

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



EFFECTO DE LA INOCULACIÓN CON BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS EN LA  
GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE QUINUA (*Chenopodium quinoa* WILD.) EN  
CONDICIONES CONTROLADAS

**TESIS**

**PRESENTADA POR:**

Br. JAVIER FRANKLIN MAMANI CALLATA

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

**PUNO – PERÚ**

**2018**

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



**EFFECTO DE LA INOCULACIÓN CON BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS EN LA  
GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE QUINUA (*Chenopodium quinoa* WILD.) EN  
CONDICIONES CONTROLADAS**

**TESIS**


**PRESENTADA POR:**

**Br. JAVIER FRANKLIN MAMANI CALLATA  
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**APROBADA POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:**

**PRESIDENTE:**

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Roxana del Carmen Medina Rojas

**PRIMER MIEMBRO:**

  
\_\_\_\_\_  
M. Sc. Vicky Cristina Gonzales Alcos

**SEGUNDO MIEMBRO:**

  
\_\_\_\_\_  
Mg. María Isabel Vallenos Gaona

**DIRECTOR / ASESOR:**

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Sc. Juan José Pauro Roque

**Fecha de sustentación:** 10 de setiembre del 2018.

**Área** : Ciencias Biomédicas.

**Sub Línea:** Biotecnología vegetal, ambiental y humana.

**Tema** : Biotecnología Microbiana.

## **DEDICATORIA**

### **A Dios.**

*Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.*

### **A mi querida esposa e hija Luana Abigail y a mi futuro hijo.**

*Por ser el motor y motivo en mi superación personal, y el apoyo constante por parte de mi esposa y el amor inmenso de mi hija, que hacen que siga superándome cada día.*

### **A mis padres y hermanos.**

*Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud a Dios, quien con su bendición llena siempre mi vida y a toda mi familia por estar siempre presentes.

Mi profundo agradecimiento a todas las autoridades y personal que hacen la Unidad Educativa, por confiar en mí, abrirme las puertas y permitirme realizar todo el proceso investigativo dentro de su establecimiento educativo.

De igual manera mis agradecimientos a la Universidad Nacional Del Altiplano - Puno, a toda la Facultad de Ciencias Biológicas a mis profesores quienes con la enseñanza de sus valiosos conocimientos hicieron que pueda crecer día a día como profesional, gracias a cada una de ustedes por su paciencia, dedicación, apoyo incondicional y amistad.

Finalmente quiero expresar mi más grande y sincero agradecimiento a los miembros de mi jurado revisor de tesis, los cuales fueron principales colaboradores durante todo este proceso, quienes con su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración permitieron el desarrollo de este trabajo.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	9
ABSTRACT.....	10
I. INTRODUCCIÓN.....	11
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	13
2.1 ANTECEDENTES .....	13
2.2 MARCO TEÓRICO .....	15
2.2.1 La rizósfera de las plantas.....	15
2.2.2 Microorganismos del suelo.....	18
2.2.3 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal .....	18
2.2.4 Bacterias diazótrofes asimbióticas ( <i>Azotobacter</i> sp) .....	19
2.2.5 Biología molecular de <i>Azotobacter</i> sp.....	22
2.2.6 La quinua ( <i>Chenopodium quinua</i> Wild).....	24
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1 TIPO DE ESTUDIO .....	28
3.2 LUGARES DE MUESTREO DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS .....	28
3.3 METODOLOGÍA.....	28
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
4.1 Recuentos de bacterias diazótrofes a partir de tres campos de cultivo de la localidad de Huancané.....	33
4.2 Efecto de la inoculación de bacterias diazótrofes en plántulas de quinua de la variedad Blanca de Juli en condiciones controladas. ....	38
V. CONCLUSIONES.....	44
VI. RECOMENDACIONES .....	45
VII. REFERENCIAS .....	46

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Recuentos de bacterias diazótrofes (NMP/g) en muestras de suelo en tres comunidades de distrito de Huancané (junio – agosto 2017).....	33
<b>Tabla 2.</b> Germinación de semillas (%) de quinua inoculadas con bacterias diazótrofes, en condiciones de laboratorio UNA - Puno (junio – agosto 2017).....	38
<b>Tabla 3.</b> Longitud total (cm) de plántulas de quinua inoculadas con bacterias diazótrofes, en condiciones de laboratorio UNA - Puno (junio – agosto 2017).....	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Genes implicados en el flujo de electrones hacia el sitio activo de la nitrogenasa para la reducción de N <sub>2</sub> (Baca <i>et al.</i> , 2000). .....	23
<b>Figura 2.</b> Esquema de la organización de los genes involucrados en la síntesis de las tres nitrogenasas utilizadas por <i>A. vinelandii</i> en la fijación de nitrógeno (Betancourt, 2002). .....	24
<b>Figura 3.</b> Fases fenológicas de la quinua ( <i>Chenopodium quinoa</i> Willd). .....	26
<b>Figura 4.</b> Prueba de Tukey de los recuentos de bacterias diazótrofes en muestras de suelo en tres comunidades de Huancané (junio – agosto 2017). .....	34
<b>Figura 5.</b> NMP de bacterias diazótrofes en muestras de suelo de la comunidad de Luriata, Huancané (junio – agosto 2017). .....	34
<b>Figura 6.</b> NMP de bacterias diazótrofes en muestras de suelo de la comunidad de Yapupampa, Huancané (junio – agosto 2017). .....	35
<b>Figura 7.</b> NMP de bacterias diazótrofes en muestras de suelo de la comunidad de Huancollusco, Huancané (junio – agosto 2017). .....	35
<b>Figura 8.</b> Prueba de Tukey de la germinación (%) de semillas de quinua según concentración bacteriana, Laboratorio de Ecología (junio – agosto 2017). ...	38
<b>Figura 9.</b> Efecto de las bacterias diazótrofes en la germinación de semillas de quinua, en condiciones de laboratorio UNA - Puno (junio – agosto 2017). .....	39
<b>Figura 10.</b> Prueba de Tukey de la germinación (%) de semillas de quinua según concentración bacteriana, laboratorio de Ecología (junio – agosto 2017). ...	40
<b>Figura 11.</b> Efecto de las bacterias diazótrofes en el crecimiento de plántulas de quinua, en condiciones de laboratorio UNA - Puno (junio – agosto 2017). ..	41

## ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

%	: porcentaje.
AIA	: ácido indol acético.
<i>et al.</i>	: y colaboradores.
FCCBB	: Facultad de Ciencias Biológicas.
g	: gramos.
mL	: mililitro.
mm	: milímetros.
n	: tamaño de muestra.
NCCLS	: National Committee for Clinical Laboratory Standars.
No	: número.
R1, R2 y R3	: repeticiones 1, 2 y 3.
spp	: especies.
UNA – P	: Universidad Nacional del Altiplano – Puno.
$\Phi$	: diámetro.



## RESUMEN

La erosión de los suelos en la provincia de Huancané, por el uso exagerado de agroquímicos, origina la disminución de las poblaciones bacterianas benéficas como las diazótrofes, éstas pueden constituirse en potenciales bioinoculantes en los cultivos de quinua. La investigación se desarrolló durante los meses de junio - agosto del 2017 en suelos de la provincia de Huancané. Los objetivos fueron: a) aislar bacterias del género *Azotobacter* en tres campos de cultivo del distrito de Huancané y b) evaluar el efecto de la inoculación de *Azotobacter* sobre el porcentaje de la germinación de semillas y la longitud total de plántulas de quinua de la variedad Blanca de Juli en condiciones controladas. El método consistió en recolectar las muestras del suelo, en el cual se cuantificó la carga bacteriana de *Azotobacter* sp, mediante la técnica del número más probable en caldo mineral libre de nitrógeno, el efecto de la inoculación de las bacterias se evaluaron en semillas mediante el método de germinación *in vitro* calculando el porcentaje de germinación, el efecto en las plántulas se evaluó mediante el cultivo en recipientes de plástico el cual contenía tierra esterilizada de un campo de cultivo, hasta la aparición de las 4 hojas verdaderas. Los resultados fueron analizados mediante pruebas de análisis de varianza y de Tukey, con un nivel de confiabilidad del 95%, cada experimento en tres repeticiones. Los resultados obtenidos de los recuentos de bacterias *Azotobacter* sp en suelos fueron de 2733.33 NMP/g en Luriata, 3333.33 NMP/g en Yapupampa y 4660.00 NMP/g en Huancollusco. Los mayores porcentajes de germinación se obtuvieron con inoculaciones de  $1.5 \times 10^8$  cel./mL, con el 93.33% y el mejor crecimiento de plántulas de quinua se obtuvo con una inoculación bacteriana de  $3.0 \times 10^8$  cel./mL.

**Palabras Clave:** inoculación, plántulas, germinación, diazótrofes.

## ABSTRACT

Soil erosion in the province of Huancané, due to the exaggerated use of agrochemicals, causes the reduction of beneficial bacterial populations such as diazotrophs, which can constitute bioinoculating potentials in quinoa crops. The investigation was developed during the months of June - August of 2017 in soils of the province of Huancané. The objectives were: a) to isolate bacteria of the genus *Azotobacter* in three cultivation fields of the district of Huancané and b) to evaluate the effect of the inoculation of *Azotobacter* on the percentage of seed germination and the total length of quinoa seedlings of the variety Blanca of Juli in controlled conditions. The method consisted of collecting the soil samples, in which the bacterial load of *Azotobacter* sp was quantified, by means of the technique of the most probable number in nitrogen-free mineral broth, the effect of the inoculation of the bacteria was evaluated in seeds by the In vitro germination method calculating the percentage of germination, the effect on the seedlings was evaluated by growing in plastic containers which contained sterilized soil from a field, until the appearance of the 4 true leaves. The results were analyzed by analysis of variance and Tukey tests, with a confidence level of 95%, each experiment in three repetitions. The results obtained from the counts of bacteria *Azotobacter* sp in soils were 2733.33 NMP / g in Luriata, 3333.33 NMP / g in Yapupampa and 4660.00 NMP / g in Huancollusco. The highest percentages of germination were obtained with inoculations of  $1.5 \times 10^8$  cel./mL, with 93.33% and the best growth of quinoa seedlings was obtained with a bacterial inoculation of  $3.0 \times 10^8$  cel./mL.

