

**UNIVERSIDAD PRIVADA DE TACNA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL**



TESIS

**“ELABORACIÓN DE UN BIOINOCULANTE CON CAPACIDAD
FERTILIZANTE A BASE DE *Beijerinckia mobilis*
EN TÉ DE ALPERUJO.”**

**PARA OPTAR:
TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AMBIENTAL**

PRESENTADO POR:

**Bach. CHRISTIAN MANUEL CANDELA BACA
Bach. ARIANA VANESSA VILLA ESPINOZA**

**TACNA – PERÚ
2023**

**UNIVERSIDAD PRIVADA DE TACNA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL**

TESIS:

**“ELABORACIÓN DE UN BIOINOCULANTE CON CAPACIDAD
FERTILIZANTE A BASE DE *Beijerinckia mobilis* EN TÉ DE
ALPERUJO”**

Tesis sustentada y aprobada el 07 de julio de 2023; estando el jurado calificador integrado por:

PRESIDENTA: Mtra. MILAGROS HERRERA REJAS

SECRETARIO: Mtro. JUNIOR SOVIET MIRANDA GUTIÉRREZ

VOCAL: Dr. RICHARD SABINO LAZO RAMOS

ASESOR: MSc. CLAUDIA VANESSA CLAVIJO KOC

DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD

Yo, Christian Manuel Candela Baca, en calidad de: Bachiller de la Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Privada de Tacna, identificado con DNI 70298233

Yo, Ariana Vanessa Villa Espinoza, en calidad de: Bachiller de la Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Privada de Tacna, identificado con DNI 77393820

Declaramos bajo juramento que:

1. Somos autores de la tesis titulada: “*Elaboración de un bioinoculante con capacidad fertilizante a base de *Beijerinckia mobilis* en té de alperujo*” la misma que presentamos para optar: el *Título Profesional de Ingeniero Ambiental*
2. La tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente, para la cual se han respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas.
3. La tesis presentada no atenta contra derechos de terceros.
4. La tesis no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
5. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falsificados, ni duplicados, ni copiados.

Por lo expuesto, mediante la presente asumimos frente a *la universidad* cualquier responsabilidad que pudiera derivarse por la autoría, originalidad y veracidad del contenido de la tesis, así como por los derechos sobre la obra.

En consecuencia, nos hacemos responsables frente a *la universidad* y a terceros, de cualquier daño que pudiera ocasionar, por el incumplimiento de lo declarado o que pudiera encontrar como causa del trabajo presentado, asumiendo todas las cargas pecuniarias que pudieran derivarse de ello en favor de terceros con motivo de acciones, reclamaciones o conflictos derivados del incumplimiento de lo declarado o las que encontrasen causa en el contenido de la tesis.

De identificarse fraude, piratería, plagio, falsificación o que el trabajo de investigación haya sido publicado anteriormente; asumimos las consecuencias y

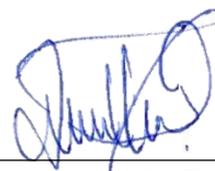
sanciones que de nuestra acción se deriven, sometiéndonos a la normatividad vigente de la Universidad Privada de Tacna.

Tacna, 07 de julio de 2023



Christian Manuel Candela Baca

70298233



Ariana Vanessa Villa Espinoza

77393820

DEDICATORIA

A mi mamá Isabel,

Que siempre desde muy niña me alentó a ser profesional y sé que desde el cielo se encuentra muy feliz por mí.

Ariana Vanessa Villa Espinoza

A mi Abuelo Manuel,

Quien me educó desde muy pequeño a ganarme cada merito con esfuerzo y al día de hoy estaría orgulloso de cada logro que estoy obteniendo en la vida.

Christian Manuel Candela Baca

AGRADECIMIENTO

Agradezco principalmente a Dios, también a mis hermanos y a mis mascotas en especial a Harry que junto a mis hermanos han sido mis pilares para seguir adelante.

También a mi madre Mariella, mis tíos Patricia y Andrés y a mi padre Víctor por apoyarme a culminar mi carrera. Agradezco a mi familia por su aliento y apoyo durante este proceso. También agradezco especialmente a nuestra asesora la MSc. Claudia Clavijo, por todas sus valiosas enseñanzas las cuales van a ser fundamentales en mi vida profesional. Por último, a mi compañero de tesis Christian que sin nuestro trabajo en equipo esto no hubiera sido posible.

Ariana Vanessa Villa Espinoza

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradecer a Dios por darme la oportunidad de realizar este proyecto de investigación, a mi madre Hilda, mi tía Isabel, mi abuela Balbina, mi hermano Bill, a mis mascotas Gary y Lion y familia quienes me dieron su apoyo incondicional. A su vez agradecer a la MSc. Claudia Clavijo por su apoyo fundamental y ética científica para la elaboración de la presente tesis y en especial a mi compañera de tesis Ariana que sin ella nuestro trabajo en equipo esto no sería posible.

Christian Manuel Candela Baca

ÍNDICE GENERAL

PÁGINA DE JURADOS	II
DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD	III
DEDICATORIA.....	V
AGRADECIMIENTO	VI
ÍNDICE DE TABLAS	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ÍNDICE DE ANEXOS	XV
RESUMEN	XVI
ABSTRACT	XVII
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN	2
1.1.Descripción del Problema	2
1.2.Formulación del Problema	2
1.2.1.Problema General	2
1.2.2.Problemas Específicos.....	3
1.3.Justificación e Importancia.....	3
1.4.Objetivos	4
1.5.Hipótesis	4
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	6
2.1.Antecedentes del estudio.....	6
2.2.Bases teóricas.....	8
2.1.1.Bioinoculantes: una alternativa	8
2.1.2.Fijación de nitrógeno.....	9
2.1.3.Beijerinckia: rizobacteria promotora del crecimiento vegetal	11
2.1.4.Cultivo: (solanum lycopersicum)	15

2.1.5. Alperujo: residuo contaminante.....	18
2.1.6. Identificación molecular del gen 16s ribosomal	20
2.1.7. Detección de genes en pcr, tiempo real.....	21
2.3. Definición de términos.....	22
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO	26
3.1. Diseño de la investigación	26
3.2. Acciones y actividades.....	26
3.2.1. Etapa i: aislamiento y purificación de la bacteria	26
3.2.2. Etapa ii: identificación genética y molecular	26
3.2.3. Etapa iii: producción del té de alperujo	29
3.2.4. Etapa iv: determinación de la curva de crecimiento celular en medio líquido de <i>beijerinckia mobilis</i>	29
3.2.5. Etapa v: elaboración del bioinoculante	30
3.2.6. Etapa vi: evaluación fenológica.....	33
3.3. Materiales e instrumentos	34
3.3.1. Materiales.....	34
3.3.2. Instrumentos	35
3.4. Población y/o muestra de estudio	35
3.5. Operacionalización de variables	35
3.6. Procesamiento y análisis de datos.....	36
CAPÍTULO IV. RESULTADOS	37
4.1. Aislamiento e identificación genética de cepas de <i>beijerinckia mobilis</i>	37
4.2. Determinación de los parámetros óptimos fisicoquímicos y nutricionales para crecimiento de <i>beijerinckia mobilis</i> en té de alperujo.....	41
4.3. Evaluación del bioinoculante a base de <i>beijerinckia mobilis</i> en té de alperujo germinación y las características fenológicas de plantas de tomate.	47
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN.....	52
CONCLUSIONES	59
RECOMENDACIONES.....	60

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
ANEXOS	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Cálculo de Cevadores	40
Tabla 2.	Configuración del termociclador en tiempo real para la amplificación de genes nif	41
Tabla 3.	Tratamientos de producción de biomasa	44
Tabla 4.	Tratamientos para el cultivo de tomate	45
Tabla 5.	Variables de la investigación	48
Tabla 6.	Características morfológicas de las colonias aisladas	50
Tabla 7.	Resultados de CT (ciclo de umbral) por muestra	53
Tabla 8.	Resultados de la identificación molecular	53
Tabla 9.	Resultados de los cálculos de parámetros que definen el crecimiento de la bacteria	55
Tabla 10.	Producción de biomasa según medio	56
Tabla 11.	Análisis de varianza para la producción de biomasa	56
Tabla 12.	Optimización de respuesta	58
Tabla 13.	Resultados estimados para la producción de biomasa	58
Tabla 14.	Germinación total por tratamiento	60
Tabla 15.	Matriz de consistencia de la Elaboración de un bioinoculante con capacidad fertilizante a base de <i>Beijerinckia mobilis</i> en té de alperujo.....	84
Tabla 16.	Crecimiento celular en caldo Ashby	85
Tabla 17.	Crecimiento celular en té de alperujo	86
Tabla 18.	Resultados de la producción de biomasa del tratamiento T1.....	89
Tabla 19.	Resultados de la producción de biomasa del tratamiento T2.....	89
Tabla 20.	Resultados de la producción de biomasa del tratamiento T3.....	89
Tabla 21.	Resultados de la producción de biomasa del tratamiento T4.....	89
Tabla 22.	Resultados de la producción de biomasa del tratamiento T5.....	90
Tabla 23.	Resultados de la producción de biomasa del tratamiento T6.....	90
Tabla 24.	Resultados de la producción de biomasa del tratamiento T7.....	90
Tabla 25.	Resultados de la producción de biomasa del tratamiento T8.....	91

Tabla 26.	Resultados de la producción de biomasa del tratamiento T9.....	91
Tabla 27.	Resultados de la producción de biomasa del tratamiento T10.....	91
Tabla 28.	Resultados de la producción de biomasa del tratamiento T11.....	91
Tabla 29.	Resultados de la producción de biomasa del tratamiento T12.....	92
Tabla 30.	Resultados de la producción de biomasa del tratamiento T13.....	92
Tabla 31.	Resultados de la producción de biomasa del tratamiento T14.....	92
Tabla 32.	Resultados de la producción de biomasa del tratamiento T15.....	92
Tabla 33.	Resultados de la producción de biomasa del tratamiento T16.....	93
Tabla 34.	Resultados de la producción de biomasa del tratamiento T17.....	93
Tabla 35.	Resultados de la producción de biomasa del tratamiento T18.....	93
Tabla 36.	Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B1	94
Tabla 37.	Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B2.....	94
Tabla 38.	Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B3.....	95
Tabla 39.	Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B4.....	95
Tabla 40.	Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B5.....	96
Tabla 41.	Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B6.....	96
Tabla 42.	Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B7.....	97
Tabla 43.	Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B8.....	97
Tabla 44.	Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B9.....	98
Tabla 45.	Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B10....	98
Tabla 46.	Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B11...	99
Tabla 47.	Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B12...	99
Tabla 48.	Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B13.	100
Tabla 49.	Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B14.	100
Tabla 50.	Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B15.	101
Tabla 51.	Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B16.	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Células de <i>Beijerinckia indica</i> suspendidas en tinta china y se mostró la formación de polisacáridos alrededor de las células	27
Figura 2. Árbol filogenético de ARNr 16S de la <i>Beijerinckia mobilis</i>	28
Figura 3. Reporte de Resultados en QuantStudio 5	41
Figura 4. Cuadrícula de la Cámara de Neubauer	43
Figura 5. Visión microscópica de la colonia A1	50
Figura 6. Visión microscópica de la colonia A2	51
Figura 7. Visión microscópica de la colonia A3	51
Figura 8. Visión microscópica de la colonia A4	52
Figura 9. Visión microscópica de la colonia A5	52
Figura 10. Árbol filogenético de la muestra enviada a identificar molecularmente	54
Figura 11. Curva del crecimiento de la <i>Beijerinckia mobilis</i> en caldo Ashby	54
Figura 12. Curva del crecimiento de la <i>Beijerinckia mobilis</i> en té de alperujo	55
Figura 13. Diagrama de Pareto de la producción de biomasa	57
Figura 14. Interacción de producción de biomasa	59
Figura 15. Resultados de las Pruebas de Múltiple Rangos para la Germinación por concentración de <i>Beijerinckia mobilis</i>	61
Figura 16. Resultados de las Pruebas de Múltiple Rangos para el tamaño total de la planta por concentración de <i>Beijerinckia mobilis</i>	61
Figura 17. Resultados de las Pruebas de Múltiple Rangos para el tamaño de la raíz por concentración de <i>Beijerinckia mobilis</i>	62
Figura 18. Resultados de las Pruebas de Múltiple Rangos para el número de hojas por concentración de <i>Beijerinckia mobilis</i>	62
Figura 19. Resultados de las Pruebas de Múltiple Rangos para el tamaño de hoja por concentración de <i>Beijerinckia mobilis</i>	63
Figura 20. Resultados de las Pruebas de Múltiple Rangos para el tamaño de la planta por concentración de <i>Beijerinckia mobilis</i>	63
Figura 21. Resultados de las Pruebas de Múltiple Rangos para el peso total por concentración de <i>Beijerinckia mobilis</i>	64

Figura 22. Producción de biomasa (cel/mL) de <i>Beijerinckia mobilis</i> en el caldo Ashby.....	86
Figura 23. Producción de biomasa (cel/mL) de <i>Beijerinckia mobilis</i> en el té de alperujo.....	87

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Matriz de consistencia	84
Anexo 2.	Monitoreo de la curva de crecimiento de la <i>Beijerinckia mobilis</i>	85
Anexo 3.	Resultados de la producción de biomasa.....	89
Anexo 4.	Resultados de las evaluaciones fenológicas a las plántulas por tratamiento.....	94
Anexo 5.	Preparación del agar Ashby	102
Anexo 6.	Aislamiento de la bacteria desde el alperujo	105
Anexo 7.	Tinción Gram a las cepas purificadas	107
Anexo 8.	Identificación genética	111
Anexo 9.	Identificación molecular	113
Anexo 10.	Producción del té de alperujo	115
Anexo 11.	Inoculación de <i>Beijerinckia mobilis</i> den Caldo Ashby y Té de alperujo para la curva de crecimiento	117
Anexo 12.	Incubación de cada medio seguido por el conteo en la cámara de Neubauer con sus respectivas diluciones	118
Anexo 13.	Elaboración del bioinoculante – Producción de biomasa en placa .	120
Anexo 14.	Fermentación de matraces en diferentes concentraciones	122
Anexo 15.	Bacterización de semillas	123
Anexo 16.	Evaluación de germinación total por tratamiento	124
Anexo 17.	Evaluación de plántulas.....	126
Anexo 18.	Resultados de las cepas aisladas y purificadas	128
Anexo 19.	Evidencia fotográfica de la evaluación fenológica	129

RESUMEN

Se llevó a cabo un estudio en el cual se elaboró un bioinoculante a partir de la biomasa producida por *Beijerinckia mobilis* en *té de alperujo* (dilución de alperujo al 40 %). Este bioinoculante se evaluó en plántulas de tomate. En primer lugar, se realizó el aislamiento de la bacteria obtenida del alperujo utilizando dos medios de cultivo diferentes: Agar Ashby y medio ATCC 13 (American Type Culture Collection). Una vez purificada la cepa, se llevó a cabo su identificación genética y molecular. Posteriormente, se realizó una curva de crecimiento durante 48 horas, monitoreando la cantidad de células en crecimiento por hora. Con base en los resultados obtenidos, se aplicaron 18 tratamientos para aumentar la biomasa, considerando diferentes temperaturas (29 °C – 45 °C), niveles de agitación (100 rpm – 200 rpm – 300 rpm) y concentraciones de *té de alperujo* (50 % - 75 % - 100 %). Los resultados demostraron que el tratamiento T18 (29 °C, 300 rpm y 50 % de concentración) generó la mayor cantidad de biomasa. Continuando con el estudio, se evaluó el bioinoculante en un cultivo de tomate utilizando el software Statgraphics V19.3.03. Se empleó un diseño unifactorial categórico, lo que resultó en 16 tratamientos y se realizaron 15 repeticiones. En total, se obtuvieron 256 almácigos con tres semillas cada uno, sumando un total de 798 semillas para analizar. En los tratamientos se consideró la concentración celular de *Beijerinckia mobilis* por gramo de semilla (0 cel/g – 10⁵ cel/g – 10⁷ cel/g – 10⁹ cel/g), la frecuencia de aplicación del BIOL (0, una vez, cada 5 días, cada 7 días) y la profundidad de siembra en 4 niveles. Las variables evaluadas fueron las características fenológicas, como la germinación por semillero, el tamaño total de la planta, el tamaño de la raíz, el número y tamaño de las hojas, y el peso total. Los resultados obtenidos indicaron que la concentración celular de *Beijerinckia mobilis* de 10⁷ cel/gr de semilla del bioinoculante fue la más efectiva, ya que tuvo incidencia en el tamaño de la raíz del cultivo, lo cual favorece la absorción de nutrientes.

Palabras clave: Alperujo; *Beijerinckia mobilis*; bioinoculante; biomasa.

ABSTRACT

A study was carried out in which a bioinoculant was prepared from the biomass produced by *Beijerinckia mobilis* in *alperujo tea* (40 % alperujo dilution). This bioinoculant was evaluated in tomato seedlings. First, the bacteria obtained from the alperujo was isolated using two different culture media: Ashby agar and ATCC 13 medium (American Type Culture Collection). Once the strain was purified, its genetic and molecular identification was carried out. Subsequently, a growth curve was performed for 48 hours, monitoring the number of growing cells per hour. Based on the results obtained, 18 treatments were applied to increase biomass, considering different temperatures (29 °C – 45 °C), agitation levels (100 rpm - 200 rpm - 300 rpm) and alperujo tea concentrations (50 % - 75 % - 100 %). The results showed that the T18 treatment (29°C, 300 rpm and 50 % concentration) generated the highest amount of biomass. Continuing with the study, the bioinoculant was evaluated in a tomato crop using the Statgraphics V19.3.03 software. A categorical unifactorial design was used, which resulted in 16 treatments and 15 repetitions. In total, 256 seedlings with three seeds each were obtained, adding a total of 798 seeds to analyze. In the treatments, the cellular concentration of *Beijerinckia mobilis* per gram of seed (0 cells/g - 10^5 cells/g - 10^7 cells/g - 10^9 cells/g), the frequency of BIOL application (0, once, every 5 days, every 7 days) and the sowing depth in 4 levels. The variables evaluated were the phenological characteristics, such as germination per seedbed, the total size of the plant, the size of the root, the number and size of the leaves, and the total weight. The results obtained indicated that the *Beijerinckia mobilis* cell concentration of 10^7 cells/g of bioinoculant seed was the most effective, since it had an impact on the size of the root of the crop, which favors the absorption of nutrients.

Keywords: Alperujo; *Beijerinckia mobilis*; bioinoculant; biomass.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el uso indiscriminado de fertilizantes químicos en los cultivos puede causar contaminación del agua y un manejo inadecuado de los suelos, lo que provoca un desequilibrio exhaustivo de los elementos químicos en el medio ambiente, como el nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio. Estos fertilizantes químicos reemplazan algunos de los elementos químicos del medio ambiente que son removidos del suelo por las plantas durante su proceso de desarrollo. Uno de los fertilizantes químicos más conocidos es el amoníaco, el cual debe mantenerse dentro de los parámetros adecuados.

Por otro lado, los bioinoculantes son productos biotecnológicos que contienen microorganismos vivos o latentes que aumentan la productividad y la sanidad de los cultivos. Estos microorganismos proporcionan nitrógeno, solubilizan fosfatos insolubles y suministran fitohormonas. Entre los microorganismos importantes en este proceso natural de fijación de nitrógeno se encuentran las bacterias del género *Beijerinckia*, las cuales tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y podrían ser utilizadas como bioinoculantes. Esto mejora la calidad de los suelos de cultivo y regenera gradualmente la disponibilidad de nitrógeno orgánico.

En la agroindustria productora de aceite de oliva, se genera un residuo llamado alperujo, el cual contiene una alta concentración de materia orgánica, compuestos fenólicos, ácidos grasos y otros contaminantes. Si no se trata adecuadamente, este residuo puede tener impactos ambientales negativos, como la contaminación del suelo y de las aguas superficiales y subterráneas. Por lo tanto, es esencial que las empresas y las autoridades correspondientes implementen medidas adecuadas para minimizar la contaminación asociada con el alperujo de aceite de oliva y fomentar prácticas sostenibles en la agroindustria del aceite de oliva.

En esta tesis, se investigó la presencia de bacterias nativas del género *Beijerinckia mobilis*, aisladas a partir del residuo de alperujo generado por la producción de aceite de oliva, que presentan capacidades promotoras de crecimiento. Luego, se aumentó su producción de biomasa y se inoculó en un té de alperujo para evaluar su capacidad fertilizante en un cultivo de tomate de la variedad Río Grande a nivel de plántula.

CAPÍTULO I: EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Descripción del problema

Las empresas agroindustriales productoras de aceite de oliva, en su mayoría, no cuentan con un manejo adecuado de los residuos, lo cual puede originar problemas de contaminación de aguas, poniendo en peligro la vida acuática y causando olores desagradables. Además, estos residuos pueden contaminar los suelos, alterando su textura e influyendo en la microbiota. Actualmente, estos residuos se utilizan como combustible en plantas industriales debido a su alto contenido de aceite. Sin embargo, esto genera contaminación ambiental debido a la emisión de dióxido de carbono a la atmósfera. También se utilizan en menor medida como abono directo, sin tener en cuenta las consecuencias mencionadas anteriormente. Estos métodos no son favorables para la preservación del medio ambiente.

El exceso de fertilizantes químicos en los suelos está causando diversos problemas ambientales, como la percolación de nitrógeno en el agua y la producción de gases de efecto invernadero. El uso de fertilizantes biológicos, conocidos como bioinoculantes, es una alternativa para mejorar la calidad del suelo. Sin embargo, la producción a gran escala de estos productos no es muy rentable en comparación con los fertilizantes químicos. Por esta razón, se están buscando alternativas de producción rentables y amigables con el medio ambiente. En este contexto, se propone el aislamiento de microorganismos con capacidad fijadora de nitrógeno que puedan desarrollarse en un medio económico como el alperujo.

Entre los microorganismos fijadores de nitrógeno se encuentra *Beijerinckia mobilis*, el cual es capaz de mejorar la capacidad nutritiva de las plantas y producir fitohormonas que favorecen el desarrollo de las raíces. El tomate es una planta muy común en nuestra alimentación y puede beneficiarse de microorganismos fijadores de nitrógeno no simbiotes, como *Beijerinckia mobilis*.

1.2. Formulación del problema

2.1.1. Problema general

¿Se podrá elaborar un bioinoculante con capacidad fertilizante a base de *Beijerinckia Mobilis* en té de alperujo?

2.1.2. Problemas específicos

- a. ¿Es posible aislar e identificar genéticamente cepas nativas de *Beijerinckia mobilis* con capacidad de desarrollarse en té de alperujo?
- b. ¿Cuáles son los parámetros óptimos fisicoquímicos y nutricionales en la producción del bioinoculante?
- c. ¿Cuál es el efecto de la concentración del bioinoculante a base de *Beijerinckia mobilis* en té de alperujo en el desarrollo de las características fenológicas de las plantas de tomate?

1.3. Justificación e importancia

La región de Tacna cuenta con un total de 35,000 hectáreas dedicadas al cultivo de aceitunas, lo que la convierte en la región con la mayor extensión de terreno destinado a este cultivo en el país. Estas hectáreas representan el 81,4 % de las 43,000 hectáreas existentes a nivel nacional. Es importante destacar que la zona de Yarada es la ubicación específica dentro de Tacna donde se encuentra la mayor área dedicada al cultivo de aceitunas (Agencia Agraria de Noticias, 2023).

Según el informe de Comercio - Reporte Comercio Regional Tacna 2022, el sector de la agroexportación de aceite de oliva experimentó un crecimiento significativo durante el primer semestre del año 2022. En comparación con el récord alcanzado en 2021 de \$77,3 millones, se registró un aumento del 22 % en el primer semestre de 2022. Este incremento se debe principalmente a un aumento del 30 % en la venta de productos derivados del olivo, lo cual se traduce en un aumento del 42 % en la comercialización de aceitunas y aceite de oliva. Cabe destacar que este sector representa la principal actividad agroindustrial en la región.

El propósito de la presente investigación es reutilizar un residuo de la producción del aceite de oliva, denominado alperujo, el cual causa alteraciones en la calidad del suelo y las aguas subterráneas en las zonas de producción de aceite de oliva. La reutilización de este residuo para producir un inoculante microbiano con capacidad de fijar nitrógeno es una manera de mitigar la contaminación causada por empresas agroindustriales, dándole un uso más respetuoso con el medio ambiente.

Tacna es una región agraria, lo que implica la utilización de fertilizantes químicos en los cultivos, especialmente en los suelos áridos costeros como La Yarada Los Palos, lo cual tiene repercusiones en el suelo, agua y aire.

La producción de un bioinoculante a base de un residuo del olivo, como es el alperujo, mejoraría la calidad del suelo con bacterias fijadoras de nitrógeno. La bacteria *Beijerinckia mobilis* es una alternativa para ser utilizada como un fertilizante biológico y puede desarrollarse en un sustrato económico como el té de alperujo.

La reutilización del alperujo como sustrato para la producción de bioinoculantes puede generar nuevas oportunidades de negocio para las empresas productoras de aceite de oliva, al producir insumos fertilizantes biológicos que mejoren la calidad de los suelos agrícolas. Esto tiene un enfoque social al crear empleo y un enfoque económico al generar rentabilidad a través del valor agregado al alperujo. Estas prácticas agrícolas más sostenibles ayudan a reducir el impacto negativo de los fertilizantes químicos en el medio ambiente.

1.4. Objetivos

Objetivo General

Elaborar un bioinoculante con capacidad fertilizante a base de *Beijerinckia Mobilis* en té de alperujo.

Objetivos Específicos

- a. Aislar e identificar genéticamente cepas de *Beijerinckia mobilis*.
- b. Determinar los parámetros óptimos fisicoquímicos y nutricionales para el crecimiento de *Beijerinckia mobilis* en té de alperujo.
- c. Evaluar el efecto de la concentración del bioinoculante a base de *Beijerinckia mobilis* en té de alperujo en la germinación y las características fenológicas de plántulas de tomate.

1.5. Hipótesis

Hipótesis General

Se elabora un bioinoculante con capacidad fertilizante a base de *Beijerinckia Mobilis* en té de alperujo.

Hipótesis Específicas

- a. Se aíslan bacterias de la especie *Beijerinckia mobilis* con capacidad de fijar nitrógeno y se identifican genes nif, los cuales están asociados a la fijación biológica de nitrógeno.
- b. Se logran obtener parámetros óptimos fisicoquímicos y nutricionales para el crecimiento de *Beijerinckia mobilis*, para la obtención de biomasa.

c. *Beijerinckia mobilis* en té de alperujo posee un efecto fertilizante en el crecimiento y desarrollo de la planta del tomate.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del estudio

Cabrera (1995) realizó una caracterización y tratamiento de las aguas residuales industriales (obtención de aceite de oliva) en el cual hace referencia a los residuos generados por esta industria como lo es el alpechín y orujo los cuales contienen materia orgánica, compuestos tóxicos (entre ellos los polifenoles) y sales que pueden ser un gran contaminante en altas concentraciones. La eliminación de estos residuos puede ser difícil y costosa por la presencia de los polifenoles.

Agrafojo et al. (2006) llevaron a cabo un estudio que se centró en la contaminación generada por los residuos de las almazaras durante el proceso de producción de aceite de oliva, incluyendo el alperujo. Se realizó una descripción detallada del entorno físico, con visitas para examinar de cerca el proceso de elaboración del aceite. Posteriormente, se llevaron a cabo entrevistas a expertos universitarios y a la población, abordando aspectos medioambientales y socioeconómicos. Durante la investigación, se recolectaron muestras ambientales que luego fueron analizadas en un laboratorio. Los resultados obtenidos fueron utilizados para desarrollar una serie de prácticas y recomendaciones destinadas a reducir el impacto de estos residuos.

Miranda Gutiérrez (2018) determinó los factores asociados a la contaminación ambiental de suelos provenientes de las plantas fermentadoras de olivo, este estudio se realizó en el distrito de La Yarada Los palos y el distrito de Tacna. La metodología aplicada fue no experimental y el instrumento utilizado fue el análisis documental. Los resultados señalaron que la concentración de polifenoles varía durante las diferentes etapas de fermentación de olivo, siendo la etapa final (aguas residuales) la que tiene un elevado contenido de compuestos fenólicos que pueden causar un impacto negativo en los suelos.

Gomathi et al. (2005) evaluaron bacterias fijadoras de nitrógeno obtenidas de los intestinos y glándula salival de termitas entre ellas la *Beijerinckia spp.*, este estudio reveló la correlación positiva entre esta bacteria y el suelo. Los resultados revelaron un incremento en la oxigenación del suelo, la porosidad y la capacidad de retención de agua, lo que contribuyó a mejorar el crecimiento de las plantas.

En el estudio realizado por Sánchez-Yáñez et al. (2014), se examinó la respuesta del maíz a la inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV), como la especie *Azotobacter sp.* La dosis utilizada en el experimento fue del 50 %. El diseño experimental empleado fue un diseño de bloques al azar, y se observaron resultados favorables tanto en la germinación como en el desarrollo de las plántulas y en la etapa de floración del maíz. Los resultados no mostraron efectos negativos en su crecimiento. Este estudio presentó esta alternativa como una opción para reducir el uso de fertilizantes químicos, como el nitrato de amonio. Se utilizó un cultivo de garbanzo para la inoculación de la RPCV, obteniendo una biomasa de 0,82 g, mientras que sin inoculación se obtuvo 0,71 g. La importancia de este estudio radica en evitar el uso de fertilizantes nitrogenados, los cuales pueden provocar la pérdida de fertilidad del suelo a largo plazo y la contaminación del medio ambiente.

Romero-Perdomo et al. (2017) tuvieron como objetivo evaluar la aplicación de dos RPCV y su capacidad para disminuir las dosis aplicadas de fertilizante nitrogenado en un cultivo de algodón. Se evaluó la germinación de semillas y el crecimiento de la planta. El estudio se llevó a cabo en un invernadero y se comparó con una dosis reducida de urea. Los resultados mostraron que el crecimiento se vio influenciado de forma positiva con la inoculación de la bacteria en comparación con la fertilización química. Este estudio demostró cómo la aplicación de esta bacteria puede ayudar a disminuir el deterioro ambiental relacionado con la contaminación de fertilizantes químicos.

