24	3.12	1.93	69.96	1.34	89.37
Mezcla	12.76	9.54	2.90	2.92	76.35	1.54	96.42
Testigo	13.10	9.13	3.10	1.68	74.85	1.56	94.32



CEPAS
VALORES DE LOS ANALISIS
QUIMICOS PROXIMALES. DIA 10

GRAFICA 7

CEPA	P.C.	P.V.	F.C.	E.E.	E.L.N.	C.	M.S.
<u>Asospirillum</u>	16.19	7.43	6.04	2.48	48.76	2.36	75.64
<u>Beijerinckia</u>	16.28	8.03	6.47	2.22	51.28	2.15	79.12
<u>Enterobacter</u>	15.85	8.10	6.02	2.75	52.15	2.16	78.96
Mezcla	17.06	8.65	6.95	2.98	46.71	2.53	76.25
Testigo	16.99	8.88	6.37	3.03	48.25	2.29	76.86



**VALORES DE LOS ANALISIS
QUIMICOS PROXIMALES. DIA 15**

GRAFICA 8

CEPA	P.C.	P.V.	F.C.	E.E.	E.L.N.	C.	M.S.
<u>Asospirillum</u>	22.60	9.38	5.19	5.15	10.07	3.34	48.33
<u>Beijerinckia</u>	22.62	9.49	7.59	5.05	10.88	3.25	49.41
<u>Enterobacter</u>	22.90	9.92	6.28	5.36	6.16	3.10	43.82
Mezcla	21.35	9.38	7.79	4.72	14.09	3.17	51.15
Testigo	20.66	10.1	6.69	5.00	9.61	3.25	45.25

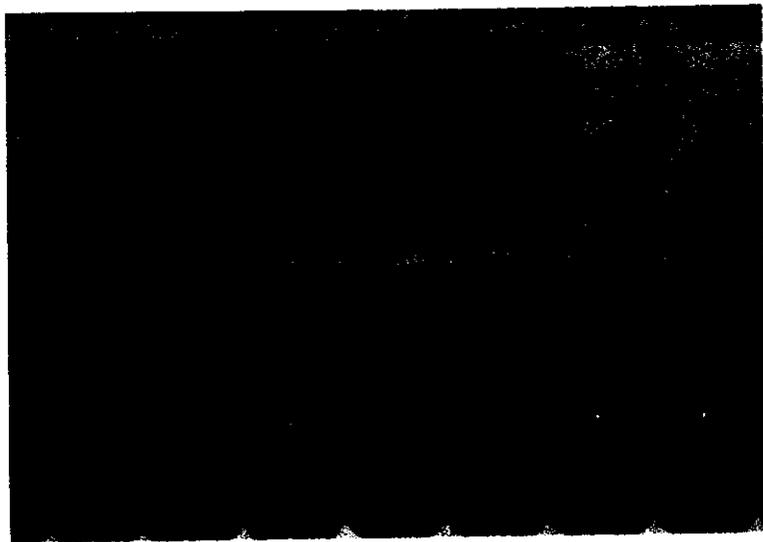


FOTO 1. PRUEBA DE LA NITRIGENASA EN EL FORRAJE
HIDROPONICO DE TRIGO INOCULADO CON BACTERIAS
FIJADORAS DE NITROGENO.



FOTO 2. DETERMINACION DE LA CARGA BACTERIANA
DEL SISTEMA RADICULAR DEL FORRAJE HIDROPONICO
DE TRIGO.

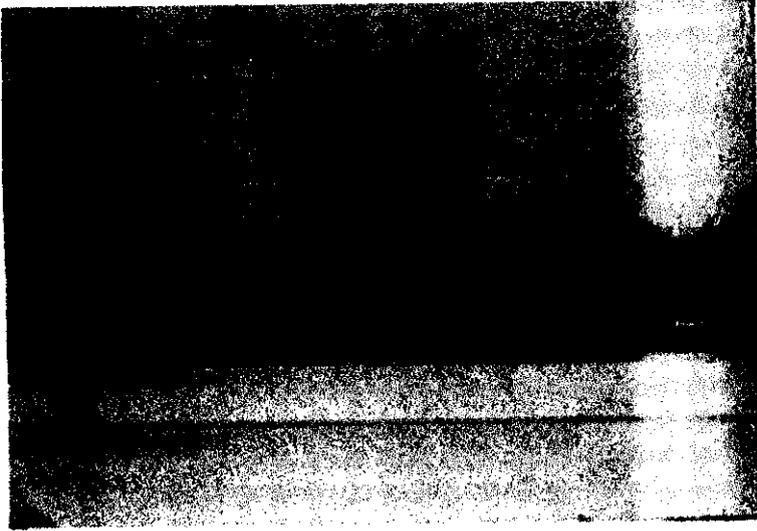


FOTO 3. PRODUCCION EN CHAROLAS DE FORRAJE
HIDROPONICO DE TRIGO INOCULADO CON BACTERIAS
FIJADORAS DE NITROGENO. DIA 15.

