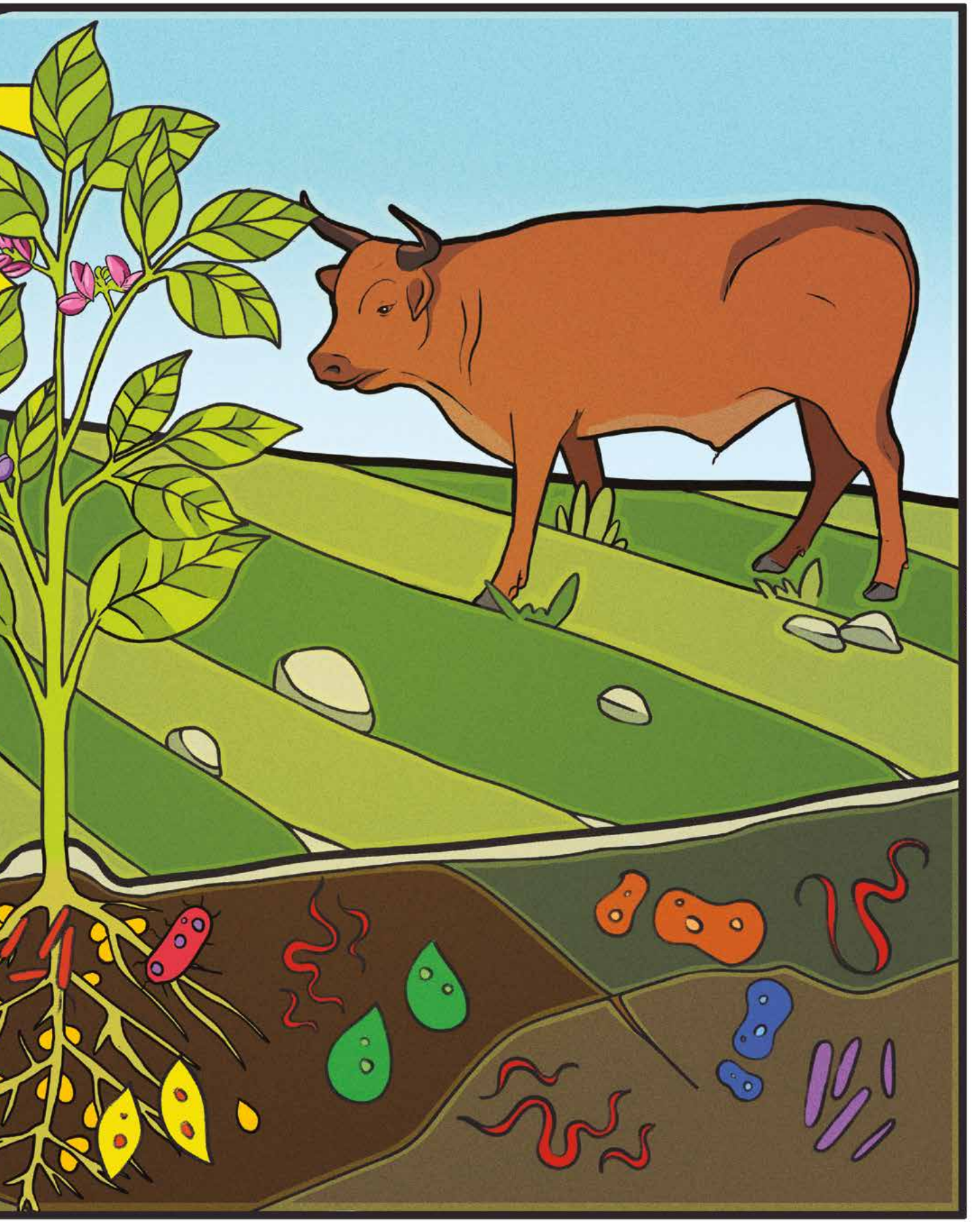
13

Experiencia AGROSAVIA en Fríjol (*Vigna unguiculata*) para ensilaje

Uso de rizobios nativos en leguminosas forrajeras como biofertilizantes en el mejoramiento de la producción de ganado de carne en el Valle del Cesar

Paola Jimena Criollo Campos[1]
Felipe Andrés Romero Perdomo[1]
Germán Orozco González[2]
Ruth Rebeca Bonilla Buitrago[1]

1. Sistemas Agropecuarios Sostenibles. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA. Centro de Investigación Tibaitatá. Cundinamarca. Colombia.
2. Unidad Municipal de Asistencia Técnica Agropecuaria Umata. Aguachica. Cesar. Colombia.



En la ganadería del trópico bajo colombiano han predominado los sistemas de producción extensivos, caracterizados por una baja eficiencia en el uso del suelo y una marcada estacionalidad de la zona (Lerner et al., 2017). Además, el deterioro ambiental, especialmente del suelo, atribuido a la deforestación, las quemas, la erosión y la pérdida de la biodiversidad, genera fuertes implicaciones sobre la producción, la calidad de los forrajes y la ganancia en peso de los animales (Enciso et al., 2019). Entre las problemáticas involucradas en el manejo inadecuado del suelo en los sistemas de producción ganadera se presenta el uso excesivo de determinados insumos químicos de síntesis que buscan suplir las necesidades de las especies forrajeras (Castro-Rincon et al., 2018); sin embargo, estos insumos generan efectos negativos sobre los ecosistemas y el medio ambiente, deteriorando las características físicas, químicas y biológicas propias de los suelos, lo cual conlleva, a su vez, al deterioro de diversos aspectos relacionados con la calidad de vida de los productores y consumidores (Massah & Azadegan, 2016).

Esta situación va en contravía de las políticas y los retos generados por la globalización, que exigen maximizar la eficiencia de los recursos y a la vez propenden por el manejo sostenible de los sistemas de producción ganadera (Patrizi et al., 2018). Entre las posibles alternativas amigables con el medio ambiente se encuentra el uso de enmiendas orgánicas que complementen la fertilización de los suelos sin conllevar riesgos ambientales y a la salud de productores y consumidores (Soares Filho et al., 2018). Es por esto que el empleo de biofertilizantes formulados a partir de microorganismos que promueven el crecimiento vegetal y aumentan la disponibilidad de nutrientes necesarios para el desarrollo de la planta se perfila como una opción para optimizar la fertilización tradicional, teniendo como valor agregado que se producen a bajo costo y que son ecológicamente sostenibles (Bensidhoum & Nabti, 2020). Por esa razón, en el presente proyecto se buscó contribuir al mejoramiento de la producción de carne en el departamento del Cesar, mediante el incremento de la calidad y la cantidad del forraje de la especie *Vigna unguiculata*, con cepas nativas de rizobios, a partir de leguminosas forrajeras. Para llevar a cabo esta investigación, se contó con el desarrollo de diferentes trabajos en microbiología de suelos para aislar y caracterizar las cepas nativas, y, por último, se llevó a cabo la aplicación en campo de prototipos de biofertilizantes para la producción de heno y se evaluó la ganancia en peso del ganado vacuno.

Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles

Aislamiento y caracterización de rizobios asociados a *Vigna unguiculata* en el Valle del Cesar y La Guajira

Introducción

En los sistemas ganaderos tropicales se propende por el uso de plantas leguminosas debido a que muchas de ellas se asocian en sus raíces con un grupo de microorganismos denominados *rizobios* para establecer una relación simbiótica en la que la bacteria provee a la planta de compuestos nitrogenados y la planta provee a la bacteria de compuestos carbonados (Ohyama & Pham, 2006). Esta simbiosis se lleva a cabo dentro de una estructura especializada denominada *nódulo*, que es el órgano capaz de llevar a cabo el proceso de fijación biológica de nitrógeno (Poole et al., 2018). Varios estudios han reportado que el potencial de la interacción simbiótica de suplir nitrógeno disponible en cultivos como soya y otras leguminosas se encuentra entre el 70 % y el 100 % respecto a la fertilización química nitrogenada (Torabian et al., 2019).

Desarrollo de la investigación y resultados

Toma de muestras y recuento poblacional

Los muestreos se realizaron en cultivos de diferentes especies de leguminosas previamente establecidos en los departamentos del Cesar (municipio La Paz) y La Guajira (municipio Distracción), y se hicieron en dos épocas climáticas diferentes: sequía y lluvia. Una vez separados los nódulos de las raíces, estos se depositaron en tubos de ensayo con gel de sílice, para su conservación, y luego se llevaron al laboratorio, junto con las muestras de suelo, para su procesamiento. Las muestras de suelo fueron diluidas e inoculadas en semillas pregerminadas de fríjol caupí para realizar la cuantificación poblacional de rizobios de acuerdo con la técnica estadística del número más probable (Oblinger & Koburger, 1975). Así, se evaluó la formación de nódulos a los 60 días mediante un muestreo destructivo, verificando la presencia de nódulos, los cuales fueron conservados con la metodología descrita anteriormente. De esta manera, se determinó que la población se encontró en un promedio de $3{,}26 \times 10^4$ rizobios g de suelo^{-1}.

Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles

Aislamiento de rizobios y descripción fenotípica

Los nódulos fueron sumergidos en etanol (95 %) durante un minuto y transferidos a una solución de hipoclorito de sodio (3 %) para su desinfección. Se realizaron cinco lavados con agua destilada estéril para retirar los residuos de las soluciones desinfectantes. Se colocaron los nódulos en un crisol estéril y se maceraron con el fin de liberar los bacteroides presentes. Para realizar el aislamiento de las cepas de rizobios, la solución obtenida se sembró en placas con medio de cultivo YMA con los colorantes rojo Congo y azul de bromotimol, las cuales se incubaron a 30 ± 2 °C entre 5 y 15 días.

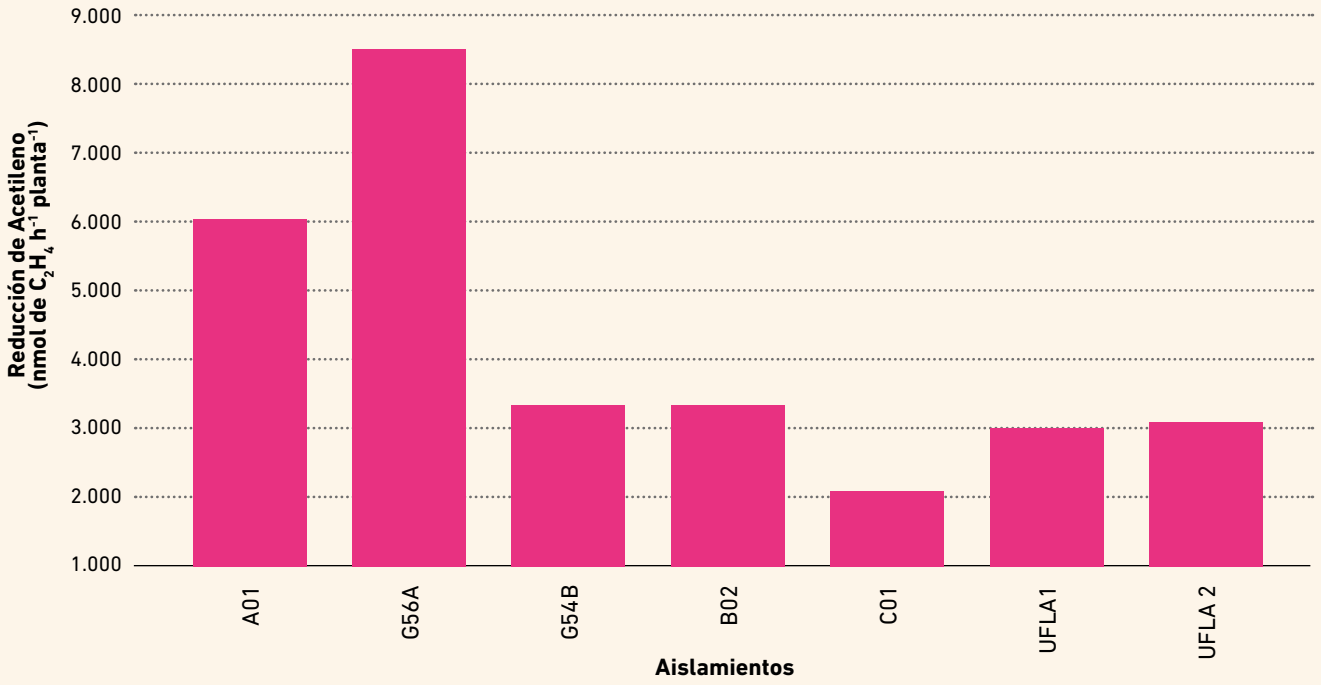
A partir de nódulos colectados de las raíces de fríjol caupí, se obtuvieron 20 aislamientos presuntivos de rizobios, los cuales, de forma general, presentaron colonias redondas, blancas, de crecimiento rápido y elevación convexa, que acidificaron el medio de cultivo (YMA + azul de bromotimol). Además, presentaron formación y elasticidad de mucosidad variable de acuerdo con el aislamiento. Las diferencias en la caracterización permitieron establecer la presencia de diferentes morfotipos entre los aislamientos, los cuales presentaron en su totalidad la característica microscópica de bacilos Gram-negativos, propia del grupo de los rizobios.

