

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOFERTILIZANTE DE
BACTERIAS *Azotobacter* sp. AISLADAS DE SUELOS
CULTIVADOS DE LA REGIÓN PUNO Y SU EFECTO EN
PLÁNTULAS DE TRIGO (*Triticum aestivum*) 2018.**

TESIS

PRESENTADA POR:

Br. MARILUZ ESCALANTE MARÓN

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PUNO - PERÚ

2018

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOFERTILIZANTE DE BACTERIAS *Azotobacter* sp. AISLADAS DE SUELOS CULTIVADOS DE LA REGIÓN PUNO Y SU EFECTO EN PLÁNTULAS DE TRIGO (*Triticum aestivum*) 2018.

TESIS

PRESENTADA POR:

Br. MARILUZ ESCALANTE MARÓN

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

APROBADA POR:

PRESIDENTE

.....
M. Sc. EVA LAURA CHAUCA

PRIMER MIEMBRO

.....
M. Sc. ALFREDO LUDWIG LOZA DEL CARPIO

SEGUNDO MIEMBRO

.....
Dr. LUIS ANGEL PAUCAR FLORES

DIRECTOR / ASESOR

.....
Dr. Sc. JUAN JOSÉ PAURO ROQUE

Área: Ciencias Biomédicas

Tema: Biotecnología Microbiana

Fecha de sustentación: 27 de diciembre 2018.

DEDICATORIA

*A Dios por haberme dado la vida,
salud, sabiduría y paciencia para
alcanzar mis objetivos.*

*A mis queridos padres: Enrique Escalante Choque
y Lourdes María Marón Mamani, que nunca
Permitieron que desista de mis estudios.*

*A mis hermanos, Mirian Roxana y Alex Fredy
por ser mi alegría y motivación cada día.*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional del Altiplano, Facultad de Ciencias Biológicas y docentes que inculcaron en mi formación profesional.

Un agradecimiento muy especial a mis queridos padres que me brindaron su apoyo para la culminación de mis estudios superiores.

Un agradecimiento a mi director de tesis Dr. Sc. Juan José Pauro Roque con su ayuda y guía pude realizar este trabajo, por sus consejos y experiencia en la realización de este trabajo de investigación.

Y, a todas aquellas personas que me apoyaron de manera directa e indirecta para la culminación de la tesis.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
ÍNDICE GENERAL	5
ÍNDICE DE TABLAS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS.....	9
RESUMEN	10
ABSTRACT.....	11
I. INTRODUCCIÓN.....	12
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	15
2.1 Antecedentes	15
2.2 Marco teórico	18
2.2.1 Bacterias diazotróficas	18
2.2.2 <i>Azotobacter</i> sp.....	21
2.2.3 Efectos de la inoculación sobre el desarrollo de las raíces.....	24
2.2.4 El trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	27
III. MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1 Área de estudio.....	31
3.2 Tipo de estudio	32
3.3 Muestra.....	32
3.4 Toma de muestra	32
3.5 Metodología.....	33
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
4.1 Carga bacteriana de <i>Azotobacter</i> sp. en los centros poblados de Camicachi, Santa Rosa de Yanaque y Jayllihuaya.....	41
4.2 Efecto biofertilizante de la bacteria <i>Azotobacter</i> sp. en plántulas de trigo	48
V. CONCLUSIONES.....	58
VI. RECOMENDACIONES	59
VII. REFERENCIAS	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Recuentos de bacterias <i>Azotobacter</i> sp (UFC/g) en campos de cultivo de suelos de tres centros poblados de la región Puno, abril – junio 2018.	41
Tabla 2. Evaluación de los parámetros edafológicos en suelos de tres de campos de cultivo, laboratorio de Aguas y Suelos – Facultad de Ciencias Agrarias, UNA Puno, julio – agosto 2018.	44
Tabla 3. Longitud total (cm) de plántulas de trigo inoculadas con bacterias <i>Azotobacter</i> sp, julio – agosto 2018.....	48
Tabla 4. Longitud de raíces (cm) de plántulas de trigo inoculadas con bacterias <i>Azotobacter</i> sp, julio – agosto, 2018.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Los biofertilizantes bacterianos más frecuentes en los suelos (CEPES, 2018).	19
Figura 2. Ubicación de zonas de muestreo de los centros poblados de Jayllihuaya (Zona 1), Santa Rosa de Yanaque (Zona 2) y Camicachi (Zona 3).	31
Figura 3. Prueba de Tukey de los recuentos de bacterias <i>Azotobacter</i> sp en suelos de tres campos de cultivo de centros poblados de la región Puno, abril – junio, 2018.	42
Figura 4. Prueba de Tukey de la longitud total de plántulas de trigo, en el laboratorio de Ecología, agosto 2018.	49
Figura 5. Prueba de Tukey de la longitud de raíz de las plántulas de trigo, en el laboratorio de Ecología, agosto 2018.	54
Figura 6. Toma de muestras de suelos en los centros poblados de Camicachi (izquierda), Santa Rosa de Yanaque (centro) y Jayllihuaya (derecha), abril – junio, 2018.	72
Figura 7. Muestras de los suelos colectadas en suelos de tres centros poblados y trasladadas al laboratorio, abril – junio 2018.	72
Figura 8. Diseño de toma de muestras de suelo al azar en los tres centros poblados, abril – junio 2018.	72
Figura 9. Procedimiento de las concentraciones de la muestra de suelo de tres centros poblados, abril – junio 2018.	73
Figura 10. Placas Petri con medio de cultivo Ashby sin indicador de pH, preparado en el laboratorio de análisis microbiológicos, abril – junio 2018.	73
Figura 11. Placa Petri con colonias transparentes en medio de cultivo Ashby con indicador de pH – azul de bromotimol, abril – junio 2018.	73
Figura 12. Placa Petri con agar nutritivo donde se observa a la colonia de <i>Azotobacter</i> sp con un borde azulino (círculo rojo), abril – junio 2018.	74
Figura 13. Observación de láminas de coloración Gram al microscopio en el laboratorio de análisis microbiológico, abril – junio 2018.	74
Figura 14. Bacilos Gram negativos (izquierda) y cocobacilos Gram negativos (derecha) con formación de quistes, abril – junio 2018.	74
Figura 15. Prueba de la oxidasa positiva (A) y negativa (B) de <i>Azotobacter</i> sp en el laboratorio de análisis microbiológico, abril – junio 2018.	75

Figura 16. Prueba de la catalasa positiva en dos colonias de <i>Azotobacter</i> sp, abril – junio 2018.....	75
Figura 17. Soluciones de suero fisiológico conteniendo bacterias <i>Azotobacter</i> sp, para inocular a las semillas de trigo, julio 2018.....	75
Figura 18. Estándares 0.5, 1 y 3, utilizados en la investigación (izquierda) comparando el tubo de bacterias con el standard de McFarland correspondiente (derecha), julio, 2018.	76
Figura 19. Inmersión de semillas en soluciones de suero fisiológico conteniendo bacterias <i>Azotobacter</i> sp, julio 2018.	76
Figura 20. Frasco con arena donde se colocaron las semillas ya inoculadas con las bacterias para su posterior crecimiento.	76
Figura 21. Crecimiento del trigo a un mes de inoculación con bacterias <i>Azotobacter</i> sp, agosto 2018 (T 0.5 = 1.5×10^8 células/ml; T 1 = 3×10^8 células/ml; T 3 = 9×10^8 células/ml).....	77
Figura 22. Medición de las plántulas de trigo, en el laboratorio de Ecología, agosto, 2018.....	77

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

%: porcentaje

°C: grados centígrados

µm: micrómetro

ADN: ácido desoxirribonucleico

AIA: ácido indol acético

C. V.: coeficiente de variabilidad

et al.: y colaboradores

FBN: fijación biológica de nitrógeno.

g: gramo

h: hora

kg/ha: kilogramo por hectárea

m²: metro cuadrado

mS/cm: miliSiemens por centímetro

N: nitrógeno.

P: probabilidad

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PGPR: Plant growth Promoting Rhizobacteria / bacterias promotoras del crecimiento vegetal

pH: potencial de hidrogeniones

Prom: promedio

ppm: partes por millón

RNA: ácido ribonucleico

t/ha: toneladas por hectárea

UFC/ml: unidades formadoras de colonia por mililitro

RESUMEN

La investigación se realizó en suelos cultivados de papa de los centros poblados (cp) de Camicachi (provincia de El Collao), Santa Rosa de Yanaque y Jayllihuaya (provincia de Puno), región Puno, durante los meses de abril a junio del 2018. Los objetivos específicos fueron: a) Evaluar la carga bacteriana de *Azotobacter* sp. en suelos de tres centros poblados del Altiplano de la región Puno y b) Evaluar el efecto biofertilizante de la bacteria *Azotobacter* sp. en plántulas de trigo. La colecta de las muestras de suelo fue al azar en cada campo de cultivo, con una cantidad de 500 g, el aislamiento de la bacteria fue mediante el recuento en placa en concentraciones de 10^{-2} a 10^{-7} en el medio de cultivo Ashby para *Azotobacter* sp, para la observación de la morfología se utilizó la tinción Gram y la identificación con pruebas específicas según las tablas de identificación de Bergey's, para el método de experimentación se realizaron concentraciones bacterianas de *Azotobacter* sp de 1.5×10^8 , 3×10^8 y 9×10^8 células/ml comparados con los estándares McFarland 0.5, 1 y 3, los que fueron inoculados en semillas de trigo mediante la técnica de inmersión en solución salina, las evaluaciones se realizaron semanalmente durante un mes, determinándose las longitudes de planta y de raíz. El diseño estadístico fue un análisis de varianza y pruebas de Tukey. Los resultados fueron: la mayor carga bacteriana de *Azotobacter* sp. se presentó en suelos del cp de Camicachi con un promedio de 142×10^4 UFC/g siendo superiores a los otros dos cp y dicha bacteria estimuló el incremento de la longitud total de planta llegando a medir 77.43 cm al ser inoculadas con una concentración de 9.0×10^8 cel./ml, y el mayor promedio de la longitud de raíces fue de 47.57 cm al inocular una concentración de 1.5×10^8 cel./ml. Se concluye en que los suelos de los cp evaluados varían en su contenido de las bacterias *Azotobacter* sp, y al inocularlos en semillas de trigo estimulan el crecimiento de la longitud total de plántulas y raíces.

Palabras clave: Bacterias fijadoras de nitrógeno, biofertilizante, pruebas bioquímicas.

ABSTRACT

The research was carried out in cultivated potato soils of the populated centers (cp) of Camicachi (province of El Collao), Santa Rosa de Yanaque and Jayllihuaya (province of Puno), Puno region, during the months of April to June 2018. The specific objectives were: a) To evaluate the bacterial load of *Azotobacter* sp. in soils of three population centers of the Altiplano of the Puno region; and b) Evaluate the biofertilizing effect of the bacterium *Azotobacter* sp. in wheat seedlings. The collection of soil samples was randomized in each culture field, with an amount of 500 g, the isolation of the bacteria was performed by counting on plate using concentrations 10^{-2} to 10^{-7} in the culture medium Ashby for *Azotobacter* sp, for the observation of the morphology Gram stain was used and the identification with specific tests according to Bergey's identification tables, for the experimental method were made bacterial concentrations of *Azotobacter* sp 1.5×10^8 , 3×10^8 and 9×10^8 cells/ml compared with the McFarland standards 0.5, 1 and 3, which were inoculated in wheat seeds by means of the saline immersion technique, the evaluations were carried out weekly for a month, determining the plant and root lengths. The statistical design was an analysis of variance and Tukey tests. The results were: the highest bacterial load of *Azotobacter* sp. it was presented in soils of the cp of Camicachi with an average of 142×10^4 CFU / g being higher than the other two cp and said bacteria stimulated the increase in the total length of the plant, reaching 77.43 cm when inoculated with a concentration of 9.0×10^8 cel./ml, and the highest average root length was 47.57 cm when inoculating a concentration of 1.5×10^8 cel./ml. It is concluded that the soils of the cp evaluated vary in their content of the bacteria *Azotobacter* sp, and when inoculated in wheat seeds stimulate the growth of the total length of seedlings and roots.

Key words: Nitrogen fixing bacteria, biofertilizer, biochemical tests.

I. INTRODUCCIÓN

La investigación tiene como finalidad la evaluación de la carga microbiana de las bacterias *Azotobacter* sp. a partir de zonas de cultivo de tres centros poblados de las provincias de El Collao y Puno, respectivamente, de la región Puno, debido a que las bacterias de las rizósfera tales como *Sinorhizobium meliloti*, *Azospirillum zea* y *A. canadense* también denominadas diazótrofas presentaron un potencial biofertilizante en el crecimiento y la producción de plántulas de trigo (*Triticum aestivum*) ya que es un importante insumo para la preparación del pan, fideos, entre otros y lo que se desea lograr es de contribuir en determinar la carga bacteriana ideal de *Azotobacter* sp para la inoculación de trigo para lograr el mejor crecimiento de plántulas, tanto de su longitud de raíz y la longitud total de la plántula debido a que fijan nitrógeno, solubilizan fosfatos, producen fitohormonas y sideróforos (Obando *et al.*, 2010), son antagonicas entre otras bondades ambientales y constituirse en una aplicación biofertilizante ecológica al alcance de los productores de trigo en la región.

En la Región Puno, la producción de trigo osciló entre 1638, 1672 y 1598 toneladas métricas durante los años 2014, 2015 y 2016 respectivamente (INEI, 2017), lo cual debería de incrementarse en la región Puno. Según el diario Gestión del 28 de marzo del 2014, la producción nacional de trigo creció 1.8% entre el 2008 y 2013, según la Sociedad Nacional de Industrias elaborado con cifras del Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI), el cultivo del cereal no logra cubrir la demanda interna, razón por la cual el 90% del cereal es importado de Canadá, EE.UU., Rusia, Argentina, y Paraguay, en el año 2008 se producían 206.9 miles de toneladas, mientras que el 2013 el volumen producido alcanzó las 230 mil toneladas, donde La Libertad, Cajamarca, Arequipa y Ancash son las

regiones con mayor nivel de producción.

Ante dicha problemática, se realizó el experimento para incrementar la producción de trigo en la región Puno, mediante la aplicación de bacterias diazótrofes tales como *Azotobacter* sp, aisladas a partir de los suelos de nuestra región, que luego de los experimentos se obtuvo buenos resultados en la estimulación de la germinación y posterior crecimiento de plántulas de trigo, tomando en cuenta los resultados obtenidos en cultivos tales como quinua realizados también en la región Puno, por tanto se evaluó la aplicación de dichas bacterias en semillas de trigo, lográndose alentadores resultados de su aplicación para su posterior evaluación en campo.

En tal sentido, teniendo en cuenta las aplicaciones biotecnológicas de las bacterias diazótrofes *Azotobacter* sp y su aplicación en semillas de trigo, es que se cumplieron con los siguientes objetivos:

Por tal razón esta investigación tuvo los siguientes objetivos:

Objetivo general:

- Evaluar el potencial biofertilizante de bacterias *Azotobacter* sp. aisladas de suelos cultivados de la región Puno y su efecto en plántulas de trigo (*Triticum aestivum*).

Objetivos específicos:

- Evaluar la carga bacteriana de *Azotobacter* sp. en suelos de tres centros poblados del Altiplano de la región Puno.

- Evaluar el efecto biofertilizante de la bacteria *Azotobacter* sp. en plántulas de trigo.

Asimismo, las hipótesis fueron:

Hipotesis general:

- Los biofertilizantes con bacterias *Azotobacter* sp. aislados de suelos cultivados de la región Puno, originan un mejor crecimiento de plántulas de trigo (*Triticum aestivum*).

