

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

USO DE LA CIANOBACTERIA *NOSTOC MUSCORUM* COMO BIOFERTILIZANTE Y SUS EFECTOS TANTO EN EL DESARROLLO DEL FRIJOL (*PHASEOLUS VULGARIS*) COMO EN LAS CARACTERÍSTICAS DEL SUELO EN CONDICIONES DE INVERNADERO.

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología para optar al grado y título de Maestría Académica en Biología

MARCEL ZÚÑIGA VEGA

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, San José, Costa Rica

2022

## DEDICATORIA

Esta tesis es dedicada a mi madre Aidalina Vega Flores ya que gracias a ella y a sus esfuerzos por darme lo mejor he podido llegar a donde estoy el día de hoy y porque siempre me apoyó, ha apoyado y me seguirá apoyando en mi vida personal, profesional y académica. La vida me premió con una madre como ella.

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia (madre, padre, hermana, hermanos y sobrinos) por el apoyo brindado en muchos ámbitos de mi vida y en especial por impulsarme y apoyarme en mis estudios. Ellos son lo más importante en mi vida y por lo que debo agradecerles siempre.

A mi compañero de vida, Diego Ugalde por apoyarme, aconsejarme y ser un complemento en mi vida y sobre todo por darme fuerzas y palabras muy sabias en este proceso.

Mis amigas, especialmente a Evelyn, Daniela y Andrea por siempre ser un apoyo y por acompañarme en todo este proceso de crecimiento académico y profesional.

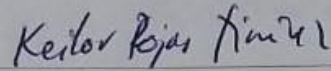
Merece principal agradecimiento a mi Directora de Tesis, la Dra. Margarita Silva Benavides del Centro de Investigación en Ciencias del Mar y Limnología (CIMAR) y la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica porque durante este proceso ha sido no solo una profesora, sino también una excelente mentora. Me brindó muchas lecciones tanto académicas como personales. Su guía y orientación se plasman en este trabajo.

A los miembros de mi comité, M.Sc. Elmer G. García y al Dr. Álvaro Ureña por su colaboración y aportes fundamentales para este trabajo.

A mi compañera de laboratorio de Microalgas del CIMAR, la licenciada Marisol Jiménez por brindarme su apoyo durante todo el tiempo que estuve realizando mi experimento en las instalaciones del centro de investigaciones.

Finalmente agradezco a la Universidad de Costa Rica por todas las enseñanzas y por darme una de las mejores formaciones académicas, humanistas, sociales y personales.

"Esta Tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de Maestría Académica en Biología"



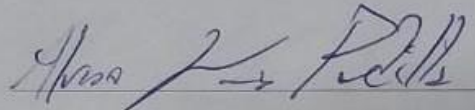
Dr. Keilor Osvaldo Rojas Jiménez

**Representante de la Decana del Sistema de Estudios de Posgrado.**



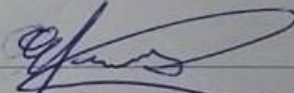
Dra. Ana Margarita Silva Benavides

**Directora de Tesis**



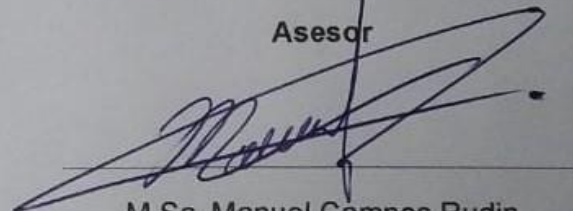
Dr. Álvaro Ureña Padilla

**Asesor**



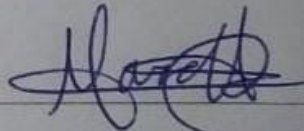
M.Sc. Elmer Guillermo García Díaz

**Asesor**



M.Sc. Manuel Campos Rudin

**Representante del Director del Programa del Posgrado Biología**



Marcel Isaac Zúñiga Vega

**Sustentante**

## INDICE

|   |      |
|---|------|
| DEDICATORIA .....   | ii   |
| AGRADECIMIENTOS.....  | iii  |
| HOJA DE APROBACION .....  | iv   |
| INDICE .....  | v    |
| RESUMEN .....   | vii  |
| ABSTRACT .....  | viii |
| LISTA DE CUADROS.....   | ix   |
| LISTA DE FIGURAS.....   | x    |
| INTRODUCCIÓN.....   | 1    |
| OBJETIVOS.....  | 9    |
| Objetivo General: .....   | 9    |
| Objetivos específicos: .....  | 9    |
| MATERIALES Y MÉTODOS. ....  | 9    |
| Sitio Experimental .....  | 9    |
| Medio de cultivo de la cianobacteria.....                           | 9    |
| Material Vegetal. ....  | 10   |
| Unidades experimentales y unidades de muestreo .....                | 10   |
| Descripción de los tratamientos.....                                | 10   |
| Parámetros fisiológicos medidos. ....                               | 11   |
| Análisis estadístico.....   | 13   |
| RESULTADOS.....   | 13   |
| Germinación.....  | 13   |
| Altura promedio de las plantas .....                                | 14   |
| Número de hojas promedio de las plantas para cada tratamiento. .... | 15   |
| Diámetro.....   | 15   |
| Flores.....   | 16   |
| Relación biomasa total/biomasa de cada parte de la planta. ....     | 17   |
| Área Foliar Específica. ....  | 17   |
| Longitud de la raíz.....  | 18   |
| Fluorescencia de la clorofila (Fv/Fm):.....                         | 19   |
| Análisis foliar. ....   | 19   |
| Análisis químico del suelo.....                                     | 20   |

|   |    |
|---|----|
| Análisis físico del suelo.....                              | 21 |
| Análisis microbiológico del suelo.....                      | 21 |
| Conteo de los nódulos producidos por <i>Rhizobium</i> ..... | 22 |
| Número de vainas producidas .....                           | 22 |
| Número de granos producidos por tratamiento.....            | 22 |
| Rendimiento por planta por tratamiento. ....                | 22 |
| DISCUSIÓN.....  | 23 |
| CONCLUSIONES.....   | 28 |
| LITERATURA CITADA .....                                     | 29 |

## RESUMEN

*Nostoc muscorum* es una cianobacteria filamentososa que presenta estructuras especializadas llamadas heterocistes, que le permite convertir el nitrógeno molecular atmosférico a formas disponibles como amonio. En entornos agrícolas, las microalgas mejoran la fertilidad del suelo y contribuyen al crecimiento y la protección de las plantas, ofreciendo una alternativa para reducir nuestra dependencia de los fertilizantes químicos. El objetivo principal de esta investigación consistió en analizar los efectos de la inoculación de una cianobacteria nativa de Costa Rica (*Nostoc muscorum*) en el crecimiento de la planta de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y en algunos parámetros agronómicos del suelo en condiciones de invernadero. Se utilizaron cuatro tratamientos: el T1 (testigo), T2 (fertilización nitrogenada química al 100%), T3 (50% de la dosis de nitrógeno químico y 40 ml de la cianobacteria *Nostoc muscorum*) y T4 (fuente de nitrógeno (80 ml de cianobacteria). Se evaluaron diferentes parámetros fisiológicos a la planta como: porcentaje de germinación, altura de la planta, número de hojas, diámetro del tallo, número de flores, longitud de la raíz, biomasa de las plantas, área foliar específica y fluorescencia de la clorofila, así como diferentes análisis en el suelo y hojas de la planta. Se realizó tres diferentes análisis estadísticos: (1. medidas repetidas con respuesta Poisson para flores y hojas; 2. modelo de medidas repetidas con respuesta normal para altura y 3. varianza de una vía para el resto de las mediciones). Se obtuvo diferencias significativas entre los tratamientos con respecto a la altura, diámetro, cantidad de flores y hojas desarrolladas, biomasa producida, área foliar específica, longitud de la raíz y fluorescencia de las plantas. El T3 fue el tratamiento con mejores resultados, pero con respecto a la germinación, el T4 presentó un 100% de germinación; además, los resultados obtenidos en el análisis químico foliar demuestran que el T3 presentó un porcentaje de nitrógeno en sus tejidos en el ámbito permitido. Con respecto a la acidez del suelo, el T1, T3 y T4 presentaron valores mayores al mínimo. El T3 y T4 son los que presentaron los valores más altos de fósforo. El T4 presentó los valores más altos en porcentaje de nitrógeno, la relación C/N, el porcentaje de materia orgánica y la retención de humedad. Según los datos de porosidad se observó que el T3 es el que contiene un mayor porcentaje. El T3 fue el que produjo una mayor cantidad de vainas y granos y un rendimiento más alto en comparación con los otros tratamientos. Se puede concluir con respecto a esta investigación que la fuente de nitrógeno proporcionada por la cianobacteria ayuda a mejorar el desarrollo de los parámetros medidos de las plantas y funciona como una fuente parcial para que las plantas obtengan el nitrógeno requerido para su crecimiento.

## ABSTRACT

*Nostoc muscorum* is a filamentous cyanobacteria that has specialized structures called heterocyst, which allow it to convert atmospheric molecular nitrogen to available forms such as ammonium. In agricultural settings, microalgae improve soil fertility and contribute to plant growth and protection, offering an alternative to reduce our dependence on chemical fertilizers. The main objective of this research was to analyze the effects of the inoculation of a native Costa Rican cyanobacteria (*Nostoc muscorum*) on the growth of the bean plant (*Phaseolus vulgaris*) and on some agronomic parameters of the soil under greenhouse conditions. Four treatments were used: T1 (control), T2 (100% chemical nitrogen fertilization), T3 (50% of the dose of chemical nitrogen and 40 ml of the cyanobacteria *Nostoc muscorum*) and T4 (nitrogen source 80 ml of the cyanobacteria *Nostoc muscorum*). Different physiological parameters of the plant were evaluated, such as: germination percentage, plant height, number of leaves, stem diameter, number of flowers, root length, plant biomass, specific leaf area and fluorescence of the plants. chlorophyll, as well as different analyzes in the soil and leaves of the plant. Three different statistical analyzes were carried out: (1. repeated measures with Poisson response for flowers and leaves; 2. model of repeated measures with normal response for height and 3. one-way variance for the rest of the measurements). Significant differences were obtained between the treatments with respect to height, diameter, number of flowers and developed leaves, biomass produced, specific leaf area, root length and fluorescence of the plants. T3 was the treatment with the best results, but regarding germination, T4 presented 100% germination; In addition, the results obtained in the foliar chemical analysis show that the T3 presented a percentage of nitrogen in its tissues in the permitted range. Regarding soil acidity, T1, T3 and T4 presented values higher than the minimum. T3 and T4 are the ones that presented the highest phosphorus values. T4 presented the highest values in nitrogen percentage, C/N ratio, organic matter percentage and moisture retention. According to the porosity data, it was observed that T3 is the one that contains a higher percentage. T3 was the one that produced a greater number of pods and grains and a higher yield compared to the other treatments. It can be concluded regarding this research that the nitrogen source provided by the cyanobacteria helps to improve the development of the measured parameters of the plants and works as a partial source for the plants to obtain the nitrogen required for their growth.



## LISTA DE CUADROS

|   |    |
|---|----|
| <b>Cuadro 1:</b> Descripción de los tratamientos utilizados en el experimento realizados en CIMAR, UCR.....                                     | 10 |
| <b>Cuadro 2:</b> Porcentaje de germinación de semillas de frijol en los tratamientos realizados en el CIMAR, UCR.....                           | 13 |
| <b>Cuadro 3:</b> Análisis químico foliar de las plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> en los tratamientos.....                                   | 20 |
| <b>Cuadro 4:</b> Análisis químico del suelo de los tratamientos utilizados para el experimento en la UCR.....                                   | 21 |
| <b>Cuadro 5:</b> Análisis de los siguientes parámetros físicos del suelo: retención de humedad, densidad y porosidad.....                       | 21 |
| <b>Cuadro 6:</b> Análisis microbiológico del suelo (biomasa microbiana, bacterias y fijadores de nitrógeno) de los tratamientos utilizados..... | 22 |
| <b>Cuadro 7:</b> Rendimiento por planta de <i>Phaseolus vulgaris</i> en los tratamientos realizados en el CIMAR, UCR.....                       | 23 |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Promedio de la altura de las plantas en cm a lo largo del tiempo en días después de la siembra (DDS).....                                | 14 |
| <b>Figura 2.</b> Promedio de hojas a lo largo del tiempo en días después de la siembra (DDS). .....   | 15 |
| <b>Figura 3.</b> Promedio de flores a lo largo del tiempo en días después de la siembra (DDS). .....  | 16 |
| <b>Figura 4.</b> Correlación entre la biomasa promedio de cada parte de la planta y la biomasa total por tratamiento (A: T1, B: T2, C: T3 y D: T4). ..... | 17 |
| <b>Figura 5.</b> Total del Área Foliar Específica por tratamiento. ....   | 18 |
| <b>Figura 6.</b> Promedio longitud de raíz por tratamiento en cm. Letras diferentes en cada gráfico indican diferencias significativas .....              | 18 |
| <b>Figura 7.</b> Promedio de la medición de Fv/fm en las plantas de frijol por tratamiento .....  | 19 |



UNIVERSIDAD DE  
COSTA RICA

SEP Sistema de  
Estudios de Posgrado

**Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.**

Yo, Marcel Isaac Zúñiga Vega, con cédula de identidad 114350789, en mi condición de autor del TFG titulado Uso de la craneobacteria *Mastoc muscorum* como biofertilizante y sus efectos tanto en el desarrollo del frijol (*Phaseolus vulgaris*) como en las características del suelo en condiciones de invernadero

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI  NO \*

\*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: \_\_\_\_\_ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

**FIRMA ESTUDIANTE**

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

## **USO DE LA CIANOBACTERIA *NOSTOC MUSCORUM* COMO BIOFERTILIZANTE, EFECTOS EN EL DESARROLLO DEL FRIJOL (*PHASEOLUS VULGARIS*) Y EN LAS CARACTERÍSTICAS DEL SUELO EN CONDICIONES DE INVERNADERO.**

### **INTRODUCCIÓN.**

Las cianobacterias (también conocidas como algas verde-azuladas) son organismos procariotas que se parecen a las bacterias gram negativas en su estructura, pero poseen un sistema fotosintético que libera O<sub>2</sub> similar al de las algas eucariotas y a las plantas superiores (Vaishampayan, et al, 2001), también son conocidos como los antecesores del cloroplasto moderno (Chakdar, et al, 2012). Una de las características más importantes de las cianobacterias a nivel celular la tiene el citoplasma, ya que presenta membranas tilacoidales que contienen el aparato fotosintético (Fernández et al., 2011). Pertenecen al dominio de las bacterias y se caracterizan por la capacidad de realizar la fotosíntesis oxigénica (Herrero et al., 2001), aunque algunas pueden desarrollar fotosíntesis anoxigénica que depende únicamente del Fotosistema I (PSI) donde utilizan el sulfuro (u otros compuestos) como donador de electrones (Fernández et al., 2011). El principal crecimiento de estos organismos es por medio de la fijación de CO<sub>2</sub> a través del ciclo de Calvin. (Mayz-Figueroa, 2004). Las cianobacterias son los primeros microorganismos fotosintéticos en utilizar el agua como donador de electrones; además, de ser los responsables de la oxigenación de la atmósfera terrestre (Fernández et al., 2011).