Evaluación de la fijación biológica de nitrógeno y de la producción de compuestos indólicos

La prueba indirecta de reducción de acetileno (ARA, por sus siglas en inglés: *acetylene reduction assay*) fue empleada para evaluar la fijación biológica de nitrógeno. Mediante esta técnica se determina la actividad de la enzima nitrogenasa, la cual reconoce la presencia de enlaces triples como el que está presente en la estructura de la molécula de acetileno, reduciendo este compuesto a etileno, el cual es detectado mediante cromatografía de gases, lo que permite estimar la cantidad de nitrógeno molecular que el microorganismo sería capaz de reducir a amonio mediante la actividad de la misma enzima (Saiz et al., 2019). Con este fin, se emplearon las raíces noduladas con cada uno de los aislamientos seleccionados y las cepas de referencia (UFLA1 y UFLA2), las cuales, en presencia de una atmósfera con un 10 % de acetileno, fueron incubadas durante una hora a temperatura ambiente. La concentración de etileno producido fue determinada a partir de una muestra de la atmósfera en contacto con los nódulos (Grove & Malajczuk, 1987).

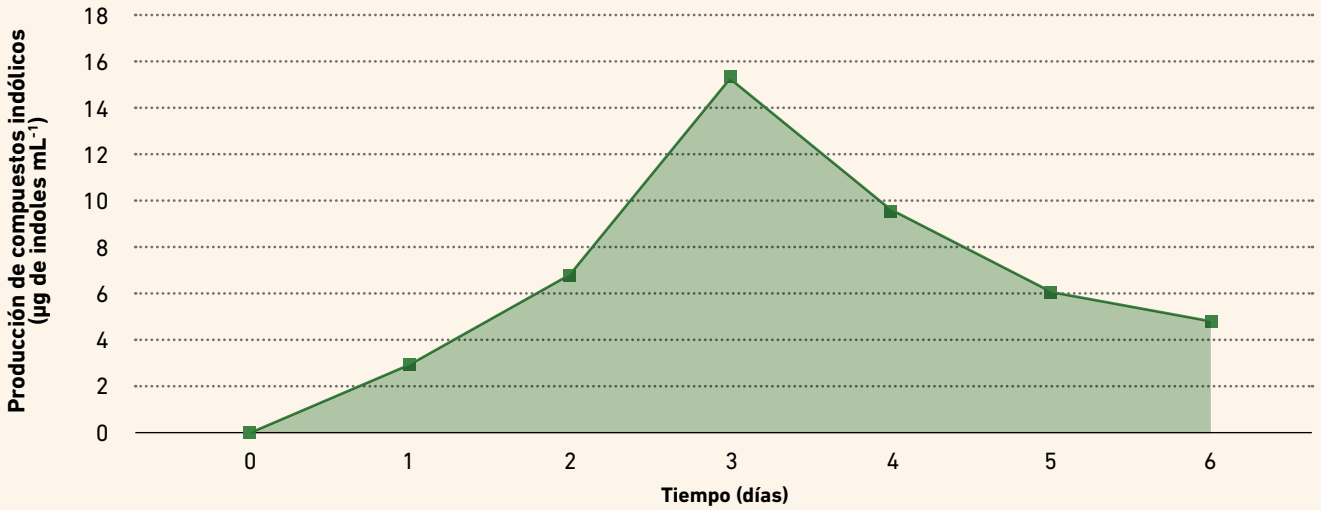
Los aislados de La Guajira que presentaron la mayor actividad nitrogenasa fueron G56A (8.558,97 nmol de C_2H_4 h^{-1} $planta^{-1}$) y G54B (3.216,23 nmol de C_2H_4 h^{-1} $planta^{-1}$), y los del Cesar fueron A01 (6.082,69 nmol de C_2H_4 h^{-1} $planta^{-1}$) y B02 (3.211,80 nmol de C_2H_4 h^{-1} $planta^{-1}$). Estos valores de los aislados nativos muestran una mayor eficiencia en la actividad nitrogenasa que los aislados de referencia provenientes de Brasil: UFLA1 (3.005,76 nmol de C_2H_4 h^{-1} $planta^{-1}$) y UFLA2 (3.125,38 nmol de C_2H_4 h^{-1} $planta^{-1}$) (Figura 13.1).

Figura 13.1. Actividad de reducción de acetileno como indicador de la fijación biológica de nitrógeno de los aislamientos del Cesar.
Fuente: Elaboración propia



La prueba de detección de compuestos indólicos se basa en la capacidad microbiana para metabolizar precursores e intermediarios, como el aminoácido triptófano, convirtiéndolos en compuestos como el ácido indol-3-acético (AIA), el cual es capaz de regular el crecimiento de la planta al inducir su elongación (Egamberdieva et al., 2017). En ese sentido, a partir del cultivo de los aislamientos por evaluar en medio con triptófano, se determinó la concentración de compuestos indólicos producidos mediante reacción colorimétrica (Glickmann & Dessaux, 1995). Los resultados mostraron que solo el aislamiento G58A, de La Guajira, fue capaz de sintetizar sustancias tipo indol. Este aislamiento, al tercer día de evaluación, presentó su pico de producción en 15,36 µg de indoles mL^{-1} (Figura 13.2).

Figura 13.2. Producción de compuestos indólicos por el aislamiento G58A, de La Guajira.
Fuente: Elaboración propia



Determinación del efecto de la inoculación de los aislamientos seleccionados en pruebas de invernadero

Con el fin de determinar el efecto de la inoculación de los aislamientos que demostraron tener potencial en la promoción de crecimiento vegetal sobre el fríjol caupí, se establecieron pruebas en invernadero bajo condiciones semicontroladas y fertilización con solución Hoagland libre de nitrógeno; se evaluaron 10 tratamientos a los 60 días después de la emergencia, y las variables agronómicas evaluadas fueron peso fresco y seco, longitud de la parte aérea y radical, y número y peso fresco de nódulos.