**Key Words:** inoculation, seedlings, germination, diazotrophs.

## I. INTRODUCCIÓN

Las poblaciones de bacterias varían de un lugar a otro según sus características químicas de los suelos, el contenido de materia orgánica, sus valores de pH, la presencia de humedad y la disponibilidad de oxígeno, junto con la planta huésped, desempeñan un papel importante. La concentración de bacterias por g de suelo que se halla en la 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 incremento de las poblaciones de microorganismos. Estas poblaciones microbianas se constituyen en estimuladoras del crecimiento debido a los beneficios como ser antagonistas de fitopatógenos, fijan nitrógeno atmosférico, producen fitohormonas, elevan la capacidad de absorción de agua, entre otros.

Una alternativa orgánica para la mejora de los cultivos es el uso de inoculantes microbianos, entre ellas las bacterias diazotróficas, que cumplen la función de biosintetizar amonio a partir del nitrógeno atmosférico, nutriendo a las plantas. Los agricultores del Altiplano Peruano, poseen mucha esperanza de obtener buenas producciones debido al contenido de materia orgánica que poseen los suelos, asimismo algunos adquieren biofertilizantes como el humus de lombriz para abonar sus plantas y estas bondades se deberían a la presencia de bacterias diazotróficas, ya que el desarrollo vegetal es mejor.

En tal sentido, la presencia de bacterias diazotróficas del género *Azotobacter* sp en un campo de cultivo es de vital importancia para el normal desarrollo de las plantas, es por ello que se planteó la evaluación de la carga bacteriana diazotrófica de *Azotobacter* presente en tres campos de cultivo del distrito de Huancané (Puno), posteriormente se observó el efecto de éstas bacterias en el proceso de germinación de semillas de quinua, y los efectos en las biometrías de su longitud total de plántulas en un lapso de 25 días, con la finalidad posterior de promocionar la aplicación de éstas bacterias benéficas en los campos de cultivo de la región y el país, tal como se viene experimentando en otros países latinoamericanos.

En esta investigación se logró aislar bacterias diazótrofes pertenecientes al género *Azotobacter* sp en suelos de tres comunidades campesinas de la provincia de Huancané, región Puno, en el que una de ellas (Huancollusco) presentó la mayor carga bacteriana, donde los factores fisicoquímicos de los suelos, el uso y aplicación de agroquímicos, entre otros factores influyen en su permanencia; por otro lado se demostró que dichas bacterias *Azotobacter* poseen efecto estimulante en los procesos de germinación y crecimiento de plántulas de quinua a comparación de las semillas y plántulas no inoculadas, lo cual se constituiría en una biotecnología agrícola saludable con el medio ambiente y al alcance de los agricultores.

Por tal razón esta investigación tuvo los siguientes objetivos, general y específicos:

### **Objetivo general**

Determinar el efecto de la inoculación con bacterias rizosféricas en semillas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) en condiciones controladas.

### **Objetivos específicos**

- Aislar bacterias del género *Azotobacter* en tres campos de cultivo del distrito de Huancané.
- Evaluar el efecto de la inoculación de *Azotobacter* sobre el porcentaje de la germinación de semillas y la longitud total de plántulas de quinua de la variedad Blanca de Juli en condiciones controladas.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 ANTECEDENTES

Arguello *et al.* (2016), cuantificaron bacterias diazótroficas en suelos rizosféricos de tres cacaotales (*Theobroma cacao* L.) en Santander (Colombia), donde la mayor cuantificación de diazótroficas se reportó en la finca Florilandia, que se caracterizó por tener riego por goteo, y se aisló en NFb y JMV, con presencia de los presuntos géneros *Azospirillum* sp y *Burkholderia* sp; por otro lado, Bécquer *et al.* (2015), llevaron a cabo un experimento de inoculación simple y combinada en invernadero con bacterias rizosféricas *Sinorhizobium meliloti* y *Azospirillum zea*, en variedades de trigo, logrando la mayor influencia positiva en el contenido de clorofila de las plantas, trigo en la longitud del tallo, peso seco aéreo y peso seco radical.

León & Rojas (2015), aislaron e identificaron bacterias como *Azotobacter* sp, que produjeron 36.03 ppm de nitrógeno fijado como amonio, 60.75 ppm de ácido indol acético y 6.06 ppm de fósforo solubilizado, también se determinó actividad antagónica proteolítica y quitinolítica frente a *Fusarium verticillioides*; asimismo, Carrillo *et al.* (2015), evaluaron el efecto de la inoculación de rizobacterias en plantas de cilantro mostrando un efecto positivo en el crecimiento en parcelas con quema y sin quema de cascarilla de arroz.

Goitia (2014), realizó el aislamiento y recuento de bacterias diazotróficas en muestras de suelo cultivado, suelo de “tierra virgen” y en biofertilizante (humus de lombriz), conteniendo cargas bacterianas diazotróficas superiores a  $110 \times 10^2$  y  $240 \times 10^2$  NMP/g de sustrato, los cuales estimularon la germinación y un mejor crecimiento en sus raíces, la aparición de las primeras hojas cotiledonares y longitud total de la plántula en 7 días de tratamiento *in vitro*, en comparación con las semillas no inoculadas; por otra parte, Sánchez *et al.* (2014), determinaron que el maíz inoculado con bacterias *Azotobacter* sp. y *Burkholderia* sp. endófitas, resultaron con un efecto positivo desde su germinación, a nivel de plántula y en la fase de floración, obteniendo un peso seco radical de 7.03 g superior a los 2.60 g de peso seco radical del maíz sin inocular, sugiriendo una interacción sinérgica de *Azotobacter* sp. y *Burkholderia* sp. en la síntesis de sustancias promotoras de crecimiento vegetal en maíz.

Cárdenas *et al.* (2014), evaluaron el efecto de *Azospirillum* spp en el crecimiento y desarrollo de las plántulas de *Panicum maximum* (pasto) mediante semillas inoculadas y sembradas en macetas, lográndose la estimulación de la germinación de semillas del pasto comparado con el tratamiento no inoculado, la combinación de *Azospirillum* sp y *Enterobacter agglomerans* registró los mejores crecimientos vegetales del pasto; de igual modo, Gutiérrez (2013), inoculó bacterias diazótrofes en dos variedades de maíz, mostrando que existe especificidad en la interacción cepa – variedad, siendo mejor en la variedad de maíz PAU871, la cepa *Raoultella terrigena* aumentó la biomasa aérea de las plantas de maíz tanto en condiciones gnotobióticas y en macetas con muestras de suelo.

Bécquer *et al.* (2012), evaluaron la respuesta de las variedades de trigo a la inoculación simple y combinada de *Azospirillum zae* y *Sinorhizobium meliloti*, donde ambas inoculaciones resultaron de alta importancia en las alternativas de inoculación que se realizaron en el experimento; asimismo, Constantino *et al.* (2011), evaluaron la aplicación de los biofertilizantes (*Azotobacter chroococcum* y *Glomus intraradices*), sobre el crecimiento, biomasa y nutrición de papaya en fase de vivero, donde la doble inoculación (semilla y plántula) promovió el mayor incremento en el crecimiento y biomasa en el cultivo, en contraste con la inoculación simple (solo en plántulas).

Escobar *et al.* (2011), determinaron que *Azotobacter* spp produjeron 7.10 a 57.99 mg/L de ácido indolacético, 0.13 a 1.64 mg/L de nitrógeno fijado como amonio y hasta 1.61% de eficiencia en la solubilización de roca fosfórica, el desarrollo vegetativo de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate”, incrementó la altura, el volumen radicular, la materia seca total, parte aérea y radicular frente al testigo absoluto; por otro lado, Ibarra (2010), cuantificó bacterias fijadoras de nitrógeno en  $10^6$  NMP/g, identificando las especies *Sinorhizobium meliloti* y *S. medicae*, y de vida libre los géneros *Stenotrophomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Serratia*, *Arthrobacter*, *Lysinibacillus*, *Bacillus* y *Tetrathlobacter*, los cuales solubilizan fosfato y producen mayor cantidad de ácido indol acético (AIA), logrando el mejor crecimiento de trigo y alfalfa a nivel invernadero.

Calvo & Zúñiga (2010), aislaron cepas de *Bacillus* sp diazótrofes desde la rizófera de papa (*Solanum tuberosum*), en la región de Puno, con características de pH 6.25,

conductividad eléctrica 0.46 dS/cm, materia orgánica 2.64%, fósforo 20.195 ppm, clase textural franco arenoso, temperatura 10 °C y precipitación 650 mm; de similar forma, Córdova *et al.* (2009), en suelo con bananos, determinaron densidades de *Azospirillum* y *Azotobacter* de  $42 \times 10^4$  y  $11 \times 10^5$  UFC/g de suelo respectivamente, que fueron utilizados en la formulación de inoculantes en soportes orgánicos (pollinaza, pollinaza + suelo, pinzote, pinzote + suelo) y en suelo testigo, determinándose que *Azotobacter* creció mejor en pinzote + suelo + inóculo con un recuento de  $63 \times 10^4$  UFC/g.

Orozco & Martínez (2009), mencionan que las bacterias fijadoras de nitrógeno asimbióticas *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus macerans*, *Enterobacter agglomerans* y *Pseudomonas* sp inoculadas en *Pinus patula*, estimuló su crecimiento longitudinal y la nutrición nitrogenada; a su vez, Ogata & Zúniga (2008), en la rizósfera de la tara (*Caesalpinia spinosa*), las cepas bacterianas no mostraron tolerancia a altos niveles de NaCl (>1%) ni a temperaturas de 37 y 40 °C, crecieron en pH de 4 a 8.8, entre los microorganismos aislados se encuentra 3 cepas de *Azotobacter* spp, 8 de actinomicetos y 13 de *Pseudomonas* spp.