Hipótesis específicas:

- La carga bacteriana de *Azotobacter* sp. es mayor en suelos del centro poblado de Santa Rosa de Yanaque del distrito de Acora de la provincia de Puno, mientras que en el centro poblado de Camicachi del distrito de Ilave provincia de El Collao y el centro poblado de Jayllihuaya del distrito de Puno, resultaron con recuentos menores.
- El efecto biofertilizante de bacterias *Azotobacter* sp fue estimulante en plántulas de trigo.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Antecedentes

Argüello & Moreno (2014), evaluaron el potencial biofertilizante de bacterias *Burkholderia* sp. y *Gluconacetobacter* sp. aisladas de suelos cacaoteros por la técnica de diluciones seriadas, los aislados con mejor capacidad de fijación de nitrógeno, promoviendo a partir de semillas durante 120 días en plantas de cacao en un incremento de crecimiento y N (%) foliar, en comparación con el testigo; se aislaron 32 cepas nativas de bacterias diazótrofes que originaron mejores resultados en la emergencia de las plantas, el diámetro del tallo y la longitud de las hojas y los tallos, las bacterias fueron identificadas como *Stenotrophomonas maltophilia*, lográndose mayor eficiencia en la emergencia y el crecimiento en las plantas de maíz (Moreno & Galvis, 2013).

Bécquer *et al.* (2015), inocularon en invernadero semillas de trigo con las rizobacterias *Sinorhizobium meliloti*, *Azospirillum zae* y *Azospirillum canadense*, y con el hongo *Trichoderma harzianum*, donde la aplicación de *Trichoderma* por separado tuvo un efecto positivo en la longitud del tallo (5.58 cm), destacándose el tratamiento *Trichoderma* + NRG34-DS2 5d en el peso seco radical (0.45 g/planta) y en el peso seco aéreo (0.58 g/planta); así como el tratamiento A2-N7, en el contenido de clorofila (40.35 spads/planta) y la longitud del tallo (5.50 cm); donde 50 genotipos de trigo harinero de primavera 30THESWYT, las mejores líneas sobresalientes fueron la línea T21 (WHEAR/VIVITSI/WHEAR) en el que se obtuvo un rendimiento procedente de campo con 5955 t/ha, además de altura de planta con 1.135 m, y la línea T50 (WBLL1*2/KIRITATI) fue la mejor con 12.67 t/ha, la línea T43 fue la mejor con 503.3 espigas por m² (Lizárraga, 2015).

León & Rojas (2015), realizaron en cultivos de maíz procedentes de campos agrícolas de los distritos de Monsefú y Reque (Lambayeque), identificaron 37 malezas, las bacterias aisladas de la rizósfera de malezas, de 305 cultivos puros de bacterias, 133 (43.7%) se identificaron como *Azotobacter* spp, y produjeron hasta 36.03 ppm de nitrógeno fijado como amonio, 60.75 ppm de ácido indol acético y 6.06 ppm de fósforo solubilizado, se determinó actividad antagónica contra *Fusarium verticillioides*, proteolítica y quitinolítica; las semillas de trigo inoculadas con *Azospirillum* spp. y *Az. beijerinckii* en un suelo agrícola no esterilizado, donde los exudados radicales en SPCV, favoreciendo un aumento en la absorción de la urea en las raíces, y la gramínea alcanzó un peso seco similar al del trigo fertilizado sólo con 100% de urea, sin inocular (García *et al.*, 2005).

González (2015), identificó 5 géneros bacterianos *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas* y *Beijerinckia*, de los cuales existe gran variabilidad de microorganismos en suelos agrícolas, luego de inocular *Azotobacter vinelandii*, a los 60, y 90 días ejerció una mayor acción en el crecimiento de las plantas de maíz, presentando la mayor altura de plantas con 96.3 y 189.6 cm respetivamente, así como los mejores resultados para el número de hojas, con una diferencia del 15.38, 23.8 y 27.92% respectivamente frente al control; de un total de 151 cepas de bacterias aerobias aisladas de la rizósfera de *Pinus patula*, donde se recuperaron 62 cepas fijadoras de nitrógeno, que luego de las pruebas bioquímicas sugieren que las bacterias diazotróficas son cercanas a las especies *Bacillus macerans* (35.5%), *Pseudomonas* sp (29%), *Enterobacter agglomerans* (22.6%) y *Azotobacter chroococcum* (12.9%), y las plántulas inoculadas con *A. chroococcum* presentaron los mejores promedios en casi todos los parámetros vegetales, a excepción del peso seco radicular sin diferencias significativas ($P > 0.01$)

(Orozco & Martínez, 2009).

Santos *et al.* (2006), identificaron microorganismos con potencial biofertilizante de suelos cultivados con arroz, un total de 43 bacterias y 4 hongos fueron aislados en diferentes suelos, dichas bacterias fueron diazotróficas del género *Azotobacter* sp., *Azospirillum* sp. y *Beijerinckia* sp. y las solubilizadoras de fósforo como *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas aeruginosa*; dos aislamientos (A5 y A6) fueron identificados como *A. nigricans* con base en la caracterización fenotípica y genotípica, el aislamiento A5 se seleccionó para la elaboración del biofertilizante ya que presentó mejor estabilidad, pigmentación, mayor velocidad de crecimiento 0.1405/h fase exponencial de 18 horas y una producción de AIA promedio de 38.4 mg/ml a las 150 horas (Borda *et al.*, 2009).

Córdova *et al.* (2009), manifiestan que las poblaciones de *Azospirillum* y *Azotobacter* se aislaron hasta profundidades de 59 y 110 cm, respectivamente, con recuentos de 42×10^4 y 11×10^5 UFC/g de suelo seco para *Azospirillum* y *Azotobacter*, respectivamente, *Azospirillum* creció mejor en pinzote + inóculo con 15×10^5 UFC/g de biofertilizante mientras que para *Azotobacter* fue 63×10^4 UFC en pinzote + suelo + inóculo, el mayor contenido de nitrógeno total fue 5.25%, liberado en el suelo con pollinaza y bioaumentado con el consorcio *Azospirillum* + *Azotobacter*; los parámetros biométricos de peso seco denotó diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) entre los tratamientos control, T1 y T2 frente a los tratamientos inoculados con *Azotobacter* A15MG en concentración de 10^7 UFC, T4 y concentración de 10^8 UFC, T5; con respecto al área foliar se observaron diferencias significativas de los tratamientos T4 y T5, coincidiendo esta característica incide en una mejor capacidad fotosintética de las plantas (Lara *et al.*, 2011).

Piscoya & Ugaz (2016), evaluaron el efecto de las bacterias *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Enterobacter* spp nativas agregado el 50% de fertilizante químico en el desarrollo vegetativo y rendimiento de maíz amarillo duro y obtuvieron el incremento de altura (0.74 – 18.76%), número de hojas (0.79 – 8.86%), diámetro de tallos (1.19 – 20.6%) y el rendimiento, específicamente con *Azotobacter* sp se logró el 24.09%; sin embargo, Rico (2009), evaluó la capacidad promotora del crecimiento vegetal (PGPR) de bacterias del género *Azotobacter* y del grupo Actinomicetos aislados de la rizósfera de plantaciones de papa colectadas en los departamentos de Huancavelica, Junín, Huánuco y Cajamarca, donde Actinomicetos y *Azotobacter* mostraron que el uso de semillas – tubérculo favorece el efecto benéfico que éstas bacterias ejercen sobre la planta de papa y su producción.

2.2 Marco teórico

2.2.1 Bacterias diazotróficas

Las bacterias diazotróficas, son la fuente primaria del suministro de nitrógeno a las plantas, son biosintetizadores de amonio a partir de nitrógeno atmosférico, algunas bacterias, actinomicetos y algas verde azules (cianofíceas) reducen el nitrógeno atmosférico a nitrógeno amoniacal y lo incorporan al suelo (Gutiérrez, 2013), entre los géneros de bacterias aerobias biosintetizadoras de amonio están *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Dexia*, *Azomonas* y *Oscillatoria*, la mayor actividad de las síntesis de amonio se alcanza con una humedad adecuada en el suelo y con una fuente de carbono accesible como el material vegetal en descomposición (pajas, socas o subproductos de cosecha) (Ceballo, 2012), por esto siempre están acompañadas por bacterias celulolíticas y necesitan de alcoholes, azúcares o ácidos orgánicos que se los suministran otros microorganismos degradadores, ya que el desarrollo de las bacterias se estimula con las exudaciones que emite la planta cuando se encuentra bien nutrida

(Coyne, 2000).

El suelo es un ecosistema de enorme riqueza microbiana, los estudios sobre los microorganismos del suelo son numerosos, sin embargo, hasta la fecha no se ha determinado completamente la biodiversidad necesaria, en lo que se refiere a microorganismos, para que un suelo agrícola funcione de manera óptima (Escobar *et al.*, 2011), el grupo de bacterias conocido como PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), son bacterias que colonizan la raíz y estimulan significativamente el crecimiento de plantas (Laura *et al.*, 2013), donde los microorganismos diazotófos, organismos de vida libre capaces de fijar nitrógeno, descritos desde el siglo pasado, han sido objeto no solo de estudio en microbiología de suelos, sino también en el desarrollo de productos biológicos comerciales, el análisis del gen del RNA ribosomal 16S suministra información importante sobre la identidad de bacterias diazotróficas y permite establecer las relaciones filogenéticas entre individuos del mismo agroecosistema (Farajzadeh *et al.*, 2009).

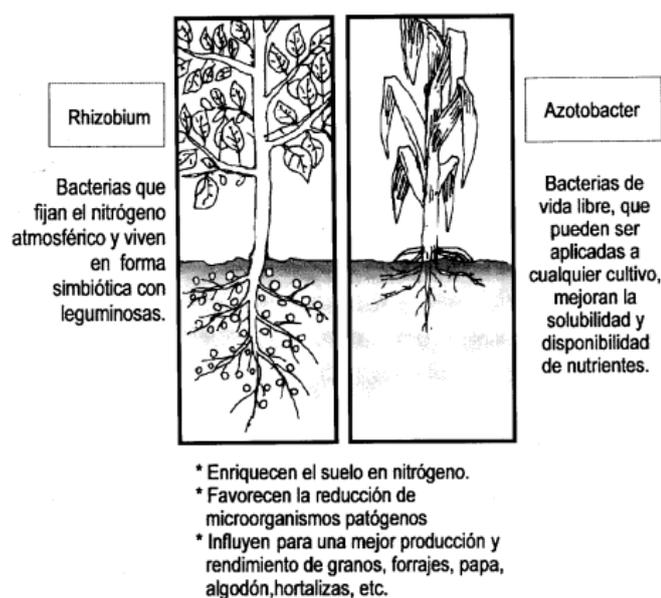


Figura 1. Los biofertilizantes bacterianos más frecuentes en los suelos (CEPES, 2018).

Las bacterias del género *Azotobacter* tienen movimiento y forman quistes cuando

encuentran condiciones difíciles, pueden fijar 40 kg de nitrógeno por hectárea equivalente a 200 kg de sulfato de amonio, se han encontrado en suelos ácidos (5.5 de pH) y alcalinos, pero prefieren los neutros (Coyne, 2000), donde la actividad biológica de los suelos tiene un papel preponderante en el logro de cultivos de alto rendimiento, los microorganismos en asociación con los cultivos son importantes, como insumos, para el mejoramiento de la producción y el control ambiental; además permiten el mantenimiento de la biodiversidad y la sostenibilidad de los ecosistemas (Carvajal & Mera, 2010), las bacterias de vida libre, o en simbiosis, que habitan la rizósfera pueden estimular el crecimiento de las plantas a través de diferentes procesos, como la síntesis de reguladores del crecimiento vegetal, la fijación de nitrógeno, la solubilización de nutrientes, la producción de sideróforos y el control de fitopatógenos del suelo (Torriente, 2010).

Los microorganismos más estudiados pertenecen a los géneros *Azotobacter*, *Stenotrophomonas*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Beijerinckia*, *Pseudomonas* y *Bacillus*, entre otros; estos se denominan bacterias PGPR, donde algunas transforman el nitrógeno atmosférico en amonio para que pueda ser incorporado a la biosfera, lo cual representa un beneficio económico y reduce el impacto negativo en el ambiente, debido al uso exagerado de insumos químicos en la producción agrícola (Bruinsma, 2003), la identificación de microorganismos nativos que promuevan el crecimiento vegetal y que se encuentren con mayor permanencia en el campo, entre ellos se citan a *Azotobacter vinelandii*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia cepacia*, pueden ser reconocidos empleando técnicas convencionales o basadas en sus propiedades bioquímicas, tales como: la descripción de su morfología celular, la coloración Gram, el análisis de su capacidad para crecer en condiciones aerobias o anaerobias, o el análisis de requerimientos de sustratos especiales para su cultivo (Orozco

& Martínez, 2009), estas técnicas permiten su identificación hasta género y para la caracterización de especies, subespecies, serovariedades o cepas, se precisa de técnicas más sensibles y específicas, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que identifica una secuencia única en el ADN (Laura *et al.*, 2013).

2.2.2 *Azotobacter* sp

Clasificación taxonómica del género *Azotobacter* (Ramos, 1992).

Dominio	: Bacteria.
Phylum	: Proteobacteria.
Clase	: Gamma proteobacteria.
Orden	: Pseudomonadales.
Familia	: Azotobacteraceae.
Género	: <i>Azotobacter</i> .
Especie	: <i>Azotobacter</i> sp

Las bacterias del género *Azotobacter* tienen un diámetro celular de 1.5 a 2.0 μm , son pleomórficas, variando su morfología desde bacilos hasta células en forma de cocos, se les observa como células individuales, como pares o formando agregados irregulares, y algunas veces formando cadenas de tamaño variable, se reproducen por fisión binaria y se mueven por flagelos peritricos (Espín, 2016), no producen endosporas pero sí quistes de resistencia a drogas, la formación de quistes ha sido muy estudiada, es un fenómeno que se produce ante condiciones ambientales adversas y en el laboratorio puede inducirse pasando el cultivo de un medio con glucosa a uno con b-hidroxibutirato como única fuente de carbono (Lin & Sadoff, 1968).

Son bacterias catalasa positivas, aerobias, quimioheterótrofas, utilizan azúcares, alcoholes y sales inorgánicas para crecer, pudiendo crecer en concentraciones bajas de oxígeno, el rango de pH óptimo para fijar nitrógeno es de 7.0 – 7.5, son mesófilas, su temperatura óptima de 30 °C (Mayea *et al.*, 1998), fijan al menos 10 mg de N₂/g de carbohidrato (glucosa) consumido, requieren molibdeno, utilizan nitrato y sales de amonio y ciertos aminoácidos como fuentes de nitrógeno (Espín, 2016), algunas especies producen alginatos, poli- α -hidroxibutirato (Horan *et al.*, 1983), pigmentos y hormonas vegetales como auxinas, citoquininas y giberelinas (González *et al.*, 1986).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno (diazótrofas) fueron las primeras en producirse comercialmente con fines de biofertilización, de este grupo, las más utilizadas como biofertilizantes corresponden al género *Azotobacter*, el cual comprende siete especies a) *A. chroococcum*, b) *A. vinelandii*, c) *A. beijerinckii*, d) *A. paspali*, e) *A. armeniacus*, f) *A. nigricans* y g) *A. salinestrus* (Page & Shivprasad, 1991), los microorganismos de este género fijan asimbióticamente nitrógeno y son solubilizadoras de fosfato, además, realizan procesos de biodegradación de plaguicidas como el endosulfan (Balandreau, 1986), en vida libre, fijan al menos 10 mg de N₂ por gramo de carbohidrato consumido (Holt, 2000).

El aislamiento secundario en medio *Azotobacter* permite obtener aislamientos de bacterias aerobias fijadoras de nitrógeno asimbióticas, este medio selectivo permite el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno además de que posee microelementos importantes para la fijación del nitrógeno como el FeSO₄ (Bécquer *et al.*, 2015), en el total de los aislamientos se evidenciaron dos morfologías diferentes de colonia, como las

colonias en la mayoría de los aislamientos fueron de color crema, medianas, irregulares y brillantes muy similares a las reportadas para el género *Azotobacter* (Coyne, 2000).

