



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



**BACTERIAS DIAZÓTROFAS DEL GÉNERO *Azotobacter* Y SU  
EFECTO EN EL CRECIMIENTO DE QUINUA (*Chenopodium  
quinoa* WILLD.) HASTA LA FASE DE RAMIFICACIÓN EN  
CONDICIONES DE LABORATORIO**

**TESIS**

**PRESENTADA POR:**

**Bach. ROXANA IRQUINIGO QUENTA**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

**PUNO - PERÚ**

**2019**



## DEDICATORIA

- A Dios, por darme la fuerza para ser perseverante en mis metas trazadas.
- Con amor y eterna gratitud a mis padres, por su comprensión, paciencia, sacrificio y apoyo incondicional.
- A mis amigos con quienes compartí alegrías y muchas emociones con su amistad incondicional, que nunca olvidaré.

*Roxana Irquinigo Quenta*



## AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, por haberme inculcado conocimientos académicos y científicos para mi futuro profesional.
- A los docentes del Programa de Microbiología y Laboratorio Clínico de la Escuela Profesional de Biología, quienes me brindaron sus sabias enseñanzas, durante mi formación profesional.
- Al director de la presente tesis, por sus consejos de dirección y asesoramiento en el trabajo de investigación.
- A los miembros del jurado por su comprensión y colaboración para la culminación del presente estudio.
- A mi familia.
- Finalmente agradezco a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron en la realización de la presente investigación.

*Roxana Irquinigo Quenta*



# ÍNDICE GENERAL

**DEDICATORIA**

**AGRADECIMIENTOS**

**ÍNDICE GENERAL**

**ÍNDICE DE FIGURAS**

**ÍNDICE DE TABLAS**

**ÍNDICE DE ACRÓNIMOS**

**RESUMEN ..... 10**

**ABSTRACT..... 11**

## **CAPÍTULO I**

### **INTRODUCCIÓN**

**1.1 OBJETIVO GENERAL..... 13**

**1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... 13**

## **CAPÍTULO II**

### **REVISIÓN DE LITERATURA**

**2.1 ANTECEDENTES ..... 15**

**2.2 MARCO TEÓRICO..... 18**

2.2.1 Rizosfera ..... 18

2.2.2 Bacterias diazotróficas ..... 19

2.2.3 *Azotobacter* sp..... 21

2.2.4 Procesos metabólicos de la fijación biológica ..... 24

2.2.5 Organización y estructura de la nitrogenasa ..... 25

2.2.6 Inoculación de bacterias *Azotobacter* en el desarrollo de las raíces ..... 26

2.2.7 Quinoa (*Chenopodium quinoa* Wild.)..... 29

2.2.8 Fisiología de la germinación y el crecimiento vegetal..... 29

## **CAPÍTULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

**3.1 ZONA DE ESTUDIO ..... 32**

**3.2 TIPO DE ESTUDIO..... 32**

**3.3 POBLACIÓN Y TAMAÑO DE MUESTRA ..... 33**

**3.4 METODOLOGÍA ..... 33**

3.4.1 Evaluación del recuento de bacterias diazótrofes en suelos de las



localidades de Jayllihuaya, Mañazo y Huancané.....	33
3.4.2 Evaluación el efecto de la inoculación de las bacterias diazótrofes en la germinación y la longitud de raíces y tallos de plantas de quinua hasta la etapa de ramificación en condiciones de laboratorio. ....	35

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

<b>4.1 CARGA BACTERIANA DIAZÓTROFAS DEL GÉNERO <i>Azotobacter</i> EN SUELOS DE LAS LOCALIDADES DE JAYLLIHUAYA, MAÑAZO Y HUANCANÉ .....</b>	<b>40</b>
<b>4.2 EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE LAS BACTERIAS DIAZÓTROFAS DEL GÉNERO <i>Azotobacter</i> EN LA GERMINACIÓN Y LA LONGITUD DE RAÍCES Y TALLOS DE PLANTAS DE QUINUA HASTA LA FASE DE RAMIFICACIÓN EN CONDICIONES DE LABORATORIO.....</b>	<b>45</b>
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>54</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>55</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>66</b>

**FECHA DE SUSTENTACIÓN: 26 de julio del 2019.**

**Área:** Ciencias Biomédicas.

**Línea:** Diagnóstico y Epidemiología.



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Genes implicados en el flujo de electrones hacia el sitio activo de la nitrogenasa para la reducción del N <sub>2</sub> (Baca et al., 2000). .....	26
<b>Figura 2.</b> Preparación de muestras y diluciones. ....	34
<b>Figura 3.</b> Quinua cultivar Salcedo INIA certificada por INIA utilizada en la investigación. ....	37
<b>Figura 4.</b> Colonias de bacterias <i>Azotobacter</i> en suelos de campos de cultivo de Mañazo, enero – marzo del 2019. ....	41
<b>Figura 5.</b> Prueba de Tukey de recuentos de bacterias <i>Azotobacter</i> en las zonas de muestreo de Jayllihuaya, Mañazo y Huancané, enero – marzo del 2019. ...	42
<b>Figura 6.</b> Prueba de T para los porcentajes de germinación en semillas de quinua inoculadas y no inoculadas, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, abril – junio 2019. ....	46
<b>Figura 7.</b> Efecto de la inoculación de <i>Azotobacter</i> sp en el crecimiento de plantas de quinua, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, abril - junio 2019.....	49
<b>Figura 8.</b> Prueba de T para las longitudes de raíces en plantas de quinua inoculadas y no inoculadas, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, abril – junio 2019. ....	50
<b>Figura 9.</b> Prueba de T para las longitudes de tallos en plantas de quinua inoculadas y no inoculadas, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, abril – junio 2019. ....	51
<b>Figura 10.</b> Compuestos químicos utilizados para preparar el medio mineral sin nitrógeno para el aislamiento de bacterias <i>Azotobacter</i> sp. ....	66
<b>Figura 11.</b> ANDEVA y prueba de Tukey de recuento de bacterias <i>Azotobacter</i> sp en las zonas de muestreo de Jayllihuaya, Mañazo y Huancané, enero – marzo, 2019.....	66
<b>Figura 12.</b> Prueba de T de la germinación de semillas de quinua inoculadas con bacterias <i>Azotobacter</i> sp y no inoculadas, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, abril - junio 2019.....	66
<b>Figura 13.</b> Prueba de T de las longitudes de raíces de plantas de quinua inoculadas con bacterias <i>Azotobacter</i> sp y no inoculadas, Laboratorio de	



Microbiología de los Alimentos, abril - junio 2019.....	67
<b>Figura 14.</b> Prueba de T de las longitudes de tallos de plantas de quinua inoculadas con bacterias <i>Azotobacter</i> sp y no inoculadas, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, abril - junio 2019.....	67
<b>Figura 15.</b> Batería de reactivos para realizar la tinción Gram. ....	67
<b>Figura 16.</b> Tinción de frotices de extendidos de bacterias diazótrofes.....	68
<b>Figura 17.</b> Cultivo puro de <i>Azotobacter</i> sp en medio mineral sin nitrógeno, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, enero – marzo 2019.....	68
<b>Figura 18.</b> Preparación de soluciones inoculantes de bacterias <i>Azotobacter</i> sp mediante la técnica de McFarland. ....	68



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Carga bacteriana de <i>Azotobacter</i> sp ( $\times 10^4$ UFC/g suelo) en campos de cultivo de las zonas de muestreo Jayllihuaya, Mañazo y Huancané, enero – marzo, 2019.....	40
<b>Tabla 2.</b> Germinación (%) de veinte semillas de quinua, cinco días después de ser inoculadas con $1.5 \times 10^8$ células/ml de <i>Azotobacter</i> sp y sin inoculación, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, abril – junio 2019.....	46
<b>Tabla 3.</b> Longitudes de tallo y raíz (cm) de plantas de quinua, cuarenta días después de ser inoculadas con $1.5 \times 10^8$ cél./ml de <i>Azotobacter</i> sp y sin inoculación, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, abril – junio 2019.....	49



## ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

$\mu\text{g/ml}$  = microgramos por mililitro

AG3 = ácido giberélico o giberelinas

AIA = ácido indol acético

*Azotobacter* sp = especie del género bacteriano *Azotobacter* no identificada.

cél./ml = células por mililitro

cm = centímetro

CV = coeficiente de variabilidad

et al. = y otros investigadores

FCCBB = Facultad de Ciencias Biológicas

g = gramo

ml = mililitro

N = nitrógeno

n = tamaño de muestra

R = repetición

S = coordenada de latitud sur

spp = otras especies

TM = toneladas métricas

UFC/g = unidades formadoras de colonia por gramo

UNA – P = Universidad Nacional del Altiplano – Puno

W = longitud oeste



## RESUMEN

La demanda de productos orgánicos y nutritivos a nivel nacional y mundial, como la quinua, viene incrementando su valor económico, disminuyendo el uso indiscriminado de agroquímicos, ante ello se plantea el uso y aplicación de bacterias diazótrofes en el proceso productivo, pero la falta de investigaciones en este tipo especial de bacterias, origina la necesidad de realizar esta investigación. Los objetivos específicos son: a) cuantificar la carga bacteriana diazótrofes del género *Azotobacter* en suelos de las localidades de Jayllihuaya, Mañazo y Huancané, y b) evaluar el efecto de la inoculación de las bacterias diazótrofes del género *Azotobacter* en la germinación y la longitud de raíces y tallos de plantas de quinua en fase de ramificación con en condiciones de laboratorio. Se evaluaron un total de 27 muestras de suelos. Los métodos a realizar constaron en la recolección de muestras de suelos, para los recuentos se aplicó la técnica de diluciones en placa, asimismo se determinó los efectos de las bacterias diazótrofes previamente aisladas en la germinación de las semillas y las biometrías de longitudes de raíces y tallos de las plantas de quinua, todos estos experimentos se realizaron en condiciones de laboratorio, todos los experimentos se realizaron con un mínimo de tres repeticiones; los resultados que se obtuvieron fueron analizados en pruebas de análisis de varianza, pruebas de T de Student y de Tukey, con un 95% de confiabilidad. Los resultados registrados fueron: los recuentos de bacterias *Azotobacter* sp en suelos de Jayllihuaya fue de  $45.67 \times 10^4$  UFC/g, en Mañazo de  $70 \times 10^4$  UFC/g y en Huancané de  $38 \times 10^4$  UFC/g ( $P=0.0126$ ), siendo superior en la localidad de Mañazo; dichas bacterias lograron un porcentaje de germinación del 76.67% ( $P=0.0018$ ), y las longitudes de raíz promedio de 6.70 cm ( $P=0.0125$ ) y las de los tallos una longitud de 3.43 ( $P=0.0445$ ). Se concluye en que, la concentración bacteriana de *Azotobacter* sp en una concentración de  $1.5 \times 10^8$  células/ml de bacterias incrementa el porcentaje de germinación y las longitudes de tallo y raíces en *Ch. quinoa*, siendo superiores al tratamiento control.

**Palabras clave:** *Azotobacter* sp, *Chenopodium quinoa*, crecimiento de plantas, inoculante, quinua.



## ABSTRACT

**Introduction:** The demand of organic and nutritious products at a national and global level, such as quinoa, has increased its economic value, decreasing the indiscriminate use of agrochemicals. In view of this, the use and application of diazotrophic bacteria in the production process is considered, but the lack of research in this special type of bacteria, originates the need to carry out this investigation. The specific objectives are: a) to quantify the bacterial load of diazotrofas of the genus *Azotobacter* in soils of the localities of Jayllihuaya, Mañazo and Huancané, and b) to evaluate the effect of the inoculation of the diazotrophic bacteria of the genus *Azotobacter* in the germination and the length of roots and stems of quinoa seedlings in branching phase under greenhouse conditions. A total of 27 soil samples were evaluated. The methods to be carried out consisted in the collection of soil samples, for the counts the plate dilution technique was applied, also the effects of previously isolated diazotrophic bacteria on the germination of the seeds and the biometries of root lengths and stems of quinoa plants, all these experiments were performed under laboratory conditions, all experiments were performed with a minimum of three replications; The results obtained were analyzed in analysis of variance tests, Student's T tests and Tukey's tests, with 95% reliability. The results recorded were: the counts of *Azotobacter* sp bacteria in Jayllihuaya soils were  $45.67 \times 10^4$  UFC/g, in Mañazo it was  $70 \times 10^4$  UFC/g and in Huancane it was  $38 \times 10^4$  UFC/g ( $P=0.0126$ ), being higher in the town of Mañazo; said bacteria achieved a germination percentage of 76.67% ( $P=0.0018$ ), and the average root lengths of 6.70 cm ( $P=0.0125$ ) and those of the stems a length of 3.43 ( $P = 0.0445$ ). It is concluded that the bacterial concentration of *Azotobacter* sp in a concentration of  $1.5 \times 10^8$  cells/ml of bacteria increases the germination percentage and the lengths of stem and roots in *Ch. quinoa*, being superior to the control treatment

**Key words:** *Azotobacter* sp, *Chenopodium quinoa*, inoculant, quinoa, seedling growth.



# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

La Región Puno, se constituye en el principal productor de quinua con aproximadamente el 82% de la siembra, le siguen en orden de importancia Junín, Arequipa, Cusco, Huancavelica, Áncash, Ayacucho y Apurímac. Al año 2014, el portal Quinoa.pe (2014) informa que la producción de quinua ascendió a 114 mil TM, incrementando su siembra en diferentes partes del Perú y el mundo debido a su gran potencial nutritivo. En los últimos años, existió un percance con la quinua producida orgánicamente en la región Puno, ya que en la región Arequipa produjeron este grano en suelos de los campos de cultivo en los que aplicaban grandes cantidades de pesticidas (insecticidas, herbicidas, fungicidas, entre otros), los cuales, al ser exportados a los Estados Unidos, éstos fueron devueltos en inmensos lotes ante los elevados contenidos de agroquímicos en la quinua.

Ante esta problemática del uso y aplicación de agroquímicos y posteriormente su presencia en los alimentos como la quinua, los grandes países de Norteamérica y Europa exigen que la producción de quinua se realice en forma orgánica, solo utilizando abonos orgánicos como estiércoles, rastrojos, humus, compost, entre otros abonos, pero todos ellos poseen una característica, el tener altos contenidos de nitrógeno, fósforo y potasio, y principalmente una alta carga microbiana que estimule el crecimiento vegetal y la protección de sus raíces ante el ataque de plagas, razón por la cual se planifica la realización de este tipo de experimentos aplicando bacterias diazótrofes del género *Azotobacter*, como una tecnología limpia amigable con el medio ambiente.