Maddonni *et al.* (2003), encontraron mejoras en el crecimiento de las plantas en asociación con bacterias rizosféricas del género *Azospirillum*, produciendo incrementos en biomasa y rendimiento, asimismo reducen los efectos nocivos de los fitopatógenos, fijan el nitrógeno atmosférico, absorben agua y nutrientes y producen fitorreguladores; mientras tanto, Tang (1995), estudió el efecto de la inoculación con *Azotobacter chroococcum* en la germinación y la altura de las plántulas de leguminosas *Centrosema pubescens* y *Leucaena leucocephala* y en dos gramíneas *Cenchrus ciliaris* y *Panicum maximum*, luego de 28 días después de la siembra, en gramíneas se observó una disminución de la germinación de semillas cuando fueron inoculadas con *Azotobacter* y no existió diferencia marcada en la altura.

## 2.2 MARCO TEÓRICO

### 2.2.1 La rizósfera de las plantas

La rizósfera es la zona del suelo donde se desarrollan de raíces y se activa la proliferación de microorganismos (Jiménez, 2007), debido al suministro de exudados radicales que contienen azúcares, aminoácidos, vitaminas y enzimas y señales que armonizan la

interacción microbio – planta (Bowen & Rovira, 1999), éstas pueden variar según las propiedades físicas, químicas y biológicas, y descender entre 10 a 100 veces al apartarse a pocos mm de la superficie radical (Collados, 2006), y si en caso el suelo posee más sales incrementadas el agua tenderá a salir de las células de las raíces, lo que causará la sequedad fisiológica de la planta y bajos recuentos bacterianos (Pernasetti, 2010), las poblaciones rizosféricas están conformadas por las bacterias, los hongos, las algas, los nematodos, los protozoos, los virus (Gryndler, 2000), estimándose que existen unas 30000 especies de bacterias y 1500000 especies de hongos, a partir del cual entre el 1% y 8% fueron identificadas (Barea, 2000), en los últimos años el análisis de moléculas de DNA ha conllevado a la identificación del 90% y 99% de los microorganismos del suelo (Barea *et al.*, 2005), permitiendo caracterizar a los microorganismos y establecer su filogenia (Jiménez, 2007).

El mantenimiento de los suelos húmedos trae como consecuencia el incremento del desarrollo de las plantas (Jadin & Jacquemart, 1978), asimismo, un campo cultivado con abundancia bacteriana se le atribuye al buen estado de abonamiento, tal como la adición de humus (Ormeño & Ovalle, 2011), asimismo, la presencia de contaminantes tales como la reducción de acetileno incrementa también la presencia de las bacterias (Park *et al.* 2005), el análisis del número y tipo de microorganismos identificados en estos medios brinda información valiosa acerca de la distribución de microorganismos potencialmente fijadores de nitrógeno en los diferentes sitios muestreados.

La mayor riqueza en vegetación presente en los bosques, incrementa los hallazgos 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), por consiguiente, el cambio de vegetación y la presencia de gramíneas (*Brachiaria* sp.), favorece el establecimiento de bacterias aerobias y microaerófilas, dichas plantas mantienen un buen crecimiento radical a expensas del crecimiento de la parte aérea, logrando adquirir nitrógeno mediante fijación asociativa (Dalton & Kramer 2006), usando ambas formas de nitrógeno (nitrito y amonio), tomando el fósforo y calcio mediante sistemas radicales extensos y asociaciones con micorrizas arbusculares (Rao *et al.* 1998).



Algunas raíces de determinadas plantas acogen en su rizósfera bacterias específicas, tales como *Burkholderia* sp, quien es precominante en cultivos como en el maíz (Perín *et al.*, 2006), otros géneros bacterianos como *Gluconacetobacter* sp. y *Herbaspirillum* sp. se presentan en menor cantidad ya que en su mayoría fueron endófitos, sin causarles daños aparentes (Punschke & Mayans, 2011), en especial en suelos rizosféricos con abundantes lixiviados radicales, ricos en nutrientes esenciales como P y K, contribuyendo al reciclaje de nutrientes por parte de las plantas (Taiz & Zeiger, 2006), por otro lado Melloni *et al.*, (2004), indica que la población de estos géneros son afectadas por las condiciones del suelo los tipos de vegetación y la época climática en la cual se realicen los muestreos de los suelos, otro factor importante lo reportan Hallman *et al.*, (1997), quienes proponen que las enzimas pectinolíticas y celulolíticas producidas por las bacterias contribuyen a los procesos de infección en las plantas, dicha actividad es 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).

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), el crecimiento de la raíz principal y de las raíces laterales produce un aumento de la superficie de absorción de las plantas, lo que favorece el intercambio de nutrientes (Spaepen *et al.*, 2008) y Xie *et al.*, (1996), otra bondad que poseen es la producción de ácido indol acético (AIA) por las bacterias, que 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.

Los microorganismos de la rizósfera cumplen funciones de mucha importancia en los procesos de edafogénesis, como los ciclos biogeoquímicos como el carbono, el nitrógeno, oxígeno, el azufre, el fósforo, el hierro y otros elementos, en la fertilidad de suelos y protección frente a patógenos, así como la degradación de compuestos xenobióticos y producción de fitohormonas (Nogales, 2005), en la microflora rizosférica se reportan a los géneros *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacteria*, *Hafnia*, *Klebsiela*, *Serratia*, *Xanthomonas*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Burkholderia* y *Bacillus* (Barea *et al.*, 2004),

asimismo se encuentran las fosfato solubilizadoras, como *Pseudomonas* spp., *P. cepacia*, *P. gladioli*, *Xanthomonas* spp., *X. maltophilia*, *Enterobacter agglomerans*, *Chromobacterium* sp., *X. maltophilia*, y *Chromobacterium* sp. (Useche *et al.*, 2004; Jiménez, 2007).

### 2.2.2 Microorganismos del suelo

La presencia de microorganismos en un suelo es afectada por factores como su estructura, los nutrientes, la degradación de residuos orgánicos, el contenido de humus, la temperatura del suelo, la humedad, la aireación, el estado redox, el contenido y la composición de gases del espacio poroso, el pH, entre otros (Coyne, 2000), explicándose así el desarrollo concomitante de procesos como la nitrificación (que requiere de condiciones aeróbicas) y la desnitrificación (que requiere de condiciones anaeróbicas) (Prescott *et al.*, 2009).

Los microorganismos edáficos representan la mayor proporción de uso a nivel industrial, gracias a su capacidad de transformación de sustancias y ser productora de compuestos útiles a las plantas (Madigan *et al.*, 2003). Un suelo contiene un alto número de grupos filogenéticos mayor a  $10^9$  células bacterianas por g de suelo, que a la más pequeña alteración climática dejan de producir metabolitos y enzimas importantes en el mundo científico (Madigan *et al.*, 2003), normalmente un suelo es habitualmente favorable para la proliferación microbiana, desarrollándose microcolonias en sus partículas, lográndose alcanzar cifras de  $10^8$  a  $10^{10}$  bacterias por g de suelo (Atlas & Bartha, 2002).

### 2.2.3 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

La gran mayoría de bacterias organotróficas aerobias pertenecen al género Gram positivos, alcanzando al 70% de la totalidad entre ellos los *Arthobacter* sp, *Bacillus* sp y *Micrococcus* sp, las bacterias Gram negativa lo componen los géneros *Pseudomonas* sp y *Flavobacterium* sp, otros géneros frecuentes se incluyen *Acinetobacter* sp, *Agrobacterium* sp, *Alcaligenes* sp y *Nocardia* sp (Larrea, 2001), se afirma que en ambientes anaerobios, saturados o tóxicos, es donde podemos encontrar especies bacterianas cumpliendo procesos metabólicas incomparables debido a su gran potencial enzimático (Hansel *et al.*, 2008).

### **Microorganismos biosintetizadores de amonio a partir de nitrógeno no simbióticos**

Los microorganismos biosintetizadores de amonio, se constituyen en la fuente primaria de nitrógeno para las plantas, entre ellos se mencionan a las bacterias aerobias biosintetizadoras de amonio como *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Azomonas* y *Oscillatoria* (Prescott *et al.*, 2009), especialmente cuando se alcanza con una humedad adecuada en el suelo y una fuente de carbono proporcionada por el material vegetal en descomposición (pajas, socas o subproductos de cosecha), razón por la cual existe siempre la presencia de bacterias celulolíticas, dicho desarrollo bacteriano se estimula gracias a las exudaciones que emite la planta cuando se encuentra bien nutrida (Coyne, 2000).

Las bacterias del género *Azotobacter* son móviles y forman quistes en condiciones adversas, llegando a fijar 40 kg N/ha equivalente a 200 kg de sulfato de amonio, habitan suelos ácidos (5.5 de pH) y alcalinos, prefiriendo los neutros, asimismo, producen sustancias que estimulan el crecimiento vegetal (Coyne, 2000), las bacterias promotoras de crecimiento en plantas se clasifican en dos grupos, el primero son promotoras de crecimiento en plantas, suprimiendo a otros microorganismos, que gracias a su metabolismo logra solubilizar fosfatos, produce hormonas o retiene nitrógeno, incrementando la absorción de agua y minerales, incrementando el crecimiento radicular, y bacterias promotoras de crecimiento vegetal con capacidad como controladores biológicos (Ferrera & Alarcón, 2007).