Las cianobacterias presentan clorofila a y ficobiliproteínas (ficocianinas, aloficocianinas y ficoeritrina) (Fernández et al., 2011); además, se caracterizan por tener una gran diversidad morfológica; desde organismos unicelulares hasta multicelulares filamentosas con o sin presencia de heterocistos (estructuras capaces de fijar nitrógeno) (Mayz-Figueroa, 2004). El desarrollo de los heterocistos se presenta cuando hay poca disponibilidad de nitrógeno (N) en el medio donde están creciendo (Fernández et al., 2011).

Presentan estructuras llamadas acinetos que les permiten generar resistencia cuando las condiciones ambientales son desfavorables; además, ciertos cambios en el ambiente hacen que estos organismos desarrollen los hormogonios, que son filamentos móviles que les permiten su dispersión y simbiosis con otros organismos (Fernández et al., 2011).

Las cianobacterias poseen vesículas de gas que les permite flotar, además, tienen la capacidad de crecer y reproducirse bajo distintas condiciones de luz, temperatura y en sustratos con diferentes nutrientes como el nitrógeno, fósforo, entre otros (Licera et al., 2015), no obstante, el crecimiento de estos organismos se puede limitar, en algunos ecosistemas por la disponibilidad de fósforo en el medio (Whitton & Potts, 2012).

Se caracterizan por tener un elevado contenido proteico y un metabolismo que les permite adaptarse a diferentes condiciones ambientales (Pilco & Viera, 2014), con una amplia distribución ecológica y variedad de hábitats, llegando a colonizar diferentes tipos de ecosistemas (Oren, 2014). Se distribuyen desde ambientes de agua dulce, salobre o marina, hasta en condiciones extremas como aguas termales, lugares congelados o desiertos (Meichtry et al., 2009).

Su diversidad morfológica y metabólica les da la ventaja de ser organismos capaces de proporcionar una amplia gama de productos que se aplican desde la industria de alimentos, nutrición, cosmética, farmacéutica, agricultura hasta la creación de combustibles (Chakdar et al., 2012). Uno de los usos más comunes que se les otorga a las cianobacterias es la inoculación de los suelos para mejorar su estructura física y biológica, así como la fertilidad para los cultivos, especialmente la cantidad de N (Whitton y Potts, 2012).

Las cianobacterias del género *Nostoc* han generado mucho interés en el área de la investigación y por sus usos biotecnológicos ya que sus características son útiles para ser usadas en sistemas de producción agrícolas rentables y ecológicamente amigables con el ambiente (Medina, 2017).

Un estudio realizado por Rogers & Burns (1994), encontró un aumento pronunciado en las propiedades químicas del suelo, un aumento total de Carbono aproximadamente entre un 50 al 63% y Nitrógeno total aumentando en 111-120% con el uso de *Nostoc muscorum*. Otro estudio, también mostró que la inoculación del suelo con diferentes cepas de cianobacterias indujo una gran proliferación microbiana, así como altos aumentos en nutrientes disponibles (Maqubela et al., 2009).

Además, estudios donde se realizó inoculación con cianobacterias, se observó plantas con mayor rendimiento y crecimiento vegetativo y una mayor longitud de raíz (Singh et al., 2016).

Por otra parte, investigaciones han demostrado que las cianobacterias pueden proveer entre 25-30 kgN/ha/estación (Venkataraman, 1981), aumentando a un 30% la productividad de la cosecha (Goyal, 1997). Además, los autores reportan que la inoculación del suelo en zonas desérticas con la cianobacteria *Nostoc* sp., ha incrementado los niveles de la materia orgánica y una recuperación de los suelos degradados (Sharma et al., (2014), Adam (1999), Obana et al., 2007).

Se ha demostrado que, en contacto con los suelos, el género *Nostoc*, comúnmente, se encuentra en simbiosis con hongos, ayudando a formar alrededor del 10% de las especies conocidas de líquenes (Bonne & Castenholz, 2001). El suelo en el que crece generalmente el género *Nostoc* es fuertemente alcalino (Cysewski & Lorenz, 2004).

*Nostoc* crece formando colonias de color verde azulado (debido a la clorofila y ficocianina) pero en ocasiones presenta una coloración marrón debido a la presencia de ficoeritrina; además, presenta una forma parecida a un racimo de uvas, traslúcida y esférica, con un diámetro que varía entre 10 y 25 mm (Medina, 2017).

*Nostoc* pertenece al orden de las Nostocales y presenta filamentos isopolares que diferencian acinetos y heterocistes (Hrouzek et al., 2013). Las células vegetativas de este microorganismo son esféricas, formando filamentos retorcidos no ramificados y grandes (Medina, 2017), mucilaginosos, lo cual les brinda una de las características diagnósticas clave del género (Hrouzek et al., 2013). Estas células vegetativas son las encargadas de realizar la fotosíntesis en las cianobacterias del género *Nostoc* (Fernández et al., 2011).

La formación de los filamentos vegetativos se puede lograr mediante dos ciclos diferentes. En el hormogónico, la diferenciación de las hormogonias comienza con la fragmentación de filamentos vegetativos viejos en posiciones adyacentes a los heterocitos; posteriormente, se desarrollan nuevos filamentos vegetativos a partir de la hormogonia (Hrouzek et al., 2013)

En el ciclo esporogónico, los acinetes germinan en filamentos vegetativos, siguiendo un esquema apoheterocítico, mientras que los heterocistos se desarrollan tanto en posiciones terminales como intercalares. Así, el género *Nostoc* es heterogéneo cuando se considera su ciclo de vida (Hrouzek et al., 2013).

Además, es fundamental mencionar que las cianobacterias del género *Nostoc* presentan una estructura conocida como vaina, la cual juega un papel importante en la protección de las células al estrés ambiental, cuanto más gruesa es la vaina, mayor es la probabilidad de supervivencia, además, sirve para concentrar metales y protegerlas de la depredación por parte de otros organismos (Medina, 2017).

Una característica importante de esta cianobacteria es la presencia de los heterocistes (células del filamento diferenciadas) favorecidas debido a la disminución de N en el sustrato donde se encuentran (Fernández et al., 2011). El proceso de diferenciación de estas estructuras tiene un tiempo de duración de 12 a 20 horas (Fernández et al., 2011), que a menudo se produce en el medio o al final de los filamentos. Estas estructuras presentan una pared celular gruesa y cuyo tamaño varía de acuerdo a la cantidad de nitrógeno fijado en el mismo. Estos pueden ser subsféricos o elipsoidales, con un diámetro aproximado entre 6.4 y 7.5  $\mu\text{m}$  (Medina, 2017). La estructura más característica de los heterocistes es la envoltura externa, la cual consta de una capa laminada de glicolípidos y que constituye la verdadera barrera contra la entrada de oxígeno al interior de los heterocistos; además, cuenta con una capa externa de polisacáridos y una pared celular (Fernández et al., 2011).

Otro rasgo importante de estas estructuras cuando están maduras es la presencia de gránulos polares refráctiles de cianoficina, localizados próximos a las uniones con las células vegetativas adyacentes, la cual es una reserva dinámica de nitrógeno (Fernández et al., 2011).

Los heterocistes actúan como sumideros de carbono reducido suministrado por las células vegetativas y a su vez, estas estructuras actúan como fuente de nitrógeno reducido para las células vegetativas, las cuales lo importan como aminoácidos, entre ellos la arginina, glicina, glutaminas, entre otros (Fernández et al., 2011).

Los heterocistes le permiten a las cianobacterias convertir el nitrógeno molecular atmosférico en formas disponibles como amonio (Choudhary & Bimal, 2010), por medio de la enzima nitrogenasa (Tovar, 1993). Gracias a esta enzima, se cataliza la conversión del nitrógeno ( $N_2$ ) a amonio ( $NH_4$ ). Este nitrógeno metabolizado es absorbido por las plantas que forman moléculas orgánicas indispensables en los procesos metabólicos y en el crecimiento (Nelson & Cox, 2006). A este proceso se le conoce como fijación biológica de nitrógeno (Choudhary & Bimal, 2010). Para que se lleve a cabo la reducción del nitrógeno atmosférico a amonio dentro de los heterocistes por medio de la nitrogenasa se necesita una fuente de energía y un poder reductor de la enzima (Fernández et al., 2011).

Bajo condiciones de luz, la energía (ATP), es suministrado por el fotosistema I (PSI) vía fotofosforilación cíclica, mientras que en condiciones de oscuridad es suministrado por la fosforilación oxidativa. El poder reductor necesario para la reducción de los donadores primarios de electrones a la nitrogenasa, procede del proceso de respiración por el que pasan los carbohidratos (sacarosa) fotosintetizados en las células vegetativas, importados por los heterocistes (Fernández et al., 2011).

Como el nitrógeno es uno de los macronutrientes más importantes y es ampliamente usado en fertilizantes, el uso de la fijación biológica del nitrógeno en agricultura representa un área potencial para una mayor utilización en este campo, por eso, las características de *Nostoc* mencionadas anteriormente, la hacen ser una cianobacteria apta para abonos naturales en la agricultura (Medina, 2017).

La fijación de nitrógeno en los bosques templados o tropicales se debe, en parte, a las cianobacterias (Vitousek et al., 2002). En las zonas del Ártico, son consideradas como la fuente primordial de entrada de nitrógeno ya que se consideran como colonizadores primarios en terrenos recientemente desglaciados y en áreas emergidas del mar (Liengen & Olsen, 1997). Además, pueden presentar un alto rendimiento de la biomasa, que contribuyen a mejorar la fertilidad del suelo presentando a las cianobacterias como un recurso valioso para el desarrollo sostenible en la agricultura (Singh et al., 2016).

En suelos áridos, las poblaciones de cianobacterias ayudan a disminuir la erosión eólica e hídrica; además, mejoran el estado nutricional de las plantas vasculares, el establecimiento de plántulas y proporcionan una fuente de amonio mediante fijación biológica de nitrógeno (Aranibar et al., 2003).

Desde el punto de vista alimenticio, agronómico y ecológico, las cianobacterias se han considerado cómo fuentes importantes de fertilizantes en cultivos agrícolas, suplementos nutritivos y fijación de nitrógeno en ecosistemas naturales (Brahmaprakash & Sahu, 2012; Dhar, et al, 2015); además, se ha demostrado que aumentan la disponibilidad del fósforo por parte de las plantas (Irisarri et al., 2001). Se debe de tomar en cuenta que la agricultura sostenible, ofrece el potencial de satisfacer todas las necesidades agrícolas, utilizando gran parte de los recursos ambientales, pero a su vez con un uso adecuado de los mismos (Singh et al., 2011).

Las cianobacterias se han tomado en cuenta en la producción de biofertilizantes (Singh et al., 2011) los cuales se definen como sustancias que contienen microorganismos vivos que colonizan la rizosfera o el interior de la planta y promueven el crecimiento al aumentar el suministro o la disponibilidad de nutrientes primarios (Sahu et al., 2012). Son productos que contienen células vivas de diferentes tipos de microorganismos que tienen la capacidad de convertir elementos nutricionalmente importantes en su forma disponible para las plantas a través de procesos biológicos (Wu et al., 2005).

La utilización de productos para la agricultura de fuentes microbianas como biofertilizantes a base de cianobacterias brindan varias ventajas sobre los fertilizantes químicos; además, se consideran más amigables para el ambiente ya que, por ejemplo, impiden la acumulación de sustancias tóxicas en el suelo y en los cultivos (Wu, et al, 2005),

Otra función importante de las cianobacterias en el campo de la agricultura, es la incorporación de varias sustancias promotoras del crecimiento en plantas (Kaushik, 2014, Dhar et al., 2015), como los polisacáridos, enzimas, carbohidratos, vitaminas, péptidos y lípidos (Kaushik, 2014), mejorando las características físicas y químicas del sustrato y ejerciendo un efecto favorable sobre el estado nutricional de las plantas (Al- Gosaibi, 1994, Adam, 1999).

La aplicación regular de cepas de cianobacterias en el suelo es prometedora para mejorar la estabilidad del sustrato, las actividades microbianas, la mineralización de nutrientes y el crecimiento de cultivos de manera ecológicamente sostenible (Hegde et al., 1999). Estos movilizan elementos importantes para las plantas (Hegde et al., 1999), como fósforo y nitrógeno influyendo en la disponibilidad para ellas (Earanna & Govindan, 2002). Además, el uso de microalgas como biofertilizantes proporcionan una alternativa sostenible, pues no solo mejoran



la producción agrícola; sino que también disminuyen la contaminación ambiental producida por los fertilizantes químicos tradicionales (García-González & Sommerfeld, 2016).

El uso de estos productos que incluyen principalmente organismos fijadores de nitrógeno como *Nostoc* y excretoras de sustancias metabólicas (Prasanna & Kaushik, 1995, Goel et al., 1999, Uysal et al., 2015), son considerados amigables con el ambiente en la agricultura (Bloemberg et al., 2000, Dhar et al., 2015), beneficiando tanto la productividad de los cultivos como el ecosistema (Singh et al., 2011).

Según El-Ayouty et al., (2012) el uso de productos químicos como fertilizantes en la agricultura aumenta la producción y resuelve problemas relacionados con el déficit alimenticio; pero a su vez, genera graves problemas a nivel ambiental y social debido a que contienen grandes cantidades de nitrógeno, fósforo y potasio generando contaminación en el agua y suelo (Bhardwaj et al., 2014); además, aumentan las emisiones de óxido nitroso ( $N_2O$ ) como producto del proceso de desnitrificación contribuyendo de esta manera al cambio climático (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2009). A largo plazo, la aplicación de fertilizantes químicos induce a un ambiente infértil lo que dificulta la producción de nuevos cultivos, situación que se refleja en plantas vulnerables a enfermedades, disminuyendo la cantidad y la calidad de la producción agrícola (Sánchez et al., 2011). Incluyendo a esto, la degradación del suelo, que es uno de los problemas más serios que afectan la producción de la cosecha, aunado al aumento de los precios de los agroquímicos, deja a los agricultores con pocas ganancias (Sánchez et al., 2011).

Es por eso que, en la agricultura es importante fomentar el uso de insumos biológicos, ya que estos mejoran el suministro de nutrientes y la salud del suelo, entre ellos, existe una alternativa viable como la cianobacteria *Nostoc* sp que tiene la capacidad de fijar nitrógeno, generando una fertilización amigable con el ambiente, creando sistemas agroecológicos con impactos ambientales positivos y a su vez, disminuyendo el uso de fertilizantes nitrogenados.