Ante el conocimiento de que los microorganismos almacenan carbono, participan



de los ciclos de nutrientes y nutrición de las plantas, rehabilitan suelos afectados, biodegradan y reducen residuos peligrosos, controlan plagas y enfermedades, descomponen materia orgánica, intervienen en la formación de sustancias orgánicas con efecto en la formación de micro y macroagregados, efectos de aireación, porosidad, capacidad de retención de agua y reducción del lixiviado de nutrientes y la protección y formación de raíces (Martínez et al., 2018), existe la imperiosa necesidad de estudiar a los microorganismos entre ellas las bacterias diazótrofes, ya que poseen un potencial inmenso en un proceso productivo de un cultivo de importancia económica, tal como lo constituye la quinua en el Perú.

Por lo tanto, presentamos esta investigación con la finalidad de aislar bacterias diazótrofes a partir de los suelos del Altiplano Peruano, en las localidades de Jayllihuaya, Mañazo y Huancané y evaluar sus efectos de inoculación en semillas y plantas de quinua, para que en un futuro próximo se podría constituir en una alternativa al uso indiscriminado de los agroquímicos.

Esta investigación tuvo los siguientes objetivos:

### **1.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar bacterias diazótrofes del género *Azotobacter* y su efecto en el crecimiento de quinua (*Chenopodium quinoa* willd.) hasta la fase de ramificación en condiciones de laboratorio.

### **1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Cuantificar la carga bacteriana diazótrofes del género *Azotobacter* en suelos de las



localidades de Jayllihuaya, Mañazo y Huancané.

- Evaluar el efecto de la inoculación de las bacterias diazótrofes del género *Azotobacter* en la germinación y la longitud de raíces y tallos de plantas de quinua hasta la fase de ramificación en condiciones de laboratorio.



## CAPÍTULO II

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 2.1 ANTECEDENTES

Las plántulas de *Carica papaya* variedad Maradol en vivero, al inocular tres biofertilizantes y un biorregulador ácido giberélico (AG3), *Azotobacter brasilense* y *A. chroococcum*, elevaron la germinación en porcentajes que variaron del 88.89% y 90.28% respectivamente, al aplicarlos a los cultivos como biofertilizantes y por acción de la fitohormona AG3, incrementando la velocidad de germinación (Constantino et al., 2017); al realizar el experimento en la aplicación de la gallinaza fresca, el compost de gallinaza adicionada con bacterias *Azospirillum* sp y *Azotobacter* sp, y la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares (HMA), fue la gallinaza cruda quien tuvo un mejor efecto en lograr buenos rendimientos en el cultivo de cebolla; mientras que en plantas tratadas con HMA, con *Azospirillum* y *Azotobacter* no fueron relevantes (Montenegro et al., 2017); Las rizobacterias de plántulas de *Ipomoea batatas* como son *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas denitrificans*, solubilizan fósforo, producen índoles y reducen acetileno, por tanto incrementan el crecimiento de longitud radicular, altura, peso seco aéreo y radicular (Pérez y Sánchez, 2017); las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal, *Azospirillum* RZH132 y *Azotobacter* RZH120, en inoculación simple y en coinoculación mostraron un efecto positivo en el crecimiento de las plantas inoculadas en las dos parcelas con quema y sin quema de cascarilla de arroz; sin embargo, en la variable rendimiento no se obtuvieron diferencias significativas (Carrillo et al., 2015).



En dos variedades de trigo a la inoculación simple y combinada con *Sinorhizobium meliloti* y *Azospirillum zae*, resultaron de alta importancia en el incremento de sus variables agronómicas, observándose una fuerte relación estadística entre las variables peso seco aéreo y variables de la raíz (Bécquer et al., 2015); la adaptabilidad del cacao (*Theobroma cacao* L.) se logra al inocular con bacterias biofertilizantes, obteniéndose que las variables de crecimiento y N (%) foliar se eleven significativamente (Zula et al., 2014); las cepas de rizobacterias en semillas de *Sporobolus cryptandrus* presentaron el 100% germinación a comparación del 40% del tratamiento testigo y la longitud de la plúmula, la longitud de la radícula, los tratamientos resultaron superiores al testigo (Bécquer et al., 2013); *Azotobacter* spp es una alternativa al uso indiscriminado de fertilizantes químicos en el desarrollo vegetativo de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate”, ya que produce entre 7.10 y 57.99 mg/l de ácido indolacético (AIA), entre 0.13 y 1.64 mg/l de nitrógeno almacenado como amonio y 1.61% de eficiencia en solubilizar la roca fosfórica de Bayóvar, obteniéndose el aumento de la altura, materia seca total, volumen radicular, parte radicular y aérea comparado con el tratamiento testigo (Escobar et al., 2011).

Vélez y Orellana (2010), indican que la bacteria *Azotobacter* spp en el cultivo de lechuga, la interacción “c5d1” (Tumbaco, Pichincha en dilución 1), alcanzó la mayor altura con un promedio de 20.60 cm, la cepa “c4” (Machachi, Pichincha) comparada con la cepa “c10” (Colta, Chimborazo), incrementó el diámetro de planta, en un 11% a causa de pequeñas cantidades de citoquininas, auxinas y giberelinas que *Azotobacter* secreta, tal como lo manifiestan (González y López, 1986); en el cultivo del cocotero, en nueces de 12 meses de edad con 1 – 1.5 kg de peso que fueron tratadas con diferentes concentraciones de *Azotobacter* IB 588 (10, 20, 30 y 40%) tuvo una respuesta positiva en



la germinación de las nueces de cocotero a la inmersión en *Azotobacter* al 30% de su concentración (Alvarado et al., 2012); en la detección de bacterias benéficas en suelo con bananos se aislaron a las bacterias de los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum* en profundidades que variaron entre 110 y 59 cm, respectivamente, con recuentos bacterianos que oscilaron entre  $11 \times 10^5$  UFC/g y  $42 \times 10^4$  UFC/g de suelo seco para *Azotobacter* y *Azospirillum* respectivamente (Córdova et al., 2009).

Las bacterias de las especies *Azotobacter chroococcum*, *A. vinelandii* y actinomicetos aislados de cultivos de papa (*Solanum tuberosum*), en 42.3% impidieron el normal crecimiento del moho *Fusarium solani* y en 17% inhibieron al hongo *Rhizoctonia solani* (Rico, 2009); en la región de la Amazonía Colombiana, las bacterias diazótroficas, en suelos de bajo terraza en la cobertura de pastizal presentaron recuentos de  $8.42 \times 10^2$  NMP/g de suelo, seguido por la cobertura de bosque con  $7.57 \times 10^2$  NMP/g de suelo y finalmente chagra bajo los dos paisajes entre 2.2 y  $2.62 \times 10^2$  NMP/g de suelo, en suelos bajo pastizal reportaron 7 y  $11 \times 10^6$  UFC/g de suelo, seguido por los suelos bajo bosque con 9.39 y  $10 \times 10^5$  UFC/g de suelo y finalmente los suelos bajo chagra con 2.93 y  $3.2 \times 10^5$  UFC/g de suelo (Mantilla et al., 2009); el estudio de la microflora de la rizósfera de la tara (*Caesalpinia spinosa*) en la provincia de Huánuco, determinó 3 cepas de *Azotobacter* spp, 8 de actinomicetos y 13 de *Pseudomonas* spp, por tanto pueden ser consideradas de ligero a medianamente fértiles y, por lo tanto, podrían sostener parcialmente el crecimiento del cultivo de tara (Ogata et al., 2008); el tratamiento de inoculación de pastos Angleton (*Dichantium aristatum*) con bacterias asimbióticas fijadoras de nitrógeno y a la vez secretoras de AIA, las bacterias del género *Azotobacter* sp originaron el altos promedios de alturas de tallo, ganancias de peso seco y elevación del contenido de nitrógeno representado en porcentajes de nitrógeno y proteína,



demostrando que la inoculación de las semillas de las plantas con bacterias diazótrofes se logra la estimulación e incremento del crecimiento y desarrollo de los pastos (Lara y Oviedo, 2007).

## **2.2 MARCO TEÓRICO**

### **2.2.1 Rizosfera**

La rizosfera es el área del suelo que presenta el desarrollo radicular, y una elevada actividad de proliferación de microorganismos, estos sobreviven debido al suministro de exudados radicales, conformados por compuestos químicos como azúcares, aminoácidos, vitaminas y enzimas, y la regulación de señales de interacción entre microorganismos y plantas (Bowen y Rovira, 1999). Las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo rizosférico son muy diferentes a las del suelo no rizosférico, especialmente cuando la distancia desde la superficie de la raíz es de algunos mm, la carga microbiana se reduce (Orozco et al., 2016).

Las comunidades microbianas rizosféricas están conformadas por bacterias, algas, hongos, protozoos, nemátodos y virus, donde la mayor parte de las investigaciones se centran en hongos y bacterias (Gryndler, 2000). Se estima que existen unas 30,000 especies diferentes de bacterias y 1'500,000 especies variables de hongos, de todos ellos solo un 1% y 8% respectivamente fueron plenamente identificados (Barea, 2000). En este contexto hay que referir que la utilización de técnicas basadas en el análisis de moléculas de DNA ha puesto de manifiesto que entre el 90% y 99% de los microorganismos del suelo son viables, pero no cultivables (Barea et al., 2005), por lo que dichas técnicas permiten caracterizar los microorganismos y establecer sus relaciones filogenéticas.



Los análisis pioneros de la complejidad microbiana en suelos, llevados a cabo por Torsvik et al. (1990), utilizando técnicas de reasociación de ADN, mostraron la gran diversidad genética bacteriana presente. Así, el número de genomas bacterianos diferentes estimados en una muestra de suelo forestal fue de aproximadamente 4,000, en claro contraste con la diversidad genética de bacterias aisladas en cultivos de la misma muestra (200 veces menos). En otras muestras de suelo de la Amazonía brasileña, la diversidad genómica fue aún mayor (8,000 – 10,000 genomas diferentes) (Torsvik et al., 1998). Los microorganismos de la rizosfera juegan un papel muy importante en relación con los procesos de edafogénesis, los ciclos biogeoquímicos de elementos como carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo, hierro y otros metales; fertilidad de las plantas y protección contra patógenos; degradación de compuestos xenobióticos y producción de fitohormonas (Nogales, 2005).

### **2.2.2 Bacterias diazotróficas**

Las bacterias diazótroficas que fijan el nitrógeno se constituyen en la primordial fuente de abastecimiento de nitrógeno para las plantas. Son biosintetizadores que sintetizan amonio desde las moléculas de nitrógeno atmosférico. Muchas de ellas entre bacterias, actinomicetos y algas verde azules logran reducir el nitrógeno atmosférico a moléculas de nitrógeno amoniacal y lo absorben en el suelo. Los géneros de bacterias biosintéticas de amoníaco aeróbicas son *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bayerlin*, *Dexia*, *Azomonas* y *Oscillatoria*. La mayor actividad de síntesis de amonio se logra a través de suficiente humedad del suelo y fuentes de carbono disponibles, como la descomposición de materiales vegetales (paja, sokas o subproductos de la cosecha). Las secreciones liberadas por la región radicular de las plantas, deberán de ser los indispensables para el desarrollo de bacterias (Coyne, 2000).



Hay muchos estudios sobre microorganismos del suelo, sin embargo, no reportan biodiversidades de los suelos agrícolas para lograr un funcionamiento óptimo del ambiente edafológico (Escobar et al., 2011), las bacterias PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), son aquellas que colonizan las raíces, estimulan significativamente el crecimiento de las plantas, son fijadores de nitrógeno y son de vida libre. Este grupo bacteriano fue motivo de investigación en microbiología edafológica desde el siglo pasado lográndose desarrollar productos biológicos de importancia comercial. El análisis del ARN ribosómico 16S otorga información para lograr la identificación molecular de las bacterias fijadoras de nitrógeno y permite el establecimiento de relaciones filogenéticas entre individuos en el mismo ecosistema agrícola (Farajzadeh et al., 2009).

Las bacterias del género *Azotobacter* posee movimiento y originan quistes al ser sometidos a condiciones adversas, llegando a fijar hasta 40 kg de N/ha, equivalente a 200 kg de sulfato de amonio. Estos microorganismos fueron ubicados en suelos ácidos con valores de pH 5.5 y en ambientes alcalinos, pero siendo de su preferencia los suelos neutros (Coyne, 2000), por lo tanto, su actividad biológica en el suelo logra cultivos de rendimientos incrementados, mejorando la producción y el control ambiental, admitiendo el mantenimiento de la diversidad biológica y la sostenibilidad de los ecosistemas (Carvajal y Mera, 2010), las bacterias simbióticas o de vida libre que habitan la rizosfera estimulan el crecimiento vegetal mediante la síntesis de reguladores del crecimiento de las plantas, la fijación de nitrógeno, la solubilización de nutrientes, la síntesis de sideróforos y el control de patógenos de plantas del suelo (Torriente, 2010).

Los microorganismos más investigados están representados por los géneros *Azotobacter*, *Stenotrophomonas*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Beyerstein*,



*Bacillus*, entre otros; y son denominados como bacterias PGPR, debido a que convierten el nitrógeno atmosférico en amoníaco mediante la fijación biológica de nitrógeno y así incorporarlo a la biosfera, representando beneficios económicos, reduciendo el impacto negativo sobre el medio ambiente a causa del uso exagerado de agroquímicos en la producción agraria (Bruinsma, 2003).

Los microorganismos nativos que benefician el mejor crecimiento vegetal incluyen a *Azotobacter vinelandii*, *Burkholderia cepacia* y *Stenotrophomonas maltophilia*, y pueden ser identificados por técnicas convencionales o en base a sus propiedades bioquímicas, como la caracterización de la morfología celular, la tinción de Gram, el análisis de la capacidad de crecimiento en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, o análisis de las necesidades de sustancias especiales necesarios para su cultivo, llegando a la identificación de géneros y la caracterización de cada especie, subespecie, serovar o cepas, para ello se requiere de las técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa que es una técnica muy útil para la identificación de ar secuencias únicas del ADN (Laura et al., 2013).

### 2.2.3 *Azotobacter* sp

Clasificación taxonómica del género *Azotobacter*:

Dominio	: Bacteria.
Phylum	: Proteobacteria.
Clase	: Gamma proteobacteria.
Orden	: Pseudomonadales.
Familia	: Azotobacteraceae.
Género	: <i>Azotobacter</i> (Ramos, 1992).



Especies : *Azotobacter vinelandii*.

*Azotobacter chroococcum*.

