

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**AISLAMIENTO DE BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS EN SUELOS DE
CULTIVO, VIRGEN Y HUMUS DE LOMBRIZ DEL DISTRITO DE PUNO Y
SU EFECTO *IN VITRO* EN LA GERMINACIÓN DE LA QUINUA
(*Chenopodium quinoa* WILLD.)**

TESIS

PRESENTADA POR:

Br. JANET EMILIA GOITIA SARZOSO

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PUNO – PERÚ

2014

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

AISLAMIENTO DE BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS EN SUELOS DE
CULTIVO, VIRGEN Y HUMUS DE LOMBRIZ DEL DISTRITO DE PUNO Y
SU EFECTO *IN VITRO* EN LA GERMINACIÓN DE LA QUINUA
(*Chenopodium quinoa* WILLD.)

TESIS

PRESENTADA POR:

Br. JANET EMILIA GOITIA SARZOSO

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

APROBADO POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:


PRESIDENTE


: Ph. D. Sabino Atencio Limachi

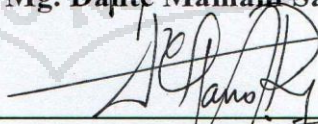
PRIMER MIEMBRO


: Blgo. Félix Rodríguez Díaz

SEGUNDO MIEMBRO


: Mg. Dante Mamani Sairitupa

DIRECTOR DE TESIS


: Mg. Juan José Pauro Roque

ASESORA DE TESIS


: Mg. Martha Elizabeth Aparicio Saavedra

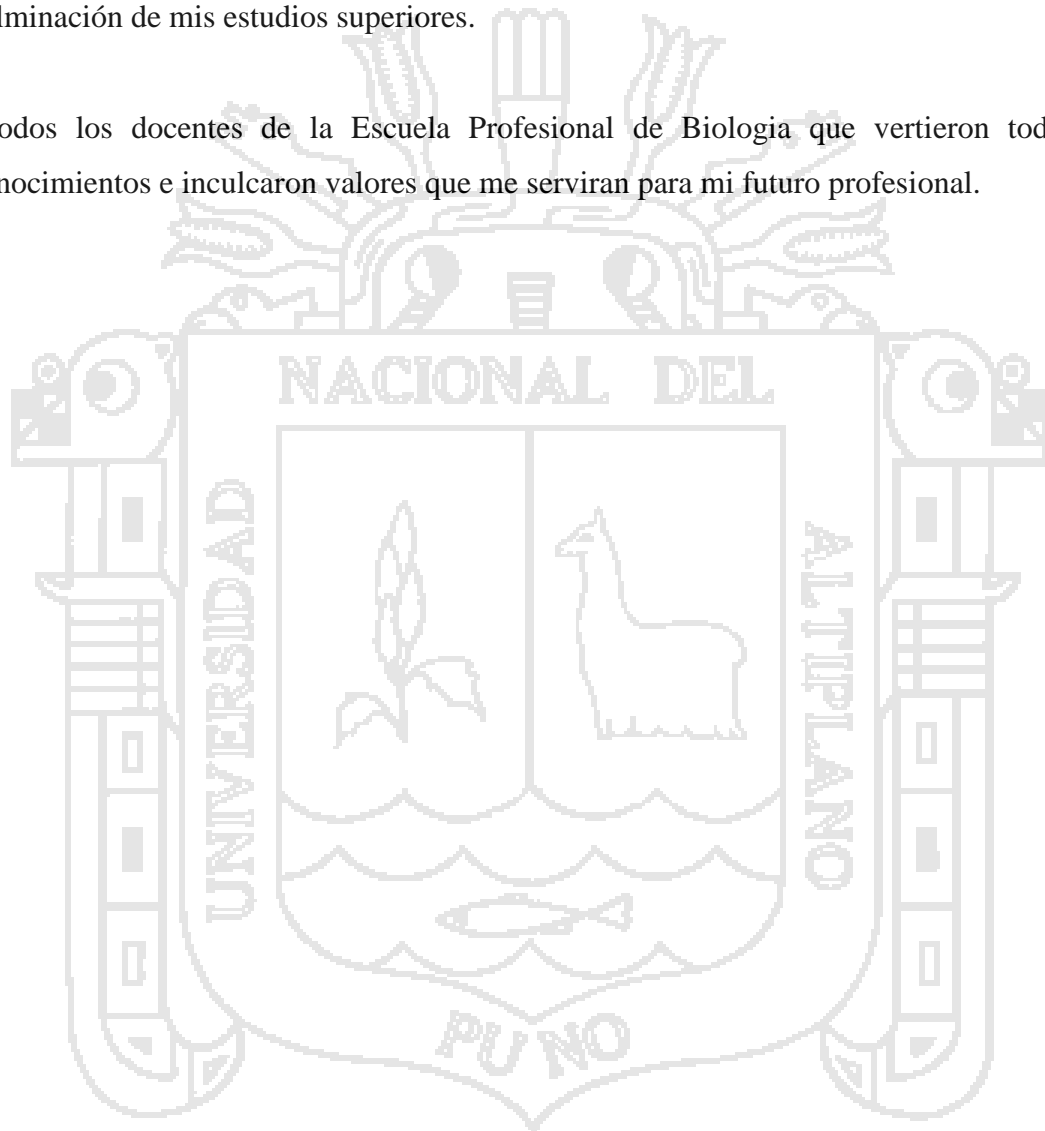
ÁREA: Aprovechamiento de los recursos naturales.

AGRADECIMIENTO

A Dios, ser maravilloso ya que me dio la fortaleza y temple para culminar satisfactoriamente la profesión que elegí y poder desenvolverme en la sociedad.

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

A todos los docentes de la Escuela Profesional de Biología que vertieron todos sus conocimientos e inculcaron valores que me sirvan para mi futuro profesional.



DEDICATORIA

*Este trabajo de investigación está dedicado
A mi querido padre Sr. Esteban Goitia R.
Que me cuida desde el cielo y querida madre
Sra. Dominga Sarzoso V. que nunca permitió
Que desista de mis estudios.*

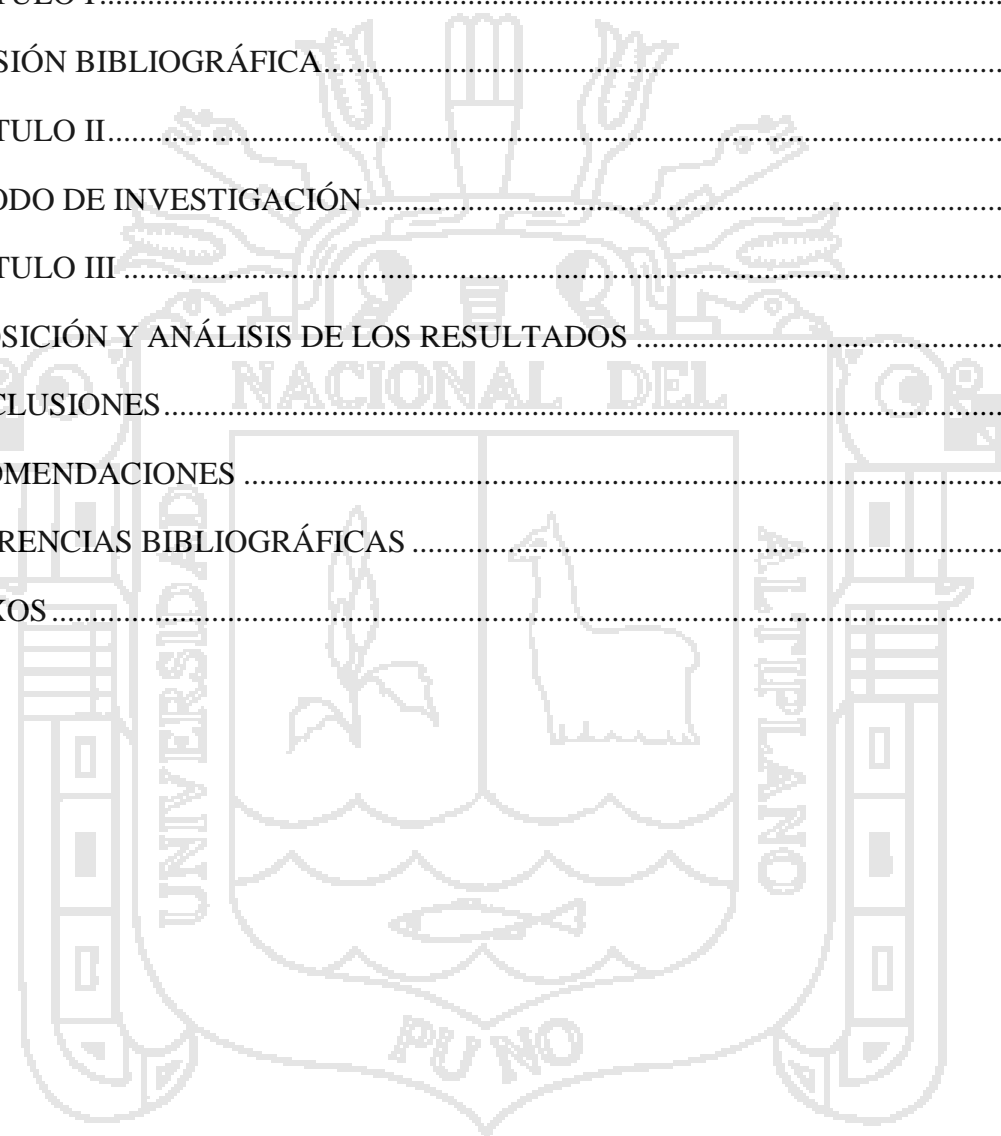
*A mis hermanas Melani, Mishell, Sara
Y Angely, que este trabajo sirva de guía
Para que ellas culminen sus metas trazadas*

*A mi esposo compañero fiel que fue mi apoyo
Incondicional en la culminación de este trabajo
A mis queridos hijos, Dylan, Jeroldy y Lucas que
son mi fortaleza en esta vida.*



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
CAPÍTULO II.....	32
MÉTODO DE INVESTIGACIÓN.....	32
CAPÍTULO III.....	39
EXPOSICIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	39
CONCLUSIONES.....	51
RECOMENDACIONES.....	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
ANEXOS.....	58



RESUMEN

La investigación se realizó en la ciudad de Puno, durante los meses de setiembre, octubre y noviembre del año 2014. Conociendo las fases fenológicas de la quinua desde la germinación de las hojas cotiledonales a los 7 días, formación de sus hojas verdaderas a los 35-45 días, formación de su panoja a los 60 días, su floración a los 90 días y formación de grano maduro a los 180 días. Los objetivos fueron: a) Aislar la carga de bacterias diazotróficas en muestras de suelo cultivado, suelo de “tierra virgen” y en biofertilizante (humus de lombriz) y b) Evaluar el efecto *in vitro* de las bacterias diazotróficas en el proceso de germinación, formación de raíces y longitud total de la plántulas de quinua en 15 días de tratamiento. La metodología consistió en determinar la carga bacteriana diazotrófica presente en muestras de suelo de campo de cultivo continuo, “tierra virgen” y humus de lombriz, mediante el método del número más probable (NMP/g), la cepa aislada de la bacteria diazotrófica, posteriormente fue inoculada a las semillas de quinua para evaluar su efecto en la germinación y crecimiento de raíces, primeras hojas y longitud total durante 15 días en condiciones controladas *in vitro*, los análisis de bacterias se contrastaron mediante la aplicación de pruebas de análisis de varianza, y prueba de Tukey. Los resultados obtenidos fueron, que las tres muestras de sustratos evaluados (suelo de cultivo, suelo virgen y humus de lombriz), presentaron cargas microbianas de bacterias diazotróficas superiores a 110×10^2 y 240×10^2 NMP/g de sustrato, los cuales influyeron marcadamente en el proceso de germinación y crecimiento vegetal, observándose el resultado a los cuatro días de tratamiento *in vitro*. Estadísticamente se determinó que la inoculación con bacterias diazotróficas en las semillas de quinua estimularon una rápida germinación y un mejor crecimiento en las raíces, primeras hojas cotiledonas y longitud total de la plántula en 7 días de tratamiento *in vitro*, en comparación con las semillas no inoculadas. La bacteria diazotrófica aislada en los sustratos evaluados corresponden a individuos del género *Azotobacter*, ya que presentaron una coloración Gram negativa, formas ovaladas y una reacción catalasa positiva.

INTRODUCCIÓN

Las poblaciones de bacterias en el suelo no se distribuyen al azar. Factores como la composición de los suelos, la materia orgánica, el pH, el agua y la disponibilidad de nutrientes, oxígeno, junto con la planta huésped, desempeñan un papel importante. La concentración de bacterias por gramo de suelo que se halla alrededor de las raíces de las plantas cultivadas, en la llamada rizósfera, es mucho mayor que en el resto del suelo, esto se puede deber a los altos niveles de nutrientes que se hallan en la zona que rodea a las raíces que permiten el desarrollo de poblaciones microbianas específicas.

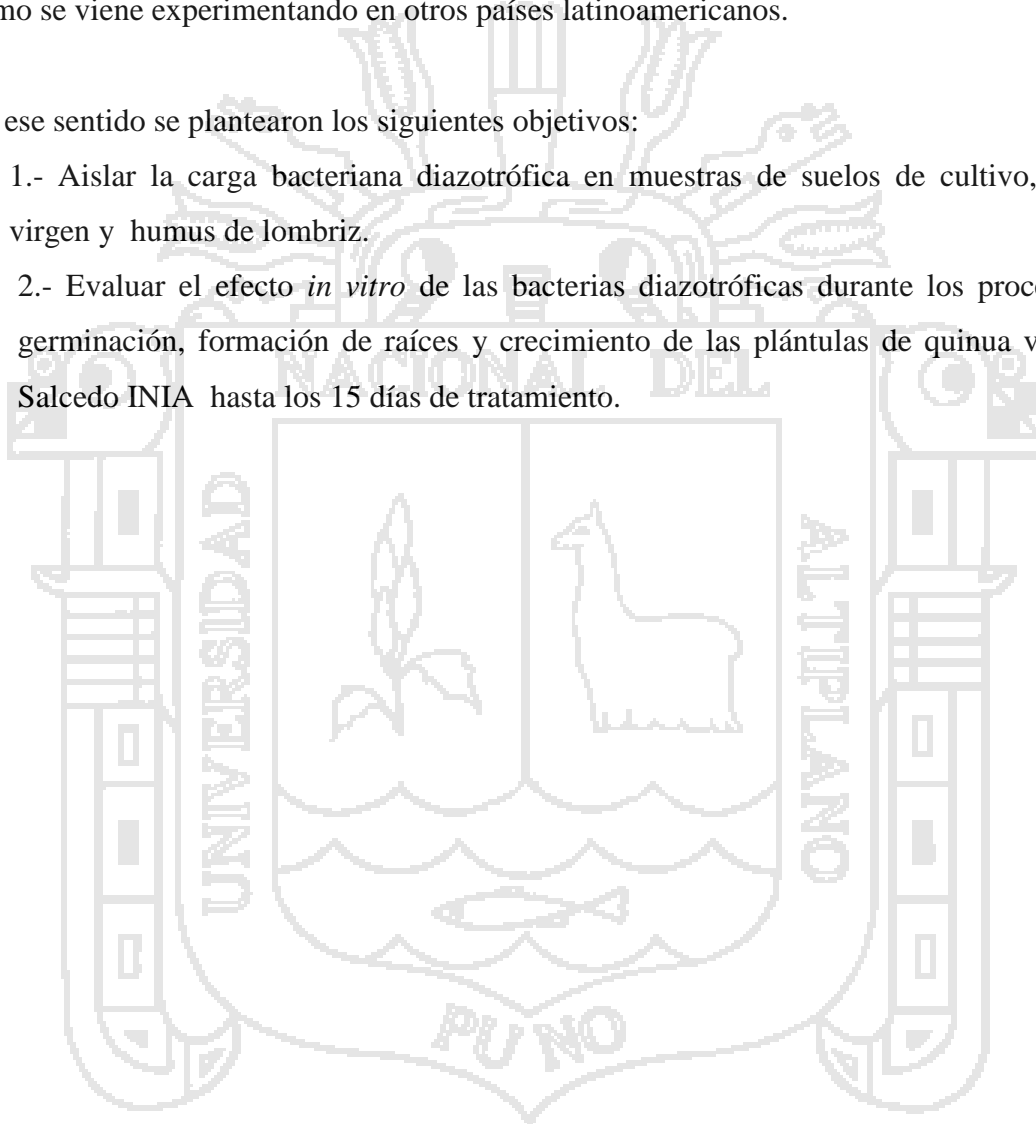
La rizósfera es el volumen de suelo influenciado por la presencia de raíces de una planta viva, cuya extensión puede variar de acuerdo al tipo de suelo, la especie de planta, su edad y otros factores. Los inoculantes microbianos a base de bacterias diazotróficas, constituyen una alternativa eficaz al uso de fertilizantes nitrogenados (Pedraza *et al.*, 2010). Estas bacterias tienen la capacidad de reducir el nitrógeno atmosférico, donde se encuentra como nitrógeno elemental de forma ilimitada, y hacerlo disponible para los cultivos. Los fijadores de nitrógeno pueden interactuar de forma simbiótica con la planta, como en el caso rizobio – leguminosa, o comportarse como diazótrofos asociativos (Atlas y Bartha, 2002).

Aunque las potencialidades de las bacterias diazotróficas ofrecen perspectivas prometedoras, la ausencia de cepas autóctonas caracterizadas en cuanto a sus mecanismos de acción imposibilitó hasta hoy, la obtención de productos eficientes que puedan ser aplicados para mitigar el deterioro ambiental causado por el uso excesivo de insumos químicos y para lograr la producción sostenible del cultivo de quinua. Los agricultores del Altiplano Peruano, poseen mucha esperanza de obtener buena producción en suelos con “tierras vírgenes” debido al contenido de materia orgánica que poseen, asimismo algunos adquieren biofertilizantes como el humus de lombriz para abonar sus plantas. Pero las bondades de estos dos componentes (tierras vírgenes y humus de lombriz), se debería a la presencia de bacterias diazotróficas, ya que el desarrollo vegetal es mejor.

En tal sentido, la presencia de bacterias diazotróficas en un campo de cultivo es de vital importancia para el normal desarrollo de las plantas, es por ello que se plantea la evaluación de la carga bacteriana diazotrófica presente en un campo de cultivo de uso continuo, comparándolos con las cargas bacterianas diazotróficas de suelos con “tierra virgen” y el humus de lombriz; posteriormente observar el efecto de éstas bacterias en el proceso de germinación de semillas de quinua, con la finalidad posterior de promocionar la aplicación de éstas bacterias benéficas en los campos de cultivo de quinua de la región y el país, tal como se viene experimentando en otros países latinoamericanos.

En ese sentido se plantearon los siguientes objetivos:

- 1.- Aislar la carga bacteriana diazotrófica en muestras de suelos de cultivo, suelo virgen y humus de lombriz.
- 2.- Evaluar el efecto *in vitro* de las bacterias diazotróficas durante los procesos de germinación, formación de raíces y crecimiento de las plántulas de quinua variedad Salcedo INIA hasta los 15 días de tratamiento.



CAPÍTULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 ANTECEDENTES

Claros *et al.* (2000), luego de realizar los primeros reportes de aislamiento de bacterias y hongos endófitos en el cultivo de quinua en Bolivia, indican que la mayoría de las plantas naturalmente propagadas en campos o en macetas, son colonizadas por las comunidades endofíticas de bacterias. Estos microorganismos pueden aumentar el crecimiento de las plantas, acelerar el desarrollo o mejorar la resistencia al estrés ambiental. La manipulación de las poblaciones de bacterias en el suelo y dentro de los cultivos es fundamental para que los microorganismos endófitos puedan ser utilizados en la producción de cultivos. Esta investigación reporta el logro de 104 aislados. De los cuales 55 son de raíz, 8 de tallo y 41 de hoja. Por lo que se concluye que es viable aislar bacterias endófitas de plantas de quinua de la zona altiplánica, que promueven el crecimiento y que las mejores cepas deberían ser identificadas molecularmente.