Nunes et al. (2017) tuvieron como objetivo evaluar la alternativa de sustituir el fertilizante soluble por el uso de bacterias *Acidithiobacillus* para producir biofertilizantes de roca, los cuales luego se mezclaron con materia orgánica inoculada con bacterias diazotróficas (*Beijerinckia indica*) para enriquecer el contenido de nitrógeno. El biofertilizante mostró respuestas similares a las del fertilizante químico soluble en la absorción de nutrientes en las diferentes partes de la caña de azúcar y en las muestras de suelo. Los efectos del biofertilizante se vieron potenciados por la interacción de los fertilizantes con la torta de filtración de caña de azúcar. Se concluyó que el biofertilizante enriquecido en nitrógeno por la inoculación con *Beijerinckia indica* puede ser una alternativa viable para reemplazar los fertilizantes solubles en el cultivo de caña de azúcar.

Romero-Perdomo et al. (2019) realizaron una investigación titulada "Rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas y su potencial como bioinoculantes en *Pennisetum clandestinum* (Poaceae)". El objetivo de este estudio fue

promover el crecimiento del pasto utilizando diversas cepas bacterianas obtenidas del suelo. Los investigadores informaron que la cepa *Beijerinckia sp.* (37 L), identificada mediante análisis genético (16S ARNr), fue la más efectiva entre todas las cepas evaluadas. Se observó que esta cepa en particular aumentó significativamente tanto la biomasa como la longitud del tallo de la especie de pasto *P. clandestinum*.

Al-Shwaiman et al. (2022) estudiaron bacterias del suelo que pueden mejorar el estrés ambiental y, a su vez, ser utilizadas como bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Entre estas bacterias se encuentra la *Beijerinckia fluminensis*, la cual mostró tolerancia a la sequía, salinidad, temperatura, metales pesados y fungicidas. Al realizar la bacterización de semillas de trigo con la cepa de *B. fluminensis*, se observó que esta bacteria promovió el crecimiento de las plantas y actuó como un agente biocontrol, además de mejorar las respuestas de defensa en las plántulas de trigo al aumentar la fenilalanina amoniaco liasa, la glucanasa y el polifenol oxidasa, que protegen a las plantas de fitopatógenos. Se concluyó que el uso de este tipo de bacterias contribuye a la seguridad alimentaria mundial.

En el estudio "El efecto de *Beijerinckia fluminensis* G3 y *Rhizobium pusense* G4c sobre la germinación de arroz Var. Ciherang y rojo arroz Var. Barak Cenana" realizado por Sukweenadhi et al. (2022), se concluyó que la efectividad de *Beijerinckia fluminensis* en el arroz Var. Ciherang fue mayor en términos de peso promedio de raíz, longitud de raíz, ancho de raíz, volumen de raíz y área de superficie de raíz en comparación con el control y el tratamiento con *Rhizobium pusense*.

2.2. Bases Teóricas

2.1.3. Bioinoculantes: Una alternativa

“Este término tiene una relación muy estrecha con el concepto de biofertilizantes debido a que son sustancias que contienen microorganismos vivos y se aplican en los cultivos para beneficiarlos” (Barajas, 2017).

La aplicación de bioinoculantes en los cultivos puede mejorar su rendimiento en un rango que va desde un 17 % hasta un 50 %. Además, ofrecen una opción para reducir los costos de producción y minimizar el impacto ambiental, ya que el uso de fertilizantes, pesticidas y otros productos químicos puede tener efectos negativos sobre la población microbiana. Algunos bioinoculantes también pueden ser efectivos para el control de plagas, la descontaminación y/o desintoxicación del suelo, pero en general todos son eficaces para la fijación biológica del nitrógeno, la solubilización de fosfatos y

el aumento del volumen de la raíz o la modificación de su morfología para facilitar el acceso a estos nutrientes. La forma más común de aplicar los bioinoculantes es directamente en la semilla (bacterización de semillas), ya que las bacterias se adhieren al tegumento de la semilla, favoreciendo así la nutrición desde el inicio de su etapa fenológica (García, 2015).

También se consideran bioinoculantes a las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, las cuales deben estar presentes en un medio que incluya tanto la bacteria como los nutrientes esenciales para las plantas. Estas bacterias también son capaces de producir fitohormonas (Maitra et al. 2021).

2.1.4. Fijación de Nitrógeno

La fijación biológica de nitrógeno es de gran importancia para la agricultura y la producción de alimentos, ya que permite que las plantas obtengan nitrógeno directamente del aire. Esto tiene varios beneficios, entre ellos la reducción de la necesidad de utilizar fertilizantes nitrogenados costosos y la preservación de la fertilidad del suelo. Además, este proceso puede incrementar la productividad agrícola y contribuir a mejorar la seguridad alimentaria a nivel global (Eugenia Baca et al. 2000).

Las bacterias diazotróficas:

Las bacterias fijadoras de nitrógeno son un grupo de microorganismos que poseen la capacidad de transformar el nitrógeno atmosférico en una forma utilizable por otros seres vivos. Estas bacterias establecen una relación simbiótica con ciertas plantas, como las leguminosas, y forman nódulos en las raíces donde se lleva a cabo el proceso de fijación de nitrógeno. Además, algunas bacterias fijadoras de nitrógeno también pueden habitar el suelo de forma independiente, sin estar asociadas a las plantas. Algunos ejemplos de bacterias con esta capacidad son *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Beijerinckia* y *Clostridium pasteurianum* (de Souza et al. 2010).

Los genes nif:

El término "genes nif" se utiliza para referirse a los genes y proteínas que desempeñan un papel fundamental en el proceso de fijación biológica de nitrógeno. Este proceso permite que ciertas bacterias conviertan el nitrógeno atmosférico en una forma utilizable por otros organismos vivos. Los genes nif son aquellos que contienen la información necesaria para codificar las proteínas requeridas en la fijación biológica del nitrógeno (Eugenia Baca et al. 2000).

Gen nif H

El gen nif H (Nitrogenase Iron Protein) codifica la subunidad de hierro de la nitrogenasa, una enzima crucial en el proceso de fijación biológica del nitrógeno. La fijación biológica del nitrógeno es un proceso mediante el cual ciertos microorganismos tienen la capacidad de convertir el nitrógeno atmosférico (N₂) en compuestos nitrogenados utilizables por otros organismos (Raymond et al. 2004).

El gen nif H está presente en diversos grupos de microorganismos, como bacterias y arqueas, que pueden llevar a cabo la fijación biológica del nitrógeno. La enzima nitrogenasa, compuesta por subunidades de hierro (codificadas por el gen nif H) y subunidades de molibdeno (codificadas por el gen nif DK), cataliza la reacción de reducción del nitrógeno atmosférico a amoníaco (NH₃), una forma asimilable por otros organismos (Zehr et al. 1998).

Gen nif A

“El gen nif A codifica la subunidad reguladora de la nitrogenasa, una enzima involucrada en la fijación biológica del nitrógeno” (Huergo & Dixon, 2015).

El gen nif A se encuentra presente en diversas especies de bacterias y arqueas que tienen la capacidad de fijar nitrógeno. La proteína codificada por el gen nif A actúa como un factor de transcripción, regulando la expresión de los genes involucrados en la fijación de nitrógeno. Esta proteína se une al ADN en regiones específicas conocidas como "cajas nif", presentes en los promotores de los genes de la nitrogenasa y otros genes relacionados (Curatti et al. 2007).

La función principal del gen nif A es regular la actividad de la nitrogenasa en respuesta a la disponibilidad de nitrógeno y otros factores ambientales. Cuando los niveles de nitrógeno son bajos, la proteína nif A se activa y se une a las cajas nif, lo que induce la transcripción de los genes de la nitrogenasa y permite la síntesis de la enzima. Por otro lado, cuando hay suficiente nitrógeno disponible, nif A se inactiva y se detiene la producción de la enzima (Wang & Mus, 2016).

Además de su papel en la regulación de la nitrogenasa, se ha descubierto que el gen nif A también puede tener funciones adicionales en la respuesta celular al estrés oxidativo y en la regulación de otros procesos metabólicos (Kaiser & Brutnell, 2003).

2.1.5. *Beijerinckia*: Rizobacteria Promotora del Crecimiento Vegetal

Beijerinckia es un género de bacterias perteneciente a la familia *Beijerinckiaceae*. Estas bacterias son gramnegativas y no forman esporas. Son aeróbicas, requieren oxígeno para llevar a cabo su metabolismo. Una de las características distintivas de las bacterias *Beijerinckia* es su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico. Esto significa que pueden convertir el nitrógeno gaseoso en formas utilizables para otros organismos. Esta capacidad de fijación de nitrógeno es importante en el ciclo del nitrógeno y contribuye a mantener los niveles adecuados de nitrógeno en el suelo y en los ecosistemas (Rodríguez, 2015).

Ramírez & Ugaz (2014) mencionaron que la bacteria *Beijerinckia* se clasifica de la siguiente manera:

Dominio: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: *Alphaproteobacteria*

Orden: Rhizobiales

Familia: *Beijerinckiaceae*

Género: *Beijerinckia*

Es importante tener en cuenta que la clasificación taxonómica puede estar sujeta a cambios a medida que se obtiene nueva información y se realizan estudios más detallados sobre la bacteria (Ramírez & Ugaz, 2014).

El género *Beijerinckia* incluye varias especies: *Beijerinckia indica*, *Beijerinckia mobilis*, *Beijerinckia dextrii*, *Beijerinckia fluminensis*, y *Beijerinckia doebereineriae*; entre las que destacan *Beijerinckia indica* y *Beijerinckia mobilis*. Estas bacterias pueden encontrarse en suelos y raíces de plantas, y han sido aisladas en diferentes regiones del mundo. Además de su capacidad de fijación de nitrógeno, algunas cepas de *Beijerinckia* también tienen la capacidad de degradar compuestos orgánicos, como hidrocarburos y contaminantes ambientales. Esto las convierte en organismos de interés en aplicaciones biotecnológicas y en la biorremediación de suelos y aguas contaminadas (Rodríguez, 2015).

Descripción macroscópica y microscópica

a. Macroscopía

Cuando se observa a simple vista, *Beijerinckia* puede presentar diferentes características macroscópicas. Las colonias pueden ser mucosas, viscosas o en forma de hojas. El color de las colonias puede variar, desde amarillo a naranja a rojo o blanco, dependiendo de la especie y las condiciones de cultivo. Algunas especies también pueden formar pigmentos específicos en las colonias. El tamaño puede ser mediano y su forma es circular (Ramírez & Ugaz, 2014).

b. Microscopía

“En la microscopía, *Beijerinckia* generalmente se observa como bacilos alargados o cocoides. Tienen gránulos de polihidroxybutirato en los extremos. Su motilidad es positiva” (Becking, 1974, 1984b).

Metabolismo

a. Fijación de nitrógeno

Beijerinckia tiene la capacidad de convertir el nitrógeno gaseoso (N₂) en amonio (NH₄⁺), mediante una enzima llamada nitrogenasa. Esta enzima es altamente energética y requiere condiciones especiales de bajo oxígeno para su funcionamiento eficiente. La fijación de nitrógeno proporciona una fuente de nitrógeno disponible para el crecimiento de *Beijerinckia* y otros organismos asociados (Altamirano & Ramos, 2016).

b. Metabolismo del carbono

“*Beijerinckia* es capaz de utilizar una variedad de compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía. Puede oxidar compuestos orgánicos como ácidos grasos, alcoholes y azúcares a través de rutas metabólicas específicas” (Corrales-Lozada et al. 2020).

c. Producción de polihidroxybutirato (PHB)

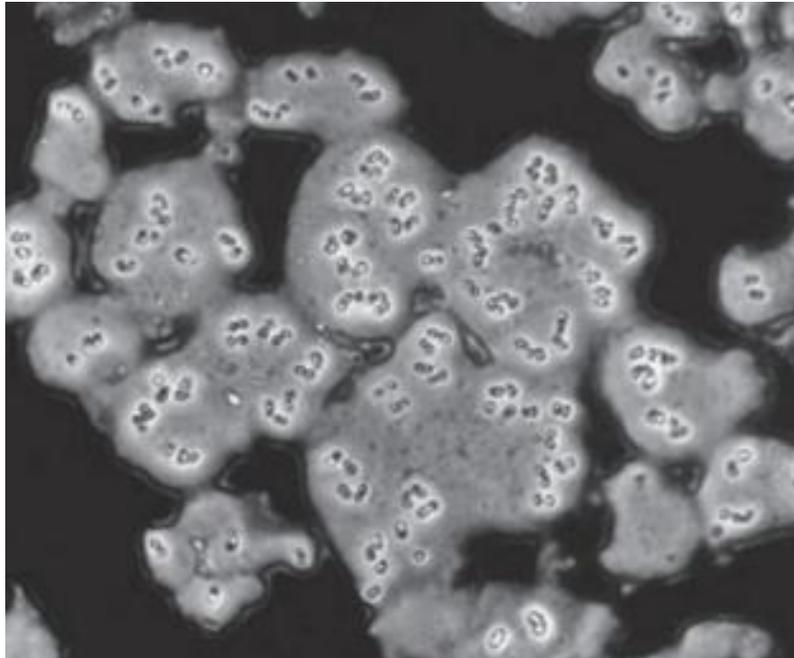
“*Beijerinckia* puede sintetizar y acumular polihidroxybutiratos (PHB), que son polímeros biodegradables y biocompatibles. Estos polímeros pueden ser utilizados en aplicaciones industriales y ambientales, como materiales plásticos biodegradables o como reserva de carbono y energía” (Chen et al. 2019).

Beijerinckia mobilis

Bajo ciertas condiciones de cultivo, algunas cepas de *Beijerinckia* muestran células cocoides sin glóbulos lipoides terminales, que por lo demás consisten en PHB como se observa en la Figura 1. La formación de quistes y cápsulas ocurre en esta especie (Becking, 1974, 1984b).

Figura 1

Células de Beijerinckia mobilis suspendidas en tinta china y se mostró la formación de polisacáridos alrededor de las células

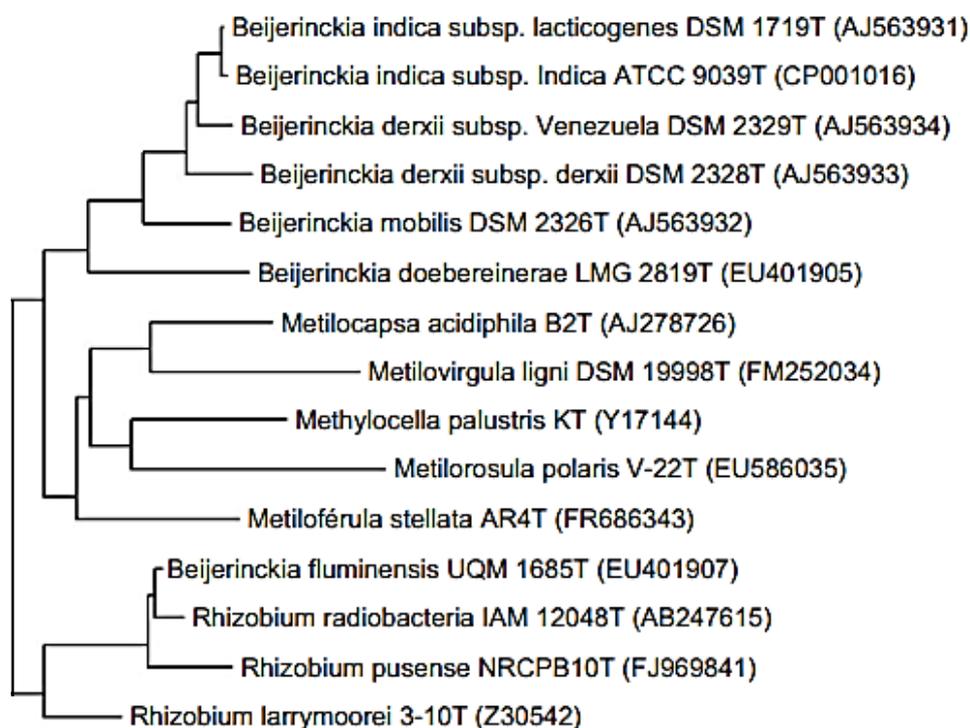


Nota. Preparación viva, microscopía de contraste de fase. Adaptado de Kennedy, C. (2005). *Beijerinckia* Derx 1950a, 145AL. En D. J. Brenner, N. R. Krieg, G. M. Garrity, J. T. Staley, D. R. Boone, P. Vos, M. Goodfellow, F. A. Rainey, & K.-H. Schleifer (Eds.), *Manual of Systematic Bacteriology* (pp. 423-432). Springer-Verlag. https://doi.org/10.1007/0-387-29298-5_104

En medios de agar, especialmente en condiciones de fijación de N₂, las cepas de *Beijerinckia* pueden producir colonias gigantes que contienen grandes cantidades de exopolisacárido. Esta mucosidad suele ser extremadamente dura, tenaz o elástica, lo que dificulta eliminar parte de una colonia con un lazo. En *B. mobilis*, el exopolisacárido tiene una consistencia más granular (Becking, 1984a).

Figura 2

Árbol filogenético de ARNr 16S de la *Beijerinckia mobilis*



Nota: La topología del árbol se estabilizó con el uso de un conjunto representativo de casi 750 secuencias de cepas tipo de alta calidad distribuidas proporcionalmente entre los diferentes filos bacterianos y arqueales. La barra de escala indica la divergencia de secuencia estimada (Yarza et al. 2010).

Beijerinckia mobilis posee todas las enzimas necesarias para la oxidación de metanol a CO₂ a través de formaldehído y formiato junto con la ruta de ribulosa bifsosfato (RuBP) de asimilación de C₁ (metanol y formiato). Por lo tanto, *B. mobilis* es un metilotrofo quimioautotrófico facultativo que, además del crecimiento en compuestos reducidos de C₁, tiene la capacidad de utilizar una amplia gama de sustratos multicarbonados. Estos estudios también demuestran que las cepas de *B. mobilis* contienen grandes cantidades de triterpenoides (Becking, 1961).

B. mobilis se encuentra principalmente en suelos muy ácidos (pH 4,0–4,5) del sudeste asiático tropical, África y América del Sur, y esto está de acuerdo con su capacidad para fijar nitrógeno de manera óptima a pH 3,9. Este alto grado de tolerancia a los ácidos podría ser útil para el enriquecimiento y aislamiento específico de esta especie. El rango de temperatura para crecimiento es de 10 – 35 °C y no crece a 37 °C (Becking, 1961).

2.1.6. Cultivo: (*Solanum lycopersicum*)

El *Solanum lycopersicum*, también conocido coloquialmente como tomate, es una planta originaria de América del Sur y pertenece a la familia de las solanáceas. Es una planta anual que se cultiva en diferentes partes del mundo, adaptándose a los climas más diversos. Por su sabor, valor nutricional y versatilidad culinaria, el tomate es una de las hortalizas más populares y utilizadas a nivel mundial (Razifard et al. 2020).

El tomate es una planta versátil que se adapta a una gran variedad de suelos y climas. Se caracteriza por ser una planta de crecimiento indeterminado, lo que significa que seguirá creciendo y dando frutos durante todo su ciclo de vida. Además de su agradable sabor, los tomates son una valiosa fuente de nutrientes esenciales como la vitamina C, la vitamina A y el potasio. También es conocido por su contenido de antioxidantes, como el licopeno, que se ha relacionado con un menor riesgo de enfermedades cardíacas y cáncer. Los tomates tienen propiedades antiinflamatorias y pueden ayudar a reducir el riesgo de enfermedades crónicas (E Venkadeswaran et al. 2018).

Características taxonómicas y morfológica

Según Behera et al. (2011), el cultivo de tomate se clasifica de la siguiente forma:

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Solanales*

Familia: *Solanaceae*

Género: *Solanum*

Especie: *Solanum lycopersicum*

En cuanto a la estructura física del tomate, se reconoce que se trata de una planta herbácea anual que puede crecer tanto de forma rastrera como trepadora, dependiendo de la variedad y las condiciones de cultivo. Además, se han identificado las partes principales de la planta de tomate:

a. Raíz

“El sistema de raíces del tomate es fibroso y se ramifica ampliamente en el suelo para absorber agua y nutrientes” (Vrebalov, J. et al. 2002).

b. Tallo

El tallo del tomate presenta una forma erguida o trepadora y puede llegar a medir entre 1 y 3 metros de altura. Tiene una estructura cilíndrica, siendo leñosa en la base y herbácea en la parte superior. A lo largo del tallo, se desarrollan hojas compuestas y también brotan en los laterales conocidos como chupones (Szymkowiak & Sussex, 1992).

c. Hojas

Las hojas del tomate son alternas, formadas y de color verde intenso. Cada hoja está conformada por varios folíolos ovalados o lanceolados con bordes dentados. Las hojas contienen estomas en la epidermis, que son responsables del intercambio de gases (Hirschberg. 2001).

d. Clima

El tomate es una planta que prefiere climas cálidos y templados. Se cultiva mejor en regiones con temperaturas diurnas entre 20-30°C y temperaturas nocturnas no inferiores a 15°C. Requiere una exposición al sol de al menos 6-8 horas al día para un crecimiento óptimo (Behera et al., 2011).

e. Tiempo de germinación

El período de germinación de las semillas de *Solanum lycopersicum*, conocido como tomate, puede variar según las condiciones ambientales y la variedad específica. En condiciones óptimas, por lo general, las semillas de tomate germinan entre 5 y 10 días después de la siembra. Sin embargo, la germinación puede ser más lenta en temperaturas frías y más rápida en temperaturas cálidas (Behera et al. 2011).

f. Hábitat

El tomate es nativo de áreas tropicales y subtropicales de América del Sur. Se cultiva en diferentes partes del mundo, adaptándose a una amplia variedad de climas y condiciones. Los tomates son cultivados en huertos, jardines e invernaderos en numerosas regiones (Wahyuni et al. 2011).

Factores agroclimáticos

a. Temperatura

“Temperatura óptima del tomate para crecimiento y desarrollo: entre 20 °C y 30 °C temperaturas extremas que afectan la planta: temperaturas superiores a 35 °C y temperaturas por debajo de los 10 °C” (Wahyuni et al. 2011).

b. Luz solar

“Requerimiento de luz solar directa para el tomate: al menos 6 a 8 horas al día. Influencia de la luz solar en la formación de pigmentos y acumulación de azúcares en los frutos” (Demotes-Mainard et al. 2016).

c. Precipitación

“Rango recomendado de precipitación para el cultivo de tomate: entre 600 y 1000 mm al año. Importancia del drenaje adecuado para evitar encharcamientos y enfermedades fúngicas” (Vallone et al. 2014).

d. Humedad relativa

“Rangos idóneos de humedad relativa: entre 60% y 80% durante el día, alrededor del 90% durante la noche. Efectos de la humedad relativa en el desarrollo de enfermedades fúngicas y estrés hídrico en la planta” (Elad et al. 2016).

e. Viento

“Impacto del viento en el cultivo de tomate: daños mecánicos, caída de flores y frutos inmaduros, y afectación de la polinización. Uso de barreras o cortavientos como medidas de protección” (Orzolek & Miller 2013).

Fertilización

a. Macronutrientes

“El suministro adecuado de nutrientes es esencial para garantizar un crecimiento y desarrollo óptimos del tomate. Los macronutrientes clave, como el nitrógeno, fósforo y potasio, desempeñan un papel fundamental en el rendimiento y la calidad de los frutos” (Taiz & Zeiger, 2014).

- Nitrógeno (N): Es necesario para el crecimiento vegetativo y la producción de hojas. La falta de nitrógeno puede causar un crecimiento lento de la planta y hojas con tonalidad amarillenta.

- Fósforo (P): Contribuye al desarrollo de las raíces, flores y frutos. La falta de fósforo puede afectar la formación y maduración de los frutos.

- Potasio (K): Estimula el desarrollo general de la planta y mejora la calidad de los frutos. La carencia de potasio puede resultar en un crecimiento deficiente de la planta y frutos de menor calidad (Taiz & Zeiger, 2014).

b. Micronutrientes

"Además de los macronutrientes, los micronutrientes también son indispensables para el crecimiento y desarrollo adecuado del tomate, ya que cumplen un papel crucial en las reacciones enzimáticas y los procesos metabólicos" (Marschner, H. 2011).

El hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn), cobre (Cu) y molibdeno (Mo) son ejemplos de micronutrientes esenciales para el crecimiento del tomate. Estos nutrientes desempeñan funciones clave en las reacciones enzimáticas y el metabolismo de la planta (Marschner, H. (2011).

Calidad y valor nutricional

El tomate, conocido científicamente como *Solanum lycopersicum*, es ampliamente reconocido por su abundancia de nutrientes y compuestos bioactivos beneficiosos para la salud. Es una valiosa fuente de vitaminas, minerales y antioxidantes como la vitamina C, el licopeno y el betacaroteno. Estos compuestos se han relacionado con una serie de beneficios para la salud, incluida la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares, ciertos tipos de cáncer y enfermedades degenerativas. Asimismo, la calidad del tomate también engloba aspectos organolépticos como el sabor, el aroma, la textura y el color. Estas características pueden variar según la variedad, el grado de madurez y las condiciones de cultivo. Es importante resaltar que el contenido nutricional y la calidad de los tomates pueden verse afectados por varios factores, como las prácticas agronómicas, el manejo postcosecha y los procesos de transformación (Fraser y Bramley, 2004).

2.1.7. Alperujo: Residuo contaminante

El alperujo es el residuo obtenido mediante la extracción del aceite de oliva por centrifugación, contiene restos de pulpa y hueso de aceituna triturada con una

consistencia viscosa. Está compuesto de abundantes cantidades de celulosa, lípidos, lignina, glúcidos y polifenoles. Estas características pueden llegar a afectar negativamente al suelo y aguas subterráneas debido a que los fenoles son toxinas dañinas, el vertido de este residuo puede ocasionar coloración en cuerpos de agua, fitotoxicidad, malos olores, etc. A lo largo de los años este residuo ha sido transformado y utilizado en un producto beneficioso como combustible y composta, sin embargo, estos métodos no son tan comúnmente aplicados en los países con mayor exportación de este producto. Para la aplicación o uso de este residuo es necesario extraer los remanentes de aceite mediante procesos fisicoquímicos (García-Ortiz, 2016).

Fenoles en el alperujo

El alperujo es considerado un residuo con gran impacto negativo al medio ambiente, debido al alto contenido de polifenoles. Su papel fitotóxico, la alteración a la fertilidad y la afectación a los cuerpos de aguas son algunas de sus principales características. El contenido alto de polifenoles en el alperujo puede representar una acción fitotóxica ante las plantas en su fase de germinación y en su fase de adultez (Aranda et al. 2007).

Los polifenoles en el alperujo causan una alteración edafológica mediante retención hídrica, también puede afectar al suelo mediante modificación de su composición mineral y su valor de pH. El uso del alperujo como abono agrícola puede ser contraproducente debido a la alta carga de polifenoles y de iones K^+ que contiene su composición. La alta concentración de estos polifenoles afecta a los microorganismos rizosféricos (Pedersen et al. 1991).

Los fenoles son compuestos químicos que pueden tener efectos perjudiciales en el medio ambiente. Estos compuestos se utilizan en una variedad de industrias y actividades humanas, incluyendo la producción de plásticos, productos químicos, medicamentos, pesticidas y desinfectantes. Aunque los fenoles pueden ser útiles en diversas aplicaciones, también pueden representar un riesgo para los ecosistemas acuáticos y terrestres (Mourato, et al. 2018).

Cuando los fenoles se liberan al medio ambiente, ya sea a través de vertidos industriales, aguas residuales o derrames accidentales, pueden tener efectos negativos en los organismos vivos y en los ecosistemas. Estos son algunos de los impactos ambientales asociados con los fenoles:

- Toxicidad para los organismos acuáticos: Los fenoles son tóxicos para muchas especies acuáticas, incluyendo peces, invertebrados y algas. Pueden afectar la respiración, el crecimiento, la reproducción y el comportamiento de estos organismos,

lo que puede tener un impacto en toda la cadena alimentaria acuática (Mourato et al. 2018).

- Contaminación del agua: La presencia de fenoles en el agua puede afectar la calidad del agua potable y de los ecosistemas acuáticos. Además, los fenoles pueden persistir en el agua durante largos períodos de tiempo, lo que agrava su impacto ambiental (Santos, et al. 2012).

- Bioacumulación: Algunos fenoles tienen la capacidad de acumularse en los tejidos de los organismos a lo largo de la cadena alimentaria. Esto puede llevar a concentraciones más altas de fenoles en los organismos superiores, lo que aumenta el riesgo de exposición y toxicidad (Xu, et al. 2020).

- Impacto en la microbiota del suelo: Los fenoles también pueden afectar la salud y la diversidad de los microorganismos del suelo, lo que puede tener consecuencias para la descomposición de la materia orgánica, la fertilidad del suelo y otros procesos ecológicos importantes (Xie, et al. 2020).

Los fenoles pueden dañar el medio ambiente debido a su toxicidad para los organismos acuáticos, su capacidad de contaminar el agua, sus efectos en la salud humana, su potencial de bioacumulación y su impacto en la microbiota del suelo. Es importante regular y controlar adecuadamente la liberación de fenoles al medio ambiente para minimizar su impacto negativo en los ecosistemas y la salud humana ambiental (Santos et al. 2012).

2.1.8. Identificación molecular del gen 16s Ribosomal

El gen ribosomal 16S (ARNr 16S) es una región del genoma bacteriano que codifica para la subunidad ribosomal 16S del ribosoma. La identificación molecular del gen 16S se basa en la secuenciación y análisis de esta región, lo que permite distinguir y clasificar a las bacterias en función de sus secuencias de ARNr 16S (Stackebrandt & Ebers, 2006).