En algunas cepas se evidencia la formación de quistes, ya que las bacterias del género *Azotobacter* cuando provienen del suelo se encuentran en un estado de resistencia a las condiciones ambientales (Vela, 1974), en un cultivo, estos quistes pueden formarse después de la fase de crecimiento exponencial, cuando las condiciones son adversas por falta de nutrientes o nutrimentos complejos como el β - hidroxibutirato o bien, cuando se degradan los PHBs (Hitchins & Sadoff, 1973), así como por la acción de los iones calcio en el medio (Hitchins & Sadoff, 1970), por otro lado, estas estructuras de resistencia no son formadas exclusivamente por especies del género *Azotobacter*, sino que también son características de especies del género *Beijerinckia*, aunque para el caso de *Azotobacter* los quistes se agrupan en pares, asimismo, se observaron bacilos Gram negativos, grandes y cortos como los reportados para *Azotobacter* sp. (Holt, 2000).

La identificación bioquímica de bacterias del género *Azotobacter* se realiza empleando técnicas convencionales, las pruebas empleadas se basaron en la utilización de cuatro azúcares, benzoato y fenol como fuente de carbono, prueba de la catalasa, prueba de Nessler, hidrólisis de almidón y producción de ácido 3- indolacético, estas pruebas bioquímicas se utilizaron ya que permiten diferenciar el género *Azotobacter* de otras bacterias fijadoras de nitrógeno asimbióticas (Tejera *et al.*, 2005), de las cepas aisladas, únicamente dos fueron positivas para la glucosa, por lo tanto, estas cepas fueron identificadas como bacterias del género *Azotobacter*, además, se tomaron en cuenta las observaciones macro y microscópicas (morfología celular y de la colonia) así como la

pigmentación en medio Ashby-benzoato para la identificación preliminar (Constantino *et al.*, 2011).

La identificación molecular se realiza en base en el ADNr 16S, una vez obtenido el ADN de alto peso molecular, se realiza la amplificación con los iniciadores FGPL y FGPS los cuales han sido utilizados en la amplificación del ADNr 16S de bacterias diazótrofes (Nour *et al.*, 1994), sin embargo, no son específicos para bacterias del género *Azotobacter*, por otro lado, se obtuvo un fragmento de 2000 pb aproximadamente, correspondiente al gen 16S y los IGS 16 – 23S, acorde con lo reportado por Farajzadeh (2009) para los aislamientos así como para la cepa control.

También se puede realizar la secuenciación, en ambos sentidos, las cuales se emplean empleando la herramienta CAP contig del software Bioedit, luego de obtener la secuencia, se lleva a cabo la comparación con las secuencias reportadas en la base de datos del GenBank mediante el programa BLAST 2.2.20 (Basic Local Alignment Search Tool) (Zhang *et al.*, 2000), obteniendo la máxima identidad con bacterias del especies *Azotobacter vinelandii*, en ambos casos, el análisis filogenético demuestra que los aislamientos se encuentran agrupados en el mismo clado que *Azotobacter vinelandii*, teniendo como vecino al clado que contiene a *A. chroococcum* y *A. salinestrus*, finalmente se logra observar que estas especies de *Azotobacter* guardan una estrecha relación con *Pseudomonas alcaligenes* (Fialho *et al.*, 1990).

2.2.3 Efectos de la inoculación sobre el desarrollo de las raíces

Los efectos más sobresalientes de la inoculación vegetal con *Azospirillum*, son los diversos cambios morfológicos que sufre el sistema radicular, éstos cambios se

encuentran directamente relacionados con la concentración del inóculo, cuando éste es superior a los niveles óptimos tiene efectos inhibitorios, mientras que dosis bajas no causan efecto (Hartman & Zimmer, 1993), el nivel de inoculación óptimo en semillas y plántulas para muchos cereales, y en vegetales y plantas de cultivo comerciales, se ha observado que es de alrededor de $10^5 - 10^6$ unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml), mientras que para el maíz es de 10^7 UFC/ml, una concentración de inóculo de $10^8 - 10^{10}$ UFC/ml generalmente inhibe el desarrollo radicular. Estos datos no han revelado cuántas células bacterianas por semilla o plántula se requieren para obtener una respuesta vegetal positiva (Bashan *et al.*, 2004).

Los efectos positivos de la inoculación se reflejan en diversos parámetros morfológicos de la raíz, incremento en la longitud (particularmente en la zona de elongación), en el número y longitud de las raíces laterales, lo cual incrementa el volumen radicular, incremento en el peso seco de la raíz, en el número, densidad y aparición temprana de pelos radiculares, en el área de superficie radicular, promoción de la división celular en el meristemo radicular, cambios en los arreglos celulares de la corteza, estimulación de la exudación radicular y cambios en la morfología externa de las raíces (Ibarra, 2010), estas observaciones se fundamentaron en estudios microscópicos, pero no pudieron ser confirmadas en un estudio posterior donde se utilizó la misma cepa de *A. brasilense* (Perrig *et al.*, 2007).

Otros estudios indican claramente que ocurre una disminución en la longitud radicular, masa y volumen, pese a que se observa un incremento en parámetros de crecimiento de los brotes (León & Rojas, 2015), tales efectos contradictorios en raíces a consecuencia de la inoculación de plantas con cepas de *Azospirillum*, aparentemente son

reales, ya que la mayoría de dichos parámetros morfológicos se pueden medir fácilmente y con precisión, y se analizaron utilizando métodos estadísticos reconocidos (Hartmann & Zimmer, 1993).

Además de afectar positiva o negativamente muchos parámetros en raíces, la inoculación de plantas con *Azospirillum* puede afectar muchos parámetros relacionados con el follaje, estos cambios se atribuyen directamente a efectos positivos en la absorción de minerales por parte de la planta (Montenegro *et al.*, 2017), se ha propuesto que la absorción de NO_3^- , NH_4^+ , HPO_4^{2-} , K^+ , Rb^+ , y Fe^{+2} inducida por *Azospirillum* es el factor responsable en incrementar la materia seca foliar y la acumulación de minerales en tallos y hojas, durante el periodo de reproducción vegetal, estos minerales pueden transferirse a las panículas y espigas, lo que resulta en un mayor rendimiento (García *et al.*, 2010).

Se ha sugerido que el incremento en la absorción de minerales se debe a un incremento general en el volumen del sistema de raíces y no a un mecanismo de absorción de iones más eficaz, por otro lado, se sugiere que la inoculación con *Azospirillum* puede provocar que la absorción de iones en el suelo sea más eficiente (se desconoce el mecanismo de este proceso); esto explicaría la acumulación de compuestos de nitrógeno en la planta sin existir una aparente biotransformación de nitrógeno (Ormeño & Ovalle, 2011), la planta puede asimilar el nitrógeno del suelo de manera más eficiente, requiriendo menos fertilización con nitrógeno, la inoculación de frijol yorimón y frijol de soya con *A. brasilense* (Cd) incrementó el flujo de protones de sus raíces, y redujo el potencial de membrana, razón por la cual se propuso que la membrana celular funciona como un sensor sobre el efecto de *Azospirillum* (Bashan *et al.*, 2004).

2.2.4 El trigo (*Triticum aestivum*)

El cultivo de trigo (*Triticum aestivum*) es de gran importancia para los pobladores de la zona Andina porque son utilizados principalmente para cubrir las necesidades alimenticias de los agricultores, además constituye una fuente de ingreso al comercializarse los excedentes, contribuyendo con el 20% del total de las calorías ingeridas por las familias rurales de esta región (Romero & Gómez, 2003), esto está relacionado a que es un cultivo que se siembra a altitudes superiores a los 3000 msnm, donde pocos cultivos se adaptan y crecen bajo las condiciones tan adversas de sierra, donde predominan las sequías y heladas (Ceballo, 2012).

La mayor parte de la producción de trigo se obtiene en la zona Andina, entre los 2800 y 3500 msnm, y casi exclusivamente en seco, de las especies cultivadas del género *Triticum* en el Perú se siembran *Triticum aestivum* ssp *aestivum* o trigo harinero en un 60 – 70% y *Triticum turgidum* ssp. *durum* o trigo cristalino o duro del 30 al 40% (Romero & Gómez, 2003) y su consumo de los productos derivados del trigo en el Perú es bastante estable y el consumo per cápita anual de trigo es de 54 Kg de trigo, que corresponde a producto importado (Diario la Gestión, 2014).

En la sierra norte del Perú, el trigo se cultiva entre los 2500 y 3500 msnm, siendo el 100% bajo condiciones de seco, alcanza bajos rendimientos (cercano a 1 t/ha), cuyas causas se relacionan suelos de baja fertilidad y capacidad productiva; baja densidad y desuniformidad de plantas en el campo; la invasión de malezas; ausencia o uso deficiente de prácticas de abonamiento; uso de semillas de baja calidad; uso de variedades de baja capacidad productiva y alto riesgo por ser de período vegetativo largo; y, un clima muy

errático, algunos años con mucha lluvia otros con sequía, heladas, entre otros aspectos, su clasificación taxonómica de las plantas de trigo es la siguiente (Ceballo, 2012).

Dominio	: Eucarya.
Reino	: Plantae.
División	: Magnoliophyta.
Clase	: Liliopsida.
Orden	: Poales.
Familia	: Poaceae.
Sub familia	: Pooideae
Tribu	: Triticeae
Género	: <i>Triticum</i>
Especie	: <i>aestivum</i>

Nombre científico: *Triticum aestivum* L.

Nombre común: trigo

Las especies de trigo se clasifican en función del número de cromosomas de las células vegetativas. Se reconocen tres series: diploide o carraón, con 14 cromosomas; tetraploide o escanda con 28 cromosomas, y hexaploide, con 42 cromosomas (Ceballo, 2012), pueden definirse tres tipos de variedades de trigo respecto a su ciclo: variedades de otoño o de ciclo largo, variedades de primavera o de ciclo corto y variedades alternativas, la diferencia entre ellos radica en sus necesidades de la duración del período vegetativo (García *et al.*, 2005), para cumplir su ciclo vegetativo, cada variedad requiere un determinado calor, que se mide por la suma de diferencias entre la temperatura media de cada día y el 0 vegetativo, que en el caso de esta especie es próximo a 0 °C, la facultad germinativa del trigo, se mantiene durante un período de 4 a 10 años,

aunque prácticamente la duración del período de utilización no debe sobrepasar los dos años (Villarreal, 2017).

Descripción botánica

Raíz. Al igual que el resto de las poaceae, el sistema radicular del trigo, es fibroso o fasciculado. Cuando la semilla de trigo germina, emite la plúmula que dará origen a la parte aérea de la planta, y emite también la radícula conocida además como raíz primaria o seminal, seguida por un sistema de raíces secundarias o permanentes que surgen de los nudos inferiores “corona” este último grupo de raíces, son las encargadas de dar sostén a la planta tanto en el aspecto mecánico como en la absorción de agua y nutrientes del suelo hasta que el trigo completa su ciclo vegetativo (Villarreal, 2000).

Tallo. Los tallos del trigo, al igual que los demás cereales, son visiblemente fraccionados por nudos e internudos; los nudos son sólidos y constituyen la conexión vascular de las hojas con el tallo; los entrenudos son huecos. La altura que alcanzan los tallos del trigo, generalmente oscila entre 60 120 cm. (Villarreal, 2000).

Macollamiento. El macollamiento o amacollamiento es una característica de las gramíneas o poaceae y consiste en el desarrollo de hijuelos o tallos secundarios terciarios, etc., a partir de los nudos subterráneos “la corona”. El macollamiento en cereales de grano pequeño es una característica deseable ya que los macollos pueden también producir espigas o panículas y por lo tanto incrementar el rendimiento con una considerable reducción de la densidad de siembra. La producción de macollos varía en función de la variedad, el clima, la fertilidad del suelo y la densidad de plantas por unidad de superficie (Villarreal, 2000).

Hoja. las hojas surgen alternativamente en los nudos de los tallos o cañas: la hoja está compuesta por la vaina, el limbo o lamina, la lígula, el cuello y las aurículas. La vaina

envuelve parcialmente el tallo por encima del nudo, el limbo es paralelinerve y típicamente plano, estrecho y por la forma de su ápice lanceolado; las aurículas o apéndices parten del cuello (donde se unen la vaina y el limbo); la lígula en trigo es de tamaño intermedio respecto a los otros cereales de invierno (Villarreal, 2000).

Inflorescencia. La inflorescencia del trigo es una espiga formada por espiguillas dispuestas en forma alternada sobre un eje central denominado raquis. Las espiguillas contienen de dos a cinco florecillas que posteriormente darán lugar al grano el cual queda inserto entre la lema o cubierta externa del grano que en la mayoría de los casos presenta una prolongación conocida como barba o arista, y la palea o envoltura más unida al grano; las florecillas laterales de cada espiguilla tienen además una tercera cubierta llamada gluma (Villarreal, 2000).

Fruto. Se desarrolla después de la polinización y alcanza su tamaño normal en los siguientes 30 a 45 días. El fruto es un grano o cariósido de forma ovalada con una sutura pliegue en la parte ventral, en un extremo lleva germen o embrión y en el otro una pubescencia llamada generalmente brocha o mechón. El grano está cubierto por la cascarilla o pericarpio normalmente de color rojo o blanco según las variedades, el resto, que constituye la mayor parte lo forma el endospermo ya que sea blanco almidonoso o cristalino (Villarreal, 2000).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Área de estudio

Fueron el centro poblado de Camicachi (coordenadas -16.033136 Lat. -69.566566 Long.) del distrito de Ilave provincia de El Collao, el centro poblado Santa Rosa de Yanaque (coordenadas -15.961674 Lat. -69.679073 Long.) del distrito de Acora, provincia de Puno y el centro poblado de Jayllihuaya (coordenadas -15.880054 Lat. -69.974785 Long.) del distrito de Puno, todos en la región Puno (Figura 2). El aislamiento bacteriano se realizó en el Laboratorio Orión, los experimentos se realizaron en el laboratorio de Ecología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA – Puno y el análisis de suelo se realizó en el laboratorio de Aguas y Suelos de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNA – Puno.



Figura 2. Ubicación de zonas de muestreo de los centros poblados de Jayllihuaya (Zona 1), Santa Rosa de Yanaque (Zona 2) y Camicachi (Zona 3).

3.2 Tipo de estudio

El tipo de investigación fue experimental, porque, se realizó en el laboratorio todo el procedimiento para la evaluación de la carga microbiana y del potencial biofertilizante de bacterias *Azotobacter* sp. y el efecto que pueda tener en plántulas de trigo (*Triticum aestivum*).

3.3 Muestra

Para la investigación son tres zonas de cultivos de los centros poblados de Camicachi del distrito de Ilave provincia de El Collao, el centro poblado Santa Rosa de Yanaque del distrito de Acora, provincia de Puno y el centro poblado de Jayllihuaya del distrito de Puno de la región Puno. De donde se colectaron tierra de los suelos cultivados de papa de cada uno de estos distritos que se tomaron como muestra en frascos de vidrio esterilizados. Durante los meses de abril a junio (2018), donde se realizaron dos muestreos por mes.

3.4 Toma de muestra

Las muestras de suelos en los tres centros poblados, fueron colectadas en frascos de vidrio de boca ancha esterilizados (Figura 3), luego rotulados debidamente (Figura 4), se recolectó 500 g de suelo en el horario de 9:00 a 11:00 am, y se transportó en una caja de tecnopor con bolsas de hielo para mantenerlas a una temperatura de 4 °C aproximadamente, al laboratorio y ser procesadas.

3.5 Metodología

3.5.1 Evaluación de la carga bacteriana de *Azotobacter* sp. en tres centros poblados de la región Puno.

a. Método a utilizar: recuento en placa.