Ogata y Zúniga (2008), al realizar el estudio de la microflora de la rizósfera de la tara (*Caesalpinia spinosa*) en la provincia de Huánuco, recolectaron muestras de suelo, raíz y rizósfera, evaluaron las poblaciones bacterianas y fúngicas, encontrándose una mayor población microbiana en la raíz y en las zonas más cercanas a ella. Los rizobios, actinomicetos, *Azotobacter* y *Pseudomonas* fueron aislados en los medios de cultivo LMA, caseína – almidón, caldo para fijadores de nitrógeno y medio F respectivamente; todas las cepas fueron purificadas y caracterizadas fenotípica y bioquímicamente. De los 14 nódulos encontrados se aislaron 4 cepas de rizobios en *Rhizobium spp* y *Bradyrhizobium spp*. Estas cepas aisladas no demostraron tolerancia a altos niveles de NaCl (>1%) ni a temperaturas de 8, 37 y 40°C, no obstante la mayoría mostró una buena capacidad de crecer a diferentes niveles de pH (4 a 8.8). Además se obtuvieron 3 cepas de *Azotobacter spp.*, 8 de actinomicetos y 13 de *Pseudomonas spp*, por estos resultados los suelos de Ambo (Huánuco) pueden ser considerados de ligero a medianamente fértiles.

Calvo *et al.* (2008), estudiaron las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas, en las regiones de Huancavelica y Puno, el

grupo importante en la rizósfera de papa fue del género *Bacillus*, los cuales pueden formar endosporas altamente resistentes que les da una ventaja competitiva muy importante en un ambiente como el suelo, asimismo se deben adaptar a cambios bruscos de temperatura, para esto cuentan con genes de shock térmico inducibles que incluyen proteínas chaperonas y proteasas. Esta capacidad de ser metabólicamente muy diversos les permite tener una colonización exitosa en el ambiente rizosférico. Por otro lado el género *Bacillus*, posee propiedades de solubilización de fosfato, la síntesis de fitohormonas como el ácido indol acético y la capacidad de controlar algunos hongos patógenos en la rizósfera.

Córdova *et al.* (2009), en la detección de bacterias benéficas en suelo con bananos para su evaluación potencial como biofertilizante en los estados de Tabasco, Veracruz, Colima, Michoacán y Chiapas (México), determinaron las densidades de bacterias totales fijadoras de N de vida libre. Los gremios aislados más grandes fueron 42×10^4 y 11×10^5 UFC/g de suelo seco para *Azospirillum* y *Azotobacter*, respectivamente. Estas bacterias luego fueron formuladas como inoculantes microbianos sostenidos en soportes orgánicos (pollinaza, pollinaza + suelo, pinzote, pinzote + suelo) y en suelo testigo, cada uno durante 60 días de incubación. *Azospirillum* creció mejor en pinzote + inóculo con 15×10^5 UFC/g de biofertilizante mientras que para *Azotobacter* fue 63×10^4 UFC/g en pinzote + suelo + inóculo. El mayor contenido de nitrógeno total fue de 5.25 %.

Rico (2009), al evaluar la capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género *Azotobacter* y Actinomicetos aislados de cultivos de papa (*Solanum tuberosum*), buscó evaluar la capacidad promotora del crecimiento vegetal (PGPR) en los departamentos de Huancavelica, Junín, Huánuco y Cajamarca. De los 11 campos muestreados, se aislaron 62 cepas de *Azotobacter*, de las cuales el 42.3% (25) inhibieron el crecimiento del hongo *Fusarium solani*, el 17% (10) el del hongo *Rhizoctonia solani* y el 9% (6) lograron inhibir el crecimiento de ambos hongos evaluados. Luego de la identificación bioquímica, las cepas identificados fueron *A. chroococcum* y *A. vinelandii*. Por otro lado, entre los Actinomicetos fueron identificados como del género *Streptomyces*. *Azotobacter* presentó un efecto benéfico sobre la planta de papa en cuanto a la promoción del crecimiento y en la producción de tubérculos. El efecto de los Actinomicetos se vio reflejado en el incremento del número de tubérculos.

Zúñiga (2010), en su trabajo de investigación de aislamiento y selección de bacterias promotoras de crecimiento en el cultivo de maca, reportan que las poblaciones de diazotrofos, *Pseudomonas* y aerobios psicrófilos presentaron poblaciones mayores en áreas cercanas a la rizósfera en comparación con el suelo desnudo. Por otro lado, diferentes cepas nativas de los grupos microbianos estudiados estimularon la germinación de semillas de maca. Asimismo, la coinoculación con las cepas bacterianas 5Act + 5A y 5A + Ps42 incrementaron significativamente el porcentaje de germinación, respecto al control. También, la cepa de *Rhizobium* P2N3, proveniente de la rizósfera del cultivo de tara de la zona de Huánuco, mejoró significativamente este parámetro así como la emergencia de las plántulas de maca. En otros ensayos, una cepa de actinomiceto mejoró significativamente el peso seco aéreo de plántulas de maca respecto al control sin inocular.

Martínez (2011), en su estudio realizado en México, de caracterización de bacterias asociadas a la rizósfera de sorgo y alfalfa, y determinaron que la rizósfera de éstas plantas presentaron bacterias con actividades antagónicas hacia fitopatógenos. El rastreo de la actividad hemolítica en rizobacterias es un método que permite la detección de rizobacterias con actividad antagónica hacia hongos fitopatógenos y que la bacteria del género *Bacillus* sp. UM96 podría ser una nueva especie, además de una alternativa en el biocontrol de hongos patógenos.

1.2 MARCO TEÓRICO

1.2.1 Microorganismos del suelo

La actividad de los microorganismos es pertinente a la agricultura en la medida que afectan factores relevantes del suelo tales como su estructura, la disponibilidad de nutrimentos, la degradación de los residuos orgánicos frescos, la circulación de nutrientes, la disponibilidad de los nutrimentos a nivel de rizósfera, la formación y degradación de humus y la actividad supresiva de la microflora sobre la sobrevivencia y actividad de propágulos de patógenos o plagas. Las prácticas de manejo afectan la actividad de los microorganismos de una manera directa al alterar parámetros fisicoquímicos tales como la temperatura del suelo, la humedad, la aireación, el estado de oxidoreducción, el contenido y composición de los gases del espacio poroso, la accesibilidad a los substratos, el pH. Los anteriores factores afectan también el crecimiento de las plantas, e indirectamente la actividad microbiana al variar el aporte de la materia orgánica a través de la cantidad y calidad de los residuos que ingresan

al suelo, su disponibilidad para la degradación microbiana y a los efectos rizosféricos (Coyne, 2000).

El suelo es el nicho ecológico más complejo disponible para los microorganismos. Es en la trama del suelo donde se presentan oportunidades de interacción entre el componente mineral sólido; arena, limo y arcillas, minerales en solución, sustratos, orgánicos, enzimas, partículas orgánicas coloidales, las raíces y los microorganismos. La estructura del suelo ofrece oportunidades a la actividad de los microorganismos tales como interfases sólido – líquido, sólido – gas y líquido – gas. Estas interfases definen una gama amplia de micronichos en el suelo. La actividad de los microorganismos en el suelo se ha de concebir con la presencia simultánea y variable, tanto en el mismo como en el tiempo de diversos micronichos. De esta manera, se explica la ocurrencia concomitante de procesos mutuamente excluyentes, en teoría, tales como la nitrificación (que requiere de condiciones aeróbicas) y la desnitrificación (que requiere de condiciones anaeróbicas) (Prescott *et al.*, 2009).

La actividad microbiana del suelo es limitada por los sustratos orgánicos; así mismo el deterioro de la fertilidad de los suelos se asocia a la disminución de los niveles de materia orgánica. Aumentar el aporte de materia orgánica a los suelos es oportuno para aumentar el suministro de nutrimentos, acondicionar el suelo y para inducir supresividad. Los microorganismos del suelo representan la mayor proporción de uso a nivel industrial, la comunidad edáfica dependen del conjunto de nutrientes en el ecosistema pero pueden ser considerados como el principal agente transformador en el movimiento de los nutrientes a través del suelo y como una fuente productora de compuestos para las plantas durante sus ciclos de renovación (Madigan *et al.*, 2003).

El suelo contiene el más alto número de grupos filogenéticos existentes, aproximadamente hay $> 10^9$ células bacterianas por gramo de suelo, pero existe una gran problemática, no es cantidad de microorganismo, es la sensibilidad de una fracción de grupos bacterianos muy alterables al cambio de condiciones ambientales, el más pequeño cambio climático y en respuesta dejan de producir metabolitos y enzimas muy importantes en el campo científico (Madigan *et al.*, 2003).

El suelo es generalmente un hábitat favorable para la proliferación de microorganismos y en las partículas que lo forman se desarrollan microcolonias. Típicamente en los hábitats del suelo se encuentran de 10^8 a 10^{10} bacterias por gramo de suelo. Los microorganismos aislados de suelo comprenden virus, bacterias, hongos, algas y protozoos (Atlas y Bartha, 2002).

a. Bacterias

La mayoría de la población bacteriana organotrófica aerobia de gran parte de los suelos está compuesta por Gram Positivos. No sería correcto generalizar los porcentajes de varios grupos, pero no es extraño encontrar que hasta el 70% de la totalidad de los aislamientos bacterianos del suelo se clasifican dentro de las denominadas bacterias Gram positivas del Género *Arthobacter* sp., siendo la mayoría de la microflora restante *Bacillus* sp. y *Micrococcus* sp (Larrea, 2001).

La población Gram Negativa generalmente está compuesta en su mayor parte por *Pseudomonas* sp y *Flavobacterium* sp. Otros géneros relativamente frecuentes considerados nativos incluyen *Acinetobacter* sp, *Agrobacterium* sp, *Alcaligenes* sp y *Nocardia* sp (Larrea, 2001). La variabilidad de las comunidades microbianas en el suelo depende mayormente de la viabilidad por metabolizar una fuente de carbono, la disponibilidad de macro y micro elementos, el contenido de agua, el pH y el tamaño de las partículas. Cuando estas características se alternan se producen ambientes anaerobios, saturados o tóxicos según sea el nivel de presencia, es donde se encuentran especies bacterianas con propiedades metabólicas incomparables y procesos adaptativos rigidos por componentes enzimáticos desconocidos (Hansel *et al.*, 2008).

b. Hongos

Los hongos son organismos esenciales para la naturaleza, dada su capacidad para mineralizar toda clase de materia orgánica con lo que contribuyen al equilibrio de los ciclos biogeoquímicos. Por el potencial enzimático que tienen codificado en su genoma, tienen incluso uso para eliminar xenobióticos que dañan el equilibrio natural. En suelos agrícolas cultivados de textura que permita la aereación los hongos constituyen la mayor parte de la biomasa microbiana total en ese ambiente. Sin embargo las técnicas en microbiología del tipo cuenta viable en placa para el conteo de otros grupos como bacterias y algas sugieren lo contrario, que los hongos no son los habitantes más

dominantes del suelo, aunque si se usan otros métodos para medir el crecimiento microbianos, los hongos aportan más del 50% de la biomasa en el suelo, en principio por el diámetro de sus filamentos y extensa red que generan predominan en el lecho en descomposición en los estratos orgánicos de suelos boscosos o selváticos en general, son los principales agentes de la mineralización de materia orgánica en ambientes ácidos, los hongos filamentosos establecen una red de micelio constituida por cadenas de hifas independientes. El micelio se subdivide en células individuales por las paredes transversales o septos; pero algunos géneros de hongos no son septadas (Astier *et al.*, 2002).

Los hongos son heterótrofos, usan el carbono orgánico para la síntesis celular. Sin embargo la microbiota es capaz de atacar a la materia orgánica compleja, entre las fuentes de carbono orgánico como: azúcares, ácidos orgánicos, disacáridos, almidón, pectina, celulosa, grasas, lignina particularmente resistente a la degradación microbiana obtienen el nitrógeno del amonio o nitratos también de proteínas, ácidos nucleicos y otros compuestos orgánicos nitrogenados. Algunos géneros son dependientes nutricionales pues requieren aminoácidos, vitaminas del complejo B, u otros factores de crecimiento para una división celular, mientras que otros crecen rápidamente en medio de cultivo con un azúcar y sales inorgánicas (Coyne, 2000).

Los hongos fitopatógenos de plantas superiores necesitan células vivas para reproducirse por su extrema dependencia nutricional. La predación es común entre los hongos, existen protozoarios susceptibles a ciertos géneros, durante el ataque, las hifas penetran en el protozoario disminuyen su movimiento, luego lo digieren el contenido celular. La supervivencia de estos predadores depende de los protozoarios sus esporas no germinan hasta que haya protozoarios sensibles. Los hongos también atacan, atrapan y devoran nemátodos, mediante extensiones de las hifas, entre los géneros nematófagos o atrapadores de nemátodos, comunes en el suelo son: *Arthrobotrys*, *Dactylaria*, *Dactylella* y *Harposporium*. Aunque no existe una función definida para las especies predadoras que participar en el balance poblacional en el suelo al limitar el tamaño, la actividad de protozoarios y nematodos. No obstante el valor limitado del número de hongos en el suelo, se dispone de información sobre su función (Astier *et al.*, 2002).

Cuadro 1. Respuesta de los hongos a la incorporación de materia orgánica vegetal en un suelo.

Tratamientos del suelo	*UFC hongos/g de suelo x 10 ³			
	7 días	21 días	35 días	49 días
Ninguno	7,90	7,55	4,06	4,74
Raíces de trébol	70,0	68,0	64,4	43,2
Tallo de trébol	-	-	48,0	43,0
Raíces de alfalfa	70,0	61,0	60,5	47,0
Tallo de alfalfa	-	-	72,5	36,8

*UFC = unidades formadoras de colonias

Fuente: Astier *et al.* (2002).

En el cuadro 1, se muestra la actividad del micelio en la degradación de moléculas complejas, los hongos responden rápidamente a la adición de restos vegetales, de tejidos verdes o abonos de origen animal, en suelos con pH ácido. Los hongos de suelo degradan los constituyentes vegetales: la celulosa, las hemicelulosas, las pectinas, el almidón y la lignina. En suelos forestales, los hongos atacan los restos de las hojas con una extensa red de hifas en la mineralización foliar. Con frecuencia las transformaciones de la materia orgánica que realizan los hongos filamentosos en medio ambientes bien aireados son de mayor importancia que las reacciones que catalizan las bacterias peor se han hecho pocos intentos de calcular en forma cuantitativa las actividades relativas de estos dos importantes grupos microbianos en la degradación de compuestos orgánicos. Un método que se ha propuesto para tal fin involucra el ensayo de la actividad metabólica de muestras de suelo modificadas: a) con una sustancia química antibacteriana; b) con una sustancia antifúngica y c) sin antibiótico. Los resultados obtenidos mediante éste procedimiento indican que los hongos son dominantes, al menos, en el proceso de descomposición de algunos azúcares sencillos (Moraga *et al.*, 2009).

Como consecuencia de su capacidad para utilizar las sustancias proteicas, los hongos participan activamente en la formación de amonio y compuestos nitrogenados simples. Muchos géneros y especies participan en el proceso de descomposición de las complejas moléculas que contienen nitrógeno. Los microorganismos se benefician con esta transformación debido a que el material proteico les proporciona carbono y nitrógeno. Sin embargo, bajo ciertas condiciones, los hongos compiten con las plantas superiores

por el nitrato y el amonio, provocando una disminución en el contenido de nitrógeno soluble del suelo. Los hongos participan en la formación de humus a partir de restos orgánicos frescos al degradar residuos vegetales y animales. Algunas especies de *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Dematium*, *Gliocladium*, *Helminthosporium*, *Humicola*, *Metarrhizum* y otros géneros sintetizan sustancias que se asemejan a los constituyentes de la fracción orgánica del suelo (Coyne, 2000).

Algunos hongos pueden también producir sustancias con estructura química semejante a la de varios carbohidratos que se extraen de la materia orgánica del suelo. Además este grupo realiza gran número de transformaciones inorgánicas e influye sobre la formación de agregados estables mediante la penetración de sus hifas y uniendo mecánicamente las partículas del suelo. Otra propiedad asociada con los hongos fitopatógenos del suelo. Algunos géneros son saprófitos e invaden tejidos vegetales vivos como patógenos de plantas. Los parásitos facultativos crecen en materia orgánica vegetal e intervienen en enfermedades de plantas. Los parásitos verdaderos son inactivos en el suelo pero sobreviven en cualquier hábitat, cuando la planta hospedera no está. Los primeros son nativos del ambiente que crecen en la competencia microbiana, mientras los segundos son microorganismos alóctonos como los habitantes de las raíces que persisten en el suelo que no es un ambiente para su crecimiento, para estos hongos fitopatógenos su hospedero es una fuente de nutrientes que no utilizan los otros microorganismos (Coyne, 2000).

Aunque si la planta hospedera no está y los hongos compiten con residentes del ecosistema del suelo sobreviven por tiempo breve, disminuye la población o desaparecer. Un porcentaje bajo de los hongos que crecen en el suelo están asociados con enfermedades vegetales, pertenecen los géneros: *Armillaria*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Ophiobolus*, *Phymatotrichum*, *Phytophthora*, *Plasmodiophora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Thielaviopsis* y *Verticillium*. Los hongos causan enfermedades en animales y hombre, su origen es la superficie del suelo, por el viento se transportan, para ser inhalados o depositados sobre áreas dañadas de los pies u otras partes del cuerpo. Las infecciones fúngicas humanas son comunes en los trópicos donde la gente camina descalza y viste ropa ligera (Benzing, 2001).

Histoplasma capsulatum es un patógeno humano es de distribución cosmopolita en Estados Unidos de América, 30 millones de personas fueron infectadas por *H.*

capsulatum, este hongo supervive y coloniza el suelo contaminado por materia fecal de pollos, palomas y otras aves; también existe en cavernas habitadas con murciélagos. En los suelos que contienen *H. capsulatum*, el número varía desde 100 hasta 200000/g. *Coccidioides immitis* no es cosmopolita, está restringido a ciertas regiones de Norte y Sudamérica, está restringido en zonas áridas y semiáridas en suelos salinos, con mínima precipitación pluvial y expuestos a temperatura elevada. La distribución de *Cryptococcus neoformans* está relacionada con deyecciones de aves, en especial del gusano de palomas, aunque la levadura existe en corrales de conejos (Benzing, 2001).

Una relación de algunos hongos con las raíces de familias vegetales superiores es la llamada micorriza u hongo de la raíz, que consiste en un tejido radical y un hongo micorrízico, en donde el hongo está limitado a un hábitat ubicado solo en la vecindad o en las raíces. Esta clase de hongo no son estrictamente del suelo, su nicho ecológico es la raíz vegetal, en especial están adaptados a tejidos radical por la demanda de nutrientes complejos que requieren mezclas de vitaminas, aminoácidos por ello algunos no se cultivan en medios artificiales de laboratorio (La Manna *et al.*, 2007).