#### **2.2.4 Bacterias diazótrofes asimbióticas: *Azotobacter* sp**

Las bacterias del género *Azotobacter* forman un grupo especial de fijadores de nitrógeno, que otorgan la regulación del crecimiento de las plantas, produciendo hormonas vegetales y favorecen la solubilidad de la materia orgánica agregada al suelo como abono (Ramos, 1992), la inoculación de *Azotobacter* sp incrementa los rendimientos de diversos cultivos, principalmente en cereales (González & Lluch, 1992), Rodríguez & Blanco (2001) experimentaron en viveros de café (*Coffea arabica*), donde la aplicación de *Azotobacter chroococcum* originó una uniformidad en las posturas de este cultivo, mayor vigor de las mismas, presentaron un color uniforme en su sistema radicular, presentaron característica de posturas sanas, vigorosas y con alto valor ecológico.

González *et al.* (1986), analizaron 8 cepas de *Azotobacter* sobre los parámetros de crecimiento y desarrollo *in vitro* de plantas de piña (*Ananas comosus*), en ellas se observaron la estimulación del crecimiento de las vitroplantas superiores al testigo sin inoculación, se ha demostrado que se puede llegar a fijar de 20 a 30 kg de nitrógeno/ha/año y mayor en condiciones óptimas de crecimiento (IAB, 2001); sin embargo, los resultados de la inoculación de *Azotobacter chroococcum*, se deben fundamentalmente a la capacidad de solubilizar fosfatos y sintetizar sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal como vitaminas y hormonas vegetales (Itzigsohn *et al.*, 2000), según Rodelas (2001), *A. chroococcum* sintetiza tiamina de 50 – 100 mg/g de sustancia celular seca, ácido nicotínico de 200 – 600 mg/g de sustancia celular seca, ácido pantoténico, biotina, ácido indolacético (AIA), ácido giberélico, citoquininas entre otros promotores de crecimiento (Rodríguez & Blanco, 2001).

El género *Azotobacter* están incluidos en la familia Azotobacteraceae que concentra bacterias Gram negativas, quimioheterotrofas, aerobias estrictas, capaces de fijar nitrógeno molecular (Espín, 2000), estuvo descrito por primera vez por Beijerinck (1901) y actualmente incluye a seis especies: *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. nigricans*, *A. armeniacus* y *A. paspali* (Ramos, 1992).

Clasificación taxonómica del género *Azotobacter*:

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

Las bacterias del género *Azotobacter* tienen un diámetro celular de 1.5 a 2.0  $\mu\text{m}$ , son pleomórficas, variando su morfología desde bacilos hasta células en forma de cocos, se les observa como células individuales, como pares o formando agregados irregulares, y algunas veces formando cadenas de tamaño variable, se reproducen por fisión binaria y se mueven por flagelos peritricos (Espín, 2000), no producen endosporas pero sí quistes de resistencia a drogas, la formación de quistes ha sido muy estudiada, es un fenómeno que se produce ante condiciones ambientales adversas y en el laboratorio puede inducirse

pasando el cultivo de un medio con glucosa a uno con b-hidroxibutirato como única fuente de carbono (Lin & Sadoff, 1968).

Son bacterias catalasa positivas, aerobias, quimioheterótrofas, utilizan azúcares, alcoholes y sales inorgánicas para crecer, pudiendo crecer en concentraciones bajas de oxígeno, el rango de pH óptimo para fijar nitrógeno es de 7.0 – 7.5, son mesófilas, su temperatura óptima de 30 °C (Mayea *et al.*, 1998), fijan al menos 10 mg de N<sub>2</sub>/g de carbohidrato (glucosa) consumido, requieren molibdeno, utilizan nitrato y sales de amonio y ciertos aminoácidos como fuentes de nitrógeno (Espin, 2000), algunas especies producen alginatos, poli- $\alpha$ -hidroxibutirato (Horan *et al.*, 1983), pigmentos y hormonas vegetales como auxinas, citoquininas y giberelinas (González *et al.*, 1986).

Todos los organismos requieren de una fuente de alimento que provea los elementos químicos básicos, de los cuales el protoplasma de las células es construido y actúa como una fuente de energía, entre ellos carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo, magnesio, hierro y otros (Scragg, 2000), como fuentes de carbono, se tiene a los carbohidratos (monosacáridos, disacáridos y algunos polisacáridos), ácidos alifáticos y aromáticos, alcoholes, compuestos volátiles, entre otros, en el suelo, estas bacterias utilizan productos de descomposición de plantas y animales, comprobándose que en suelos ricos en humus, cuando no hay residuos orgánicos frescos, la población de *Azotobacter* es pobre (Martínez, 1996).

La propagación de *Azotobacter* depende de la concentración de varias sales inorgánicas:

- La ausencia o falta de fósforo y potasio en el medio, reduce su velocidad de crecimiento y el fósforo estimula el metabolismo del carbono y la fijación de nitrógeno (Sabra *et al.*, 1999).
- El calcio y el magnesio juegan un rol principal en el crecimiento de *Azotobacter*, la carencia de calcio produce el alargamiento de la fase Lag, la concentración de calcio no deberá de ser excesiva (Dhanasekar *et al.*, 2003).
- La presencia de cobre es tóxica hasta en mínimas cantidades (Becking, 1961), el hierro lo requiere en muy pequeñas cantidades y el manganeso ejerce una acción favorable, pero no es esencial (Gaitán & García, 1998).

En el aislamiento de *Azotobacter* la temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 25 – 30 °C y la temperatura mínima se encuentra apenas sobre los 0 °C, no toleran altas temperaturas (Mishustin & Shilnikova, 1969), la temperatura óptima es 30 °C (Dhanasekar *et al.*, 2003), el pH óptimo para su crecimiento se encuentra entre 7.2 y 8.2 (Mishustin & Shilnikova, 1969), obteniéndose el máximo crecimiento a pH 7.5 (Dhanasekar *et al.*, 2003), las bacterias del género *Azotobacter* son aerobias, por tanto, necesitan de oxígeno para poder crecer (Madigan *et al.*, 2003).

### 2.2.5 Técnicas de inoculación de bacterias en semillas

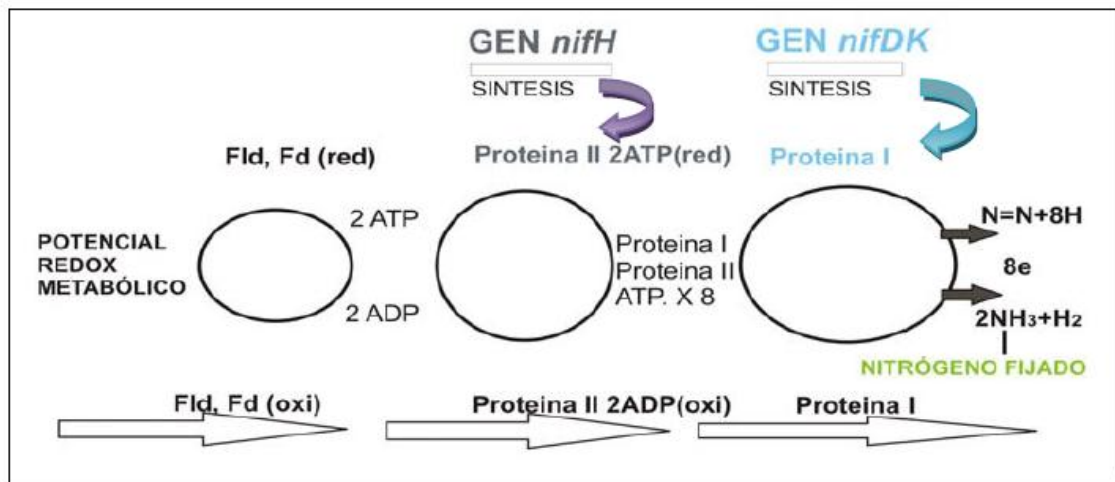
Existen varias técnicas de inoculación de bacterias en semillas, entre ellas se reportan la técnica denominada al vacío como lo describe Carrillo *et al.* (1998), que consiste en el uso de una bomba al vacío, donde grupos individuales de 50 semillas de cada variedad, al cabo de 24 horas después de la desinfección, se colocan en un matraz de 500 mL, posteriormente se añaden 100 mL de medios enriquecidos con bacterias con una concentración de  $10^7$  UFC mL, luego los matraces con semilla y medio bacteriano se someten a la acción del vacío (600 mm Hg) por un lapso de 5 minutos, donde cada uno de los grupos de semillas (50) con su respectivo tratamiento (variedad – bacteria), se depositan en cajas Petri previamente esterilizadas que presentan una esponja de sostén.

Díaz *et al.* (2001), reporta la siguiente técnica de inoculación en cajas Petri estériles, donde se coloca una capa de algodón, recubierta con papel filtro estéril y se humedece con 5 mL de agua destilada estéril, en cada caja, se colocan 10 semillas de lechuga, previamente desinfectadas con alcohol a 70%, se inocula con 0.1 mL de la suspensión bacteriana por semilla, las cajas se sellan con Parafilm y se dejan a temperatura ambiente, simultáneamente, se instala un testigo (sin inocular), al cual sólo se le agrega agua destilada estéril, cada tratamiento tiene tres repeticiones.

### 2.2.6 Biología molecular de *Azotobacter* sp

La fijación biológica de nitrógeno esta catalizada por el complejo enzimático nitrogenasa, el cual tiene dos coproteínas, la proteína I contiene hierro y molibdeno y la proteína II contiene solo hierro, aunque en *Azotobacter vinelandii* se encontró vanadio (Drummond *et al.*, 1995), la proteína I es de 220.000 Da, formado por dos tipos de subunidades  $\alpha_2 \beta_2$ , producto de los genes nifDK (Telisa *et al.*, 1999), por otro lado la proteína II es de 68.000 Da, el gen responsable es la nifH y tiene la función de transportar los electrones del

donador fisiológico de electrones (ferrodoxina o flavodoxina), en la proteína I se llevar a cabo la reducción del  $N_2$  (Figura 1) (Baca *et al.*, 2000), se han descrito alrededor de 20 genes involucrados en la fijación biológica de nitrógeno, se conoce que los genes estructurales de la nitrogenasa están sumamente conservados (Desnoues *et al.*, 2003), estas dos proteínas están codificadas por el operon *nifLA* (Martínez *et al.*, 2005).