Las bacterias del género *Azotobacter* presentan un diámetro celular que puede variar entre 1.5 a 2.0  $\mu\text{m}$ , su morfología es variable entre bacilos y cocos, son pleomórficas, se presentan en células individuales, en pares o en forma de agregados irregulares, pueden formar cadenas de tamaño variable, su reproducción es por división binaria y el movimiento lo realizan mediante flagelos peritricos (Espín, 2000), carecen de endosporas y forman quistes con farmacorresistencia, el cual fue ampliamente estudiada, este fenómeno se da en condiciones ambientales desfavorables y en el laboratorio debido al cambio en el medio de cultivo de glucosa a un medio con b-hidroxibutirato como única fuente de carbono (Lin y Sadoff, 1968), son catalasa positivas, quimioheterotróficas, aeróbicas, metabolizan azúcares, alcoholes y sales inorgánicas para su normal crecimiento; pero pueden crecer también a bajas concentraciones, en presencia de oxígeno, el rango de pH óptimo para la fijación de nitrógeno es 7.0 – 7.5, son mesofílicos y su temperatura óptima de crecimiento es de 30 °C (Mayea et al., 1998), poseen la capacidad de fijar mínimo 10 mg de  $\text{N}_2/\text{g}$  de glucosa metabolizada, también necesita de molibdeno, manipulan sales de amonio, nitrato y varios aminoácidos como fuentes de nitrógeno (Lin y Sadoff, 1968), muchas especies pueden producir poli- $\alpha$ -hidroxibutirato, alginatos (Horan et al., 1983), pigmentos y fitohormonas como las auxinas, citoquininas y giberelinas (González y López, 1986).

Las bacterias diazótroficas fueron las primeras en ser producidas comercialmente como biofertilizantes, dentro del género *Azotobacter*, se cuentan con las siguientes especies: a) *A. chroococcum*, b) *A. vinelandii* c), *A. paspali*, d) *A. armeniacus*, e) *A.*



*beijerinckii*, f) *A. nigricans* y g) *A. salinestrus* (Page y Shivprasad, 1991), quienes fijan nitrógeno en forma asimbiótica, así como también son solubilizadoras de fosfato. Algunas cepas tienen la capacidad de degradar plaguicidas como el endosulfan (Balandreau, 1986). El medio mineral sin nitrógeno o agar Ashby para *Azotobacter* permiten lograr aislamientos de bacterias asimbióticas, aeróbicas y fijadoras de nitrógeno, este medio posee microelementos necesarios para la fijación biológica de nitrógeno entre ellos el  $\text{FeSO}_4$ , las colonias bacterianas del género *Azotobacter* poseen una coloración crema, de tamaño mediano, son irregulares y brillantes (Holt, 2000).

La presencia de quiste se debe ante la carencia de del  $\beta$  – hidroxibutirato, asimismo cuando se degradan los polihidroxibutiratos - PHBs (Hitchins y Sadoff, 1973), asimismo por la acción de los iones calcio en el medio, estas estructuras no son exclusivas de bacterias del género *Azotobacter*, pero sí lo son de las bacterias del género *Beijerinckia*. La presencia de bacilos Gram negativos, cortos y grandes están relacionados con el *Azotobacter* sp. (Holt, 2000); a pesar de estas afirmaciones, la gran mayoría de cepas fijadoras de N son bacilos Gram negativos pequeños y cortos.

Los exámenes bioquímicos de las bacterias del género *Azotobacter* se realiza mediante técnicas convencionales que se basaron en el uso de cuatro azúcares, benzoato y fenol como fuentes de carbono, la prueba de catalasa, la prueba de Nessler, la producción de AIA y la hidrólisis del almidón, son las que distinguen al género *Azotobacter* de otras bacterias que fijan nitrógeno asimbióticas (Tejera et al., 2005), asimismo, se debe considerar la pigmentación en medio Ashby – benzoato, es utilizado para una identificación preliminar. Por otra parte, la identificación molecular de estas bacterias solo se realiza mediante el análisis de la ADNr 16S, que luego de ser obtenido



amplificando genes usando iniciadores FGPL y FGPS, que fueron manejados en la amplificación del ADNr 16S de las bacterias diazótrofes (Nour et al., 1994), no siendo específicos para *Azotobacter*. Ante ello, Farajzadeh (2009), obtuvo un fragmento de 2000 pb aproximadamente, que correspondería al gen 16S y 23S, que son utilizados para la cepa control.

El secuenciamiento del ADN, se puede realizar en ambas direcciones, empleando la herramienta CAP contig del software Bioedit, seguidamente se comparan con las secuencias registradas en el portal GenBank utilizando el software BLAST 2.2.20 (Basic Local Alignment Search Tool) (Zhang et al., 2000), de esta manera se obtiene la identificación de bacterias *Azotobacter vinelandii*. El análisis filogenético manifiesta que las bacterias aisladas se encuentran asociados en el mismo clado que *Azotobacter vinelandii*, poseendo como próximo clado a aquellos que presentan a *A. salinestris* y *A. chroococcum* quienes poseen una estrecha correspondencia con las bacterias *Pseudomonas alcaligenes* (Fialho et al., 1990).

#### 2.2.4 Procesos metabólicos de la fijación biológica

Existe diferencia en la fisiología de los organismos fijadores de nitrógeno, pero el proceso de fijación y el sistema enzimático es similar en todos, siendo la nitrogenasa y la reacción que se produce la siguiente:



La fijación de nitrógeno se lleva asociada a una reducción de  $\text{H}^+$  a  $\text{H}_2$  en todos los sistemas, pero la mayoría tiene un sistema acoplado de reciclar el hidrógeno debido a la presencia de la enzima hidrogenasa. La reducción del nitrógeno es un procedimiento endergónico el cual requiere mínimamente de 960 kJ por mol de nitrógeno, por tanto,

requiere de un sistema eficiente de producción de ATP, el cual se produce mediante la fosforilación oxidativa articulado a la cadena transportadora de electrones que tiene al oxígeno como aceptor final de los mismos (Fernández et al., 2002).

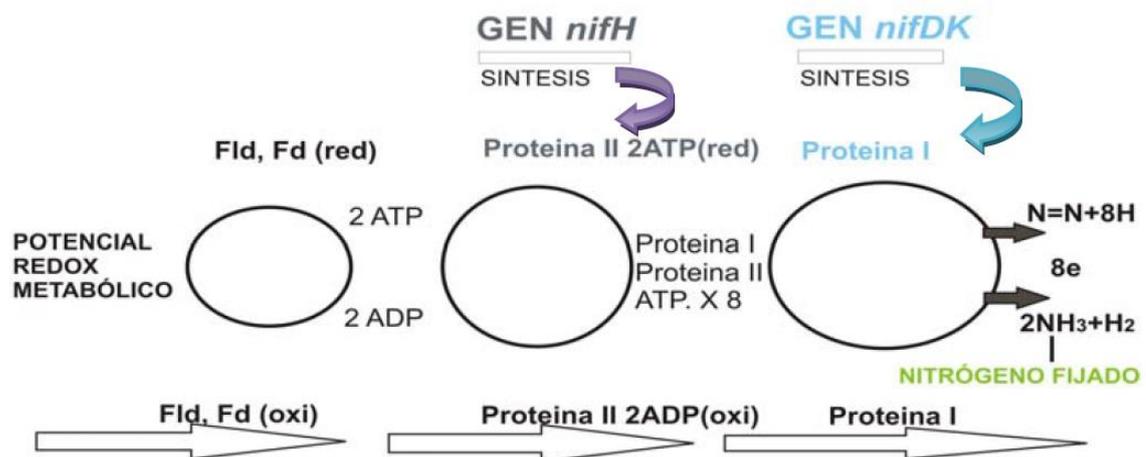
En el proceso de fijación de nitrógeno se describieron aproximadamente 20 genes involucrados, cuya secuencia y funciones fueron determinadas, donde los genes estructurales de la nitrogenasa se mantienen conservados, así también los genes relacionados a la maduración de la enzima, el transporte del molibdeno, la síntesis del cofactor y la regulación (Desnoues et al., 2003). Entre las proteínas encargadas de la regulación se encuentran las NifL y NifA y los genes *nif* en el control de la expresión en la fijación biológica del nitrógeno, todos estos genes fueron ubicados en *Azotobacter vinelandii* en el operon *nifLA* (Martínez et al., 2005).

### **2.2.5 Organización y estructura de la nitrogenasa**

La nitrogenasa está conformada por los componentes I (Mo – Fe proteína) y II (Fe – proteína), el primero es un tetrámero  $\alpha_2\beta_2$  con aproximadamente 220 kDa, presenta 24 átomos de hierro y 2 átomos de molibdeno; mientras que el segundo componente es un dímero que posee dos subunidades similares de 32 kDa cada una. La secuencia de aminoácidos de las proteínas está conservada en las especies de bacterias fijadoras (Fernández et al., 2002).

Los electrones que proceden de los glúcidos, inicialmente son traspasados del componente II al componente I, lugar donde se lleva a cabo la reducción de nitrógeno (Figura 1). Para que se realice la transferencia se requiere que la Fe – proteína, el cual se une a la Mg – ATP en los lugares de enlace, originando una alteración de la conformación

de la proteína, la disminución del potencial redox y el incremento de la sensibilidad al oxígeno. La transferencia de los electrones se relaciona con la hidrólisis de Mg – ATP, por otro lado, la Fe – proteína es enormemente sensible al oxígeno y que ante su incremento produce un cambio estructural que impide la aceptación de electrones. Aparte de los dos componentes mencionados de la nitrogenasa, también son citados los centros P y el cofactor Fe – Molibdeno (FeMoco), donde los centros P son lugares redox implicados con la acumulación intramolecular de electrones hacia el sitio de reducción del sustrato y el FeMoco viene a ser un minúsculo centro metálico aniónico que no presenta aminoácidos, pero si el homocitrato (Fernández et al., 2002).



**Figura 1.** Genes implicados en el flujo de electrones hacia el sitio activo de la nitrogenasa para la reducción del  $N_2$  (Baca et al., 2000).

### 2.2.6 Inoculación de bacterias *Azotobacter* en el desarrollo de las raíces

Una alternativa a la fertilización de los suelos es la inoculación de bacterias rizosféricas que poseen propiedades de promover el crecimiento vegetal, los cuales poseen propiedades de fijar nitrógeno, solubilizar fósforo, producir índoles y sideróforos (Marques et al., 2015), con la finalidad de tomar de nutrientes y promover el crecimiento de las plantas. Entre las bacterias rizosféricas se mencionan a los siguientes géneros *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Azoarcus*, *Erwinia*,



*Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Beijerinckia*, entre otros (Selvakumar et al., 2012), de los cuales *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* son los más utilizados por ser fijadores de nitrógeno (Yasmin et al., 2010), producen indoles (Dawwam et al., 2013) y solubilizan fósforo (Sashidhar y Podile, 2009), por lo que son considerados como bacterias potenciales biofertilizantes.

Los bioinoculantes a base de bacterias PGPRs constituyen un instrumento promisorio en el manejo de los sistemas integrados de cultivos (Di-Benedetto et al., 2017), en razón de que otorgan beneficios como fijar nitrógeno, coadyuvar en la absorción de nutrientes, estimular el crecimiento de ramas y raíces, controlar o suprimir los padecimientos y lograr la mejora de la estructura del suelo (Altaf y Ahmad, 2017). *Azospirillum lipoferum* y *Azotobacter chroococcum*, son microorganismos de vida libre habituales del suelo, el agua y la rizosfera, donde de forma directa e indirecta estimulan el enraizamiento y el crecimiento de las plantas (Sánchez y Pérez, 2018).

*Azotobacter chroococcum* son bacterias comunes que utiliza los exudados de las raíces y otorgan nitrógeno compuesto a las plantas que liberan luego de fijar nitrógeno atmosférico (Monib et al., 1979), estos exudados producidos por las raíces poseen azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, vitaminas y ácidos grasos (Prashar et al., 2014), los cuales son fuentes de energía, y esta simbiosis origina el vigor y el aumento de la ganancia de nitrógeno. Experimentos de inoculación de *Azotobacter* sp en el cultivo de papa, logró precozmente la pronta formación de tubérculos, asimismo incrementó la cantidad de almidón y finalmente el rendimiento del cultivo (Shikina, 1961), originando un ambiente dinámico llamado rizosfera, donde las



bacterias se desarrollan de forma activa y en equilibrio (Pedraza et al., 2010). En tal sentido, las bacterias del género *Azotobacter* no solo son bioestimulantes, y gracias a su actividad nitrofixadora y producción de excreciones proteicas y enzimáticas, producen modificaciones en la fisiología y su metabolismo de los vegetales (Mezei et al., 1997).

*Azotobacter chroococcum*, aparte de fijar nitrógeno y liberar amonio, degrada compuestos tóxicos y contaminantes, son antagonistas patógenos como hongos y nematodos, como la inhibición del crecimiento de *Rhizoctonia solani* en el cultivo de papa y el nematodo *Heterodera avenae* con una reducción del 48% de la infección, solubilizan fosfatos tricalcicos y biosintetizan fitohormonas, también se les atribuye degradar plaguicidas como el endulsufan mediante sus enzimas deshalogenasas, dioxigenasas, e hidroxilasas, reducen el nitrato, producen sulfuro de hidrógeno e hidrolizan almidón, y biosintetizan fitohormonas como auxinas, giberelinas y citoquininas (Avella, 2007).

Por lo tanto, las bacterias del género *Azotobacter*, lograron incrementar el crecimiento de las plantas debido a que promueven el desarrollo de raíces secundarias, en razón de que son protectores contra fitopatógenos y producen metabolitos como las fitohormonas y la deaminasa que modulan el nivel de hormonas en plantas, reducen la acción perjudicial de los fitopatógenos gracias a la biosíntesis de sideróforos y antibióticos. Por otro lado, *Azotobacter* incrementa la floración o disminuye el aborto floral, así como también posibilitan que el fruto se forme y presente una maduración precoz, todos estos beneficios hacen que las plantas posean un crecimiento vigoroso e incrementen el rendimiento superando la fertilización tradicional (Lozada y Rivas, 2010).

### 2.2.7 Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.)

Clasificación taxonómica de la alfalfa:

Reino	: Vegetal
División	: Fanerogamas
Clase	: Dicotiledoneas
Sub – clase	: Angiospermales
Orden	: Centrospermales
Familia	: Chenopodiceas
Género	: <i>Chenopodium</i>
Sección	: Chenopodia
Subsección	: Cellulata
Especie	: <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. (León, 2003).