Las micorrizas se dividen en ectotrófica, donde el hongo forma un manto alrededor de la superficie exterior de las raíces, una red constituida por una masa de hifas que penetran los espacios existentes entre células vegetales individuales, los árboles de importancia económica, tienen estructuras subterráneas de esta clase. En la micorriza endotrófica el hongo entra en las células del hospedero, tal asociación es común en las familias vegetales: *Ericaceae* y *Orchidaceae*, en los árboles frutales, como los cítricos, en el café y las leguminosas. Los géneros de hongos del suelo que se aíslan en medio de cultivo artificial no forman micorrizas ectotróficas: como los géneros: *Boletus*, *Lactarius*, *Amanita* y *Elaphomyces* que son activos en árboles. Mientras algunos géneros importantes de hongos micorrízicos endotróficos son: *Rhizoctonia*, *Phoma* y *Armillaria* (Larrea, 2001).

La formación de micorrizas es común en suelos con bajo contenido de fosfatos solubles y nitrógeno, estas estructuras de las raíces tienen una reserva de carbohidratos, después de la fotosíntesis, el hospedero proporciona al invasor azúcares para su metabolismo, incluye aminoácidos, vitaminas B u otros factores de crecimiento, la micorriza causa un efecto benéfico en plantas, aunque no se atribuye función a la asociación incluso puede

provocar perjuicio. Los árboles que tienen micorrizas ectotróficas crecen bien sin el hongo invasor, aunque la relación fúngica es ventajosa o esencial, la micorriza es de importancia en la silvicultura, involucrada en programas de reforestación (Coyne, 2000).

Las raíces micorrícicas absorben el fosfato con mayor facilidad que las raíces sin hongos, en suelos deficientes en fosfatos. En familias vegetales, los hongos micorrícicos estimulan el consumo de nitrógeno, de azufre, de cinc y de otros elementos esenciales. El hongo micorrícico protege a la raíz de las infecciones por fitopatógenos del suelo. Por sus efectos benéficos las investigaciones sobre la inoculación en familias vegetales de importancia económica mundial (Coyne, 2000).

1.2.2 Bacterias diazotróficas

a. Microorganismos biosintetizadores de amonio a partir de nitrógeno no simbióticos

Son la fuente primaria del suministro de nitrógeno a las plantas. Son biosintetizadores de amonio a partir de nitrógeno atmosférico. Algunas bacterias, actinomicetos y cianobacterias reducen el nitrógeno atmosférico a nitrógeno amoniacal y lo incorporan al suelo. Entre los géneros de bacterias aerobias biosintetizadoras de amonio están *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Derrxia*, *Azomonas*, y *Oscillatoria* (Coyne, 2000).

La mayor actividad de la síntesis de amonio se alcanza con una humedad adecuada en el suelo y con una fuente de carbono accesible como el material vegetal en descomposición (pajas, socas o subproductos de cosecha). Por esto siempre están acompañadas por bacterias celulolíticas. Necesitan de alcoholes, azúcares o ácidos orgánicos que se los suministran otros microorganismos degradadores. El desarrollo de las bacterias se estimula con las exudaciones que emite la planta cuando se encuentra bien nutrida (Coyne, 2000).

Las bacterias del género *Azotobacter* tienen movimiento y forman quistes cuando encuentran condiciones difíciles. Pueden fijar 40 kg de nitrógeno por hectárea equivalente a 200 kg de sulfato de amonio. Se han encontrado en suelos ácidos (5,5 de pH) y alcalinos, pero prefieren los neutros. Las bacterias del género *Azospirillum* son móviles y crecen en suelos con pH cercanos a neutro. En gramíneas actúan muy bien *A. lipoferum* y *A. brasilense*. No solo están en la superficie de las raíces sino que las penetran e influyen en la nutrición de las plantas (Coyne, 2000).

Además producen sustancias promotoras del crecimiento vegetal. Las bacterias del género *Clostridium pasterianum* son anaerobias y se reproducen por esporas cuando encuentran condiciones difíciles. Crecen en suelos anegados, compactados y en sitios donde se dificulta la circulación de aire en el suelo. Toleran una acidez alta (hasta 4) y retienen entre 3 y 10 mg de nitrógeno por gramo de fuente de carbono consumido. Son importantes en suelos saturados de agua como el cultivo del arroz donde suministran nitrógeno en el anegamiento (Coyne, 2000).

Las algas realizan fotosíntesis y retienen al suelo entre 25 y 50 kg de nitrógeno por hectárea en un año. También agregan sustancias carbonadas al suelo que estimulan el desarrollo de otros microorganismos. En cultivos de arroz se comportan muy bien por la humedad, iluminación y temperatura adecuadas. Se desarrollan poblaciones de las bacterias *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Beijerinckia* y también del actinomiceto *Streptomyces*. A partir de las exudaciones foliares estas forman nódulos en las hojas para retener el nitrógeno, degradan los materiales orgánicos que se depositan sobre ellas, producen enzimas de crecimiento para la planta y segregan antibióticos que protegen las hojas de los ataques de los fitopatógenos. Se han reportado retenciones hasta de 100 kg de nitrógeno por hectárea (Coyne, 2000).

b. Bacterias diazotróficas simbióticas

Los *Rhizobium* son bacterias noduladoras que transforman simbióticamente el nitrógeno en algunas leguminosas. Los actinomicetos *Frankia* y *Actinomyces* nodulan en plantas de porte arbustivo o arbóreo. Los *Rhizobium* son móviles en estados jóvenes y forman esporas cuando se encuentran en condiciones difíciles. Crecen entre 0 y 47 °C. El crecimiento óptimo se encuentra entre 20 y 30 °C. El pH donde se desarrollan mejor está entre 4,5 y 7,5. Son aerobios aunque toleran escasez de oxígeno por un tiempo moderado (Ferrera y Alarcón, 2007).

La simbiosis entre el microorganismo y la planta se fundamenta en que el primero recibe carbohidratos de la planta y este le suministra nitrógeno después de su muerte. Si la planta está mal nutrida, no está en condiciones de proveer carbohidratos a los microorganismos y por lo tanto no segrega la sustancia que estimula la atracción para que las raíces sean infectadas por los rizobios. Hay una asociación entre las rizobacterias y las bacterias no

simbióticas como el *Azotobacter* que incrementan el suministro de nitrógeno a la planta. Además los microorganismos degradadores de fósforo y calcio contribuyen a la biotransformación del nitrógeno al suministrarle estos elementos que son importantes para el desarrollo de los rizobios y para que la planta al estar bien nutrida les suministre exudaciones importantes para los microorganismos (Ferrera y Alarcón, 2007).

1.2.3 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCP)

Las bacterias promotoras de crecimiento en plantas (BPCP) son un grupo de diferentes especies de bacterias que pueden incrementar el crecimiento y productividad vegetal. Entre los organismos más conocidos están las especies pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Pseudomonas*, y *Azospirillum*. Las BPCP pueden clasificarse en dos grupos: (i) Bacterias promotoras de crecimiento en plantas, donde la bacteria afecta a las plantas suprimiendo otros microorganismos. Los mecanismos que estas bacterias utilizan pueden ser a través de su propio metabolismo (solubilizando fosfatos, produciendo hormonas o reteniendo nitrógeno), afectando directamente el metabolismo de la planta (incrementando la toma de agua y minerales), mejorando el desarrollo radicular, incrementando la actividad enzimática de la planta o “ayudando” a otros microorganismos benéficos para que actúen de mejor manera sobre las plantas. (ii) Bacterias promotoras de crecimiento en plantas con capacidad de control biológico, las cuales promueven el crecimiento de la planta al suprimir los fitopatógenos (Ferrera y Alarcón, 2007).

a. Efectos de la inoculación sobre el desarrollo de las raíces

Los efectos más sobresalientes de la inoculación vegetal con *Azospirillum* son los diversos cambios morfológicos que sufre el sistema radicular. Estos cambios se encuentran directamente relacionados con la concentración del inóculo; cuando éste es superior a los niveles óptimos tiene efectos inhibitorios, mientras que dosis bajas no causan efecto. El nivel de inoculación óptimo en semillas y plántulas para muchos cereales, y en vegetales y plantas de cultivo comerciales, se ha observado que es de alrededor de $10^5 - 10^6$ unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml), mientras que para el maíz es de 10^7 UFC/ml. Una concentración de inóculo de $10^8 - 10^{10}$ UFC/ml generalmente inhibe el desarrollo radicular. Estos datos no han revelado cuántas células bacterianas por semilla o plántula se requieren para obtener una respuesta vegetal positiva (Bashan, 1990).

Los efectos positivos de la inoculación se reflejan en diversos parámetros morfológicos de la raíz, incremento en la longitud (particularmente en la zona de elongación), en el número y longitud de las raíces laterales, lo cual incrementa el volumen radicular, incremento en el peso seco de la raíz, en el número, densidad y aparición temprana de pelos radiculares, en el área de superficie radicular, promoción de la división celular en el meristemo radicular, cambios en los arreglos celulares de la corteza, estimulación de la exudación radicular y cambios en la morfología externa de las raíces. Estas observaciones se fundamentaron en estudios microscópicos, pero no pudieron ser confirmadas en un estudio posterior donde se utilizó la misma cepa de *A. brasilense* (Del Gallo y Fendrik, 1994).

Otros estudios indican claramente que ocurre una disminución en la longitud radicular, masa y volumen, pese a que se observa un incremento en parámetros de crecimiento de los brotes. Tales efectos contradictorios en raíces a consecuencia de la inoculación de plantas con cepas de *Azospirillum*, aparentemente son reales, ya que la mayoría de dichos parámetros morfológicos se pueden medir fácilmente y con precisión, y se analizaron utilizando métodos estadísticos reconocidos (Dubrovsky *et al.*, 1994).

b. Colonización radicular por *Azospirillum*

Azospirillum puede colonizar la parte interna o externa de la raíz. En esta última, las bacterias tienden a formar pequeños agregados, aunque es posible encontrar también células aisladas distribuidas a lo largo de la superficie radicular. Por otro lado, las bacterias colonizadoras de la parte externa de la raíz se encuentran embebidas en la capa mucilaginosa que cubre la superficie radicular (Bilal *et al.*, 1993). Tanto raíces vivas como muertas pueden ser colonizadas (Bashan y Levanony, 1988). En el proceso de colonización interna, las células de *Azospirillum* pueden invadir las raíces penetrando a través de los espacios intercelulares (Oliveira *et al.*, 2002).

Azospirillum tiende a colonizar, de preferencia las zonas de elongación de la raíz y de pelos radiculares (Assmus *et al.*, 1995). En cereales, la colonización ocurre principalmente en la superficie radicular y muy pocas bacterias se adhieren a los pelos radiculares (Bashan y Levanony, 1989), mientras que en arroz se observa con frecuencia colonización masiva en estas estructuras (Murty y Ladha, 1987). En todas las plantas que se han inoculado con *Azospirillum*, pocas veces se ha detectado penetración de la bacteria

a pelos radiculares y se supone, por lo tanto, que no penetra a los espacios intercelulares a través de pelos radiculares. Sin embargo, *A. brasilense* (Sp-245) se encontró repetidamente en altas densidades en el interior de células de pelos radiculares en plantas de trigo (Assmus *et al.*, 1995).

Algunas cepas de *Azospirillum* pueden colonizar los espacios intercelulares de la corteza (Andreeva *et al.*, 1991). La población bacteriana interna comprende la mayoría de la población total radicular en trigo, mientras que en mijo (*Pennisetum glaucum*) la mayoría de la población de *Azospirillum* se concentra en la superficie radicular. No siempre ocurre colonización interna de raíces; tal es el caso del pasto "Kallar", en el cual sólo se ha detectado colonización masiva en la superficie. Estudios sobre colonización vascular por una cepa específica de *A. lipoferum*, detectada por microscopía de luz, no fueron confirmados por estudios de microscopía electrónica al utilizar *A. brasilense* (Levanony *et al.*, 1989).

Se desconoce el mecanismo de penetración de *Azospirillum* a los espacios intercelulares. Las diversas teorías propuestas hasta ahora, son: (i) invasión bacteriana vía tejidos corticales destruidos donde ramificaciones de raíces laterales emergen a partir de raíces principales (Matthews *et al.*, 1983); (ii) invasión a través de pelos radiculares lisados y heridas mecánicas ocasionadas durante el crecimiento de la planta, y (iii) penetración directa a través de lamelas intermedias, seguida de degradación de la pectina una vez que la bacteria logra penetrar por hendiduras de la zona cubierta por epidermis donde emerge la raíz lateral (Umali-Garcia, 1980). Se conoce que algunas cepas de este género producen pectinasas *in vitro* (Khammas *et al.*, 1989). Se han identificado dos fases en el mecanismo de adhesión de *Azospirillum* a raíces de trigo. La primera fase del proceso consiste en una adhesión rápida y débil, dependiente de proteínas superficiales bacterianas; al enjuagar las raíces con agua, agitándolas suavemente, la mayoría de las bacterias se pueden liberar (Castellanos *et al.*, 1998).

La mayoría de las áreas radiculares se saturan en un periodo de dos horas después de la inoculación, encontrándose variación dependiendo de la fase de crecimiento bacteriana y de la cepa utilizada (Castellanos *et al.*, 1997). El segundo paso (llamado anclaje) bajo condiciones *in vitro* es independiente del primero y consiste en un anclaje firme caracterizado por la producción de fibrillas largas. Estas se han observado, en estudios de

microscopía electrónica de barrido en diversas especies vegetales (Bashan *et al.*, 1991), formando una red que conecta las células de *Azospirillum* entre sí y a la superficie radicular de las plantas (Bashan y Holguin, 1993) e involucra la participación de un polisacárido extracelular. Este proceso empieza después de 8 h de incubación y alcanza un máximo después de 16 h (Michiels *et al.*, 1991). Estudios preliminares indican que las fibras contienen compuestos de naturaleza proteica y polisacáridos (Michiels *et al.*, 1991). El movimiento de *Azospirillum* a lo largo de la superficie radicular es mínimo debido a la formación de estas fibras producidas por la misma bacteria. Estas fibras de soporte aseguran el transporte vertical bacteriano debido al crecimiento de la punta radicular (caliptra) hacia capas de suelo más profundas (Bashan y Levanony, 1989).

c. Posibles mecanismos de acción de *Azospirillum* sobre el crecimiento vegetal

No se ha definido el mecanismo principal por medio del cual *Azospirillum* promueve el crecimiento vegetal. Sin embargo, se han propuesto algunos mecanismos de acción: i) Retención de nitrógeno, lo cual contribuye con nitrógeno a la planta; ii) efectos hormonales, los cuales promueven el metabolismo y crecimiento vegetal; iii) incremento en el crecimiento del sistema completo de raíces, lo cual puede estar relacionado con cambios hormonales y que origina una mayor capacidad de absorción de agua y minerales; iv) alteración del funcionamiento de la membrana por medio de moléculas de comunicación celular (moléculas de este tipo de bajo peso molecular, pueden ser responsables de alterar actividad y funciones de membrana relacionadas con la absorción de iones); y v) la hipótesis aditiva, la cual propone la intervención de todos los mecanismos mencionados arriba (Bashan y Holguin, 1997).

d. Efectos hormonales de *Azospirillum* en las plantas

Cepas de *Azospirillum* producen diversas hormonas vegetales cuando se cultivan en medios líquidos. Una de las principales es el ácido indol-3-acético (IAA) (Thuler *et al.* 2003). Se encontró que *A. irakense* liberó al medio 10 veces menos la concentración de IAA que *A. brasilense* Sp7 (Zimmer *et al.*, 1991). Varias cepas de bacterias diazotróficas asociativas utilizaron de un 0,28 a 1,0% del triptófano disponible para la producción de IAA (Kravchenko *et al.*, 1994). La liberación de IAA se incrementó con la presencia de amonio en el medio de cultivo, así como en el inicio de la fase estacionaria de las células, por lo que se le considera un metabolito secundario (Omay *et al.*, 1993). Otras hormonas detectadas en concentraciones más bajas, pero biológicamente significativas, son el

ácido indoláctico, ácido indol-3-butírico (IBA), indol-3-etanol, indol-3-metanol, y compuestos de indol no identificados (Hartmann *et al.*, 1983). También varias giberelinas (Rademacher, 1994), ácido absícico (ABA) (Kolb y Martin, 1985) y citoquininas (Strzelczyk *et al.*, 1994).

Yahalom *et al.* (1991) encontraron que el efecto de la hormona IAA sobre las raíces dependió de su concentración; concentraciones de 10^{-8} M estimularon la elongación radicular, mientras que concentraciones mayores que 10^{-6} M la inhibieron y redujeron la longitud de la zona de elongación. Las hormonas vegetales pueden promover la capacidad de *Azospirillum* para biotransformar (Christensen, 1998) así como su crecimiento (Strzelczyk *et al.*, 1994). Estudios sobre la aplicación externa de hormonas sintéticas o purificadas a partir de cultivos bacterianos a plántulas, imitaron los efectos positivos que provoca *Azospirillum* sobre el desarrollo y morfología radicular (Kucey, 1988). De la misma manera, se incrementaron tanto la longitud de las raíces como las ramificaciones de éstas, se produjeron más raíces laterales (Barbieri *et al.*, 1986) y se incrementó la tasa de división celular y diferenciación en tejidos meristemáticos (Fallik *et al.*, 1989).

Una cepa de *Azospirillum* y una mutante sobreproductora de IAA en condiciones de cultivo, modificaron considerablemente la morfología radicular (Jain y Patriquin, 1985), mientras que mutantes incapaces o disminuidos en su capacidad de producir IAA en condiciones de cultivo, no causaron efectos en la morfología radicular (Barbieri *et al.*, 1986), en el desarrollo del sistema de raíces y no lograron promover la absorción de minerales (Barbieri *et al.*, 1995). Sin embargo, Bothe *et al.*, (1992) encontraron que la hormona IAA no logró promover la formación de raíces laterales en plántulas de trigo, mientras que la inoculación con *Azospirillum* sí lo logró. Se ha observado que plantas inoculadas, con *Azospirillum* mantienen en estado óptimo durante más tiempo su equilibrio hormonal que plantas no inoculadas contribuyendo así a obtener una mayor producción. La inoculación de plántulas de maíz con *A. lipoferum* alteró el equilibrio de giberelina de las plántulas (Fulchieri *et al.*, 1993).

Estos resultados aportan evidencia sobre la participación de *Azospirillum* en la regulación hormonal de la planta. Sin embargo, para afirmar que los efectos hormonales son el mecanismo principal por medio del cual *Azospirillum* promueve el crecimiento

vegetal, deben hacerse estudios adicionales ya que otros factores no considerados en el diseño experimental pueden estar involucrados, por ejemplo: el nitrito, como producto del metabolismo de *Azospirillum*, o agregado directamente, provocan de igual manera un drástico incremento en la formación de raíces laterales de trigo por lo que el sistema de ensayo utilizado puede estar provocando la generación de nitrito promoviendo así el crecimiento de las plantas (Bothe *et al.*, 1992).

e. Promoción en el desarrollo de raíces, absorción de minerales, actividad de membrana, moléculas de comunicación celular y relación planta-agua por *Azospirillum*

Además de afectar positiva o negativamente muchos parámetros en raíces (Kucey, 1988); la inoculación de plantas con *Azospirillum* puede afectar muchos parámetros relacionados con el follaje. Estos cambios se atribuyen directamente a efectos positivos en la absorción de minerales por parte de la planta. Se ha propuesto que la absorción de NO_3^- , NH_4^+ , HPO_4^{2-} , K^+ , Rb^+ , y Fe^{+2} inducida por *Azospirillum* es el factor responsable en incrementar la materia seca foliar y la acumulación de minerales en tallos y hojas. Durante el periodo de reproducción vegetal, estos minerales pueden transferirse a las panículas y espigas, lo que resulta en un mayor rendimiento (Rodríguez *et al.*, 2004).