Fundamento. La técnica se basa en contar las “unidades formadoras de colonias” o UFC presentes en un gramo o mililitro de muestra. Se considera que cada colonia que desarrolla en el medio de cultivo de elección después de un cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada, proviene de un microorganismo o de un agregado de ellos, de la muestra bajo estudio; ese microorganismo o microorganismos son capaces de formar la colonia, es decir una UFC (Camacho *et al.*, 2009). Para esta investigación se utilizó el medio de cultivo Ashby donde se observaron colonias pequeñas transparentes, convexas y de borde circular.

b. Procedimientos. Para la cuantificación se utilizó la metodología de concentraciones seriadas mencionado por (Argüello & Moreno 2014). En muchos casos se necesitó preparar disoluciones con concentraciones extremadamente bajas de un soluto, hasta un punto que es difícil o imposible en la práctica medir la cantidad necesaria de producto sólido o el volumen de solución madre. En esas situaciones fue necesario preparar una solución de mayor concentración (solución de stock o solución madre) a partir del cual se obtuvieron las concentraciones sucesivas a partir de ésta hasta alcanzar la concentración deseada (Domingo, 2017).

Preparación de concentraciones. Se realizaron concentraciones seriadas con base en 100 ml, diluyendo 10 g de suelo en 90 ml de agua estéril, hasta la concentración 10^7 (Figura 9), luego se tomó 0.1 ml de cada concentración y se colocó en el centro

de la placa Petri y sobre ella el medio de cultivo Ashby (5 g de manitol, 5 g de K_2HPO_4 , 0.2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g de NaCl, 0.1 g de K_2SO_4 , 5 g de $CaCO_3$, 15 g de agar y 1.0 l de agua destilada, a pH 7) (Rao, 1999), distribuyéndose con una espátula de Digrafsky previamente flameada con alcohol (Córdova *et al.*, 2009), la incubación fue a 30 °C por cuatro a cinco días, el conteo se realizó contando las unidades formadoras de colonia (UFC) que crecieron en las placas Petri en el laboratorio “Orión” de la ciudad de Puno (se adjunta constancia).

El crecimiento en placa Petri de las colonias de bacterias *Azotobacter* sp. en medio de cultivo Ashby (Figura 11), se observaron cómo colonias pequeñas transparentes, convexas y de borde circular a 30 °C, mientras que en medios no selectivos como el agar nutritivo se observan colonias medianas redondas de color crema, convexas de borde circular los cultivos crecen a 30 °C de 24 – 48 h, al observarlas al trasluz el borde es azuloso (Biocultivos, 2018).

Identificación morfológica. Para la identificación de la bacteria *Azotobacter* sp. se utilizó la siguiente tinción.

Tinción Gram

Fundamento. Las bacterias Gram negativas pierden un colorante (el cristal violeta) con mayor facilidad que las Gram positivas, debido a la menor cantidad de mucopéptido de las paredes de las bacterias Gram negativas.

Procedimiento. Para empezar se realizó un frotis, colocando una gota de agua destilada sobre una lámina portaobjetos, a continuación con una asa de siembra previamente esterilizado a la llama de fuego del mechero, se colectó una o 2

colonias las cuales fueron extendidas sobre lámina portaobjeto mediante la gota de agua destilada, se dejó secar al ambiente y posteriormente se realizó la tinción de Gram, se añadió cristal violeta por 1 minuto, luego se aplicó el lugol por 1 minuto, también alcohol-acetona por 1 minuto y por último se añadió safranina por 30 segundos (Popescu & Doyle 1996).

Identificación bioquímica. Para la identificación de la bacteria *Azotobacter* sp. se utilizaron las siguientes pruebas bioquímicas:

Prueba de la oxidasa

Fundamento. Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromo oxidasa sólo se encuentra en las bacterias aerobias, algunas anaerobias facultativas y, excepcionalmente, en alguna microaerófila (*Vibrio fetus*), pero las bacterias anaerobias estrictas carecen de actividad oxidasa (Fernández *et al.*, 2010).

Procedimiento. Se utilizó tiras de papel impregnadas con el reactivo para-amino-N-dimetil-anilina, que se oxida por la citocromo-oxidasa, el procedimiento consistió en impregnar la zona coloreada de la tira reactiva con una masa de bacterias colectadas con el asa de siembra, luego del transcurso de un minuto, si es positivo viró a un color azul-violeta. (Figura 15).

Prueba de la catalasa

Fundamento. La catalasa es un enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos. Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas (Fernández *et al.*, 2010).

Procedimiento. Se colocó una gota de agua oxigenada sobre una lámina portaobjetos con ayuda de una pipeta Pasteur, se colectó una o dos colonias con el asa de siembra y se suspendió en la gota de agua oxigenada, a la presencia de burbujas pequeñas se dio como positiva a la prueba de catalasa (Figura 16).

c. Variables

Variable independiente: zonas de estudio.

Variables dependientes: recuentos de bacterias *Azotobacter* sp.

d. Prueba estadística. Se realizó un ANVA en un diseño completo al azar con tratamientos de suelos cultivados de la región Puno, con variables independientes que fueron los tratamientos y variables dependientes que fue el recuento de bacterias *Azotobacter* sp. se realizaron cuatro repeticiones donde se formaron 12 unidades experimentales y se aplicó la prueba análisis de varianza y prueba de medidas Tukey con una confiabilidad al 95% y un error de 5%, las variables respuesta fueron los recuentos bacterianos de *Azotobacter* sp, los datos se procesaron con el paquete estadístico Infostat versión estudiantil 2016 para Windows. Previamente se realizó la prueba de Levene y Normalidad de datos, los cuales cumplieron con dichos supuestos siendo no significativos.

El modelo matemático que se utilizó fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

$i = 1, 2, \dots, t$ (tratamientos) y $j = 1, 2, \dots, r$ (repeticiones)

Donde:

Y_{ij} = observación en la j – ésima unidad experimental, sujeto al i – ésimo tratamiento.

t = efecto del i – ésimo tratamiento (suelos de 3 centros poblados).

μ = efecto de la media general o constante común.

ε_{ij} = efecto verdadero de la j – ésima unidad experimental (réplica), sujeta al i – ésimo tratamiento (error experimental).

3.5.2 Evaluación del efecto biofertilizante de la bacteria *Azotobacter* sp. en plántulas de trigo.

Según Novoa (1989), el rendimiento de un trigo sin usar fertilizante nitrogenado fue una medida del nitrógeno aportado por el suelo siempre que no haya algún factor limitante (agua, otro nutriente, malezas, enfermedades u otro), el nitrógeno constituye de un 1 a 2% de la materia seca del trigo y es el primer componente principal. La evaluación del efecto biofertilizante de las bacterias *Azotobacter* sp, se realizó durante la etapa vegetativa que duró entre 30 y 35 días aproximadamente, ya que esta etapa es apropiada para aplicar fuentes nitrogenadas de alto grado al suelo (Ceballo, 2012).

- a. **Inoculación de bacterias *Azotobacter* sp.** Se realizaron tres inoculaciones con diferentes concentraciones de 1.5×10^8 (Estándar McFarland 0.5) 3.0×10^8 (Estándar McFarland 1) y 9.0×10^8 UFC/ml (Estándar McFarland 3) en semillas de trigo (*Triticum aestivum*). La preparación de los inóculos con las diferentes concentraciones se realizó en un matraz con 75 ml de suero fisiológico previa

esterilización (Figura 14), donde se colocaron con el aza de siembra para cada una de las concentraciones, más no en el tratamiento control por estar con agua destilada.

b. Procedimientos

Preparación de concentraciones bacterias con el Estándar Mcfarland 0.5, 1 y 3

Fundamento. En Microbiología, los estándares de McFarland son usados como una referencia para ajustar la turbidez de suspensiones bacterianas hasta que el número de bacterias llegue al rango establecido, específicamente para identificación y pruebas de susceptibilidad. El patrón de McFarland más utilizado es al 0.5% y corresponde aproximadamente a una suspensión homogénea de 1.5×10^8 células bacterianas por ml (MDMCientífica, 2017).

Procedimientos:

1. Antes de su uso, se invirtió suavemente el tubo equivalente al patrón de McFarland varias veces, para asegurar uniformidad de la suspensión.
2. Se ajustó la turbidez con colonias de bacterias comparando con el patrón de McFarland equivalente según la técnica.
3. Se comparó la turbidez de la muestra con bacterias y el tubo del standard de McFarland 0.5, 1 y 3, contra un fondo de barras negras y blancas (Figura 15).

Se colocaron en frascos con arena los cuales fueron previamente esterilizados para que no se presente alteraciones en cuanto al crecimiento del trigo y no con suelo por que tiene microorganismos y esto alteraría al observar la reacción de la bacteria que se inoculo a las semillas (Figura 20).

El crecimiento de plántulas de trigo se evaluó luego de la inoculación con *Azotobacter* sp. por un lapso de un mes para su posterior evaluación de la longitud total de la plántula y la longitud de la raíz, desde la germinación hasta biométrica. (Figura 21).

Evaluación de parámetros biométricos. Se evaluó la longitud total de la planta, longitud de la raíz, de plántulas de trigo (*Triticum aestivum*) para evaluar el efecto que produjeron las bacterias *Azotobacter* sp. inoculadas en las plántulas. (Figur 22).

c. Variables

Variable independiente: concentraciones de bacterias *Azotobacter* sp.

Variables dependientes: longitud total y longitud de raíz de plántulas de trigo.

d. Prueba estadística. Se aplicó el diseño completo al azar para evaluar el efecto del biofertilizante de bacterias *Azotobacter* sp, con cuatro tratamientos, tres repeticiones donde se formaron nueve unidades experimentales y se aplicó la prueba análisis de varianza y prueba de medidas Tukey con una confiabilidad al 95% y un error de 5%. Las variables respuesta fueron las longitudes totales de las plántulas y sus raíces. Los datos se procesaron con el paquete estadístico Infostat versión estudiantil 2016 para Windows.

El modelo matemático que se utilizó fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

$i = 1, 2, \dots, t$ (tratamientos) y $j = 1, 2, \dots, r$ (repeticiones)

Donde:

Y_{ij} = observación en la j – ésima unidad experimental, sujeto al i – ésimo tratamiento.

t = efecto del i – ésimo tratamiento (concentraciones bacterianas).

μ = efecto de la media general o constante común.

ε_{ij} = efecto verdadero de la j – ésima unidad experimental (réplica), sujeta al i – ésimo tratamiento (error experimental).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Carga bacteriana de *Azotobacter* sp. en los centros poblados de Camicachi, Santa Rosa de Yanaque y Jayllihuaya

La carga bacteriana de *Azotobacter* sp cuantificada en los suelos evaluados, oscilaron entre los promedios de 142 UFC/g en suelos del centro poblado de Camicachi, 97 UFC/g en suelos del centro poblado de Santa Rosa de Yanaque y 95 UFC/g en suelos del centro poblado de Jayllihuaya. Los coeficientes de variación fueron mayores en suelos del centro poblado de Santa Rosa de Yanaque (21.13%) y menores en suelos de los centros poblados de Camicachi con 18.47% y en el centro poblado de Jayllihuaya fue de 14.33% (Tabla 1).

Tabla 1. Recuentos de bacterias *Azotobacter* sp (UFC/g) en campos de cultivo de suelos de tres centros poblados de la región Puno, abril – junio 2018.

Centros poblados	Recuento de <i>Azotobacter</i> sp				Promedio	C. V. (%)
	(x 10 ⁴ UFC/g)					
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4		
Camicachi	144	108	172	144	142	18.47
S. R. Yanaque	100	76	124	88	97	21.13
Jayllihuaya	84	100	84	112	95	14.33

Donde: Rep = repetición; C. V. = coeficiente de variación.

Fuente: Elaborado por el equipo de trabajo.

Según el análisis de varianza las cargas bacterianas en los tres suelos evaluados presentan diferencia estadística significativa ($F_c = 6.55$; $g_l = 2$; $P = 0.0175$), siendo

superior en suelos del centro poblado de Camicachi con un promedio de 142 UFC/g a los dos restantes suelos de Santa Rosa de Yanaque (97 UFC/g) y de Jayllihuaya (95 UFC/g) (Figura 3).

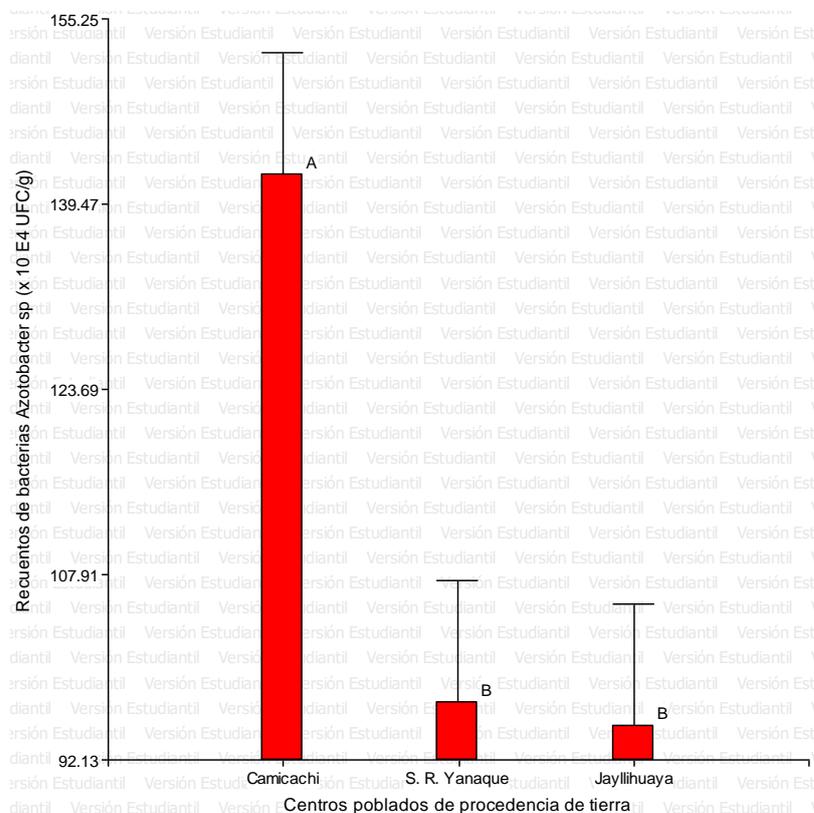


Figura 3. Prueba de Tukey de los recuentos de bacterias *Azotobacter* sp en suelos de tres campos de cultivo de centros poblados de la región Puno, abril – junio, 2018.

En la investigación, se logró aislar a *Azotobacter* sp, lo cual concuerda con lo obtenido por Flores *et al.* (2012), quienes obtuvieron un total de 6 aislamientos de bacterias aerobias fijadoras de nitrógeno asimbióticas, las cuales fueron de color crema, medianas, irregulares y brillantes, muy similares a las reportadas para el género *Azotobacter*, coincidiendo con la formación de quistes al observarlas al microscopio, ya que las bacterias del género *Azotobacter* cuando provienen del suelo se encuentran en un estado de resistencia a las condiciones ambientales (Vela, 1974).

Las muestras de suelo presentaron las siguientes características edafológicas, el porcentaje de arena osciló entre 68.60% (Camicachi) y 80.20% (S. R. Yanaque); el contenido de arcilla entre 8.40% (Jayllihuaya) y 15.10% (Camicachi); el porcentaje de limo fue entre 12.30% (Jayllihuaya) y 16.30% (Camicachi); la clase textural fue franco arenoso en Camicachi y arena franca en S. R. Yanaque y Jayllihuaya; el contenido de materia orgánica fue entre 0.95% (Jayllihuaya) y 2.15% (Camicachi); el contenido de nitrógeno total fue entre 0.04% (S. R. Yanaque) y 0.06% (Jayllihuaya); el pH varió entre 6.30 (Jayllihuaya) y 7.80 (S. R. Yanaque); la conductividad eléctrica osciló entre 0.11 mS/cm (Camicachi) y 0.16 mS/cm (S. R. Yanaque); el contenido de fósforo disponible fue entre 2.51 ppm (S. R. Yanaque) y 3.63 ppm (Jayllihuaya) y el contenido de potasio disponible fue entre 38 ppm (Jayllihuaya) y 64 ppm (Camicachi).