Los resultados mostraron que la aplicación de la solución de Hoagland libre de nitrógeno en el tratamiento químico mejoró significativamente las longitudes y la biomasa vegetal, tanto en la raíz como en la parte aérea, en comparación con el testigo absoluto (tabla 13.1). Además, en ninguno de estos dos tratamientos se evidenció presencia de nódulos. Respecto a los tratamientos inoculados, se observó, en general, un efecto promotor de crecimiento sobre el fríjol caupí frente al testigo químico. En la longitud de la parte aérea, la cepa G58A ejerció la mayor promoción de crecimiento, con un aumento del 14 %, seguida de la cepa B01, con el 6 %. En cuanto a la longitud radicular, las cepas G52A y G58A generaron un incremento del 98 % y el 50 %, respectivamente. Respecto a la biomasa vegetal, G58A fue la cepa que más aumentó significativamente las cuatro variables medidas, con aumentos superiores al 100 %. Asimismo, la inoculación de G58A generó el mayor número y peso de nódulos en el fríjol caupí. De esta manera, los hallazgos sugieren que la cepa G58A generó el mayor efecto promotor del crecimiento vegetal (Figura 13.3).

Tabla 13.1. Resultados de la evaluación de las variables agronómicas en planta después de la nodulación con aislamientos obtenidos a partir de muestras de suelo y nódulos
Nota: Los valores de la misma columna con diferente letra presentan diferencias estadísticamente significativas a un 95 % de confianza de acuerdo con la prueba hsd de Tukey.
Fuente: Elaboración propia

1 Longitud de la parte aérea (cm planta^{-1})
Testigo absoluto: 10 h
Testigo químico: 16,4 cd
UFLA1: 16,5 bc
UFLA2: 15,9 cde
G52A: 15,5 fde
G54B: 13,1 g
G56A: 14,3 f
G58A: 18,8 a
A01: 15,4 e
B01: 17,4 b

2 Longitud de la raíz (cm planta^{-1})
Testigo absoluto: 8,7 h
Testigo químico: 12,3 g
UFLA1: 17,7 cd
UFLA2: 17 de
G52A: 24,4 a
G54B: 17,1 de
G56A: 16,4 e
G58A: 18,5 bc
A01: 15,4 f
B01: 19 b

3 Peso fresco de la parte aérea (g planta^{-1})
Testigo absoluto: 0,2 d
Testigo químico: 0,7 bc
UFLA1: 0,5 b
UFLA2: 0,6 bc
G52A: 0,7bc
G54B: 0,7 bc
G56A: 0,8 b
G58A: 1,1 a
A01: 0,7 bc
B01: 0,7 bc

4 Peso fresco de la raíz (g planta^{-1})
Testigo absoluto: 0,2 f
Testigo químico: 0,4 ef
UFLA1: 0,9 bc
UFLA2: 1b
G52A: 0,4 ef
G54B: 0,6 de
G56A: 0,7 cd
G58A: 2,2 a
A01: 0,5 de
B01: 1b

5 Peso seco de la parte aérea (g planta^{-1})
Testigo absoluto: 0,1 b
Testigo químico: 0,2 b
UFLA1: 0,1 b
UFLA2: 0,2 b
G52A: 0,1 b
G54B: 0,1 b
G56A: 0,2 b
G58A: 0,5 a
A01: 0,2 b
B01: 0,2 b

6 Peso seco de la raíz (g planta^{-1})
Testigo absoluto: 0,1 a
Testigo químico: 0,1 a
UFLA1: 0,1 a
UFLA2: 0,1 a
G52A: 0,1 a
G54B: 0,1 a
G56A: 0,2 a
G58A: 0,2 a
A01: 0,1 a
B01: 0,2 a

7 Nódulos planta^{-1}
Testigo absoluto: 0 f
Testigo químico: 0 f
UFLA1: 4 e
UFLA2: 10,3 c
G52A: 6,7 d
G54B: 11 c
G56A: 7,3 d
G58A: 19,3 a
A01: 10,7 c
B01: 15,3 b

8 Peso fresco de los nódulos (g planta^{-1})
Testigo absoluto: 0 b
Testigo químico: 0 b
UFLA1: 0,1 ab
UFLA2: 0,1 ab
G52A: 0,1 ab
G54B: 0,1 ab
G56A: 0,1 ab
G58A: 0,2 ab
A01 : 0,1 ab
B01: 0,1 ab

Figura 13.3. Planta de fríjol. *a.* Planta inoculada; *b.* Planta sin inocular a nivel de campo.
Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles

a

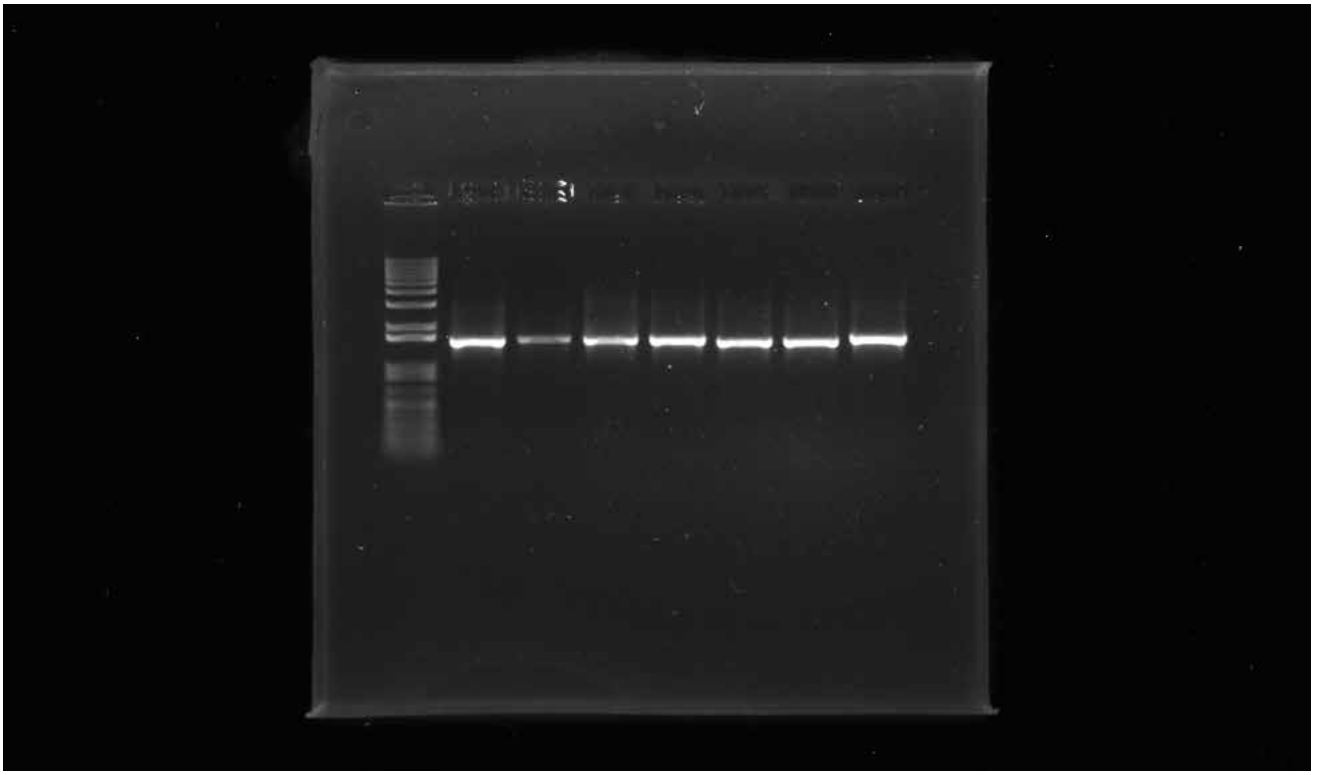
b

Identificación molecular de las cepas eficientes

Los resultados obtenidos bajo condiciones de invernadero arrojaron que la cepa más eficiente para la leguminosa frijol caupí (*Vigna unguiculata*) es la G58A, razón por la cual se realizó su identificación genética utilizando la secuencia 16S rARN ribosomal.

Los resultados de esta secuenciación determinaron que la cepa G58A, asilada de nódulos de frijol caupí, corresponde al género *Rhizobium* sp., con un porcentaje de similitud del 99 % con respecto a la base de datos GenBank (Figura 13.4).

Figura 13.4. Gel de electroforesis, en agarosa, para análisis del gen 16S rARN de la cepa G58A.
Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles



Conclusiones

El desarrollo de este estudio permitió observar que la densidad poblacional de rizobios en los suelos evaluados reporta un valor mayor a 1×10^3 UFC g de suelo^{-1}. Además, se observó un mayor número de nódulos en las muestras del departamento del Cesar, con un promedio de 574, en comparación con el departamento de La Guajira, con un promedio de 394.

Al evaluar la actividad biológica de las cepas aisladas, se logró comprobar que, en la prueba de reducción de acetileno, el aislamiento G56A presentó una mayor actividad con respecto a los demás aislamientos de La Guajira y a los aislamientos obtenidos del Cesar. Asimismo, los aislamientos de La Guajira presentaron una mayor producción de indoles totales que los aislamientos del Cesar. Los mayores valores se presentaron en las cepas G52A y G58A. En el experimento bajo condiciones de invernadero, se encontró que las cepas aisladas promueven el crecimiento del frijol caupí, donde la cepa G58A mostró el mayor potencial biofertilizante y luego fue identificada como *Rhizobium* sp.

Inoculación de *Vigna unguiculata* con cepas nativas de rizobios para evaluar la ganancia en peso de terneros de levante

Los resultados evidenciados con la inoculación de la cepa *Rhizobium* sp. G58A sobre el crecimiento del fríjol caupí en invernadero mostraron un potencial biofertilizante, lo que permitió continuar con estudios en campo. El objetivo fue corroborar los efectos positivos en la producción y calidad del forraje y en la ganancia en peso de terneros de levante.

Introducción

La alimentación de rumiantes en el Caribe seco colombiano está basada en el uso de forrajes, generalmente de baja oferta y calidad nutricional como consecuencia de procesos de degradación del suelo o falta de implementación de prácticas sostenibles en la producción (Capstaff & Miller, 2018). Asimismo, la estacionalidad climática afecta drásticamente la productividad de las pasturas en época seca (Grossi et al., 2018). Esta baja oferta y calidad nutricional de los forrajes utilizados para la alimentación de los bovinos de la región se manifiesta en bajas ganancias diarias de peso por animal (350 g día^{-1}), con capacidades de carga de 0,6 animales hectárea^{-1} (Da Luz et al., 2019). Estos parámetros productivos son susceptibles de incrementarse con el desarrollo de prácticas sostenibles de producción de forrajes, basadas en el uso de biofertilizantes, los cuales pueden mejorar la oferta y calidad nutricional de los forrajes en la región y propiciar, así, el aumento en la producción de carne por animal y unidad de área (Hungria et al., 2016; Zayed, 2018). Con base en lo anterior, se plantea la utilización de una cepa nativa de leguminosa forrajera desarrollada con la tecnología del uso de biofertilizantes para complementar la alimentación de bovinos de ceba en época seca con el propósito de mejorar los parámetros productivos.

Desarrollo de la investigación y resultados: evaluación en campo de *Vigna unguiculata*

El experimento se realizó en la Estación Experimental Motilonia de AGROSAVIA, localizada en la microrregión del Valle del Cesar, ubicada a una altitud de 160 m s.n.m., con una temperatura media anual de 29 °C, una precipitación promedio anual de 1.360 mm y enmarcada en la zona agroecológica Cj, correspondiente a trópico seco colombiano. Durante la época de lluvia, se estableció un lote de 0,7 ha de *Vigna unguiculata* inoculando la semilla con la cepa seleccionada, *Rhizobium* sp. G58A, la cual fue producida en medio de cultivo líquido YM (Vincent, 1970) a 30 °C, a 150 rpm, durante 24 horas. Se utilizaron 25 kg de semilla ha^{-1} y distancias de 0,5 m entre surcos y de 15 cm entre plantas. Se realizó control de malezas con glifosato y basagran como control de ciperáceas y fertilización basal con DAP y KCL, según requerimientos y ajustes, por análisis de suelos (Figura 13.5). Adicionalmente, se evaluaron las características químicas del suelo al inicio y final del cultivo, utilizando los métodos descritos en el manual de suelos del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA, 1989).