Se ha sugerido que el incremento en la absorción de minerales se debe a un incremento general en el volumen del sistema de raíces y no a un mecanismo de absorción de iones más eficaz. Por otro lado, se sugiere que la inoculación con *Azospirillum* puede provocar que la absorción de iones en el suelo sea más eficiente (se desconoce el mecanismo de este proceso); esto explicaría la acumulación de compuestos de nitrógeno en la planta sin existir una aparente biotransformación de nitrógeno. La planta puede asimilar el nitrógeno del suelo de manera más eficiente, requiriendo menos fertilización con nitrógeno. La inoculación de frijol yorimón y frijol de soya con *A. brasilense* (Cd) incrementó el flujo de protones de sus raíces. Y redujo el potencial de membrana, razón por la cual se propuso que la membrana celular funciona como un sensor sobre el efecto de *Azospirillum* (Bashan *et al.*, 1992).

Los cambios en la actividad del flujo de protones en raíces de trigo inoculadas con *Azospirillum*, y cambios en el potencial de membrana de células radiculares, y en la concentración relativa de fosfolípidos en la membrana celular del frijol yorimón, apoyan

la hipótesis que propone que la absorción de nutrimentos es más eficiente en raíces inoculadas (Amoaghaie *et al.*, 2002). Es conocido que el flujo de protones a través de las membranas radicales se encuentra de manera directa relacionada con el equilibrio iónico en las raíces.

Recientemente, se propuso que moléculas de comunicación celular de bajo peso molecular no identificadas pueden ser responsables de alterar la actividad y funciones de la membrana relacionadas con la absorción de iones (Bashan *et al.*, 1992). Ya que las membranas son extremadamente sensibles a cualquier cambio, pueden servir como indicadores de la actividad de *Azospirillum* en la célula. Se encontró que la adición de aglutinina de germen de trigo a *A. brasilense* Sp245, además de provocar cambios en el metabolismo celular de la cepa, provocó cambios en la proporción relativa de los fosfolípidos ácidos de la membrana. Es probable que los fosfolípidos ácidos estén participando en la comunicación celular a través de la membrana. Se sugiere que la aglutinina de germen de trigo puede tener la función de molécula de comunicación celular en la asociación *Azospirillum* – planta (Antonyuk *et al.*, 1995).

1.2.4 La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.)

La información que se menciona a continuación fue reportado por León (2003).

a. Taxonomía

Reyno: Vegetal

División: Fanerogamae

Clase: Dicotiledoneae

Sub – clase: Angiospermae

Orden: Centrospermales

Familia: Chenopodiaceae

Género: *Chenopodium*

Especie: *Chenopodium quinoa* Willd.

Sección: Chenopodia

Subsección: Cellulata.

b. Origen. Se atribuye su origen a la zona andina del Altiplano Peruano – boliviano, por estar caracterizada por la gran cantidad de especies silvestres y la gran variabilidad

genética, principalmente en ecotipos, reconociéndose cinco categorías básicas (León, 2003).

- c. Quinuas altiplánicas.** Crecen en lugares aledaños al lago Titicaca a una altura de 3800 msnm, estos cultivos se caracterizan por tener buena resistencia a las heladas, son bajos en tamaño, no ramificados (tienen un solo tallo y panoja terminal que es glomerulada densa), llegan a tener una altura de 1 a 2 m, con periodo vegetativo corto, se tiene quinuas precoces como: Illpa-INIA y Salcedo – INIA, semi – tardías: blanca de Juli, tardías: como la kancolla, chewecca, tahuaco, amarilla de Marangani (León, 2003).
- d. Variabilidad genética.** La quinua es una especie tetraploide, constituido por 36 cromosomas somáticas, está constituido por 4 juegos cromosómicos, con un número básico de 9 cromosomas ($4n = 4 \times 9 = 36$). El color de las plantas de quinua es un carácter de herencia simple; en cambio el color de los granos es por la acción de agentes complementarios, siendo el color blanco un carácter recesivo (León, 2003).

En quinua el tipo de inflorescencia puede ser amarantiforme o glomerulada, siendo esta última dominante sobre la primera. El contenido de saponina en quinua es heredable, siendo recesivo el carácter dulce. La saponina se ubica en la primera membrana. Su contenido y adherencia en los granos es muy variable y a sido motivo de varios estudios y técnicas para eliminarla, por el sabor amargo que confiere al grano (Gandarillas, 1979), que el carácter amargo o contenido de saponina estaría determinado por un simple gen dominante. Sin embargo, la presencia de una escala gradual de contenido de saponina indicaría más bien su carácter poligénico (León, 2003).

- e. Variedad Salcedo - INIA.** Esta variedad fue obtenida mediante la selección surco – panoja a partir de las variedades “real boliviana” y “sajama”, en la estación experimental de Patacamaya e introducido en Puno en 1989. El grano que posee es grande y tiene un tamaño de 1,8 a 2 mm de diámetro, son de color blanco, su panoja es glomerulada, su periodo vegetativo es de 160 días (precoz), su rendimiento es de 2500 Kg /ha, son resistente a las heladas ($-2\text{ }^{\circ}\text{C}$) y tolerantes al mildiú. Se recomienda su cultivo en la zona circunlacustre (León, 2003).

- f. Descripción botánica**

- **Raíz.** El tipo de raíz varía de acuerdo a las fases fenológicas. Empieza con raíz pivotante terminando en raíz ramificado con una longitud de 25 a 30 cm, según el ecotipo, profundidad del suelo y altura de la planta; la raíz se caracteriza por tener numerosas raíces secundarias y terciarias.

- **Tallo.** Es cilíndrico y herbáceo anual a la altura del cuello cerca a la raíz y de una forma angulosa a la altura donde se insertan las ramas y hojas, estando dispuestas en las cuatro caras del tallo, la altura es variable de acuerdo a las variedades y siempre terminan en una inflorescencia; cuando la planta es joven tiene una médula blanca y cuando va madurando se vuelve esponjosa, hueca sin fibra, sin embargo la corteza se lignifica, el color del tallo es variable, puede ser púrpura como la Pasankalla, blanco cremoso (Blanca de Juli) y con las axilas coloreadas como la blanca de Juli, en toda su longitud; colorada como la kancolla y otros colores según el ecotipo de cada zona (el color varía de acuerdo a las fases fenológicas, se pueden diferenciar bien los colores en la floración). Cuando se tiene plantas monopodicas (de un solo tallo), se puede inducir cortando la yema apical para tener plantas simpodicas (de varios tallos); esta técnica se debe realizar antes del inicio de panojamiento.

- **Hojas.** Son simples, enteras, esparcidas, glabras, pecioladas, sin estípulas, pinnatinervadas, presentan oxalatos de calcio o vesículas granulosas en el envés a veces en el haz; las cuales evitan la transpiración excesiva en caso de que se presentaran sequías. En la quinua, podemos notar que la hoja está formada por una lámina y un pecíolo, los pecíolos son largos acanalados y finos, las hojas son polimorfos, las hojas inferiores son de forma romboidal o de forma triangular y las hojas superiores son lanceoladas que se ubican cerca de las panojas. Pueden tomar diferentes coloraciones, va del verde al rojo o púrpura (dependiendo de la variedad).

La inserción de las hojas en el tallo es alterna, en cada nudo se observan de 5 a 12 hojas de acuerdo a cada variedad y la distancia entre nudos es de 0,8 a 4 cm. La hoja es por excelencia el órgano clorofiliano esencial de la respiración y la asimilación de CO₂ (anhídrido carbónico). El número de dientes por hoja varía de 2 a 14 dependiendo de la variedad.

- **Inflorescencia.** Es de tipo racimosa y por la disposición de las flores en el racimo se le denomina como una panoja, por el hábito de crecimiento algunas inflorescencias se difieren por que pueden ser axilares y terminales. En algunas variedades no se tiene una diferencia clara y pueden ser ramificadas teniendo una forma cónica, el eje principal de la inflorescencia es de forma angulosa o piramidal y tiene dos surcos, donde se ubican las flores. De acuerdo a la forma de panoja; se le considera amarantiforme, cuando sus glomérulos están insertados en el eje secundario y glomérulada, cuando los glomérulos están insertos en el eje primario o principal y toda la panoja tiene la forma, de un solo glomérulo. De acuerdo a la densidad de panoja que se presentan estas son considerados: compactas, semicompactas o semilaxas y laxas.
- **Flores.** En una misma inflorescencia pueden presentar flores hermafroditas (perfectas), femeninas y androésteriles (imperfectas). Generalmente se encuentra 50 glomérulos en una planta y cada glomérulo está conformado por 18 a 20 granos aproximadamente. Las flores son pequeñas de 1 a 2 mm de diámetro como en todas las Quenopodiáceas, son flores incompletas porque carecen de pétalos. Hay un grupo intermedio como la blanca de Juli, originaria de Puno, en el cual el grado de cruzamiento depende del porcentaje de flores pístiladas (León, 2003).
- g. Tipo de reproducción.** La quinua es una especie autógama (autofecundación) con un cierto porcentaje de alogamia (cruzamiento con otras plantas de la misma especie). El porcentaje de cruzamiento depende de la variedad y de la distancia a las plantas con que se pueda cruzar, y oscila entre 2 al 10% (León, 2003).
- h. La androesterilidad.** En las quinuas nativas se encuentran frecuentemente plantas androestériles, siendo éste carácter recesivo. Plantas androestériles: En toda la planta hay solamente flores femeninas o androestériles pero ninguna flor hermafrodita. Como faltan los órganos masculinos, la planta androestéril necesita siempre otra planta con polen viable para ser fecundada y producir semilla. Esta androesterilidad tiene un aspecto económico muy importante: Una forma para subir drásticamente los rendimientos de una especie es mediante la creación de híbridos. La obtención de ellos requiere la eliminación de los órganos masculinos, una operación tediosa y costosa, especialmente en especies con flores pequeñas como la quinua. Como esta operación

no hace falta en las plantas estériles, la esterilidad masculina es un factor importante y de alto interés económico en la producción de híbridos comerciales. En éste contexto la variedad androestéril más famosa es la variedad nativa boliviana Apelawa, sobre la cual se dio a nivel internacional una discusión básica y fuerte respecto la posibilidad y la honestidad de patentar recursos genéticos encontrados en países ajenos (León, 2003).

- i. Fase de la floración.** En los glomérulos la floración inicia en la parte apical y sigue hasta la base. En cada parte del glomérulo se abren primero las flores hermafroditas y después las femeninas. Cada flor está abierta de 5 a 13 días. A partir de la apertura de la primera flor, las demás flores se abren dentro de 15 días. Así la fase total de floración de una panoja se demora 3 a 4 semanas (León, 2003).
- j. Floración en el transcurso del día.** La máxima intensidad de la floración en días de sol se presenta entre las 10.00 am hasta las 14.00 pm, cuando el 25 a 40% de flores están abiertas y cuando hay una fuerte radiación solar. Una floración de mínima intensidad se da en horas de lluvia. El pistilo es receptivo durante 2 horas (León, 2003).
- k. Fruto.** Es aquenio, el que se encuentra cubierto por el perigonio, que cuando se encuentra en estado maduro es de forma estrellada por los cinco tépalos que tiene la flor. El perigonio cubre solo una semilla y se desprende con facilidad al frotarlo; el color del grano está dado por el perigonio y se asocia directamente con el color de la planta, el pericarpio del fruto se encuentra pegado a la semilla y es donde se encuentra la saponina que es un glucósido de sabor amargo; se ubica en la primera membrana (León, 2003).
- l. Semilla.** Tiene forma lenticelada, que se encuentra envuelta por el perisperma, el tamaño de la semilla (grano) se considera grande cuando el diámetro es mayor a 2 mm Ej. Var. Sajama, Salcedo – INIA, Illpa INIA; mediano de diámetro 1,8 a 1,9 mm Ej. Var. Kancolla, tahuaco, chewecca y pequeño menos de 1,7 mm de diámetro Ej. Blanca de Juli (León, 2003).

El pericarpio, está formado por tres capas, pegado a la semilla y contiene saponina en un rango de 0,2 - 5,1%. El pericarpio es suave en los ecotipos chilenos y duro en los demás ecotipos. Directamente bajo del pericarpio está el episperma, una membrana delgada que cubre al embrión. El embrión está formado por los dos cotiledones y la radícula envuelve al perisperma en forma de anillo. El perisperma presenta la sustancia de reserva y contiene pequeños granos de almidón. Su color es siempre blanco (León, 2003).

Cabe destacar que el embrión presenta la mayor proporción de la semilla (30 % de peso), mientras que en los cereales corresponde solamente al 1%. De allí resulta el alto valor nutritivo de la quinua. Las semillas vienen dispuestas en panojas, éstas tienen entre 15 y 70 cm, puede llegar a un rendimiento de 220 g de granos por panoja. Los colores varían según la variedad y el estado fisiológico de la planta, así van del púrpura al rosado amarillo, del verde al amarillo pálido, etc. Los granos, cuyo color también varía (blanco, gris, rosado) (León, 2003).

La capa externa que la cubre es rugosa y seca, se desprende con facilidad al ser puesta en contacto con agua caliente o hervida, en esta capa (pericarpio) se almacena la sustancia amarga denominada saponina que al ser lavada se elimina en forma de espuma. El grado de amargor varía según los tipos de quinua. El contenido de la saponina en la quinua es de entre 0 – 6% dependiendo de la variedad (León, 2003).

m. Fases fenológicas. La duración de las fases fenológicas depende mucho de los factores medio ambientales que se presenta en cada campaña agrícola por ejemplo; si se presenta precipitación pluvial larga de 4 meses continuas (enero, febrero, marzo y abril), sin presentar veranillos las fases fenológicas se alarga por lo tanto el periodo vegetativo es largo y el rendimiento disminuye (León, 2003).

Cuando hay presencia de veranillos sin heladas, la duración de las fases fenológicas se acorta y el periodo vegetativo también es corto y el rendimiento es óptimo. También influye la duración de la humedad del suelo, por ejemplo en un suelo franco arcilloso, las fases fenológicas se alargan debido al alto contenido de humedad en el suelo o alta capacidad de retener agua; en cambio en un suelo franco arenoso sucede todo lo contrario (León, 2003).

- **Emergencia.** Es cuando la plántula emerge del suelo y extiende las hojas cotiledonales, pudiendo observarse en el surco las plántulas en forma de hileras nítidas, esto depende de la humedad del suelo; si el suelo está húmedo, la semilla emerge al cuarto día o sexto día de la siembra. En esta fase la planta puede resistir a la falta de agua, siempre dependiendo del tipo de suelo; si el suelo es franco – arcilloso. Si el suelo es franco – arenoso, puede resistir aproximadamente, hasta 7 días. También la resistencia depende mucho, del tipo de siembra; si es al voleo sin

hacer surco, no resistirá a la sequía; si se siembra también al voleo pero dentro del surco, podrá resistir a la sequía.

- **Dos hojas verdaderas.** Es cuando dos hojas verdaderas, extendidas que ya poseen forma lanceolada y se encuentra en la yema apical el siguiente par de hojas, ocurre a los 10 a 15 días después de la siembra y muestra un crecimiento rápido en las raíces. En esta fase la planta también es resistente a la falta de agua, pueden soportar de 10 a 14 días sin agua, siempre dependiendo de los factores ya mencionados en la emergencia.
- **Cuatro hojas verdaderas.** Se observan dos pares de hojas extendidas y aun están presentes las hojas cotiledonales de color verde, encontrándose en la yema apical las siguientes hojas del ápice; en inicio de formación de yemas axilares del primer par de hojas; ocurre aproximadamente a los 25 a 30 días después de la siembra.
- **Seis hojas verdaderas.** Se observan tres pares de hojas verdaderas extendidas y las hojas cotiledonales se tornan de color amarillento. Esta fase ocurre aproximadamente a los 35 a 45 días después de la siembra, en la cual se nota claramente una protección del ápice vegetativo por las hojas más adultas.
- **Ramificación.** Se observa ocho hojas verdaderas extendidas con presencia de hojas axilares hasta el tercer nudo, las hojas cotiledonales se caen y dejan cicatrices en el tallo, también se nota presencia de inflorescencia protegida por las hojas sin dejar al descubierto la panoja, ocurre aproximadamente a los 45 a 50 días de la siembra. Durante esta fase se efectúa el aporque y fertilización complementaria. Desde la fase de cuatro hojas verdaderas hasta fase se puede consumir las hojas en reemplazo a la espinaca.
- **Inicio de panojamiento.** La inflorescencia se nota que va emergiendo del ápice de la planta, observado alrededor aglomeración de hojas pequeñas, las cuales van cubriendo la panoja en sus tres cuartas partes; ello puede ocurrir aproximadamente a los 55 a 60 días de la siembra, así mismo se puede apreciar amarillamiento del primer par de hojas verdaderas (hojas que ya no son fotosintéticamente activas) y se produce una fuerte elongación del tallo, así como engrosamiento.

- **Panojamiento.** La inflorescencia sobresale con claridad por encima de las hojas, notándose los glomérulos que la conforman; así mismo, se puede observar en los glomérulos de la base los botones florales individualizados, puede ocurrir aproximadamente a los 65 a los 75 días después de la siembra, a partir de esta etapa hasta inicio de grano lechoso se puede consumir las inflorescencias en reemplazo de las hortalizas de inflorescencia tradicionales, como por ejemplo a la coliflor.
- **Inicio de floración.** Es cuando la flor hermafrodita apical se abre mostrando los estambres separados, aproximadamente puede ocurrir a los 75 a 80 días después de la siembra, en esta fase es bastante sensible a la sequía con helada; se puede notar en los glomérulos las anteras protegidas por es un perigonio de un color verde limón.
- **Floración.** Se considera a esta fase cuando el 50% de las flores de la inflorescencia de las panojas se encuentran abiertas, puede ocurrir aproximadamente a los 90 a 80 días después de la siembra, esta fase es muy sensible a las heladas y granizadas, debe observarse la floración a medio día cuando hay intensa luminosidad solar, ya que en horas de la mañana y al atardecer se encuentra cerradas, así mismo la planta comienza a eliminar las hojas inferiores que son menos activas fotosintéticamente, se ha observado que en esta etapa cuando se presentan altas temperaturas que superan los 38 °C se produce aborto de las flores, sobre todo en invernaderos o zonas desérticas calurosas. Cuando hay presencia de veranillos o sequías de 10 a 15 días de duración en esta fase es beneficioso para una buena polinización; cruzada o autopolinizada, siempre en cuanto no haya presencia de heladas.
- **Grano lechoso.** El estado de grano lechoso es cuando los frutos que se encuentran en los glomérulos de la panoja, al ser presionados explotan y dejan salir un líquido lechoso, aproximadamente ocurre a los 100 a 130 días de la siembra, en esta fase el déficit hídrico es sumamente perjudicial para el rendimiento disminuyéndolo drásticamente el llenado de grano (en suelos franco-arenoso), pero en suelos francoarcilloso es normal.
- **Grano pastoso.** El estado de grano pastoso es cuando los granos al ser presionados presentan una consistencia pastosa de color blanco, puede ocurrir aproximadamente

a los 130 a 160 días de la siembra, en esta fase el ataque, de Kcona – kcona (*Eurysacca quinoa*) y aves (gorriones, palomas) causa daños considerables al cultivo, formando nidos y consumiendo el grano. En esta fase ya no es necesario las precipitaciones pluviales (lluvia).

- **Madurez fisiológica.** Es cuando el grano formado es presionado por las uñas, presenta resistencia a la penetración, aproximadamente ocurre a los 160 a 180 días a más después de la siembra, el contenido de humedad del grano varia de 14 a 16%, el lapso comprendido de la floración a la madurez fisiológica viene a constituir el periodo de llenado del grano, asimismo en esta etapa ocurre un amarillamiento y defoliación completa de la planta. En esta fase la presencia de lluvia es perjudicial porque hace perder la calidad y sabor del grano (León, 2003).