### 2.2.8 Fisiología de la germinación y el crecimiento vegetal

La germinación consiste en el crecimiento del embrión, el cual exige actividades metabólicas aceleradas que se activan con el incremento de la humedad y la actividad respiratoria de la semilla (Obregón, 2007), donde la absorción de agua en la semilla origina una secuencia de alteraciones metabólicas como la respiración, la síntesis proteica y la movilización de reservas. Consecuentemente, la división y el elongamiento de sus células del embrión terminan con la rotura de las cubiertas seminales, que continua con la emergencia de la radícula (Chong et al., 2002). Para que una semilla llegue a cumplir con su objetivo, el embrión debe transformarse en una plántula con capacidad independiente, por medio de los mecanismos morfogenéticos y metabólicos, que en suma se denomina germinación, y que consta de las siguientes fases: absorción de agua (imbibición) por la semilla, la activación del metabolismo, del proceso de respiración, de



la síntesis de proteínas y la movilización de sustancias de reserva y la elongación del embrión y ruptura de la testa y posterior emergencia de la radícula (Suárez y Melgarejo, 2010).

La germinación de las semillas tiene influencia de factores internos propios, entre ellas la viabilidad del embrión, la cantidad del tejido de reserva, el tipo de dormancia. Entre los factores externos se mencionan al grosor de la testa, la temperatura, la disponibilidad de agua y los tipos de luz (Abril et al., 2017). Sin embargo, muchas semillas no logran germinar debido a que se encuentran en un estado de latencia a causa de estar en condiciones inadecuadas para la germinación, incluso pueden llegar a perder la capacidad de germinar (Chong et al., 2002). La germinación posee tres etapas sucesivas que posee una superposición parcial, los cuales son la absorción de agua de las semillas (primera fase) por el micrópilo, produciendo el hinchamiento y la destrucción final de la testa, a continuación, inicia la actividad enzimática y el metabolismo respiratorio (segunda fase), la translocación y la asimilación de las reservas nutritivas en las zonas de crecimiento del embrión y ulterior crecimiento y división celular (tercera fase) que culmina con la emergencia de la radícula y luego la plúmula (Koornneef et al., 2002).

Las fases de la germinación, son afectadas ciertas condiciones del ambiente, como las propiedades y la composición del sustrato, el nivel de humedad, la temperatura ambiental, entre otros. Es necesario considerar la relación existente entre las fases con el metabolismo de las semillas (Doria, 2010). La primera fase de la germinación se lleva a cabo en semillas vivas y muertas, siendo independiente de la actividad metabólica de la semilla y en las semillas viables, la imbibición o hidratación es la que activa el metabolismo. La segunda fase consiste en la activación del metabolismo en semillas



viables. La tercera fase se realiza en semillas germinadas y se caracteriza por una elevada actividad metabólica, que involucra el crecimiento de plántulas y la movilización de las reservas (Koornneef *et al.*, 2002).



## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 ZONA DE ESTUDIO

Las muestras de suelos a partir del cual se realizaron los recuentos, fueron colectadas de los suelos de tres localidades, entre ellas se encuentran el centro poblado de Jayllihuaya cuyo primer punto de muestreo se ubicó en las coordenadas  $15^{\circ}52'51.2''$  S  $69^{\circ}58'59.6''$  W, el segundo punto de muestreo se ubicó en la localidad de Mañazo en las coordenadas de  $15^{\circ}48'06.6''$  S  $70^{\circ}20'24.6''$  W y el tercer punto de muestreo se ubicó en la localidad de Huancané en las coordenadas  $15^{\circ}12'31.2''$  S  $69^{\circ}45'24.6''$  W. Los primeros dos puntos de muestreo se ubicaron en los distritos de Puno y Mañazo, provincia de Puno y el tercer punto de muestreo se ubicó en el distrito y provincia de Huancané, ambas provincias se ubicaron en la Región Puno - Perú.

#### 3.2 TIPO DE ESTUDIO

La investigación realizada fue descriptiva y analítica, en razón de que se realizó el recuento de bacterias en suelos de tres localidades de la Región Puno y de los resultados obtenidos se realizó la explicación y el porqué de los recuentos de bacterias diazótroficas obtenidas. Por otro lado, fue experimental, en razón de que se evaluó el efecto de una concentración bacteriana diazotrófica con respecto al control en el proceso de germinación de semillas y crecimiento de plantas de quinua. Fue de corte transversal en razón de que se realizó en una determinada temporalidad durante los meses de abril – junio del año 2019.



### **3.3 POBLACIÓN Y TAMAÑO DE MUESTRA**

Para determinar la población y el tamaño de muestra para la investigación, se eligió campos de cultivo con un área aproximada de 150 m<sup>2</sup>, los cuales cada metro cuadrado fue enumerados y considerados como la población en cada localidad de muestreo. De estos terrenos los tres metros cuadrados del cual se tomaron las muestras fueron elegidos mediante la tabla de número aleatorio, haciendo un total de 9 muestras en cada punto de muestreo. Cada muestra estuvo conformada por 500 g de tierra. Las tres muestras consideradas repeticiones, fueron colectadas en forma mensual durante los meses de enero, febrero y marzo del año 2019.

### **3.4 METODOLOGÍA**

#### **3.4.1 Evaluación del recuento de bacterias diazótroficas en suelos de las localidades de Jayllihuaya, Mañazo y Huancané**

Luego de coleccionar las muestras en los puntos de muestreo, los recuentos bacterianos de *Azotobacter* sp, se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, del Programa de Microbiología y Laboratorio Clínico de la Escuela Profesional de Biología, adscrita a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno.

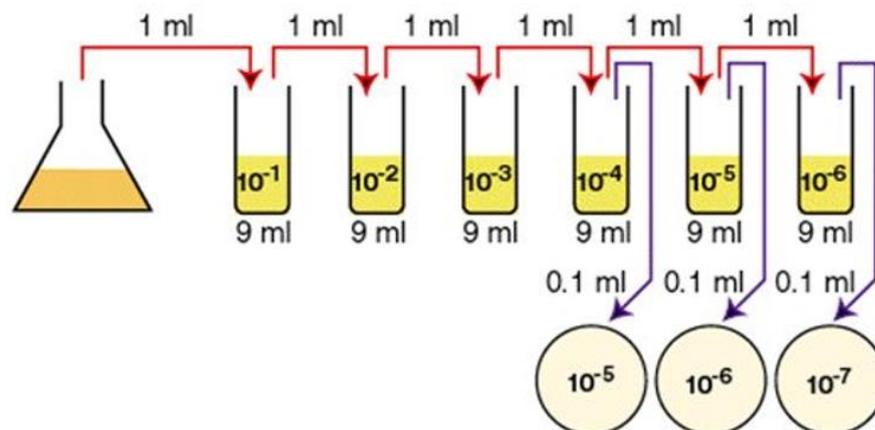
##### **a. Frecuencia de muestreo**

La colecta de muestras de suelo en cada localidad, se realizaron en forma mensual cada día 15 de los meses de abril, mayo y junio del año 2019. Las muestras fueron colectadas entre los 0 y 30 cm de la capa arable del campo de cultivo, donde el primer

muestreo se realizó entre los 0 y 10 cm, el segundo muestreo entre los 10 y 20 cm y el tercer muestreo entre los 20 y 30 cm (MINAM, 2014). Cada muestra debe tener un peso de 500 g (Bazán, 2017).

## b. Procedimientos

**Preparación de diluciones de la muestra.** Se empleó la técnica de la cuenta por dilución en placa (Fernández et al., 2006): se rotuló cada tubo con el número de dilución correspondiente y código de la muestra, se pesó 10 g de cada una de las muestras sólidas. Siendo éstas adicionadas a 90 ml del diluyente, obteniéndose así la dilución  $10^{-1}$ , se agitaron en un vortex cuidadosamente las muestras por un periodo de un minuto aproximadamente, se tomaron 1 ml de la dilución  $10^{-1}$  y se adicionó en otro tubo que contenga 9 ml del diluyente, obteniéndose una dilución de  $10^{-2}$ . Se homogenizaron nuevamente, el paso anterior fue repetido hasta la dilución  $10^{-6}$ , a continuación, se traspasó 0.1 ml de cada una de las diluciones a las placas Petri, sobre ellas se adicionó el medio sólido libre de nitrógeno, mediante el método de inversión en placa, seguidamente se realizaron movimientos suaves horarios y antihorarios, cada placa tuvo 2 repeticiones para así lograr el promedio de recuento (Figura 2).



**Figura 2.** Preparación de muestras y diluciones.



Se contaron sólo aquellas placas Petri que contenían de 30 a 300 colonias y el cálculo del recuento final de diazótrofas se llevó a cabo mediante la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/g suelo} = \text{Número de colonias} \times \text{Factor de dilución}$$

**c. Variables analizadas**

**Variable independiente:** Suelos de tres localidades (Jayllihuaya, Mañazo y Huancané).

**Variable dependiente:** Recuento de bacterias diazótrofas (*Azotobacter* sp).

**d. Pruebas estadísticas para contrastar las hipótesis**

Los resultados de los recuentos bacterianos obtenidos en cada localidad de muestreo, fueron los considerados como los tratamientos, los muestreos presentaron 3 repeticiones, haciendo un total de 9 unidades experimentales. Los recuentos de *Azotobacter* sp fueron representados mediante promedios y coeficientes de variación (%), y la diferencia estadística se determinó mediante pruebas de análisis de varianza y de contraste de Tukey. Los análisis de los datos obtenidos se realizaron con una confiabilidad del 95% y un 5% de error (Ibañez, 2009), los datos fueron tabulados en una hoja del programa Microsoft Office Excel, los análisis estadísticos inferenciales se realizaron en el software Infostat versión estudiantil.

**3.4.2 Evaluación el efecto de la inoculación de las bacterias diazótrofas en la germinación y la longitud de raíces y tallos de plantas de quinua hasta la etapa de ramificación en condiciones de laboratorio.**

La inoculación de las semillas y las plántulas de quinua, y las determinaciones de los porcentajes de germinación y crecimiento de raíz y tallos de las plántulas de quinua,



se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, del Programa de Microbiología y Laboratorio Clínico de la Escuela Profesional de Biología, perteneciente a la Facultad de Ciencias Biológicas en la Universidad Nacional del Altiplano de Puno.

#### **a. Frecuencia de muestreo**

Las evaluaciones de los porcentajes de germinación se realizaron luego de cinco días de inoculación. Las evaluaciones de las longitudes de raíces y tallos de quinua inoculados con *Azotobacter* sp, fueron determinados luego de 40 días de inoculación, los meses experimentados fueron los meses de abril, mayo y junio del año 2019.

#### **b. Procedimientos**

Luego de aislar las bacterias *Azotobacter* sp, se procedió a inocular semillas de quinua en condiciones de esterilidad, que aseguren la sola interacción entre la especie vegetal y la bacteria inoculada.

#### **Evaluación del efecto en la germinación de semillas de quinua.**

En una bandeja de plástico, previamente se colocó tierra de un campo de cultivo de la localidad de Jayllihuaya, para así simular las condiciones naturales del ambiente de cultivo, posteriormente fueron humedecidas con agua de pozo, todos tuvieron su tratamiento control. La inoculación de semillas de quinua se realizó transfiriendo de 3 a 4 colonias de bacterias diazótrofes en 100 ml de suero fisiológico. En esta solución se colocaron 100 g de semilla de la variedad de quinua Salcedo – INIA, estas semillas certificadas fueron adquiridas en la filial del Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA) (Figura 3), ubicado en la Rinconada de Salcedo – Puno.



**Figura 3.** Quinoa cultivar Salcedo INIA certificada por INIA utilizada en la investigación.

A continuación, se depositaron las 20 semillas de cada una de las placas Petri sobre una capa de gasa, seguidamente fueron incubadas a condiciones de laboratorio. El porcentaje de germinación (PG) se determinó al quinto día (Carrillo *et al.*, 2015) y se determinó mediante la siguiente fórmula matemática:

$$PG = \frac{\text{Semillas germinadas}}{\text{Número total de semillas de prueba}} \times 100$$

**Donde:** IG = índice de germinación;  $n_i$  = número de semillas germinadas en el día  $i$ ;  $t_i$  = número de días después de la siembra; N = total de semillas sembradas; M = velocidad de germinación; t = tiempo de germinación desde la siembra hasta la germinación de la última semilla.

### **Evaluación del efecto en el crecimiento de raíces y tallos de plantas de quinua hasta la fase de ramificación**

Los procedimientos fueron los siguientes: primeramente, se colectó muestra de suelo de la localidad de Jayllihuaya, a continuación, las semillas inoculadas y las semillas



control (no inoculadas) fueron acomodadas en frascos de plásticos de un área de 7.5 cm por 11.5 cm de altura, forrados interiormente con plástico de color negro y sujetados con ligullas, para posteriormente colocarlas sobre una mesa que recibió radiación solar en el laboratorio, en el transcurso de la investigación las plantas fueron regadas con agua de mesa de la marca Cielo para consumo humano. Asimismo, cada 15 días se aplicó una dilución bacteriana de *Azotobacter* sp equivalente a  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml, la observación del efecto final en la biometría de longitud de raíces y tallos, se realizó en 10 plantas elegidas al azar y seleccionadas tres de ellas, todas las determinaciones se realizaron al llegar a los 40 días de evaluación.

**c. Variables analizadas**

**Variable independiente:** Inoculación de bacterias *Azotobacter* sp ( $1.5 \times 10^8$  células/ml).

**Variable dependiente:** Porcentaje de germinación, longitud de raíces y de tallos.

**d. Pruebas estadísticas para contrastar las hipótesis**

El diseño experimental aplicado fue completo al azar, en el proceso de la germinación de semillas y longitudes de raíces y tallos, los tratamientos estuvieron representados por las bandejas con semillas y plantas inoculadas y no inoculadas, donde cada tratamiento tuvo tres repeticiones, previo al análisis inferencial se realizó el análisis descriptivo de promedios y coeficientes de variación (%) y el análisis estadístico inferencial estuvo representado por pruebas de T de Student, donde se comparó dos tratamientos como fueron la germinación de semillas y crecimiento de raíces y tallos de las plántulas de quinua, sean inoculas y semillas no inoculadas. Los análisis de datos se realizaron con una confianza del 95% (Ibañez, 2009), la tabulación de datos fue llevado



a cabo en el programa Microsoft Office Excel y los análisis inferenciales en el software estadístico Infostat versión libre.