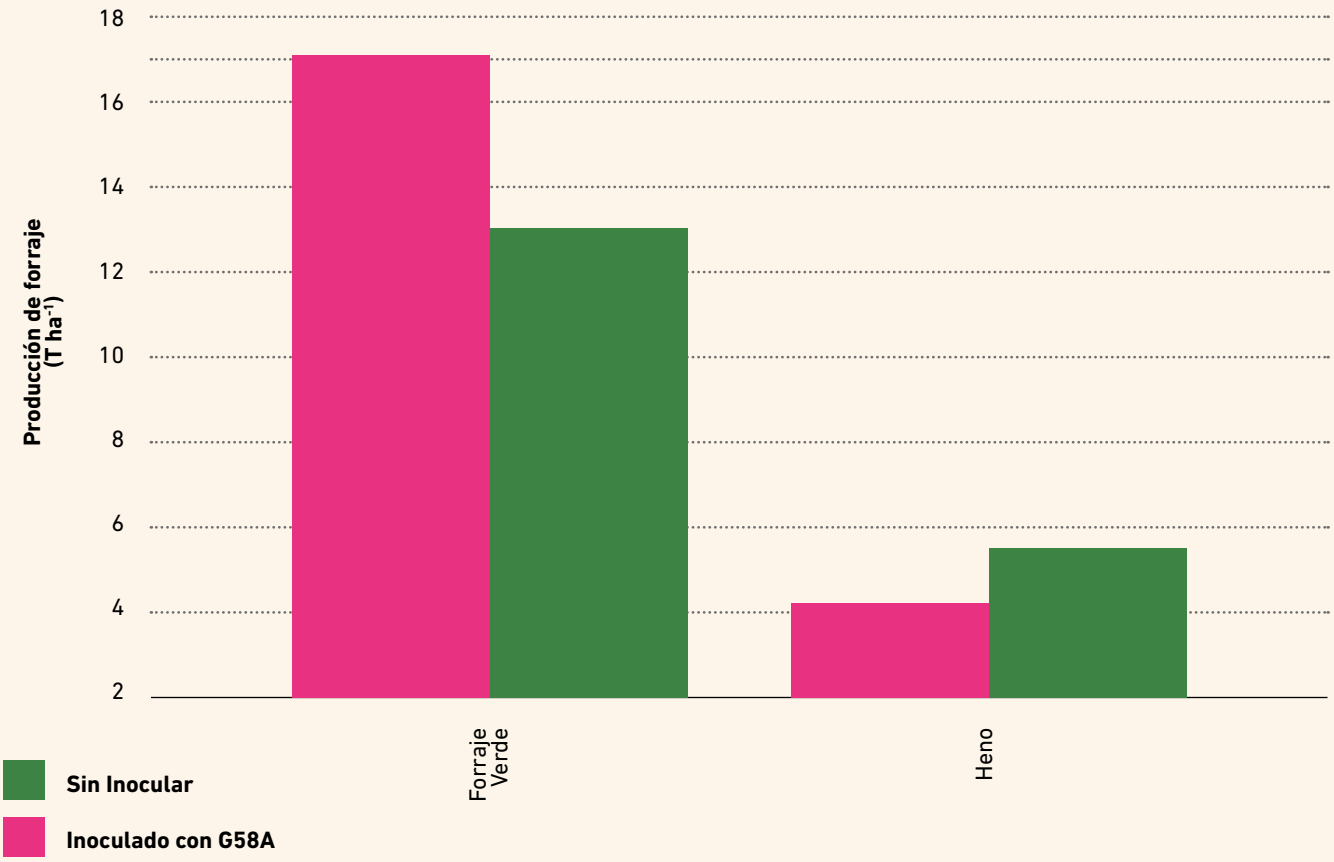
Figura 13.5. Fríjol establecido en campo.
Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles

Para la evaluación de la producción de heno al finalizar la época de lluvia se realizó la cosecha de fríjol caupí cuando el 70 % de las vainas presentó llenado inicial del grano, el cual se llevó a exposición directa del sol para disminuir el porcentaje de humedad y obtener un porcentaje de materia seca cercano al 90 %; esto, con el fin de elaborar, de forma manual, las pacas de heno. Así, se elaboraron pacas de 12 kg, aproximadamente, y se almacenaron para su posterior suministro a los animales.

Con el fin de evaluar la calidad nutricional del forraje, los contenidos de carbohidratos y proteínas se determinaron por el sistema CNCPS, de la Cornell University (Fox et al., 2003); el fósforo y el calcio se determinaron, en su orden, por colorimetría y espectrofotometría; la digestibilidad, por el método de Tilley y Terry (1963), y FDN (fibra detergente neutra) y FDA (fibra detergente ácida), siguiendo los procedimientos de Van Soest et al. (1991).

Al realizar la inoculación de *Rhizobium* sp. G58A sobre *Vigna unguiculata*, los resultados mostraron un incremento del 30,8 % en la producción de forraje verde y del 31,2 % en la producción de heno, en comparación con el material sin inocular (Figura 13.6).

Figura 13.6. Producción de forraje verde y de heno de *Vigna unguiculata* con y sin inoculación con la cepa G58A.
Foto: Elaboración propia



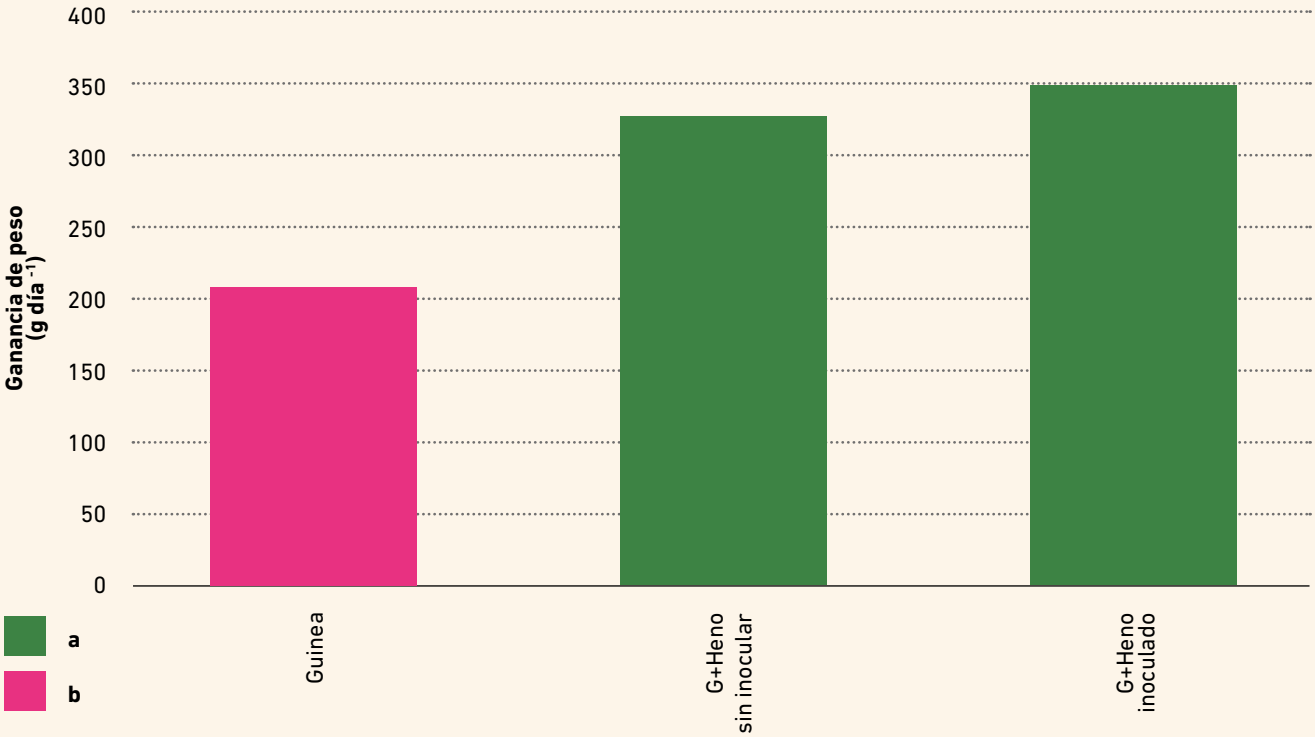
Se observó un contenido más alto de proteína en el heno producido con semilla inoculada, lo cual se refleja en un producto de mayor calidad. Asimismo, se encontró un contenido de FDN y FDA menor en el heno inoculado, lo cual es un indicador de mejora de la digestibilidad del ensilaje. En general, el heno se encuentra dentro de los parámetros normales de un heno bajo las condiciones de la zona (tabla 13.2).