Los suelos con el mayor recuento bacteriano de *Azotobacter* sp, fueron los procedentes del centro poblado de Camicachi (Figura 3), con respecto a los demás suelos, lo cual se debería a la mayor presencia de materia orgánica (2.15%), un pH próximo a la neutralidad de 6.90 unidades, el mayor contenido de fósforo (P) disponible (3.63 ppm) y potasio (K) disponible (64 ppm), así como también en suelos franco arenosos, probablemente debido a que existe una buena circulación de agua, manteniendo la humedad, la oxigenación de los suelos y buen contenido de materia orgánica; dando a conocer de que los suelos del centro poblado de Camicachi serían abonados con estiércoles de ovinos, aves, vacunos y guano de isla, entre otros abonos orgánicos; asimismo el uso o aplicación de agroquímicos es menor con respecto a los demás centros poblados (Tabla 2).

Tabla 2. Evaluación de los parámetros edafológicos en suelos de tres de campos de cultivo, laboratorio de Aguas y Suelos – Facultad de Ciencias Agrarias, UNA Puno, julio – agosto 2018.

Parámetros edafológicos	Centros poblados			Promedio	C. V. (%)
	Camicachi	S. R. Yanaque	Jayllihuaya		
Arena (%)	68.60	80.20	79.30	76.03	8.50
Arcilla (%)	15.10	11.20	8.40	11.57	29.10
Limo (%)	16.30	8.60	12.30	12.40	31.10
Clase textural	Franco arenoso	Arena franca	Arena franca	No aplica	No aplica
Materia orgánica (%)	2.15	1.45	0.95	1.52	39.70
N total (%)	0.05	0.04	0.06	0.05	20.00
pH (unidades)	6.90	7.80	6.30	7.00	10.80
C. E. (mS/cm)	0.11	0.16	0.12	0.13	20.40
P disponible (ppm)	3.63	2.51	3.07	3.07	18.20
K disponible (ppm)	64	39	38	47.00	31.3

Fuente: Elaborado por el equipo de trabajo.

Sin embargo, Borda *et al.* (2009), obtuvo biofertilizantes en medio leche con una concentración celular de 4×10^{12} UFC/ml, las cuales fueron superiores a los obtenidos en ésta investigación, indicando que identificaron a bacterias *Azotobacter nigricans* con base en la caracterización fenotípica y genotípica, presentando mejor estabilidad, pigmentación, mayor velocidad de crecimiento de 0.1405/h en fase exponencial de 18 horas y una producción de AIA promedio de 38.4 mg/ml a las 150 horas; asimismo, concuerda con Córdova *et al.* (2009), quienes manifiestan que las poblaciones de *Azospirillum* y *Azotobacter* fueron aislados hasta profundidades de 59 y 110 cm,

respectivamente, los cuales oscilaron entre 42×10^4 y 11×10^5 UFC/g de suelo seco para *Azospirillum* y *Azotobacter*, respectivamente, superando los recuentos obtenidos en la investigación.

Según Goitia (2014), Ibarra (2010) y Córdova *et al.* (2009), las bacterias fijadoras de nitrógeno en suelos rizosféricos, identificaron bacterias vida libre *Stenotrophomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Serratia*, *Arthrobacter*, *Lysinibacillus*, *Bacillus* y *Tetrathiobacter*; en la presente investigación no se pudo obtener mayor diversidad bacteriana, debido probablemente a la carencia de raíces de plantas, ya que se colectaron las muestras en suelos en temporadas de otoño y en la región Puno, no se cultivan en esta temporada, en razón de que las raíces proveen de nutrientes a las bacterias diazótrofes incrementando su número (Atlas & Bartha, 2002).

Entre los factores que afectan disminuyendo los recuentos de bacterias *Azotobacter* sp en los suelos, es que poseerían altos niveles de NaCl (Ogata & Zúñiga, 2008), y otras sales debido probablemente al aumento de aplicación de agroquímicos en las temporadas de cultivo, ya que una solución del suelo que posee más sales que el medio interno de las células que constituyen las raíces, el agua tenderá a salir de estas últimas, causando sequedad fisiológica en las plantas y paralelamente los bajos recuentos bacterianos (Pernasetti, 2010), en la investigación se refleja valores de conductividad eléctrica (CE) que oscilan entre 0.11 y 0.16 mS/cm, el cual refleja la capacidad del suelo para conducir corriente eléctrica al aprovechar la propiedad de las sales en la conducción de esta; por lo tanto, la CE mide la concentración de sales solubles presentes en la solución del suelo.

El mayor recuento de bacterias *Azotobacter* sp se debería a las condiciones fisicoquímicas del suelo, coincidiendo con Arguello *et al.* (2016), quienes determinaron que en los suelos de la zona de muestreo Florilandia, el mayor recuento bacteriano, se dio a la presencia de riego por goteo, influyendo positivamente en la zona de rizósfera y en la planta, y este tipo de irrigación acelera la tasa de desarrollo de las plantas (Jadin & Jacquemart, 1978), la abundancia bacteriana se atribuye además, a que este cultivo fue el único abonado orgánicamente con humus líquido (Ormeño & Ovalle, 2011), el cual es una forma de aplicar nutrientes para las plantas y mejorar la calidad química de los suelos, con ello se favorecen las condiciones para preservar y fomentar la diversidad bacteriana de la zona de rizósfera.

Las menores poblaciones de bacterias *Azotobacter* sp fueron determinadas en suelos de los centros poblados de Jayllihuaya y de Santa Rosa de Yanaque, dichos resultados concuerdan con los manifestado por Arguello *et al.* (2016), que, en suelos de la zona de El Porvenir, reportaron valores de pH de 6.48 unidades, el pH ácido es un factor determinante en el número de bacterias, debido, a que estas poseen requerimientos de pH ácidos o ligeramente ácidos, de entre 5.5 – 6.2 para poder crecer. Por otro lado, Park *et al.* (2005) afirman que, en un laboratorio, el análisis del número y tipo de microorganismos identificados en estos medios brinda información valiosa acerca de la distribución de microorganismos potencialmente fijadores de nitrógeno en los diferentes sitios muestreados.

En este trabajo se realizó el aislamiento de bacterias del género *Azotobacter* sp en medios libres de nitrógeno para la identificación y posterior análisis de bacterias fijadoras de nitrógeno, donde la mayor riqueza en vegetación que se encuentra en los bosques,

concuerta con el mayor hallazgo de bacterias diazótrofes en el interior y en la superficie de las raíces de muchas gramíneas tropicales como es el caso de bacterias del género *Azospirillum* (Marín *et al.*, 1998), por consiguiente el cambio de vegetación y la presencia de gramíneas (*Brachiaria* sp.), pueda favorecer el establecimiento de bacterias aerobias y microaerófilas, esto debido a que las gramíneas mantienen un buen crecimiento radical a expensas del crecimiento de la parte aérea, puede adquirir nitrógeno mediante fijación asociativa (Dalton & Kramer 2006), éstas usan ambas formas de nitrógeno (nitrato y amonio) y, al igual que en otros suelos, toma fósforo y calcio mediante sistemas radicales extensos y asociaciones con micorrizas arbusculares (Rao *et al.* 1998).

En esta investigación se aislaron bacterias del género *Azotobacter* sp, estos resultados fueron desiguales a los mencionados por Cárdenas *et al.* (2010), quienes obtuvieron mayor cuantificación para bacterias del género *Azospirillum* sp. en el medio NFb, seguido de *Burkholderia* sp., debido a que los géneros bacterianos se establecen en las raíces de las plantas y en suelo subyacente y al parecer algunas raíces de determinadas plantas acogen en su rizósfera bacterias específicas, tales como *Burkholderia* sp., quien es precominante en cultivos como en el maíz (Perín *et al.*, 2006).

Es beneficioso el aislamiento de las bacterias diazótrofes, debido a que contribuyen al reciclaje de nutrientes por parte de las plantas (Taiz & Zeiger, 2006), estas bacterias, también biosintetizan y exudan hormonas vegetales como las auxinas, citoquininas y giberelinas, adaptándose y colonizando ambientes rizosféricos con mayor facilidad (Cárdenas *et al.*, 2010), la baja cuantificación en algunas parcelas evaluadas de las comunidades concuerda con Melloni *et al.* (2004), quien reportó que la población de este género se ve afectada por las condiciones del suelo, los tipos de vegetación y la época

climática en la cual se realicen los muestreos de los suelos.

4.2 Efecto biofertilizante de la bacteria *Azotobacter* sp. en plántulas de trigo

4.2.1 Efecto de las bacterias *Azotobacter* sp en la longitud total de plántulas de trigo

Las plántulas de trigo inoculadas con una concentración de bacterias *Azotobacter* sp de 9.0×10^8 células/ml, fueron las que resultaron con el mayor promedio de longitud total con 77.43 cm, seguido del efecto de la inoculación de 1.5×10^8 células/ml, con un promedio de 68.87 cm y de 60.87 cm al inocular con una concentración bacteriana de 3.0×10^8 células/ml (Tabla 3), todos los resultados de los tratamientos fueron superiores al tratamiento control, el cual solo se inocularon con suero fisiológico. Todos los recuentos bacterianos presentaron un coeficiente de variabilidad inferior al 15%, eso quiere decir que el promedio es representativo de los conjuntos de datos presentados en las repeticiones.

Tabla 3. Longitud total (cm) de plántulas de trigo inoculadas con bacterias *Azotobacter* sp, julio – agosto 2018.

Concentración del inoculante	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Prom	C. V. (%)
1.5×10^8 cel./ml	69.10	78.60	58.90	68.87	14.31
3.0×10^8 cel./ml	66.10	64.00	52.50	60.87	12.03
9.0×10^8 cel./ml	73.20	80.20	78.90	77.43	4.81
Control	60.00	55.80	57.90	57.90	3.63

Donde: Rep. = repetición y C. V. = coeficiente de variación.

Fuente: Elaborado por el equipo de trabajo.

Las longitudes totales de las plántulas inoculadas con bacterias *Azotobacter* sp en tres concentraciones diferentes, presentaron diferencias estadísticas significativas ($F_c =$

5.46; $gl = 3$; $P = 0.0245$), asimismo, el mayor promedio de longitud total de las plántulas de trigo se obtuvo cuando las semillas fueron inmersas en suero fisiológico con una concentración de 9.0×10^8 células/ml, seguidos de las concentraciones 1.5 y 3.0×10^8 células/ml y los menores promedios de longitud total de plantas se obtuvieron en el tratamiento control (Figura 4).

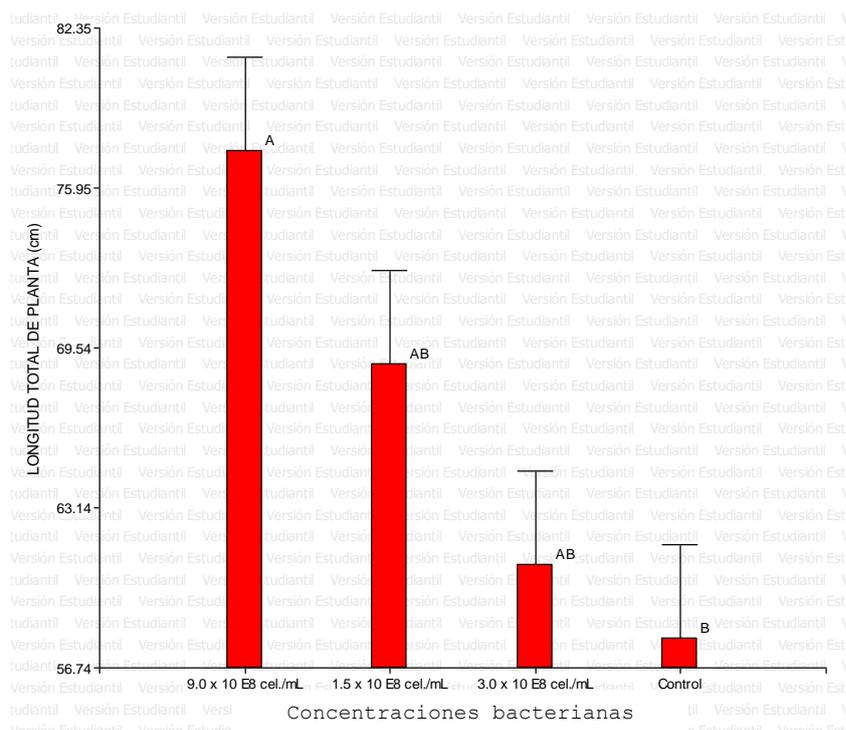


Figura 4. Prueba de Tukey de la longitud total de plántulas de trigo, en el laboratorio de Ecología, agosto 2018.

Las rizósferas de las plantas, cuenta con muchos organismos bacterianos capaces de estimular el crecimiento vegetal, lo cual concuerda con Orozco & Martínez (2009), quienes aislaron 151 cepas de bacterias aerobias aisladas de la rizósfera de *Pinus patula*, de las cuales 62 cepas fueron fijadoras de nitrógeno, entre dichas bacterias diazótrofes se mencionan a *Bacillus macerans* (35.5%), *Pseudomonas* sp (29%), *Enterobacter agglomerans* (22.6%) y *Azotobacter chroococcum* (12.9%), ante la inoculación de plántulas con *A. chroococcum* presentaron los mejores promedios en casi todos los

parámetros vegetales (altura con 18.7 cm, peso seco foliar con 37.4 g, peso seco radicular con 16.6 g, contenido de nitrógeno foliar con 0.72 g/planta), a excepción del peso seco radicular, la inoculación de semillas de trigo con una concentración bacteriana de *Azotobacter* sp de 9.0×10^8 cel./ml, ejerció los mejores crecimientos con respecto a la longitud total de las plántulas, lo cual concuerda con González (2015), quien luego de inocular *Azotobacter vinelandii* en semillas de maíz a los 60 y 90 días ejerció una mayor acción en el crecimiento e incremento de la altura de plantas con 96.3 y 189.6 cm respectivamente.

La inoculación de bacterias *Azotobacter* sp en semillas de trigo trae consigo el mejor crecimiento de plántulas, esto debido a que dichas bacterias producen auxinas y a las 24 horas de evaluación, producen la mayor cantidad de ácido indol acético (AIA) con 137.49 ug/ml (González, 2015) y Rodríguez (2011), el cual manifiesta que todos los aislamientos bacterianos pertenecientes a los géneros *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Raoultella* y *Ochrobactrum*, produjeron AIA en medio de cultivo TY (Medio Triptona), suplementado con triptófano en cantidades que van desde 1.77 ug/ml hasta 185 ug/ml, dichas moléculas son un grupo de fitohormonas que actúan como reguladoras del crecimiento vegetal, provocando la elongación de las células y se sintetizan en las regiones meristemáticas del ápice de los tallos y son muy aplicadas por los agricultores, logrando acelerar el crecimiento de las plantas, promoviendo la iniciación de raíces adventicias y es el componente activo de muchos preparados comerciales utilizados en la fruticultura para el enraizamiento de esquejes de tallos, promueve la floración y el cuajado de los frutos y evitar la caída prematura de los frutos.

Las bacterias del género *Azotobacter* sp, fueron aisladas en meses de abril – junio del año 2018, en suelos pos cosechados, según Obando *et al.* (2010), la densidad de bacterias en mención, muestran la densidad poblacional homogénea en las épocas climáticas analizadas lluvia y sequía, en tal sentido se infiere afirmando de que no hay influencia de la época climática en el establecimiento de las bacterias diazotróficas, dicho comportamiento se atribuye a características fisiológicas de los géneros diazotróficos, así como a su capacidad de modificar sus patrones metabólicos propios de cada género, al alterarse las condiciones edáficas, fundamentalmente la disponibilidad de carbono y nitrógeno, contenido de humedad, tensión de oxígeno, entre otros parámetros edáficos (Sadasivan & Neyra 1987), por otro lado, la eficiencia fotosintética, las exigencias nutricionales y la resistencia a condiciones desfavorables, entre otras características ligadas a la planta influye en la eficiencia de fijación de nitrógeno por las bacterias, y la diversidad genética de éstas diazotróficas viene relacionada con el genotipo de la planta (Combe *et al.*, 1994).