## CAPÍTULO IV

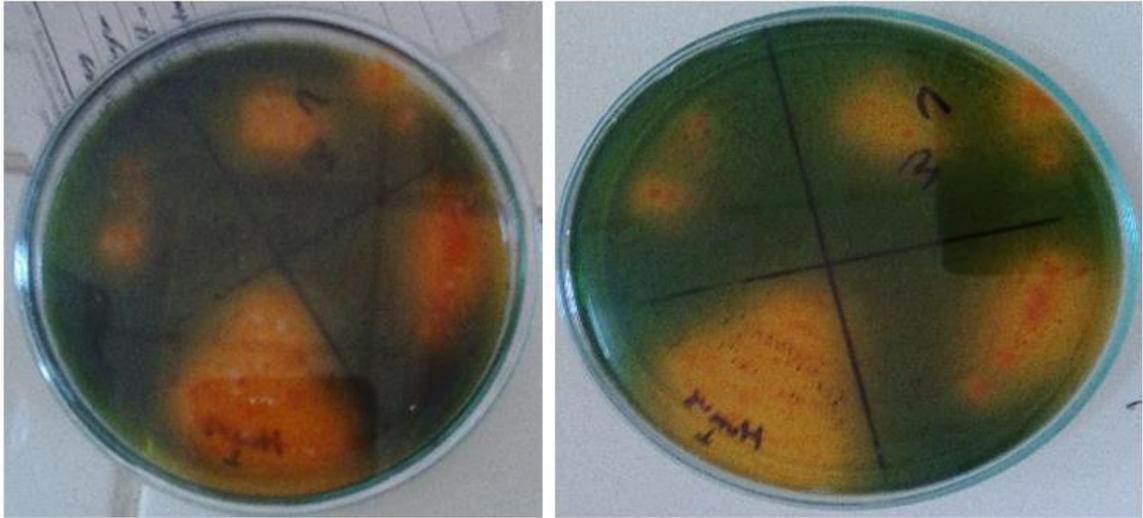
### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 CARGA BACTERIANA DIAZÓTROFAS DEL GÉNERO *Azotobacter* EN SUELOS DE LAS LOCALIDADES DE JAYLLIHUAYA, MAÑAZO Y HUANCANÉ

La carga bacteriana de *Azotobacter* sp evaluados en tres suelos de muestreo de la región Puno, fue mayor en la zona de muestreo de Mañazo con  $70 \times 10^4$  UFC/g de suelo, seguido de Jayllihuaya con  $45.67 \times 10^4$  UFC/g de suelo y Huancané con  $38 \times 10^4$  UFC/g de suelo. La mayor dispersión de los recuentos bacterianos se presentó en suelos de la zona de muestreo de Mañazo con 19.33%, seguido de Huancané con 16.43% y Jayllihuaya con 12.45% (Tabla 1), pero todos ellos con una dispersión de recuentos bacterianos aceptable.

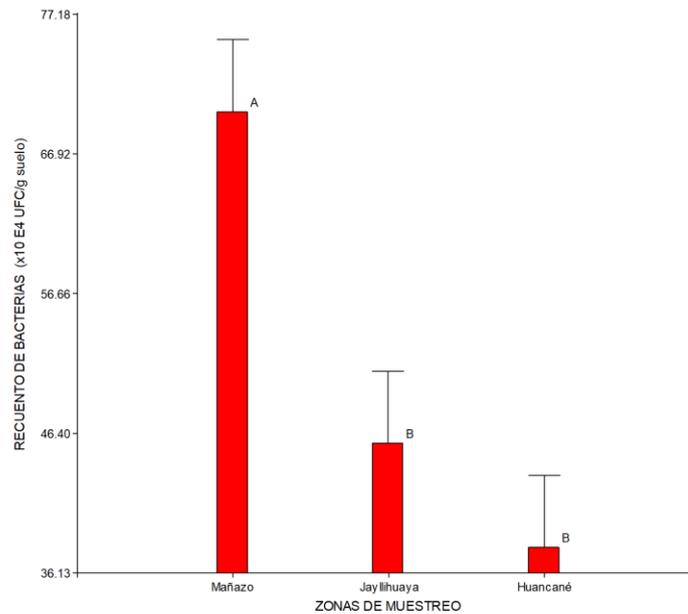
**Tabla 1.** Carga bacteriana de *Azotobacter* sp ( $\times 10^4$  UFC/g suelo) en campos de cultivo de las zonas de muestreo Jayllihuaya, Mañazo y Huancané, enero – marzo, 2019.

Zonas	Repeticiones			Prom	CV (%)
	1	2	3		
Jayllihuaya	44	52	41	45.67	12.45
Mañazo	71	56	83	70.00	19.33
Huancané	36	33	45	38.00	16.43



**Figura 4.** Colonias de bacterias *Azotobacter* en suelos de campos de cultivo de Mañazo, enero – marzo del 2019.

Luego de realizar la prueba estadística de análisis de varianza, se obtuvo un P – valor de 0.0126, éste último como es menor a 0.05 (nivel de confianza), se afirma que existió diferencia estadística entre los recuentos bacterianos de *Azotobacter* sp en muestras de suelos de las zonas de muestreo de Jayllihuaya, Mañazo y Huancané (Figura 5), donde el mayor promedio según la prueba de Tukey o de contraste entre zonas se determinó que el mayor recuento se encontró en la zona de Mañazo, con respecto a las zonas restantes zonas; mientras tanto que entre las zonas de muestreo de Jayllihuaya y Huancané los recuentos bacterianos no presentaron diferencia estadística significativa (Anexos – Figura 11).



**Figura 5.** Prueba de Tukey de recuentos de bacterias *Azotobacter* en las zonas de muestreo de Jayllihuaya, Mañazo y Huancané, enero – marzo del 2019.

Los recuentos obtenidos en la investigación oscilaron entre  $38 \times 10^4$  UFC/g de suelo (Huancané) y  $70 \times 10^4$  UFC/g de suelo (Mañazo), estos resultados fueron inferiores a los indicados por Velandia (2016), quienes reportaron recuentos de bacterias fijadoras de nitrógeno rizosféricas, para las fincas evaluadas oscilaron entre  $10^6$  a  $10^8$  UFC/g de suelo. En la investigación las colonias de *Azotobacter* sp, fueron seleccionadas a partir de medio mineral sin nitrógeno (Figura 4), estas se caracterizaron por poseer una coloración amarillenta las colonias y el medio de cultivo, las bacterias Gram negativas con presencia de quistes, presentar un crecimiento viscoso y abundante debido a la producción de exopolisacáridos como el alginato, útil para el proceso de enquistamiento de sus células, como mecanismo de protección y de polihidroxitirato como principal reserva de carbono y energía para las células bacterianas y relacionado con la fijación de nitrógeno, ya que protege a la enzima nitrogenasa de las elevadas concentraciones de oxígeno (Gauri *et al.*, 2012).



Los suelos de la zona de muestreo de Mañazo presentaron el mayor promedio de recuento de bacterias *Azotobacter* sp, ello se debería a que los suelos muestreados poseían una adecuada humedad, lo cual coincidiría con lo reportado por Jadin y Jacquemart (1978), quienes encontraron mayor abundancia de bacterias diazótrofes, en suelos con un sistema de riego por goteo, lo cual acelera la tasa de desarrollo de las plantas, aumenta el número de flores y los rendimientos con uniformidad en los cultivos, por lo tanto, el uso del estiércol de ovinos, cuy, aves entre otros, también incrementaría la población de las bacterias *Azotobacter* sp; por otro lado, la abundancia de éste tipo de bacterias, se debe al abonamiento con el filtrado del humus, quien posee la capacidad de agregar nutrientes para las plantas, asimismo se mejora la calidad química de los suelos, que terminará en el favorecimiento de las condiciones de preservación e incremento de la diversidad bacteriana de las zonas de muestreo (Ormeño y Ovalle, 2011), asimismo, las bacterias *Azotobacter* sp, aseguran la sostenibilidad de los campos de cultivo mejorando la calidad de los suelos, mermando el incremento de nutrientes agroquímicos y aumentar los rendimientos de producción (Hernández *et al.*, 2006).

Otro factor importante que influye en los recuentos bacterianos es el pH del suelo (Coyne, 2000), en la investigación se determinó un pH de 5.7, lo cual influiría en los altos recuentos de bacterias *Azotobacter* sp, lo cual coincide con lo reportado por Arguello *et al.* (2016), quienes encontraron menores poblaciones de diazótrofes en suelos con pH 6.48, y en suelos con pH 5.32 y 5.42, los cuales fueron un pH más ácido, presentaron el mayor recuento microbiano, ya que los pH ácidos o ligeramente ácidos, con valores entre 5.5 – 6.2 permiten su crecimiento; otro factor que influiría es la presencia de las raíces de las plantas, así como en el suelo subyacente (Cárdenas *et al.*, 2010); en contraste Chennappa *et al.* (2014), también reportan el aislamiento de especies de *Azotobacter* sp,



en suelos de pH cercano a la neutro, en tal sentido existen varios factores que influyen en la diversidad microbiana y la obtención de pocos aislados del género *Azotobacter* se relacionaría con la naturaleza ácida de los suelos, los cuales se caracterizaron por ser de fuerte (4.23) a moderadamente (5.60) ácidos.

Algunas especies diferentes a *Azotobacter* sp, como la bacteria *Burkholderia* sp, es un buen colonizador de la rizósfera y representa uno de los grupos bacterianos más predominantes en diversos cultivos como en el maíz (Perín *et al.*, 2006), por lo que se afirmaría de que ciertos cultivos poseen presente de bacterias específicas en su rizosfera, siendo atraídos por los lixiviados radicales, enriqueciendo los suelos con nutrientes como fósforo y potasio, los cuales nutrirán a las plantas (Taiz y Zeiger, 2006), por otro lado, Melloni *et al.*, (2004), declaran que las rizobacterias son afectadas por las condiciones del suelo, los tipos de vegetación que posee y la época climática donde se realizaron los muestreos de los suelos, los cuales son variables en los suelos de Altiplano peruano.

Adicionalmente se manifiesta que las bacterias *Azotobacter* sp, son aisladas en suelos con características fisicoquímicas con pH que oscilaron entre 5.76 – 7.45, el contenido de materia orgánica está entre 0.2 – 1.2%, las cantidades de fosfato oscilaron entre 13.59 – 107.53, dichas variables se correlacionaron con los recuentos bacterianos del suelo, la profundidad de la raíz y el tipo de riego que presentaba el campo de cultivo, registrándose a mayor profundidad mayor número de bacterias; ante ello el fosfato posee una correlación positiva, debido a que las bacterias lo utilizan para su metabolismo, lo cual es reafirmado por Frioni (1999), quién manifiesta que la fijación biológica de nitrógeno en las bacterias *Azotobacter* sp requiere de gran cantidad de energía, por tal



motivo se asume que el contenido de materia orgánica acumulada en la rizósfera optimiza el desarrollo de las bacterias.

## **4.2 EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE LAS BACTERIAS DIAZÓTROFAS DEL GÉNERO *Azotobacter* EN LA GERMINACIÓN Y LA LONGITUD DE RAÍCES Y TALLOS DE PLANTAS DE QUINUA HASTA LA FASE DE RAMIFICACIÓN EN CONDICIONES DE LABORATORIO**

### **4.2.1 Efecto de *Azotobacter* sp en la germinación de semillas de quinua**

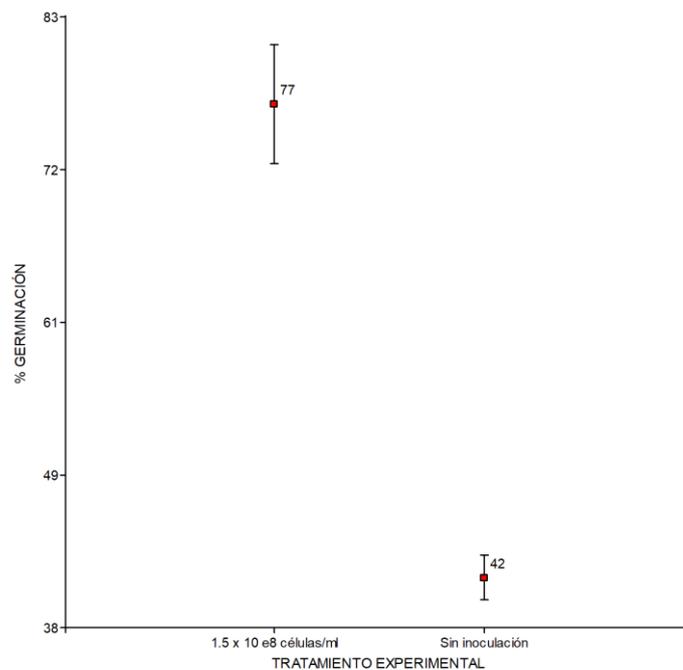
Las germinación de semillas de quinua se presentó en mayor proporción al inocular  $1.5 \times 10^8$  células/ml de bacterias *Azotobacter* sp, con un promedio de 76.67%, siendo mayor al promedio de germinación de semillas de quinua obtenidas sin inoculación o tratamiento control, con una cifra promedio de 41.67% de germinación, ambos tratamientos lograron coeficientes de variabilidad de 9.96% y 6.93% para las semillas inoculadas y no inoculadas respectivamente, demostrándose así baja dispersión de los porcentajes de germinación, en tal sentido los promedios son representativos de las tres repeticiones (Tabla 2).

Los porcentajes de germinación en las semillas de quinua, presentaron diferencia estadística significativa entre semillas inoculadas con  $1.5 \times 10^8$  cél./ml de *Azotobacter* sp y las no inoculadas o tratamiento control, según la prueba de T de Student ( $T=7.42$ ;  $gl=4$ ;  $P=0.0018$ ) (Anexos – Figura 12), gráficamente se presenta en la Figura 6.

**Tabla 2.** Germinación (%) de veinte semillas de quinua, cinco días después de ser inoculadas con  $1.5 \times 10^8$  cél./ml de *Azotobacter* sp y sin inoculación, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, abril – junio 2019.

Tratamientos	Repeticiones						Prom % Germ	CV (%) Germ
	1		2		3			
	Sem Germ	% Germ	Sem Germ	% Germ	Sem Germ	% Germ		
$1.5 \times 10^8$ cél./ml	15	75	14	70	17	85	76.67	9.96
Control	8	40	9	45	8	40	41.67	6.93

**Donde:** Sem Germ = semillas germinadas; % Germ = porcentaje de germinación.



**Figura 6.** Prueba de T para los porcentajes de germinación en semillas de quinua inoculadas y no inoculadas, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, abril – junio 2019.

Los resultados de la investigación manifiestan que la germinación es estimulada por la inoculación de *Azotobacter* sp obteniéndose los mayores porcentajes de germinación, estos resultados concuerdan con lo mencionado por Constantino et al. (2017), quien al inocular bacterias biofertilizantes entre ellas *Azotobacter* lograron



germinaciones entre el 90.28% y 88.89%, la aplicación de *Azotobacter* sp a semillas de quinua previa a la siembra, lograría mejores porcentajes de germinación, gracias a que las bacterias, no solo fijan N atmosférico, sino más bien biosintetizan sustancias activas como los aminoácidos, AIA, vitaminas y AG3 en cultivos puros (Perrig et al., 2007), asimismo lo reafirman Nezarat y Gholami (2009), afirman que al aplicar un consorcio rizobacteriano de *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas fluorescens* y *Ps. putida* en semillas de maíz, se obtuvo incrementar los porcentajes de germinación.