En la presente investigación se utilizó como cultivo experimental el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Dentro del grupo de las leguminosas comestibles, este grano se distribuye en los cinco continentes y es un componente esencial de la dieta, especialmente en Centroamérica y Sudamérica (Ulloa et al., 2011).

El frijol es actualmente cultivado por pequeños agricultores; con frecuencia, en condiciones no favorables y con un mínimo uso de insumos (Beebe et al., 2008), donde constituye una fuente económica de proteínas y calorías para la población (Rao, 2001). No obstante, los rendimientos del cultivo son afectados por varias causas, entre ellas la sequía que puede generar pérdidas entre 10% y 100% del cultivo. Cerca del 60% de las regiones productoras de frijol presentan

períodos prolongados de sequía el cual constituye un factor importante de reducción en rendimiento (Thung & Rao, 1999; Rao, 2001)

Según la FAO (2005), el frijol es uno de los cultivos con mayor producción en el planeta mientras que en Costa Rica, es el segundo en importancia después del arroz (MAG, 2007), constituye un alimento indispensable en la dieta del costarricense, donde el 96.7% de la población lo consume, principalmente en zonas rurales (Rodríguez & Fernández, 2003).

El cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*) pertenece a la familia de las leguminosas y su origen se dio en el continente americano (Ancín, 2011). Es una planta herbácea anual, que presenta dos tipos de crecimiento (el determinado o el indeterminado). El determinado es aquel cuya parte terminal se presenta en inflorescencia, mientras que el indeterminado, en su parte terminal, se presenta un meristemo vegetativo que le permite seguir en continuo crecimiento (Ancín, 2011). El ciclo de vida varía entre 80 y 180 días, dependiendo de la variedad sembrada y cuenta con dos fases de crecimiento: vegetativa (desde la germinación de la semilla hasta la aparición de los primeros botones florares) y reproductiva (madurez de la cosecha) (Ancín, 2011).

Su sistema radicular se forma por la radícula del embrión, convirtiéndose en la raíz primaria, desarrollando sobre ella las raíces secundarias (o adventicias) que le permiten absorber agua y nutrientes (Ancín, 2011). Posee un tallo que es el eje central de la planta, dando forma a la sucesión de nudos y entrenudos originando un meristemo apical del embrión de la semilla. Su tallo es epigeo, herbáceo y delgado, erecto, semipostrado o postrado, dependiendo de la variedad (Ancín, 2011).

Las ramas de esta planta se desarrollan gracias a un complejo de yemas localizadas en las axilas (complejo axilar o triada), formado por tres yemas visibles; además, sus hojas se insertan en los nudos de los tallos y las ramas y son de dos tipos: simples (hojas primarias) y las compuestas (hojas trifoliadas típicas del frijol), sus flores o inflorescencias son de color blanco, amarillo, rosado o morado que aparecen en racimos terminales en las plantas de hábito de crecimiento determinado y axilares en las de hábito indeterminado (Ancín, 2011). Presentan un fruto en forma de vaina y desarrolla semillas unidas de una forma alterna sobre la sutura ventral de la vaina (Ancín, 2011).

El cultivo del frijol a nivel nacional constituye actualmente 10 mil TM anuales, con un rendimiento de 0.68 TM/HA cultivadas en aproximadamente 15 539 Has y es llevada a cabo por aproximadamente 8.000 productores, donde los principales destinatarios son el autoconsumo (10%), y el 90% de la producción es para la venta, no obstante, la producción ha disminuido de 39,000 en el periodo 1997-1998 a 15,539 Has en el 2006-2007 (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2007). Esto se debe entre otras razones, a la disminución del uso de semillas de

variedades mejoradas, alta dependencia agroquímicos y altos costos de producción (Araya, 2000).

Se debe de tomar en cuenta que el frijol generalmente se siembra entre los 200 y 1500 msnm, y que los mayores rendimientos se obtienen en zonas donde la temperatura fluctúa entre 20-25°C, mientras que el exceso o déficit de precipitación son perjudiciales para la cosecha, pues perjudican el desarrollo de las plantas y la proliferación de las enfermedades. En Costa Rica se cultiva en la mayoría de los suelos, sin embargo, las mayores áreas de siembra se encuentran en suelos de baja fertilidad, con pH medianamente ácidos y buen drenaje (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2009).

En Costa Rica, el uso de semillas con pocas mejoras genéticas, altos costos de producción, exceso de laboreo del suelo, pero sobre todo la alta demanda de fertilizantes y agroquímicos, hacen que la producción sea menos competitiva con el resto de las zonas productora del mundo (Jiménez, 2008).

El uso de *Nostoc* en cultivos como el frijol, permite tener costos de producción más bajos ya que se ha demostrado que la fertilización nitrogenada química en este cultivo representa el 25% de los costos aproximadamente (Araujo et al., 2018); además de tener beneficios en el suelo e incrementar el contenido de nitrógeno y carbono, así como la estimulación de la actividad de la comunidad microbiana y el aumento de materia orgánica (D'Acqui, 2016).

Se debe considerar que la agricultura sostenible, ofrece el potencial de satisfacer todas las necesidades agrícolas, utilizando gran parte de los recursos ambientales, pero a su vez con un uso adecuado de los mismos (Singh et al., 2011). El reciente incremento por el interés de una agricultura amigable con el ambiente y sostenible, ha aumentado el uso de productos biológicos, ya que estos contienen microorganismos eficientes, mejorando el crecimiento de los cultivos, ayudando a la sostenibilidad del medio ambiente y la productividad sana de las siembras (Singh et al., 2011).

Los biofertilizantes promueven la agricultura sostenible y de conservación por lo que han sido considerados como una oportunidad actual primordial en todo el mundo para satisfacer la creciente demanda de alimentos más saludables y a su vez, generar una sostenibilidad ambiental; además, ayudan a mitigar el efecto de gases invernadero y a contrarrestar los efectos del cambio climático por la disminución en el uso de fertilizantes nitrogenados (Singh et al., 2016).

La cianobacteria utilizada para esta investigación fue aislada bajo el marco del proyecto 808-A7-061: Mantenimiento y monitoreo de una colección viva de microalgas y cianobacterias en el laboratorio de microalgas del CIMAR

## OBJETIVOS.

### Objetivo General:

Analizar los efectos de la inoculación de una cianobacteria nativa de Costa Rica (*Nostoc muscorum*) en el crecimiento de la planta de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y en las propiedades físico-químicas-biológicas del suelo en condiciones de invernadero.

### Objetivos específicos:

1. Medir variables de crecimiento y desarrollo de la planta de frijol tales como: porcentaje de germinación, altura, diámetro, número de hojas producidas, número de flores, número de vainas, número de semillas, biomasa total de cada parte vegetativa de las plantas, rendimiento por planta, longitud de la raíz, área foliar específica y fluorescencia de la clorofila (Fv/Fm) de las hojas de frijol.
2. Analizar el efecto de la inoculación de *Nostoc muscorum* sobre la composición química, física y microbiológica del suelo en cada tratamiento del suelo y las hojas del cultivo de frijol.
3. Analizar el efecto sobre la composición química de las hojas del cultivo de frijol.
4. Evaluar la interacción entre *Rhizobium* y *Nostoc muscorum*.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### Sitio Experimental

El proyecto se realizó en el Centro de Investigaciones de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad de Costa Rica (CIMAR), Calle Novillos, San José, San Pedro, Costa Rica, entre octubre del 2019 a agosto 2020.

### Medio de cultivo de la cianobacteria.

Se utilizó la cianobacteria *Nostoc muscorum*, muestreada en el Río Murciélagos, La Cruz, Guanacaste, la cual se aisló, cultivó y se escaló en el Laboratorio de Microalgas de la Universidad de Costa Rica. Esta cianobacteria se cultivó en un recipiente de 400 ml a una irradiación entre 100- 150  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ , posteriormente, se escaló a volúmenes de 15-20 litros, mediante un sistema de cultivo discontinuo, hasta obtener un crecimiento en fase exponencial. Se utilizó el medio de cultivo BG0 (Rippka, et al., 1979) con un pH 7.5 y temperatura 28°C.

El crecimiento de la biomasa se monitoreó por medio de la cuantificación de la concentración en términos de peso seco (gr/l) a partir de volúmenes de 10 ml (en duplicado) con filtros pre-pesados y secados a una temperatura de 105°C durante 3 horas.

Se colectó la biomasa producida en los cultivos discontinuos de *Nostoc muscorum*, se lavó con agua destilada para eliminar el resto de nutriente del medio de cultivo donde estaba el inóculo

y se midió con una probeta las cantidades que se debían agregar a cada maceta de cada tratamiento.

### **Material Vegetal.**

La variedad de frijol (*Phaseolus vulgaris*) que se utilizó fue Nambí (frijol negro), donada por el programa de leguminosas de la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno de la Universidad de Costa Rica (UCR).

### **Unidades experimentales y unidades de muestreo**

Como unidades experimentales se utilizaron macetas de plástico con una capacidad de 1 kg, las cuales dispusieron de cuatro plantas cada una y se llenaron con suelo extraído de la Finca 2 de la Universidad de Costa Rica.

Se utilizó un andisol, cuya característica principal es el desarrollo a partir de materiales y ceniza volcánica, además de presentar alto contenido de materia orgánica y minerales como la imogolita y las alofanas. Son suelos que se meteorizan rápidamente, formando mezclas amorfas de aluminio y silicatos, de texturas medias (franco arenoso, franco o franco limosa) un drenaje de bueno a moderadamente excesivo, color negro en la superficie y café en la profundidad (Elizondo, 2015).

### **Descripción de los tratamientos.**

Para el establecimiento de los tratamientos se empleó un diseño experimental completamente al azar, con cuatro tratamientos y 10 repeticiones cada uno, con cuatro semillas sembradas a 5 cm de profundidad cada repetición.

Los tratamientos usados son los siguientes (Cuadro 2.6.1):

T1 (testigo): Cultivo de frijol sin fertilización nitrogenada

T2: Fertilización nitrogenada (con Nitrato de amonio) al 100% según la dosis recomendada para el cultivo de frijol (Bertsch, 2009).

T3: Fertilización nitrogenada (con Nitrato de amonio) al 50% según la dosis recomendada para el cultivo de frijol y 50% de la biomasa de la cianobacteria *Nostoc muscorum*.

T4: Fuente de nitrógeno con la cianobacteria *Nostoc muscorum* al 100%.

**Cuadro 1:** Descripción de los tratamientos utilizados en el experimento realizados en CIMAR, UCR.

| <b>TRATAMIENTOS</b>   | <b>DESCRIPCIÓN</b>  |
|-----------------------|---|
| Tratamiento 1<br>(T1) | suelo + agua destilada + Ácido fosfórico  |
| Tratamiento 2<br>(T2) | Suelo + agua + Ácido fosfórico + fertilización nitrogenada al 100% con Nitrato de Amonio. |

|                       |   |
|-----------------------|---|
| Tratamiento 3<br>(T3) | Suelo + agua + Ácido fosfórico + fertilización nitrogenada al 50% con Nitrato de Amonio + <i>Nostoc sp.</i> (40 ml de biomasa fresca por maceta). |
| Tratamiento 4<br>(T4) | Suelo + agua + Ácido fosfórico + <i>Nostoc sp.</i> (80 ml de biomasa fresca por maceta).  |

Se adicionó ácido fosfórico a todos los tratamientos debido a la deficiencia de fósforo del suelo usado en los tratamientos.

Para realizar el cálculo de la cantidad de fertilizante químico requerido se siguió lo indicado por Bertsch (2009).

La cantidad calculada de *Nostoc muscorum* para cada maceta en el T3 fue de 40 ml considerando dos fuentes de nitrógeno (Nitrato de Amonio y *Nostoc muscorum*); mientras que, para el T4, a cada maceta, se le agregó 80 ml de *Nostoc muscorum* como la fuente de nitrógeno al 100%.

Para la fertilización biológica se siguió la recomendación de Cruz (2009) y dos ensayos preliminares que se realizaron en el laboratorio de Microalgas del CIMAR durante el 2018 y 2019, donde se evidenció que al utilizar 40 ml en el tratamiento combinado y 80 ml en el tratamiento con la fuente de nitrógeno dada al 100% por la cianobacteria, se obtenía mejores resultados.

#### **Parámetros fisiológicos medidos.**

- i. Porcentaje de germinación: Se cuantificó la germinación de las plantas por tratamiento:  

$$\text{Total de semillas germinadas} \times 100 / \text{total de semillas sembradas}$$
- ii. Altura de la planta: la medición se realizó cada 8 días, desde la cicatriz de los cotiledones, hasta la base de la última ramificación
- iii. Número de hojas: Se procedió a contar el número de hojas funcionales de la planta, cada semana, a partir de la primera hoja trifoliada.
- iv. Diámetro del tallo: medido por debajo de la cicatriz de los cotiledones con un Bernier.
- v. Número de flores: Se contaron solo las flores totalmente abiertas a partir del primer primordio floral, esta medición se realizó una vez a la semana, hasta que aparecieron los primeros frutos.
- vi. Longitud de la raíz: Se midió la longitud de la raíz por planta por repetición, por tratamiento con una regla. Se tomaron las 5 repeticiones que se utilizaron para el cálculo de la biomasa.
- vii. Biomasa de las plantas: Se cuantificaron los pesos frescos y secos de las hojas, tallos y raíz por separado. Esta medición se realizó antes de la

floración para evitar la traslocación de los nutrientes en la etapa reproductiva. Para esta medición se destinó 5 repeticiones por tratamiento completamente al azar. Se obtuvo primero el peso fresco-luego se secó en una estufa a 60°C por 72 horas. Se cuantificó la biomasa de cada parte de la planta y la biomasa total por repetición por tratamiento.

- viii. Área foliar específica (AFE): Para calcular el AFE, se usó la fórmula descrita por Lambers, Chapin y Pons (2008). Con estos datos se procedió a obtener la relación entre AFE y biomasa total. Se utilizó el programa image J para medir porcentaje de área foliar.
- ix. Fluorescencia de la clorofila (Fv/Fm) de las hojas de frijol: Para la medición del Fv/Fm se tomó tres repeticiones de cada tratamiento, cuatro hojas al azar por cada repetición (para un total de 12 hojas por tratamiento) y se situaron en la oscuridad durante 24 horas; luego se colocaron en una cámara de 10 mm de longitud y se midió con un fluorómetro tipo PAM-2500 (Silva-Benavides, et al., 2013).
- x. Análisis foliar: Se realizó un análisis químico foliar a cada tratamiento antes de la floración con el fin de observar la absorción de nutrientes antes de la traslocación a los órganos reproductivos. El muestreo para el análisis se realizó midiendo 10 hojas por tratamiento de la parte media de las plantas. Se seleccionaron 10 plantas completamente al azar para el muestreo.
- xi. Análisis del suelo: se realizaron los siguientes análisis: químico, físico y microbiológico. Para el análisis químico se cuantificaron los siguientes elementos: Nitrógeno, Fósforo, Potasio, Calcio, Magnesio, Cobre, Hierro, Zinc, Manganeso, Boro y Azufre. Los análisis físicos que se realizaron fueron: densidad, porosidad y retención de la humedad mientras que los microbiológicos consistieron en: Biomasa microbiana, recuento de bacterias y recuento de fijadores de nitrógeno presentes en el suelo según la metodología propuesta para la evaluación de microorganismos fijadores de nitrógeno. Todos los análisis fueron realizados en el Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica.
- xii. Conteo de nódulos bacterianos: Se contó cada nódulo bacteriano (*Rhizobium*) formado en las raíces de las plantas de cada repetición tomadas para el cálculo de la biomasa.