1.3 MARCO CONCEPTUAL

- **Agroecología.** Ciencia que estudia las interacciones entre organismos y factores ambientales en sistemas agropecuarios.
- **Antibiótico.** es una sustancia química producida por un ser vivo o derivado sintético, que mata o impide el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles, generalmente bacterias.
- **Biocenosis.** Conjunto de organismos que viven en un ecosistema o biotopo.
- **Biofertilizante.** Insumos formulados con uno o varios microorganismos, los cuales, de una forma u otra, proveen o mejoran la disponibilidad de nutrientes cuando se aplican a los cultivos.
- **Biomasa microbiana.** Masa total de microorganismos vivientes en un volumen o masa de suelos dados. Pero total de los microorganismos en un entorno particular.
- **Calicatas o catas.** Son técnicas de prospección empleadas para facilitar el reconocimiento geotécnico, estudios edafológicos o pedológicos de un terreno, mediante la realización de excavaciones de profundidad pequeña a media y que permiten la inspección directa del suelo que se desea estudiar y por lo tanto, es el método de exploración que normalmente entre la información más confiable y completa.
- **Calidad del suelo.** Capacidad de un suelo para funcionar dentro de una serie de límites de ecosistema para sostener la productividad biológica, mantener la calidad medioambiental y promover la salud vegetal y animal.
- **Campana agrícola.** Tiempo que transcurre desde el momento del barbecho o preparación de un terreno hasta el proceso de cosecha del cultivo en un suelo agrícola.
- **Carga bacteriana.** Cantidad de bacterias presentes en un sustrato, superficie o ambiente, que posee las condiciones favorables para su crecimiento.
- **Cepa.** Aislamiento de un microorganismo, que se distingue de otras cepas de su procedencia, no siempre es genéticamente diferente.
- **Cultivo *in vitro*.** Técnicas de cultivo de vegetales en condiciones controladas de laboratorio.
- **Bacterias diazotróficas.** Son bacterias que biotransforman el nitrógeno atmosférico en una forma más disponible como es el amonio. Es un organismo que es capaz de crecer sin fuentes externas de nitrógeno retenido. Ejemplos: los géneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* y *Frankia* (en simbiosis) y *Azospirillum* (en vida libre). Todos los diazótrofos contienen sistemas hierro – molibdeno nitrogenasas. Dos de los más

estudiados sistemas son sobre *Klebsiella pneumoniae* y *Azotobacter vinelandii*. Estos sistemas se han usado debido a su simplicidad genética (trazabilidad) y su rápido crecimiento y multiplicación.

- **Diluyente.** Agente de dilución, por lo general agua destilada. Que puede ser líquida una sustancia o deshacer las partes de un cuerpo sólido. Se aplica a la sustancia líquida que se añade a una disolución para disminuir su concentración y hacerla más fluída.
- **Endófito.** Quiere decir “dentro de la planta” y se ha usado para referirse a distintos organismos que viven dentro de una planta sin que importara la relación que guardan con ella.
- **Fenología.** Ciencia que estudia la relación entre los factores climáticos y los ciclos de los seres vivos.
- **Fitofenología.** Parte de la fenología que estudia cómo afectan las variables meteorológicas a las manifestaciones periódicas o estacionales de las plantas (floración, aparición o cuajado de frutos y su maduración, caída de hojas y dormancia).
- **Genotipo.** Información genética que posee un organismo en particular, en forma de ADN. Normalmente el genoma de una especie incluye numerosas variaciones o polimorfismos en muchos de sus genes.
- **Hábitat.** Ambiente que ocupa una población biológica, es el espacio que reúne las condiciones adecuadas para que la especie pueda residir y reproducirse, perpetuando su presencia. Un hábitat queda así descrito por los rasgos que lo definen ecológicamente, distinguiéndolo de otros hábitats en los que las mismas especies no podrían encontrar acomodo.
- **Humus de lombriz.** Abono obtenido del excremento de las lombrices alimentadas con desechos orgánicos (restos vegetales, residuos de cosecha, estiércoles de herbívoros entre estas algunas aves, etc.).
- **Inhibir.** Suspender transitoriamente una función orgánica.
- **Inoculación.** Introducción de una sustancia en un organismo.
- **Materia orgánica.** Seres vivos y los compuestos de degradación y transformación que quedan después de su muerte.
- **Nutriente.** Compuestos orgánicos que contienen carbono o inorgánicos presentes en los alimentos los cuales pueden ser utilizados por un organismo para una variedad de procesos vitales como suplir energía, formar células o regular las funciones del organismo.

- **Pectinasas.** Enzimas capaces de descomponer o separar grupos pectinos, sustratos de polisacáridos encontrados en la pared celular de las plantas.
- **PGPRs.** Significa rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Bacterias que habitan las zonas de las raíces de la plantas y que estimulan el crecimiento de las plantas.
- **Pollinaza.** Estiércol puro del pollo, el cual es un subproducto natural con alto porcentaje de proteínas, que con un manejo adecuado se puede convertir en un excelente suplemento alimenticio para todo tipo de bovinos.
- **Quinua.** Planta alimenticia de desarrollo anual, dicotiledónea que normalmente alcanza una altura de 1 a 3 m. Las hojas son anchas y polimorfas (con diferentes formas en la misma planta); el tallo central comprende hojas lobuladas y quebradizas y puede tener ramas, dependiendo de la variedad o densidad del sembrado; las flores son pequeñas y carecen de pétalos. Son hermafroditas y generalmente se autofecundan. El fruto es seco y mide aproximadamente 2 mm de diámetro (de 250 a 500 semillas/g), rodeado por el cáliz, que es del mismo color que la planta. Está considerado un grano sagrado por los pueblos originarios de los Andes, debido a sus exclusivas características nutricionales.
- **Sideróforos.** Compuesto quelante de hierro secretado por microorganismos. El ion hierro Fe^{3+} tiene muy poca solubilidad a pH neutro y por ende no puede ser utilizado por los organismos. Los sideróforos disuelven estos iones a complejos de Fe^{2+} , que pueden ser asimilados por mecanismos de transporte activo. Muchos sideróforos son péptidos no ribosomales.
- **Suelo.** Parte superficial de la corteza terrestre, biológicamente activa, que proviene de la desintegración o alteración física y química de las rocas y de los residuos de las actividades de seres vivos que se asientan sobre ella. Los suelos son sistemas complejos donde ocurren una vasta gama de procesos físicos y biológicos que se ven reflejados en la gran variedad de suelos existentes en la tierra.
- **Suelo agrícola.** Suelo fértil que permite el crecimiento y desarrollo de diferentes tipos de cultivo, que sean luego cosechados y utilizados por el hombre, por lo cual también debe ser apto por sus componentes para el ser humano.
- **Tierra “virgen”.** Estructura edáfica en el que nunca se ha realizado ningún cultivo de plantas. En otros lugares es aquel suelo en el que se ha dejado de cultivar por más de 5 años.

CAPÍTULO II

MÉTODO DE INVESTIGACIÓN

2.1 ÁMBITO DE ESTUDIO

Esta investigación se realizó en el distrito de Puno, provincia de Puno, de la región de Puno. Las muestras de suelo procedentes de un campo de cultivo, fueron colectados de los terrenos agrícolas pertenecientes a la Estación Experimental del Instituto Nacional de Investigación e Innovación Agraria (INIA) de Salcedo (suelo inceptisol) (INADE – PELT, 1996), el cual se encuentra localizado entre las coordenadas de $-15^{\circ} 52' 50,78''$ de latitud sur y $-70^{\circ} 0' 10,26''$ de longitud oeste. Las muestras de suelo con “tierra virgen”, procedieron del centro poblado de Jaillihuaya (suelo entisol) (INADE – PELT, 1996), que está localizado en las coordenadas de $-15^{\circ} 52' 17,49''$ de latitud sur y $-69^{\circ} 59' 1,66''$ de longitud oeste (Google Earth, 2013). Mientras tanto, la muestra de humus de lombriz, se obtuvo en la feria sabatina de la ciudad de Puno. El distrito de Puno, se caracteriza por presentar un clima frío y seco, con una estación seca (mayo a agosto) y otra lluviosa (septiembre a febrero) y una temperatura media anual de 8°C (SENAMHI, 2000). Los análisis de laboratorio y los tratamientos se realizaron en el Laboratorio de Microbiología y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno.

2.2 TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN

El tipo de investigación fue experimental y analítico, ya que se estableció la carga bacteriana diazotrófica presente en muestras de suelos de campo de cultivo continuo, “tierra virgen” y humus de lombriz y se realizó la inoculación en semillas de quinua para evaluar su desarrollo por 15 días.

2.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

La población de tipos de sustrato (suelos) es muy amplia, es por eso que se planificó un muestreo no probabilístico, por conveniencia, en el que el número de muestras sea representativa de la población. El número total de muestras evaluadas fueron de 27, en cada

tipo de sustrato (suelo de cultivo, suelo virgen y humus de lombriz) se realizaron 9 muestreos y en cada mes (setiembre, octubre y noviembre) se realizaron 3 muestreos sectorizados, los cuales procedieron de cada tipo de suelo, tal como se observa en el cuadro 2.

Cuadro 2. Distribución del número de muestras a evaluar en la investigación.

Meses de muestreo	Número de muestras por tipo de suelo			Total
	Campo de cultivo*	“Tierra virgen”**	Humus de lombriz***	
Setiembre	3	3	3	9
Octubre	3	3	3	9
Noviembre	3	3	3	9
Total	9	9	9	27

* Procedente del campo experimental de INIA – Puno.

** Procedente del centro poblado de Jayllihuaya.

*** Procedente de un solo productor.

2.4 MATERIALES

a) Muestra a analizar

- ✓ Tipos de sustratos (suelo de cultivo, suelo virgen y humus de lombriz).
- ✓ Semillas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) variedad Salcedo INIA.

b) Material de laboratorio

- ✓ Bolsas de polietileno.
- ✓ Tubos de ensayo de 10 x 12 ml.
- ✓ Láminas portaobjetos 25 x 76 mm.
- ✓ Láminas cubreobjetos de 22 x 22 mm.
- ✓ Placas Petri plásticas estériles de 47 mm de diámetro, caja 100 unidades (Millipore PD10 047 00).
- ✓ Matraces de 250 ml.
- ✓ Regla calibrada Standar.

c) Material de escritorio

- ✓ Cuaderno de apuntes.
- ✓ Laptop marca Toshiba.
- ✓ Impresora.
- ✓ Lápiz de grafito.
- ✓ Lapiceros de tinta seca.
- ✓ Hojas de papel Bond A4.

d) Medios de cultivo

- ✓ Medio mineral sin nitrógeno.
- ✓ Agar mineral sin nitrógeno
- ✓ Medio de cultivo de Knop.

e) Equipos

- ✓ Incubadora BINDER serie BD.
- ✓ Autoclave marca AESA.
- ✓ Balanza analítica de precisión marca Mettler Toledo.
- ✓ Microscopio óptico compuesto marca Karl Zeiss.

2.5 METODOLOGÍA

a. Tratamiento de las muestras

Las muestras de tierra fueron colectadas en frascos de vidrio de boca ancha esterilizados, se recolectó 250 g. de suelo virgen y cultivado, seguidamente fueron rotulados y las muestras de humus de lombriz expandidas en bolsas de 1 Kg, procedieron de la empresa (figura 1) J. BONANZA ING´S E.I.R. Todos ellos fueron colocados en una caja de tecnopor acompañado con bolsas conteniendo cubitos de hielo para mantenerlas a temperatura a 4 °C aproximadamente, hasta que las muestras fueron procesadas en el laboratorio (Zúñiga, 2010).



Figura 1. Sustratos evaluados (1 = humus de lombriz; 2 = suelo de cultivo y 3 = suelo virgen).

b. Preparación de diluciones de la muestra

La técnica empleada fue de acuerdo al Standard Methods (1998) citado por Zúñiga (2010):

- 1) Se rotuló cada tubo con el número de dilución correspondiente y código de muestra.
- 2) Se pesó 10 g de cada muestra sólida, y se mezclaron en un matraz con 90 ml de agua destilada (diluyente), obteniéndose así la dilución 10^{-1} .
- 3) Se agitó manualmente las muestras por un periodo de un minuto aproximadamente.
- 4) Se tomó 1 ml de la dilución 10^{-1} y se adicionó en un tubo que contenga 9 ml de agua destilada, obteniéndose una dilución de 10^{-2} y se homogenizó.
- 5) El paso anterior fue repetido hasta obtener diluciones de 10^{-6} .

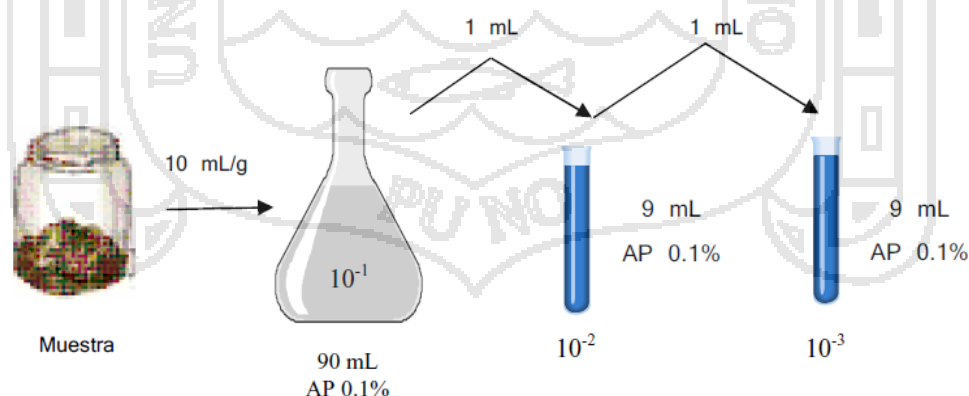


Figura 2. Preparación de muestras y diluciones.

c. Cuantificación de bacterias diazotróficas de vida libre (Zúñiga, 2010)

- 1) Se colocó 1 ml de las diluciones 10^{-2} hasta 10^{-6} en tubos que contenían caldo mineral sin nitrógeno. Se consideró 3 tubos por dilución.
- 2) Se realizó la incubación de los tubos a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 días.
- 3) Seguidamente se realizó el conteo de los tubos positivos de cada una de las diluciones observando viraje de color, turbidez y la formación de un velo en la superficie del caldo, el conteo bacteriano se expresó en NMP/g (gramo de sustrato).

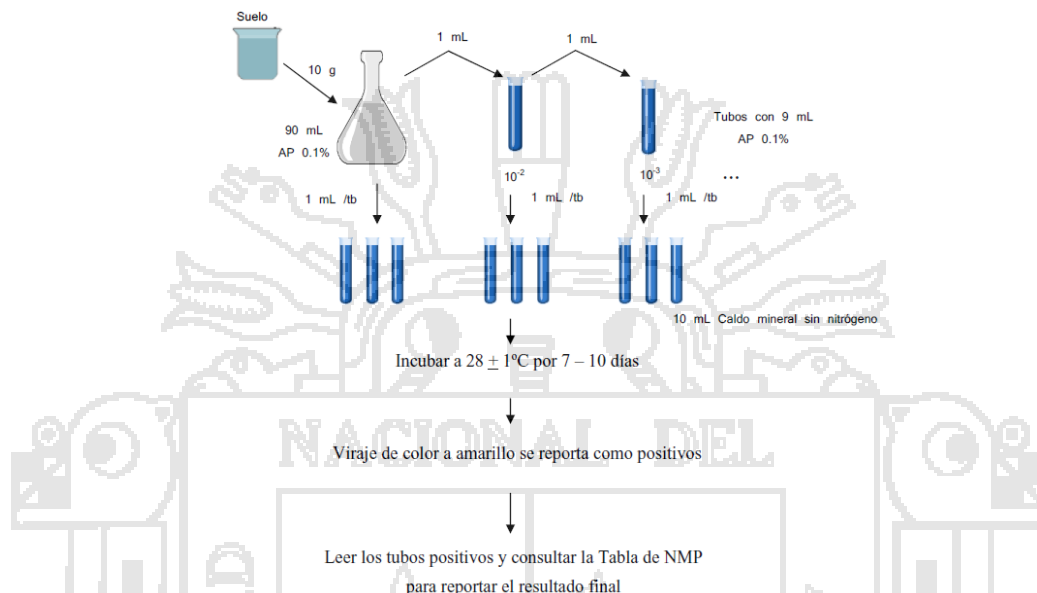


Figura 3. Recuento de bacterias diazotróficas de vida libre.

d. Obtención de colonias de bacterias diazotróficas de vida libre

Las bacterias diazotróficas fueron aisladas a partir de los tubos positivos conteniendo caldo mineral sin nitrógeno mediante la realización de estrías en medios de cultivo sólido mineral sin nitrógeno, el cual estuvo constituido por los siguientes componentes químicos: K_2HPO_4 (0,635 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g), NaCl (0,02 g), Cl_3Fe (0,1% en solución) (3,4 g), $\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,0108 g), KH_2PO_4 (0,15 g), manitol (10 g), agar (15 g), sacarosa (10 g) y azul de bromotimol (solución al 0,5% en etanol de 70%) (5 ml), todo ello a pH 7 (Zúñiga, 20102). En esta investigación se realizó la identificación plena de bacterias diazotróficas, la cual presentó características culturales en las colonias que desarrollaron en los medios carentes de nitrógeno.



Figura 4. Reactivos para preparación del caldo mineral sin nitrógeno.

e. Evaluación del efecto *in vitro* de las bacterias en el crecimiento de plantas

Una vez realizado el trabajo de aislamiento de las cepas se procedió a inocular a las semillas de quinua en condiciones de esterilidad, que aseguren la sola interacción entre la especie vegetal y la bacteria inoculada. La inoculación se realizó según lo recomendado por Constantino *et al.* (2011), y fue de la siguiente manera:

- 1) De los tubos de caldo mineral sin nitrógeno positivos a la presencia de bacterias diazotróficas, se realizaron subcultivos mediante estrías, en placas de agar mineral sin nitrógeno, en el cual desarrollaron colonias compatibles con bacterias diazotróficas.
- 2) En un vaso de precipitado limpio y seco, se añadió 50 ml de agua destilada estéril.
- 3) Con la ayuda de un hisopo, se tomaron de 3 a 5 colonias de bacterias diazotróficas presentes en medio de cultivo de agar mineral sin nitrógeno, para ser transferidos al vaso de precipitado con 50 ml de agua destilada estéril.
- 4) Seguidamente se coleccionaron 100 semillas de quinua, las cuales fueron transferidas por una hora al vaso de precipitado con agua destilada inoculada con bacterias.

Los procedimientos realizados post inoculación de bacterias en las semillas de quinua, fueron los siguientes:

- 1) Se cultivaron las semillas de quinua en tubos de ensayo de tamaño estándar, cada uno presentaba 5 ml medio Knop.
- 2) Se utilizó en total 10 semillas por tratamiento.
- 3) Las semillas se esterilizaron superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 30 y 0,1% de Tween 80 durante 15 minutos, seguidos de tres lavados con agua estéril de 10 minutos cada uno.
- 4) El material vegetal se mantuvo en condiciones de esterilidad.
- 5) Los tubos de ensayo se mantuvieron en una cámara de cultivo durante 15 días, con 16 horas de fotoperíodo a 25 °C (Schoebitz, 2008).

Los efectos evaluados de la inoculación de bacterias diazotróficas en las semillas de quinua, fueron determinados en 10 semillas, en ellas se determinó lo siguiente:

- 1) El porcentaje de germinación a los 4 días post inoculación de las semillas de quinua. Para ello se aplicó el método de la observación directa e *in situ*, cuantificando el número de semillas germinadas.
- 2) El tiempo en días que demoró la formación de raíces y primeras hojas a partir de las semillas inoculadas de quinua. Para ello se aplicó el método de la observación directa e *in situ*, en el cual se verificó la presencia de raíces y primeras hojas de la plántula.
- 3) La longitud total de la plántula luego de los 15 días post inoculación de las semillas de quinua. Para ello se aplicó el método de la observación directa e *in situ*, mediante la medición con un vernier de la longitud total de la planta.