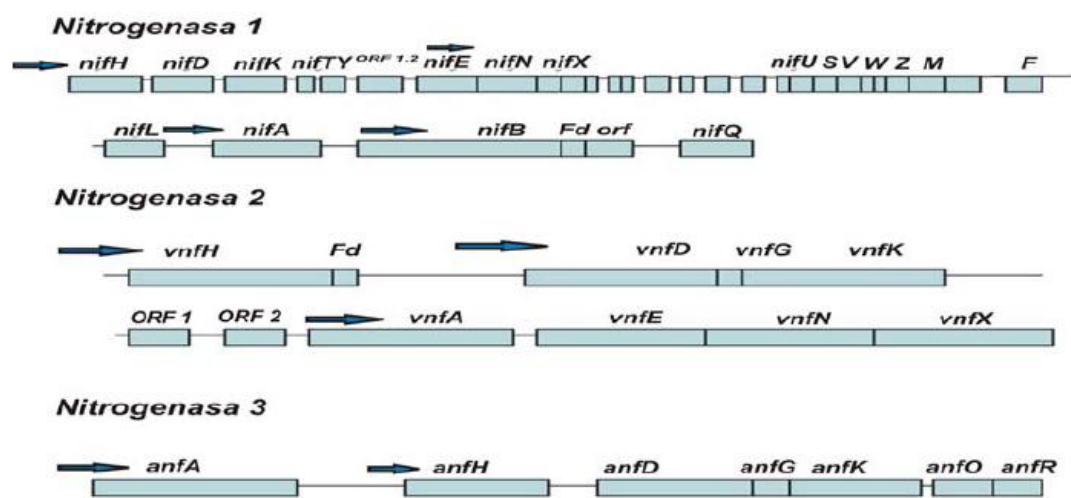
**Figura 1.** Genes implicados en el flujo de electrones hacia el sitio activo de la nitrogenasa para la reducción de  $N_2$  (Baca *et al.*, 2000).

La enzima nitrogenasa es muy sensible al oxígeno y muchos diazotrófos fijan nitrógeno anaeróbicamente o microaeróbicamente y en algunas cianobacterias el proceso se realiza en estructuras de resistencia como los heterocistes (Singleton, 2004), es inactivada rápida e irreversiblemente por el  $O_2$ , la proteína (Fe) es mucho más sensible que la proteína (Mo-Fe) (Robson & Postgate, 1980), bioquímicamente son catalasa y oxidasa positivo, reducen el nitrato, producen el sulfuro de hidrógeno e hidrolizan almidón, producen promotores de crecimiento (giberelinas, auxinas y citoquininas) (Santana *et al.*, 2002), son solubilizadoras de fosfato y cumplen procesos de biodegradación de plaguicidas (Castillo *et al.*, 2005).

Las bacterias *Azotobacter* metabolizan compuestos fenólicos como, ácidos p-hidroxibenzoico, vanilínico, p-cumarico, ferulico y 4-hidroxifenilacético, presentes en aguas residuales los cuales originan un efecto antibacterial, fitotóxico y generan coloración a las aguas residuales, debido a esto, son compuestos con alta carga contaminante para el ambiente (Juárez *et al.*, 2004), además tiene la capacidad de degradar plaguicidas cloroaromáticos contaminantes como el endosulfán por medio de

enzimas deshalogenasas, dioxigenasas e hidroxilasas (Castillo *et al.*, 2005) y Sudhir *et al.* (1983), reportaron que *A. chroococcum* inhibe el crecimiento de *Rhizoctonia solani* en cultivos de papa a temperaturas de 15 °C.

*A. vinelandii* posee tres tipos de nitrogenasas, la nitrogenasa 1 codificada por el gen *nifHDK*, la nitrogenasa 2 es dependiente de vanadio y los genes que codifican para las dos proteínas están designados con el nombre de *vnf* y se encuentran en los operones *vnfHorfFd* y *vnfDGK* y la nitrogenasa 3 la cual es fabricada en condiciones deficientes de molibdeno y vanadio esta codificada por el gen *anfHDK* (Figura 2) (Betancourt, 2002; Joerger *et al.*, 1990).



**Figura 2.** Esquema de la organización de los genes involucrados en la síntesis de las tres nitrogenasas utilizadas por *A. vinelandii* en la fijación de nitrógeno (Betancourt, 2002).

### 2.2.7 La quinua (*Chenopodium quinua* Wild)

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

#### a. Taxonomía

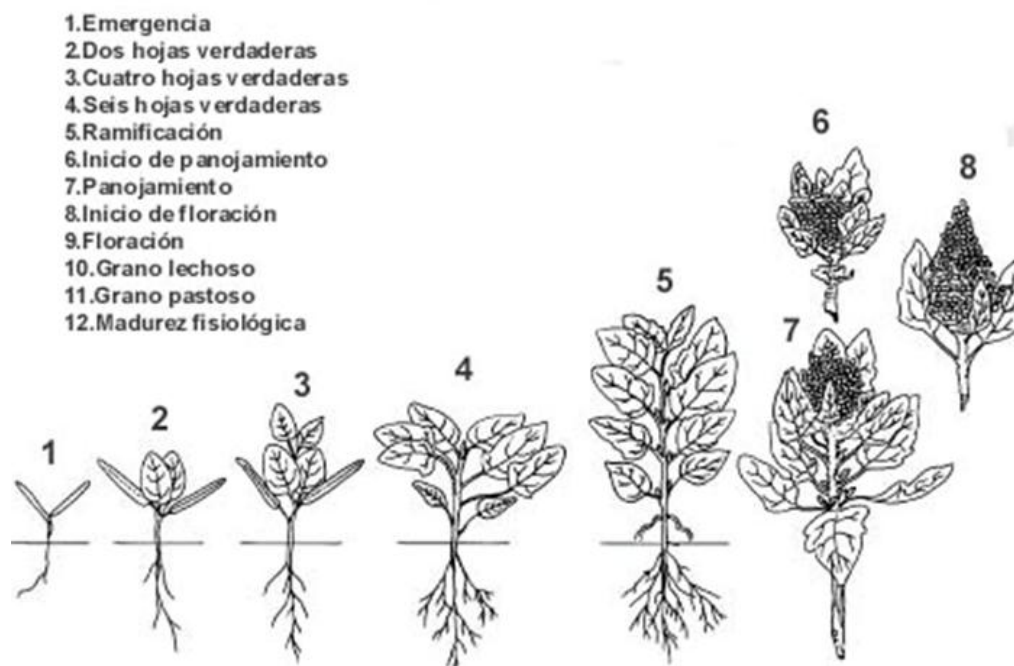
- Dominio : Eucarya.
- Reyno : Vegetal
- División : Fanerógamas
- Clase : Dicotiledóneas
- Sub – clase : Angiospermales
- Orden : centrospermales
- Familia : Chenopodiceas



Género : *Chenopodium*  
Especie : *Chenopodium quinua* Willd (León, 2003).

**b. Descripción botánica**

- **Raíz.** Inicia con raíz pivotante terminando en raíz ramificado con una longitud de 25 a 30 cm.
- **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.
- **Hojas.** Son simples, enteras, esparcidas, glabras, pecioladas, sin estípulas, pinnatinervadas, presentan oxalatos de calcio o vesículas granuladas en el envés a veces en el haz; las cuales evitan la transpiración excesiva en caso de que se presentaran sequías.
- **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.
- **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 (León, 2003).
- **Fase de la floración.** En los glomérulos la floración inicia en la parte apical y sigue hasta la base (León, 2003).
- **Fruto.** Es aquenio, el que se encuentra cubierto por el perigonio (León, 2003).
- **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 (León, 2003)
- **Fases fenológicas.** La duración depende mucho de los factores medio ambientales que se presenta en cada campaña agrícola (León, 2003).
  - **Emergencia.** Es cuando la plántula emerge del suelo y extiende sus dos hojas cotiledonales, ocurre de los 7 a 10 días de la siembra.
  - **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.



- **Figura 3.** Fases fenológicas de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.).

- **Cuatro hojas verdaderas.** Se observan dos pares de hojas extendidas y aún están presentes las hojas cotiledonales de color verde, ocurre aproximadamente a los 25 a 30 días después de la siembra.
- **Seis hojas verdaderas.** Se observa tres pares de hojas verdaderas extendidas y las hojas cotiledonales se tornan de color amarillento, ocurre a los 35 o 45 días de la siembra.
- **Ramificación.** Se observa 8 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 hojas sin dejar al descubierto la panoja, ocurre de los 45 a 50 días de la siembra, en esta fase la parte más sensible a las heladas no es el ápice sino por debajo de este, y en caso de bajas temperaturas que afecten a las plantas, se produce el "colgado" del ápice. En esta fase se efectúa el aporque para las quinuas de valle
- **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; asimismo, se puede observar en los glomérulos de la base los botones florales individualizados; ello ocurre de los 65 a los 70 días después de la siembra.
- **Floración.** La floración es cuando el 50% de las flores de la inflorescencia se encuentran abiertas, lo que ocurre de los 90 a 100 días después de la siembra.
- **Grano lechoso.** El estado de grano lechoso es cuando los frutos al ser presionados explotan y dejan salir un líquido lechoso, lo que ocurre de los 100 a 130 días de la siembra, en esta fase el déficit de agua es perjudicial.
- **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.
- **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 (León, 2003).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 TIPO DE ESTUDIO

Fue de tipo experimental y analítico de corte transversal.