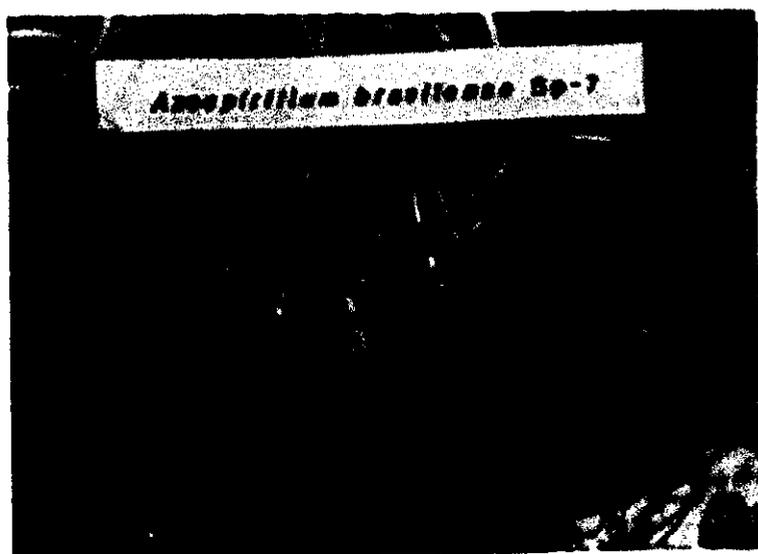


FOTO 4. SISTEMA RADICULAR DEL FORRAJE
HIDROPONICO DE TRIGO INOCULADO CON
Azospirillum brasilense SP-7. DIA 10.



FOTO 5. SISTEMA RADICULAR DEL FORRAJE
HIDROPONICO DE TRIGO INOCULADO CON
Beijerinckia indica. S5-BE. DIA 10.



FOTO 6. SISTEMA RADICULAR DEL FORRAJE
HIDROPONICO DE TRIGO INOCULADO CON
Enterobacter agglomerans. S4-AT. DIA 10.

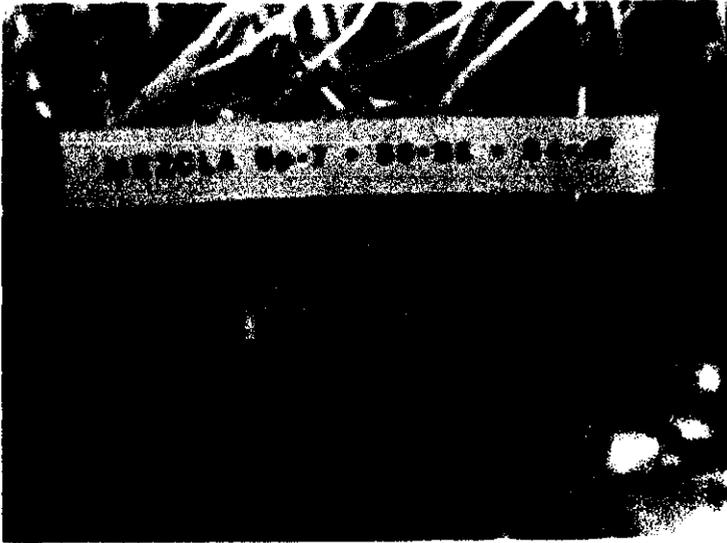


FOTO 7. SISTEMA RADICULAR DEL FORRAJE
HIDROPONICO DE TRIGO INOCULADO CON
Azospirillum brasilense SP-7,
Beijerinckia indica S5-BE y
Enterobacter agglomerans S4-AT. DIA 10.

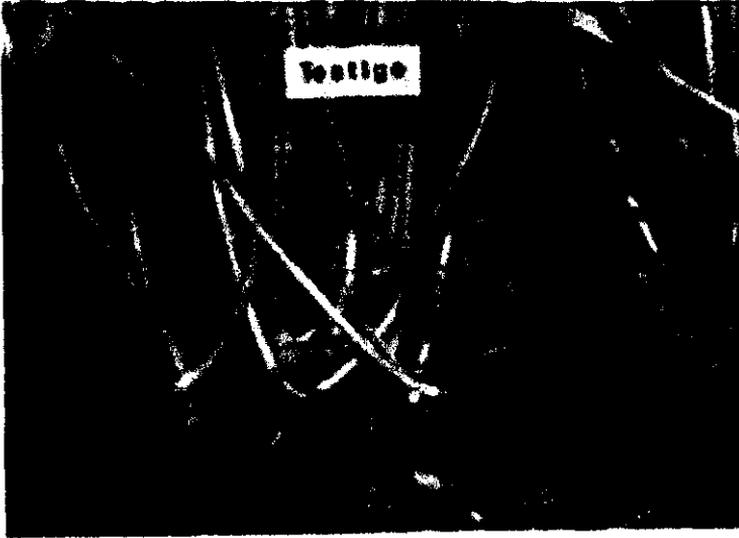


FOTO 8. SISTEMA RADICULAR DEL FORRAJE
HIDROPONICO DE TRIGO NO INOCULADO. DIA 10.



FOTO 9. CHAROLA CONTENIENDO EL EXUDADO DEL
FORRAJE HIDROPONICO DE TRIGO INOCULADO CON
BACTERIAS FIJADORAS DE NITROGENO. DIA 15.