El proceso de identificación molecular del gen 16S implica los siguientes pasos:

- Extracción de ADN: Se extrae el ADN bacteriano de la muestra que se quiere analizar. Esto puede realizarse utilizando diversos métodos de extracción de ADN, dependiendo del tipo de muestra y del protocolo específico utilizado.

- Amplificación del gen 16S: Se utiliza la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar la región del gen 16S. Se emplean cebadores específicos diseñados para reconocer secuencias conservadas en la región del gen 16S.

- Secuenciación del gen 16S: Una vez que se ha amplificado la región del gen 16S, se procede a la secuenciación del ADN. Se utilizan métodos de secuenciación de nueva generación, como la secuenciación de Sanger o la secuenciación masiva paralela, para obtener la secuencia completa de la región del gen 16S.

- Análisis bioinformático: Se realiza un análisis bioinformático de la secuencia obtenida para identificar y clasificar la bacteria. Esto implica comparar la secuencia de ARNr 16S con bases de datos públicas, como la base de datos del GenBank, utilizando programas y algoritmos específicos. La comparación permite determinar la similitud entre la secuencia del gen 16S y las secuencias de referencia disponibles, lo que proporciona información sobre la identidad taxonómica de la bacteria.

- Interpretación de resultados: Una vez completado el análisis bioinformático, se interpreta el resultado para identificar y clasificar la bacteria en función de la similitud de secuencia del gen 16S. Esto puede implicar asignar a la bacteria un nombre taxonómico específico, como el género y la especie a la que pertenece.

La identificación molecular del gen 16S se utiliza ampliamente en estudios de taxonomía y filogenia bacteriana, así como en estudios de microbiología ambiental y clínica. Permite obtener información precisa sobre la identidad de las bacterias presentes en una muestra y establecer relaciones evolutivas entre ellas (Rosselló-Móra & Amann, 2015).

2.1.9. Detección de genes en PCR, tiempo real

La detección de genes mediante PCR en tiempo real, también conocida como PCR en tiempo real o qPCR (por sus siglas en inglés, quantitative PCR), es una técnica ampliamente utilizada en la investigación molecular y en aplicaciones clínicas para cuantificar y detectar la presencia de genes específicos.

La PCR en tiempo real se basa en los principios de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional, pero incorpora la monitorización y cuantificación en tiempo real de la amplificación del ADN. Esto permite obtener información precisa y cuantitativa sobre la cantidad de una secuencia de interés presente en una muestra.

El proceso de detección de genes en PCR en tiempo real implica los siguientes pasos:

- Diseño de cebadores y sonda: Se diseñan cebadores específicos que se unen a regiones específicas del gen de interés y una sonda de fluorescencia que se une a la secuencia amplificada durante la PCR. La sonda contiene un fluoróforo y un

quencher, los cuales interactúan para generar una señal fluorescente cuando la sonda se degrada durante la amplificación.

- Preparación de la mezcla de reacción: Se prepara una mezcla de reacción que contiene ADN de la muestra, cebadores y sonda específicos, nucleótidos, una enzima de polimerasa termoestable y un tampón de reacción adecuado. Esta mezcla se distribuye en tubos individuales o en una placa de PCR en tiempo real.

- Amplificación y detección en tiempo real: La PCR en tiempo real se realiza mediante ciclos de calentamiento y enfriamiento. Durante la amplificación, la enzima de polimerasa sintetiza nuevas hebras de ADN a partir de las plantillas presentes en la muestra. A medida que avanza la amplificación, la sonda específica se degrada, liberando el fluoróforo y generando una señal fluorescente detectable. La intensidad de la señal fluorescente se mide en cada ciclo de amplificación y se registra en tiempo real.

- Análisis de datos: Los datos de la PCR en tiempo real se analizan utilizando software específico que permite calcular la cantidad inicial de ADN de la muestra y realizar análisis estadísticos. Se utilizan estándares de calibración o curvas de calibración para cuantificar la cantidad de ADN objetivo en la muestra.

La detección de genes en PCR en tiempo real ofrece numerosas ventajas, como alta sensibilidad, especificidad y rapidez. Se utiliza en una amplia variedad de aplicaciones, como la detección de patógenos, la cuantificación de expresión génica, la genotipificación y el diagnóstico molecular (Bustin et al. 2009).

2.3. Definición de términos

2.3.1. Bacterización de semillas

Es una técnica que consiste en aplicar bacterias beneficiosas a las semillas antes de su siembra, con el objetivo de mejorar la germinación y el crecimiento de las plantas (Gramaglia et al. 2019).

2.3.2. Cebadores en biología molecular

En biología molecular, los cebadores son secuencias cortas de ADN o ARN utilizadas como punto de partida para la amplificación de fragmentos específicos de ADN mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos cebadores se unen de manera complementaria a las secuencias de ADN objetivo y permiten la replicación selectiva de la región de interés (Mullis & Faloona, 1987).

2.3.3. Cultivo Hortícola

El cultivo hortícola se refiere a la práctica de cultivar plantas hortícolas, como frutas, verduras, hierbas y flores, en un entorno controlado, como jardines, invernaderos o huertos, utilizando técnicas y métodos específicos para maximizar el crecimiento, desarrollo y rendimiento de las plantas con fines alimentarios, ornamentales o medicinales (García, A. 2023).

2.3.4. Enfermedad Fúngica

Según López S. (2023), una enfermedad fúngica se define como "una afección causada por la presencia y actividad de hongos patógenos que invaden los tejidos de plantas, animales o seres humanos"

Una enfermedad fúngica es una afección causada por la presencia y actividad de hongos patógenos en plantas, animales o seres humanos. Estos hongos pueden invadir los tejidos del organismo huésped, causando síntomas y daños en su desarrollo normal (López, S. 2023).

2.3.5. Estrés hídrico

Según González (2023), el estrés hídrico se define como "la condición en la cual una planta experimenta una falta de agua disponible en el suelo para satisfacer sus necesidades fisiológicas normales", lo cual puede afectar su crecimiento y desarrollo.

El estrés hídrico se refiere a la condición en la cual una planta experimenta una falta de agua disponible en el suelo para satisfacer sus necesidades fisiológicas normales. Esta falta de agua puede tener efectos negativos en el crecimiento, desarrollo y funcionamiento de la planta (González, 2023).

2.3.6. Fitohormonas

Las fitohormonas, también conocidas como hormonas vegetales, son compuestos químicos producidos de manera natural por las plantas que regulan diversos procesos fisiológicos en su crecimiento y desarrollo. Estas hormonas desempeñan un papel fundamental en la coordinación de diferentes etapas del ciclo de vida de las plantas, como la germinación de semillas, el crecimiento de raíces y tallos, la floración, la fructificación y la senescencia (Salisbury & Ross, 1992).

2.3.7. Fructificación

La fructificación se refiere al proceso en el cual los órganos reproductivos de una planta, como los ovarios, se desarrollan y maduran, dando lugar a la formación y crecimiento de los frutos, que contienen las semillas de la planta (Smith, A. 2023).

2.3.8. Inflorescencia

La inflorescencia se refiere a la disposición y arreglo de las flores en una planta. Es la estructura que agrupa y organiza las flores en un determinado patrón, permitiendo su polinización y reproducción (González, 2023).

2.3.9. Nitrogenasa

Es un complejo enzimático que se encuentra en ciertas bacterias y arqueas, y es responsable de la fijación biológica del nitrógeno atmosférico en amoníaco. Este proceso es importante porque el nitrógeno es un elemento esencial para la vida, pero la mayoría de los organismos no pueden utilizar directamente el nitrógeno gaseoso del aire. La nitrogenasa convierte el nitrógeno gaseoso en una forma que los organismos pueden utilizar para sintetizar proteínas y otros compuestos nitrogenados necesarios para su crecimiento y supervivencia. (Soto Urzúa & Eugenia Baca, 2001)

2.3.10. Polihidroxialcanoatos (PHA)

Son polímeros sintetizados por diversos microorganismos, que presentan propiedades de biodegradabilidad y biocompatibilidad. Estos polímeros comparten muchas características similares a los plásticos derivados de productos petroquímicos (Delgado & Cordoba, 2015).

2.3.11. Polinización

La polinización es el proceso natural en el cual el polen de las estructuras reproductivas masculinas de una planta, llamadas estambres, es transferido a las estructuras reproductivas femeninas, conocidas como pistilos, para que ocurra la fertilización y se produzca la formación de semillas. Este proceso puede ser llevado a cabo por diferentes agentes, como el viento, el agua, insectos, pájaros u otros animales (Smith, J. 2023).

2.3.12. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

Son bacterias capaces de activar el sistema radicular que genera una mejora en el crecimiento y rendimiento de un cultivo. Utilizan mecanismos directos o indirectos para cumplir esta acción (Moren et al. 2018).

2.3.13. Tegumento de la semilla

Es una de las partes de la semilla, también conocida como testa. Su función es proteger la semilla y sus diferentes esculturas favorecen la dispersión (Universidad Nacional de la Plata, 2017).

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

3.1. Diseño de la investigación

Investigación cuantitativa experimental transversal.

3.2. Acciones y actividades

3.2.1. Etapa I: Aislamiento y purificación de la bacteria

Para el aislamiento y purificación de la RPCV (Rizobacteria Promotora del Crecimiento Vegetal) se utilizó como medio de cultivo dos variaciones del Agar Ashby, el cual tiene la siguiente composición para 250 mL (Ver Anexo 5) (Esqueche & Quispe, 2017).

- A. Asbhy: 0,37 g de manitol, 0,0005 g fosfato dipotásico, 0,0025 g de sulfato de calcio, 0,125 g de carbonato de calcio, 5 g de agar agar 5, 0,25 g de benzoato de sodio y 0,0005 g de molibdato de sodio.
- A. Ashby + sacarosa: agregar a la composición anterior 2,5 g de sacarosa.

Se sembró una alícuota sólida del alperujo en placas de agar mediante estrías y se incubó durante 3 días a 28 °C. Durante este periodo, se observó crecimiento bacteriano en ambos medios de cultivo (ver Anexo 6) (Clavijo et al. 2012).

Para purificar las colonias presentes en el medio, se tomó una porción y se sembró nuevamente en ambos medios de cultivo. Se realizaron observaciones macroscópicas y microscópicas en cada replique. Además, mediante la tinción de Gram, se determinó el grado de pureza de las colonias, identificando aquellas que presentaban características de una RPCV (ver Anexo 7) (Clavijo et al. 2012).

3.2.2. Etapa II: Identificación genética y molecular

Estandarización PCR: En el laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Universidad Nacional Jorge Brasadre Grohmann se realizó la caracterización genética de los genes nif en un Termoreciclador QuantStudio 5.

Se realizó la extracción de ADN genómico con el kit de extracción Norgen para bacterias, posteriormente se realizó la amplificación de los genes nif H y nif A, utilizando el kit de PCR en Power Mix Sybr Green de la marca invitrogen

Secuencia de Cevadores para genes fijadores de nitrógeno fueron sintetizados por Invitrogen nif A y nif H y se realizaron los cálculos de cevadores (Tabla 1):

- Nif A-Forward for Inspectorate - TTATCGCGGCGACGAACC
- Nif A-Reverse for Inspectorate - CGCAATGGCGGCAAGTAG
- Nif H-Forward for Inspectorate - CGGTGAAATGATGGCATGT
- Nif H-Revers for Inspectorate – CGGTCCGGTCTTCCGTTTCGT

Tabla 1*Cálculo de Cevadores*

Primer	Peso Cevadores en µg	Peso en nano moles	Volumen Agua µL	Concentración Final µM
Nif A-Forward	142,32	26	260	100
Nif A-Reverse	191,77	34,4	340	100
Nif H-Forward	16,77	26,9	269	100
Nif H-Revers	184,00	31,9	319	100

Se añadieron 500 nMolar o 0,5 µMolar de cada primer

Se prepararon soluciones más diluidas de los cevadores para poder trabajar, se llevó a una concentración de 10 µM de cada primer. (10 µL de primer + 90 µL de agua) y colocar 1 µL de la solución de los cevadores que representa a 0,5 µM.

Para los genes nif A y nif H se prepararon para 10 pocillos, para lo cual se preparó un volumen total de 12 µL 6 µL de cada primer forward y revers.

Para cargar cada pocillo se realizaron los siguientes pasos:

10 µL de Power Mix Sybr Green

2 uL de muestra

1 uL de cevadores

7 uL de agua ultrapure

El agua y el Power Mix se mezclaron en un solo tubo para un solo pipeteo. Dado que había 42 pocillos, se midieron 10 µL por pozo en proporción de 420 µL de Power mix y se agregó 294 µL en el mismo tubo de agua ultrapura, para que el volumen no sea completamente exacto se midió en 430 µL de Power Mix y 301 uL de agua ultrapura. Se tomó 17 µL de la solución. Se trabajó en la cabina de bioseguridad para preparar la mezcla de PCR (Ver Anexo 8).

Seguidamente se pasó a configurar el termociclador en tiempo real, para diseñar el experimento (Tabla 2).

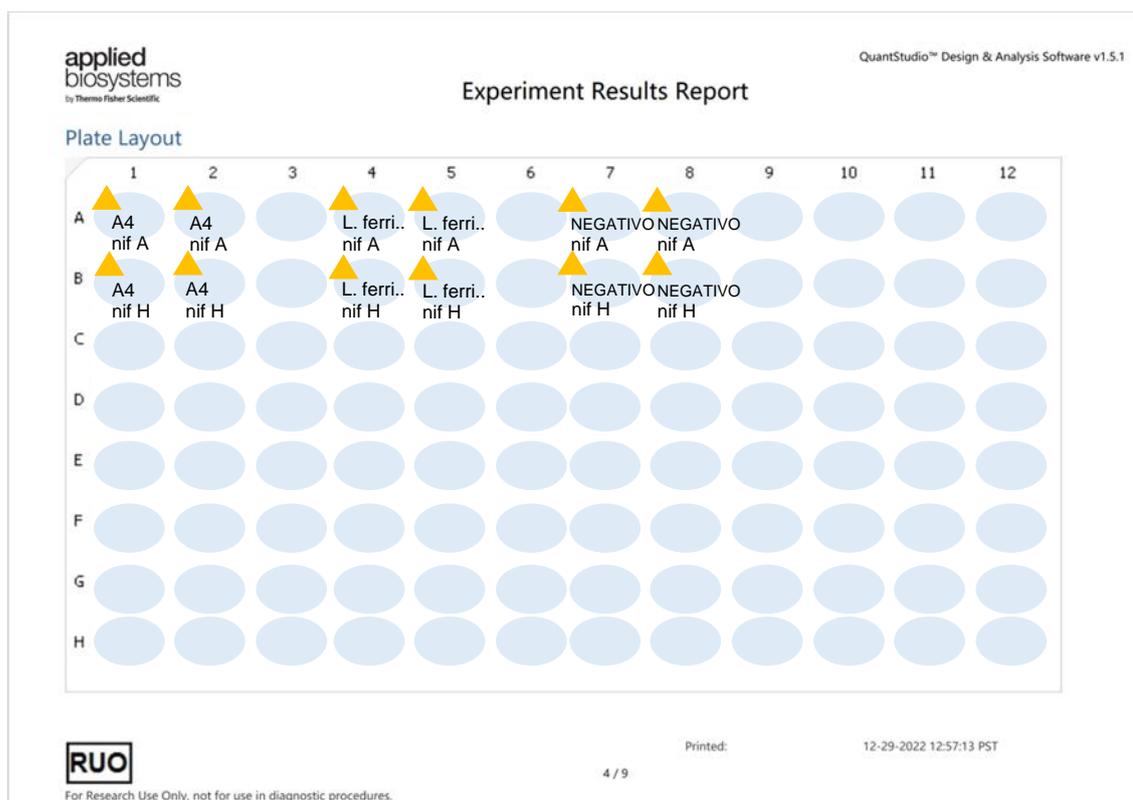
Tabla 2

Configuración del termociclador en tiempo real para la amplificación de genes nif.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación UDG	50 °C	2 minutos	1
Activación de doble bloqueo DNA de polimerasa	95 °C	2 minutos	1
Desnaturalización	95 °C	15 segundos	40
Extensión de canal	60 °C		

Figura 3

Reporte de Resultados en QuantStudio 5



Nota. Extraído del software del termociclador QuantStudio

Identificación molecular: Se realizaron réplicas de las colonias que presentaban genes *nif* con el fin de enviar las muestras al laboratorio de MACROGEN, ubicado en Corea. Se enviaron un total de 4 muestras en placas Petri para llevar a cabo el secuenciamiento del gen 16S ARNr (Ver Anexo 9).

3.2.3. Etapa III: Producción del té de alperujo

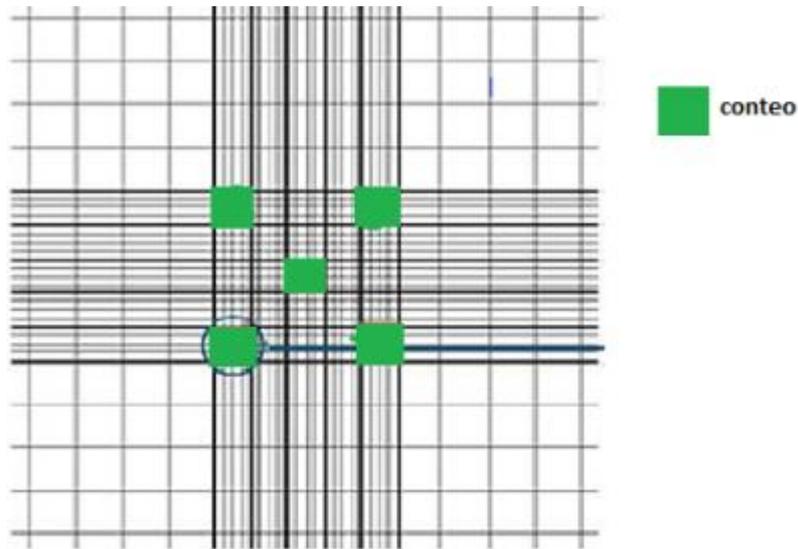
Se diluyó el alperujo al 40 % con relación al peso/volumen, considerando su humedad de 0,24 %. A esta solución se le agregaron 0,6 g de sacarosa por cada 300 mL. A continuación, se llevó a cabo la ebullición del té y se realizó una prefiltración utilizando gasa y algodón para eliminar los sólidos de mayor tamaño. Posteriormente, se utilizó un sistema de filtración que incluyó un papel filtro de 5 a 11 μm , seguido de un filtro microbiológico de 0.45 μm , con el fin de eliminar microorganismos que pudieran interferir en el recuento celular de la *Beijerinckia mobilis*.

El pH del té de alperujo se ajustó a 6 mediante la adición de ácido sulfúrico 0,1 N. Las mediciones se llevaron a cabo utilizando un medidor de pH de mesa Thermo Scientific, previamente calibrado. Por último, el té se autoclavó a 121 °C durante 15 minutos (ver Anexo 10) (Cerrone, 2011).

3.2.4. Etapa IV: Determinación de la curva de crecimiento celular en medio líquido de *Beijerinckia mobilis*

Se inoculó el cultivo de *Beijerinckia mobilis* en dos medios: caldo Ashby y té de alperujo (ver Anexo 11). Las concentraciones se determinaron mediante el recuento en la cámara Neubauer (Bastidas, 2021).

Se realizaron dos réplicas en matraces con 150 mL de cada medio utilizando una incubadora agitadora IKA. La concentración inicial fue de 10^7 cel/mL. Los matraces se incubaron a 29 °C con una agitación de 200 rpm (revoluciones por minuto) durante 48 horas. Se realizaron conteos en la cámara de Neubauer utilizando la ecuación 1 (Figura 4) cada hora para obtener la cinética del crecimiento del cultivo bacteriano. Se hicieron diluciones de 10^{-1} y 10^{-2} con solución salina fisiológica al 85 % (ver Anexo 12). La curva de crecimiento fue necesario para determinar el tiempo de generación de la biomasa (Chipana, 2015).

Figura 4*Cuadrícula de la Cámara de Neubauer*

Nota. Señalización de las cuadrículas en las que se hace el conteo celular con la cámara Neubauer.

- Cálculo de la concentración celular:

$$C = P * 25 * 10^4 * D \quad (1)$$

Dónde:

C = Concentración

P = Promedio de las células contadas/cuadrícula.

25 = es el promedio de los 5 cuadrantes que se cuentan.

10⁴ = es por la sensibilidad de la cámara, no se pueden contar menos de 10000 células.

D = es el factor de dilución

3.2.5. Etapa V: Elaboración del bioinoculante

(Ver Anexo 13)

Fase pre fermentativa:

- Producción de biomasa en placa

Para la producción de biomasa se utilizó la cepa nativa de *Beijerinckia mobilis* la cual fue aislada directamente del alperujo. Esta cepa fue sembrada directamente por estrías

en el medio ATCC 13, su composición para 240 mL es: 0,3 g de fosfato dipotásico, 0,06 g de sulfato de magnesio heptahidratado, 0,06 g de cloruro de sodio, 0,0015 g de sulfato de hierro, 5 g de agar agar, luego al medio se le agrega 30 mL de extracto de suelo el cual fue reemplazado con té de alperujo y 30 mL de solución de glucosa.

- Preparación de inóculo

Se incubó a 29 °C durante 24h (Ver Anexo 14). Por cada tratamiento se utilizó una placa con biomasa bacteriana, la cual se recolectó en un tubo de ensayo con SSF al 0,85%, se llegó a una concentración de $1,075 \cdot 10^9$ cel/mL y se realizaron los cálculos ($C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$) para inocular los matraces los cuales llegaron a una concentración de aproximadamente 10^7 cel/mL.

Fase fermentativa:

Se realizó la fermentación de matraces con té de alperujo con los siguientes parámetros: 50 %, 75 % y 100 % y a temperaturas de 29 °C y 45 °C, con agitaciones de 100, 200 y 300 rpm esto nos dio un total de 18 tratamientos, lo que corresponde a un diseño estadístico factorial multinivel (3^k). Se incubó durante 20 h y se realizó el conteo inicial a la hora cero y un conteo final a la hora 20 (Ver Anexo 15). El recuento se realizó utilizando la cámara de Neubauer y aplicando la fórmula correspondiente se obtuvo los resultados sobre el mejor tratamiento para la producción de biomasa (Chipana, 2015).

Tabla 3

Tratamientos de producción de biomasa

Tratamiento	Temperatura (°C)	Agitación (rpm)	Concentración (%)
T1	29	200	100
T2	45	200	75
T3	45	300	50
T4	45	100	75
T5	29	200	75
T6	45	100	50
T7	45	300	75
T8	29	100	75
T9	45	200	50
T10	45	100	100
T11	29	300	75
T12	29	100	50
T13	29	300	100
T14	29	200	50

T15	45	200	100
T16	29	100	100
T17	45	300	100
T18	29	300	50

Aplicación del bioinoculante al cultivo de *Solanum lycopersicum*

La cepa nativa de *Beijerinckia mobilis* fue nuevamente repicada en medio ATCC 13 modificado con alperujo e incubada a 29 °C por 24 h, las colonias desarrolladas fueron utilizadas para inocular el té de alperujo el cual se fermentó con los parámetros óptimos obtenidos para la producción de biomasa en té de alperujo.

Se realizó un diseño de Unifactorial categórico (cuadrado latino).

El diseño estadístico generó 16 tratamientos con 15 repeticiones lo que dio un total de 256 almácigos, cada uno con 3 semillas por golpe de *Solanum lycopersicum*.

Tabla 4

Tratamientos para el cultivo de tomate

Tratamiento	<i>Beijerinckia</i>	BIOL	Profundidad de la semilla
B1	2	1	2
B2	2	4	3
B3	4	4	1
B4	3	1	3
B5	1	1	1
B6	1	4	4
B7	4	2	3
B8	2	3	4
B9	3	2	4
B10	4	1	4
B11	1	3	3
B12	3	4	2
B13	3	3	1
B14	4	3	2
B15	2	2	1
B16	1	2	2

La aplicación de *Beijerinckia mobilis* se realizó mediante la técnica de bacterización de semillas, obteniendo cuatro niveles:

- *Beijerinckia* 1: 0 cel/g
- *Beijerinckia* 2: $1,94 \times 10^5$ cel/g
- *Beijerinckia* 3: $1,94 \times 10^7$ cel/g
- *Beijerinckia* 4: $1,94 \times 10^9$ cel/g

Para lograr esta concentración se aplicó las siguientes concentraciones de té de alperujo a 10 mL por nivel:

- 1 (0 cel/mL)
- 2 (10^4 cel/mL)
- 3 (10^6 cel/mL)
- 4 (10^8 cel/mL)

Las cuales fueron inoculadas en 0,516 g de semillas de tomate por nivel de concentración de *Beijerinckia mobilis*. (Ver Anexo 16).

Los factores intervinientes fueron aplicados de la siguiente manera:

BIOL: 1 (ninguna vez), 2 (se aplicó una vez), 3 (se aplicó cada cinco días), 4 (se aplicó cada siete días).

Para la profundidad de la semilla se consideró la profundidad del almacigo siendo el nivel 1 el más profundo y el nivel 4 el más superficial. El sustrato que se utilizó en los almácigos fue turba estéril.

Las semillas reposaron en la suspensión bacteriana por 1h, seguido de esto se sembraron en el almacigo (Gramaglia et al. 2019).

3.2.6. Etapa VI: Evaluación fenológica

Para evaluar el porcentaje total de germinación por tratamientos del bioinoculante se utilizó la siguiente fórmula (Clavijo et al. 2012):

$$\%G = \frac{A}{B} * 100 \quad (2)$$

Dónde:

A: N° de semillas germinadas dentro de los almácigos por tratamiento.

B: N° total de semillas dentro de los almácigos por tratamiento.

El porcentaje total de germinación por tratamiento se evaluó en el día 10, 15, 20 y 25. (Ver Anexo 17).

La evaluación de las plántulas se realizó tomando una de tres plántulas que germinaron en cada semillero del almacigo con turba estéril. (Ver Anexo 18) Se consideraron las siguientes variables:

Germinación: Número de planta germinada por golpe (del 0 al 3), dependiendo de las plántulas que germinaron hasta el día 25.

Tamaño total: Variable numérica (cm). Es la suma del tamaño de la raíz y el tamaño de la planta.

Tamaño de la raíz: Variable numérica (cm).

Número de hoja: Número de las hojas de la plántula.

Tamaño de la hoja: Variable numérica (cm). Se consideró la hoja que más resalta en la plántula.

Tamaño de la planta: Variable numérica (cm). Se considera el alto del tallo y hojas.

Peso total: Variable cuantitativa (g). La plántula fue pesada en una balanza analítica.

3.3. Materiales e instrumentos

3.3.1. Materiales

- **Cepa bacteriana:**

Beijerinckia mobilis es una cepa nativa aislada directamente del residuo alperujo. Fue aislada por los autores en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Privada de Tacna. Identificada genéticamente por los autores en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Se envió a identificar molecularmente en el Laboratorio Macrogen ubicado en el país de Corea.

- **Medios de cultivo, reactivos y soluciones:**

Agar Ashby, Agar Ashby + sacarosa, Caldo Ashby, Medio ATCC 13, Solución salina fisiológica al 85 %, Ácido sulfúrico, Agua destilada, kit de coloración gram, entre otros de uso común.

- **Materiales de vidrio:**

Matraces, kitsato, frascos de vidrio, vasos precipitados, placas Petri, asa digralsky. entre otros de uso común.

- **Otros materiales:**

Asa de Kolle, cámara de Neubauer, micropipeta, pipeta, válvula para pipeta, entre otros de uso común.

3.3.2. Instrumentos

Incubadora, Autoclave, Balanza analítica, Estufa, Cocinilla, Microscopio, Incushaker, Sistema de filtración, Vórtex, Destilador de agua, medidor de pH, entre otros de uso común.

3.4. Población y/o muestra de estudio

En la presente investigación, la población estuvo compuesta principalmente por el residuo conocido como alperujo (5 kg), el cual se obtuvo de la empresa Valle Sur ubicada en la Av. Industrial 1835, Tacna 23001, Tacna, Perú. Este residuo se utilizó principalmente para el aislamiento de la población bacteriana de *Beijerinckia mobilis* y la preparación del té de alperujo.

Además, la población también incluyó el cultivo de tomate, el cual constó de aproximadamente 768 semillas dispuestas para la germinación y 256 plántulas que fueron evaluadas fenológicamente. Estas plántulas fueron bioinoculadas con aproximadamente 10 mL por tratamiento de té de alperujo + *Beijerinckia mobilis*.