#### 3.2 ZONA DE ESTUDIO

Las muestras de suelo fueron procedentes de tres campos de cultivo ubicados entre las coordenadas UTM -15.208404 y -69.775588 (zona de muestreo 1), -15.205552, -69.778989 (zona de muestreo 2) y -15.209145, -69.752824 (zona de muestreo 3) de las comunidades de Luriata, Yapupampa y Huancollusco en la provincia de Huancané, tal como se muestra en el Anexo 4 (Google Map, 2016). Los análisis de laboratorio se realizaron en el Laboratorio de Ecología y los tratamientos experimentales en el laboratorio de Ecología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano - Puno.

#### 3.3 METODOLOGÍA

##### 3.3.1 Aislamiento de bacterias del género *Azotobacter* sp en tres campos de cultivos del distrito de Huancané

###### a. Recolección de muestras de suelo

Las muestras de suelo colectadas fueron colocadas en bolsas de cierre hermético nuevas, debidamente rotuladas, dichas bolsas fueron colocadas en una caja de tecnopor con bolsas de hielo que mantuvo la temperatura a 4 °C aproximadamente, hasta que las muestras fueron procesadas en el laboratorio (Zúñiga, 2010).

###### b. Preparación de diluciones para recuento de bacterias

Para el aislamiento y posterior recuento de bacterias diazótroficas, a partir de suelos de la localidad de Huancané, se realizó la técnica recomendada por la Standard Methods (1998) citado por Zúñiga (2010), detallados a continuación:

- 1) Se rotuló cada tubo con el número de dilución correspondiente y código de la muestra.
- 2) Se pesó 1 g de cada una de las muestras de tierra, dicha muestra se transfirió a un tubo con 9 ml de agua destilada esterilizada, así se obtuvo la dilución  $10^{-1}$ .
- 3) Se agitaron cuidadosamente las muestras por un periodo de un minuto aproximadamente.

- 4) Se transfirió 1 ml de la dilución  $10^{-1}$  y se transfirió a otro tubo que contenía 9 ml del diluyente, obteniéndose así una dilución de  $10^{-2}$  y se homogenizó.
- 5) El paso anterior será repetido hasta obtener la dilución  $10^{-3}$ .

### c. Determinación de la carga bacteriana diazotrófica (Zúniga, 2010)

La cuantificación de la carga bacteriana diazótropa, se realizó en razón de que se considera de importancia el conocer la carga bacteriana que poseen los suelos de esta localidad para así experimentar inoculaciones a las semillas posteriormente. A continuación, se considera el método, el fundamento y los procedimientos realizados:

#### 1) **Método.** Número más probable

2) **Fundamento.** Es una estrategia eficiente de estimación de densidades poblacionales especialmente cuando una evaluación cuantitativa de células individuales no es factible y el estimado de densidad poblacional se obtiene del patrón de ocurrencia de ese atributo en diluciones seriadas y el uso de una tabla probabilística.

#### 3) **Procedimientos**

- Se colocó 1 ml de las diluciones  $10^{-2}$  hasta  $10^{-6}$  en tubos que contienen caldo mineral sin nitrógeno ( $K_2HPO_4$  0.655 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g; NaCl 0.02 g;  $CaCl_2$  0.01 g;  $Cl_3Fe$  3.4 g;  $NaMoO_4 \cdot H_2O$  0.0128 g;  $KH_2PO_4$  0.15 g, manitol, 10 g, agar 15 g, sacarosa 10 g, azul de bromotimol 5 mL, pH 7) (Zúniga, 2012), considerando 3 tubos por dilución.
- Los tubos fueron incubados a 28 °C por 10 días.
- La obtención de los resultados del conteo bacteriano fue a partir de los tubos positivos de cada una de las diluciones observando su viraje de color, turbidez y la formación de un velo en la superficie del caldo, se expresa este conteo en NMP/g (número más probable por g de sustrato).

### d. Análisis estadístico de datos

El diseño experimental que se realizó fue completo al azar, los tratamientos evaluados fueron las tres zonas de estudio, cada tratamiento presentó tres repeticiones. La variable respuesta fue el recuento bacteriano de diazótropas, que fue comparada entre los tratamientos mediante análisis de varianza y pruebas de Tukey, con un nivel de confianza del 95%, la base de datos se elaboró en el programa Microsoft Office Excel y el análisis

se realizó en el software estadístico Infostat (versión estudiantil). El modelo matemático a utilizar fue el siguiente:

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

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

**Donde:**  $Y_{ij}$  = observación en la  $j$  – ésima unidad experimental, sujeto al  $i$  – ésimo tratamiento.  $t$  = efecto del  $i$  – ésimo tratamiento.  $\mu$  = efecto de la media general.  $\varepsilon_{ij}$  = efecto verdadero de la  $j$  – ésima unidad experimental (réplica), sujeta al  $i$  – ésimo tratamiento (error experimental).

### 3.3.2 Evaluación del efecto de la inoculación de bacterias *Azotobacter* sp en quinua en condiciones controladas

Para realizar la parte experimental de la investigación, la quinua certificada de la variedad Blanca de Juli, fue adquirida en el Anexo de Salcedo del INIA – Puno, el diámetro del grano de las semillas seleccionadas fue de 1.6 mm y el color será blanco opaco (Apaza *et al.*, 2013).

#### a. Evaluación del efecto en la germinación

##### 1) **Método.** Germinación *in vitro*

2) **Fundamento.** La germinación se basa en la transformación de un embrión en estado quiescente en una plántula, posee los eventos de imbibición, activación, división y elongación celular, ruptura de la cubierta seminal por el embrión y el establecimiento de la plántula como ente autónomo, donde la velocidad e índice de germinación, son indicadoras de la estimulación del proceso fisiológico y la vigorosidad de la semilla.

3) **Procedimientos:** En cada una de las placas Petri, se colocaron secciones circulares de papel filtro Whatman exento de cenizas, las cuales fueron humedecidas con agua destilada estéril. A continuación, se colocaron 100 semillas de quinua certificada inoculadas con bacterias y en otra placa semillas no inoculadas (tratamiento control). Entonces hubo 4 tratamientos a contrastar del efecto de las bacterias diazótrofes, las cuales fueron tratamiento control (agua destilada), tratamiento 1 (bacterias diazótrofes en dilución  $1.5 \times 10^8$  células/mL), tratamiento 2 (bacterias diazótrofes en dilución  $3.0 \times 10^8$  células/mL) y tratamiento 3 (bacterias diazótrofes en dilución de  $6.0 \times 10^8$  células/mL).

**Porcentaje de germinación (PG) de las semillas.** Se calculó mediante la siguiente ecuación de acuerdo a lo recomendado por González & Orozco (1996):

$$PG = ((\text{semillas germinadas}) / (\text{número total de semillas en prueba})) \times 100$$

**b. Evaluación del efecto de las bacterias en la longitud total de plántulas de la quinua**

- 1) Al igual que en el experimento anterior, 20 semillas de quinua fueron inoculadas en cada uno de los tratamientos (diluciones bacterianas) agregando su tratamiento control (sin inoculación bacteriana), adicionando ahora fueron colocadas en placas Petri de plástico conteniendo tierra esterilizada en autoclave procedente de un campo de cultivo de la localidad de Jayllihuaya (Puno).
- 2) Dichas bandejas fueron colocadas en andamios metálicos acondicionados en condiciones controladas.
- 3) La observación del efecto en el crecimiento y la biometría, se realizó por un lapso de 25 días, hasta lograr la observación de la formación de las 2 hojas verdaderas en las plántulas.
- 4) Los tratamientos de las inoculaciones de las bacterias a las semillas de quinua, fueron en tres diluciones bacterianas, como son  $1.5 \times 10^8$ ,  $3.0 \times 10^8$  y  $6.0 \times 10^8$  células/mL, tal igual que en los procesos de germinación.
- 5) Una vez finalizada el tiempo de experimentación, se realizó la evaluación biométrica de longitud total de plántulas con la ayuda de un vernier. De 20 semillas cultivadas en cada uno de los tratamientos, el tamaño de muestra de las plántulas obtenidas luego del tiempo de experimentación, estuvo conformada por 8 plántulas, las cuales fueron colectadas al azar, las cuales se constituyeron en repeticiones y se realizó por única vez al finalizar el tiempo de experimentación.

**c. Análisis estadístico de datos**

El diseño experimental que se realizó fue completo al azar, los tratamientos evaluados fueron las tres concentraciones bacterianas, cada tratamiento presentó tres repeticiones. La variable respuesta fueron el porcentaje de germinación, el índice de germinación, las longitudes de raíz y tallo, que fue comparada entre los tratamientos mediante análisis de varianza y pruebas de Tukey, con un nivel de confianza del 95%, la base de datos se

elaboró en el programa Microsoft Office Excel y el análisis se realizó en el software estadístico Infostat (versión estudiantil). El modelo matemático a utilizar fue el siguiente:

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

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

**Donde:**  $Y_{ij}$  = observación en la  $j$  – ésima unidad experimental, sujeto al  $i$  – ésimo tratamiento.  $\tau_i$  = efecto del  $i$  – ésimo tratamiento.  $\mu$  = efecto de la media general.  $\varepsilon_{ij}$  = efecto verdadero de la  $j$  – ésima unidad experimental (réplica), sujeta al  $i$  – ésimo tratamiento (error experimental).



#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### 4.1 Recuentos de bacterias *Azotobacter* sp en tres campos de cultivo de la localidad de Huancané

La carga bacteriana diazotrófica cuantificada en los sustratos evaluados, oscilaron entre los promedios de 2600 NMP/g en suelos de la comunidad Luriata y 4800 NMP/g en suelos de Huancollusco, con promedios de 2733.33, 3333.33 y 4660.00 NMP en las comunidades de Luriata (Figura 5), Yapupampa (Figura 6) y Huancollusco (Figura 7), respectivamente. Los coeficientes de variación fueron mayores en suelo de la comunidad Yapupampa (15.39%) y menores en suelos de la comunidad Huancollusco (32.90%), mientras que en el suelo de la comunidad Luriata fue de 5.59% (Tabla 1).