El efecto provechoso de las bacterias *Azotobacter* sp reside en diferentes mecanismos, como la producción de fitohormonas, antibióticos y sideróforos, induce a la resistencia vegetal y fija el nitrógeno atmosférico (Torriente, 2010). De tal manera, que el aislamiento de las bacterias diazótroficas, su tipificación mediante métodos moleculares y su capacidad de promover del crecimiento de las plantas, se constituye es una potencial alternativa para el mejoramiento de la nutrición vegetal y por ende la calidad de los cultivos, que mejorará el sistema planta – suelo – microorganismo, lo que sugiere que la inoculación bacteriana en la elongación de las raíces, dependerán de los genotipos bacterianos y de las plantas, quedando pendiente realizar más repeticiones de los ensayos.

*Azotobacter* sp, posee la capacidad de producir fitohormonas como auxinas (Vessey, 2003), un 58.65% de las 104 cepas aisladas produjo AIA, de 20 cepas seleccionadas lograron producir AIA de 2.42  $\mu\text{g/ml}$  hasta 46.47  $\mu\text{g/ml}$ , lo mismo encontró Celis y Gallardo (2008), quienes a los 6 días lograron que *Azotobacter vinelandii* produjera un máximo de 60  $\mu\text{g/ml}$  de AIA. Las bacterias estimadas con características presuntivas y muy parecidas a *Azotobacter* no produjeron AIA, por lo que en la



investigación estamos seguros de haber aislado a una especie de *Azotobacter* sp, ya que incrementó el proceso de germinación en las semillas de quinua, corroborándolo también Obando et al. (2010) quienes en bacterias diazotróficas del eucalipto, aislaron y determinaron la producción máxima de 49.57  $\mu\text{g/ml}$  de AIA; otra propiedad característica de *Azotobacter* sp inoculada en las semillas de quinua fue la capacidad que poseen para solubilizar fosfato, por lo que se les considera bacterias PGPRs (Córdova et al., 2009).

#### **4.2.2 Efecto de *Azotobacter* sp en el crecimiento de los tallos y raíces de plantas de quinua**

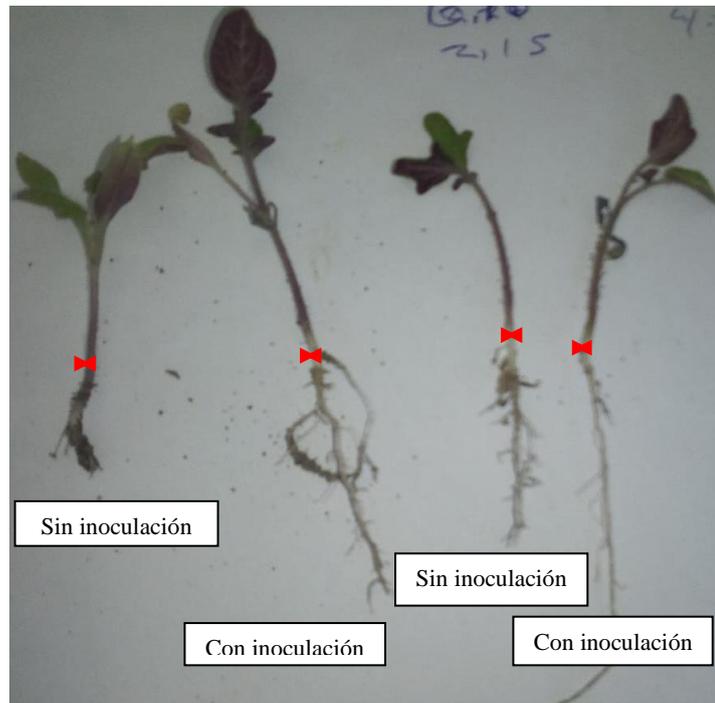
Las longitudes de las raíces de las plantas de quinua se presentó en mayor proporción al inocular  $1.5 \times 10^8$  células/ml de bacterias *Azotobacter* sp, con un promedio de 6.70 cm, siendo mayor al promedio de longitud de raíces de plantas de quinua obtenidas sin inoculación o tratamiento control, con una cifra promedio de 2.83 cm, ambos tratamientos lograron coeficientes de variabilidad de 19.40% y 30.02% para las semillas inoculadas y no inoculadas respectivamente, demostrándose así leve dispersión de los longitudes de raíces, en tal sentido los promedios son representativos de las tres repeticiones (Tabla 3).

De similar forma las longitudes de los tallos de las plantas de quinua fueron mayores al inocular bacterias *Azotobacter* sp, con un promedio de 3.43 cm, siendo mayor al promedio de longitud de tallos de plantas de quinua obtenidas sin inoculación o tratamiento control, con una cifra promedio de 2.23 cm, ambos tratamientos lograron coeficientes de variabilidad de 9.36% y 28.79% para las semillas inoculadas y no inoculadas respectivamente, demostrándose así una leve y moderada dispersión de los

longitudes de los tallos, en tal sentido los promedios son representativos de las tres repeticiones (Figura 7).

**Tabla 3.** Longitudes de tallo y raíz (cm) de plantas de quinua, cuarenta días después de ser inoculadas con  $1.5 \times 10^8$  cél./ml de *Azotobacter* sp y sin inoculación, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, abril – junio 2019.

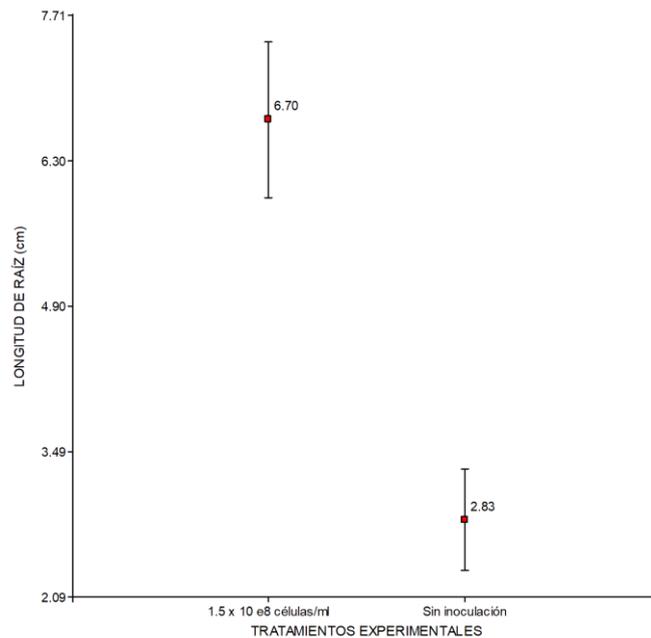
Órgano vegetal	Tratamientos (cél./ml)	Repeticiones			Promedio	CV (%)
		1	2	3		
Raíz	$1.5 \times 10^8$	5.4	8.0	6.7	6.70	19.40
	Control	2.5	3.8	2.2	2.83	30.02
Tallo	$1.5 \times 10^8$	3.2	3.3	3.8	3.43	9.36
	Control	1.5	2.7	2.5	2.23	28.79



**Figura 7.** Efecto de la inoculación de *Azotobacter* sp en el crecimiento de plantas de quinua, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, abril - junio 2019.

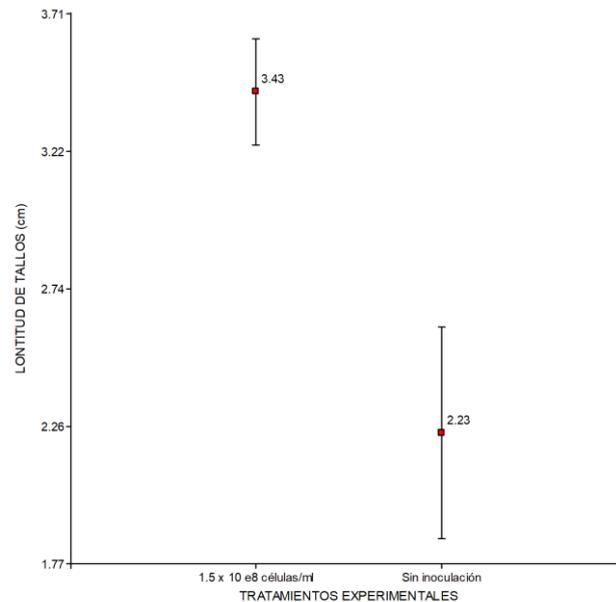
Las longitudes de las raíces en las plantas de quinua, presentaron diferencia estadística significativa entre las plantas inoculadas con  $1.5 \times 10^8$  células/ml de *Azotobacter* sp y las no inoculadas o tratamiento control, según la prueba de T de Student

( $T=4.31$ ;  $gl=4$ ;  $P=0.0125$ ) (Anexos – Figura 13), y gráficamente se presenta en la Figura 8.



**Figura 8.** Prueba de T para las longitudes de raíces en plantas de quinua inoculadas y no inoculadas, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, abril – junio 2019.

Las longitudes de los tallos en las plantas de quinua, presentaron diferencia estadística significativa entre las plantas inoculadas con  $1.5 \times 10^8$  células/ml de *Azotobacter* sp y las no inoculadas o tratamiento control, según la prueba de T de student aplicada ( $T=2.89$ ;  $gl=4$ ;  $P=0.0445$ ) (Anexos – Figura 14), y gráficamente se presenta en la Figura 9.



**Figura 9.** Prueba de T para las longitudes de tallos en plantas de quinua inoculadas y no inoculadas, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, abril – junio 2019.

La inoculación de *Azotobacter* sp en semillas germinadas de quinua y posteriormente plantas, incrementaron los valores de las longitudes de tallos y raíces, lo cual concuerda con Orozco y Martínez (2009), quienes aislaron bacterias aerobias de la rizósfera de *Pinus patula*, entre ellas fijadoras de nitrógeno a *Azotobacter chroococcum* (12.9%), y al inocularlas en *P. patula* lograron los mejores promedios en altura de las plantas con una longitud de 18.7 cm, un peso seco de sus hojas de 37.4 g, un peso seco de raíces de 16.6 g, un contenido de N en sus hojas de 0.72 g/planta, y a concentraciones de *Azotobacter* sp de  $9.0 \times 10^8$  cel./ml, logró los mejores crecimientos con respecto a la longitud total de toda la planta, asimismo, se asemeja a los resultados obtenidos por González (2015), quien al inocular *Azotobacter vinelandii* en semillas de maíz luego de 60 y 90 días originó un mayor crecimiento y aumento de la altura vegetal llegando a los 96.3 cm y 189.6 cm respectivamente.

*Azotobacter* sp para estimular la germinación y mejorar el desarrollo de las plantas



se ha adaptado desde condiciones *in vitro* hasta *in vivo* en plantas de importancia agrícola y ornamental (Tsaykelova et al., 2007), ya que promueven el crecimiento vegetal, debido a que poseen propiedades fisiológicas útiles para la colonización de la superficie radicular llevando al mejoramiento del crecimiento y la sanidad de las plantas (Cassán et al., 2009), como la producción de AIA, siendo el mecanismo principal que tiene relación con la impulso del crecimiento vegetal (Mehnaz et al., 2010).

Por su parte, Davies (1995), afirma que la hormona giberelina (AG3) es la que está encargada de estimular la elongación del tallo en las plantas y vendría siendo producida por microorganismos que la producen, como *Azotobacter* sp. (Martínez et al., 1988), sin embargo Mia et al. (2012), establecieron que la elongación del tallo a partir de semillas de arroz, luego de ser inoculadas con cepas de rizobios y bacterias diazótrofes de vida libre, y se debió a que produjeron giberelinas por parte de las bacterias, en tal sentido el efecto de las hormonas biosintetizadas por las bacterias inoculadas es el principal mecanismo de estimulación radicular, más no sería la fijación del N atmosférico; sin embargo Bashan et al. (2004) consideraron que el efecto de la fijación de nitrógeno de *Azospirillum* (otra bacteria libre fijadora de nitrógeno) en la planta realiza dicho efecto solo cuando esta alcanza estadios fenológicos más avanzados, ya que mejora la eficiencia de absorción de N en arroz (García de Salomone et al., 2010) aseveraron que el efecto hormonal de *Azospirillum*, y no el nitrógeno fijado.

En contraste Tang (1995), en un experimento de inoculación de *A. chroococcum* en semillas de *Cenchrus ciliaris* y *Panicum maximum*, comprobó que la germinación de semillas y la altura de las plantas mermaron con la inoculación bacteriana, por lo que se invocaría a una deficiente biosíntesis de fitohormonas estimulantes en la bacteria y a la



regulación de la morfogénesis radicular por el AIA (Dobbelaere et al., 1999), adicionalmente en los tratamientos inoculados con las cepas bacterianas, las variables longitud de raíz y longitud de la plúmula se deberían a la biosíntesis de aminoácidos como la glutamina y la alanina, más no a las fitohormonas (Thuler et al., 2003).

En la investigación las semillas y las plantas de quinua fueron inoculadas con bacterias *Azotobacter* sp, tanto en el proceso de germinación y crecimiento, este procedimiento se realizó con la finalidad de lograr el mayor efecto en la germinación y el crecimiento de plantas, en razón de que estimulan el incremento de la biomasa fresca y seca, siendo mayor con respecto al tratamiento control (Constantino et al., 2017), la biofertilización foliar con *Azotobacter* sp en cultivos de arroz, lograron incrementos en la producción del grano (Kannaiyan et al., 1980), no se encontraron diferencias significativas cuando se aplicó *A. chroococcum* simple, por lo que al parecer sus efectos serían mejores con combinación con otros microorganismos, lo cual se debería realizar futuros trabajos de investigación en esta línea.



## V. CONCLUSIONES

- Las bacterias *Azotobacter* sp en suelos de Jayllihuaya, Mañazo y Huancané, presentaron recuentos bacterianos con promedios de  $45.67 \times 10^4$  UFC/g,  $70 \times 10^4$  UFC/g y  $38 \times 10^4$  UFC/g respectivamente presentando diferencia estadística significativa ( $P=0.0126$ ), siendo mayor en suelos de la localidad de Mañazo.
- Las bacterias *Azotobacter* sp influyeron el proceso de germinación y crecimientos de las plantas, ya que en una concentración de  $1.5 \times 10^8$  células/ ml de bacterias, lograron un porcentaje de germinación del 76.67%, siendo superior al tratamiento control con 41.67% ( $P=0.0018$ ), asimismo fueron superiores en las longitudes de raíz logrando un promedio de 6.70 cm frente a 2.83 obtenidas en el tratamiento control ( $P=0.0125$ ) y las de los tallos se obtuvo una longitud promedio de 3.43 cm frente a 2.23 cm en el tratamiento control ( $P=0.0445$ ).