- xiii. **Peso de los granos:** De cada tratamiento se tomaron todas las semillas y se pesaron en una balanza granataria. Se expresó el valor en gramos.
- xiv. **Rendimiento por tratamiento:** Rendimiento= Total de granos por tratamiento/ total de plantas. Se estimó el rendimiento en kg por hectáreas según los datos obtenidos en cada tratamiento.

### **Análisis estadístico.**

Se realizó tres modelos estadísticos diferentes debido a que las mediciones realizadas no fueron homogéneas (en metodología) entre sí. Los modelos utilizados fueron: 1) medidas repetidas con respuesta Poisson para flores y hojas; 2) modelo de medidas repetidas con respuesta normal para altura y 3) varianza de una vía para el resto de las mediciones, además, para todos los modelos se realizó pruebas de Tuckey con un nivel de significancia de  $p < 0.05$  para encontrar diferencias entre los grupos.

Para el análisis se usó el lenguaje R (R Core Team, 2018), con la versión 4.0.2 y las librerías lattice (Sarkar, 2008), lme4 (Bates, Maechler, Bolker y Walker, 2015), ggplot2 (Wickham, 2016).

Para el análisis foliar, análisis químico, físico y microbiológico del suelo no se les realizó un análisis estadístico (descriptivo) ya que solo se contó con una muestra para cada tratamiento.

## **RESULTADOS.**

### **Germinación.**

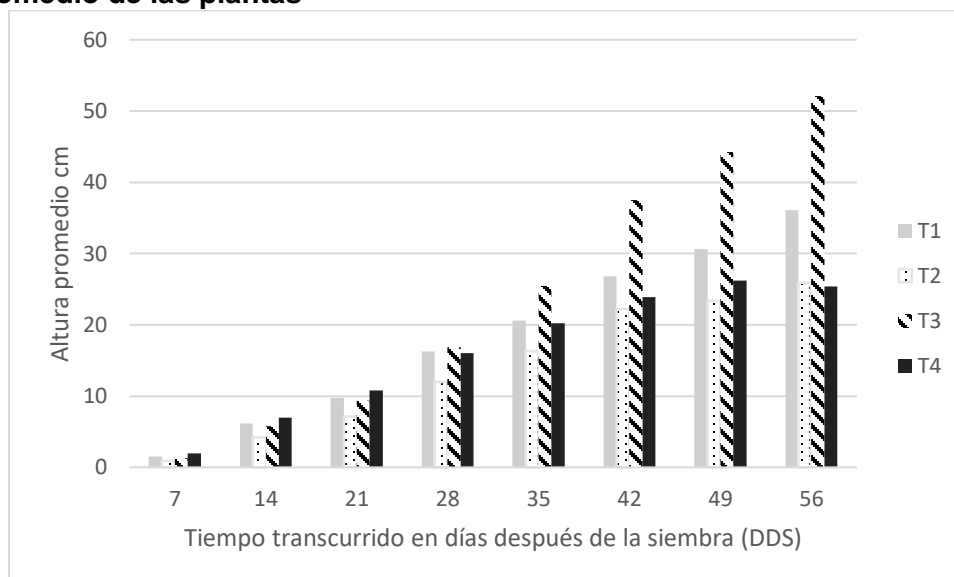
En el cuadro 3.1.1. se observa que el T4 obtuvo la mayor germinación de semillas seguido por el T1. El T3 obtuvo un total de 85% de semillas germinadas, mientras que el T2 fue el que germinó menos (82,5%).

**Cuadro 2:** *Porcentaje de germinación de semillas de frijol en los tratamientos realizados en el CIMAR, UCR.*

| <b>Tratamiento</b> | <b>Porcentaje de Germinación</b> |
|--------------------|----------------------------------|
| T1                 | 97,5%                            |
| T2                 | 82,5%                            |
| T3                 | 85%                              |
| T4                 | 100%                             |



### Altura promedio de las plantas



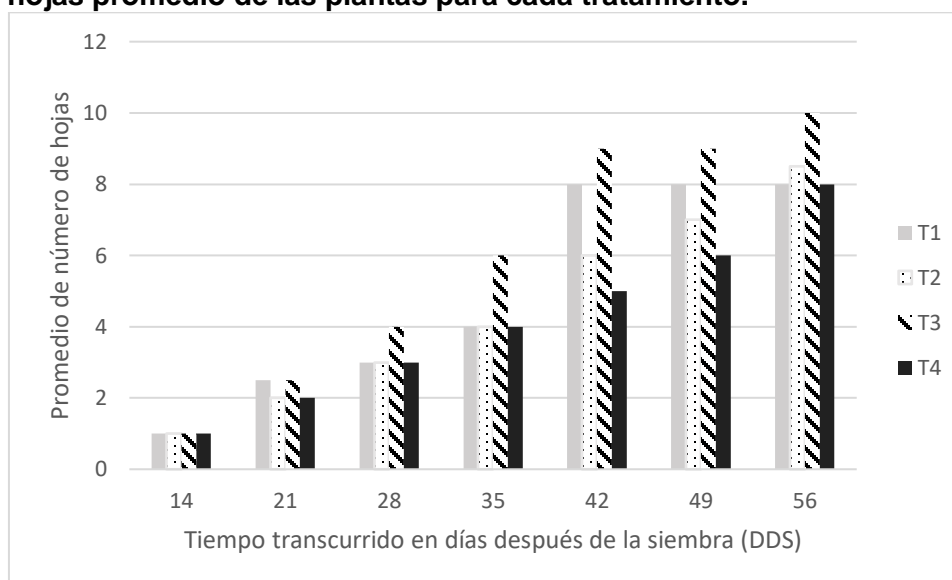
**Figura 1.** Promedio de la altura de las plantas en cm a lo largo del tiempo en días después de la siembra (DDS).

En la figura 1 se observa que la altura a los 7 días después de la siembra (DDS) fue muy similar entre los tratamientos, pero a partir del día 14 se observa una diferencia en la altura de las plantas entre tratamientos.

Después de los 7 DDS, se obtuvo que las plantas del T4 presentaron 2.7 cm más grandes que las plantas del T2.

Sin embargo, al comparar nuevamente el promedio de la altura de las plantas al final de la tercera semana (día 28 DDS), la diferencia entre T2 y el T4 no es significativa ( $p > 0,05$ ). La comparación entre el T3 y el T2 es significativa ( $p < 0,05$ ), es decir, existe diferencias entre estos dos tratamientos. Se observa que en las últimas semanas del experimento, el tratamiento 3 produce un incremento considerable en la altura de las plantas con respecto a los otros tres tratamientos.

### Número de hojas promedio de las plantas para cada tratamiento.



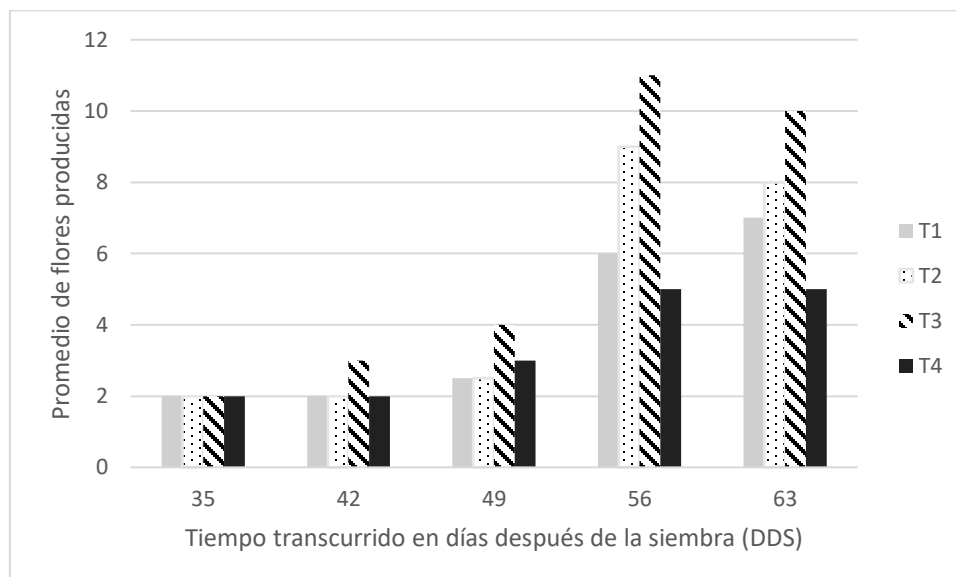
**Figura 2.** Promedio de hojas a lo largo del tiempo en días después de la siembra (DDS).

En la figura 2 se observa que al inicio del experimento todos los tratamientos tuvieron una producción promedio de 1 hoja por planta, a partir del día 28 DDS el número de hojas producidas para el tratamiento 3 aumentó; sin embargo, el número de hojas de los otros tratamientos fue similar.

Al realizar la comparación de la cantidad de hojas de las plantas entre los tratamientos, se obtuvo probabilidades asociadas inferiores a 0.001.

### Diámetro.

Según el análisis estadístico realizado, se logró obtener que entre los únicos tratamientos que hubo diferencias significativas fue entre el T2 y T3 ( $p=0.0295$ ) y entre el T3-T4 ( $p=0.040$ ). En ambos casos, el diámetro promedio de las plantas del T3 fue más ancho que el de las plantas del T2 y T4. Comparando la variabilidad de las medias de los tratamientos, en relación con el T1, este no presentó diferencias significativas con los otros tratamientos ( $p=0.0925$ ).

**Flores.**

**Figura 3.** Promedio de flores a lo largo del tiempo en días después de la siembra (DDS).

En la figura 3 se observa que el promedio de las flores en los tratamientos al inicio del tiempo fue muy similar, pero a partir del día 42, el promedio de flores producidas en T3 aumenta, mientras que al final de la toma de datos, el tratamiento que produjo menos cantidad de flores en promedio fue el T4. Sin embargo, según el análisis estadístico realizado, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p=0.899$ ).

### Relación biomasa total/biomasa de cada parte de la planta.

Se realizó el análisis estadístico tomando en cuenta la relación de biomasa total/biomasa de cada parte de la planta para observar la correlación existente.

| Cuadro A: T 1 |         |       |       |               |
|---------------|---------|-------|-------|---------------|
|               | Follaje | Tallo | raíz  | Biomasa total |
| Follaje       |         | 0,93  | -0,97 | -0,92         |
| Tallo         |         |       | -0,99 | -0,73         |
| Raíz          |         |       |       | 0,81          |

| Cuadro B: T2 |         |       |       |               |
|--------------|---------|-------|-------|---------------|
|              | Follaje | Tallo | raíz  | Biomasa total |
| Follaje      |         | 0,83  | -0,96 | -0,34         |
| Tallo        |         |       | 0,96  | -0,49         |
| Raíz         |         |       |       | 0,43          |

| Cuadro C: T3 |         |       |       |               |
|--------------|---------|-------|-------|---------------|
|              | Follaje | Tallo | raíz  | Biomasa total |
| Follaje      |         | -0,7  | -0,77 | 0,82          |
| Tallo        |         |       | 0,08  | -0,22         |
| Raíz         |         |       |       | -0,95         |

| Cuadro D: T4 |         |       |       |               |
|--------------|---------|-------|-------|---------------|
|              | Follaje | Tallo | raíz  | Biomasa total |
| Follaje      |         | 0,23  | -0,58 | 0,71          |
| Tallo        |         |       | -0,93 | 0,72          |
| Raíz         |         |       |       | -0,87         |

**Figura 4.** Correlación entre la biomasa promedio de cada parte de la planta y la biomasa total por tratamiento (A: T1, B: T2, C: T3 y D: T4).

En la figura 4, en el cuadro A (T1), se observa un aumento del área foliar y el tallo y una disminución de la raíz.

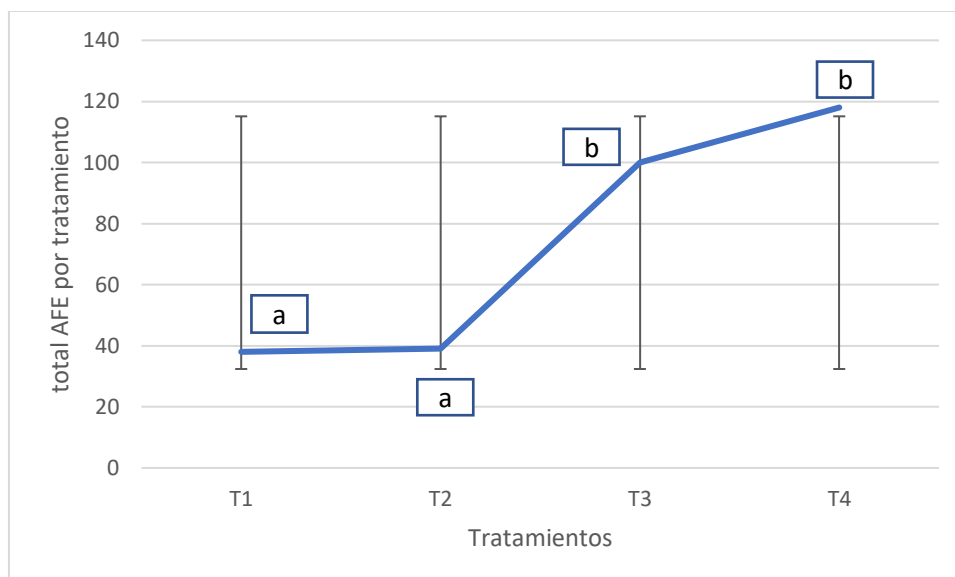
Cuadro B (T2) se observa que cuando el área foliar aumenta, la biomasa del tallo también, pero la raíz crece lentamente.

En el cuadro C (T3) se observa que la correlación entre la biomasa foliar, tallo y raíz es negativa, esto indica que conforme la planta produce mayor área foliar, el desarrollo de los tallos y raíces disminuye.

En el caso del T4 (cuadro D), se observa un desarrollo de las hojas y crecimiento del tallo pero disminuye el crecimiento de las raíces.