Las bacterias diazótroficas del género *Azotobacter* sp, aisladas e identificadas a partir de suelos, previo a la cosecha se encontrarían en el suelo rizosférico debido a que poseen una quimiotaxis con los exudados de las raíces, que influyen en la colonización de las bacterias en dicho hábitat (Schmid, 1991), tales como diversos azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos (Reinhold *et al.*, 1985), así como hacia compuestos aromáticos (López *et al.*, 1993) y exudados radicales (Gafny *et al.*, 1986); por otro lado, también sería a la capacidad de producir sideróforos por algunas cepas (Tapia *et al.*, 1992), ejerciendo efectos antagónicos contra otros microorganismos rizosféricos como los fitopatógenos (Caballero, 2000). Burdman *et al.* (2000), acota la posibilidad de que una proteína de la membrana externa de *Azospirillum* sp (otra bacteria diazótropa asimbiótica),

sea la responsable de la adherencia a las raíces de las plantas, también se ha reportado la aparición de material fibrilar que contribuye al anclaje de *Azospirillum* sp., a las raíces de diversas plantas de interés agrícola (Levanony *et al.*, 1991).

Por su parte León *et al.* (2012), corrobora con el presente estudio, ya que las plántulas inoculadas de tabaco tuvieron un grosor o diámetro del tallo y valores de masa fresca y seca adecuados, en nueces de cocotero inoculadas con *A. chroococcum*, se obtuvieron diferencias significativas en el crecimiento y desarrollo de las plántulas inoculadas en comparación con el testigo (Alvarado *et al.*, 2004), las cepas de *Azotobacter*, en relación con el crecimiento de las plántulas de tomate (La Torre & Zúñiga, 2009), mostraron un incremento significativo respecto al control, en altura, área foliar, peso seco radicular y peso fresco y seco aéreo.

4.2.2 Efecto de las bacterias *Azotobacter* sp en la longitud de la raíz de plántulas de trigo

Las plántulas de trigo inoculadas con una concentración de bacterias *Azotobacter* sp de 1.5×10^8 células/ml, fueron las que resultaron con el mayor promedio de longitud de raíces con 47.57 mm, seguido del efecto de la inoculación de 9×10^8 células/ml, con un promedio de 45.83 mm y de 42.93 mm al inocular con una concentración bacteriana de 3.0×10^8 células/ml (Tabla 4), todos los resultados de los tratamientos fueron superiores al tratamiento control, el cual solo se inocularon con suero fisiológico. Todos los recuentos bacterianos presentaron un coeficiente de variabilidad inferior al 20%, significando que el promedio es representativo de los conjuntos de datos mostrados en las repeticiones.

Las longitudes de las raíces de las plántulas inoculadas con bacterias *Azotobacter* sp en tres concentraciones diferentes, presentaron diferencias estadísticas significativas ($F_c = 8$; $g_l = 3$; $P = 0.0086$), asimismo, el mayor promedio de longitud de raíces de las plántulas de trigo se obtuvo cuando las semillas fueron inmersas en suero fisiológico con las tres concentraciones de 1.5 , 3 y 9.0×10^8 células/ml y los menores promedios de longitud total de plantas se obtuvieron en el tratamiento control (Figura 5).

Tabla 4. Longitud de raíces (cm) de plántulas de trigo inoculadas con bacterias *Azotobacter* sp, julio – agosto, 2018.

Concentración del inoculante	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Prom	C. V. (%)
1.5×10^8 cel./ml	50.20	38.00	54.50	47.57	17.99
3.0×10^8 cel./ml	39.30	48.00	41.50	42.93	10.54
9.0×10^8 cel./ml	41.00	52.50	44.00	45.83	13.01
Control	28.50	28.00	24.00	26.83	9.19

Donde: Rep. = repetición y C. V. = coeficiente de variación.

Fuente: Elaborado por el equipo de trabajo.

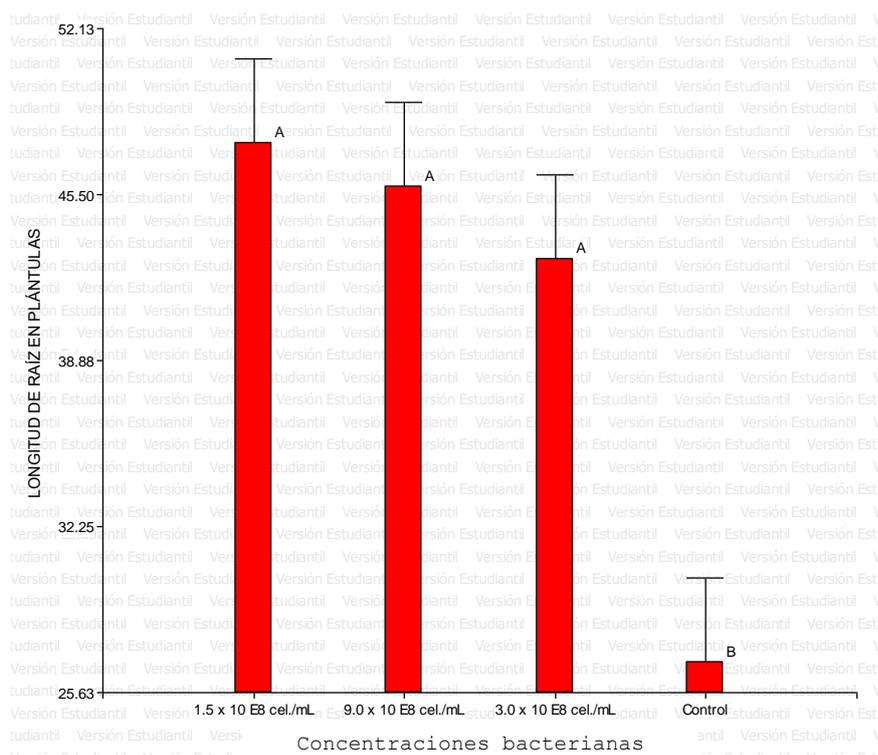


Figura 5. Prueba de Tukey de la longitud de raíz de las plántulas de trigo, en el laboratorio de Ecología, agosto 2018.

Los resultados obtenidos en la investigación manifiestan que las bacterias aisladas e inoculadas en las plántulas de trigo, estimularon el proceso de germinación y crecimiento de plántulas, lo cual concuerda con los mencionado por Bécquer *et al.* (2015), quienes al inocular bacterias rizosféricas *Sinorhizobium* y *Azospirillum* en trigo, lograron el incremento del contenido de clorofila y la longitud del tallo, peso seco aéreo y peso seco radical; asimismo, Carrillo *et al.* (2015), afirma que la inoculación en plantas de cilantro con bacterias diazótrofes muestra un efecto positivo en el crecimiento.

Similar resultado obtuvo Rodríguez (2015), donde la mejor longitud de raíz en tomate, alcanzó los 57 cm de largo con la inoculación de la cepa *Azospirillum* GCN1 con 50% de N, superando al testigo que obtuvo el peor resultado hasta con un 50%, al respecto Toniutti y Fornasero (2008) reportan resultados similares ya que *A. brasilense* incrementó

en el 82% la longitud radicular de las plantas de *Setaria lachnea* en comparación con las plantas no inoculadas, asimismo, Greer *et al.* (2004), afirman que especies de *Azospirillum brasilense* se encuentran asociadas con las raíces de muchos cultivos de importancia agrícola, como el trigo, el maíz y el arroz, promoviendo el crecimiento radicular de las plantas, por tanto poseen un gran potencial para el desarrollo de biofertilizantes, Cura *et al.* (2005), corroboran que al inocular semillas de arroz con *Azospirillum* produce un mayor enraizamiento de las plantas, lo cual les permite explorar una mayor superficie de suelo.

Las bacterias *Azotobacter* sp aisladas en la presente tesis, presentaron especificidad con las semillas de trigo ya que presentaron efectos en la germinación y crecimiento de plántulas, todo ello fue corroborado por Gutiérrez (2013), quien al inocular bacterias diazótrofes en variedades de maíz, demostraron la existencia de especificidad en la interacción cepa – variedad, aumentando la biomasa aérea de las plantas; las bacterias diazótrofes originaron un buen desarrollo vegetal en plántulas de trigo, lo cual concuerda con lo determinado por Maddonni *et al.* (2003), quienes lograron mejoras en el crecimiento de las plantas incrementando su biomasa y rendimiento en asociación con bacterias rizosféricas del género *Azospirillum*, por otro lado, minimizan los efectos nocivos de los organismos fitopatógenos, incrementan la fijación de nitrógeno atmosférico, la absorción de agua, nutrientes y producen fitorreguladores de crecimiento vegetal; asimismo, concuerda con lo manifestado por Constantino *et al.* (2011), al biofertilizar plántulas de papaya con bacterias *Azotobacter chroococcum* y micorrizas *Glomus intraradices*, incrementando el crecimiento, la biomasa y su nutrición luego de dos inoculaciones, en semillas y después en plántulas, 30 días después de la emergencia.

Las cepas nativas de *Azotobacter* sp estimularon un mejor desarrollo vegetativo de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate”, ya que biosintetizaron entre 7.10 a 57.99 mg/l de ácido indolacético (AIA), esta fitohormona natural estimularía el crecimiento de las plántulas, asimismo, pueden fijar entre 0.13 a 1.64 mg/l de nitrógeno en forma de amonio y presentó una eficiencia del 1.61% en solubilizar la roca fosfórica de Bayóvar, lográndose así el aumento de la altura y el volumen radicular (Escobar *et al.*, 2011); de similar forma León & Rojas (2015), evaluaron que *Azotobacter* sp, logró cuantificar 36.03 ppm de nitrógeno fijado como amonio, produjo 60.75 ppm de ácido indol acético (fitohormona) y 6.06 ppm de fósforo solubilizado, y presentó actividad antagónica contra hongos patógenos como *Fusarium verticillioides* debido a su actividad proteolítica y quitinolítica.

Pero muchas veces, las bacterias *Azotobacter chroococcum*, no presentaron efectos estimulantes del crecimiento de plántulas, lo cual se debería a que probablemente las bacterias no tendrían una especificidad en la estimulación de su crecimiento (Tang, 1995), así como también las raíces de las gramíneas no liberan sustancias nutritivas adecuadas para las bacterias del género *Azotobacter* (Atlas & Bartha, 2002), Las semillas de trigo inoculadas con las bacterias diazótrofes presentaron mejores resultados en los porcentajes de germinación y posterior crecimiento de los órganos de las plántulas, a pesar de que las bacterias *Azotobacter* sp son asimbióticas, las pectinasas y celulasas vienen a ser enzimas implicadas en los mecanismos de producción de las fitohormonas y otros metabolitos producidos por las bacterias, Hallman *et al.* (1997) por su lado propone que las enzimas pectinolíticas y celulolíticas producidas por las bacterias contribuyen a los procesos de infección en las plantas.

Las bacterias diazótrofes entre ellas *Azotobacter* sp, origina muchos beneficios en los suelos o campos de cultivo ya que producen sustancias estimuladoras del crecimiento, sideróforos y antibióticos, e inclusive inducen a la resistencia en la planta y la fijación del nitrógeno (Torriente, 2010), razón por la cual deben ser aisladas, identificadas mediante métodos confiables y así evaluar su capacidad como promotoras del crecimiento vegetal, constituyéndose en una buena alternativa para mejorar la nutrición y la calidad de los cultivos, lo que contribuye al mejoramiento del sistema planta – suelo – microorganismo (Tang, 1995), como también el genotipo vegetal; aunque, para verificar esto, deberían realizarse más repeticiones de los ensayos y que al inducir el crecimiento de la raíz principal y de las raíces laterales produce un aumento de la superficie de absorción de las plantas, lo que favorece el intercambio de nutrientes (Spaepen *et al.*, 2008).

V. CONCLUSIONES

- La carga bacteriana de *Azotobacter* sp. en el centro poblado de Camicachi presentó un promedio de 142×10^4 UFC/g de suelo, el centro poblado de Santa Rosa de Yanaque presentó un promedio de 97×10^4 UFC/g y el centro poblado de Jayllihuaya 95×10^4 UFC/g, todos los valores presentaron valores de dispersión leve y con diferencia estadística significativa ($F_c = 6.55$; $g_l = 2$; $P = 0.0175$).
- El efecto biofertilizante de la bacteria *Azotobacter* sp. estimuló el incremento de la longitud total de las plantas logrando valores de 77.43 cm con una concentración de 9.0×10^8 cel./ml ($F_c = 6.55$; $g_l = 2$; $P = 0.0175$) y la longitud de raíces de 47.57 cm con una concentración bacteriana de 1.5×10^8 cel./ml ($F_c = 8$; $g_l = 3$; $P = 0.0086$), superando a las longitudes de las plántulas del tratamiento control.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar la identificación molecular de las especies de bacterias diazótrofes del género *Azotobacter* sp. aisladas de los campos de cultivo de la región Puno.
- Para los investigadores biólogos y agrónomos, realizar experimentos sobre la obtención de presentaciones comerciales líquidas en concentraciones de 1.5×10^8 células/ml o sobre sustratos que contengan bacterias diazótrofes *Azotobacter* sp aisladas de suelos del altiplano peruano, con fines de obtener productos agropecuarios ecológicos de venta a los agricultores para su ulterior aplicación en sus campos de cultivo.

VII. REFERENCIAS

- Alvarado K., Blanco, A., Rodríguez, L.; González, R. & Abreu, N. (2004). Influencia de la concentración y forma de aplicación del *Azotobacter* en la germinación de nueces de cocotero (*Cocos nucifera*). Centro de Desarrollo de la Montaña.
- Argüello A. & Moreno L. (2014). Evaluación del potencial biofertilizante de bacterias diazótrofias aisladas de suelos con cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). Grupo de investigación en ciencias Biológicas- Majumba. Vol. 63 (3): 238 - 245.
- Arguello A., Madiedo N. & Moreno L. (2016). Cuantificación de bacterias diazótrofias aisladas de suelos cacaoteros (*Theobroma cacao* L.) por la técnica de Número Más Probable (NMP). Rev. Colomb. Biotecnol. Vol XVIII (2): 40 – 47.
- Atlas M. & Bartha R. (2002). Ecología microbiana y microbiología ambiental. Segunda Edición. Editorial Addison Wesley. Madrid – España. 217 – 218.
- Balandreau J. (1986). Ecological factors and adaptative processes in N₂ - fixing bacterial populations of the plant environment. *Plant Soil*, Vol. 90 (73).
- Bashan Y., Holguin G. & De Bashan L. (2004). *Azospirillum* - plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances. *Can. J. Microbiol.* Vol. 50 (521).
- Bécquer C., Lazarovits G., Nielsen L., Quintana M., Adesina M., Quigley L., Lalin I. & Ibbotson C. (2015). Efecto de la inoculación con bacterias rizosféricas y *Trichoderma* en trigo (*Triticum aestivum* L.). Rev. Pastos y Forrajes. Vol. 38 (1): 29 – 37.
- Biocultivos. (2018). Ficha técnica de *Azotobacter chroococcum*. Página web: <http://www.biocultivos.com.co/dctos/Ficha+Tecnica+Azotobacter+Chroococcum.pdf>. Fecha de revisión: 26 de setiembre del 2018.
- Borda D., Pardo J., Martinez M., Montaña J. (2009). Produccion de un biofertilizante a

- partir de un aislamiento de *Azotobacter nigricans* obtenido en un cultivo de *Stevia rebaudiana* Bert. *Universitarias Scientiarum*. Vol. 14 (1) : 71-78.
- Bruinsma J. (2003). *World agriculture: Towards 2015/2013 en FAO perspective*. . Rome.
- Burdman S., Jurkevitch E., Soria M., Gil A. & Okon Y. (2000). Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation. *FEMS Microbiol Lett*. Vol. 89: 259 – 264.
- Caballero J. (2000). El género *Azospirillum*: Universidad Nacional Autónoma de México. página web: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap10/>. Fecha de revisión: 16 de diciembre del 2018.
- Camacho A., Giles M., Ortigón A., Palao M., Serrano B., & Velásquez O. (2009). *Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos*. 2da Edición. Facultad de Química. UNAM. Mexico.
- Cárdenas D., Garrido M., Bonilla R. & Baldani V. (2010). Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. en pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) del Valle del Cesar. *Pastos y Forrajes*. Vol. 33(3): 11.
- Carrillo K., Colmenares A., Ramírez L., Moreno L. & Cárdenas D. (2015). Inoculación de cilandro (*Coriandrum sativum* L.) con rizobacterias en Villa del Rosario, Norte de Santander. *Revista Fac. Nal. Agr. Medellín – Colombia*. Vol. 68 (1): 7459 – 7470.
- Carvajal J. & Mera A. (2010). Fertilización biológica: técnica de vanguardia para el desarrollo agrícola sostenible. *Producción + Limpia*. Vol. 5 (2): 77.
- Ceballo C. (2012). Efecto de la inoculación de bacterias solubilizadoras de fósforo a través de bioencapsulados en trigo (*Triticum aestivum* L.). Tesis de Licenciatura en Ingeniería Agronómica, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. 68 p.