Tabla 13.2. Calidad nutricional con fraccionamiento de proteínas para el heno, con y sin inoculación, en porcentaje.
Fuente: Elaboración propia

1	**Proteína** **Con inóculo: 17,15** **Sin inóculo: 13,44**	2	**FDN** **Con inóculo: 43,11** **Sin inóculo: 52,11**	3	**FDA** **Con inóculo: 29,66** **Sin inóculo: 35,98**
4	**Degradabilidad *in situ*** **Con inóculo: 69,95** **Sin inóculo: 69,66**	5	**Fracción A (NNP)** **Con inóculo: 6,29** **Sin inóculo: 8,68**	6	**Fracción B1** **Con inóculo: 37,49** **Sin inóculo: 44,81**

Adicionalmente, se evaluó la respuesta animal calculando la ganancia de peso de los animales. Esta se evaluó mediante el pesaje individual de los terneros cada 28 días, con previo ayuno de 12 horas durante la fase experimental, y sometidos al manejo sanitario y general impartido en la explotación. Para el ensayo, se empleó un diseño completamente al azar, aplicando un análisis de varianza con el procedimiento GLM (modelo lineal generalizado) de SAS (versión 9.0), y una comparación de medias por la prueba de Tukey a un nivel de confianza del 95 %. La evaluación demostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la ganancia de peso en los tratamientos evaluados (Figura 13.7).

Figura 13.7. Ganancia diaria de peso en novillos alimentados con pasto guinea cv. Tanzania, pasto guinea cv. Tanzania más heno de *Vigna unguiculata* inoculado con *Rhizobium* sp. G58A y sin inocular.
Foto: Elaboración propia



La ganancia diaria de peso de los animales en los tratamientos en que se realizó la introducción de heno en el sistema de alimentación fue estadísticamente superior a la del tratamiento testigo. Sin embargo, pese a que no se presentó diferencia estadística en los tratamientos suplementados, la ganancia en peso de los animales fue mayor cuando se introdujo heno de fríjol caupí inoculado en la dieta.

Conclusiones

La suplementación en terneros de levante con heno de *Vigna unguiculata* inoculada o sin inocular es superior en comparación con la ganancia de peso observada en el tratamiento de pasto guinea (*Panicum maximum* cv. Tanzania) como única fuente de alimentación. Sin embargo, no hay diferencias significativas entre los tratamientos de suplementación con *Vigna unguiculata* inoculada y sin inocular. La suplementación con heno de *Vigna unguiculata* (inoculada y sin inocular) intensifica el sistema de producción al incrementar la carga animal en las praderas de pasto guinea, debido a la sustitución de una tercera parte de la oferta de pasto por el heno.

Referencias

Bensidhoum, L., & Nabti, E.-H. (2020). Biofertilizers and biopesticides: Microbes for sustainable agriculture. En A. N. Yadav, A. A. Rastegari, N. Yadav, & D. Kour (eds.), *Advances in plant microbiome and sustainable agriculture: Diversity and biotechnological applications* (pp. 257-279). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3208-5_10

Capstaff, N. M., & Miller, A. J. (2018). Improving the yield and nutritional quality of forage crops. *Frontiers in Plant Science*, *9*, artículo 535. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00535

Castro-Rincon, E., Mojica-Rodríguez, J. E., Carulla-Fornaguera, J. E., & Lascano-Aguilar, C. E. (2018). Abonos verdes de leguminosas: integración en sistemas agrícolas y ganaderas del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, *29*(3), 711-729. https://www.scielo.sa.cr/pdf/am/v29n3/1659-1321-am-29-03-00711.pdf

Da Luz, P. A. C., Andrighetto, C., Lupatini, G. C., Aranha, H. S., Trivelin, G. A., Mateus, G. P., Santos, C. T., Francisco, C. de L., Castilhos, A. M., & Jorge, A. M. (2019). Effect of integrated crop-livestock systems in carcass and meat quality of Nellore cattle. *Livestock Science*, *220*, 83-92. https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.11.018

Egamberdieva, D., Wirth, S. J., Alqarawi, A. A., Abd_Allah, E. F., & Hashem, A. (2017). Phytohormones and beneficial microbes: Essential components for plants to balance stress and fitness. *Frontiers in Microbiology*, *8*, artículo 2104. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02104