3.5. Operacionalización de variables

Tabla 5

Variables de la investigación

Variable	Definición conceptual	Dimensiones	Indicador	Escala	Técnicas o métodos
Parámetros de Producción de <i>Beijerinckia mobilis</i> en té de alperujo.	Estos parámetros aplicados en la incushaker para la producción de biomasa de la bacteria serán determinados a través de los siguientes métodos	Objetiva unidimensional: Parámetros fisicoquímicos Objetiva multidimensional: Parámetros nutricionales	•Agitación •Temperatura	•Rpm •°C	Métodos analíticos Método Peso/Volumen
Concentración de <i>Beijerinckia</i>	La concentración celular de la bacteria en el residuo determinara la	-	Concentración celular/ mL	cel/mL	Método de recuento directo

<i>mobilis</i> en té de alperujo.	cantidad necesaria a inocular en los tratamientos.				
Efecto fertilizante	Estos efectos determinaran la calidad del bioinoculante.	Objetiva multidimension al: Características Fenológicas de la planta	Porcentaje de germinación por tratamiento	%	N° de plantas germinadas * 100
Efecto fertilizante	Estos efectos determinaran la calidad del bioinoculante.	Objetiva multidimension al: Características Fenológicas de la planta	Germinación por semillero	N°	Variable numérica
Efecto fertilizante	Estos efectos determinaran la calidad del bioinoculante.	Objetiva multidimension al: Características Fenológicas de la planta	Tamaño total	cm	Variable numérica
Efecto fertilizante	Estos efectos determinaran la calidad del bioinoculante.	Objetiva multidimension al: Características Fenológicas de la planta	Tamaño de la raíz	cm	Variable numérica
Efecto fertilizante	Estos efectos determinaran la calidad del bioinoculante.	Objetiva multidimension al: Características Fenológicas de la planta	Número de hojas	N°	Variable numérica
Efecto fertilizante	Estos efectos determinaran la calidad del bioinoculante.	Objetiva multidimension al: Características Fenológicas de la planta	Tamaño de hoja	cm	Variable numérica
Efecto fertilizante	Estos efectos determinaran la calidad del bioinoculante.	Objetiva multidimension al: Características Fenológicas de la planta	Tamaño de la planta	cm	Variable numérica
Efecto fertilizante	Estos efectos determinaran la calidad del bioinoculante.	Objetiva multidimension al: Características Fenológicas de la planta	Peso total	g	Variable cuantitativa

3.6. Procesamiento y análisis de datos

Los datos obtenidos de la investigación fueron procesados en un análisis estadístico en el programa Statgraphics V19.3.03 donde principalmente se determinó la efectividad del bioinoculante como fertilizante.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

4.1. Aislamiento e identificación genética de cepas de *Beijerinckia mobilis*.

Tabla 6

Características morfológicas de las colonias aisladas

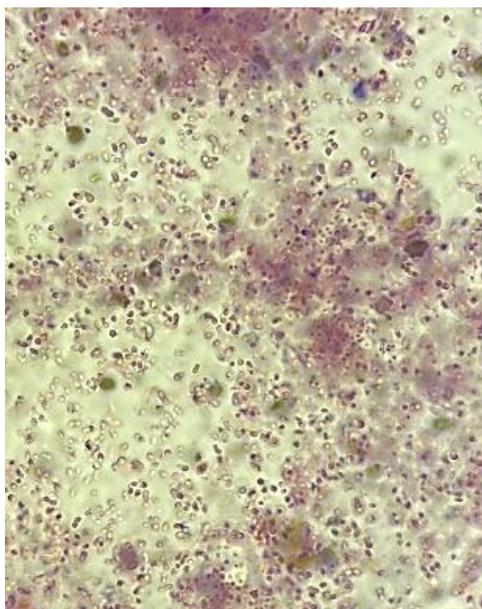
Aislado	Crec. ^a	Color ^b	Muc. ^c	Textura ^d	Gram ^e	Morf. ^f	Tam. ^g	Fig. ^h
A1	+	1	++	1	-	CB	3	5
A2	++	1	++	1	-	CB	2	6
A3	++	2	+++	1	-	CB	1	7
A4	+++	2	+++	1	-	CB	1	8
A5	+	2	++	1	-	CB	1	9

Nota. a: Crecimiento: (+) ligero, (++) moderado, (+++) abundante; b: Color: (1) crema con pigmentos marrones, (2) traslucidas, (3) amarillo; c: Mucosidad: (+) ligero, (++) moderado, (+++) abundante; d: Textura: (1) viscosa; e: Gram: (-) negativo, (+) positivo; f: Morfología: (CB) cocobacilar, (BL) bacilo largo, (BC) bacilo corto; g: Tamaño: 1 - 3 mm; h: figura: número de figura para observar la morfología.

En la Tabla 6 se realiza la caracterización de las colonias aisladas del alperujo fresco, estas bacterias fueron aisladas en Agar Ashby con sacarosa al 1 % a una temperatura de 29 °C, al purificar las colonias se observaron bacteria gram negativas cocobacilares polimórficas (Figuras del 5 al 9), algunas en estado de quiste donde se puede observar las inclusiones de polihidroxybutirato en la Figura 8. (Ver anexo 19)

Figura 5

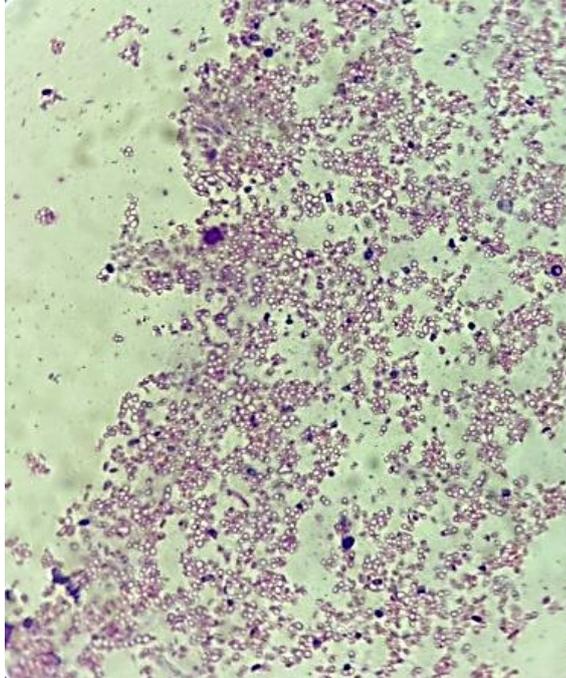
Visión microscópica de la colonia A1 (100x)



Nota. Tinción gram de la muestra extraída de la colonia A1.

Figura 6

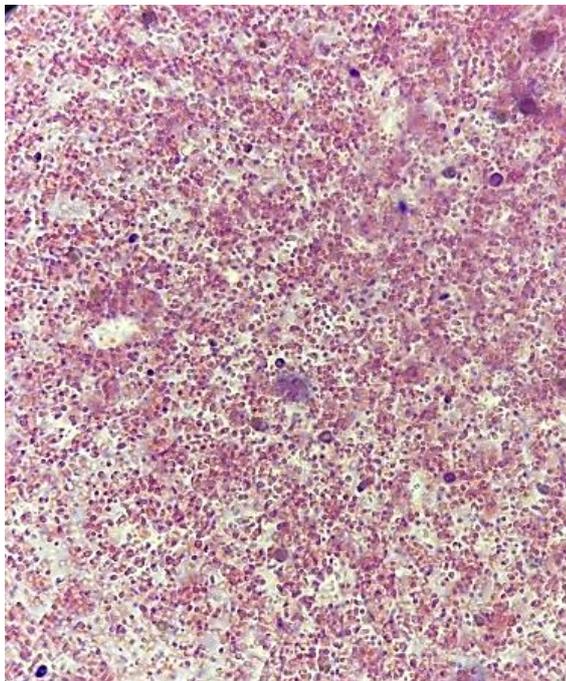
Visión microscópica de la colonia A2 (100x)



Nota. Quiste de bacteria Tinción gram de la muestra extraída de la colonia A2.

Figura 7

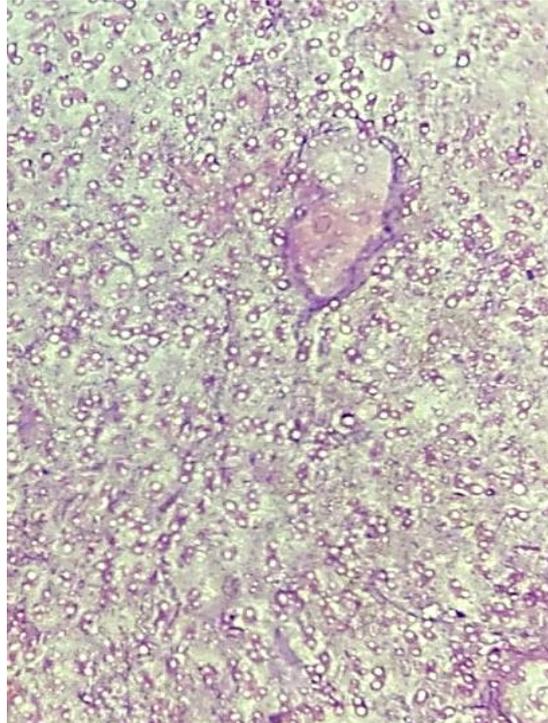
Visión microscópica de la colonia A3 (100x)



Nota. Tinción gram de la muestra extraída de la colonia A3

Figura 8

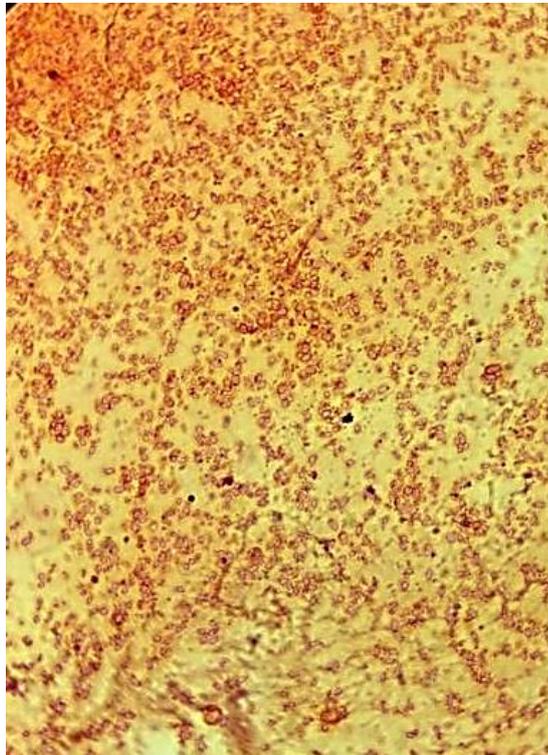
Visión microscópica de la colonia A4 (100x)



Nota. Quistes de bacteria en Tinción gram de la muestra extraída de la colonia A4.

Figura 9

Visión microscópica de la colonia A5 (100x)



Nota. Tinción gram de la muestra extraída de la colonia A5.

Identificación de genes nif

Los resultados obtenidos de la identificación genética realizadas en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana de la UNJBG se expresan de la siguiente forma:

Tabla 7

Resultados de CT (ciclo de umbral) por muestra

Muestra	Gen	CT Mean
A4	nif A	37,879
	nif H	34,153
<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	nif A	-
	nif H	-
Control negativo	nif A	-
	nif H	-

Se realizó un análisis a nivel molecular para determinar la presencia de genes nif en la colonia bacteriana A4, la presencia de estos genes indica que la bacteria tiene potencial para fijar nitrógeno atmosférico.

Identificación molecular (gen 16s ARNr)

Tabla 8

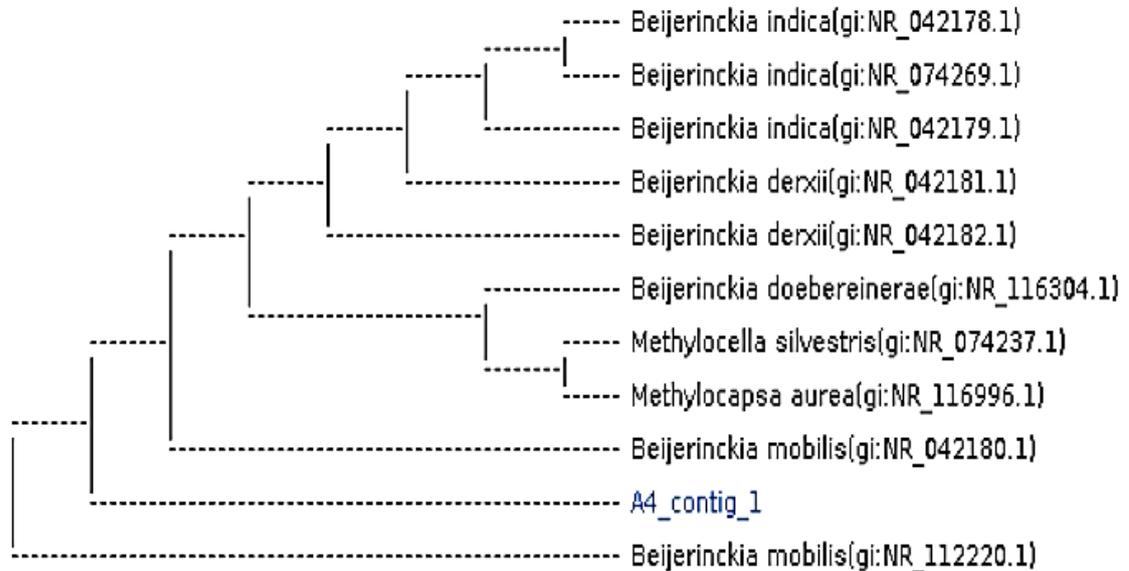
Resultados de la identificación molecular

Cepa	Sitio de muestreo	Organismo	Identidad de secuencia (%)
A4	MACROGEN Humanizing Genomics	<i>Beijerinckia mobilis</i> gen parcial ARNr 16S, cepa UQM 1969	100

En la tabla 8 se observan los resultados que se obtuvieron de la secuenciación de las cepas aisladas. Se identificó la especie del género bacteriano *Beijerinckia mobilis*. La especie cuenta con 100 % de homología con la base de datos Ezbiocloud y National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Figura 10

Árbol filogenético de la muestra enviada a identificar molecularmente



Árbol filogenético de la cepa A4 identificada como *Beijerinckia mobilis* se observa en la Figura 10 que esta cepa se encuentra cercana a *Methylocapsa aurea*.

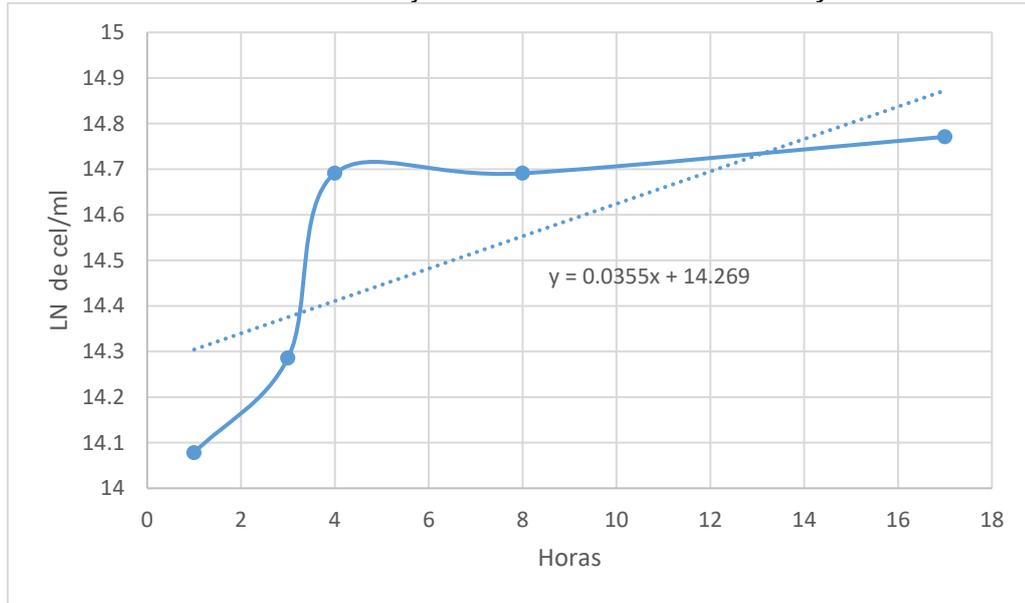
4.2. Determinación de los parámetros óptimos fisicoquímicos y nutricionales para el crecimiento de *Beijerinckia mobilis* en té de alperujo

Curva de crecimiento de la bacteria *Beijerinckia mobilis* 48 h (monitoreos cada hora):

Ver Anexo 2 para observar los resultados del monitoreo de las curvas de crecimiento.

Figura 11

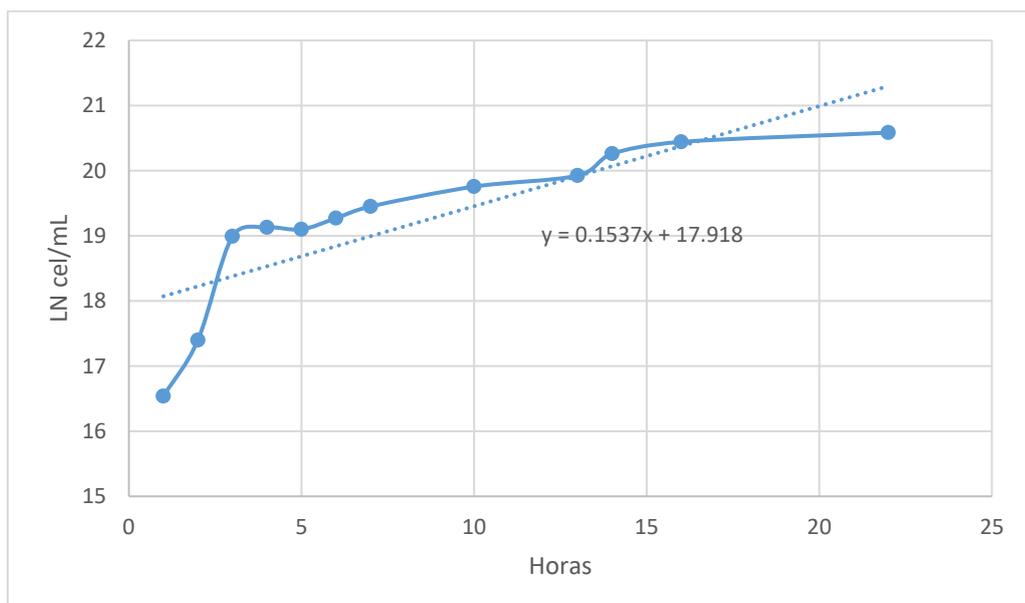
Curva del crecimiento de la Beijerinckia mobilis en caldo Ashby



Según la fórmula mostrada en el gráfico de la Figura 11 se obtiene la constante específica de velocidad de crecimiento en la ecuación de la bacteria $\mu=0,0355$. Se aplicó las siguientes fórmulas: (Ver Anexo 2) (Madigan et al. 2012, Willey et al. 2011)

Figura 12

Curva del crecimiento de la Beijerinckia mobilis en té de alperujo



Según la fórmula mostrada en el gráfico de la Figura 12 se obtiene la constante específica de velocidad de crecimiento en la ecuación de la bacteria $\mu=0.1537$. Se aplicó las siguientes fórmulas (Ver Anexo 2) (Madigan et al. 2012, Willey et al. 2011):

Tabla 9

Resultados de los cálculos de parámetros que definen el crecimiento de la bacteria

Medio	Tiempo de generación	Velocidad de crecimiento
Caldo Ashby	19,52h	0,051 generaciones/h
Té de alperujo	4,53h	0,22 generaciones/h

En la tabla 9 se observa los cálculos de los parámetros que definen el crecimiento de la bacteria los cuales se obtuvieron luego de realizar la curva de crecimiento en un sistema cerrado como fue la incubadora IKA.

Elaboración del bioinoculante a base de *Beijerinckia mobilis* en té de alperujo:

- **Producción de biomasa**

Fase pre fermentativa (Producción en placa)

Tabla 10

Producción de biomasa según medio

Medio de cultivo	Cantidad de biomasa	Tiempo de crecimiento
Agar Ashby	x	168 h
Agar Ashby + sacarosa	xx	96 h
Medio ATCC 13	xx	24 h
Medio ATCC 13 con alperujo	xxx	24 h

Nota. La cantidad de biomasa es representada por x: escaso, xx: regular, xxx: abundante.

En la Tabla 10 se observa el crecimiento de las bacterias *Beijerinckia mobilis* en diferentes medios de cultivos sólidos, el medio ATCC 13 enriquecido con alperujo, fue el medio en el que se observó mayor biomasa y el crecimiento se dio a las 24 horas.

Fase fermentativa (Producción en té de alperujo)

Utilizamos el programa Statgraphics V19.3.03 para analizar los datos, para ver el efecto de las variables y la optimización del proceso.

Tabla 11

Análisis de varianza para la producción de biomasa

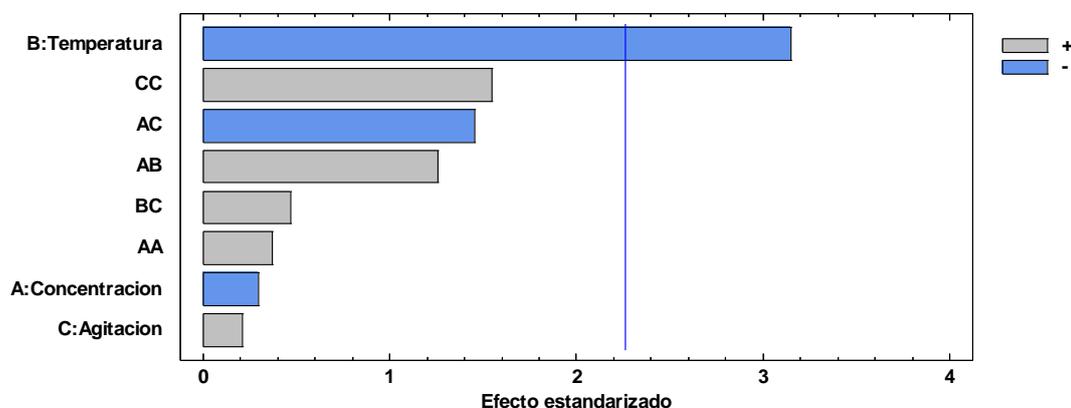
Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Concentración	6,48675E15	1	6,48675E15	0,09	0,7741
B: Temperatura	7,3528E17	1	7,3528E17	9,91	0,0118*
C: Agitación	3,267E15	1	3,267E15	0,04	0,8384
AA	1,02347E16	1	1,02347E16	0,14	0,7189
AB	1,1781E17	1	1,1781E17	1,59	0,2392
AC	1,5708E17	1	1,5708E17	2,12	0,1795
BC	1,61333E16	1	1,61333E16	0,22	0,6520
CC	1,7696E17	1	1,7696E17	2,39	0,1568
Error total	6,67454E17	9	7,41615E16		
Total (corr.)	1,89071E18	17			

Nota. * Significancia $p < .05$

En la tabla 11 el análisis de varianza determinó que la temperatura tiene un efecto significativo en el crecimiento de *Beijerinckia mobilis* con un p : 0,0118.

Figura 13

Diagrama de Pareto de la producción de biomasa

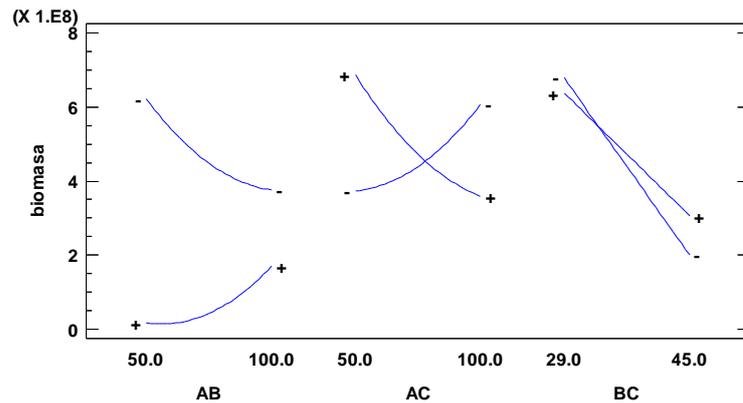


En la Figura 13 se observa que los factores temperatura y concentración de alperujo tienen un efecto negativo en la producción de biomasa, siendo la temperatura

significativa, la agitación tienen un efecto positivo pero no significativo en el desarrollo de la bacteria.

Figura 14

Interacción de producción de biomasa

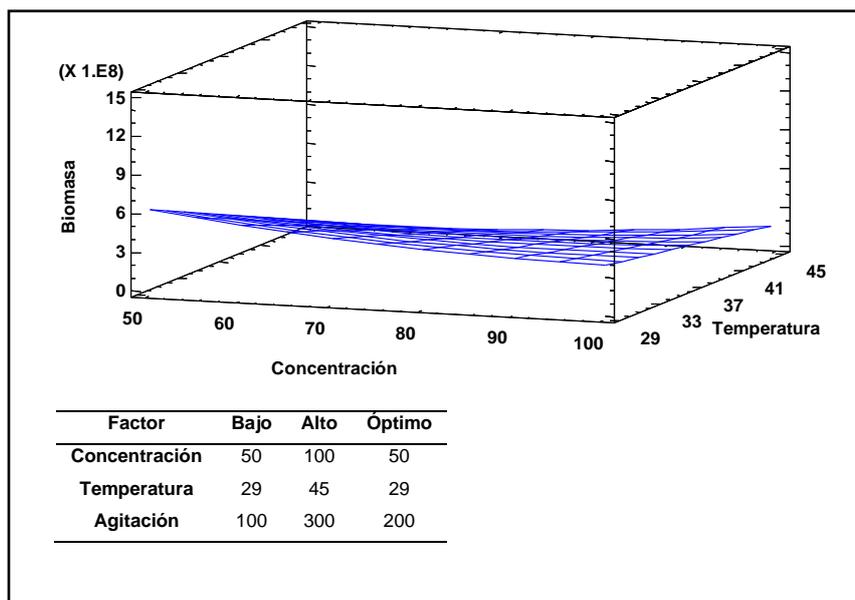


Nota. Donde A: concentración, B: temperatura, C: agitación

En la figura 14 se observa la interacción de la variable agitación (C) con las variables temperatura (B) y concentración (A), así mismo se determina que no existe interacción entre las variables concentración (A) y temperatura (B).

Figura 15

Superficie respuesta de las variables temperatura, agitación y concentración de alperujo



En la figura 15 se observan los factores analizados en el software Statgraphics V19.3.03 el cual dio como parámetros óptimos: concentración de alperujo 50 %, temperatura 29 °C y agitación 200 rpm.

Tabla 13

Resultados estimados para la producción de biomasa con el coeficiente de regresión

Fila	Observados	Ajustados
	Valores	Valores
1	1,63E8	4,21875E8
2	3,03E8	4,47722E8
3	2,05E8	3,07E8
4	1,15E8	4,67208E8
5	2,29E8	4,35E7
6	1,86E8	2,00667E8
7	3,94E8	2,93292E8
8	5,7E8	7,11014E8
9	3,87E8	1,69917E8
10	2,04E8	3,75972E8
11	8,27E8	6,78222E8
12	4,17E8	6,20639E8
13	1,33E9	9,50931E8
14	1,36E8	1,825E7
15	1,42E8	3,52917E7
16	9,99E8	7,46597E8
17	3,8E8	4,26014E8
18	5,65E8	6.37889E8

Nota. Coeficiente de regresión para la producción de biomasa:

$$\begin{aligned}
 PB = & 3,38691E9 - 2,01904E7 * C - 7,15868E7 * T - 5,74042E6 * A + 80933,3 \\
 & * C^2 + 495417 * C * T - 56050 * C * A + 45833,3 * T * A \\
 & + 21033,3 * A^2
 \end{aligned}
 \tag{2}$$

En la tabla 13 se observan los valores reales obtenidos en los 18 tratamientos del experimento con diseño factorial 3^k y los valores ajustados de biomasa mediante la ecuación 2 del coeficiente de regresión. Donde:

PB: Producción de biomasa

C: Concentración de té de alperujo

T: Temperatura

A: Agitación

4.3. Evaluación del bioinoculante a base de *Beijerinckia mobilis* en té de alperujo en la germinación y las características fenológicas de plantas de tomate.

(Ver Anexo 16)

Tabla 14

Evaluación del porcentaje de germinación en el diseño experimental unifactorial (cuadrado latino)

Tratamiento	Beijerinckia	Biol	Profundidad de la Semilla	10 Días	15 Días	20 Días	25 Días
T1	2	1	2	12,5 %	43,3 %	81,25 %	81,25 %
T2	2	4	3	87,5 %	100 %	100 %	100 %
T3	4	4	1	87,5%	93,75 %	100 %	100 %
T4	3	1	3	25 %	81,25 %	100 %	100 %
T5	1	1	1	6,25 %	37,5 %	56,25 %	68,75 %
T6	1	4	4	18,75 %	87,5 %	93,75 %	93,75 %
T7	4	2	3	93,75 %	93,75 %	93,75 %	93,75 %
T8	2	3	4	25 %	100 %	100 %	100 %
T9	3	2	4	25 %	93,75 %	100 %	100 %
T10	4	1	4	0 %	68,75 %	100 %	100 %
T11	1	3	3	62,5 %	100 %	100 %	100 %
T12	3	4	2	93,75 %	100 %	100 %	100 %
T13	3	3	1	87,5 %	93,75 %	100 %	100 %
T14	4	3	2	93,75 %	93,75 %	100 %	100 %
T15	2	2	1	87,5 %	93,75 %	100 %	100 %
T16	1	2	2	68,75 %	81,25 %	93,75 %	93,75 %

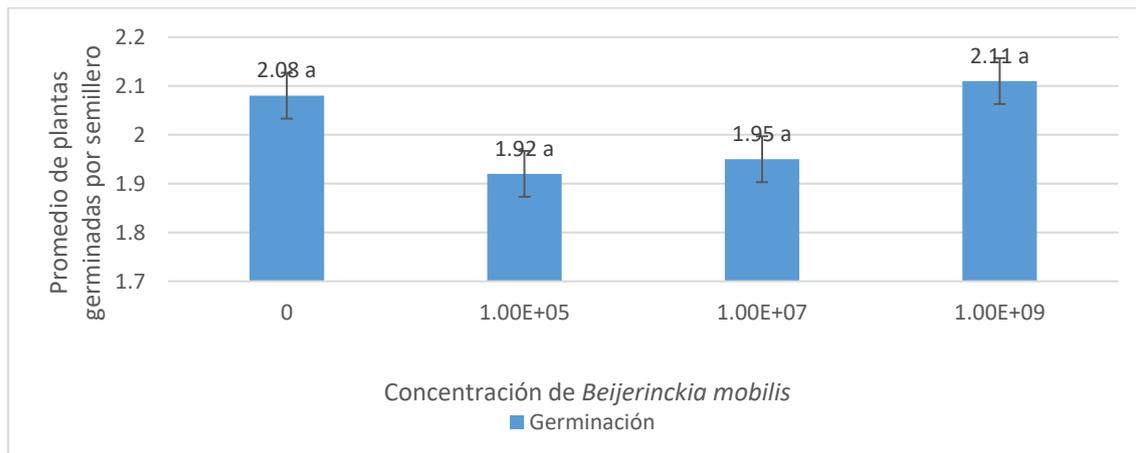
En la tabla 14 se observa de manera individual el porcentaje de germinación por tratamientos, el cual fue evaluado cuatro veces, a partir del día 10 al día 25.