### Área Foliar Específica.

El área foliar específica (AFE) se obtuvo que entre los tratamientos T1 y T2 al igual que entre el T3 y T4 no existen diferencias significativas ( $p=0.9451$  y  $p=0.9864$  respectivamente), pero entre los tratamientos T1-T3, T1-T4, T2 -T3 y T3-T4 si se observó diferencias significativas ( $p=0.00942$ ,  $p=0.0111$ ,  $p=0.0059$  y  $p=0.0073$ ).

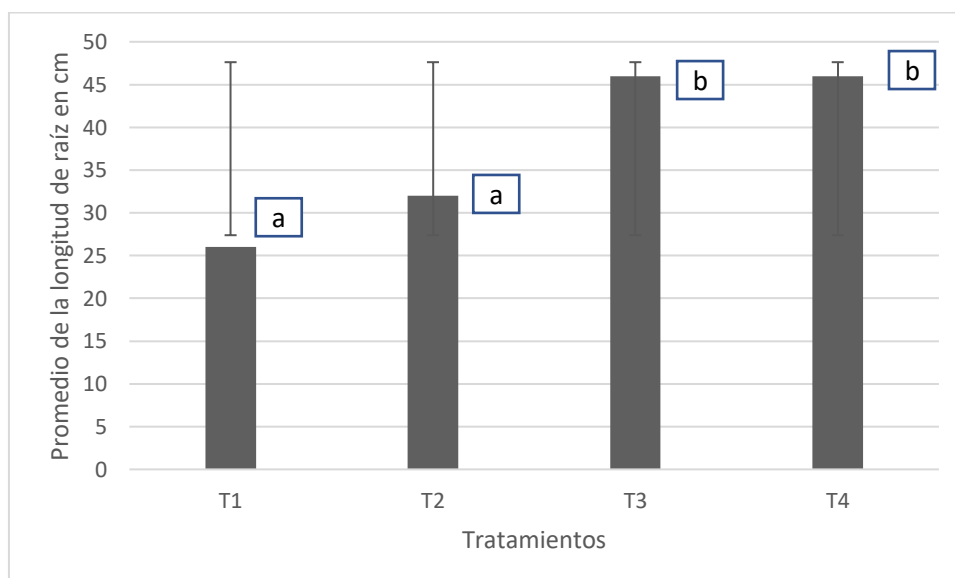


**Figura 5.** Total del Área Foliar Específica por tratamiento.

### Longitud de la raíz.

Según el análisis estadístico realizado para la medida de longitud de raíz, al comparar entre el T1 con el T3 y el T4, este presentó diferencias significativas con una diferencia en centímetros de 5.78 (T1-T3) y 5.86 (T1-T4), sin embargo, entre el T1 con el T2 no se presentó diferencias significativas. Con respecto al T2, se encontró diferencias significativas con el T3 y el T4. Ambos con una diferencia en centímetros de aproximadamente 3.65.

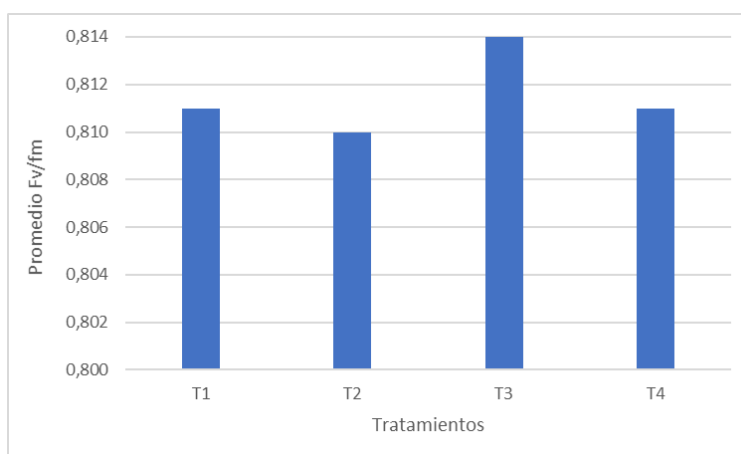
Para el T3, se observó que existen diferencias significativas con el T1 y el T2, pero con el T4 no presentó diferencias significativas. El T4 presentó diferencias significativas con el T1 y T2.



**Figura 6.** Promedio longitud de raíz por tratamiento en cm. Letras diferentes en cada gráfico indican diferencias significativas

En la figura 6 se observa el promedio en centímetros (cm) de la longitud de la raíz para las plantas de cada tratamiento. Se observa que el T3 como el T4 son los que tuvieron un promedio mayor (46 cm) mientras que el T2 tuvo un promedio de 33 cm y el T1, con el valor más bajo, 26 cm. Según el análisis estadístico realizado, se encontró diferencias significativas entre el T1 con el T3 y T4, así como el T2 con el T3 y T4, pero entre el T1 y el T2 como entre el T3 y el T4 no hubo diferencias.

### Fluorescencia de la clorofila (Fv/Fm):



**Figura 7.** Promedio de la medición de Fv/fm en las plantas de frijol por tratamiento

En la figura 7 se muestra el promedio de la medición obtenida para la fluorescencia de la clorofila en las plantas de frijol. Se observa que el tratamiento que presentó mayor diferencia fue el T3 (0.814), mientras que el tratamiento 2 y 4 se obtuvo valores para ambos de 0.811 y el tratamiento con menos absorción fue el T1 (0.810), no obstante, según el análisis estadístico realizado para los datos de fluorescencia de la clorofila, no se encontraron diferencias significativas ( $p=0.9536$ ) entre los tratamientos.

### Análisis foliar.

El cuadro 3 presenta los datos obtenidos en el análisis químico foliar realizado en las plantas de frijol. Se observa que el porcentaje (%) de masa de Nitrógeno (N) en las muestras analizadas del T1 y T4 se encuentran por debajo del ámbito aceptado. Con respecto al T3, este presentó un % de masa de N dentro de lo aceptado y el tratamiento 2 por encima de lo aceptado. El fósforo (P) tanto para el T1, T2 y T3 presentaron el mismo valor (0.34%) mientras que el T4 un valor de 0.28%. Con respecto al Ca y Mg el T2 y T3 tuvieron valores más altos mientras que el T1 y T4 los más bajos. Con respecto al B, el T1 y T2 presentaron valores más altos comparados con el T3 y T4.

**Cuadro 3: Análisis químico foliar de las plantas de *Phaseolus vulgaris* en los tratamientos**

| Tratamientos    | %masa     |           |           |           |           |          |          | mg/kg  |       |       |        |       |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|--------|-------|-------|--------|-------|
|                 | N         | P         | Ca        | Mg        | K         | S        | C        | Fe     | Cu    | Zn    | Mn     | B     |
| ámbito aceptado | 4,25-5,50 | 0,25-0,60 | 0,35-2,00 | 0,25-1,00 | 1,70-3,00 | Sin dato | Sin dato | 50-450 | 10-30 | 20-70 | 20-100 | 15-50 |
| T1              | 2,68      | 0,28      | 1,81      | 0,29      | 2,78      | 0,21     | 41,95    | 78     | 7     | 33    | 48     | 34    |
| T2              | 6,12      | 0,34      | 2,37      | 0,37      | 2,79      | 0,28     | 41,91    | 121    | 6     | 39    | 98     | 32    |
| T3              | 4,90      | 0,34      | 2,93      | 0,40      | 3,09      | 0,25     | 41,83    | 107    | 7     | 39    | 103    | 27    |
| T4              | 2,79      | 0,28      | 1,69      | 0,25      | 2,59      | 0,22     | 41,93    | 69     | 6     | 26    | 45     | 25    |

Elementos: Nitrógeno (N), Fósforo (P), Ca (Calcio), Mg (Magnesio), K (Potasio), S (Azufre), C (Carbono), Fe (Hierro), Cu (Cubre), Zn (zinc), Mn (Manganeso) y B (Boro).

#### **Análisis químico del suelo.**

En el cuadro 4 se observa los datos obtenidos del análisis químico del suelo.

Con respecto al pH, todos los tratamientos presentan un suelo con un pH neutro. Con respecto a la acidez, todos los tratamientos se encuentran en un valor óptimo, pero siendo el T2 con una acidez mayor.

Se observa que la Capacidad de Intercambio Catiónico Efectiva (CICE) del T1 presenta un valor de 19,15 cmol (+) /L, seguido por el T4 con un valor de 18,61 cmol (+) /L, luego el T3 y por último el T2 (16,72 cmol (+) /L y 14,12 cmol (+) /L respectivamente).

En relación al fósforo (P), todos los tratamientos, se encuentran por encima del valor mínimo, pero tanto el T3 como el T4 son los que tienen los valores más altos (71 mg/L y 61 mg/L respectivamente) a diferencia del T1 y T2 (50 mg/L y 32 mg/L respectivamente).

Con respecto al % de N se observa que el T4 presenta un valor de 0,29, el T1 y el T3 0,28 y por último el T2 con un % de 0,27. Observando la relación entre C/N, el tratamiento con una relación más alta es el T4, mientras que el T2 es el que muestra un valor más bajo (10,4 y 10,00 respectivamente) y según el análisis, el % de MO (materia orgánica), el T4 es el que presenta un mayor % de MO mientras que el T2 un porcentaje más bajo (4,30 y 3,85 respectivamente).

**Cuadro 4:** Análisis químico del suelo de los tratamientos utilizados para el experimento en la UCR.

|           | pH  | cmol (+) /L      |        |      |      |       | %   | mg/L |     |    |    |    | mS/cm | %    |      | Relación | %    |
|-----------|-----|------------------|--------|------|------|-------|-----|------|-----|----|----|----|-------|------|------|----------|------|
|           |     | H <sub>2</sub> O | ACIDEZ | Ca   | Mg   | K     |     | CICE | SA  | P  | Zn | Cu |       | Fe   | Mn   |          |      |
|           | 5,5 | 0,5              | 4      | 1    | 0,2  | 5     |     | 10   | 3   | 1  | 10 | 5  | 1,5   |      |      |          |      |
| <b>T1</b> | 7,1 | 0,11             | 16,47  | 2,01 | 0,56 | 19,15 | 0,6 | 50   | 6,0 | 11 | 31 | 8  | 0,3   | 2,85 | 0,28 | 10,2     | 4,08 |
| <b>T2</b> | 6,3 | 0,08             | 12,42  | 1,27 | 0,35 | 14,12 | 0,6 | 32   | 6,3 | 20 | 92 | 8  | 0,7   | 2,69 | 0,27 | 10,0     | 3,85 |
| <b>T3</b> | 6,8 | 0,12             | 14,43  | 1,70 | 0,47 | 16,72 | 0,7 | 71   | 7,6 | 12 | 49 | 13 | 0,3   | 2,88 | 0,28 | 10,3     | 4,12 |
| <b>T4</b> | 7,2 | 0,10             | 16,04  | 1,93 | 0,54 | 18,61 | 0,5 | 61   | 5,5 | 9  | 30 | 9  | 0,3   | 3,01 | 0,29 | 10,4     | 4,30 |

### Análisis físico del suelo.

El cuadro 5. presenta los resultados obtenidos en el análisis físico del suelo.

Se observa que la retención de humedad cambia entre los tratamientos, siendo el T4 el que muestra una mayor humedad y el T1 una retención de humedad menor. En relación con la densidad aparente y la densidad de partículas, el tratamiento T1 y T4 muestran valores iguales ( $1,0 \text{ g cm}^{-3}$ ) mientras que el T3 valores más altos ( $1,1 \text{ g cm}^{-3}$ ) mientras que el T2 presenta los valores más bajos ( $0,8 \text{ g cm}^{-3}$ )

Según los porcentajes de porosidad en cada tratamiento se observa que el T3 es el que contiene mayor porcentaje de porosidad en el suelo (70%), mientras que el T1 y T4 con un 62% y por último el T2 con un 56%. (Cuadro 4.4.1)

**Cuadro 5:** Análisis de los siguientes parámetros físicos del suelo: retención de humedad, densidad y porosidad

|             | RETENCIÓN DE HUMEDAD |          | DENSIDAD Y POROSIDAD |                     |           |
|-------------|----------------------|----------|----------------------|---------------------|-----------|
|             | Retención            |          | Densidad aparente    | Densidad Partículas | Porosidad |
| Tratamiento | 33 kPa               | 1500 kPa | g cm <sup>-3</sup>   |                     | %         |
| <b>T1</b>   | 41                   | 23       | 1,0                  | 2,6                 | 60        |
| <b>T2</b>   | 49                   | 28       | 0,8                  | 2,5                 | 56        |
| <b>T3</b>   | 37                   | 32       | 1,1                  | 2,7                 | 70        |
| <b>T4</b>   | 38                   | 33       | 1,0                  | 2,6                 | 62        |

### Análisis microbiológico del suelo.

En el cuadro 6 la biomasa microbiana en mg C/kg de suelo en el T2 es el más alto, seguido por el T1, luego el T4 y por último el T3 (191, 152, 142 y 125 respectivamente). Con respecto a la cantidad de bacterias formadoras de colonia por gramo de suelo, el tratamiento que presentó



mayor cantidad fue el T3 con un total de  $5,9 \times 10^7$ , seguido por el T4 con  $4,0 \times 10^7$  luego el T1 y por último el T2 ( $2,9 \times 10^7$  y  $2,0 \times 10^7$  respectivamente).

En relación con los fijadores de N por unidad formadora de colonia por gramo de suelo el tratamiento que presentó el valor más alto fue el T1, seguido por el T3, luego el T4 y por último el T2.

**Cuadro 6:** Análisis microbiológico del suelo (biomasa microbiana, bacterias y fijadores de nitrógeno) de los tratamientos utilizados

| Tratamiento | Biomasa (mg C/kg suelo) | Bacterias UFC/g   | Fijadores de N UFC/g |
|-------------|-------------------------|-------------------|----------------------|
| T1          | 152                     | $2,9 \times 10^7$ | $7,3 \times 10^7$    |
| T2          | 191                     | $2,0 \times 10^7$ | $2,0 \times 10^7$    |
| T3          | 125                     | $4,0 \times 10^7$ | $3,1 \times 10^7$    |
| T4          | 142                     | $5,9 \times 10^7$ | $5,1 \times 10^7$    |

#### Conteo de los nódulos producidos por *Rhizobium*

Se encontró diferencias significativas en el número de nódulos entre T1 y T4 ( $p=1.09e-15$  y  $p=8.71e-05$  respectivamente). En el T1, la cantidad de nódulos aumentó 23.6 veces más en comparación con los otros tratamientos, mientras que en el T4, incrementó 4.17 veces en comparación con los otros tratamientos. Para T2 y T3 no se contabilizó nódulos bacterianos.