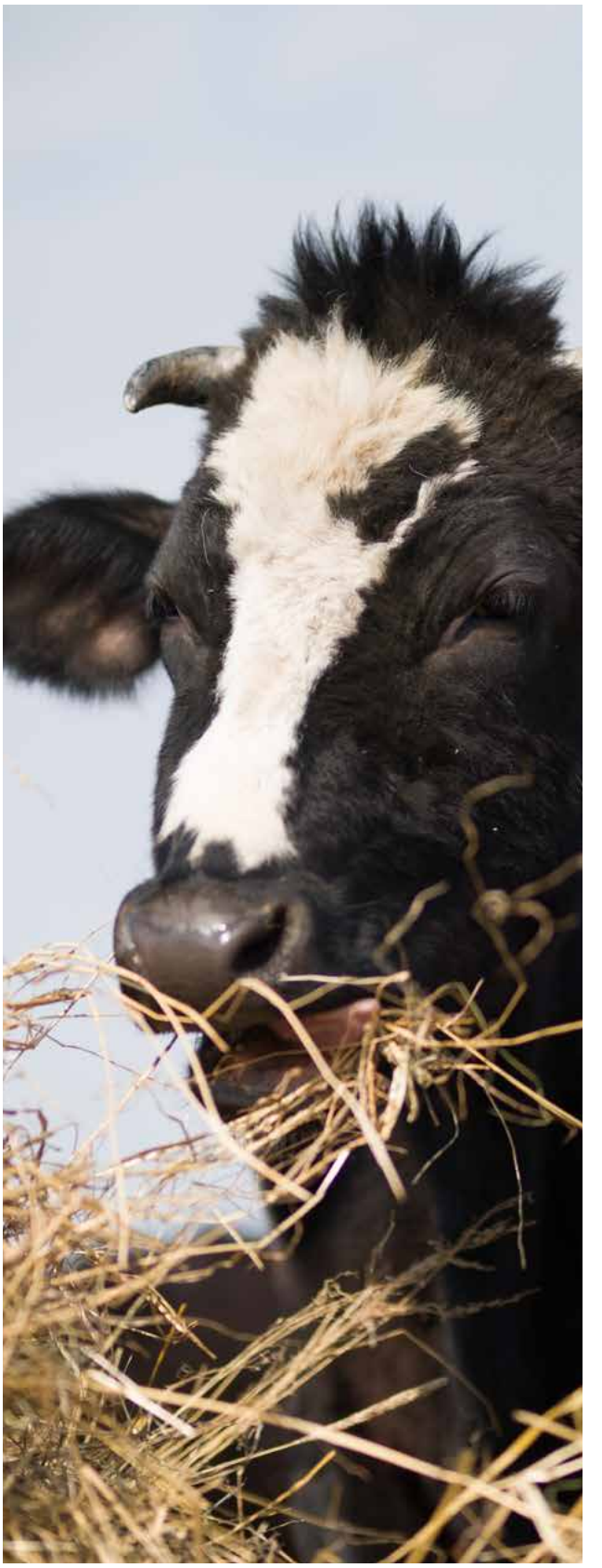
Enciso, K., Sotelo, M., Peters, M., & Burkart, S. (2019). The inclusion of *Leucaena diversifolia* in a Colombian beef cattle production system: An economic perspective. *Tropical Grasslands*, *7*(4), 359-369. https://doi.org/10.17138/TGFT(7)359-369

Fox, D., Tylutki, T., Tedeschi, L., Van Amburgh, M., Chase, L., Pell, A., Overton, T., & Russell, J. (2003). *Sistema de carboidratos e proteínas "líquidos" para a avaliação da nutrição de rebanhos e excreção de nutrientes (CNCPS Versão 5.0): documentação do modelo CNCPS*. Embrapa Gado de Leite.

Glickmann, E., & Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(2), 793-796. http://aem.asm.org/content/61/2/793.abstract

Grossi, G., Goglio, P., Vitali, A., & Williams, A. G. (2018). Livestock and climate change: Impact of livestock on climate and mitigation strategies. *Animal Frontiers*, *9*(1), 69-76. https://doi.org/10.1093/af/vfy034

Grove, T. S., & Malajczuk, N. (1987). Nitrogen fixation (acetylene reduction) by forest legumes: Sensitivity to pre-harvest and assay conditions. *New Phytologist*, *106*(1), 115-127. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1987.tb04795.x



Hungria, M., Nogueira, M. A., & Araujo, R. S. (2016). Inoculation of *Brachiaria* spp. with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: An environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *221*, 125-131. https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.01.024

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (1989). *Manual de análisis de suelos, plantas y aguas para riego* (Manual de Asistencia Técnica n.º 47).

Lerner, A. M., Zuluaga, A. F., Chará, J., Etter, A., & Searchinger, T. (2017). Sustainable cattle ranching in practice: Moving from theory to planning in Colombia's livestock sector. *Environmental Management*, *60*(2), 176-184. https://doi.org/10.1007/s00267-017-0902-8

Massah, J., & Azadegan, B. (2016). Effect of chemical fertilizers on soil compaction and degradation. *Agricultural Mechanization in Asia, Africa and Latin America*, *47*(1), 44-50.

Oblinger, J. L., & Koburger, J. A. (1975). Understanding and teaching the most probable number technique. *Journal of Milk and Food Technology*, *38*(9), 540-545. https://doi.org/10.4315/0022-2747-38.9.540

Ohyama, T., & Pham, V. (2006). General methods to evaluate microbial activity. En Japan Atomic Industrial Forum (JAIF, ed.), *Biofertilizer manual* (pp. 3-17). https://www.fnca.mext.go.jp/bf/bfm/pdf/Biofertilizer_Manual.pdf

Patrizi, N., Niccolucci, V., Castellini, C., Pulselli, F. M., & Bastianoni, S. (2018). Sustainability of agro-livestock integration: Implications and results of emergy evaluation. *Science of The Total Environment*, *622-623*, 1.543-1.552. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.029

Poole, P., Ramachandran, V., & Terpolilli, J. (2018). Rhizobia: From saprophytes to endosymbionts. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(5), 291-303. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.171

Saiz, E., Sgouridis, F., Drijfhout, F. P., & Ullah, S. (2019). Biological nitrogen fixation in peatlands: Comparison between acetylene reduction assay and $^{15}N_2$ assimilation methods. *Soil Biology and Biochemistry*, *131*, 157-165. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.01.011

Soares Filho, C. V., Cavazzana, J. F., Heinrichs, R., Vendramini, J. M. B., Lima, G. C., & Moreira, A. (2018). The impact of organic biofertilizer application in dairy cattle manure on the chemical properties of the soil and the growth and nutritional status of Urochroa grass. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, *49*(3), 358-370. https://doi.org/10.1080/00103624.2018.1427261

Tilley, J. M. A., & Terry, R. A. (1963). A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Grass and Forage Science*, *18*(2), 104-111. https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x

Torabian, S., Farhangi-Abriz, S., & Denton, M. D. (2019). Do tillage systems influence nitrogen fixation in legumes? A review. *Soil and Tillage Research*, *185*, 113-121. https://doi.org/10.1016/j.still.2018.09.006

Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. Symposium: Carbohydrate Methodology, Metabolism, and Nutritional Implications in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, *74*(10), 3.583-3.597. http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2

Vincent, J. M. (1970). *A manual for the practical study of root-nodule bacteria* (IBP Handbook no. 15). Blackwell Scientific.

Zayed, M. S. (2018). Enhancement the feeding value of rice straw as animal fodder through microbial inoculants and physical treatments. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, *7*(2), 117-124. https://doi.org/10.1007/s40093-018-0197-7