Evaluación fenológica:

(Ver Anexo 4 y Anexo 19)

Figura 15

Resultados de las Pruebas de Múltiple Rangos para la Germinación por concentración de *Beijerinckia mobilis*

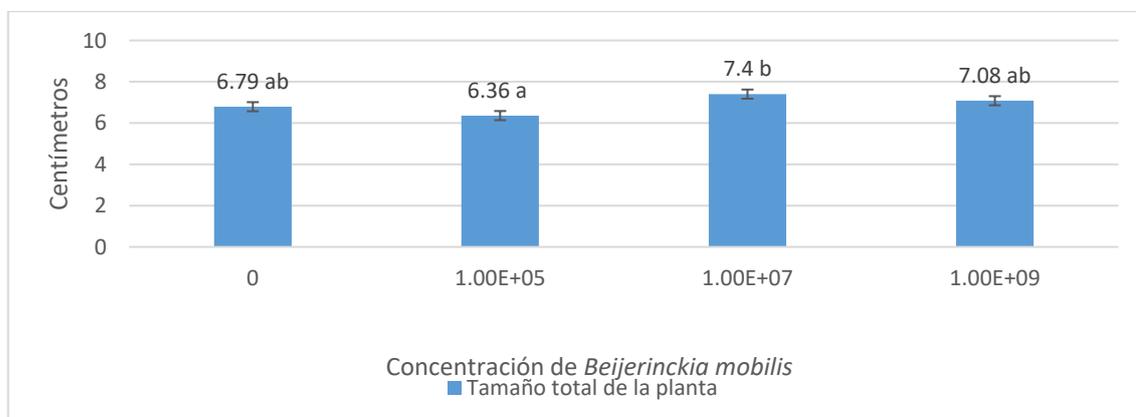


Nota. a, ab, b, letras estadísticamente diferentes (Grupos homogéneos) $p < .05$

En la figura 15 se evaluó el promedio de plántulas germinadas por semillero, no se observó diferencias significativas entre las concentraciones de *Beijerinckia mobilis* en el té de alperujo, pero se obtuvo un promedio mayor en la concentración de 10^9 con un valor de 2,11 plántulas.

Figura 16

Resultados de las Pruebas de Múltiple Rangos para el tamaño total de la planta por concentración de *Beijerinckia mobilis*

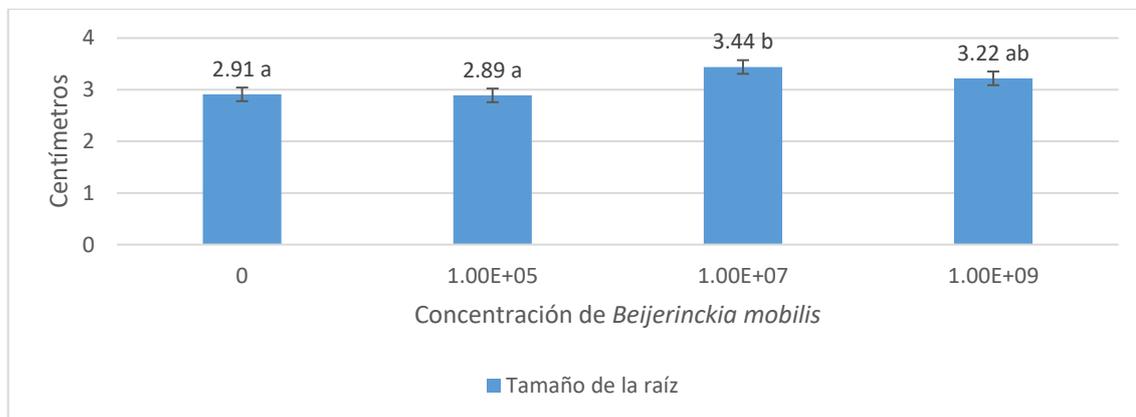


Nota. a, ab, b, letras estadísticamente diferentes (Grupos homogéneos) $p < .05$

En la figura 16 se evaluó el promedio del tamaño total de la planta (incluida la radícula), se observó una diferencia significativa en la concentración de 10^7 de *Beijerinckia mobilis* en el té de alperujo con un valor de 7,4 cm.

Figura 17

Resultados de las Pruebas de Múltiple Rangos para el tamaño de la raíz por concentración de *Beijerinckia mobilis*

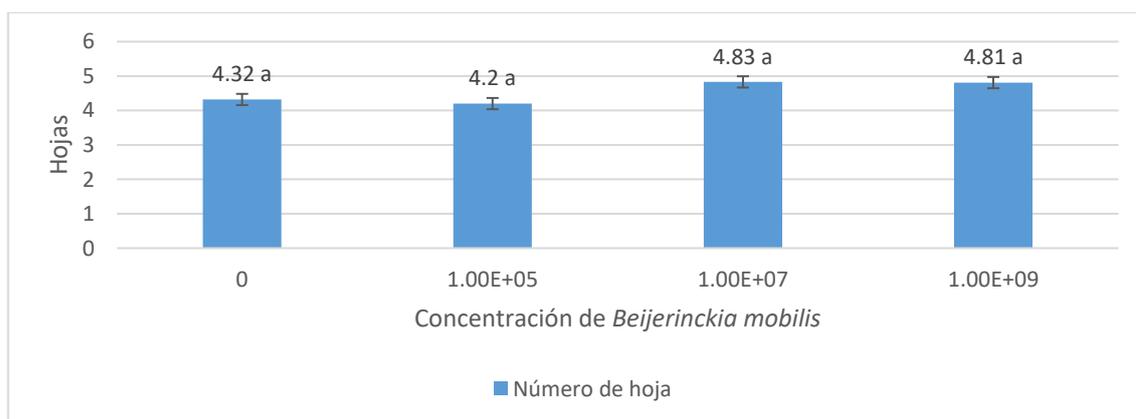


Nota. a, ab, b, letras estadísticamente diferentes (Grupos homogéneos). $p < ,05$

En la figura 17 se evaluó el promedio del tamaño de la raíz, se observó una diferencia significativa en la concentración de 10^7 de *Beijerinckia mobilis* en el té de alperujo con un valor de 3,44 cm.

Figura 18

Resultados de las Pruebas de Múltiple Rangos para el número de hojas por concentración de *Beijerinckia mobilis*



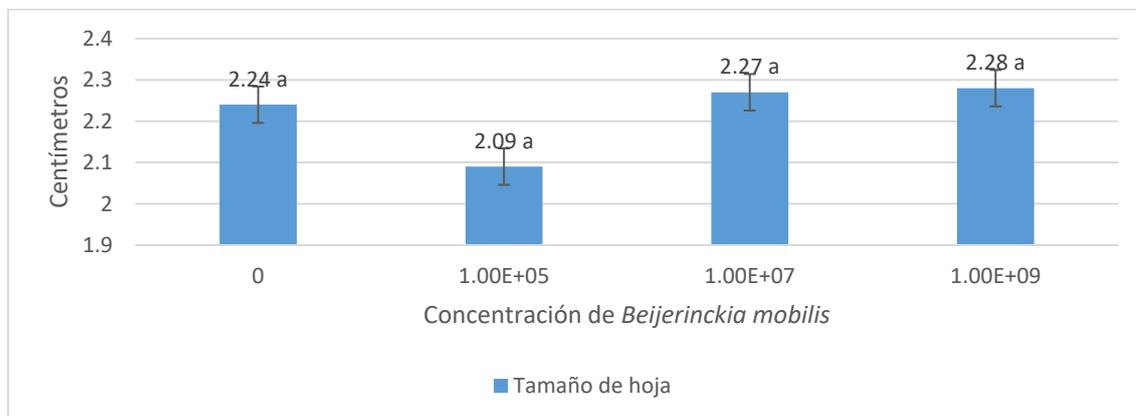
Nota. a, ab, b, letras estadísticamente diferentes (Grupos homogéneos) $p < ,05$

En la figura 18 se evaluó el promedio de número de hojas, no se observó diferencias significativas entre las concentraciones de *Beijerinckia mobilis* en el té de

alperujo, pero se obtuvo un promedio mayor en la concentración de 10^7 con un valor de 4,83 hojas.

Figura 19

*Resultados de las Pruebas de Múltiple Rangos para el tamaño de hoja por concentración de *Beijerinckia mobilis**

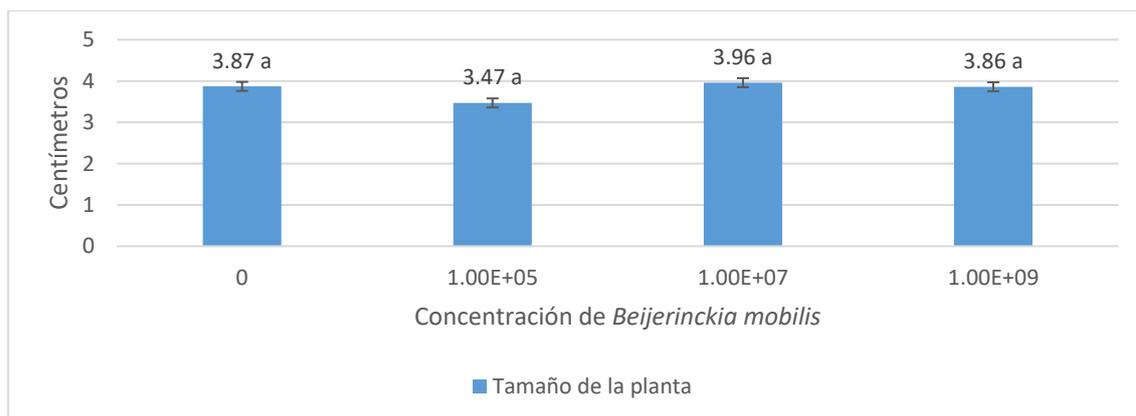


Nota. a, ab, b, letras estadísticamente diferentes (Grupos homogéneos)

En la figura 19 se evaluó el promedio de tamaño de hoja, no se observó diferencias significativas entre las concentraciones de *Beijerinckia mobilis* en el té de alperujo, pero se obtuvo un promedio mayor en la concentración de 10^9 con un valor de 2,28 cm.

Figura 20

*Resultados de las Pruebas de Múltiple Rangos para el tamaño de la planta por concentración de *Beijerinckia mobilis**

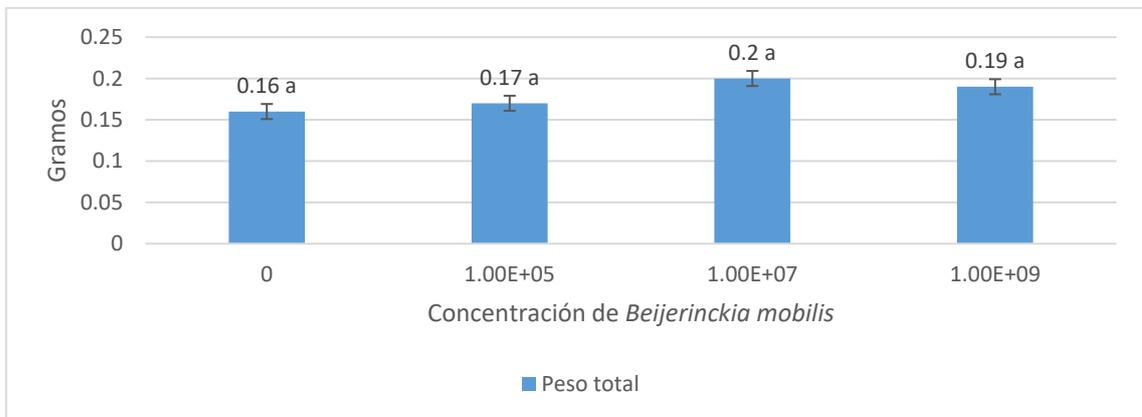


Nota. a, ab, b, letras estadísticamente diferentes (Grupos homogéneos)

En la figura 20 se evaluó el promedio de tamaño de la planta, no se observó diferencias significativas entre las concentraciones de *Beijerinckia mobilis* en el té de alperujo, pero se obtuvo un promedio mayor en la concentración de 10^7 con un valor de 3,96 cm

Figura 21

*Resultados de las Pruebas de Múltiple Rangos para el peso total por concentración de *Beijerinckia mobilis**



Nota. a, ab, b, letras estadísticamente diferentes (Grupos homogéneos)

En la figura 21 se evaluó el promedio de tamaño de la planta, no se observó diferencias significativas entre las concentraciones de *Beijerinckia mobilis* en el té de alperujo, pero se obtuvo un promedio mayor en la concentración de 10^7 con un valor de 0,2 g.

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

Se logró aislar cepas bacterianas de residuos de alperujo de olivo en medios libre de nitrógeno, para ello se identificaron las colonias macroscópica y microscópicamente (Tabla 6), macroscópicamente se observaron 2 tipos de colonias en el medio Ashby, las colonias A1 y A2, tenían una textura viscosa de color crema con pigmentos marrones de aproximadamente 3 mm de diámetro, los cultivo A3, A4 y A5 desarrollaron colonias translúcidas muy pequeñas de aproximadamente 1 mm de diámetro, al realizar la coloración gram las colonias A1 (visión microscópica de la colonia A1, Figura 5) y A2 (visión microscópica de la colonia A2, Figura 6) presentaban crecimiento de levaduras junto con las bacterias lo cual fue difícil purificar, a diferencia de A3 (visión microscópica de la colonia A3, Figura 7) y A4 (visión microscópica de la colonia A4, Figura 8), ambas colonias fueron purificadas como se observa en las figuras. En la visión microscópica de la colonia A4 (Figura 8), se observó la forma enquistada de la bacteria, la morfología era muy similar al género *Azotobacter* como lo indica Becking (2006), quien describe a las bacterias del género *Beijerinckia* como bacterias gram negativas con incrustaciones lipoides y colonias viscosas de color marrón debido a la producción de exopolisacáridos en un medio mineral libre de glucosa que contiene cloruro de calcio.

Se identificaron los genes nif H y nif A en la cepa A4 (Tabla 7) para esta prueba se utilizó una bacteria control y un control negativo (agua pura) en los cuales no mostraron la amplificación de los genes nif, mientras que la cepa A4 si amplificó los genes nif A y H con un CT de 37,88 y 34,15 respectivamente , estos genes están presentes en las RPCV, la cepa A4 es una bacteria que codifica los genes para las enzimas nitrogenasas, responsables de la conversión del nitrógeno atmosférico en amoníaco para que pueda ser utilizado por las plantas, también según Fisher et al., (2016) la presencia de estos genes le otorgan la capacidad de colonizar y crecer en suelos pobres de nitrógeno lo que la convierte en una bacteria beneficiosa para la agricultura y la producción sostenible de cultivos pobres en nitrógeno, como suelen ser los suelos de la costa de Tacna.

Se realizó la identificación molecular mediante el secuenciamiento del gen 16S ARNr, utilizando los cebadores 785F y 907F, estos cebadores fueron utilizados en el trabajo de microbiomas utilizando el gen 16S ARNr (Ziesemer et al. 2015). El secuenciamiento se realizó mediante la plataforma de Sanger, secuenciando el gen 16S ARNr ribosomal, el análisis bioinformático se realizó mediante las bases de datos de

EZ-Biocloud y National Center Biotechnology (NCBI), en ambas bases de datos se identificó como la especie *Beijerinckia mobilis* con una identidad de 100 % en Ez. Biocloud comparándola con la cepa UQM 1969 y la base de datos del NCBI se comparó con la cepa *Beijerinckia mobilis* DSM 2326.

La especie *Beijerinckia mobilis* es una bacteria gram negativa pertenece a las proteobacterias y la familia *Beijerenckiaceae* (Marín & Arahal, 2014), es una bacteria diazotrófica como se ha comprobado al ser aislada de un medio libre de nitrógeno y la presencia genes nif A y nif H, este último gen está relacionado en bacterias metilotrónica (Izumi et al., 2006). Se ha reportado la capacidad de fijar nitrógeno sin embargo no es tan eficiente como otras bacterias como *Azotobacter*, sin embargo produce alto porcentaje de ácido indol acético 95 ppm y para solubilizar fósforo en un promedio de 15 ppm (Corrales-Lozada et al. 2020). La bacteria del género *Beijerinckia mobilis*, es una bacteria relacionada a *Beijerinckia doebereineriae* y a bacterias metanotróficas como *Methilocapsa acidiphila*, esta bacteria se encuentra en ambientes ácidos con alto contenido de metano se ha determinado la presencia de un gen funcional pmoA , que codifica el polipéptido del sitio activo del metano monooxigenasa particulada (pMMO) , este gen permite a la bacteria utilizar cómo única fuente de carbón el metano (Dedysh et al. 2001), los resultados filogenéticos se puede observar el Árbol filogenético de la muestra enviada a identificar molecularmente (Figura 10) el cual coincide con el Árbol filogenético de ARNr 16S de la *Beijerinckia mobilis* (Figura 2) Yarza et al. (2010). Es probable que estas dos bacterias tengan un ancestro en común, un microorganismo acidófilo fijador de di nitrógeno (Dedysh et al. 2004).

La cepa de *Beijerinckia fluminencis* presentó una capacidad fitoprotectora contra patógenos en plantas de trigo, esto debido a la presencia de dos genes a fenilalanina amoníaco liasa (PAL), la β -1,3 glucanasa y el polifenol oxidasa (PPO) (Kim & Zylstra, 1995), en el estudio genómico de *Beijerinckia mobilis* se encuentra el gen PAL (*Beijerinckia mobilis* (ID 33186) - Genoma - NCBI, s. f.), lo que podría mejorar las defensas de la planta contra patógenos.

Se evaluó la curva de crecimiento de *Beijerinckia mobilis* en un caldo a base de té de alperujo realizando conteos cada hora por 48 horas hasta su fase estacionaria (Anexo 2). El té de alperujo tuvo una concentración de 40 % p/v de alperujo seco el cual tenía una humedad de 0,24 %, la bacteria desarrolló una velocidad de crecimiento (μ) de 0,1537 h⁻¹, lo que dio un tiempo de generación de 4,53 horas y una velocidad de crecimiento (K) de 0,22 generaciones por hora, en el medio Ashby el crecimiento fue más lento obteniendo una (μ) de 0,035 h⁻¹ y un tiempo de generación de 19,52 horas

(Curva del crecimiento de la *Beijerinckia mobilis* en caldo Ashby , Figura 11 y Curva del crecimiento de la *Beijerinckia mobilis* en té de alperujo, Figura 12), comparado con otras rizobacterias como *Rhizobium etli*, la cual tuvo un tiempo de generación de 28 horas en caldo levadura manitol (Chipana, 2015), en el trabajo realizado por Rojas; et.al (2009), se determinó el tiempo de generación de una cepa de *Rhizobium sp* con potencial para biofertilizante en 2,676 horas en medio LM (Caldo Levadura Manitol) y 4,472 h en medio RGB.

Luego de ser identificada la cepa A4 como *Beijerinckia mobilis*, se comparó cualitativamente 4 medios de cultivo sólido para la preparación de biomasa para la producción del inóculo; estos medios de cultivo se describen en la Tabla 10, siendo el agar Ashby + sacarosa el que produjo mayor biomasa para aislar y purificar la bacteria y el medio ATCC 13 con alperujo para aumentar la producción de biomasa, el cual superó al medio ATCC13 enriquecido con suelo de violeta africana, las bacterias diazotróficas como *Azotobacter sp*, crecen en medios con alperujo para la producción de polihidroxicarbonos (PHAs) Cerrone (2001). Los medios de cultivo libre de nitrógeno no permitieron el máximo desarrollo, Becking, (1961) reportó el 26% de bacterias de crecimiento lento pero con mejor capacidad de fijar N_2 y la biomasa estaba en relación a la cantidad de carbono que tiene el medio de cultivo, con un promedio de fijación de nitrógeno de (14,0–16,9 mg de N/g de glucosa consumida), en cepas con crecimiento lento, el medio Ashby fue un medio que produjo la menor biomasa pero nos permitiría aislar bacterias más eficientes para fijar nitrógeno, a diferencia del medio de ATCC 13 enriquecido con alperujo, el cual contiene glucosa y nitrógeno proveniente de la aceituna, este medio va a permitir producir biomasa en poco tiempo, pero la capacidad de fijar nitrógeno en ese medio va ser más limitada.

Para la elaboración del bioinoculante fue necesario evaluar un diseño experimental factorial 3^k para optimizar la producción de biomasa y determinar los factores que tienen efecto en la producción, los datos fueron analizados en el programa Statgraphics V19.3.03 (Ver Anexo 3). En la tabla 10 se observa el análisis de varianza, lo cual nos indica que en la temperatura hubo diferencia significativa en los tratamientos.

El diagrama de Pareto (Figura 13) nos señala que la temperatura tiene un efecto negativo en el crecimiento microbiano, la temperatura de 45 °C no fue favorable para su crecimiento a diferencia de la temperatura a 29 °C, en la cual se detectó un mayor crecimiento celular; Becking (1961), reporta el crecimiento óptimo de *Beijerinckia mobilis* en un rango de 10 a 35 °C. Este resultado nos indica que *Beijerinckia mobilis* no es una bacteria termotolerante, sin embargo aún se observa crecimiento a temperatura de 45

°C. La concentración del alperujo tiene un efecto negativo en el desarrollo de las bacterias, la depuración del alpechín por biometanización es difícil debido a la actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos (Maestro Durán et al. 1991); sin embargo esta variable no tuvo un efecto significativo en el desarrollo de *Beijerinckia mobilis*, al ser una bacteria aislada del alperujo, está adaptada a las condiciones de este residuo de la aceituna, sin embargo el proceso se optimizó a una concentración de 50 % de té de alperujo. La agitación se midió en rpm 100, 200 y 300, la agitación favorece el incremento de aire en el medio de cultivo y homogeniza los nutrientes, al ser *Beijerinckia* una bacteria aerobia, la agitación favoreció su crecimiento, optimizando el proceso a 200 rpm, Becking (1961) describió a *Beijerinckia mobilis* como una bacteria aeróbica. La producción de biomasa llegó a un valor máximo de $1,28 \times 10^9$ cel/mL overnight (20 horas de incubación) (Tabla 34-Anexo 3). En la Tabla 11 se observa la optimización de los factores estudiados, para maximizar la biomasa los parámetros obtenidos fueron: 50 % de concentración de alperujo a una temperatura de 29 °C con 300 rpm de agitación, el valor óptimo es $9,51 \times 10^8$ de concentración de *Beijerinckia mobilis*, comparando el crecimiento microbiano con bacterias del género *Rhizobium etli* en el Caldo Levadura Manitol, y en recuento en cámara de Neubauer, llegó a una concentración de $1,61 \times 10^9$ a las 52 horas en un medio optimizado para la bacteria del género *Rhizobium* (Chipana, 2015).

Las bacterias fueron contadas por concentración células/mL, debido a que nuestro objetivo era obtener la mayor de cantidad de células para que puedan actuar como fertilizantes, sin embargo para otros procesos como la obtención de bioplásticos se dejaría incubar hasta la fase estacionaria, debido que en esta etapa la bacteria aumenta en biomasa, incrementando en tamaño y produciendo las inclusiones de polihidroxybutiratos o polihidroxi alcanos, además que esta bacteria produce gran cantidad de exopolisacárido, (Becking, 1961). Cerrone (2001) obtuvo polihidroxi alcanos para la producción de bioplásticos a base de la fermentación de *Azotobacter sp* en caldo de alperujo. *Beijerinckia mobilis* al ser una bacteria metilotrófica que puede utilizar el metanol como fuente de energía, puede utilizar el alperujo como una alternativa para producir polihidroxi alcanos o polihidroxybutiratos para la producción de bioplásticos. Dedysh et al, (2005), reportó el crecimiento de *B. mobilis* en un amplio, rango de concentraciones de metanol, que se puede dar desde 0,01 hasta 3 % (vol/vol), con un crecimiento óptimo entre 0,05 y 0,5 % (vol/vol) de CH₃OH, esto explica el crecimiento de *B. mobilis* en el alperujo, el cual al ser almacenado es fermentado por levaduras y hongos produciendo pequeñas cantidades de metanol, junto con la glucosa residual permiten el crecimiento de *B. mobilis*

Se obtuvo el coeficiente de regresión para la producción de biomasa, para optimizar los parámetros evaluados, esto nos permite estimar y predecir la concentración de biomasa de *Beijerinckia mobilis*, como se observa en la Tabla 12 en valores reales y ajustados de biomasa.

La interacción que tienen las variables para la producción de biomasa, indica que la concentración de alperujo y la temperatura no interactúan entre sí, sin embargo la concentración de alperujo y la agitación así como la temperatura si tienen interacción (Figura 16).

Para la evaluación del bioinoculante se realizó mediante un diseño unifactorial de cuadrado latino, para determinar el efecto del inoculante (té de alperujo) a diferentes concentraciones y con 2 variables intervinientes, (la aplicación de BIOL y la profundidad de siembra de la semilla), este diseño tuvo 16 tratamientos con 15 repeticiones, lo que dio un total de 256 unidades experimentales (Tabla 4).

En los resultados de las Pruebas de Múltiple Rangos para la Germinación por concentración de *Beijerinckia mobilis* (Figura 15), se observa el valor promedio en la germinación de la concentración de *Beijerinckia mobilis* por semillero, en cada uno se agregó 3 semillas y no hubo diferencia significativa entre las concentraciones. Al aplicar el té de alperujo en la concentración de 10^9 cel/g sin ser diluido, esto demuestra que el té de alperujo con *Beijerinckia mobilis* no es tóxico para las plantas como si lo puede ser el biol como lo reporta Aguado et al. (2023), quienes aplicaron biol a diferentes concentraciones y siendo las de 10 y 15 % tóxicas para las semillas disminuyendo el porcentaje de germinación. Cuando se comparó los días de germinación de las plantas se observó que a los diez días, hubo una mayor germinación en los tratamientos que contenían concentraciones de 10^7 y 10^9 de *Beijerinckia mobilis* llegando a un 93,75 % (B7, B12 Y B14) de germinación, siendo estos los primeros tratamientos en germinar (Figura 16), el alperujo es considerado un contaminante de suelo, debido a que contiene polifenoles los cuales son antimicrobianos y eso resulta tóxico para el suelo, sin embargo *B.mobilis* cepa Cepa: UQM 1969, la cual tuvo una identidad del 100 % con la cepa aislada, contiene genes bcr (degradadores del tolueno y fenol), pcaH, pcaG, pcaF (dioxigenasas fenólicas), katG (peroxidasas), alkB (alcano monoxigenasa), mxaF (metanol deshidrogenasa) (*Beijerinckia mobilis* (ID 33186) - Genoma - NCBI, s. f.); y cbbL (y la forma I RubisCO) (Dedysh et al. 2005), estos genes le proveen la capacidad de degradar los fenoles y ser autotrófica para usar el metanol y etanol como fuente de carbono, estos microorganismos además de tener la capacidad de ser utilizada como bioinoculantes, pueden cumplir un rol importante en la descontaminación de suelos,

incluso para descontaminar suelos con hidrocarburos y pesticidas. El BIOL tuvo un efecto en la germinación de las semillas al finalizar los 25 días esto se explica porque el BIOL fue aplicado de manera foliar, debido a que los bioles tienen sustancias como el ácido giberílico, auxinas y ácido indolacético, el cual influye en la germinación de las plantas (Díaz Montoya, 2017), así mismo el autor reporta en su estudio un porcentaje más bajo de germinación aproximadamente un 60 %, a diferencia del inóculo del té de alperujo que llegó a un 100 %. Se concluye que el BIOL y el té de alperujo son complementarios en la germinación de las semillas, pero el BIOL debe ser aplicado de manera foliar no directamente a la semilla, esto favoreció que hubiera una germinación de casi el 100 % a nivel de almácigo con semillas de tomate.

En los resultados de las Pruebas de Múltiple Rangos para el tamaño total de la planta (Figura 16) incluida la radícula y los resultados de las Pruebas de Múltiple Rangos para el tamaño de la planta por concentración de *Beijerinckia mobilis* (Figura 20) en donde se observa valores superiores de la media en el tratamiento con concentración de 10^7 cel/g de *Beijerinckia mobilis* y no se observa una diferencia significativa con la concentración 10^9 y el control negativo, esto se explica por la aplicación foliar del biol, la cual al ser aplicada en el almácigo pudo afectar indirectamente a las plantas del control negativo, por lo que no se observó una diferencia significativa. Bécquer et al. (2013) y Rodríguez (2015) en las evaluaciones realizadas a sus cultivos inoculadas con *Beijerinckia*, favoreció el crecimiento de las plantas, en el Anexo 4 (Tabla 39) se evidencia el menor tamaño de la planta en el control negativo B5 con 3.2 cm de largo. Tanto el BIOL como el té de alperujo tienen sustancias como vitaminas y reguladores del crecimiento vegetal lo que permitió la germinación de las plantas de tomate, además de la capacidad de fijar nitrógeno existen cinco tipos de hormonas del crecimiento vegetal: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno y ácido abscísico (Arshad y Frankenberger, 1998).

En los resultados de las Pruebas de Múltiple Rangos para el tamaño de la raíz por concentración de *Beijerinckia mobilis* (Figura 17) se observa que la concentración 10^7 cel/g por semilla la tuvo el promedio más alto 3,44 cm, pero no tuvo diferencia significativa con la concentración de 10^9 cel/g. Esto coincide con el estudio realizado por Sukweenadhi et al. (2022) el cual tuvo la media más alta en la longitud de raíz promedio de su tratamiento con *Beijerinckia*. El tamaño de la raíz tiene relación con la absorción de agua y nutrientes asimilados por la planta, por lo tanto esto contribuye al rendimiento del cultivo (Hernandez-Rodriguez, et al. 2010).

La absorción de nutrientes por parte de las raíces del tomate es un proceso fundamental para el crecimiento y desarrollo saludable de las plantas. La raíz del tomate es responsable de absorber y transportar los nutrientes esenciales del suelo al resto de la planta. (Marschner, H. 2012); la cepa de *Beijerinckia mobilis* presenta el gen indole-3-glycerol phosphate synthase (TrpC) (*Beijerinckia mobilis* (ID 33186) - Genoma - NCBI, s. f.), esta enzima produce antranilato que se degrada a ácido indol acético (Ouyang et al. 2000), esta vía explica el incremento de tamaño de las raíces de las plántulas del tomate, debido a la producción AIA.