## VI. RECOMENDACIONES

- Lograr la identificación molecular de las especies de bacterias diazótrofes, en razón de que la única forma de identificar a las especies de *Azotobacter* sp es mediante el estudio de su ADN.
- Realizar experimentos de doble inoculación con *Azotobacter* sp en semillas y en plántulas a nivel foliar y así evaluar los valores de biomasa fresca y seca.
- Realizar estudios a 30 cm y 60 cm de profundidad ya que a mayor profundidad los recuentos bacterianos son mayores según el sistema de riego que se aplica a un campo de cultivo.



## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abril, R., Ruíz T., Alonso J. y Génova C. (2017). Germinación, diámetro de semillas y tratamientos pregerminativos en especies con diferentes finalidades de uso. *Agron. Mesoam.* Vol. 28 (3): 703 - 717.
- Altaf, M. y Ahmad I. (2017). In vitro and in vivo biofilm formation by *Azotobacter* isolates and its relevance to rhizosphere colonization. *Rhizosphere.* Vol. 3: 138-142. Doi: 10.1016/j.rhisph.2017.04.009.
- Alvarado, K., Blanco A., Matos K., Columbié M. y Pérez L. (2012). Influencia de la concentración y forma de aplicación del *Azotobacter chroococcum* en la obtención de posturas de cocotero (*Cocos nucifera*). Disponible en <http://ediciones.inca.edu.cu/files/congresos/2012/CD/memorias/ponencias/talleres/CMM/rc/CMM-P.28.pdf>.
- Arguello, A., Madiedo N. y Moreno L. (2016). Cuantificación de bacterias diazótrofes aisladas de suelos cacaoteros (*Theobroma cacao* L.), por la técnica de Número Más Probable (NMP). *Rev. Colomb. Biotecnol.* XVIII (2), 40 – 47.
- Avella, J. (2007). Caracterización de sepas nativas colombianas de *Azotobacter* spp mediante el análisis de restricción de ADN ribosomal.
- Baca, B., Soto L. y Pardo M. (2000). Fijación biológica de nitrógeno. *Elementos.* Vol. 38: 43-49.
- Balandreau, J. (1986). Ecological factors and adaptative processes in N<sub>2</sub> - fixing bacterial populations of the plant environment. *Plant Soil.* Vol. 90: 73.
- Barea, J. (2000). Rhizosphere and mycorrhiza of field crops. In: biological resource management: connecting science and policy (OECD). J. Toutnat, E. Balazs, E. Galante, M. Lynch S. Schepers, D. Werner y A. Werry (eds): INRA, Editions and Spinger. 110 – 125.
- Barea, J., Azcon R. y Azcon C. (2005). Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. In: *Microorganism on soil: Roles in genesis and functions.* F. Buscot, S. Varma (eds): Heidelberg Alemania: Spinger – Verlag. 195-212.
- Bashan, Y., Holguin G. y De Bashan L. (2004). *Azospirillum* - plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances. *Can. J. Microbiol.* Vol. 50: 521.



- Bazán, R. (2017). Manual de procedimientos de los análisis de suelos y agua con fines de riego. Instituto Nacional de Innovación Agraria, Ministerio de Agricultura. Lima – Perú. 92 p.
- Bécquer, C., Salas B., Slaski J., Archambault D. y Anya A. (2013). Influencia de bacterias rizosféricas en la germinación y crecimiento inicial de *Sporobolus cryptandrus* (Torr.) A. Gray. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. Vol. 47 (4): 431 - 436.
- Bécquer, C., Lazarovits G., Nielsen L., Quintana M., Adesina M., Quigley L., Lalin I. y 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.
- Bowen, D. y Rovira A. (1999). The Rhizosphere and its management to improve plant growth. Adv. Agron. Vol. 66: 1-102.
- Bruinsma, J. (2003). World agriculture: Towards 2015/2013 en FAO perspective. Rome: FAO.
- Cárdenas, D., Garrido M., Bonilla R. y 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. y 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. y Mera A. (2010). Fertilización biológica: técnica de vanguardia para el desarrollo agrícola sostenible. Producción + Limpia. Vol. 5 (2): 77.
- Cassán, F., Perriga D., Sgroya V., Pennab C. y Luna V. (2009). *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). European J. Soil Biol. Vol. 45: 28.
- Celis, L. y Gallardo I. (2008). Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) en cultivos microbianos. Tesis Microbiólogo Agrícola y Veterinario. PUJ.
- Constantino, M., Gómez R., Álvarez J., Pat J. y Espín G. (2017). Efecto de la biofertilización y los biorregulares en la germinación y el crecimiento de Carica Papaya L. Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XII (2): 103 - 115.
- Córdova, Y., Rivera M., Ferrera R., Obrador J. y Córdova V. (2009). Detección de bacterias benéficas en suelo con banano (*Musa* AAA Simmonds) cultivar Gran



- enano y su potencial para integrar un biofertilizante. *Revista Publicaciones Uciencia. Universidad y Ciencia, México*. Vol. 25 (3): 253 – 265.
- Coyne, M. (2000). *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio*. Editorial Paraninfo. ITP An International Thomson Publishing company. Madrid – España. 416 p.
- Chennappa, G., Adkar C., Suraj U., Tamilvendan K. y Sreenivasa M. (2014). Pesticide tolerant *Azotobacter* isolates from paddy growing areas of northern Karnataka, India. *World J. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 30: 1-7.
- Chong, C., Bible B. y Hak - Yoon J. (2002). Germination and emergence. In Pessarakli M. *Handbook of plant and crop physiology*. New York: Marcel Dekker Inc. 85 - 146.
- Davies, P. (1995). The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In Davies D. *PLant hormones: physiology, biochemistre and Molecular Biology*. The Netherlands: Kluwer Academic Press.
- Dawwam, E., Elbeltagy A., Emara M., Abbas H. y Hassan M. (2013). Beneficial effect of plant growth promoting bacteria isolated from the roots of potato plant. *Annals of Agricultural Sciences*. Vol. 58 (2): 195-201.
- Desnoues, N., Lin M., Guo X., Ma L., Carreño R. y Elmerich C. (2003). Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice. *Journal of Microbiology*. Vol 149: 2251–2262.
- Di-Benedetto, A., Corbo M., Campaniello D., Cataldi M., Bevilacqua A., Sinigaglia M. y Flagella Z. (2017). The role of plant growth promoting bacteria in improving nitrogen use efficiency for sustainable crop production: a focus on wheat. *AIMS Microbiol.* Vol. 3: 413-434. Doi: 10.3934/microbiol.2017.3.413.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs A., Thys A., Vande A., Vanderleyden J. (1999). Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil*. Vol. 212: 155.
- Doria, J. (2010). Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales*. Vol. 31 (1): 74-85.
- Escobar, C., Horna Y., Carreño C. y 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*. Vol. 2: 39-49.
- Espín, G. (2000). Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de México. Disponible desde 2016.
- Farajzadeh, D., Yakhchal B., Aliasgharзад N. y Sokhandan N. (2009). Isolation and



- identification of micro - organisms in isolation media for *Azotobacteria*. Unpublished.
- Fernández, M., De Felipe N. y De Felipe M. (2002). Fijación biológica de nitrógeno: factores limitantes. *Rev. Ciencia y Medio Ambiente*. CCMA – CSIC. 195 – 202.
- Fernández, L., Rojas N., Roldán T., Ramírez M., Zegarra H., Uribe R. et al. (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicados a la remediación de sitios contaminados. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México D. F. 180 p.
- Fialho, A., Zielinski N., Fett W., Chakrabarty A. y Berry A. (1990). Distribution of alginate gene sequences in the *Pseudomonas* rRNA homology grupo I - *Azomonas* - *Azotobacter* lineage of superfamilia B procariotes. *Appl. Environ. Microbiolog.* Vol. 56: 436-443.
- Frioni, L. (1999). Procesos microbianos. Editorial Plant and Soil. Córdoba – Argentina.
- García de Salomone, I., Di Salvo L., Escobar J., Boa P., Urquiaga S. y 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*. Vol. 336: 351.
- Gauri, S., Mandal S. y Pati B. (2012). Impact of *Azotobacter* exopolysaccharides on sustainable agriculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 95: 331-338.
- González, M. y López J. (1986). Production of auxinas, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter vinelandii*. ATCC12837, in chemically defined media and dialyzed soil media. New York, EU. McGraw-Hil: 119-120.
- 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. Ecuador. 102 p.
- Gryndler, M. (2000). Interactions of arbuscular micorrhizal fungi with other soil organism. In: *Arbuscural micorrizas: physiology and function*. Y. Kapulnick & D. Douns Jr. (eds). Kluwer Academic Press. 239-262.
- Hartmann, Z. y Zimmer W. (1993). Physiology of *Azospirillum*. In: *Azospirillum/plant Associations* Boca Ratón: CRC Press.
- Hernández, A., Heydrich M., Velázquez M. y Hernández N. (2006). Perspectivas del empleo de rizobacterias como agentes de control biológico en cultivos de



- importancia económica. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol. 24 (1): 42-49.
- Hitchins, V. y 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. y Dawes E. (1983). Studies of some enzymes of aliginic acid biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* grown in continuous culture USA.
- Ibañez, V. (2009). *Métodos estadísticos*. Maestría en Ganadería Andina. Escuela de Post Grado, Universidad Nacional del Altiplano. Editorial Universitaria. Puno – Perú. 582 p.
- Jadin, P. y Jacquemart P. (1978). Effet de l'irrigation sur la précocité des jeunes cacaoyers. *Café Cacao*. Vol. 22 (1): 31-35.
- Kannaiyan, S., Govindarajan K. y Lewin H. (1980). Effect of foliar spray of *Azotobacter chroococcum* on rice crop. *Plant and Soil*. Vol. 6: 487 - 490.
- Koornneef, M., Bentsink L. y Hilhorst S. (2002). Seed dormancy and germination. *Plant Biol.* Vol. 5: 33 - 36.
- Kurdish, I., Bega Z., Gordienko A. y Dyrenko D. (2008). The effect of *Azotobacter vinelandii* on plant seed germination and adhesion of these bacteria to cucumber roots. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya*. Vol. 4: 442.
- Lara, C. y Oviedo L. (2007). Evaluación de bacterias nativas de la zona de Córdoba, con capacidad fijadora de nitrógeno y secetora de ácido indoacético (AIA), en pasto Angletón (*Dichanthium aristatum*). Informe final de Investigación. Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba. Colombia.
- Laura, Y., Moreno Y. y Galvis F. (2013). Potencial biofertilizante de bacterias diazótroficas aisladas de muestra de suelo rizosférico. *Pastos y Forrajes*. Vol. 36 (1).
- León, J. (2003). Cultivo de la quinua en Puno – Perú, descripción, manejo y producción. Texto universitario de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Altiplano. Puno – Perú. 62 p.
- Lin, L. y Sadoff H. (1968). Encystment and polymer production of *Azotobacter vinelandii* in the presence of B - hidroxibutirato Londres.
- Lozada, L. y Rivas C. (2010). Evaluación del efecto de la inoculación con *Azotobacter* spp en plantas de ají dulce (*Capsicum frutescens*). Trabajo de grado de Técnico Superior Agrícola. Departamento de Ciencias Agrarias, Universidad de Los Andes. Colombia. 56 p.



- Mantilla, A., Cardona G., Peña C., Murcia U., Rodríguez M. y Zambrano M. (2009). Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia Colombiana. *Revista de Biología Tropical*. Vol. 57 (4): 915-927.
- Marques, M., Da Silva F., Vollú E., De Lacerda M., Blank F., Smalla K. y Seldin, L. (2015). Bacterial endophytes of sweet potato tuberous roots affected by the plant genotype and growth stage. *Applied Soil Ecology*. Vol. 96 (1): 273-281.
- Martínez, M., Ortega R. y Fincheira, P. (2018). Use of organic amendments in table grape: effect on plant root system and soil quality indicators. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* Vol. 18 (1): 100-112.
- Martínez, I., Little R., Shearer N., Johnson P. y Dixon R. (2005). Nitrogen fixation: key genetic regulatory mechanisms *Biochemical Society Transactions*. Vol. 33. Part 1.
- Martínez, M., De la Rubia T., Moreno J. y Gonzáles J. (1988). Root exudates of *Zea mays* and production of auxins, gibberelins and cytokinins by *Azotobacter chroococcum*. *Plant Soil*. Vol. 110: 149.
- Mayea, S., Carone M., Novo R., Boado I., Silveria E., Soria M. et al. (1998). Aplicaciones de la Microbiología Agropecuaria Cuba: Félix Valer.
- Mehnaz, S., Kowalik T., Reynolds B. y Lazarovits G. (2010). Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field condition. *Soil Biol & Biochem*. Vol. 42: 1848.
- Melloni, R., Nóbrega R., Moreira F. y Siqueira J. (2004). Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxite, em reabilitação. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. Vol. 28 (1): 85-93.
- Mezei, M., Popović M., Kovačev L., Mrkovački N., Nagl N. y Malenčić D. (1997). Effect of *Azotobacter* strains on sugar beet callus proliferation and nitrogen metabolism enzymes. *Biol. Plant*. Vol. 40: 277-283. Doi:10.1023/A:1001028922433.
- Mia, M., Shamsuddin, Z. y Mahmood M. (2012). Effects of rhizobia and plant growth promoting bacteria inoculation on germination and seedling vigor of lowland rice. *African J. Biotechnol.* Vol. 16: 3758.
- MINAM, Ministerio del Ambiente – Perú. (2014). Guía para el muestreo de suelos. Dirección General de Calidad Ambiental. Ministerio del Ambiente. Lima – Perú. 72 p.
- Monib, M., Abd-el-Malek Y., Hosny I. y Fayez M. (1979). Effect of *Azotobacter* inoculation on plant growth and soil nitrogen. *Zentralbl. Bakteriol. Naturwiss.* Vol.