2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos de los recuentos bacterianos presentes en los suelos (tierra de campo de cultivo, “tierra virgen” y humus de lombriz), así como la determinación de la longitud total de la planta luego de 15 días de inoculación, fueron previamente analizados mediante pruebas estadísticas descriptivas (media) y de dispersión (desviación estándar y coeficiente de variación). Seguidamente para determinar si existieron o no diferencia estadística significativa entre los suelos en estudio y los efectos de cada bacteria diazotrófica aislada, se aplicaron pruebas de análisis de varianza, seguidamente se realizaron pruebas de contraste de Tukey, todos los análisis estadísticos se realizaron con un nivel de confianza del 95%.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Carga bacteriana diazotrófica en muestras de suelo de cultivo, suelo virgen y en humus de lombriz

La carga bacteriana diazotrófica cuantificada en los sustratos evaluados, oscilaron entre los promedios de $155,33 \times 10^2$ NMP/g en suelos de cultivo y $240,00 \times 10^2$ NMP/g en suelo virgen. Los coeficientes de variación fueron mayores en suelo de cultivo (48,95%) y en humus de lombriz (38,16%), mientras que en suelo virgen al ser uniformes los valores en los recuentos bacterianos, los coeficientes de variación fueron iguales a 0%, tal como se presenta en el cuadro 3.

Cuadro 3. Cuantificación bacteriana diazotrófica en muestras de tres sustratos a los siete días de cultivo.

Tipo de sustrato	Carga bacteriana diazotrófica (NMP/g) promedio de tres repeticiones			\bar{X} (%)	D. E.	C. V. (%)
	Setiembre	Octubre	Noviembre			
Suelo de cultivo	$>240 \times 10^2$	110×10^2	110×10^2	$153,33 \times 10^2$	75,06	48,95
Suelo virgen	$>240 \times 10^2$	$>240 \times 10^2$	$>240 \times 10^2$	$240,00 \times 10^2$	0,00	0,00
Humus de lombriz	$>240 \times 10^2$	$>240 \times 10^2$	110×10^2	$196,67 \times 10^2$	75,06	38,16

Dónde: R = repetición, \bar{X} = promedio; D. E. = desviación estándar; C. V. = coeficiente de variación.

Posteriormente a los 10 días de cultivo, las triadas de tubos negativos a los siete días, realizaron el viraje de azul a un color amarillo, tal como se observa en las figuras 5, 6 y 7, demostrándose así la presencia de una alta carga bacteriana de diazotrófos en las muestras de suelo cultivado, suelo virgen y humus de lombriz respectivamente.

El aislamiento de microorganismos en medios libres de nitrógeno, constituye un primer paso hacia la identificación de bacterias con capacidad para metabolizar nitrógeno.

El análisis del número y tipo de microorganismos identificados en estos medios brinda información valiosa acerca de la distribución de microorganismos potencialmente promotores del crecimiento vegetal de las semillas de quinua en los diferentes sitios muestreados. Los resultados muestran que los tres suelos evaluados presentaron cargas microbianas de bacterias mayores a 240 NMP/g de sustrato.



Figura 5. Número más probable de suelo cultivado.

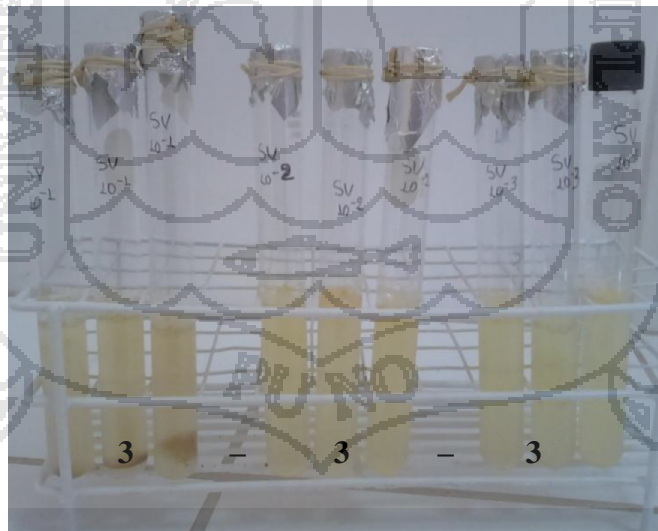


Figura 6. Número más probable de suelo virgen.

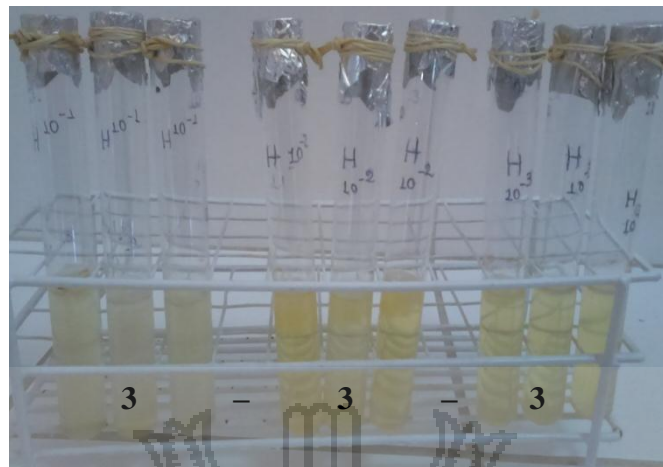


Figura 7. Número más probable de humus de lombriz.

Según el análisis de varianza realizado a la carga bacteriana diazotrófica, los tres sustratos evaluados no presentaron diferencia estadística significativa ($F = 1,50$; $GL = 2$; $P = 0,2963$) (anexo 1). Estos resultados también se representan gráficamente en la figura 8, y en ella se muestra que aritméticamente el mayor promedio de carga bacteriana diazotrófica se encontró en suelo virgen, siendo menor en suelo cultivado.

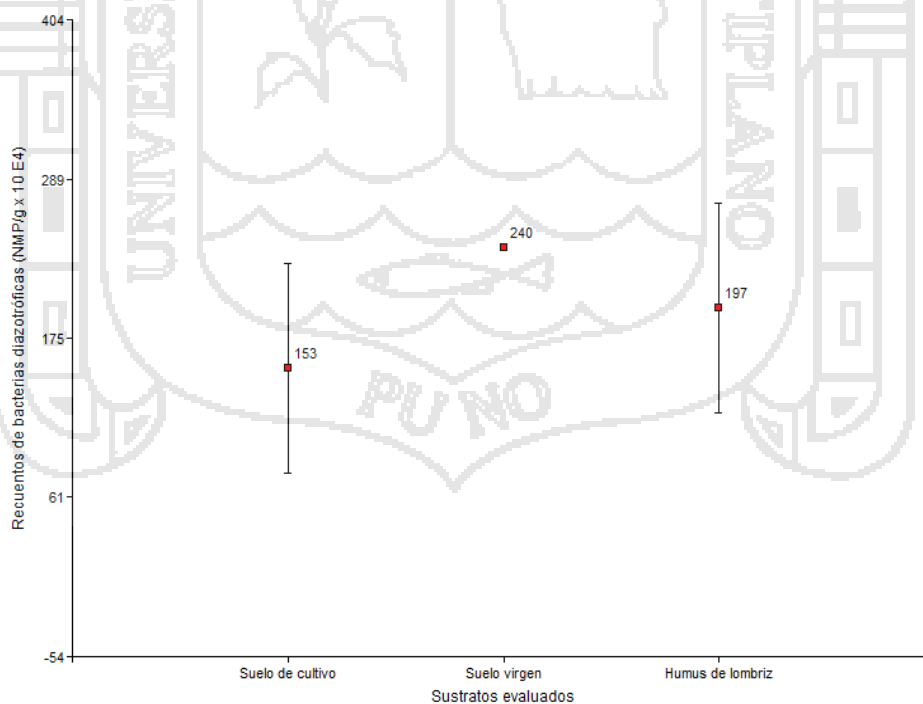


Figura 8. Comparación de la carga bacteriana diazotrófica en sustratos evaluados.

En la figura 9, se observa el crecimiento en placa de colonias de bacterias diazotróficas, las cuales se caracterizaron por virar el color del medio de cultivo libre de nitrógeno de color azul a amarillo, asimismo de la presencia de colonias de amarillas. En este trabajo se realizó el aislamiento de microorganismos en medios libres de nitrógeno como un primer paso para la identificación y posterior análisis de bacterias potencialmente promotores de crecimiento vegetal. Este resultado es interesante porque concuerda con hallazgos anteriores de bacterias diazótroficas en el interior y en la superficie de las raíces de varias gramíneas tropicales como es el caso de bacterias del género *Azospirillum* (Marín *et al.*, 1998). Es posible, por consiguiente, que el cambio de vegetación, y en especial la presencia de gramíneas (*Brachiaria* sp.), pueda favorecer el establecimiento de bacterias aerobias y microaerófilas. Las gramíneas mantienen un buen crecimiento radical a expensas del crecimiento de la parte aérea, puede adquirir nitrógeno mediante fijación asociativa (Dalton y Kramer, 2006), éstas usan ambas formas de nitrógeno (nitrato y amonio) y, al igual que en otros suelos, toma fósforo y calcio mediante sistemas radicales extensos y asociaciones con micorrizas arbusculares (Rao *et al.*, 1998).



Figura 9. Crecimiento de colonias de bacterias diazotróficas.

Claros *et al.* (2000), reportan haber aislado 55 cepas microbianas (entre bacterias y hongos) endófitas no identificadas en las raíces de la quinua en Bolivia, estos valores fueron diferentes a los resultados obtenidos en esta investigación, ya que solo se aisló una cepa bacteriana con características de colonia similares y crecieron en medios de cultivo libres de nitrógeno, en tal sentido muchos microorganismos endófitos fueron inhibidos; asimismo los autores indican que las asociaciones microbianas pueden aumentar el crecimiento de las plantas, acelerar el desarrollo o mejorar la resistencia al estrés ambiental. En las raíces de la tara (*Caesalpinia spinosa*), entre los microorganismos de vida libre se reportan a 3 cepas de

Azotobacter spp., 8 de actinomicetos y 13 cepas de *Pseudomonas* spp. (Ogata y Zúñiga, 2008). Este reporte científico fue diferente a lo determinado en esta investigación con respecto al número de especies aisladas, esto se debe probablemente a que aislamos en un medio mineral de cultivo libre de nitrógeno.

En esta investigación según las características de las colonias obtenidas en el medio mineral libre de nitrógeno, sólo creció una cepa microbiana a partir de los sustratos evaluados, las cuales presentaron una coloración amarilla, se colorearon como Gram negativas de formas ovaladas, y fueron catalasa positivas, estos rasgos de cultivo y bioquímicos, nos apoya a afirmar que corresponden a bacterias del género *Azotobacter* spp. En contraste a éstos resultados Calvo *et al.* (2008), en la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*), reportan a individuos del género *Bacillus* como el principal grupo y su presencia constante se debe a que poseen la capacidad de formar endosporas, y que las cepas bacterianas adaptadas a altitudes de la provincia de Puno, se deberían a que poseen genes de shock térmico inducibles que incluyen chaperonas y proteasas, y que entre sus beneficios fisiológicos para las plantas, se mencionan la capacidad de solubilizar los fosfatos, la síntesis de fitohormonas (ácido indol acético) y la capacidad de controlar hongos patógenos en la rizósfera.

3.2 Efecto *in vitro* de las bacterias diazotróficas en el proceso de germinación, formación de raíces y el crecimiento de las plántulas de quinua salcedo INIA hasta los 15 días de tratamiento

Luego de los 15 días de tratamiento de las semillas con bacterias diazotróficas previamente aisladas, se obtuvo un promedio de 76,67% de germinación de las semillas de quinua luego de cuatro días de incubación, siendo superior a los resultados de germinación en plantas no inoculadas. Por otro lado, la formación de raíces y primeras hojas se obtuvo en un promedio de 5,67 días, mientras que las plantas no inoculadas se presentaron con un promedio de 15,33 días. Asimismo, los promedios de longitud total de las plántulas fueron de 10,17 cm en plántulas inoculadas y de 0,87 cm en plántulas no inoculadas, todo ello se observa en el cuadro 4.

Cuadro 4. Determinación del tiempo de germinación de las semillas, formación de raíces y hojas y longitud total de las plántulas de quinua inoculadas con bacterias diazotróficas.

	Semillas	Repeticiones			\bar{X}	D. E.	C. V.
		1	2	3			
Germinación a los 4 días post inoculación (%)	Inoculadas	70	80	80	76,67%	5,77	7,53%
	No inoculadas	4	6	7	5,67%	1,53	26,96%
Tiempo de formación de raíces y primeras hojas (días)	Inoculadas	4	6	7	5,67%	1,53	26,96%
	No inoculadas	13	18	15	15,33%	2,52	16,41%
Longitud total de la plántula (cm)	Inoculadas	7,5	12	11	10,17%	2,36	23,24%
	No inoculadas	1,8	0,5	0,3	0,87%	0,81	93,98%

Dónde: \bar{X} = promedio; D. E. = desviación estándar; C. V. = coeficiente de variación.

El efecto de las bacterias diazotróficas fue notoriamente superior en semillas y plántulas inoculadas. Luego de realizar el análisis de varianza y prueba de Tukey, los porcentajes de germinación variaron estadísticamente, siendo mayores en semillas inoculadas con bacterias diazotróficas previamente aisladas ($F = 162$; $gl = 1$; $p = 0,0002$) y se observa en la figura 10 (anexo 2).

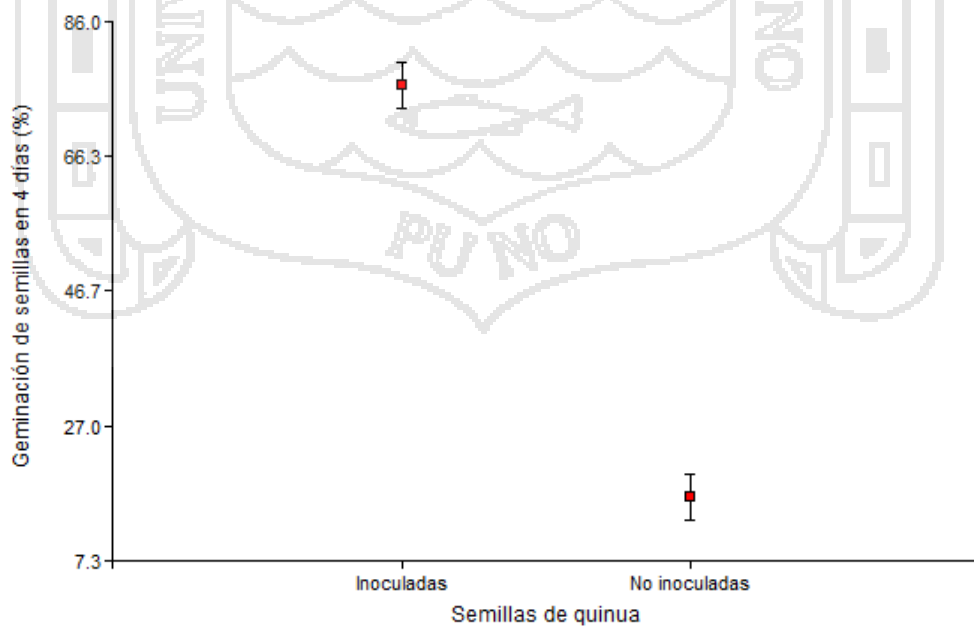


Figura 10. Efecto de las bacterias diazotróficas en la germinación de semillas de quinua.

Por otro lado, luego de realizar el análisis de varianza y prueba de Tukey, los crecimientos de raíces y la aparición de primeras hojas en plántulas de quinua variaron estadísticamente, siendo mayores en plántulas originadas a partir de semillas inoculadas con bacterias diazotróficas previamente aisladas ($F = 32,35$; $gl = 1$; $p = 0,0047$) y se observa en la figura 11 (anexo 3).

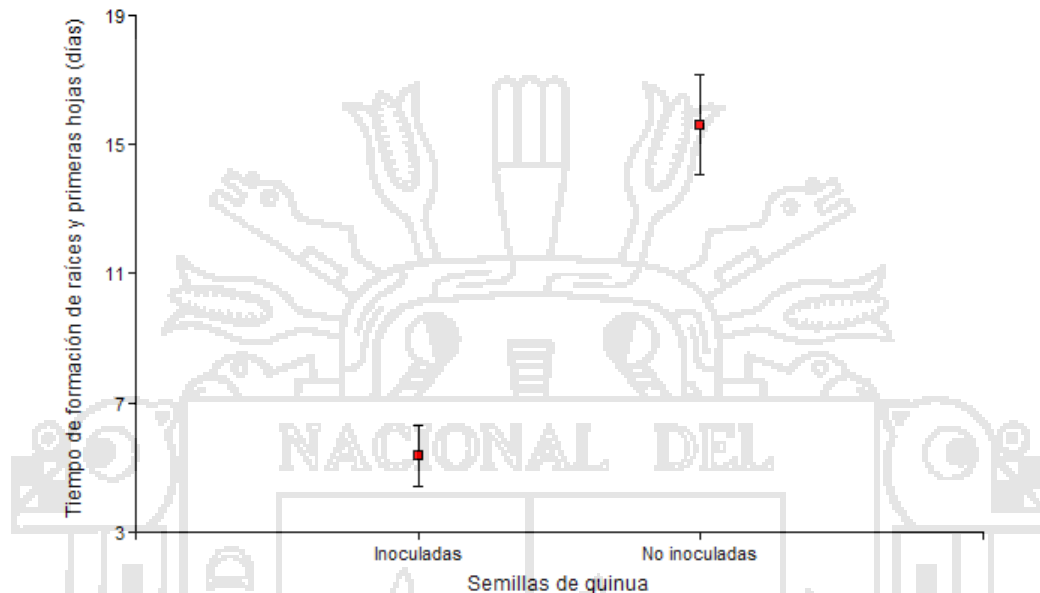


Figura 11. Efecto de las bacterias diazotróficas en el crecimiento de raíces y primeras hojas a partir de semillas de quinua.

En las figuras 13, 15 y 16, se visualiza el efecto final de inoculación de semillas con bacterias diazotróficas y no inoculadas, mientras que en la figura 14, se muestran las semillas no inoculadas con bacterias diazotróficas. Luego de realizar el análisis de varianza y prueba de Tukey, las longitudes totales de plántulas de quinua variaron estadísticamente, siendo mayores en plántulas originadas a partir de semillas inoculadas con bacterias diazotróficas previamente aisladas, ($F = 41,54$; $gl = 1$; $p = 0,0030$) y se observa en la figura 12 (anexo 4).

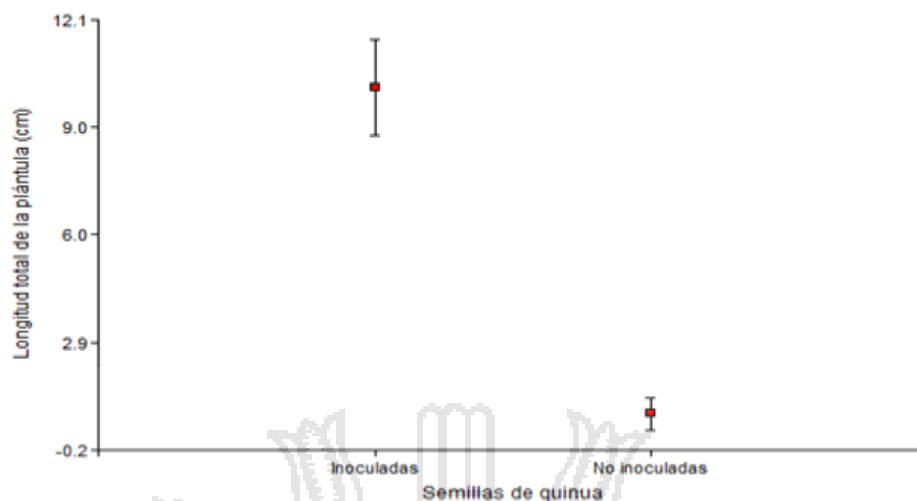


Figura 12. Efecto de las bacterias diazotróficas en la longitud total de las plántulas de quinua.