CEPES, Centro Peruano de Estudios Sociales. 2018. Manejo ecológico de suelos. Página web:

http://www.cepes.org.pe/pdf/OCR/Partidos/manejo_ecologico_de_suelos/manejo_ecologico_de_suelos-21.pdf. Fecha de revisión: 15 setiembre del 2018.

Combe M., Pons J., Sesboue R. & Martin J. (1994). Electrophoretic transfer from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: a new method to characterize multilocus enzyme genotypes of *Klebsiella* strains. *Appl Environ Microbiol.* Vol. 60 (1): 26 – 30.

Constantino M., Gómez R., Álvarez J., Pat J. & Espín E. (2011). Efecto de la inoculación de *Azotobacter chroococcum* y *Glomus intraradices* en el crecimiento y nutrición de plántulas de papaya en fase de vivero. *Agronomía Costarricense.* Vol. 35 (1): 15 – 31.

Córdova Y., Rivera M., Ferrera R., Obrador J., Córdova V. (2009). Detección de bacterias benéficas en suelo con banano (*Musa AAA Simmonds*) cultivar ‘Gran enano’ y su potencial para integrar un biofertilizante. *Universidad y ciencia.* Vol. 25 (3): 253-265.

Coyne M. (2000). *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio*. Madrid - España: Paraninfo.

Cura A., Ribaudó M., Gaetano M. & Ghiglione O. (2005). Utilidad de las bacterias promotoras del crecimiento y fijadoras de nitrógeno en el cultivo del arroz durante las primeras etapas de desarrollo. *Revista Foro Latinoamericano Arrocero*, 21, 10- 13.

Dalton A. & Kramer S. (2006). Plant-Associated Bacteria, p. 105-130. In S. S. Gnanamanickam (ed.). *Nitrogenfixing bacteria in non-legumes*. Springer, Dordrecht, Holanda.

Diario La Gestión. (2014). Producción nacional de trigo creció 1.8% entre el 2008 y 2013.

Página web: <https://gestion.pe/economia/produccion-nacional-trigo-crecio-1-8-2008-2013-7905?ref=gesr>. Fecha de revisión 15 de diciembre del 2018.

Domingo A. (2017). Cuaderno de laboratorio. Página web: <http://www3.uah.es/cuadernolab/p/index.php/tag/disoluciones/>. Fecha de revisión: 19 de noviembre del 2017.

Escobar C., Horna Y., Carreño C., & Mendoza G. (2011). Caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* spp. y su efecto en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill. "tomate" en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria - Universidad Nacional de Trujillo*. Vol. 2.

Espín G. (2016). *Biología de Azotobacter vinelandii*. Obtenido de Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de México.

Farajzadeh D., Yakhchal B., Aliasghar zad N. & Sokhandan N. (2009). Isolation and identification of micro - organisms in isolation media for Azotobacteria. *Unpublished*.

Fernández A., García de la Fuente C., Sáez J., Valdezate S. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica. ISBN-978-84-614-7932-0.

Fialho A., Zielinski N., Fett W., Chakrabartya A. & Berry A. (1990). Distribution of alginate gene sequenses in the *Pseudomonas* rRNA homology grupo I - Azomonas - *Azotobacter* lineage of superfamilia B procariotes. *Appl. Environ. Microbiolog.* Vol. 56: 436 - 443.

Flores A., Contreras J., Reyes M., Rodríguez R. (2012). Aislamiento e identificación de cepas nativas del suelo mexicano del género *Azotobacter*. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. Vol. 4 (8).

- Gafny R., Okon Y., Kapulnik Y. & Fischer M. (1986). Adsorption of *Azospirillum brasilense* to corn roots. *Soil Biol Biochem.* Vol. 18: 69 – 76.
- García de Salomone I., Di Salvo L., Escobar J., Boa P., Urquiaga S. & Teixeira K. (2010). Field response of rice paddy crop to *Azospirillum* inoculation: physiology of rhizosphere bacterial communities and the genetic diversity of endophytic bacteria in different parts of the plants. *Plant. Soil.*, 336, 351.
- García M., Farías R., Peña J., Sánchez J. (2005). Inoculación del trigo var. Pavon con *Azospirillum* spp. y *Azotobacter beijerinckii*. *Terra Latinoamericana.* Vol. 23 (1): 65-72.
- Goitia J. (2014). Aislamiento de bacterias diazotróficas en suelos de cultivo, virgen y humus de lombriz del distrito de Puno y su efecto in vitro en la germinación de la quinua (*Chenopodium quinoa* Wild). Tesis de Licenciatura. Escuela Profesional de Biología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano. Puno – Perú. 69 p.
- González J., Salmerón V., Martínez M., Ballesteros F. & Ramos A. (1986). *Producción de auxins, gibberellins and cytokinins by Azotobacter vinelandi ATCC12837.* España.
- González R. (2015). Aislamiento y caracterización de bacterias diazotróficas del género *Azotobacter* y su efecto sobre el crecimiento y desarrollo en maíz, variedad INIAP 182, en la estación experimental la Argelia. Tesis de Ing. Agrónomo, Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, Universidad Nacional de Loja. Loja – Ecuador. 102 p.
- Greer S., Stephens B. & Alexandre. (2004). An Energy Taxis Transducer Promotes Root Colonization by *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* 186 (19): 6595-6604.
- Gutiérrez P. (2013). Efecto de la inoculación con bacterias diazótroficas en plantas de maíz

- (*Zea mays* L.) de distintas variedades. Informe de investigación. Laboratorio de Microbiología Vegetal, Facultad de Agronomía, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Montevideo – Uruguay. 80 p.
- Hallmann J., Mahaffee F. & Klopper W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*. Vol. 914 (10): 895 – 914.
- Hartmann Z. & Zimmer W. (1993). *Physiology of Azospirillum*. In: *Azospirillum/plant Associations*. Boca Ratón: CRC Press.
- Hitchins V. & Sadoff H. (1970). Morphogénesis of cyst in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* Vol. 104: 492 - 498.
- Hitchins V. & Sadoff H. (1973). Sequential metabolic events during encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* Vol. 113: 1273 - 1279.
- Holt J. (2000). *Bergey's manual to determinative bacteriology*. Baltimor, Maryland, USA: Williams y Wilkins.
- Horan N., Jarman T. & Dawes E. (1983). Studies of some enzymes of aliginic acid biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* grown in continuous culture. USA.
- Ibarra Cl. (2010). Diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de suelo de Chinampa y su efecto en plantas de interés agrícola. Tesis de Maestría en Ciencias. 51 Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. México. 85 p.
- INEI, Instituto Nacional de Estadística e Informática. (2017). Compendio Estadístico Puno. Sistema Estadístico Nacional. Lima – Perú. 464 p.
- Jadin P. & Jacquemart P. (1978). Effet de l'irrigation sur la précocité des jeunes cacaoyers. *Café Cacao*. Vol. 22 (1): 31 – 35.
- Lara C., García L., Oviedo L. (2011). Efecto biofertilizante del preparado: residuos vegetales-bacteria nativa diazótrofa, sobre las variables biométricas en plántulas de

- Rhapanus sativus*. Revista Colombiana de Biotecnología. Vol. XIII (1):156-162.
- La Torre C. & Zúñiga D. (2009). Efecto de bacterias promotoras de crecimiento en la emergencia y desarrollo de plántulas de tomate (*Lycopersicum esculentum* miller) En: Memorias de la XXIV Reunión Latinoamericana de Rizobiología (XXIV RELAR) y I Conferencia Iberoamericana de Interacciones Beneficiosas Microorganismo-Planta-Ambiente (I IBEMPA) Solubilizadores de fósforo y PGPRs.
- Laura Y., Moreno Y. & Galvis F. (2013). Potencial biofertilizante de bacterias diazótrofes aisladas de muestra de suelo rizosférico. *Pastos y Forrajes*. Vol. 36 (1).
- León Y., Hernández J., Rodríguez N. & Martínez R. (2012). Aplicación de *Azotobacter chroococcum* en la producción de plántulas de tabaco negro. *Cultivos tropicales*. Vol 33 N° 2.
- León L. & Rojas L. (2015). Determinación del potencial promotor del crecimiento vegetal de *Azotobacter* spp. aislados de la rizósfera de malezas en cultivos de maíz (*Zea mays* L.) *Scientia Agropecuaria*. Vol. 6 (4): 247 – 257.
- Levanony H. & Bashan Y. (1991). Active attachment of *Azospirillum brasilense* to rootsurface of non-cereal plants and to sand particles. *Plant Soil*. Vol. 137 (1): 91 – 97.
- Lin L. & Sadoff H. (1968). *Encystment and polymer production of Azotobacter vinelandii in the presence of B - hidroxibutirato*. Londres.
- Lizárraga I. (2015). Rendimiento y caracterización agronómica de 50 líneas elite de trigo de primavera (30 TH – ESWYT) procedentes del CIMMYT – México en la E. E. A. “El Mantaro, Tesis de Licenciatura en Ing. Agronómica, Facultad de Agronomía Universidad Nacional del Centro del Perú. Huancayo – Perú. 73 p.

- López G. & Lovell C. (1993). Chemotactic behavior of *Azospirillum* species to aromatic compounds. *Appl Environ Microbiol.* Vol. 59: 2951 – 2955
- Maddonni G., Ruíz R., Vilariño P. & Garía I. (2003). Capítulo 17: Dinámica de los nutrientes en el sistema Suelo – Planta. En *Producción de Granos. Bases funcionales para su manejo.* Editorial Facultad de Agronomía. p. 469 – 479.
- Marín V., Baldani V., Dos Santos K. & Baldani J. (1998). Fijación biológica de nitrógeno: bacterias fijadoras de nitrógeno de importancia para la agricultura tropical. *Embrapa - Agrobiología, Seropedica, Río de Janeiro, Brasil.*
- Mayea S., Carone M., Novo R., Boado I., Silveria E., Soria M. & Valiño A. (1998). *Aplicaciones de la Microbiología Agropecuaria.* Cuba: Félix Valre.
- MDMCientífica. (2017). Técnica de McFarland. Página web <http://mdmcientifica.com/wp-content/uploads/2017/07/Patr%C3%B3n-McFarland-05072017-O-P.PD-311-INSERTO-05072017-MDM-cient%C3%ADfica.pdf>. Fecha de revisión: 15 de julio 2018.
- Melloni R., Nóbrega R., Moreira F. & Siqueira J. (2004). Densidade e diversidade fenotípica de bacterias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxite, em reabilitação. *Revista Brasileira de Ciência do Solo.* Vol. 28 (1): 85 – 93.
- Montenegro S., Gómez S. & Barrera S. (2017). Efecto de la gallinaza sobre *Azotobacter* sp., *Azospirillum* sp. y hongos micorrízicos arbusculares en un cultivo de cebolla (*Allium fistulosum*). *Rev. Entramado.* Vol. 13 (2): 250 - 257.
- Moreno L. & Galvis F. (2013). Potencial biofertilizante de bacterias diazótrofes aisladas de muestras de suelo rizosférico. *Grupo de Investigación Majumba.* Vol. 36 (1): 33-37.
- Nour S., Cleyet J., Beck D., Effosse A. & Fernandez M. (1994). Genotypic and phenotypic diversity of *Rhizobium* isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.).

Can. J. Microbiol. Vol. 40: 345 - 354.

Novoa R. (1989). Fertilización del cultivo de trigo. IPA La Platina. Página web:
<file:///C:/Users/Alex/Downloads/Documents/NR08660.pdf>. Fecha de revisión: 28

de diciembre del 2017.

Obando D., Burgos L., Rivera D., Rubiano M., Divan V. & Bonilla R. (2010).

Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al Eucalipto

(*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, César (Colombia). *Acta Biol. Colomb.* Vol. 15 (3):

107

Ogata K. & Zúñiga D. (2008). Estudio de la microflora de la rizósfera de *Caesalpinia*

spinosa en la provincia de Huánuco. *Revista Zonas Áridas.* Vol. 12 (1): 191 – 208.

Ormeño M. & Ovalle A. (2011). Efecto de la aplicación de abonos orgánicos en la calidad

química de los suelos cacaoteros y el crecimiento de las plántulas en vivero. Ed.

Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, INIA, Mérida. En: Memorias

XIX Congreso Venezolano de la Ciencia del Suelo. 6 p.

Orozco C. & Martínez P. (2009). Evaluación de la inoculación con microorganismos

fijadores de nitrógeno asimbióticos aislados de la rizósfera de *Pinus patula* en

Colombia. *Revista Bosque.* Vol. 30 (2): 70 – 77.

Page W. & Shivprasad D. (1991). *Azotobacter salinestrus* sp nov., a sodium - dependent,

microaerophili, and aeroadaptative nitrogen fixing bacterium. *J. Syst. Bacteriol.*

Vol. 41: 369 - 376.

Park M., Kim C., Yang J., Lee J., Shin W., Kim S. & Ta S. (2005). Isolation and

characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of

agricultural crops of Korea. *Microb. Res.* Vol. 160: 127 – 133.