En las Figuras 20 y 21 se observan los resultados de la media de número y tamaño de hojas, que muestran que los mayores promedios son los de las concentraciones 10^7 y 10^9 de *Beijerinckia mobilis* aunque no se evidencian diferencias estadísticas significativas entre estas. La investigación de Rodríguez (2015) muestra un resultado similar en el efecto de la *Beijerinckia mobilis* en las hojas, al igual que sus resultados con el peso del cultivo inoculados con esta bacteria. En la Figura 23 se observa que la media del peso total de las plantas fue similar en las diferentes concentraciones, siendo mayor la media de la concentración de 10^7 cel/g.

Los resultados obtenidos sobre la concentración de *Beijerinckia mobilis* nos indican que esta bacteria tiene incidencia en la raíz del cultivo, lo cual es favorable para el desarrollo de la planta ya que habrá mayor absorción de nutrientes, se observó una diferencia significativa en el desarrollo radicular, además se evidencia la potencialidad de ser un microorganismo con capacidad de biorremediación de suelos contaminados con compuestos fenólicos como el alperujo, hidrocarburos y pesticidas.

CONCLUSIONES

Se logro elaborar un bioinoculante a base de té de alperujo inoculado con la bacteria *Beijerinckia mobilis* el cual demostró una capacidad fertilizante en el cultivo de *Solanum Lycopersicum* (tomate).

Se aislaron cuatro cepas bacterianas con capacidad de crecer en medios libres de nitrógeno y en la cepa A4 se comprobó la presencia de los genes nif A y nif H, el secuenciamiento del gen 16S ARNr determinó con una identidad del 100% a la especie *Beijerinckia mobilis*.

Los parámetros óptimos en temperatura, agitación y concentración de alperujo para obtener biomasa de *Beijerinckia mobilis* fueron de: 29°C, 300 rpm y 50% de alperujo, logrando una concentración máxima ajustada al modelo matemático de 9.5×10^8 , la temperatura tuvo un efecto negativo para el crecimiento bacteriano comprobando que no es una bacteria termotolerante.

La concentración de té de alperujo que tuvo un mayor efecto fertilizante en las características fenológicas en el germinado de tomate fue de 10^7 cel/g de semilla, se evidenció un efecto significativo en el tamaño de la raíz comparado con el tratamiento control.

RECOMENDACIONES

Realizar investigaciones sobre la capacidad de biorremediación de suelos contaminados con alperujo, alpechín con la Bacteria *Beijerinckia mobilis*.

Realizar un estudio genético y transcriptómico para determinar el potencial de la cepa A4 *Beijerinckia mobilis* para ser utilizado en procesos de biorremediación y su capacidad metilotrófica.

Considerar la aplicación de este bioinoculante al cultivo de olivo, ya que así las empresas productoras de aceite olivo que generan este residuo podrían reutilizar su residuo aportando así con un impacto positivo al medio ambiente y promoviendo la economía circular al ellos mismos producir su fertilizante desde sus residuos.

Fomentar el uso de este producto biotecnológico el cual tiene beneficios fertilizantes y probablemente biorremediadores, a diferencia del uso de insumos fertilizantes químicos.

Seguir realizando investigaciones de este bioinoculante a nivel piloto e industrial para poder obtener un producto biotecnológico industrializado que se pueda liofilizar para promover el uso en empresas agrícolas.

Realizar estudios de la capacidad de la *Beijerinckia mobilis* para la producción de polihidroxybutirato, debido a que esta característica tiene la potencialidad para la producción de bioplásticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguado, G. D., Uliarte, E. M., & Funes-Pinter, I. (2023). Efecto de diferentes concentraciones de BIOL en la germinación y producción de plantines de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 76(1), Article 1. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v76n1.99647>
- Agencia Agraria de Noticias. (2023). Agraria.pe Agencia Agraria de Noticias. <https://agraria.pe/noticias/tacna-concentra-el-81-4-de-las-areas-de-aceituna-que-existen-26124>
- Agrafojo, D. V., Sánchez, M. B. F., Pacheco, M. P. H., Jiménez, J. M. P., Blanco, R. L., & Moreno, F. M. (2006). Estudio sobre la contaminación real producida por bodegas y almazaras en diez municipios de extremadura.
- AL-Shwaiman, H. A., Shahid, M., Elgorban, A. M., Siddique, K. H. M., & Syed, A. (2022). *Beijerinckia fluminensis* BFC-33, a novel multi-stress-tolerant soil bacterium: Deciphering the stress amelioration, phytopathogenic inhibition and growth promotion in *Triticum aestivum* (L.). *Chemosphere*, 295, 133843. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133843>
- Altamirano León, L., & Ramos Romero, E. (2016). Rendimiento de polihidroxialcanoatos producidos por bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de *Asparagus officinalis* L., noviembre – diciembre, 2016. <https://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12893/1988/BC-TESTMP-842.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Arshad, M., & Frankenberger, W. T. (1991). Microbial production of plant hormones. *Plant and Soil*, 133(1), 1-8. <https://doi.org/10.1007/BF00011893>
- Barajas, L. N. A. (2017). Biofertilizantes: Conceptos, beneficios y su aplicación en Colombia. 12.
- Bastidas, O. (2021). Technical Note—Neubauer Chamber Cell Counting.
- Becking JH (1961) Estudios sobre bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Beijerinckia*. I. Distribución geográfica y ecológica de los suelos. *Suelo vegetal* 14: 49–81.
- Beijerinckia mobilis* (ID 33186)—Genoma—NCBI. (s. f.). Recuperado 18 de junio de 2023, de [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid231434\[orgn\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid231434[orgn]).

- Becking JH (1984a) Género *Beijerinckia*. En el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey, 1ª ed., vol. 1, Kreig NR y Holt JC (eds). Williams & Wilkins Co., Baltimore: 311
- Becking, J. H. (2006). The Genus *Beijerinckia*. En M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes: Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses* (pp. 151-162). Springer. https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1_8
- Bécquer, C. J., Salas, B., Slaski, J., Archambault, D., & Anya, A. (2013). Influencia de bacterias rizosféricas en la germinación y crecimiento inicial de *Sporobolus cryptandrus* (Torr.) A. Gray. <https://www.redalyc.org/pdf/1930/193029815018.pdf>
- Behera, T. K., John, K. J., Bharathi, L. K., & Karuppaiyan, R. (2011). Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources (C. Kole, Ed.; pp. 217-246). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20450-0_10
- Bustamante, F. G. T. (2019). Detección de genes *nif h* y *phod* en bacterias endófitas y epífitas.
- Cabrera, F. (1995). Características y tratamiento de las aguas residuales industriales por sectores: molturado de aceituna para la obtención de aceite de oliva virgen. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, CSIC
- Cerrone, F. (2011). Producción de polímeros biopoliméricos desde alpeorujos por medio de bacterias fijadoras de nitrógeno.pdf.
- Chen, G. Q., Wu, Q., & Chen, J. C. (2019). Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 123-132.
- Chipana L., V. L. (2015). Efecto de la concentración del biofertilizante *Rhizobium* sp. En el rendimiento, calidad y rentabilidad de *Phaseolus vulgaris* L. (Vainita) en condiciones de campo.
- Clavijo, C., Chipana, V., Centeno, J., Zúñiga, D., y Guillén, C. (2012). Aislamiento, Caracterización e Identificación de Bacterias Diazotróficas de la Rizósfera del Cultivo de *Olea* Europea "olivo" en Tacna Perú. *Ecología Aplicada*, 11(1-2), 89.
- Corrales-Lozada, M., Lumbres, V., Iglesias-Osores, S., & Carreño-Farfán, C. (2020). Potencialidades de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, aisladas de

Portulaca oleracea L. en suelos con salinidad.
<http://scielo.sld.cu/pdf/pyf/v43n2/2078-8452-pyf-43-02-93.pdf>

- Curatti, L., Hernandez, J. A., Igarashi, R. Y., Soboh, B., Zhao, D., & Rubio, L. M. (2007). In vitro synthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase from iron, sulfur, molybdenum, and homocitrate using purified proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(51), 17626-17631. doi:10.1073/pnas.0707712104
- Das, S., Dash, H. R., & Chakraborty, J. (2016). Genetic basis and importance of metal resistant genes in bacteria for bioremediation of contaminated environments with toxic metal pollutants. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(7), 2967-2984.
- Dedysh, S. N., Horz, H.-P., Dunfield, P. F., & Liesack, W. (2001). A novel pmoA lineage represented by the acidophilic methanotrophic bacterium *Methylocapsa acidophila* B2. *Archives of Microbiology*, 177(1), 117-121. <https://doi.org/10.1007/s00203-001-0362-6>.
- Dedysh, S. N., Ricke, P., & Liesack, W. (2004). NifH and NifD phylogenies: An evolutionary basis for understanding nitrogen fixation capabilities of methanotrophic bacteria. *Microbiology (Reading, England)*, 150(Pt 5), 1301-1313. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26585-0>
- Dedysh SN, Smirnova KV, Khmelenina VN, Suzina NE, Lie sack W y Trotsenko YA (2005) Autotrofia metilotrónica en *Beijerinckia mobilis*. *J Bacteriol* 187: 3884–3888.
- Delgado, A. C. L., & Cordoba, A. M. (2015). Polyhydroxyalkanoates (PHA's) produced by bacteria and its potential application to industrial level. *Informador Técnico*.
- Demotes-Mainard, S., Péron, T., Corot, A., Bertheloot, J., Le Gourrierec, J., Pelleschi-Travier, S., ... & Boumaza, R. (2016). Plant responses to red and far-red lights, applications in horticulture. *Environmental and Experimental Botany*, 121, 4-21.
- Díaz Montoya, A. J. (2017). Características fisicoquímicas y microbiológicas del proceso de elaboración de BIOL y su efecto en germinación de semillas.
- Döbereiner, J., & Ruschel, A. P. (1958). Nitrogen fixation by *Beijerinckia* species. *Journal of General Microbiology*, 18(3), 552-559.

- E Venkadeswaran, Vethamoni, P. I., Arumugam, T., Manivannan, N., & Harish, S. (2018). Evaluating the yield and quality characters of cherry tomato [*Solanum lycopersicum* (L.) var. *Cerasiforme* Mill.] genotypes. *International Journal of Chemical Studies*.
- Elad, Y., Pertot, I., & Cotes, A. M. (Eds.). (2016). *Advances in Botanical Research: Botrytis—The Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Academic Press.
- Esqueche, A., & Quispe, G. (2017). Caracterización de bacterias del género *Azotobacter* aisladas de rizoplano y rizósfera de *Asparagus officinalis* L. y su potencial como promotoras de crecimiento en plantas.
- Eugenia Baca, B., Soto Urzúa, L., & Pardo Ruiz, P. (2000). Fijación biológica nitrógeno.
- Fisher, R. F., Long, S. R., Swanson, J. A., & Yoon, S. H. (2016). Nitrogen fixation by rhizobia—The roots of a symbiotic relationship. In *The Rhizobiaceae* (pp. 1-63). Springer.
- Fraser, P. D., & Bramley, P. M. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*, 43(3), 228-265.
- García, A. (2023). Cultivo hortícola. En *Manual de Horticultura* (pp. 123-125). Editorial XYZ.
- García, C. (2015). Validación de un bioinoculante a base de bacterias diazotróficas en el crecimiento, desarrollo y rendimiento agrícola de (*Phaseolus Vulgaris* L.).
- García, C., Y Civantos, O. (2016). Aprovechamiento Del alperujo Como Enmienda Orgánica En El Olivar. .
- García, S. C. (2004). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno
- GOMATHI, V. & Ramalakshmi, A. & RAMASAMY, K.. (2005). Isolation of Nitrogen Fixing Bacteria from Fungus Termites. *Entomological Research*. 35. 75-78.
- González, M. (2023). Estrés hídrico. En *Enciclopedia de Botánica* (pp. 345-347). Editorial XYZ.
- González, M. (2023). Inflorescencia. En *Enciclopedia de Botánica* (pp. 123-125). Editorial XYZ.

- Gramaglia, M., Castaño, E., Centeno Toledo, F., Heredia, T., Saracho, R., Roberst, E., & Bárbaro, G. D. (2019). Bioensayo de germinación: bacterización de semillas hortícolas con *azospirillum brasilense*.
- Hernandez-Rodriguez, A., Heydrich, M., Diallo, B., El Jaziri, M., & Vansaputte, O. (2010). Cellfree culture medium of *Burkholderia cepacia* improves seed germination and seedling growth in maize (*Zae mays*) and rice (*Oryza sativa*). *Plant Growth Regul*, 191-197.
- Hirschberg, J. (2001). Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(3), 210-218.
- Huergo, L. F., & Dixon, R. (2015). The emergence of 2-oxoglutarate as a master regulator metabolite. *Microbiology*, 161(3), 639-644. doi:10.1099/mic.0.000060
- Izumi, H., Anderson, I. C., Alexander, I. J., Killham, K., & Moore, E. R. B. (2006). Diversity and expression of nitrogenase genes (*nifH*) from ectomycorrhizas of Corsican pine (*Pinus nigra*). *Environmental Microbiology*, 8(12), 2224-2230. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01104.x>
- Kaiser, B. N., & Brutnell, T. P. (2003). Evolution of nitrogen utilization pathways. *Trends in Plant Science*, 8(2), 78-84. doi:10.1016/S1360-1385(02)00049-4
- Kennedy, C. (2005). Genus I. *Beijerinckia* Derx 1950a, 145AL.
- Kim, E., & Zylstra, G. (1995). Molecular and biochemical characterization of two meta-cleavage dioxygenases involved in biphenyl and m-xylene degradation by *Beijerinckia* sp. Strain B1. *Journal of Bacteriology*, 177(11), 3095-3103. <https://doi.org/10.1128/jb.177.11.3095-3103.1995>
- López, S. (2023). Enfermedad fúngica. En *Manual de Fitopatología* (pp. 234-236). Editorial ABC.
- Maitra, S., Brestic, M., Bhadra, P., Shankar, T., Praharaj, S., Palai, J. B., Shah, M. M. R., Barek, V., Ondrisik, P., Skalický, M., & Hossain, A. (2021). bioinoculantes—Natural Biological Resources for Sustainable Plant Production. *Microorganisms*, 10(1), 51.
- Marschner, H. (2011). *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press.
- Miranda Gutiérrez, J. S. (2018). Factores Que Intervienen En La Contaminación Del Suelo Por Aguas Residuales Del Proceso De Fermentación De Aceitunas

Verdes Estilo Sevillana En El Distrito De La Yarada Los Palos, Región De Tacna, 2017.

- Moreno Reséndez, A., García Mendoza, V., Reyes Carrillo, J. L., Vásquez Arroyo, J., y Cano Ríos, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: Una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 68-83.
- Mourato, M. P., Moreira, I. N., Leitão, I., Pinto, F. R., Sales, J. R., Louro Martins, L., & Castro, P. M. (2018). Phenolic compounds: Structure, biological activity and environmental effects. *Environmental Chemistry Letters*, 16(4), 1309-1335. doi:10.1007/s10311-018-0762-6
- Nunes Oliveira, F. L., Silva Oliveira, W., Pereira Stamford, N., Nova Silva, E. V., e Silva Santos, C. E. R., & Santiago Freitas, A. D. (2017). Effectiveness of biofertilizer enriched in N by *Beijerinckia indica* on sugarcane grown on an Ultisol and the interactive effects between biofertilizer and sugarcane filter cake. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 17(4), 1040-1057. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162017000400015>
- Orzolek, M. D., & Miller, W. B. (2013). Tomato Production Systems. In *Greenhouse Vegetable Production* (pp. 87-134). CRC Press.
- Ouyang, J., Shao, X., & Li, J. (2000). Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 24(3), 327-334. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00883.x>
- Ramírez Bazán, L., & Ugaz Hoyos, J. (2014). Bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno en *Oryza sativa* L. «arroz», Lambayeque, 2014. <https://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12893/8/BC-TES-3593.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Raymond, J., Siefert, J. L., Staples, C. R., & Blankenship, R. E. (2004). The natural history of nitrogen fixation. *Molecular Biology and Evolution*, 21(3), 541-554. doi:10.1093/molbev/msh047
- Razifard, H., Ramos, A., Della Valle, A. L., Bodary, C., Goetz, E., Manser, E. J., Li, X., Zhang, L., Visa, S., Tieman, D., van der Knaap, E., & Caicedo, A. L. (2020). Genomic Evidence for Complex Domestication History of the Cultivated Tomato

- in Latin America. *Molecular Biology and Evolution*, 37(4), 1118-1132. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz297>
- Rodríguez, T. X. Á. (2015). Caracterización e identificación de bacterias rizosféricas y su efecto en interacción con el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*). Var. Bolona.
- Romero-Perdomo, F., Abril, J., Camelo, M., Moreno-Galván, A., Pastrana, I., Rojas-Tapias, D., y Bonilla, R. (2017). *Azotobacter chroococcum* as a potentially useful bacterial biofertilizer for cotton (*Gossypium hirsutum*): Effect in reducing N fertilization. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(4), 377-383.
- Romero-Perdomo, F., Ocampo-Gallego, J., Camelo-Rusique, M., Bonilla, R., (2019). Plant growth promoting rhizobacteria and their potential as bioinoculantes on *Pennisetum clandestinum* (Poaceae). *Revista de Biología Tropical*, 67(4), 825-832. <https://doi.org/10.15517/rbt.v67i4.34029>
- Rosselló-Móra, R., & Amann, R. (2015). Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(4), 209-216.
- Rosselló-Móra, R., & Amann, R. (2015). Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(4), 209-216.
- Sánchez-Yáñez, J. M., Ayala, I. Y. L., Villegas, J., y Arias, N. M. M. (2014). Respuesta del maíz (*Zea mays* L) a la inoculación con *Azotobacter* spp y *Burkholderia* spp a dosis reducida de fertilizante nitrogenado. *Scientia Agropecuaria*, 7.
- Santos, L. H. M. L. M., Araújo, A. N., Castro, B. B., Marques, C. R., & Gonçalves, F. (2012). Toxicity of phenolic compounds to aquatic organisms: A review. *Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 92(1), 1-26. doi:10.1007/s00216-011-5360-6
- Smith, A. (2023). Fructificación. En *Encyclopedia of Plant Biology* (pp. 234-236). Editorial XYZ.
- Smith, J. (2023). Polinización. En *Encyclopedia of Botany* (pp. 123-125). Editorial ABC.
- Smirnova, K. V., Dedysh, S. N., Khmekenina, V. N., & Trotsenko, I. A. (2005). Methanol and glucose metabolism in *Beijerinckia mobilis*.
- Soto Urzúa, L., & Eugenia Baca, B. (2001). Mecanismos de Protección de la Nitrogenasa a la Inactivación por Oxígeno.

- Stackebrandt, E., & Ebers, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today*, 33(4), 152-155.
- Stackebrandt, E., & Ebers, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today*, 33(4), 152-155.
- Sukweenadhi, J., Sutanto, K., Artadana, I. B. M., Savitri, W. D., & Khang, S. C. (2022). The Effect of *Beijerinckia fluminensis* G3 and *Rhizobium pusense* G4c on Germination of rice Var. Ciherang and red rice Var. Barak Cenana. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1083(1), 012025. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1083/1/012025>.
- Surovtseva, E. G., Ivořlov, V. S., & Beliaev, S. S. (1999). Fizilogo-biokhimicheskie svořstva shtamma *Beijerinckia mobilis* 1phi Phn+---destruktora politsiklicheskikh aromatičeskikh uglevodorodov [Physiologo-biochemical properties of a strain of *Beijerinckia mobilis* 1phi Phn+---a degrader of polycyclic aromatic hydrocarbons]. *Mikrobiologija*, 68(6), 845–850.
- Szymkowiak, E., & Sussex, I. M. (1992). What chimeras can tell us about plant development. *Annual Review of Plant Biology*, 43(1), 289-304.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2014). *Plant Physiology and Development*. Sinauer Associates, Inc.
- Universidad nacional de la plata. (2017). *Morfología de la semilla*.
- Vallone, S., Falcone, G., Sala, T., & Cortis, P. (2014). Simulation of subsurface water flow in a greenhouse tomato cropping system. *Irrigation Science*, 32(2), 131-141.
- Vrebalov, J., Ruezinsky, D., Padmanabhan, V., White, R., Medrano, D., Drake, R. & Giovannoni, J. (2002). A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (*rin*) locus. *Science*, 296(5566), 343-346.
- Wahyuni, Y., Ballester, A. R., Sudarmonowati, E., Bino, R. J., & Bovy, A. G. (2011). Metabolite biodiversity in tomato fruit: a gap between quality and perception. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(15), 2906-2913.
- Wang, J., & Mus, F. (2016). A new player in bacterial nitrogen fixation: A flavin-doped molybdenum nitrogenase. *Chemical Science*, 7(9), 5492-5497. doi:10.1039/C6SC01936K
- Willey, J.M., L.M. Sherwood, C.J. Woolverton. 2011. *Prescott's Microbiology Companion Site*, 8^a ed. McGraw-Hill Ryerson Ltd.

- Xie, H., Zhang, Y., & Wang, H. (2020). Effects of phenolic compounds on soil microbial communities and their roles in ecological processes: A review. *Chemosphere*, 242, 125093. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.125093
- Xu, C., Xu, Z., Zhu, S., Zhou, G., & Li, Y. (2020). Ecological effects of phenolic compounds on soil microorganisms: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 191, 110156. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.110156
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K. H., ... & Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences
- Zehr, J. P., Mellon, M. T., & Zani, S. (1998). New nitrogen-fixing microorganisms detected in oligotrophic oceans by amplification of nitrogenase (NifH) genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3444-3450.
- Ziesemer, K. A., Mann, A. E., Sankaranarayanan, K., Schroeder, H., Ozga, A. T., Brandt, B. W., Zaura, E., Waters-Rist, A., Hoogland, M., Salazar-García, D. C., Aldenderfer, M., Speller, C., Hendy, J., Weston, D. A., MacDonald, S. J., Thomas, G. H., Collins, M. J., Lewis, C. M., Hofman, C., & Warinner, C. (2015). Intrinsic challenges in ancient microbiome reconstruction using 16S rRNA gene amplification. *Scientific Reports*, 5(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep16498>

ANEXOS

ANEXO 1. Matriz de consistencia

Tabla 15

*Matriz de consistencia de la elaboración de un bioinoculante con capacidad fertilizante a base de *Beijerinckia mobilis* en té de alperujo*

Planteamiento del problema	Hipótesis	Objetivo	Variable	Indicador	Método	Estadística
¿Es posible aislar e identificar molecular y genéticamente cepas nativas de <i>Beijerinckia mobilis</i> con capacidad de desarrollarse en té de alperujo?	Se aíslan bacterias de la especie <i>Beijerinckia mobilis</i> con capacidad de fijar nitrógeno y se identifican genes nif, los cuales están asociados a la fijación biológica de nitrógeno.	Aislar e identificar genética y molecularmente cepas de <i>Beijerinckia mobilis</i> .	Cepa	Características de colonia	Métodos microbiológicos	Descriptiva
			Genes	CT	Métodos moleculares	
¿Cuál es el efecto de la concentración del bioinoculante a base de <i>Beijerinckia mobilis</i> en té de alperujo en el desarrollo de las características fenológicas de las plantas de tomate?	Se logran obtener parámetros óptimos fisicoquímicos y nutricionales para el crecimiento de <i>Beijerinckia mobilis</i> , para la obtención de biomasa.	Determinar los parámetros óptimos fisicoquímicos y nutricionales para el crecimiento de <i>Beijerinckia mobilis</i> en té de alperujo.	Concentración celular/volumen	cel/mL	Método de recuento directo	Experimental Factorial Multinivel
			Porcentaje germinación tratamiento	de por	. %	
¿Cuál es el efecto fertilizante del bioinoculante en el cultivo de tomate?	Se obtiene un efecto del bioinoculante a base de <i>Beijerinckia mobilis</i> en té de alperujo sobre el crecimiento y desarrollo de la planta del tomate.C11	Evaluar el efecto de la concentración del bioinoculante a base de <i>Beijerinckia mobilis</i> en té de alperujo en la germinación y las características fenológicas de plantas de tomate.	Germinación por semillero	N°	Método de medición	Experimental Unifactorial
			Tamaño total	cm		
			Tamaño de la raíz	cm		
			Número de hojas	N°		
			Tamaño de hoja	cm		
Tamaño de la planta	cm					
			Peso total	g		

ANEXO 2. Monitoreo de la curva de crecimiento de la *Beijerinckia mobilis*

Tabla 16

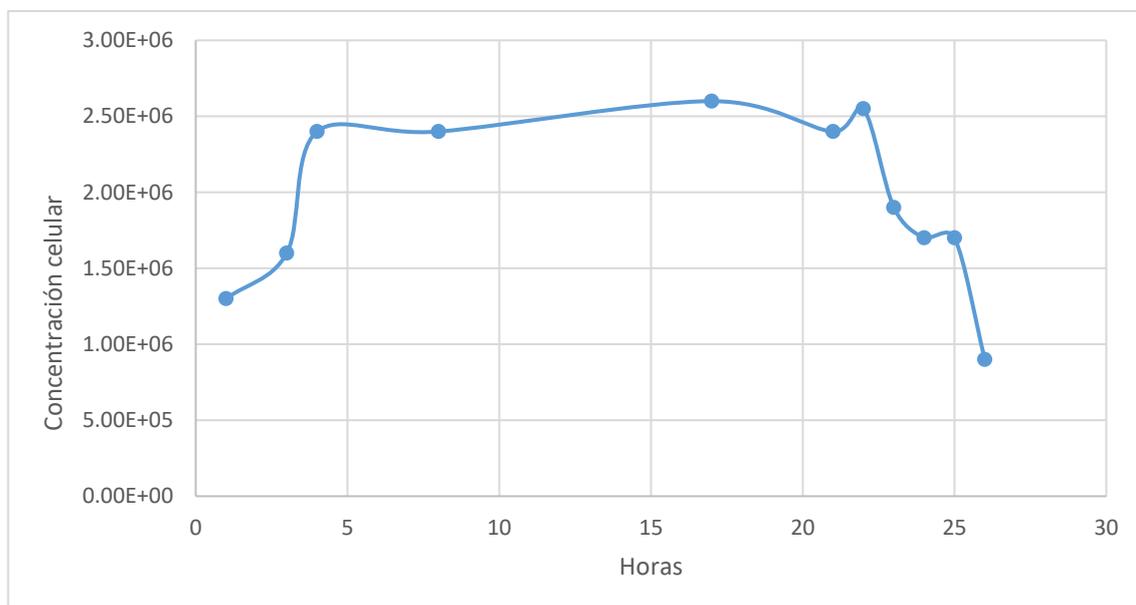
Crecimiento celular en caldo Ashby

Horas	Concentración	Recuentos					Diluciones
1	1,30E+06	1	9	6	6	4	0
2	3,50E+06	4	16	38	7	5	0
3	1,60E+06	7	9	6	7	3	0
4	2,40E+06	8	4	11	16	9	0
5	3,15E+06	25	17	3	15	3	0
6	8,60E+06	22	26	39	39	46	0
7	1,10E+06	5	5	2	8	2	0
8	2,40E+06	12	12	8	10	7	0
9	2,25E+06	9	8	7	10	11	0
10	1,50E+06	5	6	5	7	7	0
11	1,20E+06	8	3	4	3	6	0
12	1,30E+06	3	2	13	4	4	0
13	9,50E+05	0	3	4	5	7	0
14	9,00E+05	0	6	4	3	5	0
15	4,50E+05	0	2	3	4	0	0
16	2,25E+06	5	11	12	15	2	0
17	2,60E+06	18	1	4	6	23	0
18	1,00E+06	1	7	4	1	7	0
19	1,50E+06	2	12	2	11	3	0
20	2,30E+06	6	17	7	10	6	0
21	2,40E+06	7	17	7	8	9	0
22	2,55E+06	12	7	13	11	8	0
23	1,90E+06	8	7	10	7	6	0
24	1,70E+06	9	7	6	4	8	0
25	1,70E+06	0	9	9	13	4	0
26	9,00E+05	3	3	3	1	8	0
27	5,00E+05	4	3	2	0	1	0
28	3,00E+05	0	2	1	1	2	0
37	4,00E+05	1	3	0	1	3	0

Nota. Esta tabla indica el crecimiento microbiano de la *Beijerinckia mobilis* en el caldo Ashby.