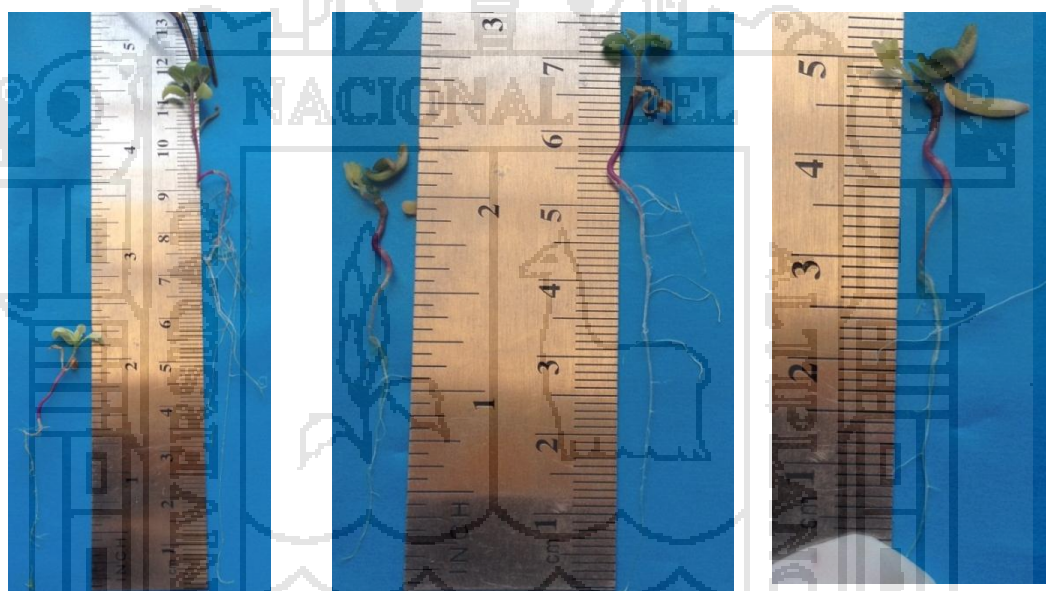


Figura 13. Mediciones del crecimiento final de las plántulas, de semillas inoculadas con bacterias diazotróficas.



Figura 14. Mediciones del crecimiento final de las plántulas, de semillas no inoculadas con bacterias diazotróficas.



Figura 15. Germinación y crecimiento de plántulas de quinua inoculadas con bacterias diazótroficas.



Figura 16. Comparación del crecimiento de tres plántulas de quinua inoculada (izquierda) con bacterias diazótroficas y dos no inoculadas (derecha).

Las bacterias diazótroficas plenamente identificadas como *Azotobacter chroococcum* y *A. vinelandii*, presentaron un efecto benéfico sobre la planta de papa en cuanto a la promoción del crecimiento como en la producción de tubérculos (Rico, 2009), mejoraron la emergencia de la maca (Zúñiga, 2010) y presentaron actividades antagónicas hacia fitopatógenos (Martínez, 2011). Estas aseveraciones coinciden con lo observado en los resultados de esta investigación, ya que como se observa en la figura 16, las semillas de

quinua inoculadas con bacterias diazotróficas, estimularon un mayor porcentaje de germinación y mejor crecimiento a los 15 días de inoculación. Estos resultados nos llevarían a realizar futuras formulaciones biofertilizantes, tal como lo reporta Córdova *et al.* (2009), quien recomienda agregar bacterias diazotróficas a sustratos como pollinaza, los cuales mejorarían la calidad fértil de los suelos.

Las semillas de quinua inoculadas con las bacterias diazótroficas presentaron mejores resultados en los porcentajes de germinación y posterior crecimiento de los órganos de las plántulas. Las pectinasas y celulasas han sido implicadas en los mecanismos de entrada de los microorganismos a los tejidos internos de las plantas. Hallman *et al.*, (1997), han propuesto que las enzimas pectinolíticas y celulolíticas producidas por las bacterias contribuyen a los procesos de infección en las plantas. La actividad pectinolítica ha sido propuesta como responsable de la invasión por *Azospirillum* sp. a las raíces, por penetración de la laminilla media y de los puntos de emergencia de las raíces laterales (Bekri *et al.*, 1999). Por otro lado, las enzimas como pectinasas y celulasas también son producidas por microorganismos patógenos, por lo que es necesario un mayor conocimiento de la regulación y expresión de estas enzimas (Verma *et al.*, 2001).

Es de suponer que en el proceso de colonización microbiana al penetrar y dañar los tejidos de las plantas, la misma active sus genes de defensa para protegerse de los endófitos. De hecho, varios estudios demuestran que cuando las plantas son inoculadas con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs) aumentan su resistencia, provocando cambios fisicoquímicos (Zdor y Anderson, 1992). La capacidad pectinolítica de las cepas puede ser favorable o no, dado que si producen las enzimas en los tejidos internos de las plantas podrían provocar daños en las mismas. Por otro lado, Verma *et al.*, (2001) indican que las enzimas hidrolíticas podrían ser producidas por los endófitos sólo durante las etapas tempranas de la invasión y no mientras residen en los tejidos de las plantas.

Los tratamientos que presentaron mejores resultados en la emergencia de las plantas, el diámetro del tallo y la longitud de las hojas y los tallos fueron las inoculadas con las bacterias diazótroficas. Estos tuvieron diferencias significativas con respecto a las semillas testigo sin inoculación bacteriana, además se observó una mayor eficiencia en la

emergencia y el crecimiento en las plantas de quinua. De acuerdo con el análisis estadístico de los datos de emergencia y crecimiento de las plantas, las semillas inoculadas presentaron valores por encima de la media y límite superior, con respecto a los otros aislados y controles.

El efecto beneficioso de las rizobacterias radica en diferentes mecanismos, tales como: la producción de sustancias estimuladoras del crecimiento, sideróforos y antibióticos; así como la inducción de resistencia en la planta y la fijación del nitrógeno (Torriente, 2010). Por ello el aislamiento de bacterias diazótrofes, su identificación mediante métodos confiables y la evaluación de su capacidad como promotoras del crecimiento vegetal, además de ser una opción en procesos investigativos con fines agrícolas, es una buena alternativa para mejorar la nutrición y la calidad de los cultivos, lo que contribuye al mejoramiento del sistema planta suelo microorganismo.

Estos resultados sugieren que, el efecto de la inoculación en la elongación de las raíces depende del genotipo de las bacterias pero también del genotipo vegetal. Aunque, para verificar esto, deberían realizarse más repeticiones de los ensayos. El crecimiento de la raíz principal y de las raíces laterales produce un aumento de la superficie de absorción de las plantas, lo que favorece el intercambio de nutrientes. Muchos autores han reportado la capacidad de las PGPRs de potenciar estos cambios morfológicos en los sistemas radiculares de los cultivos (Kapulnik *et al.*, 1985; De Bashan *et al.*, 2007; Spaepen *et al.*, 2008).

La elongación de la radícula podría atribuirse a la producción de algún metabolito bacteriano como el ácido indol acético (AIA). En las condiciones ensayadas, la inoculación no provocó en ninguno de los casos, un crecimiento significativo en el largo de la radícula en relación a las semillas no inoculadas. A pesar de que las cepas en estudio poseen la capacidad de producir AIA, puede ser que no lo estén expresando en estas condiciones, o que en vez de provocar el crecimiento de la raíz principal provoquen un aumento de Tratamiento Largo de la radícula (cm).

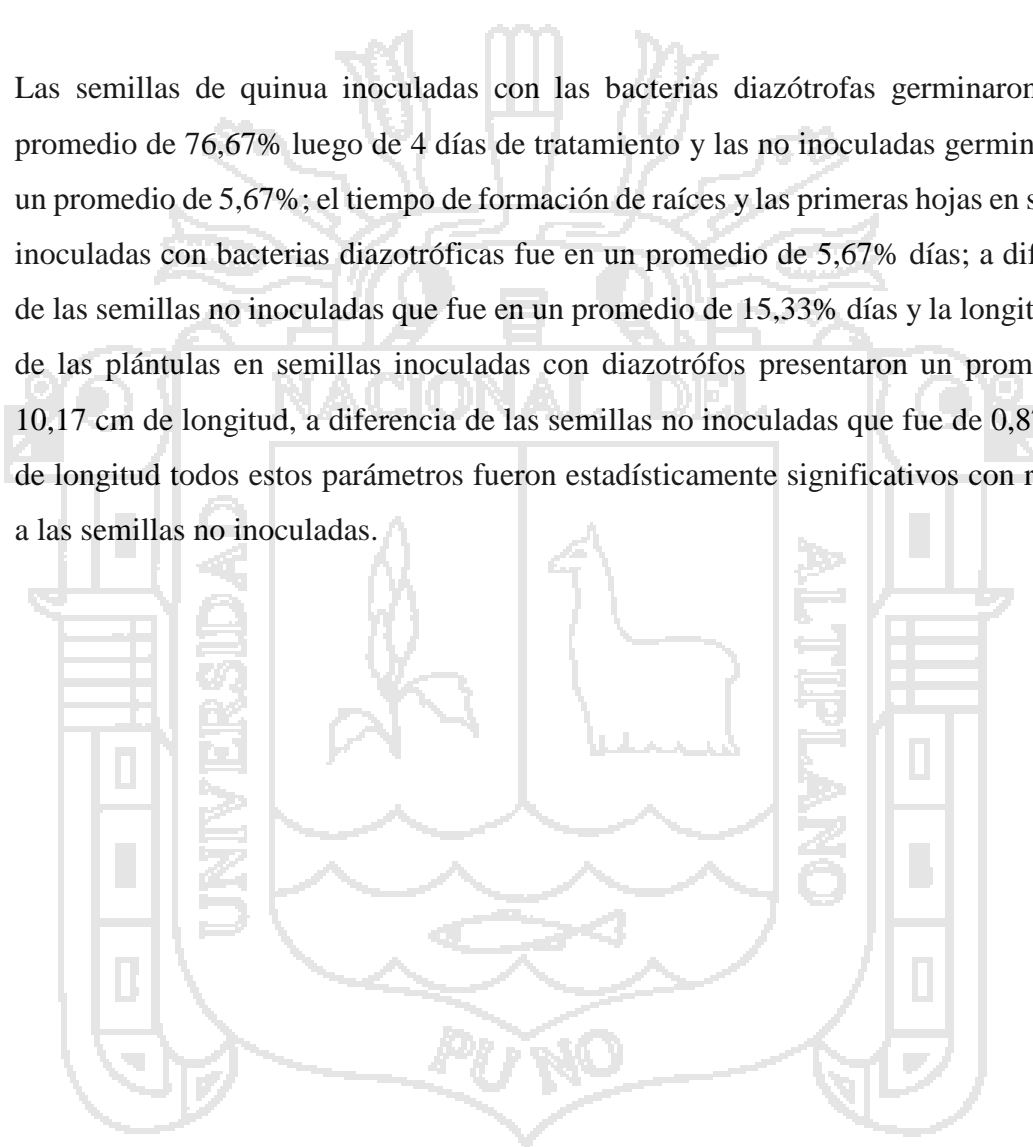
Xie *et al.*, (1996) indican que la producción de AIA por las bacterias en bajas cantidades promueve la elongación de la raíz principal, mientras que cantidades altas de AIA provocan el aumento de la formación de raíces laterales y adventicias pero inhiben el

crecimiento de la raíz principal. Las bacterias del presente estudio son productoras de AIA, en las condiciones del presente ensayo en la variedad de quinua pudieron haber producido altas concentraciones de AIA lo cual podría explicar el efecto inhibitorio observado sobre las raíces principales de dicha variedad.



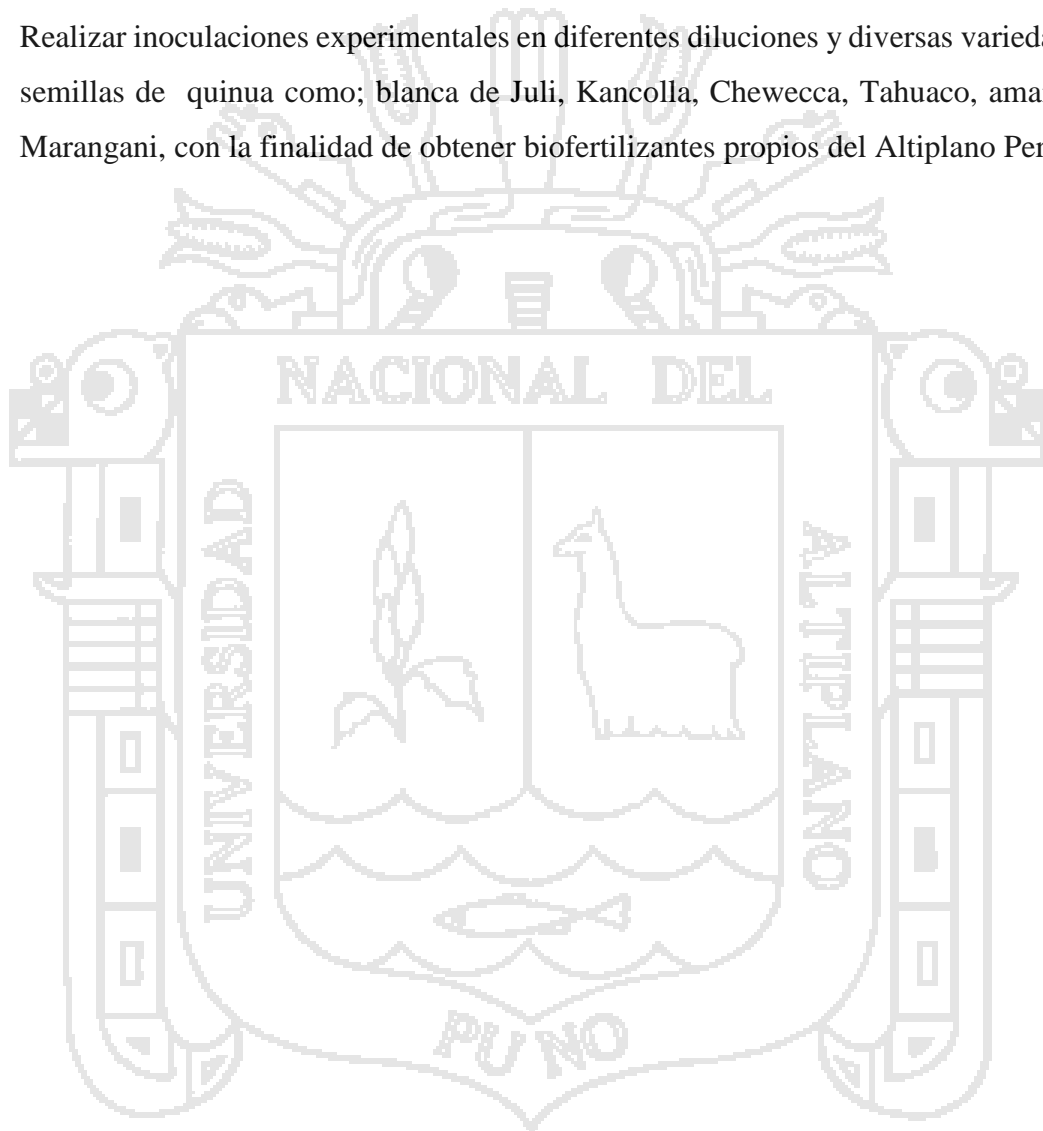
CONCLUSIONES

- La carga bacteriana diazótropa promedio en suelo cultivado fue la que tuvo menor carga bacteriana con $153,33 \times 10^2$ NMP/g, a diferencia del suelo virgen que tuvo la mayor carga bacteriana con $240,00 \times 10^2$ NMP/g y el humus de lombriz fue de $196,67 \times 10^2$ NMP/g.
- Las semillas de quinua inoculadas con las bacterias diazótropas germinaron en un promedio de 76,67% luego de 4 días de tratamiento y las no inoculadas germinaron en un promedio de 5,67%; el tiempo de formación de raíces y las primeras hojas en semillas inoculadas con bacterias diazotróficas fue en un promedio de 5,67% días; a diferencia de las semillas no inoculadas que fue en un promedio de 15,33% días y la longitud total de las plántulas en semillas inoculadas con diazotrófos presentaron un promedio de 10,17 cm de longitud, a diferencia de las semillas no inoculadas que fue de 0,87 % cm de longitud todos estos parámetros fueron estadísticamente significativos con respecto a las semillas no inoculadas.



RECOMENDACIONES

- Realizar la identificación molecular de las especies de bacterias diazótrofes aisladas en suelos del Altiplano Peruano.
- Realizar inoculaciones experimentales en diferentes diluciones y diversas variedades de semillas de quinua como; blanca de Juli, Kancolla, Chewecca, Tahuaco, amarilla de Marangani, con la finalidad de obtener biofertilizantes propios del Altiplano Peruano.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Astier M., Maass M. y Etchevers J. 2002. Derivación de indicadores de calidad del suelo en el contexto de la agricultura sustentable. *Rev. Agrociencia*. Vol. 36: p. 605 – 620.
- Atlas M. y Bartha R. 2002. *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Segunda Edición. Editorial Addison Wesley. Madrid – España. 217 – 218.
- Benzing A. 2001. *Agricultura orgánica, fundamentos para la región andina*. Editorial Neckar – Verlag, Villingen – Schwenningen. Alemania. 682 p.
- Bekri A., Desair J., Keijers V., Proost P., Leeuwen S., Vanderleyden J., Broek V. 1999. *Azospirillum irakense* produces a novel type pectate lyase. *J. Bacteriol.* 181: 2440 – 2447.
- Calvo P. y Zúñiga D. 2010. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Revista Ecología Aplicada*. 9 (1): 31 – 39.
- Calvo P., Meneses L. y Zúñiga D. 2008. Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Revista Ecología Aplicada, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima – Perú*. 7 (1,2): 141 – 148.
- Constantino M., Gómez R., Álvarez J., Pat J. y Espín E. 2011. Efecto de la inoculación de *Azotobacter chroococcum* y *Glomus intraradices* en el crecimiento y nutrición de plántulas de papaya en fase de vivero. *Revista Agronomía Costarricense*. 35 (1): 15 – 31.
- Cardona, G.I. 2004. *Evaluación de la diversidad de actinomicetos en suelos bajo tres coberturas vegetales en el sur del trapecio amazónico colombiano*. Tesis M.Sc, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, DC, Colombia.
- Claros M., Angulo V., Gutiérrez C. y Ortuño N. 2000. Primeros reportes de aislamiento de bacterias y hongos endófitos en el cultivo de la quinua (*Chenopodium quinoa* Wild) en Bolivia. Fundación PROINPA. Cochabamba – Bolivia. 4 p.
- 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*. 25 (3): 253 – 265.
- Covaleda-Velez, A. 1996. Caracterización de sistemas de producción agrícola y pecuario; uso y manejo de las tierras y su evaluación con fines múltiples, p. 977- 1071. *In* IGAC

- (ed.). Aspectos ambientales para el ordenamiento territorial del municipio de Mitú. Departamento del Vaupés, Bogotá DC, Colombia.
- Coyne M. 2000. Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. Editorial Paraninfo. ITP An International Thomson Publishing company. Madrid – España. 416 p.
- Dalton, D.A & S. Kramer. 2006. Plant-Associated Bacteria, p. 105-130. In S. S. Gnanamanickam (ed.). Nitrogenfixing bacteria in non-legumes. Springer, Dordrecht, Holanda.
- De Bashan E., Holguin G., Glick R. y Bashan Y. 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. En: Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo. Ferrera – Cerrato R., Alarcon A. (Eds.). Editorial Trillas, México City, México. 8: 170 – 224.
- Ferrera R. y Alarcón A. 2007. Microbiología Agrícola, hongos, bacterias y micro y macrofauna, control biológico y planta – microorganismo. Editorial Trillas. México. 568 p.
- Gehring, C., P.L.G. Vlek, L.A.G. de Souza & M. Denich. 2005. Biological nitrogen fixation in secondary regrowth and mature rainforest of central Amazonia. *Agricult. Ecosys. & Environ.* 111: 237 – 252.
- Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee F. and Kloepper W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43: 895 – 914.
- Hansel C., Fendorf S., Jardine P. y Francis C. 2008. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. Department of Geological and Environmental Sciences, Stanford University, Standford, California. USA.
- Ibañez V. 2009. Métodos estadísticos. Maestría en Ganadería Andina. Escuela de Post Grado, Universidad Nacional del Altiplano. Editorial Universitaria. Puno – Perú. 582 p.
- INADE – PELT, Instituto Nacional de Desarrollo y Proyecto Especial Binacional Lago Titicaca. 1996. Diagnóstico ambiental de la bahía, microcuenca y ciudad de Puno. Editado por D&MA. Puno – Perú. 157 p.
- Kapulnik Y., Okon Y. and Henis Y. 1985. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. *Can. J. Microbiol.* 31: 881 – 887.
- Kitouni, M., A. Boudemagh, L. Oulmi, S. Reghioua, F. Boughachiche, H. Zerizer, H. Hamdiken, A. Couble, D. Mouniee, A. Boulahrouf & P. Boiron. 2005. Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. *J. Mycol. Med.* 15: 45-51.