#### Número de vainas producidas

Se encontró diferencias significativas en T1, T2 y T3 ( $p=0.0321$ ,  $p=0.012$  y  $p=0.0005$  respectivamente) mientras que para T4 el valor de p fue 0.803, es decir, no presentó diferencias significativas. Al comparar los tratamientos se observó que en T3 la producción de vainas incrementó en un 63% mientras que con el T2 un 43% y con el T1 un 5%

#### Número de granos producidos por tratamiento.

Con el análisis estadístico realizado para la medición de número de granos producidos por tratamientos, se encontró que las diferencias significativas se presentan en el T1 ( $p=2e-16$ ), T2 ( $P=0.0123$ ) y T3 ( $p=0.0005$ ) mientras que para el T4 no se encontró diferencias significativas ( $p=0.8031$ ). Con el T1 el número de granos producidos aumentó 23 veces, mientras que con el T2 incrementó en un 43% y con el T3 un 63% el cuál produjo la mayor cantidad de granos.

#### Rendimiento por planta por tratamiento.

Los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento con un mayor rendimiento por planta fue el T3 con un total de 28,1 g/planta, seguido por el T2 (27,7 g/planta); el testigo (T1) produjo 18,7 g/planta y por último el tratamiento 4 (T4) un total de 17,6 g/planta. Para conocer el

rendimiento por hectárea se hizo el cálculo extrapolando los resultados mediante la siguiente fórmula:

$$\text{(Densidad de siembra por ha * Peso fresco de los granos producidos / número de plantas por tratamiento) / 1000}$$

Al extrapolar esos resultados a una producción por kg/ha, el T3 obtuvo un mayor rendimiento con un total de 2704 Kg/ha.

**Cuadro 7:** Rendimiento por planta de *Phaseolus vulgaris* en los tratamientos realizados en el CIMAR, UCR.

| Tratamiento | Rendimiento en g por planta | Producción de kg/ha |
|-------------|-----------------------------|---------------------|
| T1          | 18,7                        | 1158                |
| T2          | 27,7                        | 1971                |
| T3          | 28,1                        | 2704                |
| T4          | 17,6                        | 1155                |

## DISCUSIÓN.

Varios estudios mencionan que el uso de cianobacterias como fuentes de nitrógeno aumentan la productividad de los cultivos, el tamaño de las plantas, la cantidad de hojas producidas, la longitud de las hojas y la biomasa (Vaishampayan, et al., 2001). Además, el uso de cianobacterias filamentosas como *Nostoc muscorum* ayudan a mejorar características del suelo como la resistencia a la erosión, incremento de la materia orgánica y una mayor actividad microbiológica, así como un aumento en los nutrientes para la planta (Acea, et al., 2003). Estos beneficios son facilitados en parte por las estructuras llamadas heterocistes cuya función principal es proporcionar un ambiente libre de oxígeno a la nitrogenasa, enzima encargada de reducir el N<sub>2</sub> a amonio por medio de la dinitrogenasa y la dinitrogenasa reductasa. (Fernández, et al., 2011). El nitrógeno reducido se asimila en una reacción catalizada por la enzima glutamina sintetasa y glutamato sintasa. Una de ellas funciona para incorporar amonio y la otra se utiliza como amida o ureidos. Estos componentes funcionan como productores de hormonas claves para el crecimiento de la planta y el desarrollo de sus tejidos vegetales (García, 2011). Una vez que los heterocistes logran fijar el N, el amonio reducido se transforma en aminoácidos en los plastidios o en el citoplasma, estos aminoácidos son transportados por el xilema y distribuidos

en la planta (García, 2011), los cuales se convierten en proteínas que constituyen componentes importantes para el metabolismo y estructura de la planta, así como tejidos vegetativos y reproductivos (Tegeeder, 2012).

En los resultados se obtuvo un 100% de germinación de las semillas en el T4. A pesar de que no se ha medido el nivel de citoquininas presentes, es posible considerar que este comportamiento está relacionado a esta fitohormona, ya que según Chua, et al., (2019), han detectado que las cianobacterias producen esta sustancia que mejoran la germinación de las semillas y los brotes de plántulas. En relación a otros parámetros como altura de las plantas, el T3 presentó una altura del 50% mayor en comparación con las plantas de los otros tratamientos, además, desarrolló mayor cantidad de hojas y flores. Esto indica que además de la fertilización química tradicional en los cultivos de frijol, la cianobacteria *Nostoc muscorum* potencia el crecimiento de las plantas, debido probablemente a que estos organismos proporcionan fitohormonas y bioestimulantes que influyen en el crecimiento (Hussain, et al., 2015), por ejemplo, auxinas, citoquininas y giberelinas (Álvarez, et al., 2021). Estos resultados son similares a los que encontró Chittapun, et al, (2018), el cual indican que la combinación de la mitad de la dosis recomendada con la cianobacteria *Nostoc*, el cultivo de arroz presentó un mejor crecimiento y producción. En contraste a lo anteriormente mencionado, el T2 presentó los valores más bajos en la altura de la planta, hojas, cantidad de flores y diámetro del tallo, debido a que probablemente las fuentes nitrogenadas químicas producen estrés salino en el sustrato, menor porosidad, menor disponibilidad de nutrientes y poca retención de agua, afectando el crecimiento de las plantas.

Uno de los resultados obtenidos en la investigación es la relación positiva que existe entre la biomasa total de las plantas y de las hojas para T3 y T4. Esto indica que la presencia de una fuente parcial o total de nitrógeno biológico por parte de *Nostoc* a la planta podría proveer consigo una mayor tasa fotosintética (Corrales-González, Rada, & Jaimez, 2016); es decir, podría influir no solo en el desarrollo de las plantas, sino también en el contenido de clorofila en las hojas y así aumentar el rendimiento energético de la biomasa (Piotrowski, et al., 2020); además la nitrato reductasa, la nitrogenasa y otros metabolitos contenidos en las cianobacterias, podrían aumentar el crecimiento de las plantas, así como los péptidos y aminoácidos de estos microorganismos pueden mejorar el desarrollo y su rendimiento de biomasa (Romanowska-Duda, et al, 2021).

A su vez, la reducción del peso seco del T2 puede atribuirse a la inhibición de la hidrólisis de las reservas y su translocación a los brotes en crecimiento causada por la salinidad producida por la fertilización química; además la reducción en el crecimiento de las plantas también podría atribuirse a los efectos inhibidores en la actividad de las mitocondrias y los cloroplastos (Al-Erwy,

et al., 2016). Se conoce que el estrés por salinidad retarda el crecimiento de las plantas a través de su influencia en varios factores metabólicos como el ajuste osmótico, la absorción de nutrientes, la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, la fotosíntesis, la acumulación de solutos orgánicos, la actividad enzimática, el equilibrio hormonal, la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, los lípidos. peroxidación y disponibilidad reducida de agua (Simaei, et al., 2011).

Como se observa en los resultados obtenidos, la aplicación de la cianobacteria *Nostoc muscorum* ayuda que las plantas tengan un mejor desarrollo durante su ciclo de vida ya que según Shariatmadari, et al., (2013), las cianobacterias del género *Nostoc* producen una capa de polisacáridos que mejora las condiciones del suelo, la retención de humedad y mayor aprovechamiento del agua por parte de las plantas (Fernández, et al., 2011).

El nitrógeno aportado a las plantas por parte de las cianobacterias tiene una función estructural, ya sea como parte de moléculas de aminoácidos o proteínas, además es un constituyente de bases nitrogenadas y ácidos nucleicos, que actúan en procesos tales como absorción iónica, fotosíntesis, respiración, multiplicación, diferenciación de células, entre otras funciones (Rodríguez et al., 2020). Las proteínas que se forman son utilizadas como carbohidratos; además, incrementa los compuestos de defensa basados en N, como los alcaloides, glucosinolatos y glicósidos cianogénicos, también el N produce hojas de color verde oscuro debido a que éstas tienen una alta concentración de clorofila (Sandoval, 2002). Los resultados obtenidos se respaldan con lo anteriormente mencionado ya que se observa que las plantas donde se les proporcionó la cianobacteria tuvieron un mayor crecimiento, desarrollo foliar, longitud de la raíz, área foliar y biomasa producida.

Varios estudios han demostrado que el uso de fuentes de nitrógeno biológico como fertilizante en plantas, ayuda a aumentar la clorofila a, clorofila b y carotenoides, cuya función es aumentar la tasa fotosintética de las plantas (Latsague, et al., 2014), lo cual en este estudio se pudo evidenciar en el T3 ya que produjo mayor fluorescencia; es decir, las plantas tuvieron una mayor capacidad de liberar energía radiante como fotón visible de menor energía (fluorescencia), además, el análisis de fluorescencia de clorofila de las plantas es importante ya que caracteriza los efectos que tienen diferentes tipos de estrés ambiental (Moreno, et al., 2008).

El uso de una fuente biológica nitrogenada como lo es la cianobacteria *Nostoc muscorum* proporciona varios beneficios a las plantas; incluso, se puede utilizar como una forma de reducir parcialmente la fertilización nitrogenada química y constituye una alternativa positiva para la agricultura ya que, reduce el impacto ambiental que ha generado los fertilizantes nitrogenados químicos y mejora el desarrollo de las plantas.

La utilización de biofertilizantes a base de cianobacterias fijadoras de nitrógeno como *Nostoc muscorum* es una alternativa para mejorar los niveles nutricionales, microbiológicos y físicos del suelo.

El análisis foliar muestra que las plantas del T2 presentaron un exceso de nitrógeno en sus tejidos (cuadro 4.2.1); este resultado se respalda con lo visto en campo ya que las hojas de las plantas de este tratamiento mostraron una coloración más verduzca, tallos más débiles y arrugamiento de las hojas en las puntas. Este exceso también se observó en los análisis químicos del suelo ya que presentaron una mayor acidez. El exceso de N puede causar una asimilación menor del nutriente por parte de las plantas (Sánchez, Rivero, Ruiz, & Romero, 2004); además una acumulación de nitrato de amonio ( $\text{NO}_3\text{NH}_4^+$ ) puede causar una disminución de la fotosíntesis.

El T3 muestra un porcentaje de N apto para el cultivo de frijol, reduciendo la fertilización química nitrogenada y complementándola con una fertilización biológica nitrogenada, esto le permite a la planta una mejor asimilación del nitrógeno formando aminoácidos y proteínas. Una vez absorbido por las raíces, el nitrato se transporta principalmente a las hojas donde se reduce a nitrito por la actividad del nitrato citosólico dependiente de NAD(P)H reductasas (NR). El nitrito, a su vez, es transportado a los cloroplastos donde es reducido por nitrito reductasa en amonio para una mayor asimilación en compuestos orgánicos, proceso que es llevado a cabo gracias a la glutamina sintetasa (Frunghillo, et al, 2013).

La limitación de las plantas en asimilar el N del suelo es afectada en la etapa de la reducción del Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2^-$ ) catalizada por la enzima Nitrato Reductasa (NR). Posteriormente, la enzima nitrito reductasa (NiR) convierte el  $\text{NO}_2^-$  a Amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y ambas enzimas, NR y NiR, son inducidas por los mismos factores. Un factor importante que regula tanto la actividad NR como la de NiR es la disponibilidad de  $\text{NO}_3^-$  (Sánchez, et al., 2006).

Una vez absorbido por las raíces, el nitrato se transporta principalmente a las hojas donde se reduce a nitrito por la actividad del nitrato citosólico dependiente de NAD(P)H reductasas (NR). El nitrito, a su vez, es transportado a los cloroplastos donde es reducido por nitrito reductasa en amonio para una mayor asimilación en compuestos orgánicos, proceso que es llevado a cabo gracias a la glutamina sintetasa (Frunghillo, et al, 2013).

Con respecto a otros elementos, el fósforo (P) en las plantas del T2 y T3 son las que presentaron valores más altos, esto se puede deber, según Lasa et al (2000) que las plantas con fertilizantes que contienen amonio tienen a presentar mayores contenidos de P; además, Marschner (1997) menciona que las plantas suministradas con nitrógeno amoniacal contienen concentraciones elevadas de aniones para mantener el equilibrio de aniones y cationes en las

plantas. También estos mismos tratamientos contienen los valores más altos de Mg ya que al existir el nitrato en el suelo, las plantas absorben mayor este catión para balancear la carga negativa que genera ese nutriente. (Parra et al, 2012).

Con respecto al Ca, los niveles de este nutriente en las hojas de T1 y T4 es menor que en T y T3, pero en los análisis del suelo se observó que T1 y T4 tienen mayor contenido de Ca. Esto puede deberse a que las plantas del T2 y T3 tienen mayor capacidad de absorción de este nutriente.

Los resultados obtenidos en el análisis químico del suelo demuestran que el uso de fertilizantes inorgánicos acidifican el mismo, acumulando metales pesados y sulfatos que producen salinidad reduciendo también la materia orgánica (MO) (Savci, 2012), lo cual respalda los resultados obtenidos pues el T2 presentó valores bajos de MO, mientras que los suelos tratados con una fertilización combinada o 100% nitrogenada con la cianobacteria lograron bajar los niveles de acidez al absorber iones de Sodio (Na+) y Cloruros (Cl-) (Li, et al., 2019), se aumentó la materia orgánica (MO) y la actividad biológica (Issa et al, 2007) e incorporan carbono (C) (Rogers & Burns, 1994). Lo mencionado anteriormente se puede respaldar con lo observado en el experimento, ya que el T4 presentó un mayor porcentaje de materia orgánica (MO). También, los altos contenidos de MO pueden deberse a que los suelos de T3 y T4 presentaron una mejor porosidad y retención de humedad, que a su vez regulan la nutrición de la planta (Cardona, W2017).

Con respecto a la microbiología del suelo, el T2 presentó una mayor biomasa, medida en mg C/kg de suelo. La biomasa aumenta ya que existe una fuente nitrogenada química; la cual los microorganismos la descomponen y la utilizan para su desarrollo por medio de la mineralización de fuentes de C liberando minerales, aminoácidos y aminoazúcares (Kuzyakov & Xu, 2013), pero a su vez, es el tratamiento que presentó menor cantidad de bacterias formadoras de colonias (UFC) y fijadores de nitrógeno en comparación con T3 y T4 que obtuvieron los valores más altos (UFC)/g de suelo, esto debido a la presencia de *Nostoc muscorum*, ya que, según Dhull, Goyal, Kapoor & Mundra (2004) ayuda en procesos microbiológicos del suelo aumentando las bacterias del suelo y dándoles nutrientes para su desarrollo.