Figura 22

Producción de biomasa (cel/mL) de Beijerinckia mobilis en el caldo Ashby

**Tabla 17**

Crecimiento celular en té de alperujo

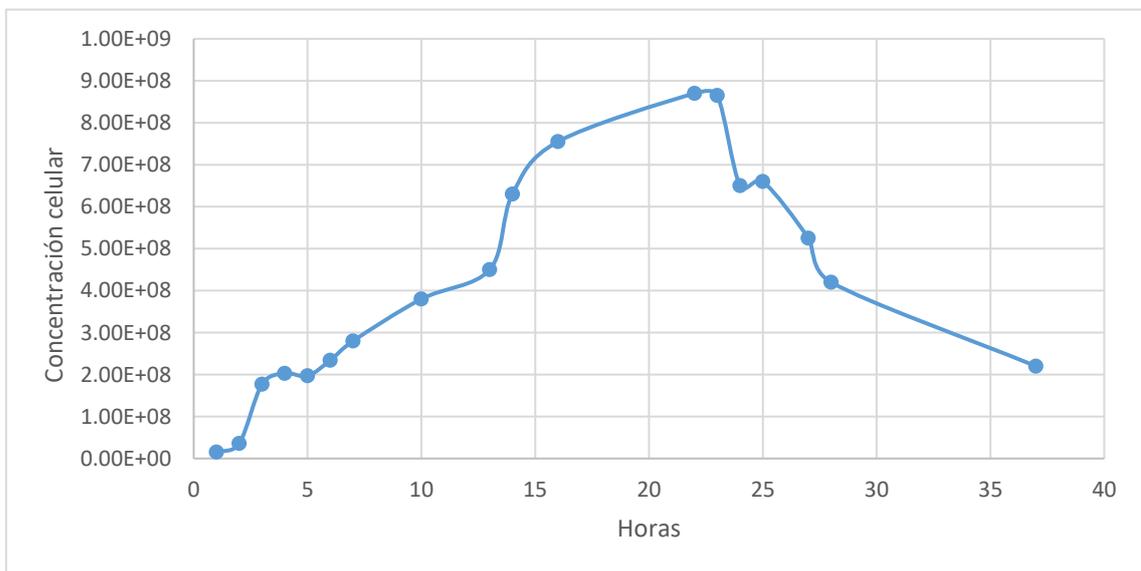
Horas	Concentración	Recuentos					Diluciones
1	1,52E+07	51	47	30	78	99	0
2	3,60E+07	151	162	118	156	136	0
3	1,77E+08	98	59	57	88	51	1
4	2,03E+08	58	121	59	79	89	1
5	1,97E+08	94	61	79	72	87	1
6	2,34E+08	86	93	92	90	107	1
7	2,80E+08	171	85	136	93	74	1
8	5,85E+08	14	22	33	17	31	2
9	4,10E+08	16	19	18	17	12	2
10	3,80E+08	12	19	20	12	14	2
11	3,30E+08	11	16	16	15	8	2
12	2,90E+08	16	5	11	16	10	2
13	4,50E+08	19	14	21	15	21	2
14	6,30E+08	21	21	27	28	29	2
15	1,94E+08	113	60	69	57	89	2
16	7,55E+08	28	27	32	34	30	2
17	4,00E+08	13	19	19	17	12	2
18	1,18E+09	46	29	92	43	26	2
19	3,75E+08	9	12	10	26	18	2
20	5,85E+08	24	29	18	24	22	2
21	5,80E+08	34	24	16	28	14	2
22	8,70E+08	33	36	33	37	35	2

23	8,65E+08	37	25	49	32	30	2
24	6,50E+08	22	23	29	31	25	2
25	6,60E+08	25	24	23	23	58	2
26	3,60E+08	12	16	14	17	13	2
27	5,25E+08	28	18	20	20	19	2
28	4,20E+08	15	18	13	8	10	2
37	2,20E+08	13	8	10	6	8	2

Nota. Esta tabla indica el crecimiento microbiano de la *Beijerinckia mobilis* en el té de alperujo, teniendo su pico a las 20h con una concentración mayor la que se inoculo: $1,18 \times 10^9$ cel/mL.

Figura 23

Producción de biomasa (cel/mL) de Beijerinckia mobilis en el té de alperujo



Cálculo de parámetros que definen el crecimiento de la bacteria:

Para la curva de crecimiento en caldo Ashby:

- Tiempo de generación

$$g = 0,693 / \mu \quad (3)$$

$$g = 0,693 / 0,0355$$

$$g = 19,52$$

- Velocidad de crecimiento

$$K = \frac{1}{g} \quad (4)$$

$$K = \frac{1}{19,52}$$

$$K = 0,051$$

Para la curva de crecimiento en té de Alperujo:

- Tiempo de generación

$$g = 0,693 / \mu$$

$$g = 4,53$$

- Velocidad de crecimiento

$$K = \frac{1}{g}$$

$$K = 0,22$$

Anexo 3. Resultados de la producción de biomasa

Tabla 18

Resultados del Tratamiento 1

Hora conteo	Recuentos					Diluciones	Concentración
1er conteo (1h)	98	90	96	88	94	1	2,33E+07
2do conteo (18h)	396	896	650	570	660	1	1,59E+08
3er conteo (20h)	64	85	91	68	100	10	2,04E+08

Nota. Parámetros del T1: Temperatura: 29 °C, rpm: 200 y Concentración: 100 %

Tabla 19

Resultados del Tratamiento 2

Hora conteo	Recuentos					Diluciones	Concentración
1er conteo (1h)	41	40	36	38	37	10	9,60E+07
2do conteo (18h)	86	93	97	89	87	10	2,26E+08
3er conteo (20h)	89	91	86	93	98	10	2,29E+08

Nota. Parámetros del T2: Temperatura: 45 °C, rpm: 200 y Concentración: 75 %

Tabla 20

Resultados del Tratamiento 3

Hora conteo	Recuentos					Diluciones	Concentración
1er conteo (1h)	28	26	29	30	25	10	6,90E+07
2do conteo (18h)	58	52	53	61	57	10	1,41E+08
3er conteo (20h)	64	67	60	71	63	10	1,63E+08

Nota. Parámetros del T3: Temperatura: 45 °C, rpm: 300 y Concentración: 50 %

Tabla 21

Resultados del Tratamiento 4

Hora conteo	Recuentos					Diluciones	Concentración
1er conteo (1h)	64	68	62	65	59	10	1,59E+08
2do conteo (18h)	698	693	689	696	701	1	1,74E+08
3er conteo (20h)	736	758	747	739	743	1	1,86E+08

Nota. Parámetros del T4: Temperatura: 45 °C, rpm: 100 y Concentración: 75 %

Tabla 22

Resultados del Tratamiento 5

Hora conteo	Recuentos					Diluciones	Concentración
1er conteo (1h)	57	61	52	54	64	1	1,44E+07
2do conteo (18h)	108	119	116	103	114	10	2,80E+08
3er conteo (20h)	102	132	107	122	142	10	3,03E+08

Nota. Parámetros del T5: Temperatura: 29 °C, rpm: 200 y Concentración: 75 %

Tabla 23*Resultados del Tratamiento 6*

Hora conteo	Recuentos					Diluciones	Concentración
1er conteo (1h)	44	40	45	52	48	10	1,15E+08
2do conteo (18h)	499	405	401	497	507	1	1,15E+08
3er conteo (20h)	568	572	563	570	565	1	1,42E+08

Nota. Parámetros del T6: Temperatura: 45 °C, rpm: 100 y Concentración: 50 %

Tabla 24*Resultados del Tratamiento 7*

Hora conteo	Recuentos					Diluciones	Concentración
1er conteo (1h)	35	33	39	36	37	10	9,00E+07
2do conteo (18h)	72	70	78	75	69	10	1,82E+08
3er conteo (20h)	80	87	81	79	82	10	2,05E+08

Nota. Parámetros del T7: Temperatura: 45 °C, rpm: 300 y Concentración: 75 %

Tabla 25*Resultados del Tratamiento 8*

Hora conteo	Recuentos					Diluciones	Concentración
1er conteo (1h)	145	148	139	140	138	1	3,55E+07
2do conteo (18h)	324	316	318	321	322	10	8,01E+08
3er conteo (20h)	336	330	328	327	333	10	8,27E+08

Nota. Parámetros del T8: Temperatura: 29 °C, rpm: 100 y Concentración: 75 %

Tabla 26*Resultados del Tratamiento 9*

Hora conteo	Recuentos					Diluciones	Concentración
1er conteo (1h)	34	30	29	30	31	10	7,70E+07
2do conteo (18h)	48	46	39	43	41	10	1,09E+08
3er conteo (20h)	56	51	62	52	50	10	1,36E+08

Nota. Parámetros del T9: Temperatura: 45 °C, rpm: 200 y Concentración: 50 %

Tabla 27*Resultados del Tratamiento 10*

Hora conteo	Recuentos					Diluciones	Concentración
1er conteo (1h)	112	100	110	108	113	10	2,72E+08
2do conteo (18h)	416	428	412	421	417	1	1,05E+08
3er conteo (20h)	440	461	489	464	446	1	1,15E+08

Nota. Parámetros del T10: Temperatura: 45 °C, rpm: 100 y Concentración: 100 %

Tabla 28*Resultados del Tratamiento 11*

Hora conteo	Recuentos					Diluciones	Concentración
1er conteo (1h)	148	140	143	146	142	1	3,60E+07
2do conteo (18h)	16	14	17	16	15	100	3,90E+08
3er conteo (20h)	23	20	24	22	24	100	5,65E+08

Nota. Parámetros del T10: Temperatura: 29 °C, rpm: 300 y Concentración: 75 %

Tabla 29*Resultados del Tratamiento 12*

Hora conteo	Recuentos					Diluciones	Concentración
1er conteo (1h)	110	119	117	120	116	1	2,91E+07
2do conteo (18h)	188	212	197	192	207	10	4,98E+08
3er conteo (20h)	230	227	221	232	229	10	5,70E+08

Nota. Parámetros del T12: Temperatura: 29 °C, rpm: 100 y Concentración: 50 %

Tabla 30*Resultados del Tratamiento 13*

Hora conteo	Recuentos					Diluciones	Concentración
1er conteo (1h)	180	186	184	185	192	1	4,64E+07
2do conteo (18h)	5	7	4	8	6	100	1,50E+08
3er conteo (20h)	13	18	15	16	14	100	3,80E+08

Nota. Parámetros del T13: Temperatura: 29 °C, rpm: 300 y Concentración: 100 %

Tabla 31*Resultados del Tratamiento 14*

Hora conteo	Recuentos					Diluciones	Concentración
1er conteo (1h)	30	50	44	70	39	1	1,17E+07
2do conteo (18h)	304	423	414	596	476	1	1,11E+08
3er conteo (20h)	212	132	124	210	155	10	4,17E+08

Nota. Parámetros del T14: Temperatura: 29 °C, rpm: 200 y Concentración: 50 %

Tabla 32*Resultados del Tratamiento 15*

Hora conteo	Recuentos					Diluciones	Concentración
1er conteo (1h)	61	55	52	62	60	10	1,45E+08
2do conteo (18h)	150	164	144	152	149	10	3,80E+08
3er conteo (20h)	158	150	156	160	150	10	3,87E+08

Nota. Parámetros del T15: Temperatura: 45 °C, rpm: 200 y Concentración: 100 %

Tabla 33*Resultados del Tratamiento 16*

Hora conteo	Recuentos					Diluciones	Concentración
1er conteo (1h)	188	176	180	174	175	1	4,47E+07
2do conteo (18h)	376	384	379	369	375	10	9,42E+08
3er conteo (20h)	392	405	402	398	400	10	9,99E+08

Nota. Parámetros del T16: Temperatura: 29 °C, rpm: 100 y Concentración: 100 %

Tabla 34*Resultados del Tratamiento 17*

Hora conteo	Recuentos					Diluciones	Concentración
1er conteo (1h)	58	67	59	60	57	10	1,51E+08
2do conteo (18h)	146	136	144	147	134	10	3,54E+08
3er conteo (20h)	162	158	155	157	156	10	3,94E+08

Nota. Parámetros del T17: Temperatura: 45 °C, rpm: 300 y Concentración: 100 %

Tabla 35*Resultados del Tratamiento 18*

Hora conteo	Recuentos					Diluciones	Concentración
1er conteo (1h)	184	182	185	180	189	1	4,60E+07
2do conteo (18h)	39	36	31	38	40	100	9,20E+08
3er conteo (20h)	53	55	49	52	56	100	1,33E+09

Nota. Parámetros del T17: Temperatura: 29 °C, rpm: 300 y Concentración: 50 %

Anexo 4. Resultados de las evaluaciones fenológicas a las plántulas por tratamiento

Tabla 36

Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B1

Plántulas (repeticiones)	Germinación	Tamaño total	Tamaño de la raíz	Número de hojas	Tamaño de hojas	Tamaño de la planta	Peso total
1	3	5,1	2	2	2,1	3,1	0,05415
2	3	6,3	2,6	8	2,7	3,7	0,2065
3	2	6,5	3,8	3	1,7	2,7	0,05344
4	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0
6	3	6	2,4	4	1,7	3,6	0,06692
7	0	0	0	0	0	0	0
8	3	7	4,4	3	1,6	2,6	0,06167
9	3	6,7	2,8	4	2,9	3,9	0,17307
10	2	7,8	4,7	4	2,9	3,1	0,05052
11	1	9,5	4,5	5	3	5	0,26254
12	1	7,7	3,2	4	2,4	4,5	0,27438
13	2	4,8	3	2	0,5	1,8	0,03712
14	1	6,6	3,3	3	2	3,3	0,19052
15	1	6,5	4,5	3	2,6	2	0,15889
16	2	6,4	3,1	2	1,8	3,3	0,07487
Promedio	1,69	5,43	2,77	2,94	1,74	2,66	0,10

Nota. Parámetros del B1: Beijerinckia 2, 10^5 cel/mL, BIOL 1, nada y Profundidad de la semilla 2

Tabla 37

Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B2

Plántulas (repeticiones)	Germinación	Tamaño total	Tamaño de la raíz	Número de hojas	Tamaño de hojas	Tamaño de la planta	Peso total
1	3	6,2	2,8	6	3,3	3,4	0,1845
2	3	10,7	6,4	8	3	4,3	0,1605
3	1	8,7	3,4	8	2,8	5,3	0,25327
4	2	10,3	4,4	7	3,4	5,9	0,3791
5	3	7,7	3,7	8	2,6	4	0,20005
6	2	8	3	7	3	5	0,24872
7	3	7,4	2,7	4	3,2	4,7	0,18908
8	3	5,3	1,8	6	2,5	3,5	0,12189
9	2	8,7	3,7	8	4	5	0,40567
10	3	9,6	3,5	9	3,4	6,1	0,39101
11	3	9,8	3	6	2,5	6,8	0,41103
12	3	8,2	3,5	8	2,8	4,7	0,24651
13	2	3,9	2	0	0	1,9	0,04081
14	3	7,4	3,6	5	2	3,8	0,18844
15	2	8,3	4,3	5	2,5	4	0,30057
16	3	6,4	2,6	4	2,3	3,8	0,19924
Promedio	2,56	7,91	3,40	6,19	2,71	4,51	0,25

Nota. Parámetros del B2: Beijerinckia 2, 10^5 cel/mL, BIOL 4, se aplicó cada 7 días y Profundidad de la semilla

Tabla 38*Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B3*

Plántulas (repeticiones)	Germinación	Tamaño total	Tamaño de la raíz	Número de hojas	Tamaño de hojas	Tamaño de la planta	Peso total
1	3	5,6	2,6	3	2,9	3	0,0889
2	2	10,7	3,4	7	2,5	7,3	0,19373
3	3	8,9	2,7	7	3,6	6,2	0,25004
4	2	5,5	2,7	3	1,3	2,8	0,05518
5	2	8,6	3,2	4	2,5	5,4	0,18328
6	2	10,3	4,4	7	2,9	5,9	0,42674
7	2	4,1	1,5	6	2,5	2,6	0,07456
8	3	8,7	3,5	8	2,9	5,2	0,37345
9	3	9,6	5	8	2,7	4,6	0,32182
10	3	7,8	3,7	8	3,3	4,1	0,24953
11	3	10,4	3,9	6	3,5	6,5	0,42221
12	2	7,2	3,4	4	1,5	3,8	0,14078
13	1	7,1	4	5	2,6	3,1	0,21814
14	2	8,8	4	7	3,7	4,8	0,28647
15	1	6,6	3,4	9	4,1	3,2	0,48842
16	1	4,3	2,5	4	1,1	1,8	0,11468
Promedio	2,19	7,76	3,37	6,00	2,73	4,39	0,24

Nota. Parámetros del B3: Beijerinckia 4, 10^9 cel/mL, BIOL 4, se aplicó cada 7 días y Profundidad de la semilla 1

Tabla 39*Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B4*

Plántulas (repeticiones)	Germinación	Tamaño total	Tamaño de la raíz	Número de hojas	Tamaño de hojas	Tamaño de la planta	Peso total
1	1	5,4	2,8	4	2,2	2,6	0,05673
2	3	7,7	3,1	5	2,2	4,6	0,16729
3	3	7,9	3	4	2	4,9	0,1552
4	3	8,7	3,4	9	2,5	5,3	0,2381
5	1	3,3	1,8	2	0,6	1,5	0,01832
6	3	6,2	2,9	3	2,1	3,3	0,08514
7	2	7,9	3,6	6	1,3	4,3	0,17224
8	2	6,4	3	4	2,7	3,4	0,10261
9	3	7,8	4,6	3	2,1	3,2	0,11724
10	2	5,9	2,4	2	3	3,5	0,18042
11	2	8,1	2,3	8	2,8	5,8	0,26572
12	2	7,5	3,2	4	1,2	4,3	0,21084
13	3	8,5	3,6	8	2,1	4,9	0,27824
14	3	6,6	3	6	2,8	3,6	0,21863
15	1	6,5	3	2	2	3,5	0,26349
16	2	4,3	2,3	4	2,1	2	0,15136
Promedio	2,25	6,79	3,00	4,63	2,11	3,79	0,17

Nota. Parámetros del B4: Beijerinckia 3, 10^7 cel/mL, BIOL 1, nada y Profundidad de la semilla 3

Tabla 40*Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B5*

Plántulas (repeticiones)	Germinación	Tamaño total	Tamaño de la raíz	Número de hojas	Tamaño de hojas	Tamaño de la planta	Peso total
1	3	7,1	2,5	2	1,5	4,6	0,03505
2	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0
5	2	6,7	2,9	4	2,4	3,8	0,13509
6	3	4,8	2,9	3	1,2	1,9	0,05856
7	0	0	0	0	0	0	0
8	1	2,7	1,4	3	1,7	1,3	0,07997
9	2	6,4	3,7	2	1,3	2,7	0,06675
10	2	5,7	4	2	0,7	1,7	0,02946
11	3	5,1	2,6	2	1	2,5	0,04235
12	0	0	0	0	0	0	0
13	1	6	3,2	3	1,6	2,8	0,09427
14	0	0	0	0	0	0	0
15	1	6,5	5	4	2,4	1,5	0,29625
16	0	0	0	0	0	0	0
Promedio	1,13	3,19	1,76	1,56	0,86	1,43	0,05

Nota. Parámetros del B5: Beijerinckia 1, nada, BIOL 1, nada y Profundidad de la semilla 1

Tabla 41*Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B6*

Plántulas (repeticiones)	Germinación	Tamaño total	Tamaño de la raíz	Número de hojas	Tamaño de hojas	Tamaño de la planta	Peso total
1	1	8,4	4,3	5	3,3	4,1	0,13812
2	3	8,4	4,2	6	2,3	4,2	0,1468
3	3	6,2	2,8	4	2,7	3,4	0,16285
4	0	0	0	0	0	0	0
5	2	8,6	3,3	4	2,7	5,3	0,20241
6	2	9,5	4,1	4	5,7	5,4	0,18383
7	2	5,4	1,8	4	2,5	3,6	0,11331
8	3	6	1,6	3	2,5	4,4	0,13773
9	1	8,5	3,8	5	2,7	4,7	0,24454
10	3	4,7	1,3	4	2,2	3,4	0,11221
11	2	5,5	2	2	1,4	3,5	0,07975
12	3	11,8	5,3	6	2,4	6,5	0,31289
13	3	7,6	1,6	4	2,3	6	0,18596
14	1	7,6	4,3	4	2,7	3,3	0,12477
15	2	7,6	3,1	4	2,7	4,5	0,31352
16	3	6,5	3	4	1,6	3,5	0,12424
Promedio	2,13	7,02	2,91	3,94	2,48	4,11	0,16

Nota. Parámetros del B6: Beijerinckia 1, nada, BIOL 4, se aplicó cada 7 días y Profundidad de la semilla 4

Tabla 42*Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B7*

Plántulas (repeticiones)	Germinación	Tamaño total	Tamaño de la raíz	Número de hojas	Tamaño de hojas	Tamaño de la planta	Peso total
1	1	5,7	3,4	8	2,8	2,3	0,15087
2	2	8,8	5,5	4	2,4	3,3	0,11372
3	3	10,3	4,5	8	4,3	5,8	0,34398
4	2	9,7	4,3	6	2,8	5,4	0,29001
5	2	9,8	4,2	8	2,8	5,6	0,38673
6	2	8,9	3,5	9	4,3	5,4	0,46751
7	2	8,8	3,8	6	3,5	5	0,31013
8	3	10,3	3,6	6	3,4	6,7	0,34652
9	0	0	0	0	0	0	0
10	3	9,3	2,8	8	3	6,5	0,35698
11	3	7,3	3,5	6	3	3,8	0,39747
12	2	8,8	3	5	3,4	5,8	0,25015
13	1	8,8	3,2	8	3	5,6	0,32597
14	2	8	3,1	6	2,8	4,9	0,23919
15	2	14,5	9,5	7	3	5	0,13587
16	3	9,6	4,5	9	3	5,1	0,39684
Promedio	2,06	8,66	3,90	6,50	2,97	4,76	0,28

Nota. Parámetros del B7: Beijerinckia 4, 10^9 cel/mL, BIOL 2, se aplicó una vez y Profundidad de la semilla 3

Tabla 43*Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B8*

Plántulas (repeticiones)	Germinación	Tamaño total	Tamaño de la raíz	Número de hojas	Tamaño de hojas	Tamaño de la planta	Peso total
1	2	3,8	1,1	4	1,6	2,7	0,0894
2	2	8,1	4,2	5	2,1	3,9	0,18809
3	3	4,8	2,3	3	1,2	2,5	0,06325
4	2	3,8	1,1	2	1,4	2,7	0,0426
5	3	3,9	1,8	2	1,5	2,1	0,06847
6	2	5,5	2,2	3	2	3,3	0,077803
7	3	7,1	3,2	4	1,7	3,9	0,18103
8	1	4,5	1,9	2	1,9	2,6	0,10118
9	1	4,4	2,1	2	1,3	2,3	0,04424
10	3	4,5	2	2	1	2,5	0,06518
11	3	4,5	1,4	2	1,1	3,1	0,08011
12	2	3,8	1,8	2	1,4	2	0,08578
13	3	7,1	2,1	4	2,4	5	0,20151
14	2	9,5	4,5	6	3	5	0,18013
15	2	4,9	3,1	3	1,6	1,8	0,17261
16	3	5,2	1,7	4	1,8	3,5	0,12996
Promedio	2,31	5,34	2,28	3,13	1,69	3,06	0,11

Nota. Parámetros del B7: Beijerinckia 2, 10^5 cel/mL, BIOL 3, se aplicó cada cinco días y Profundidad de la semilla 4

Tabla 44*Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B9*

Plántulas (repeticiones)	Germinación	Tamaño total	Tamaño de la raíz	Número de hojas	Tamaño de hojas	Tamaño de la planta	Peso total
1	2	6,8	2,2	4	2,6	4,6	0,0816
2	2	5,3	2,1	2	1,8	3,2	0,0642
3	3	8,1	3,3	5	2,5	4,8	0,13207
4	2	6,2	2,4	4	2,4	3,8	0,12361
5	3	3,6	2,6	4	2	1	0,07212
6	2	8,2	3,7	3	3,5	4,5	0,1881
7	3	9,5	2,7	4	2,7	6,8	0,15788
8	2	9,9	4,9	3	2	5	0,14227
9	3	9	3,7	4	2,2	5,3	0,37023
10	2	4,1	2,1	2	1,3	2	0,14852
11	3	6,1	3,1	4	1,8	3	0,15326
12	1	7,7	2,7	4	2,8	5	0,20027
13	3	8,5	3,5	7	2	5	0,37092
14	3	7,5	2,9	4	2,6	4,6	0,1547
15	3	6,3	3,8	6	2,3	2,5	0,15614
16	3	7,7	2,8	8	2,9	4,9	0,24468
Promedio	2,50	7,16	3,03	4,25	2,34	4,13	0,17

Nota. Parámetros del B9: Beijerinckia 3, 10^7 cel/mL, BIOL 2, se aplicó una vez y Profundidad de la semilla

Tabla 45*Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B10*

Plántulas (repeticiones)	Germinación	Tamaño total	Tamaño de la raíz	Número de hojas	Tamaño de hojas	Tamaño de la planta	Peso total
1	3	7,3	1,6	4	2,7	5,7	0,007405
2	2	9,7	5,1	4	2,2	4,6	0,1543
3	3	6	3,2	2	1,8	2,8	0,07312
4	2	5,4	2,1	3	2,6	3,3	0,09841
5	2	5,6	3	3	2,5	2,6	0,11655
6	1	9,3	4,3	3	3,3	5	0,20372
7	2	5,5	3,8	2	1,4	1,7	0,06272
8	2	7,2	3,2	4	2,4	4	0,20506
9	2	6,5	2,6	4	2,5	3,9	0,13878
10	2	7,8	4,7	4	2,9	3,1	0,21154
11	2	7,7	2,6	4	3,2	5,1	0,18055
12	2	7	3	3	2,3	4	0,17252
13	3	8,6	2,9	4	2,2	5,7	0,24323
14	2	9,2	4,6	4	2,9	4,6	0,19764
15	3	5	4	2	1,5	1	0,13064
16	3	5,8	2,4	4	2,2	3,4	0,13035
Promedio	2,25	7,10	3,32	3,38	2,41	3,78	0,15

Nota. Parámetros del B10: Beijerinckia 2, 10^9 cel/mL, BIOL 1, nada y Profundidad de la semilla 4

Tabla 46*Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B11*

Plántulas (repeticiones)	Germinación	Tamaño total	Tamaño de la raíz	Número de hojas	Tamaño de hojas	Tamaño de la planta	Peso total
1	1	4,2	1,6	4	1,6	2,6	0,07405
2	3	6,3	2	5	2,3	4,3	0,13017
3	1	6	4,1	4	1,8	1,9	0,07287
4	2	3,5	1,1	3	1,2	2,4	0,03983
5	3	6,9	3,4	7	2,3	3,5	0,13656
6	3	6,6	3	4	2	3,6	0,12862
7	1	3,1	1,4	0	0	1,7	0,02662
8	1	2,3	1,1	0	0	1,2	0,02578
9	3	10,2	5,2	7	2,7	5	0,23908
10	3	6,3	2,1	4	2,1	4,2	0,14821
11	3	6,5	2,7	4	2,4	3,8	0,15982
12	3	4,9	1	4	1,8	3,9	0,11364
13	2	5	2,1	6	2	2,9	0,16089
14	2	5,3	2,3	4	2,2	3	0,1741
15	3	6,3	4	5	2	2,3	0,19141
16	2	5,7	3	4	2,5	2,7	0,21039
Promedio	2,25	5,57	2,51	4,06	1,81	3,06	0,13

Nota. Parámetros del B11: Beijerinckia 1, nada, BIOL 3, se aplicó cada cinco días y Profundidad de la semilla 3

Tabla 47*Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B12*

Plántulas (repeticiones)	Germinación	Tamaño total	Tamaño de la raíz	Número de hojas	Tamaño de hojas	Tamaño de la planta	Peso total
1	3	11,4	4,6	6	2,8	6,8	0,25429
2	2	10	4,2	7	3	5,8	0,29175
3	2	10,3	5,4	6	2,9	4,9	0,2485
4	2	8,5	4,7	4	2,5	3,8	0,22449
5	2	10,2	3,7	6	4,4	6,5	0,36761
6	2	6	3,3	3	1,5	2,7	0,08289
7	3	9,8	4,1	8	2,5	5,7	0,36207
8	3	6	2,1	2	2,6	3,9	0,10523
9	1	7,4	3,2	7	3,1	4,2	0,23152
10	1	6,2	2,8	6	1	3,4	0,11473
11	3	7,7	3,2	8	2,6	4,5	0,27056
12	2	11,5	4	6	3	7,5	0,50569
13	2	7,6	3,1	5	2,8	4,5	0,23967
14	1	5,8	2	5	2	3,8	0,19786
15	3	5,4	2,5	6	2,2	2,9	0,21845
16	3	11,4	4,6	6	2,8	6,8	0,25429
Promedio	2,19	8,45	3,59	5,69	2,61	4,86	0,25

Nota. Parámetros del B12: Beijerinckia 3, 10^7 cel/mL, BIOL 4, se aplicó cada siete días y Profundidad de la semilla 2

Tabla 48*Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B13*

Plántulas (repeticiones)	Germinación	Tamaño total	Tamaño de la raíz	Número de hojas	Tamaño de hojas	Tamaño de la planta	Peso total
1	1	8,7	3,7	7	3,2	5	0,2619
2	1	8,5	4,5	4	3	4	0,1898
3	2	9	4,6	8	2,1	4,4	0,1494
4	1	9,2	3,7	8	2,7	5,5	0,32354
5	3	6,3	2,9	7	2,9	3,4	0,16783
6	2	7,4	4,4	4	1,8	3	0,13103
7	2	10,1	4,4	6	2,4	5,7	0,33613
8	3	6	3,2	4	2,7	2,8	0,15752
9	2	7,4	3,4	5	2,5	4	0,13318
10	1	7,9	3,2	7	2,8	4,7	0,24864
11	1	8,9	2,9	8	3,5	6	0,49216
12	3	6,4	3	2	1,6	3,4	0,11635
13	2	6,9	3	4	1,6	3,9	0,17521
14	1	2,8	1,3	2	0,4	1,5	0,02791
15	3	5,5	3	4	1,5	2,5	0,16585
16	2	5,6	2,7	4	2,2	2,9	0,13862
Promedio	1,88	7,29	3,37	5,25	2,31	3,92	0,20

Nota. Parámetros del B13: Beijerinckia 3, 10^7 cel/mL, BIOL 3, se aplicó cada cinco días y Profundidad de la semilla 1

Tabla 49*Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B14*

Plántulas (repeticiones)	Germinación	Tamaño total	Tamaño de la raíz	Número de hojas	Tamaño de hojas	Tamaño de la planta	Peso total
1	3	8	3,6	5	2,1	4,4	0,16453
2	1	7	2,5	4	2,3	4,5	0,17247
3	2	8,9	3,8	6	2	5,1	0,20262
4	1	8,4	4,3	5	1,8	4,1	0,1428
5	2	6,8	2,7	5	1,4	4,1	0,14563
6	2	8,1	4,4	3	1,8	3,7	0,10213
7	1	6,7	3,1	4	2	3,6	0,1351
8	3	6,8	4	6	2,4	2,8	0,17781
9	1	8,7	2,7	6	2,2	6	0,38033
10	3	6,8	3,3	4	2,1	3,5	0,13983
11	3	6,1	2,4	4	2,5	3,7	0,21547
12	3	8,1	2,8	7	3,3	5,3	0,33187
13	1	1	0,4	0	0	0,6	0,02054
14	3	6,5	3,2	4	2,7	3,3	0,13095
15	2	6,9	3,9	7	2,6	3	0,2343
16	2	6	2,8	2	1,4	3,2	0,08035
Promedio	3	8	3,6	5	2,1	4,4	0,16453