- 134 (2): 140-148. Doi:10.1016/S0323-6056(79)80040-3.
- Montenegro, S., Gómez S. y 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.
- Nezarat, S. y Gholami A. (2009). Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving seed germination seedling growth and yield of maize. Pakistan Journal of Biological Science. Vol. 12: 26-32.
- Nogales, B. (2005). Microbiología del suelo en la era de la biología molecular: Descubriendo la punta del iceberg. Ecosistemas. Vol. 2: 1-10.
- Nour, S., Cleyet J., Beck D., Effosse A. y Fernandez M. (1994). Genotypic and phenotypic diversity of *Rhizobium* isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.). Can. J. Microbiol. Vol. 40: 345 - 354.
- Obando, D., Burgos L., Rivera D., Rubiano M., Diván D. y Bonilla R. (2010). Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, César (Colombia). Acta Biológica Colombiana. Vol. 15: 107 - 120.
- Obregón, P. (2007). Agricultura y ganadería. Disponible en [www.monografias.com/trabajos59/bioquimicagerminacion/bioquimica-germinaci\\_on2.shtml](http://www.monografias.com/trabajos59/bioquimicagerminacion/bioquimica-germinaci_on2.shtml).
- Ogata, K., Arellano C. y Zúñiga D. (2008). Efecto de diferentes bacterias aisladas de rizófera de *Caesalpinia spinosa* en la germinación de diferentes especies vegetales cultivados. Zonas Áridas. Vol. 12: 137-153.
- Ormeño, M. y 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, p. 6.
- Orozco, A., Valverde M., Martínez R., Chávez C. y Benavides R. (2016). Propiedades físicas, químicas y biológicas de un suelo con biofertilización cultivado con manzano. Terra Latinoamericana. Vol. 34 (4): 441 – 456.
- Orozco, C. y 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. y Shivprasad D. (1991). *Azotobacter salinestris* sp nov., a sodium - dependent, microaerophilic, and aeroadaptative nitrogen fixing bacterium. J. Syst. Bacteriol.



- Vol. 41: 369-376.
- Pedraza, O., Teixeira K., Fernández A., García I., Baca B., Azcón R. et al. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. Corpoica Cienc. Tecnol. Agropec. Vol. 11: 155-164. Doi: 10.21930/rcta.vol11\_num2\_art:206.
- Pérez, J. y Sánchez D. (2017). Caracterización y efecto de *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* asociadas a *Ipomoea batatas* del Caribe Colombiano. Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XIX (2): 35 – 46.
- Perín, L., Martínez L., Castro R., Estrada P., Cabellos T., Guedes H., Resi V. y Caballero J. (2006). Diazotrophic *Burkholderia* Species Associated with Field-Grown Maize and Sugarcane. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 72 (5): 3103-3110.
- Perrig, D., Boiero L., Masciarelli O., Penna C., Ruíz O., Cassan F., et al. (2007). Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formulation. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 75: 1143 - 1150.
- Prashar, P., Kapoor N. y Sachdeva S. (2014). Rhizosphere: Its structure, bacterial diversity and significance. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. Vol. 13: 63-77. Doi: 10.1007/s11157-013-9317-z.
- Quinoa.pe. (2014). Portal de información. <https://www.agraria.pe/noticias/lanzan-portal-quinuape-4053>.
- Ramos, F. (1992). Genética de la regulación de la asimilación de nitrato en *Azotobacter vinelandii* Sevilla - España.
- Rico, M. (2009). Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género *Azotobacter* y Actinomicetos aislados de cultivos de *Solanum tuberosum* Linnaeus, 54 1753 (papa) cultivados en zonas altoandinas del Perú. Tesis de Biólogo. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de San Marcos. Lima – Perú.
- Sánchez, B. y Pérez J. (2018). Caracterización y evaluación de PGPRs sobre el crecimiento de plántulas de *Dioscorea rotundata* in vitro. Agronomía Costarricense. Vol. 42 (2): 75-91. Doi:10.15517/rac.v42i2.33780.
- Sashidhar, B. y Podile R. (2009). Transgenic expression of glucose dehydrogenase in *Azotobacter vinelandii* enhances mineral phosphate solubilization and growth of sorghum seedlings. Microbial biotechnology. Vol. 2 (4): 521-529.
- Selvakumar, G., Reetha, S. y Thamizhiniyan, P. (2012). Response of biofertilizers on growth, yield attributes and associated protein profiling changes of blackgram



- (*Vigna mungo* L. Hepper). World Applied Sciences Journal. Vol. 16 (10): 1368-1374.
- Shikina, P. (1961). Effect of organo-mineral and bacterial fertilizers on yield utilization and quality of potato tubers. Izv. Akad. Nauk. Kazakh. SSR. Sev. Bot. Pochvobed. Vol. 4: 3-14.
- Suárez, D. y Melgarejo L. (2010). Research Gate. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/258627099\\_BIOLOGIA\\_Y\\_GERMINACION\\_DE\\_SEMILLAS](https://www.researchgate.net/publication/258627099_BIOLOGIA_Y_GERMINACION_DE_SEMILLAS).
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2006). Fisiología vegetal. Plant physiology. 4th ed. Sunderland, MA. Sianuer Associates Inc., p. 1338.
- Tang, M. (1995). Efecto de la inoculación con *Azotobacter chroococcum* en la germinación y altura de las plántulas en dos leguminosas y dos gramíneas. Pastos y forrajes. Vol. 18: 145.
- Tejera, N., Lluch C., Martínez M. y González J. (2005). Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. Plant and Soil. Vol. 27.
- Thuler, D., Floh E., Handro W. y Barbosa H. (2003). *Beijerinckia dextrii* releases plant growth regulators and amino acids in synthetic media independent of nitrogenase activity. J. Appl. Microbiol. Vol. 95: 799.
- Torriente, D. (2010). Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de la caña de azúcar. Perspectivas de su uso en Cuba. Cultivos Tropicales. Vol. 31 (1): 19.
- Torsvik, V., Daae F., Sandaa R. y Ovreans L. (1998). Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. Journal. Biotechnology. Vol. 64: 53-62
- Torsvik, V., Goksoyr J. y Daae F. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. Applied. Environmental Microbiology. Vol. 56: 782-787.
- Tsavkelova, E., Cherdyntseva T., Botina S. y Netrusov A. (2007). Bacteria associated with orchid roots and microbial producción of auxin. Microbiol. Res. Vol. 95: 69.
- Velandia, K. (2016). Aislamiento y caracterización de bacterias diazotróficas en cultivos de caña panelera de las regiones del occidente de Cundinamarca y la hoya del Río Suarez. Tesis de Magíster en Microbiología. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá – Colombia. 154 p.
- Vélez, L. y Orellana H. (2010). Evaluación de cepas de *Azotobacter* spp. en el cultivo de



- lechuga (*Lactuca sativa* var. Green Salad Bowl). Tumbaco. Pichincha. XII Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Central del Ecuador.
- Vessey, J. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*. Vol. 255: 571 - 586.
- Yasmin, F., Othman R., Sijam K. y Saad S. (2010). Characterization of beneficial properties of plant growth-promoting rhizobacteria isolated from sweet potato rhizosphere. *African Journal of Microbiology Research*. Vol. 3 (11): 815-821.
- Zhang, Z., Schwartz S., Wagner L. y Miller W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* Vol. 7: 203 - 214.
- Zula, A., Navarro A. y Moreno L. (2014). Evaluación del potencial biofertilizante de bacterias diazotróficas aisladas de suelos con cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta Agronómica - Colombia*. Vol. 63 (3).

## ANEXOS



**Figura 10.** Compuestos químicos utilizados para preparar el medio mineral sin nitrógeno para el aislamiento de bacterias *Azotobacter* sp.

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RECuento DE BACTERIAS	9	0.77	0.69	17.98

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1674.89	2	837.44	9.88	0.0126
ZONAS DE MUESTREO	1674.89	2	837.44	9.88	0.0126
Error	508.67	6	84.78		
Total	2183.56	8			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=23.06692

Error: 84.7778 gl: 6

ZONAS DE MUESTREO	Medias	n	E.E.
Mañazo	70.00	3	5.32 A
Jayllihuaya	45.67	3	5.32 B
Huancané	38.00	3	5.32 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Figura 11.** ANDEVA y prueba de Tukey de recuento de bacterias *Azotobacter* sp en las zonas de muestreo de Jayllihuaya, Mañazo y Huancané, enero – marzo, 2019.

### Prueba T para muestras Independientes

Variable: % GERMINACIÓN - Clasific: TRATAMIENTO - prueba: Bilateral

	Grupo 1	Grupo 2
	Con inoculación	Sin inoculación
n	3	3
Media	76.67	41.67
Media (1) - Media (2)	35.00	
LI (95)	21.91	
LS (95)	48.09	
pHomVar	0.2500	
T	7.42	
gl	4	
p-valor	0.0018	

**Figura 12.** Prueba de T de la germinación de semillas de quinua inoculadas con bacterias *Azotobacter* sp y no inoculadas, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, abril - junio 2019.

Prueba T para muestras Independientes

Variable:Raíz - Clasific:Tratamientos - prueba:Bilateral

	Grupo 1	Grupo 2
	1.5 x 10 e8	Control
n	3	3
Media	6.70	2.83
Media (1)-Media (2)	3.87	
LI (95)	1.38	
LS (95)	6.36	
pHomVar	0.5994	
T	4.31	
gl	4	
p-valor	0.0125	

**Figura 13.** Prueba de T de las longitudes de raíces de plantas de quinua inoculadas con bacterias *Azotobacter* sp y no inoculadas, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, abril - junio 2019.

Prueba T para muestras Independientes

Variable:Tallos - Clasific:Tratamientos - prueba:Bilateral

	Grupo 1	Grupo 2
	1.5 x 10 e8	Control
n	3	3
Media	3.43	2.23
Media (1)-Media (2)	1.20	
LI (95)	0.05	
LS (95)	2.35	
pHomVar	0.4000	
T	2.89	
gl	4	
p-valor	0.0445	

**Figura 14.** Prueba de T de las longitudes de tallos de plantas de quinua inoculadas con bacterias *Azotobacter* sp y no inoculadas, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, abril - junio 2019.



**Figura 15.** Batería de reactivos para realizar la tinción Gram.



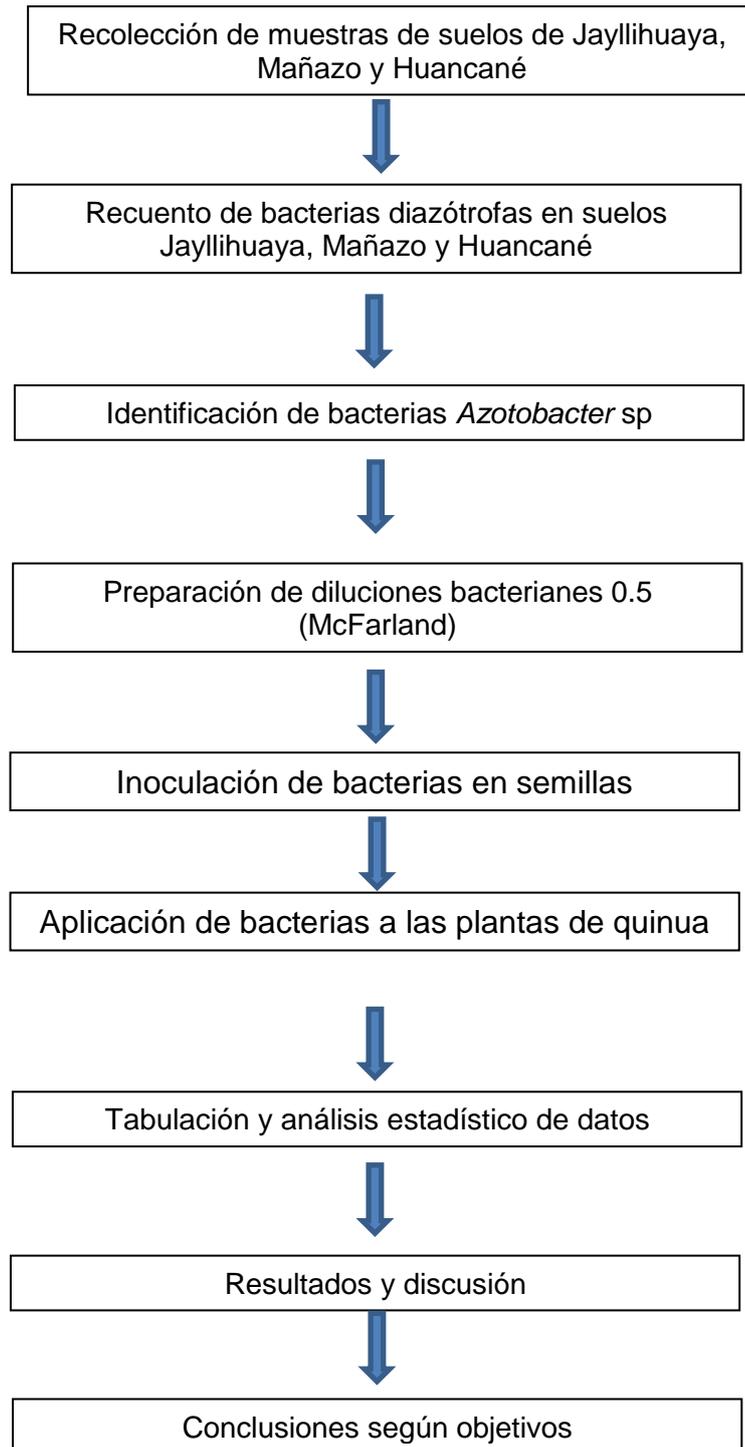
**Figura 16.** Tinción de frotices de extendidos de bacterias diazótroficas.



**Figura 17.** Cultivo puro de *Azotobacter* sp en medio mineral sin nitrógeno, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, enero – marzo 2019.



**Figura 18.** Preparación de soluciones inoculantes de bacterias *Azotobacter* sp mediante la técnica de McFarland.



Flujograma del trabajo de investigación



*Universidad Nacional del Altiplano de Puno*

Facultad de Ciencias Biológicas  
Escuela Profesional de Biología  
Programa Académico de Microbiología y Laboratorio Clínico  
Laboratorio de Microbiología de los Alimentos



## CONSTANCIA

LA QUE SUSCRIBE, JEFE DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNA – PUNO.

HACE CONSTAR:

Que la Bachiller **ROXANA IRQUINIGO QUENTA**, egresada de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, ha realizado su trabajo de investigación titulado: “**BACTERIAS DIAZÓTROFAS DEL GÉNERO *Azotobacter* Y SU EFECTO EN EL CRECIMIENTO DE QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd.) HASTA LA FASE DE RAMIFICACIÓN EN CONDICIONES DE LABORATORIO**”, en el laboratorio de Microbiología de los Alimentos, del Programa Académico de Microbiología y Laboratorio Clínico de la Escuela Profesional de Biología, entre los meses de setiembre a diciembre del 2018.

Se le expide la presente Constancia a solicitud de la interesada para los fines que se estime por conveniente.

Puno, 12 de julio del 2019.



Biól. M. Sc. **EVA LAURA CHAUCA DE MEZA**  
Jefe de Laboratorio de Microbiología de los Alimentos  
FCCBB – UNA Puno

**Constancia de ejecución de tesis.**