Con respecto a los resultados relacionados a los organismos fijadores de N, se obtuvo que el T1 tuvo una mayor producción de organismos fijadores de N en comparación con los otros tratamientos, esto se debe a que, el frijol al ser una leguminosa, genera una simbiosis con *Rhizobium*, ya que le ofrece nitrógeno a la planta y la planta le aporta azúcares y carbohidratos a la bacteria

A pesar de que T4 fue el segundo tratamiento con mayor producción de organismos fijadores de N y de nódulos bacterianos, este no superó al testigo. Esto puede deberse a que al estar presente *Nostoc muscorum*, existe competencia por los nutrientes. Con respecto a T2 y T3 se ha evidenciado que los fertilizantes inorgánicos nitrogenados tienen un efecto negativo sobre la nodulación y la fijación de N<sub>2</sub> de las leguminosas, inhibiendo la infección de la raíz, la iniciación y el desarrollo de nódulos (Clayton, et al., 2004).

En relación a la producción de vainas, granos y rendimiento en kg/ha, el T3 presentó una mayor producción debido probablemente a que el uso de *Nostoc muscorum* en combinación con un fertilizante químico mejora el rendimiento de los cultivos, proporcionándoles una mayor disponibilidad de nitrógeno y otros nutrientes para su desarrollo y producción (Sholkamy, et al., 2015). Además, la aplicación de biofertilizantes a base de cianobacterias incrementa el rendimiento de cultivos, en comparación con los cultivos que poseen fertilización química solamente, ya que mejoran las propiedades del suelo (Paudel, et al., 2012).

## **CONCLUSIONES.**

Según este estudio el uso de una fertilización combinada con una sal nitrogenada y una cianobacteria (*Nostoc muscorum*) mejora el desarrollo de la planta, afectando positivamente la altura, número de hojas, producción de flores, longitud de la raíz, biomasa, entre otros parámetros, además de beneficiar la germinación de las semillas. Como parte de los resultados se puede recomendar reducir a un 50% la fertilización química nitrogenada en el cultivo de frijol y utilizar un biofertilizante base de este microorganismo ya que aporta múltiples beneficios para la fisiología de la planta y a su vez ayuda a la producción.

Además, la incorporación de nitrógeno biológico al suelo desde una fuente como *Nostoc muscorum* demostró mejorar la germinación de las plantas en comparación con los tratamientos que contaban con fertilizante químico o el testigo, además le permite a la planta asimilar mejor el nitrógeno en los tejidos vegetales como las hojas, lo cual conlleva a una mayor producción de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, entre otros. También se evidenció que, al incorporar *Nostoc muscorum* al suelo, reduciendo la fertilización química, mejora parámetro en él como acidez, CICE y SA, así como de MO.

Una de las conclusiones más interesantes obtenidas en esta investigación fue la producción de nódulos bacterianos ya que en los tratamientos donde no se contaba con fertilización química fueron donde se contabilizó lo nódulos de *Rhizobium*

Al contar con una fuente de nitrógeno química y otra biológica, las plantas tienen un mejor rendimiento en comparación con aquellas que solo tienen una fuente de nitrógeno química o una fuente de nitrógeno biológica dada por la cianobacteria.

El uso de la biofertilización trae consigo beneficios para la agricultura ya que reduce el impacto ambiental que genera la fertilización química, además, es una alternativa para que las personas productoras de cultivos de alto consumo como el frijol, reduzcan sus costos ya que pueden producir su biofertilizante a base de cianobacterias en su propia finca o parcela.

## LITERATURA CITADA

- Abinandan, S., Subashchandrabose, S. R., Venkateswarlu, K., & Megharaj, M. (2019). Soil microalgae and cyanobacteria: the biotechnological potential in the maintenance of soil fertility and health. *Critical reviews in biotechnology*, 39(8), 981-998.
- Acea MJ, Prieto-Fernández A, Diz-Cid N (2003) Cyanobacterial inoculation of heated soils: effect on microorganism of C and N cycles and on chemical composition in soil surface. *Soil Biol Biochem* 35:513–524
- Adam, M.S., (1999). The promotive effect of the cyanobacterium *Nostoc muscorum* on growth of some crop plants. *Acta Microbiol. Polo.*, 48, 163–71.
- Al-Gosaibi, A.M. (1994). Use of algae as a soil conditioner for improvement of sandy soils in Al-Ahasa. Saudi Arabia. *Journal of Agricultural Sciences.*, 19, 1877–83.
- Álvarez, A. L., Weyers, S. L., Goemann, H. M., Peyton, B. M., & Gardner, R. D. (2021). Microalgae, soil and plants: A critical review of microalgae as renewable resources for agriculture. *Algal Research*, 54, 102200.
- Al-Erwy, A. S., Bafeel, S. O., & Al-Toukhy, A. (2016). Effect of chemical, organic and bio fertilizers on germination, growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) plants irrigated with sea water. *seeds*, 10, 100.
- Aly, M. H., El-Ail, A., Azza, A. M., & Mostafa, S. S. (2008). Enhancement of sugar beet seed germination, plant growth, performance and biochemical components as contributed by algal extracellular products. *J. Agric. Sci. Mansoura Univ*, 33(12), 8429-8448.
- Ancín, M. (2011). Evaluación de diferentes tipos de fertilizantes químicos y orgánicos en la producción de frijol (*Phaseolus vulgaris* L. var. *Alubia*) en el distrito de San Juan de Castrovirreyna Huancavelica (Perú). Tesis de licenciatura. Universidad Pública de Navarra, Perú.
- Anderson, T. H., & Gray, T. R. G. (2003). The influence of soil organic carbon on microbial growth and survival. *Advances in Soil Organic Matter Research* (pp. 253-266). Woodhead Publishing.



- Aranibar, J. N., Anderson, I. C., Ringrose, S. & Macko, S. A. (2003). Importance of nitrogen fixation in soil crusts of southern African arid ecosystems: acetylene reduction and stable isotope studies. *Journal of Arid Environments*, 54(2), 345-358.
- Araya C. (2000). Estatus de las principales enfermedades del cultivo de frijol, y posibilidades organizativas para su manejo integrado en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas*, 55, 6-11.
- Araujo, D., Hernández, R. y Vanegas, J. (2008). Efecto de la inoculación de cianobacterias en cultivos de interés comercial en zonas semiáridas de La Guajira – Colombia. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 5(1), 20–31.
- Aspiras, R. B., Allen, O. N., Chesters, G., & Harris, R. F. (1971). Chemical and physical stability of microbially stabilized aggregates. *Soil Science Society of America Journal*, 35(2), 283-286.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B. & Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1), 1-48.
- Beebe, S.; Rao, I. M.; Cajiao, C.; & Grajales, M. (2008). Selection for drought resistance in common bean also improves yield in phosphorus limited and favorable environments. *Crop Sci.* 48:582 - 592.
- Bertsch, F. (2009). Absorción de nutrientes por cultivos. San José, Costa Rica.
- Bhardwaj, D., Ansari, M. W., Sahoo, R. K., & Tuteja, N. (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial cell factories*, 13(1), 66.
- Bloemberg, G.V., Wijffijes, A.H.M., Lamers, G.E.M., Stuurman, N. & Lugtenberg, B.J. (2000). Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS 3655 populations expressing three different autofluorescent proteins in rhizosphere: new perspective for studying microbial communities. *Mol. Plant Mic. Int.*, 13, 1170–6.
- Bonne, D. & Castenholz, R. (2001). Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer.
- Brahmaprakash, G.P., & Sahu, P.K. (2012). Biofertilizers for Sustainability. *Journal of the Indian Institute of Science*, 92(1), 37-62.
- Burris, R. H., & Wilson, P. W. (1946). Characteristics of the nitrogen-fixing enzyme system in *Nostoc muscorum*. *Botanical Gazette*, 108(2), 254-262.
- Carter, O. G. (1967). The effect of chemical fertilizers on seedling establishment. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 7(25), 174-180.

- Cardona, W. A. (2017). Requerimientos nutricionales (nitrógeno, fósforo, potasio y calcio) en etapa vegetativa y reproductiva de un cultivo de mora (*Rubus glaucus* Benth.), ubicado en el municipio de Sylvania (Cundinamarca). Escuela de Posgrados.
- Chakdar, H., Jadhav, S., Dhar, D. & Pabbi, S. (2012). Potential applications of blue green algae. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 71, 13-20.
- Chittapun, S., Limbipichai, S., Amnuaysin, N., Boonkerd, R., & Charoensook, M. (2018). Effects of using cyanobacteria and fertilizer on growth and yield of rice, Pathum Thani I: a pot experiment. *Journal of Applied Phycology*, 30(1), 79-85.
- Choudhary, K. K., & Bimal, R. (2010). Distribution of nitrogen-fixing cyanobacteria (Nostocaceae) during rice cultivation in fertilized and unfertilized paddy fields. *Nordic Journal of Botany*, 28(1), 100-103.
- Chua, M., Erickson, T. E., Merritt, D. J., Chilton, A. M., Ooi, M. K., & Muñoz-Rojas, M. (2020). Bio-priming seeds with cyanobacteria: effects on native plant growth and soil properties. *Restoration Ecology*, 28, S168-S176.
- Clayton, G. W., Rice, W. A., Lupwayi, N. Z., Johnston, A. M., Lafond, G. P., Grant, C. A., & Walley, F. (2004). Inoculant formulation and fertilizer nitrogen effects on field pea: Nodulation, N<sub>2</sub> fixation and nitrogen partitioning. *Canadian Journal of Plant Science*, 84(1), 79-88.
- Corrales-González, M., Rada, F., & Jaimez, R. (2016). Efecto del nitrógeno en los parámetros fotosintéticos y de producción del cultivo de la gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus ex Hook. f.). *Acta Agronómica*, 65(3), 255-260.
- Cruz, M. (2009). Uso biofertilizante de dos cultivos de cianobacterias, uno axénico y otro en consorcio, a nivel de invernadero para producción parcialmente orgánica de frijol *Phaseolus vulgaris*. (Tesis inédita de licenciatura). Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador.
- Cysewski, G. R., & Lorenz, R. T. (2004). 14 Industrial Production of Microalgal Cell-mass and Secondary Products—Species of High Potential. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, 281.
- D'Áquí, L. (2016). Use of Indigenous Cyanobacteria for Sustainable Improvement of Biogeochemical and Physical Fertility of Marginal Soils in Semiarid Tropics. Springer.
- Dhar, D. W., Prasanna, R., Pabbi, S., & Vishwakarma, R. (2015). Significance of cyanobacteria as inoculants in agriculture. *Algal Biorefinery: An Integrated Approach*, 339-374.
- Dhull, S., Goyal, S., Kapoor, K., & Mundra, M. (2004). Microbial biomass carbon and microbial activities of soils receiving chemical fertilizers and organic amendments. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 50(6), 641-647.

- Earanna, N. & Govindan, R., 2002. Role of biofertilizers in mulberry production a review. *Indian J. Seric.* 41, 92–99.
- El-Ayouty, Y.; F. M. Ghazal & Zain El-Abdeen, H. (2012). Effect of cyanobacteria inoculation Associated with different nitrogen levels on some sandy and calcareous soils properties and wheat productivity. *Nature and Science* 10, 12, 233-240.
- Elizondo, M.J. (2015). Suelos de Costa Rica: Orden Andisol. Boletín Técnico. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA- Costa Rica), San José, Costa Rica.
- Fernández, E., Leganés, F., Piñas, F., & Quesada, A. (2011). Fijación de Nitrógeno en Cianobacterias. *Fundamentos y aplicaciones agroambientales de las interacciones beneficiosas plantas-microorganismos*. 269-281.
- Flyn, R. & J. Idowu. (2015). Nitrogen fixation by legumes. *Environmental and Experimental Botany*, 65, 18-26. FAO (2005). The state of food and agriculture. Agriculture Series No. 36. Rome, Italy.
- Frungillo, L., Skelly, M. J., Loake, G. J., Spoel, S. H., & Salgado, I. (2014). S-nitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway. *Nature Communications*, 5(1), 1-10
- García, S. C. (2011). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. *Cuadernos del Tomás*, (3), 173-186.
- Garcia-Gonzalez, J., & Sommerfeld, M. (2016). Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. *Journal of applied phycology*, 28(2), 1051-1061.
- Gheda, S. F., & Ahmed, D. A. (2015). Improved soil characteristics and wheat germination as influenced by inoculation of *Nostoc kihlmani* and *Anabaena cylindrica*. *Rendiconti Lincei*, 26(2), 121-131.
- Goel, A.K., R.D.S. Laura, Pathak, G., Anuradha, G. & Goel, A. (1999). Use of bio-fertilizers: potential, constraints and future strategies review. *Int. J. Trop. Agric.*, 17, 1 18.
- Goyal, S.K. (1997). Algae and the soil environment. *Phykos*, 36, 1-12.
- Grzesik, M., & Romanowska-Duda, Z. (2014). Improvements in germination, growth, and metabolic activity of corn seedlings by grain conditioning and root application with cyanobacteria and microalgae. *Pol. J. Environ. Stud*, 23(4), 1147-1153.
- Gupta, V. K., & Rastogi, A. (2008). Sorption and desorption studies of chromium (VI) from nonviable cyanobacterium *Nostoc muscorum* biomass. *Journal of Hazardous Materials*, 154(1-3), 347-354.
- Hegde, D.M., Dwivedi, B.S. & Babu, S.N.S. (1999). Biofertilizers for cereal production in India a review. *Indian J. Agric. Sci.* 69, 73–83.

- Hegazi, A. Z., Mostafa, S. S., & Ahmed, H. M. (2010). Influence of different cyanobacterial application methods on growth and seed production of common bean under various levels of mineral nitrogen fertilization. *Nature and Science*, 8(11), 183-194.
- Herrero, A., Muro-Pastor, A. M., & Flores, E. (2001). Nitrogen control in cyanobacteria. *Journal of bacteriology*, 183(2), 411-425.
- Hrouzek, P., Lukesová, A., Mares, J., & Ventura, S. (2013). Description of the cyanobacterial genus *Desmonostoc* gen. nov. including *D. muscorum* comb. Nov. as a distinct, phylogenetically coherent taxon related to the genus *Nostoc*. *Journal of the Czech Phycological Society*, 13(2), 201-213.
- Hussain, A., Shah, S. T., Rahman, H., Irshad, M., & Iqbal, A. (2015). Effect of IAA on in vitro growth and colonization of *Nostoc* in plant roots. *Frontiers in plant science*, 6, 46.
- Irisarri, P., Gonnet, S. & Monza, J. (2001). Cyanobacteria in Uruguayan rice fields: Diversity, nitrogen fixing ability and tolerance to herbicides and combined nitrogen. *J. Bacteriol*, 91, 95-103.
- Issa, O. M., Défarge, C., Le Bissonnais, Y., Marin, B., Duval, O., Bruand, A., D'Acqui, L. P., Nordenberg, S., & Annerman, M. (2007). Effects of the inoculation of cyanobacteria on the microstructure and the structural stability of a tropical soil. *Plant and soil*, 290(1), 209-219.
- Jiménez, M. (2008). Descripción morfológica e histológica del desarrollo ontogénico del eje embrionario cigótico de cuatro variedades costarricenses de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) bajo condiciones de cultivo in vitro. Tesis para optar por el grado de licenciatura. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- Kaushik, B. D. (2014). Developments in Cyanobacterial Biofertilizer. *Proc Indian Natn Sci Acad* 80 (2), 379-388.
- Kuzyakov, Y., & Xu, X. (2013). Competition between roots and microorganisms for nitrogen: mechanisms and ecological relevance. *New Phytologist*, 198(3), 656-669.
- Lambers, H., F. Stuart Chapin II & T.L. Pons. 2008. *Plant Physiological Ecology*. 2da. Ed. Springer, New York.
- Lange, O. L., Meyer, A., Zellner, H., & Heber, U. (1994). Photosynthesis and water relations of lichen soil crusts: field measurements in the coastal fog zone of the Namib Desert. *Functional ecology*, 253-264.
- Lasa, B., Frechilla, S., Aleu, M., González-Moro, B., Lamsfus, C., & Aparicio-Tejo, P. M. (2000). Effects of low and high levels of magnesium on the response of sunflower plants grown with ammonium and nitrate. *Plant and soil*, 225(1), 167-174.