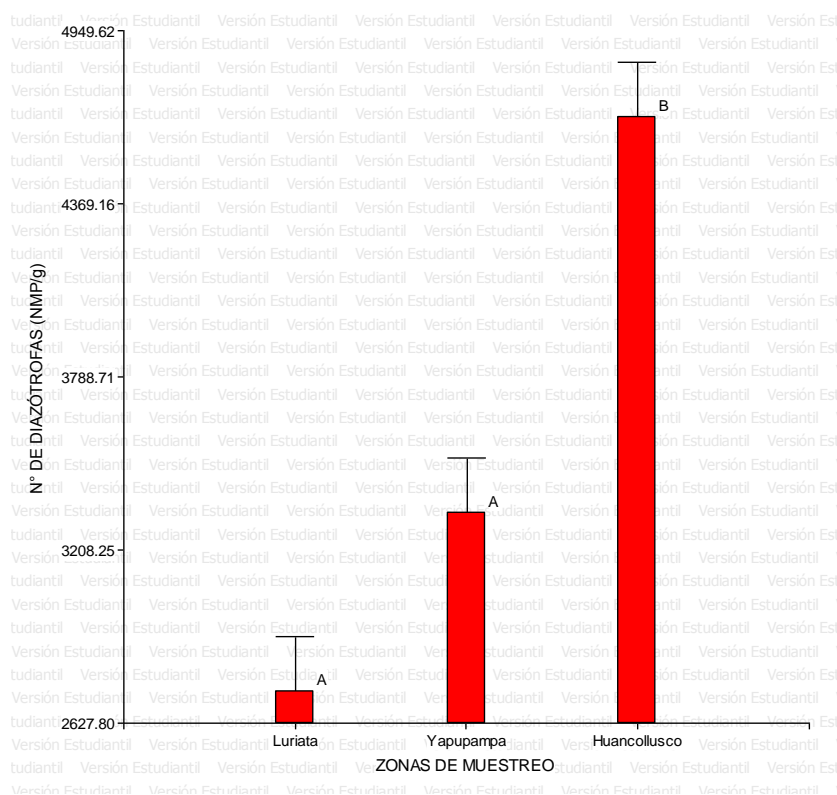
**Tabla 1.** Recuentos de bacterias diazótroficas (NMP/g) en muestras de suelo en tres comunidades de distrito de Huancané (junio – agosto 2017).

Comunidades	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Promedio	D.E.	C. V.
Luriata	2700	2900	2600	2733.33	152.75	5.59
Yapupampa	3200	3900	2900	3333.33	513.16	15.39
Huancollusco	4800	4650	4530	4660.00	135.28	2.90

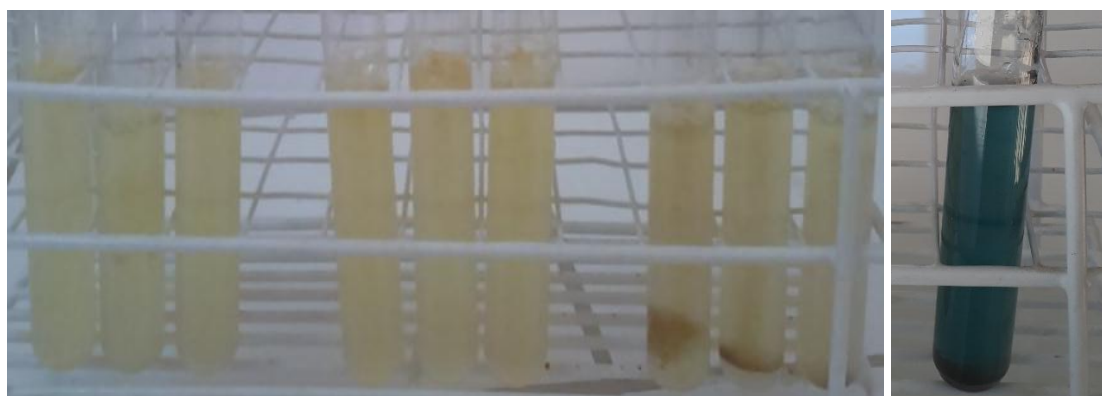
**Donde:** Rep. = repetición; DE = desviación estándar; y CV = coeficiente de variación.

Según el análisis de varianza las cargas bacterianas en los tres suelos evaluados presentan diferencia estadística significativa ( $P=0.0008$ ), siendo superior en suelos de la comunidad de Huancollusco (4660.00 NMP/g) y menor en los suelos de las comunidades de Luriata y Yapupampa (2733.33 y 3333.33 NMP/g respectivamente) (Figura 4). Los resultados muestran que los tres suelos evaluados presentaron cargas microbianas de bacterias mayores a 2100 NMP/g suelo. El mayor recuento de bacterias diazótroficas se determinó en la comunidad de Huancollusco con respecto a las dos restantes comunidades, ello se debería a que en la parcela donde se colectó las muestras de suelo, poseerían restos de cenizas de los fogones procedentes de las cocinas de los moradores de la zona (Carrillo *et al.*, 2015), administrando los minerales necesarios para el crecimiento ideal de las bacterias en los suelos, en tal sentido las características fisicoquímicas del suelo, la humedad y las relaciones climáticas al momento de la toma de las muestras, condicionan

la cantidad de exudados de las raíces y por tanto son factores que condicionaron la presencia de diazótrofes en las muestras (Arguello *et al.*, 2016).



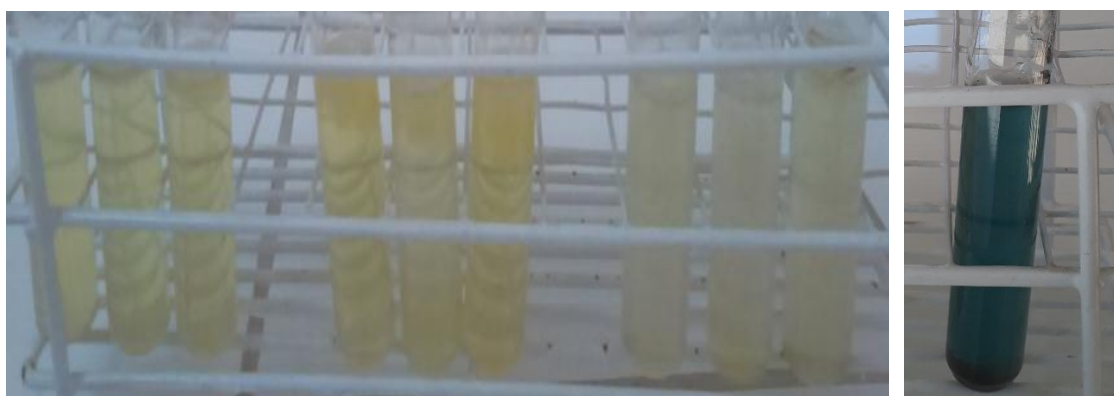
**Figura 4.** Prueba de Tukey de los recuentos de bacterias diazótrofes en muestras de suelo en tres comunidades de Huancané (junio – agosto 2017).



**Figura 5.** NMP de bacterias diazótrofes en muestras de suelo de la comunidad de Luriata, Huancané (junio – agosto 2017).



**Figura 6.** NMP de bacterias diazótroficas en muestras de suelo de la comunidad de Yapupampa, Huancané (junio – agosto 2017).



**Figura 7.** NMP de bacterias diazótroficas en muestras de suelo de la comunidad de Huancollusco, Huancané (junio – agosto 2017).

Por otro lado, Goitia (2014), Ibarra (2010) y Córdova *et al.* (2009), cuantificaron bacterias fijadoras de nitrógeno mediante el NMP y UFC/g de suelo respectivamente, siendo mayor en suelos rizosféricos, e identificó bacterias simbióticas como *Sinorhizobium meliloti* y *S. medicae*, y de vida libre *Stenotrophomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Serratia*, *Arthrobacter*, *Lysinibacillus*, *Bacillus* y *Tetrathiobacter*, en tal sentido el bajo recuento bacteriano en los suelos de las comunidades de Luriata y Yapupampa, se debería a la carencia de raíces de plantas, en razón de que dichas raíces proveen de nutrientes a las bacterias diazótroficas incrementando su número (Atlas & Bartha, 2002), y estos suelos estuvieron sin siembra en el último año y los agricultores aducen que algunos años a los suelos los dejan “descansar” para luego obtener buena producción de sus cultivos.

Entre los factores que disminuyen los recuentos de bacterias diazótroficas en los suelos, se tiene a los altos niveles de NaCl, tal como lo manifiesta Ogata & Zúñiga (2008), debido

a que, si la solución del suelo posee más sales que el medio interno de las células que constituyen las raíces, el agua tenderá a salir de estas últimas, causando sequedad fisiológica en las plantas y paralelamente los bajos recuentos bacterianos (Pernasetti, 2010).

El mayor recuento de bacterias diazótropas se debería a las condiciones fisicoquímicas del suelo, coincidiendo con Arguello *et al.* (2016), quienes determinaron en los suelos de la zona de muestreo Florilandia, el mayor recuento bacteriano, debido a la presencia de riego por goteo, influyendo positivamente en la zona de rizósfera y en la planta, y este tipo de irrigación acelera la tasa de desarrollo de las plantas (Jadin & Jacquemart, 1978), la abundancia bacteriana se atribuye además, a que este cultivo fue el único abonado orgánicamente con humus líquido (Ormeño & Ovalle, 2011), el cual es una forma de aplicar nutrientes para las plantas y mejorar la calidad química de los suelos, con ello se favorecen las condiciones para preservar y fomentar la diversidad bacteriana de la zona de rizósfera. Las menores poblaciones de diazótropas determinadas en las comunidades de Luriata y Yapupampa, fue similar a los informado por Arguello *et al.* (2016), en suelos de la zona de El Porvenir, cuyo suelo reportó un pH de 6.48, el pH ácido es un factor determinante en el número de bacterias, debido, a que estas poseen requerimientos de pH ácidos o ligeramente ácidos, de entre 5.5 – 6.2 para poder crecer.