- La Manna L., Buduba C., Alonso V., Davel M., Puentes C. y Irisarri J. 2007. Comparación de métodos analíticos para la determinación de materia orgánica en suelos de la región Andino – Patagónica: efectos de la vegetación y el tipo de suelo. *Rev. Ciencia del Suelo – Argentina*. Vol. 25, No. 2: p. 179 – 188.
- Larrea O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*. Vol. 62: p. 96 – 100.
- 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.
- Madigan M., Martinko J. y Parker J. 2003. *Brock Biología de los Microorganismos*. 10ma edición. Editorial Prentice – Hall. Madrid – España.
- Marin, V., V. Baldani, K. dos Santos-Teixeira & J.I. Baldani. 1998. Fijación biológica de nitrógeno: bacterias fijadoras de nitrógeno de importancia para la agricultura tropical. EMBRAPA-AGROBIOLOGIA, Seropedica, Río de Janeiro, Brasil.
- Marínez S. 2011. Análisis funcional y caracterización de bacterias asociadas a la rizósfera de sorgo (*Sorghum spp*) y alfalfa (*Medicago sativa*). Tesis de Biólogo. Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Michoacan – México. 61 p.
- Moraga N., Gamboni O., Amoroso M. y Rajal V. 2009. Aislamiento de microorganismos presentes en suelos contaminados con Boro. Artículo de la Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Salta. Salta Argentina. 7 p.
- Nagananda G., Das A., Bhattacharya S. and Kalpana T. 2010. *In vitro* studies on the effects of biofertilizers (*Azotobacter* and *Rhizobium*) on seed germination and development of *Trigonella foenum – graecum* L. using a novel glass marble containing liquid medium. *International Journal of Botany*. 6 (4): 394 – 403.
- Ogata K. y Zúñiga D. 2008. Estudio de la microflora de la rizósfera de *Caesalpinia spinosa* en la provincia de Huánuco. *Revista Zonas Áridas*. 12 (1): 191 – 208.
- Park, M., C.H. Kim, J. Yang, H. Lee, W. Shin, S. Kim & T. Sa. 2005. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microb. Res*. 160: 127-133.
- Pedraza R., 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. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 11(2): 155 – 164.

- Peña-Venegas, C.P. 2004. Ficha BPIN: mantenimiento de la fertilidad del suelo y generación de tecnologías para la recuperación de áreas degradadas en la amazonía colombiana. Informe final anual, Instituto Sinchi, Leticia, Colombia.
- Prescott L., Harley J. y Klein D. 2009. Microbiología. 5ta edición. Editorial McGraw – Hill Interamericana. Madrid – España.
- Rao, I.M., P.C. Kerridge & M.C.M. Macedo. 1998. Requerimientos nutricionales y adaptación a los suelos ácidos de especies de *Brachiaria*. CIAT. *Brachiaria*: biología, agronomía y mejoramiento. Cali, Valle del Cauca, Colombia.
- Rico M. 2009. Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género *Azotobacter* y Actinomicetos aislados de cultivos de *Solanum tuberosum* Linnaeus, 1753 (papa) cultivados en zonas altoandinas del Perú. Tesis de Biólogo. E. A. P. de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de San Marcos.
- Schoebitz M. 2006. Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de *Lolium perenne* L. de suelo volcánico (modelo género *Azospirillum* spp.). Tesis de Licenciado en Ciencias Agrarias. Escuela de Agronomía, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. Valdivia – Chile. 77 p.
- SENAMHI, Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología. 2000. Boletines agro – hidrometeorológico. Dirección Regional de Puno. Puno – Perú.
- Spaepen S., Dobbelaere S., Croonenborghs A. and Vanderleyden J. 2008. Effects of *Azospirillum brasilense* indole – 3 – acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant Soil*. 312: 15 – 23.
- 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*. 31 (1):19.
- Verma C., Ladha K. and Tripathi K. 2001. Evaluation of plant growth promotion and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J. Biotechnol.* 91: 127 – 141.
- Xie H., Pasternak J. and Glick R. 1996. Isolation and characterization of mutants of plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2 that over produce indole acetic acid. *Curr. Microbiol.* 32: 67 – 71.
- Zdor E., Anderson J. 1992. Influence of root colonizing bacteria on the defense responses of bean. *Plant Soil*. 140: 99 – 107.

Zúñiga D. 2010. Caracterización y selección de bacterias promotoras de crecimiento en el cultivo orgánico de maca como herramienta biotecnológica para mejorar su calidad productiva. Perúbiodiverso. Lima – Perú. 207 p.

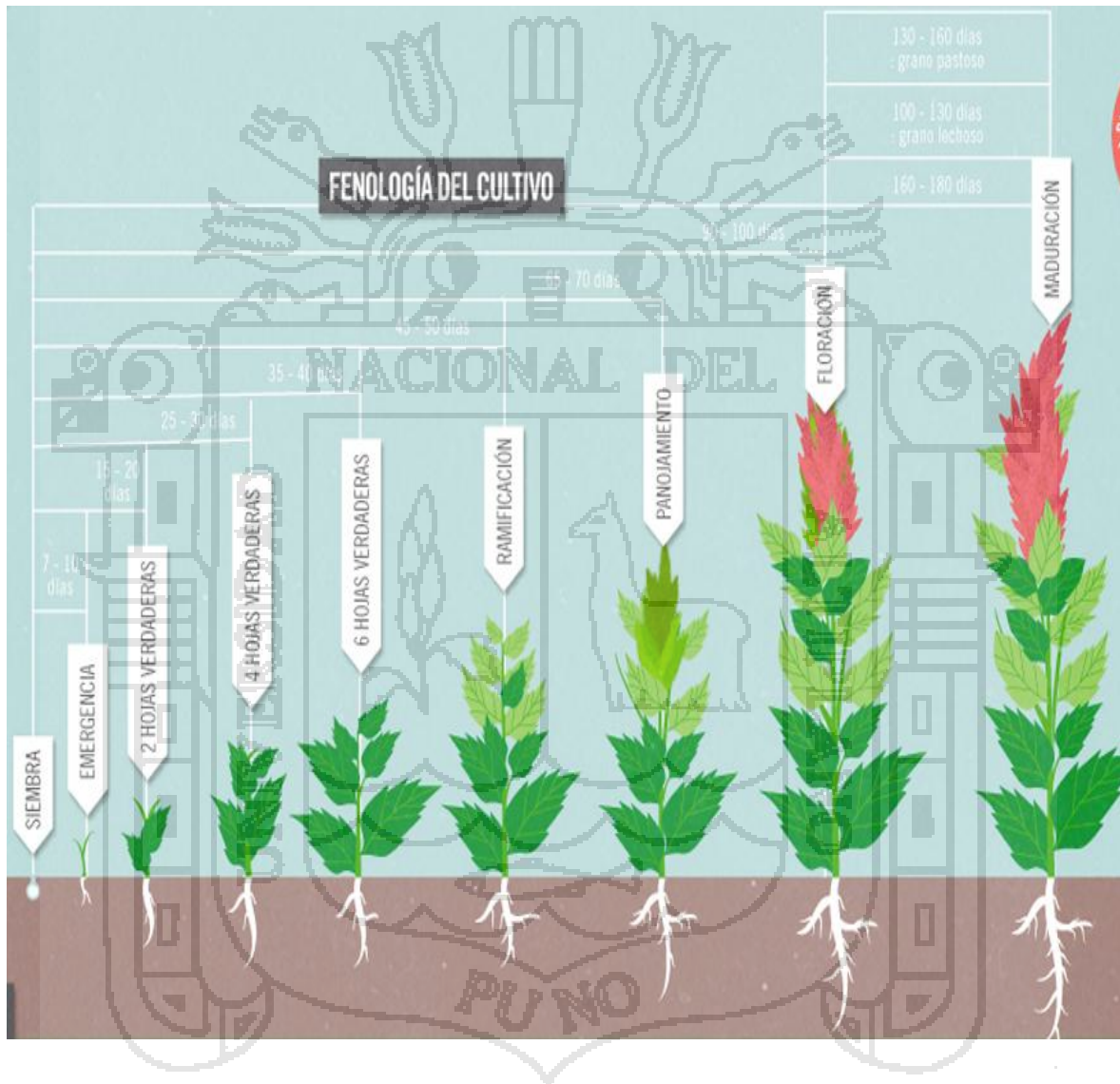
Webgrafías

Google Earth. 2013. Web site: <https://maps.google.com.pe/maps?q=bibliografia+google+earth+pdf&hl=es&gl=pe&ie=UTF-8>. Buscador: www.google.com.pe. Fecha de revisión: 29 de junio del 2013.





Anexo 1. Fenología del cultivo de la quinua.



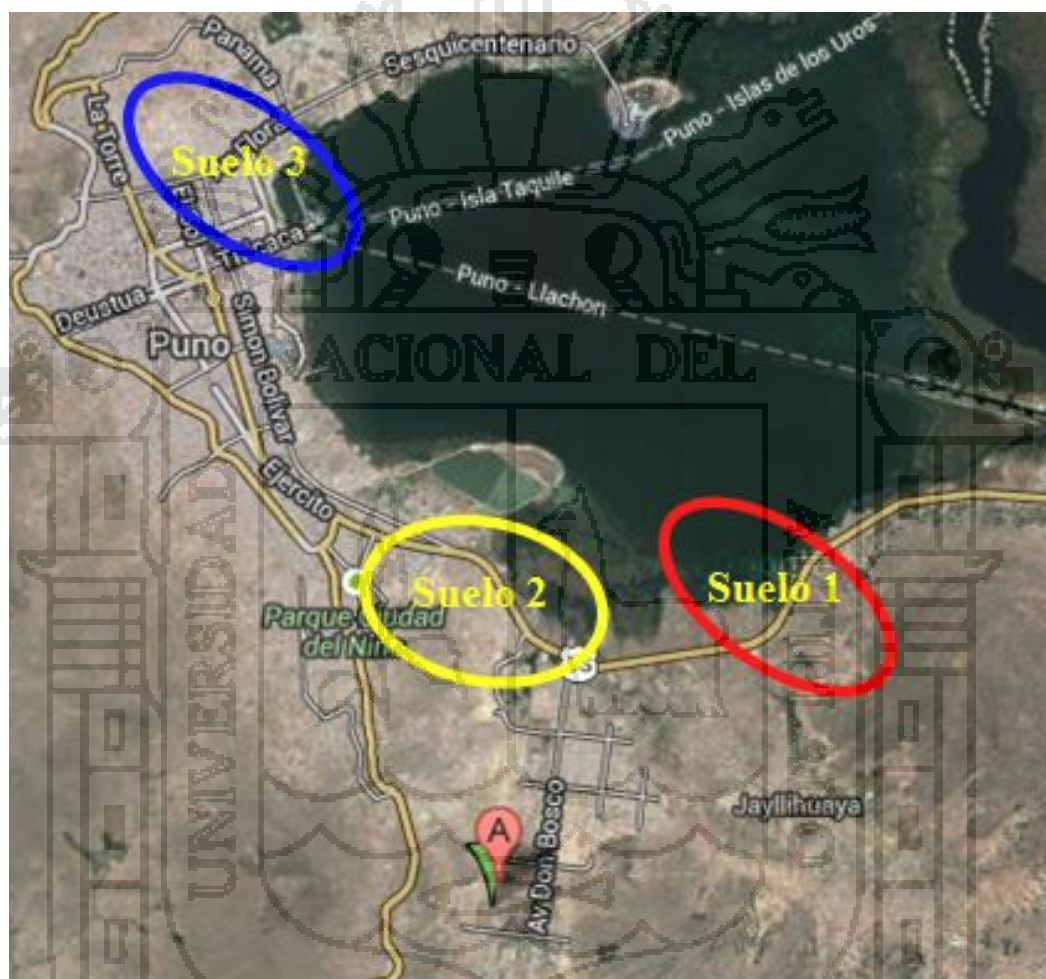
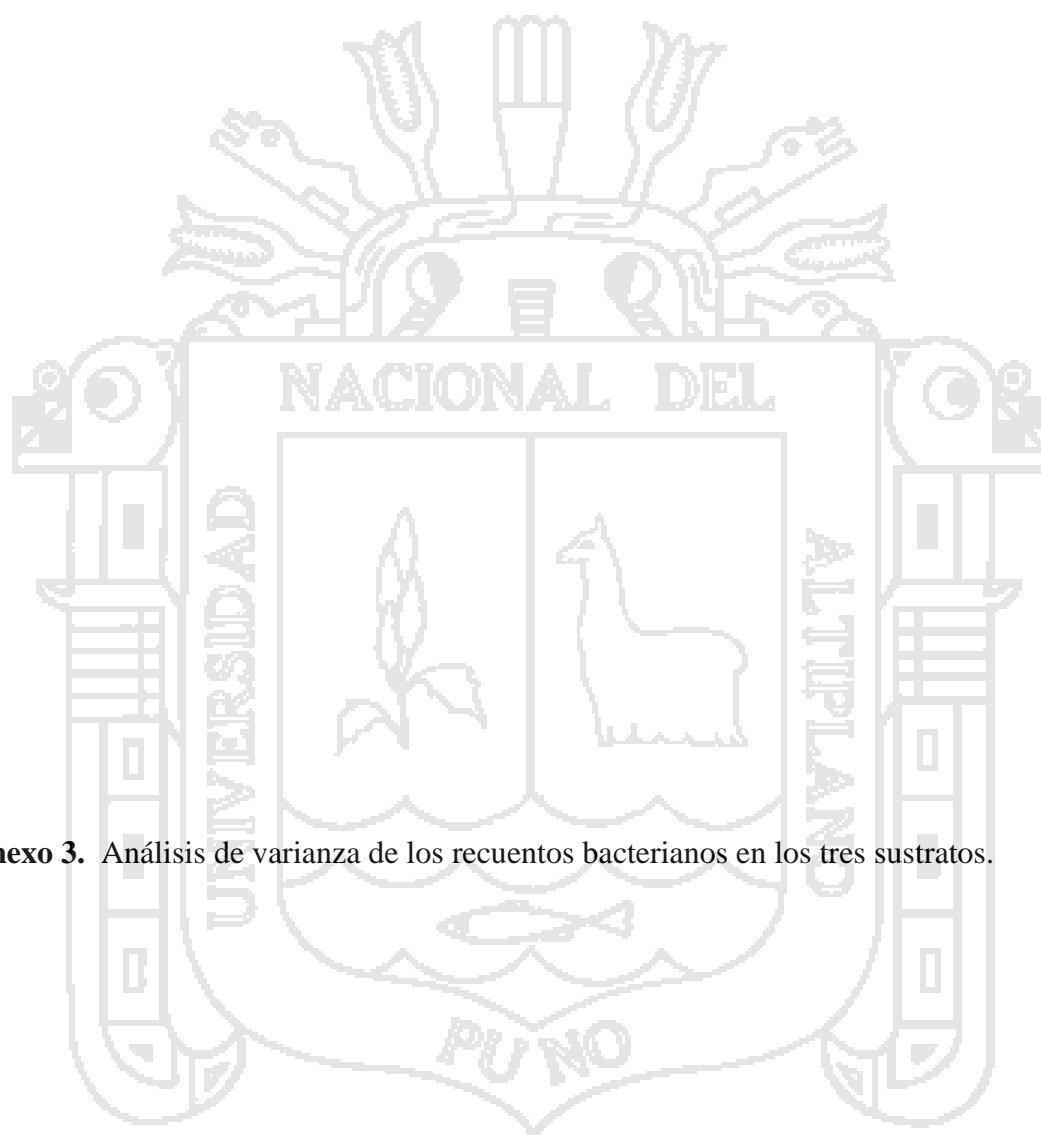
Anexo 2. Ámbito de estudio

Figura 4. Zonas de toma de muestras de suelos.

Fuente. Google Eart (2013).



Anexo 3. Análisis de varianza de los recuentos bacterianos en los tres sustratos.



Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna1	9	0.33	0.11	31.16

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	11266.67	2	5633.33	1.50	0.2963
Columna2	11266.67	2	5633.33	1.50	0.2963
Error	22533.33	6	3755.56		
Total	33800.00	8			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=153.52732

Error: 3755.5556 gl: 6

Columna2	Medias	n	E.E.
1	153.33	3	35.38 A
3	196.67	3	35.38 A
2	240.00	3	35.38 A

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

Anexo 4. Análisis de varianza para la germinación

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna1	6	0.98	0.97	12.37

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5400.00	1	5400.00	162.00	0.0002
Columna2	5400.00	1	5400.00	162.00	0.0002
Error	133.33	4	33.33		
Total	5533.33	5			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=13.08834

Error: 33.3333 gl: 4

Columna2	Medias	n	E.E.
2	16.67	3	3.33 A
1	76.67	3	3.33 B

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

Anexo 5. Análisis de varianza para el crecimiento de raíces y primeras hojas de quinua.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna1	6	0.89	0.86	19.83

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	140.17	1	140.17	32.35	0.0047
Columna2	140.17	1	140.17	32.35	0.0047
Error	17.33	4	4.33		
Total	157.50	5			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=4.71907

Error: 4.3333 gl: 4

Columna2	Medias	n	E.E.	
1	5.67	3	1.20	A
2	15.33	3	1.20	B

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

Anexo 6. Análisis de varianza de la longitud total de las plántulas de quinuas.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna1	6	0.91	0.89	32.04

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	129.74	1	129.74	41.54	0.0030
Columna2	129.74	1	129.74	41.54	0.0030
Error	12.49	4	3.12		
Total	142.23	5			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=4.00640

Error: 3.1233 gl: 4

Columna2	Medias	n	E.E.	
2	0.87	3	1.02	A
1	10.17	3	1.02	B

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