- Latsague, M., Sáez, P., & Mora, M. (2014). Efecto de la fertilización con nitrógeno, fósforo y potasio, sobre el contenido foliar de carbohidratos, proteínas y pigmentos fotosintéticos en plantas de *Berberidopsis corallina* Hook. f. *Gayana. Botánica*, 71(1), 37-42.
- Liengen, T. & Olsen, R. A. (1997). Nitrogen fixation by free-living cyanobacteria from different coastal sites in a high arctic tundra, Spitsbergen. *Arctic and Alpin Research*, 29(4), 470-477.
- Licera, C; Rodríguez, M; Larrosa, N; Ruíz, M; Halac, S; Olivera, P; Brandalise, M. & Nadal, F. (2015). Cianobacterias en embalses de Córdoba, descripción taxonómica y ecológica. Instituto Nacional de Agua, Centro de Investigaciones de la Región Semiárida, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba.
- Long, S. R. (2001). Genes and signals in the Rhizobium-legume symbiosis. *Plant physiology*, 125(1), 69-72.
- Maqubela, M. P., Mnkeni, P. N. S., Issa, O. M., Pardo, M. T. & D'Acqui, L. P. (2009). *Nostoc* cyanobacterial inoculation in South African agricultural soils enhances soil structure, fertility, and maize growth. *Plant and Soil*, 315(1-2), 79-92.
- Marschner H (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd ed. Academic Press. San Diego, California, USA. pp:229-255.
- Masojídek, J., Sergejevová, M., Malapascua, J. R. & Kopecký, J. (2015). Thin-layer systems for mass cultivation of microalgae: flat panels and sloping cascades. *In Algal Biorefineries* (pp. 237-261). Springer, Cham.
- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L., & Suzuki, A. (2010). Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of botany*, 105(7), 1141-1157.
- Mayland, H.F., & McIntosh, T. H. (1966) Availability of biologically fixed atmospheric nitrogen-15 to higher plants. *Nature* 209:421–422.
- Mayz-Figueroa, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista Científica UDO Agrícola*, 4(1), 1-20.
- Medina, A. E. (2017). Caracterización morfológica, análisis proximal y análisis microbiológico de una muestra de la Cianobacteria *Nostoc* sp., recolectada en el páramo de Papallacta. (Tesis inédita de bachillerato), Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Meichtry Zaburlín, N., Irmgard Martens, S., y Llano, V., 2009. Cianobacteria planctónica: su impacto en ambientes acuáticos continentales. Descripción de los géneros más frecuentes. *Cianobacterias y Cianotoxinas: identificación, toxicología, monitoreo y evaluación de riesgo*. 17-23. Buenos Aires, Argentina.

- Ministerio de Agricultura y Ganadería (2007). Plan estratégico de la cadena productiva del maíz y frijol. Periodo 2008-2010. San José, Costa Rica.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2009). Manual de recomendaciones técnicas. Cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris*). San José, Costa Rica.
- Moreno, S. G., Vela, H. P., & Alvarez, M. O. S. (2008). La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(4), 119-129.
- Nelson, D., & Cox, M. (2006). *Lehninger principles of biochemistry* (4th ed.). New York, Worth Publishers.
- Obana S, Miyamoto K, Morita S, Ohmori M, Inubushi K (2007) Effect of *Nostoc* sp. On soil characteristics, plant growth and nutrient up take. *Journal Apply Phycological* 19, 641–646.
- Oren, A. (2014). Cyanobacteria: biology, ecology and evolution. *Cyanobacteria: an economic perspective*, 1-20.
- Parra Terraza, S., Lara Murrieta, P., Villarreal Romero, M., & Hernández Verdugo, S. (2012). Crecimiento de plantas y rendimiento de tomate en diversas relaciones nitrato/amonio y concentraciones de bicarbonato. *Revista fitotecnia mexicana*, 35(2), 143-153.
- Paredes, M. C. (2013). Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas. (Tesis inédita de licenciatura). Universidad Católica Argentina, Buenos Aires, Argentina.
- Paudel, Y. P., Pradhan, S., Pant, B., & Prasad, B. N. (2012). Role of blue green algae in rice productivity. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 3(8), 332-335.
- Pereira, I., Ortega, R., Barrientos, L., Moya, M., Reyes, G., & Kramm, V. (2009). Development of a biofertilizer based on filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria for rice crops in Chile. *Journal of applied phycology*, 21(1), 135-144.
- Pedurand, P., & Reynaud, P. A. (1987). Do cyanobacteria enhance germination and growth of rice?. *Plant and Soil*, 101(2), 235-240.
- Pilco, M. & Viera, G. (2014). *Determinación de la eficiencia de biorremoción de metales pesados con cianobacteria Nostoc spp., de los páramos andinos: Papallacta, Pintag y Guamote; caso: efluente de curtiembre, Totoras-Ambato*. (Tesis inédita de licenciatura), Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Piotrowski, K.; Romanowska-Duda, Z.; Messyasz, B (2020). Cultivation of energy crops by ecological methods under the conditions of global climate and environmental changes with the use of diatom extract as a natural source of chemical compounds. *Act. Physiol. Plant.* 42, 146.

- Prasanna, R., & Kaushik, B.D. (1995) Nitrogen fixation and nif gene organization in branched heterocystous cyanobacteria: Variation for the presence of xisA. *Folia Microbiologica*, 40: 176–180.
- Prasanna, R., Chaudhary, V., Gupta, V., Babu, S., Kumar, A., Singh, R., Shivay, Y., & Nain, L. (2013). Cyanobacteria mediated plant growth promotion and bioprotection against Fusarium wilt in tomato. *European Journal of Plant Pathology*, 136(2), 337-353.
- R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rana, A., Joshi, M., Prasanna, R., Shivay, Y. S., & Nain, L. (2012). Biofortification of wheat through inoculation of plant growth promoting rhizobacteria and cyanobacteria. *European Journal of Soil Biology*, 50, 118-126.
- Rao, I. M. (2001). Role of physiology in improving crop adaptation to abiotic stresses in the tropics: The case of common bean and tropical forages. *Handbook of plant and crop physiology*, 583-613.
- Rippka, R., J., Deruelles, J. Waterbury, M. Herdman & Stainer, R. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen Microbiol* 11, 1-61.
- Rodríguez, C. & Fernández, R. (2003). Los frijoles (*Phaseolus vulgaris*): su aporte a la dieta del costarricense. *Acta Médica Costarricense*, 45 (3), 6-9.
- Rodríguez-Yzquierdo, G. A., Pradenas-Aguila, H. E., Basso-de-Figuera, C. A., Barrios-García, M., León-Pacheco, R. I., & Pérez-Macias, M. (2020). Efecto de dosis de nitrógeno en la agronomía y fisiología de plantas de maracuyá. *Agronomía Mesoamericana*, 117-128.
- Rogers, S.L. & Burns, R.G. (1994). Changes in aggregate stability, nutrient status, indigenous microbial populations and seedling emergence following inoculation of soil with *Nostoc muscorum*. *Biology and Fertility of Soils*, 18, 209–215.
- Romanowska-Duda, Z., Szufa, S., Grzesik, M., Piotrowski, K., & Janas, R. (2021). The Promotive Effect of Cyanobacteria and Chlorella sp. Foliar Biofertilization on Growth and Metabolic Activities of Willow (*Salix viminalis* L.) Plants as Feedstock Production, Solid Biofuel and Biochar as C Carrier for Fertilizers via Torrefaction Process. *Energies*, 14(17), 5262.
- Román, J. R., Roncero-Ramos, B., Chamizo, S., Rodríguez-Caballero, E., & Cantón, Y. (2018). Restoring soil functions by means of cyanobacteria inoculation: importance of soil conditions and species selection. *Land Degradation & Development*, 29(9), 3184-3193.
- Sahu, D., Priyadarshani, I. & Rath, B. (2012). Cyanobacteria-as potential biofertilizer. *CIB. Tech J Microbiol*, 1, 20-26.

- Sánchez, C. I., Benintende, S. M., & Benintende, M. C. (2011). Cianobacterias en diferentes estadios fenológicos del cultivo de arroz en Entre Ríos (Argentina). *Ciencia del suelo*, 29(2), 181-189.
- Sánchez, E., Soto, J. M., Ruiz, J. M., & Romero, L. (2006). Asimilación de nitrógeno en raíces y hojas de frijol ejotero: deficiencia vs toxicidad de nitrógeno. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 29(3), 187-195.
- Sánchez, E., Rivero, R. M., Ruiz, J. M., & Romero, L. (2004). Changes in biomass, enzymatic activity and protein concentration in roots and leaves of green bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike) under high NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> application rates. *Scientia Horticulturae*, 99(3-4), 237-248.
- Sandoval, C. A. (2002). Determinación del efecto de tres densidades y tres niveles de nitrógeno sobre dos variedades de frijol.
- Sarkar, D. (2008). *Lattice: Multivariate Data Visualization with R*. Springer, New York.
- Savci, S. (2012). Investigation of effect of chemical fertilizers on environment. *Apcbee Procedia*, 1, 287-292.
- Selvi, T. & Sivakumar, K. (2012). Effect of cianobacteria on growth and yield parameters in *Oryza* native, variety (ADT 38). *Int. of J. of Develop. Res.*, 2 (6), 1008-1011.
- Sharma, N., Rai, A., Stal, L. (2014). *Cyanobacteria: an economic perspective*. Wiley Blackwell.
- Sharma, V., Prasanna, R., Hossain, F., Muthusamy, V., Nain, L., Shivay, Y. S., & Kumar, S. (2021). Cyanobacterial inoculation as resource conserving options for improving the soil nutrient availability and growth of maize genotypes. *Archives of Microbiology*, 1-17.
- Shariatmadari, Z., Riahi, H., Seyed Hashtroudi, M., Ghassempour, A., & Aghashariatmadary, Z. (2013). Plant growth promoting cyanobacteria and their distribution in terrestrial habitats of Iran. *Soil Science and Plant Nutrition*, 59(4), 535-547.
- Sholkamy, E. N., El-Komy, H. M., & Ali, H. M. (2015). Enhancement of soybean (*Glycine max* L.) growth by biofertilizers of *Nostoc muscorum* and *Nostoc rivulare*. *Pak J Bot*, 47, 1199-1204.
- Silva-Benavides, A. M. S., Torzillo, G., Kopecký, J., & Masojídek, J. (2013). Productivity and biochemical composition of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in tubular photobioreactors and open ponds. *biomass and bioenergy*, 54, 115-122.
- Simaei, M., Khavarinejad, R. A., Saadatmand, S., Bernard, F., & Fahimi, H. (2011). Interactive effects of salicylic acid and nitric oxide on soybean plants under NaCl salinity. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58(5), 783-790.



- Singh, J. S., Pandey, V. C., & Singh, D. P. (2011). Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, ecosystems & environment*, 140(3-4), 339-353.
- Singh, J., Kumar, A., Rai, N. & Singh, P. (2016). Cyanobacteria: a precious bio-resource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability. *Frontiers in microbiology*, 7, 529.
- Swarnalakshmi, K., Prasanna, R., Kumar, A., Pattnaik, S., Chakravarty, K., Shivay, Y. S., Singh, R., & Saxena, A. K. (2013). Evaluating the influence of novel cyanobacterial biofilmed biofertilizers on soil fertility and plant nutrition in wheat. *European Journal of Soil Biology*, 55, 107-116.
- Svircev, Z., Tamas, I., Nenin, P., & Drobac, A. (1997). Co-cultivation of N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria and some agriculturally important plants in liquid and sand cultures. *Applied Soil Ecology*, 6(3), 301-308.
- Tegeder, M. (2012). Transporters for amino acids in plant cells: some functions and many unknowns. *Current opinion in plant biology*, 15(3), 315-321.
- Thung, M. & Rao, I. M. (1999). Integrated management of abiotic stresses. In Singh, S. (Ed.). Common bean improvement in the twenty-first century (pp. 331-370). Kluwer Academic Publ., Dordrecht, Holanda.
- Torzillo, G. & Vonshak, A. (2013). Environmental stress physiology with reference to mass cultures. *Handbook of microalgal mass cultures. Blackwell Science, River Street, USA*, 90-113.
- Tovar, D. (1993). Capacidad de Fijación de Nitrógeno de los Ficobiontes aislados de líquenes del género *Leptogium* S. Gray. *Revista de Química*, 7(2), 137-156.
- Ulloa, J. A., Rosas, P., Ramírez, J. C., & Ulloa, B. E. (2011). El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. CONACYT.
- Uysal, O., Uysal, F. O., & Ekinci, K. (2015). Evaluation of microalgae as microbial fertilizer. *European Journal of Sustainable Development*, 4(2), 77-82.
- Vaishampayan, A., Sinha, R. P., Hader, D. P., Dey, T., Gupta, A. K., Bhan, U., & Rao, A. L. (2001). Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture. *The Botanical Review*, 67(4), 453-516.
- Venkataraman, G. S. (1981). Blue-green algae for rice production: a manual for its promotion (No. 46). FAO.
- Vitousek, P. M., Cassman, K. E. N., Cleveland, C., Crews, T., Field, C. B., Grimm, N. B. & Sprent, J. I. (2002). Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *The Nitrogen Cycle at Regional to Global Scales*. 1-45.

- Wang, Y., Zhu, Y., Zhang, S., & Wang, Y. (2018). What could promote farmers to replace chemical fertilizers with organic fertilizers?. *Journal of cleaner production*, 199, 882-890.
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York
- Whitton, B. A., Potts, M. (2012). Introduction to the cyanobacteria. In *Ecology of Cyanobacteria II. Their diversity in space and time*. (p. 2). Springer, Dordrecht.
- Wu, S., Cao, Z., Li, Z., Cheung, K., & Wong, M. (2004). Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma*, 125 (2005) 155-166.