Perín L., Martínez L., Castro R., Estrada P., Cabellos T., Guedes H., Resi V. & Caballero,

J. (2006). Diazotrophic Burkholderia Species Associated with Field-Grown Maize

- and Sugarcane. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 72 (5): 3103 – 3110.
- Pernasetti O. (2010). Cátedra de salinidad y sodicidad de los suelos. Catamarca Argentina: Universidad Nacional de Catamarca. 56 p.
- Perrig D., Boiero L., Masciarelli O., Penna C., Ruíz O., Cassan F. & Luna V. (2007). Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75, 1143 - 1150.
- Piscoya E. & Ugaz Z. (2016). Efecto de *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Enterobacter* spp. nativas con 50% de fertilizante químico en el desarrollo vegetativo y rendimiento de *Zea mays* L. “maíz” amarillo duro en Lambayeque, 2013. Tesis para título de Lic. en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo. Lambayeque – Perú. 102 p.
- Popescu A. & Doyle RJ. (1996). The Gram stain after more than a century. *Biotech Histochem*. Vol. 71: 145-151.
- Ramos F. (1992). Genética de la regulación de la asimilación de nitrato en *Azotobacter vinelandii*. Sevilla – España.
- Rao M., Kerridge P. & Macedo M. (1998). Requerimientos nutricionales y adaptación a los suelos ácidos de especies de *Brachiaria*. CIAT. *Brachiaria: biología, agronomía y mejoramiento*. Cali, Valle del Cauca, Colombia.
- Rao NS. (1999). *Soil microorganisms and plant growth*. Oxford and IBH Publ. New Delhi, India. 407 p.
- Reinhold B., Hurek T. & Fendrik I. (1985). Strain-specific chemotaxis of *Azospirillum* spp. *J. Bacteriol*. Vol. 162: 190 – 195.
- Rico M. (2009). Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género

- Azotobacter* y Actinomicetos aislados de cultivo de *Solanum tuberosum* Linnaeus, 1753 (papa) cultivados en zonas altoandinas del Perú. Tesis de Biólogo. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú. 152 p.
- Rodríguez M. (2015). Efecto de rizobacterias *Azotobacter*, *Acetobacter* y *Azospirillum* sp, sobre plántulas de Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) Tesis de Ing. Agrónomo en Producción, Departamento de Fitomejoramiento, División de Agronomía, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Coahuila – México. 65 p.
- Romero M. & Gómez L. (2003). Cultivo de trigo en el Perú: Recomendaciones para su cultivo. Serie Divulgativa, Universidad Nacional Agraria La Molina. 29 p.
- Sadasivan L. & Neyra C. (1987). Cyst production and brown pigment formation in aging cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 29145. J. Bacteriol. Vol. 169 (4): 1670 – 1677.
- Santos M., Santos M., Cárdenas D. (2006). Aislamiento e identificación de microorganismos con potencial biofertilizante de suelos arroceros del distrito de Riego del río Zulia, norte de Santander. Ingenieras de producción biotecnológica. Vol. 11(2): 5 - 13.
- Schmid M., Baldani J. & Hartmann A. (2006). The genus *Herbaspirillum*. En: Balows A, Tripper H, Dworking M, Harder W, Scheleider K. The prokaryotes. Springer - Verlag. Part 1, New York, USA. Vol. 3: 1141 – 1150. Disponible en: <http://www.bashanfoundation.org/schmid/schmidherbaspirillum.pdf>.
- Spaepen S., Dobbelaere S., Croonenborghs A. & Vanderleyden J. (2008). Effects of *Azospirillum brasilense* índole – 3 – acetic acid production on inoculated wheat plants. Plant Soil. Vol. 312: 15 – 23.

- Taiz L. & Zeiger E. (2006). Fisiología vegetal. Plant physiology. 4th ed. Sunderland, MA. Sianuer Associates Inc. 1338 p.
- Tang M. (1995). Efecto de la inoculación con *Azotobacter chroococcum* en la germinación y altura de las plántulas en dos leguminosas y dos gramíneas. Revista de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes. Vol. 18 (2).
- Tapia A., Mascarúa M. & Caballero J. (1992). Production of bacteriocins and siderophore- like activity by *Azospirillum brasilense*. Microbios. Vol. 64: 73 – 83.
- Tejera N., Lluch C., Martínez M. & González J. (2005). Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant and Soil*. Vol. 27.
- Toniutti M. & Fornasero V. (2008). Efecto de la inoculación de *Azospirillum brasilense* sobre el crecimiento y desarrollo de *Setaria Lachnea* (Nees) Kunth. Revista FAVE- Ciencias Agrarias, 7 (1-2):33-41.
- Torriente D. (2010). Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de la caña de azúcar. *Perspectivas de su uso en Cuba*. Vol. 31 (19).
- Vela, G. (1974). Survival of *Azotobacter* in dry soil. *Appl. Microbiol.* Vol. 28: 77 - 79.
- Villarreal k. (2000). Efectos de la Producción del Trigo (*Triticum aestivum* L) en el mundo, México y en la región 5 manantiales. México. Página web: [file:///D:/EFECTOS%20DE%20LA%20PRODUCCION%20DEL%20TRIGO%20\(Triticum%20aestivum%20L.\)%20EN%20EL%20MUNDO,%20MEXICO%20Y%20EN%20LA%20REGION%205%20MANANTIALES.pdf](file:///D:/EFECTOS%20DE%20LA%20PRODUCCION%20DEL%20TRIGO%20(Triticum%20aestivum%20L.)%20EN%20EL%20MUNDO,%20MEXICO%20Y%20EN%20LA%20REGION%205%20MANANTIALES.pdf). Fecha de revisión: 27 de diciembre del 2017.
- Zhang Z., Schwartz S., Wagner L. & Miller W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* Vol. 7: 203 - 214.

ANEXOS

Anexo 1. Galería de fotos.



Figura 6. Toma de muestras de suelos en los centros poblados de Camicachi (izquierda), Santa Rosa de Yanaque (centro) y Jayllihuaya (derecha), abril – junio, 2018.



Figura 7. Muestras de los suelos colectadas en suelos de tres centros poblados y trasladadas al laboratorio, abril – junio 2018.

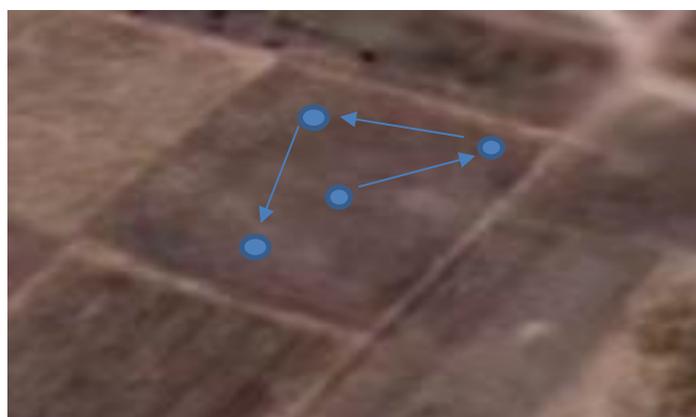


Figura 8. Diseño de toma de muestras de suelo al azar en los tres centros poblados, abril – junio 2018.



Figura 9. Procedimiento de las concentraciones de la muestra de suelo de tres centros poblados, abril – junio 2018.



Figura 10. Placas Petri con medio de cultivo Ashby sin indicador de pH, preparado en el laboratorio de análisis microbiológicos, abril – junio 2018.



Figura 11. Placa Petri con colonias transparentes en medio de cultivo Ashby con indicador de pH – azul de bromotimol, abril – junio 2018.



Figura 12. Placa Petri con agar nutritivo donde se observa a la colonia de *Azotobacter* sp con un borde azulino (círculo rojo), abril – junio 2018.



Figura 13. Observación de láminas de coloración Gram al microscopio en el laboratorio de análisis microbiológico, abril – junio 2018.

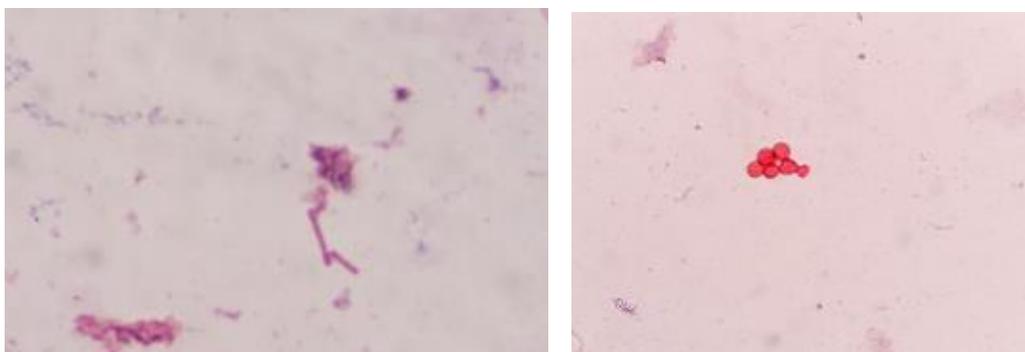


Figura 14. Bacilos Gram negativos (izquierda) y cocobacilos Gram negativos (derecha) con formación de quistes, abril – junio 2018.

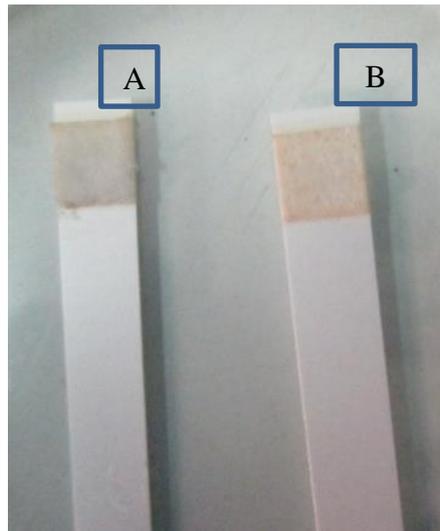


Figura 15. Prueba de la oxidasa positiva (A) y negativa (B) de *Azotobacter* sp en el laboratorio de análisis microbiológico, abril – junio 2018.



Figura 16. Prueba de la catalasa positiva en dos colonias de *Azotobacter* sp, abril – junio 2018.



Figura 17. Soluciones de suero fisiológico conteniendo bacterias *Azotobacter* sp, para inocular a las semillas de trigo, julio 2018.



Figura 18. Estándares 0.5, 1 y 3, utilizados en la investigación (izquierda) comparando el tubo de bacterias con el estandar de McFarland correspondiente (derecha), julio, 2018.



Figura 19. Inmersión de semillas en soluciones de suero fisiológico conteniendo bacterias *Azotobacter* sp, julio 2018.



Figura 20. Frasco con arena donde se colocaron las semillas ya inoculadas con las bacterias para su posterior crecimiento.

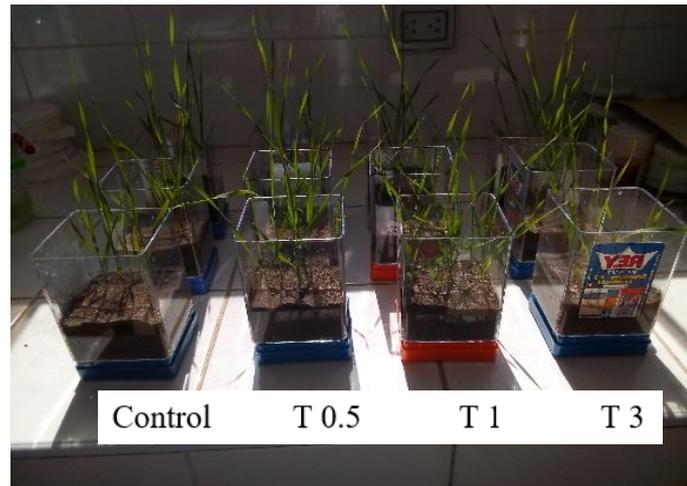


Figura 21. Crecimiento del trigo a un mes de inoculación con bacterias *Azotobacter* sp, agosto 2018 (T 0.5 = 1.5×10^8 células/ml; T 1 = 3×10^8 células/ml; T 3 = 9×10^8 células/ml).



Figura 22. Medición de las plántulas de trigo, en el laboratorio de Ecología, agosto, 2018.

Anexo 2. Constancia de laboratorio donde se realizó el aislamiento bacteriano.**CONSTANCIA**

HERBERT LARRY FLORES REATEGUI, GERENTE DEL LABORATORIO ORION

HACE CONSTAR QUE:

La Srta. MARILUZ ESCALANTE MARON Bachiller de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano Puno, ha realizado su trabajo de investigación en nuestro laboratorio cuyo título de tesis fue: "Evaluación del potencial biofertilizante de bacterias *Azotobacter sp.* aisladas de suelos cultivados de la región Puno y su efecto en plántulas de trigo (*Triticum aestivum*) 2018", realizado entre los meses de abril a junio del 2018.

Se expide la presente constancia a solicitud escrita de la interesada para los fines que crea por conveniente, no válida para asuntos legales.

Puno, julio 04 del 2018

Dr. Herbert Larry Flores Reategui
 GERENTE
 CBP 4441

Anexo 3. Constancia de laboratorio donde se realizó los cultivos de las plántulas.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LABORATORIO DE ECOLOGÍA ACUÁTICA

Reconocido por resolución N° 2787-2017-R-UNA

Reconocido por la SUNEDU N° 101-2017-SUNEDU/CD



“Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional”

CONSTANCIA

**EL QUE SUSCRIBE JEFE DEL LABORATORIO DE ECOLOGÍA ACUÁTICA
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNA – PUNO.**

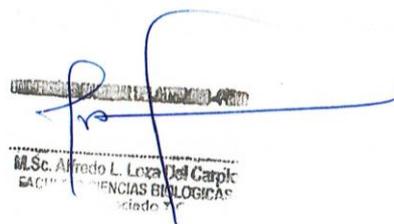
HACE CONSTAR:

Que la Bachiller, Mariluz Escalante Marón, egresada de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano ha realizado su trabajo de investigación titulada “**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOFERTILIZANTE DE BACTERIAS *Azotobacter sp.* AISLADAS DE SUELOS CULTIVADOS DE LA REGION PUNO Y SU EFECTO EN PLANTULAS DE TRIGO (*Triticum aestivum*) 2018**”. Realizado en los meses de julio y agosto del 2018.

Se emite la presente constancia a solicitud de la interesada para los fines que se estime por conveniente.

Puno, 24 de septiembre del 2018.

Atentamente



M.Sc. Alfredo L. Loza Del Campo
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNA - PUNO

Anexo 4. Informe de los resultados de análisis de suelos.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO – PUNO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
LABORATORIO DE AGUAS Y SUELOS



ANALISIS DE FERTILIDAD DE SUELOS

PROCEDENCIA : C. P. Santa Rosa de Yanaque Dist. de Acora, C.P. Camicachi Dist. de Ilave y C.P. Jayllihuaya Distrito y Departamento de Puno.
 INTERESADO : Bach. Marilúz ESCALANTE MARON
 MOTIVO : Análisis Fertilidad de suelos
 MUESTREO : 24/07/2018 (por la interesada)
 ANÁLISIS : 25707/2018
 LABORATORIO : Agua y Suelo FCA – UNA
 FECHA :

# ORD	CLAVE DE CAMPO	ANALISIS MECANICO			CLASE TEXTURAL	CO ₃ ^m %	M.O. %	N. TOTAL %
		ARENA %	ARCILLA %	LIMO %				
01	C. P. Santa Rosa de Yanaque Dist. de Acora	80.20	11.20	8.60	Arena Franca	0.00	1.45	0.04
02	C.P. Camicachi Dist. de Ilave	68.60	15.10	16.30	Franco arenoso	0.00	2.15	0.05
03	C.P. Jayllihuaya Distrito Puno	79.30	8.40	12.30	Arena Franca	0.00	0.95	0.06

# ORD	pH	C.E. mS/cm	C.E. (e) mS/cm	ELEMENTOS DISPONIBLES		CATIONES CAMBIABLES					CIC me/100 g	S.B. %
				P ppm	K ppm	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺	Al ³⁺		
						me/100 g suelo						
01	7.80	0.16	0.80	2.51	39	NC	NC	NC	NC	0.00	NC	NC
02	6.90	0.11	0.55	3.63	64	NC	NC	NC	NC	0.00	NC	NC
03	6.30	0.12	0.60	3.07	38	NC	NC	NC	NC	0.00	NC	NC

FAR = Franco arcillo arenoso
 Ar = Arcilloso
 FAR = Franco arcillo arenoso
 CIC = Capacidad Intercambio Cationico
 N = Nitrógeno total
 K⁺ = Potasio cambiante
 A = Arena
 Ca²⁺ = Calcio cambiante
 Na⁺ = Sodio cambiante
 CO₃^m = Carbonatos
 me = miliequivalente.

FAR = Franco arcilloso
 M.O. = Materia orgánica
 P = Fósforo disponible
 K = Potasio disponible
 C.E. = Conductividad eléctrica
 SB = Saturación de bases
 Mg²⁺ = Magnesio cambiante
 mS/cm = milisiemens por centímetro
 C.E.(e) = Conductividad eléctrica del extracto
 Al³⁺ = Aluminio cambiante
 NC = no corresponde

Analista: *[Signature]*
 Ing. M.S. Daniel Canaza Mamani
 Ing. M.S. Daniel Canaza Mamani
 Ing. M.S. Daniel Canaza Mamani

Ing. M.S. Daniel Canaza Mamani
 Ing. M.S. Daniel Canaza Mamani
 Ing. M.S. Daniel Canaza Mamani