Nota. Parámetros del B14: Beijerinckia 2, 10^9 cel/mL, BIOL 1, nada y Profundidad de la semilla 4

Tabla 50*Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B15*

Plántulas (repeticiones)	Germinación	Tamaño total	Tamaño de la raíz	Número de hojas	Tamaño de hojas	Tamaño de la planta	Peso total
1	0	0	0	0	0	0	0
2	2	9,5	4,8	7	4,3	4,7	0,37624
3	3	9,1	3,6	8	2,8	5,5	0,2457
4	3	8,9	3,8	7	2,5	5,1	0,24263
5	3	11,6	6,4	6	2,1	5,2	0,19825
6	1	13,3	6,5	8	3,1	6,8	0,43072
7	2	8,6	2,8	7	2,6	5,8	0,3092
8	1	8,9	3	7	2,5	5,9	0,30471
9	1	8,2	3,6	4	3	4,6	0,16143
10	2	11,5	4,6	7	3,1	6,9	0,43858
11	3	9,8	3,8	8	2,6	6	0,26638
12	2	9,3	4,1	8	1,9	5,2	0,29413
13	2	7,4	3,2	6	2,8	4,2	0,25412
14	2	9	3,3	9	3,5	5,7	0,44047
15	2	9,3	3,3	6	3	6	0,24364
16	2	5,1	2,6	4	2,3	2,5	0,18294
Promedio	1,94	8,72	3,71	6,38	2,63	5,01	0,27

Nota. Parámetros del B15: Beijerinckia 2, 10^5 cel/mL, BIOL 2, se aplicó una vez y Profundidad de la semilla 1

Tabla 51*Resultados de la aplicación del bioinoculante del tratamiento B16*

Plántulas (repeticiones)	Germinación	Tamaño total	Tamaño de la raíz	Número de hojas	Tamaño de hojas	Tamaño de la planta	Peso total
1	3	6,5	3,2	4	2,3	3,3	0,09418
2	3	9	3,5	6	2,4	5,5	0,15402
3	1	7,7	3,6	5	2,1	4,1	0,08837
4	1	4,2	2,6	0	0	1,6	0,0275
5	3	6,9	2,9	3	1,7	4	0,14754
6	2	10,1	6,8	4	2,4	3,3	0,20074
7	3	7,1	4,2	3	1,7	2,9	0,15692
8	3	9,1	4,6	7	2,9	4,5	0,23229
9	2	3,9	2,7	2	1,8	1,2	0,04919
10	1	7,9	3,6	6	3,3	4,3	0,24308
11	1	9,1	5,6	8	3,2	3,5	0,33599
12	0	0	0	0	0	0	0
13	1	9,9	5	7	3	4,9	0,43987
14	1	12,5	6,2	8	3,5	6,3	0,15811
15	1	8	3,7	6	3,6	4,3	0,31663
16	1	3	1,4	2	0,3	1,6	0,03014
Promedio	1,69	7,18	3,73	4,44	2,14	3,46	0,17

Nota. Parámetros del B16: Beijerinckia 1, nada, BIOL 2, se aplicó una vez y Profundidad de la semilla 2

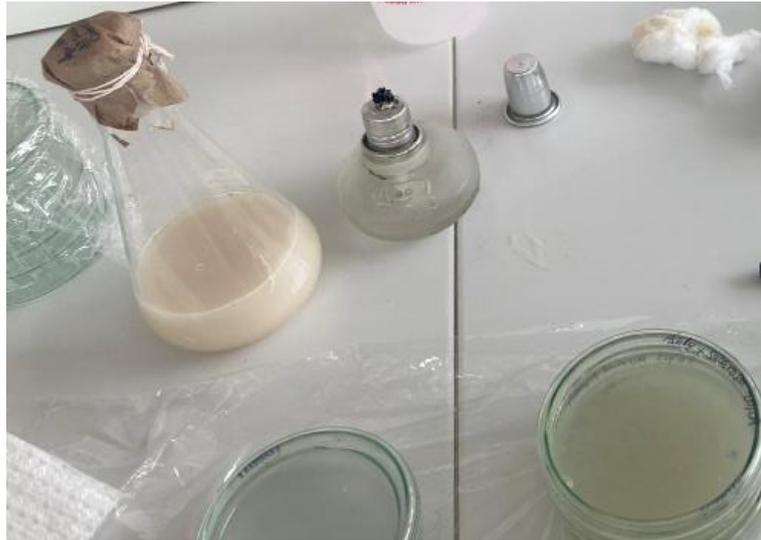
Anexo 5. Preparación del agar Ashby



Reactivos para la preparación del agar Ashby



Agar Ashby en matraces



Plaqueo de agar Ashby



Agar Ashby en cocinilla



Placas Petri con agar Ashby

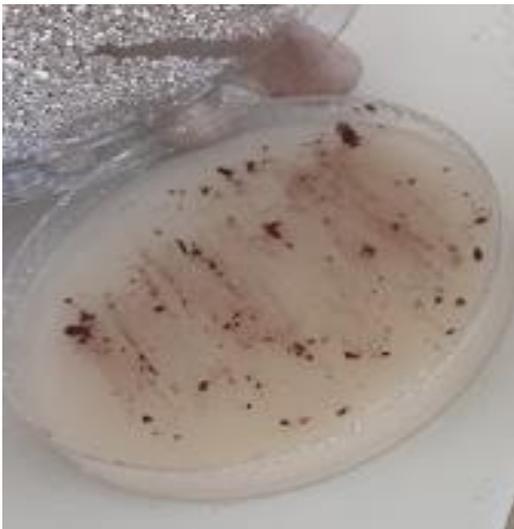


Autoclavado del agar Ashby

ANEXO 6. Aislamiento de la bacteria desde el alperujo



Muestra de alperujo para siembra en placas

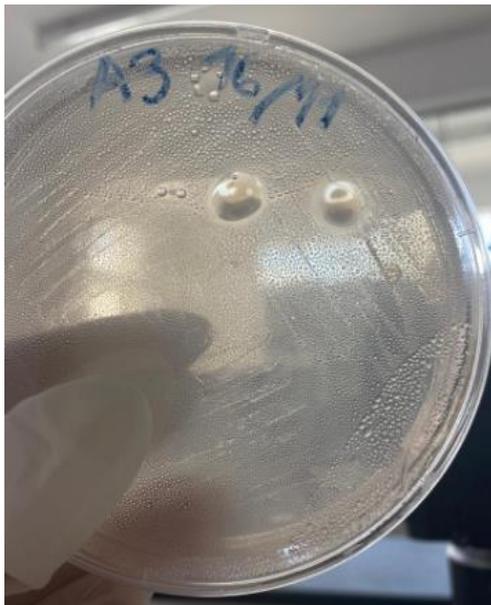
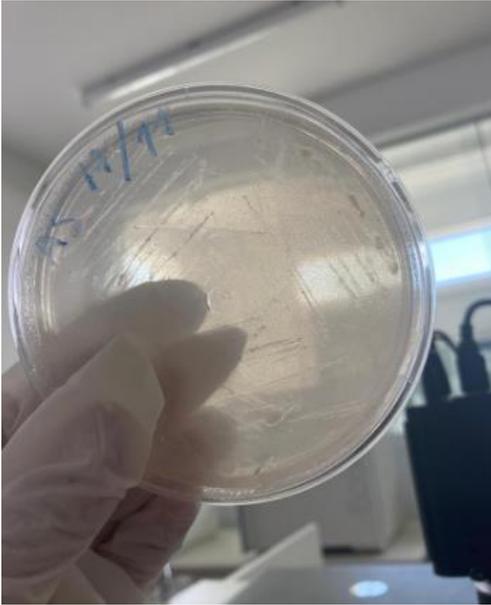


Alícuota de alperujo en placa de agar Ashby



Diferentes cepas aisladas en placas Petri

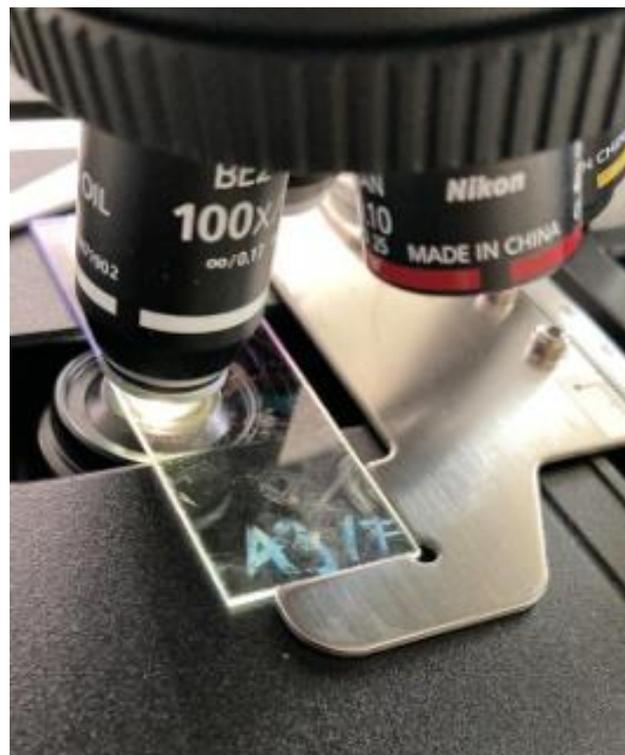
Anexo 7. Tinción Gram a las cepas purificadas



Placas de cepas purificadas



Proceso de tinción Gram



Muestra de la tinción gram en el microscopio

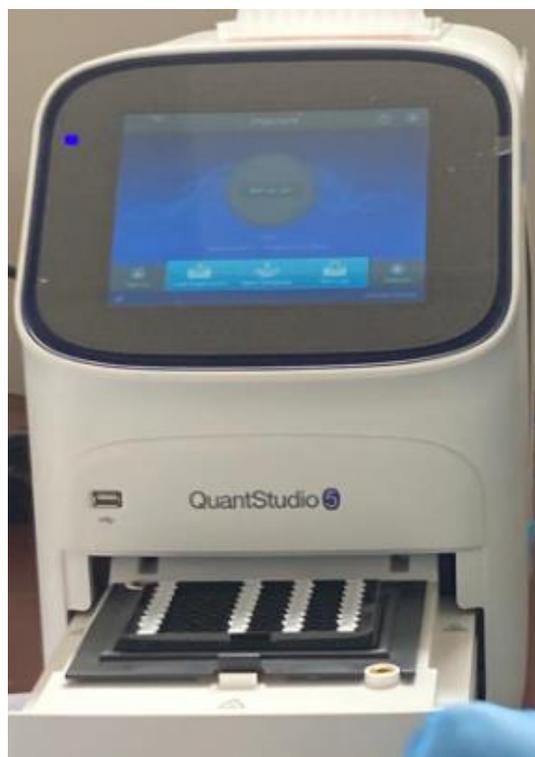


Vista de la muestra en el microscopio

ANEXO 8. Identificación genética



Extracción de ADN de cepa A4

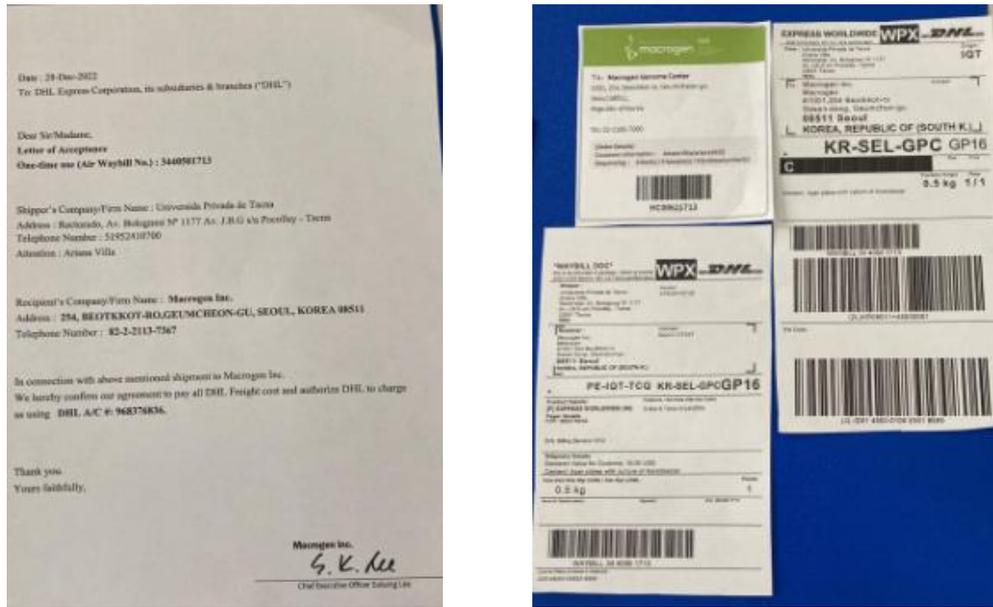


Termociclador en tiempo real



Recopilación de datos en termociclador en tiempo real

Anexo 9. Identificación molecular



Documentación para el envío de muestras a MACROGEN – SEOUL COREA

Preparación de empaque para envío





Resultados de la página de MACROGEN

Anexo 10. Producción del té de alperujo



Molienda del alperujo



Hervor del té de alperujo



Sistema de filtrado para la obtención del té de orujo



Filtrado por papel filtro

Anexo 11. Inoculación de *Beijerinckia mobilis* en Caldo Ashby y Té de alperujo para la curva de crecimiento



Té de alperujo y caldo Ashby



Inoculación del té de alperujo y caldo Ashby

Anexo 12. Incubación de cada medio seguido por el conteo en la cámara de Neubauer con sus respectivas diluciones



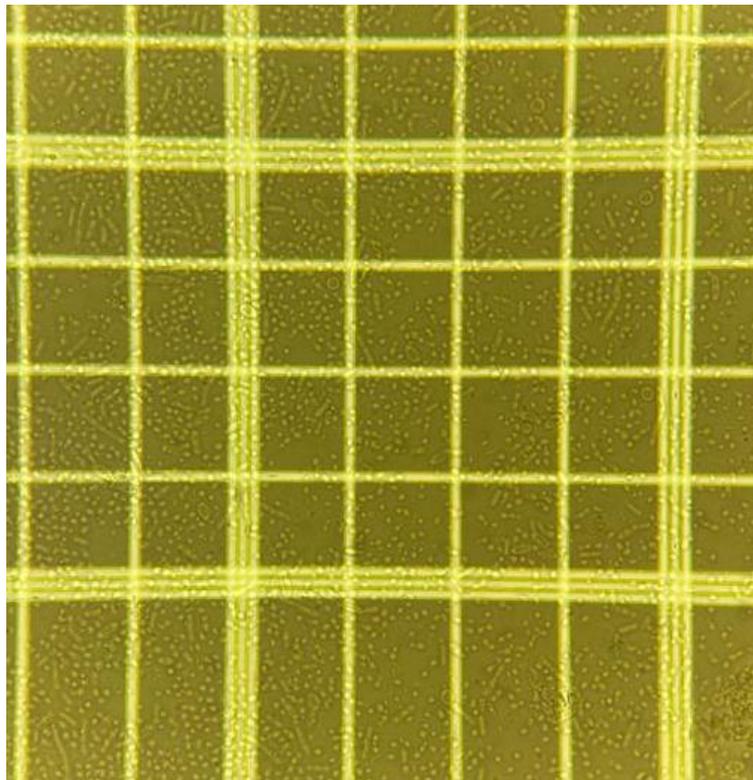
Se incubó cada medio en la incushaker IKA



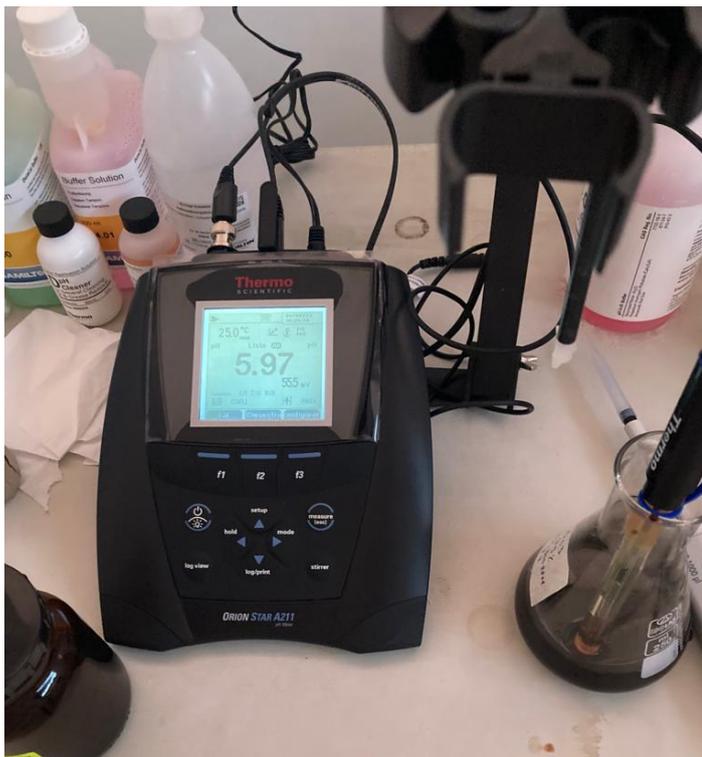
Preparación de la cámara Neubauer para el conteo



Conteo celular por el microscopio a 40x



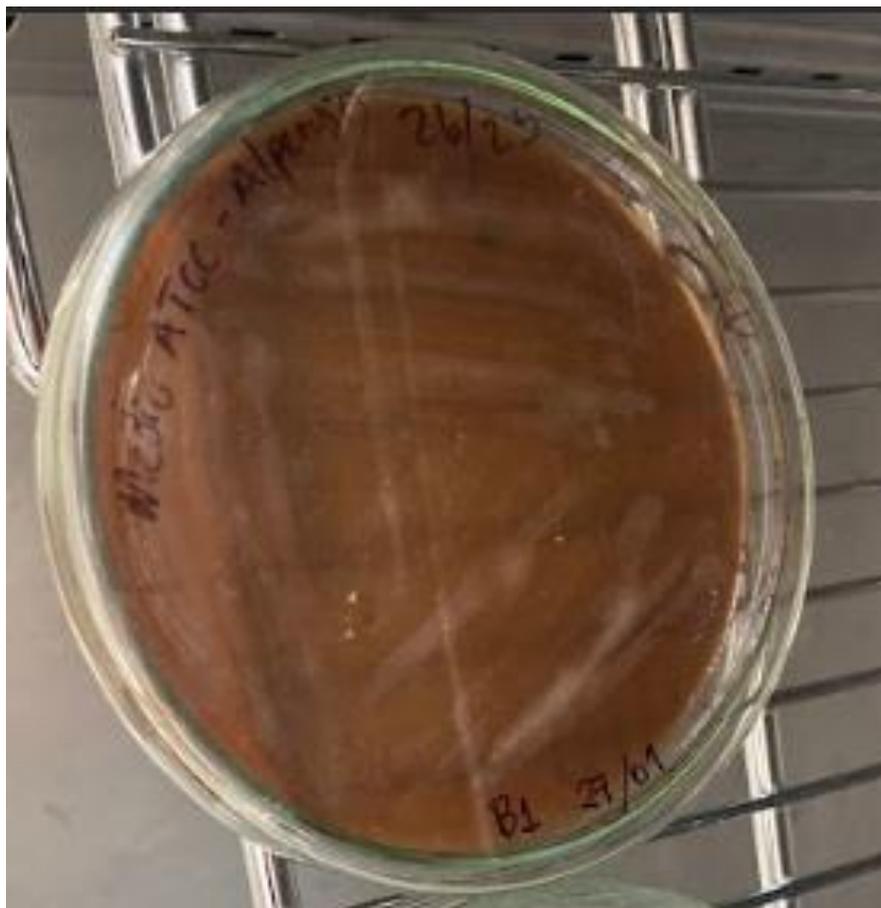
Muestra sin dilución en la cámara de Neubauer

Anexo 13. Elaboración del bioinoculante – Producción de biomasa en placa

Ajuste de pH del medio ATCC 13



Siembra de la cepa



Cepa sembrada por estrías en medio ATCC

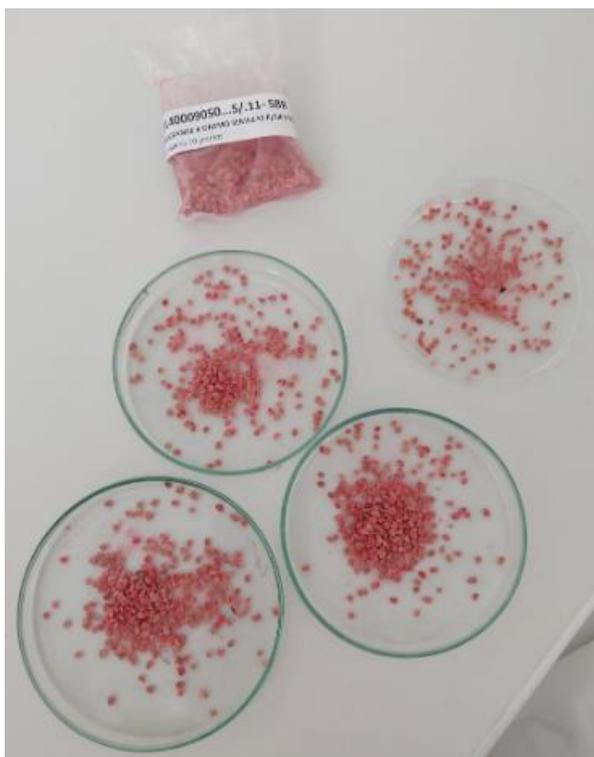
Anexo 14. Fermentación de matraces en diferentes concentraciones

Matraces con los diferentes tratamientos para la producción de biomasa

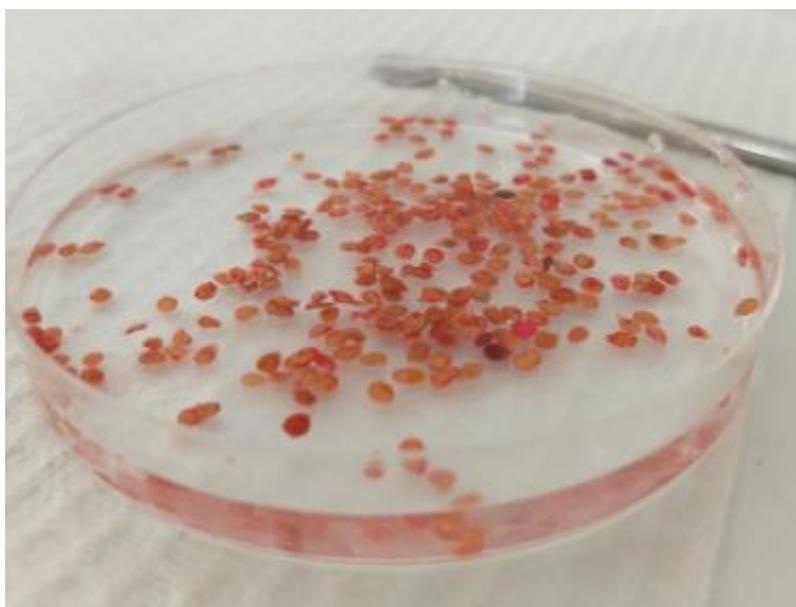


Incubación por 20 horas

Anexo 15. Bacterización de semillas



Selección de semillas



Semillas reposando en suspensión bacteriana

Anexo 16. Evaluación de germinación total por tratamiento

Germinación en 10 días



Germinación en 15 días



Germinación en 20 días



Germinación en 25 días

Anexo 17. Evaluación de plántulas



Selección de plántulas por semillero

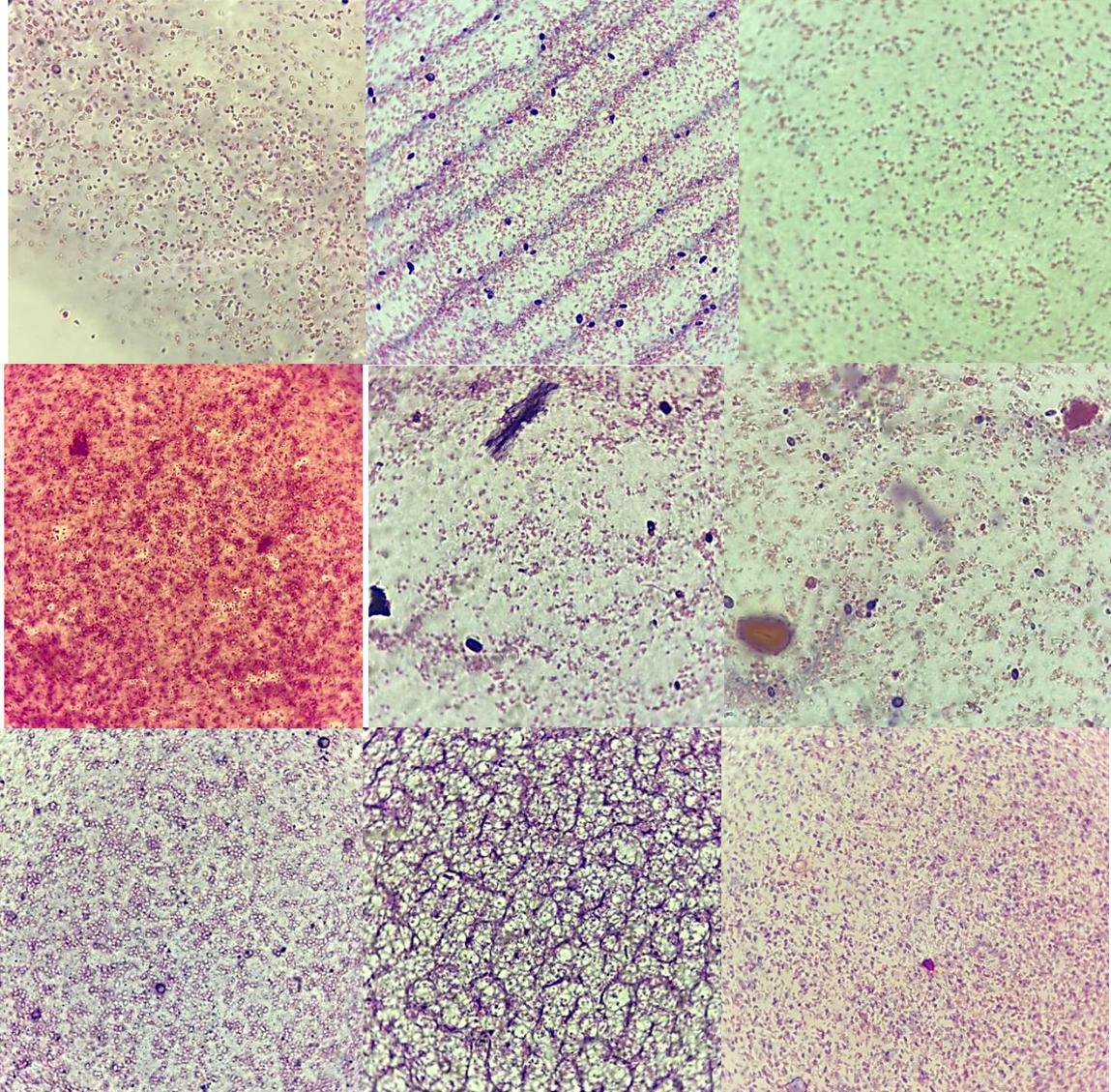




Algunas de las plántulas seleccionadas para la evaluación fenológica



Medición del tamaño total de la planta

Anexo 18. Resultados de las cepas aisladas y purificadas

Algunos resultados de las tinciones gram durante el proceso de aislamiento y purificación

Anexo 19. Evidencia fotográfica de la evaluación fenológica

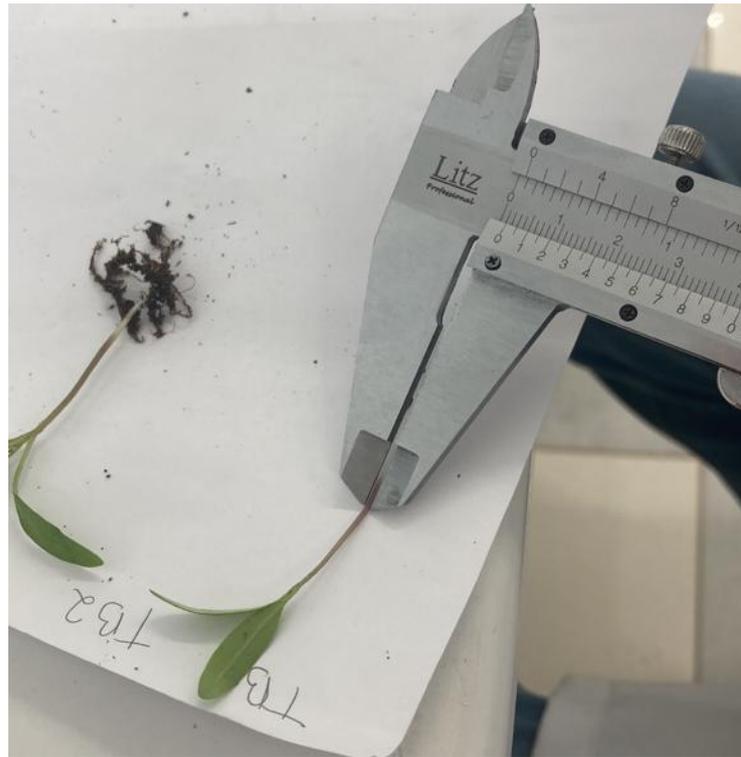
Almácigos con plántulas del cultivo de tomate



Vista de plántulas con poco crecimiento de tallo y raíz



Plántulas seleccionadas para la evaluación fenológica



Medición y comparación del desarrollo de plántulas con diferentes tratamientos