El aislamiento de microorganismos en medios libres en nitrógeno, constituye un primer paso hacia la identificación de bacterias con capacidad para fijar nitrógeno. Aunque esta actividad está en proceso de ser comprobada mediante el ensayo de reducción de acetileno (Park *et al.*, 2005) en el laboratorio, el análisis del número y tipo de microorganismos identificados en estos medios brinda información valiosa acerca de la distribución de microorganismos potencialmente fijadores de nitrógeno en los diferentes sitios muestreados.

En este trabajo se realizó el aislamiento de microorganismos en medios libres de nitrógeno como un primer paso para la identificación y posterior análisis de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno. De acuerdo a estos resultados se encontró una mayor recuperación de aislamientos primarios en tres tipos de suelos. Este resultado es interesante porque contrasta con la mayor riqueza en vegetación que se encuentra en los bosques, y concuerda con hallazgos anteriores de bacterias diazótropas 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 & Kramer 2006), éstas usan ambas formas de nitrógeno (nitrato y amonio) y, al igual que en otros suelos, toma fósforo y calcio mediante sistemas radicales extensos y asociaciones con micorrizas arbusculares (Rao *et al.* 1998).

En esta investigación se aisló bacterias del género *Azotobacter* sp, debido a que se preparó el medio mineral libre de nitrógeno recomendado por varios autores para el aislamiento de éste género bacteriano (Arguello *et al.*, 2016; Constantino *et al.*, 2011; Escobar *et al.*, 2011; entre otros), estos resultados fueron diferentes a los mencionados por Cárdenas *et al.* (2010), quienes obtuvieron mayor cuantificación presuntivamente para el género *Azospirillum* sp. en el medio NFb, seguido de *Burkholderia* sp., debido a que los géneros bacterianos se establecen en las raíces de las plantas y en suelo subyacente. Al parecer algunas raíces de determinadas plantas acogen en su rizósfera bacterias específicas, tales como *Burkholderia* sp., quien es precominante en cultivos como en el maíz (Perín *et al.*, 2006).

Otros géneros bacterianos como *Gluconacetobacter* sp. y *Herbaspirillum* sp. Estuvieron en menor cantidad, ya que en su mayoría fueron endófitos, es decir en el interior de las plantas sin causarles daños aparentes (Punschke & Mayans, 2011), otros géneros como el *Gluconacetobacter* sp. son endófito, pero también se encuentran en suelos rizosféricos con abundantes lixiviados radicales, ricos en nutrientes esenciales como P y K, contribuyendo al reciclaje de nutrientes por parte de las plantas (Taiz & Zeiger, 2006). Estas bacterias, también exudan hormonas vegetales como las auxinas, citoquininas y giberelinas, adaptándose y colonizando ambiente rizosférico con mayor facilidad (Cárdenas *et al.*, 2010). La baja cuantificación en algunas parcelas evaluadas de las comunidades concuerda con Melloni *et al.*, (2004), quien reportó que la población de este género se ve afectada por las condiciones del suelo los tipos de vegetación y la época climática en la cual se realicen los muestreos de los suelos.

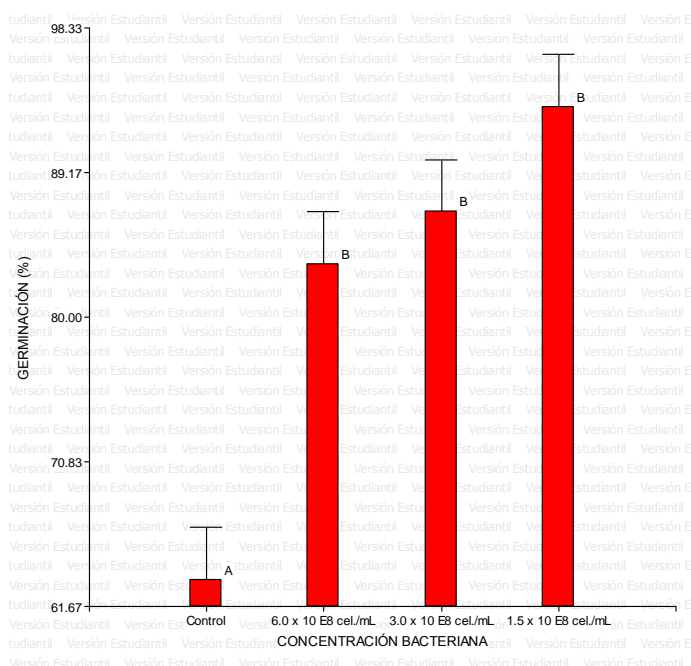
#### 4.2 Efecto de la inoculación de bacterias *Azotobacter sp* en la germinación y crecimiento de plántulas de quinua de la variedad Blanca de Juli

La germinación expresada en porcentaje (%) fue superior a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  cel./mL con un promedio de 93.33% de germinación, e inferior en el tratamiento control con agua destilada, logrando un promedio de 63.33%. Los coeficientes de variación fueron mayores en semillas no inoculadas (9.12%) y variaron de 6.19, 6.66 y 6.93% inoculadas con  $1.5$ ,  $3.0$  y  $6.0 \times 10^8$  cel./mL (Tabla 2).

**Tabla 2.** Germinación de semillas (%) de quinua inoculadas con bacterias diazótroficas, en condiciones de laboratorio UNA - Puno (junio – agosto 2017).

Concentración del inoculante	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Promedio	D.E.	C. V.
$1.5 \times 10^8$ cel./mL	90	100	90	93.33	5.77	6.19
$3.0 \times 10^8$ cel./mL	80	90	90	86.67	5.77	6.66
$6.0 \times 10^8$ cel./mL	80	90	80	83.33	5.77	6.93
Control	60	70	60	63.33	5.77	9.12

**Donde:** Rep. = repetición; DE = desviación estándar; y CV = coeficiente de variación; I. G. = índice de germinación; V. G. = velocidad de germinación.



**Figura 8.** Prueba de Tukey de la germinación (%) de semillas de quinua según concentración bacteriana, laboratorio de Ecología (junio – agosto 2017).

Según el análisis de varianza los porcentajes de germinación presentaron diferencia estadística significativa ( $P=0.0012$ ), donde la concentración bacteriana inoculada ( $1.5$ ,  $3.0$  y  $6.0 \times 10^8$  cel./mL) con respecto al tratamiento control (agua destilada), fueron superiores con porcentajes de germinación de 83.33, 86.67 y 93.33% respectivamente (Anexo 2).



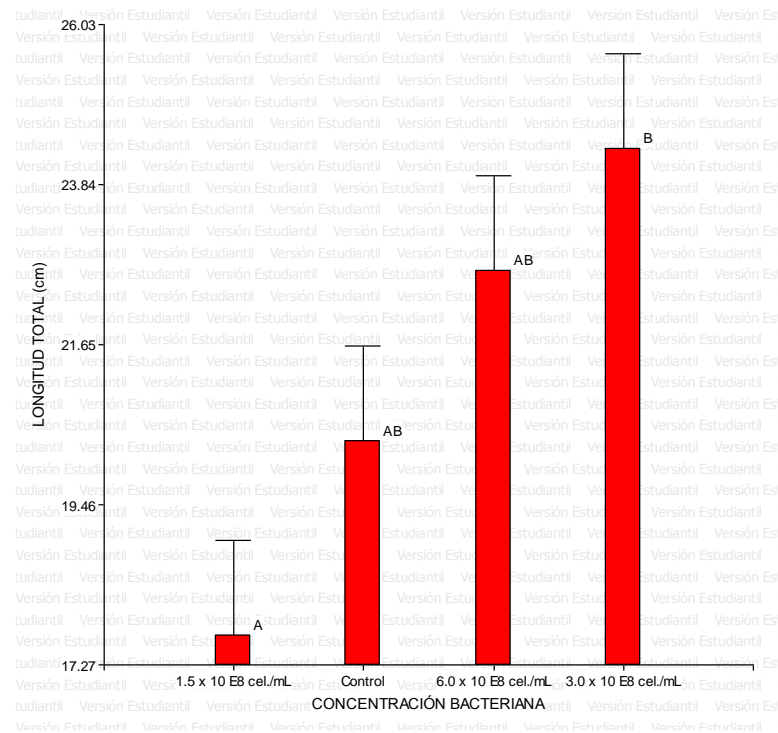
**Figura 9.** Efecto de las bacterias diazótroficas en la germinación de semillas de quinua, en condiciones de laboratorio UNA - Puno (junio – agosto 2017).

La mayor longitud total de plántulas fue superior a una concentración de  $3.0 \times 10^8$  cel./mL con plántulas de 10.33 cm y menor en semillas inoculadas con  $3.0 \times 10^8$  cel./mL con 4.67 cm (Tabla 3). Los coeficientes de variación de las longitudes totales fueron mayores a bajas concentraciones bacterianas (44.61%) y menor a concentraciones de  $6.0 \times 10^8$  células/mL con 17.63% (Figura 10).

**Tabla 3.** Longitud total (cm) de plántulas de quinua inoculadas con bacterias diazótroficas, en condiciones de laboratorio UNA - Puno (junio – agosto 2017).

Concentración del inoculante	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Promedio	D.E.	C. V.
$1.5 \times 10^8$ cel./mL	4	3	7	4.67	2.08	44.61
$3.0 \times 10^8$ cel./mL	8	11	12	10.33	2.08	20.15
$6.0 \times 10^8$ cel./mL	7	9	10	8.67	1.53	17.63
Control	5	7	7	6.33	1.15	18.23

**Donde:** Rep. = repetición; DE = desviación estándar; y CV = coeficiente de variación.



**Figura 10.** Prueba de Tukey de la longitud total de plántulas de quinua según concentración bacteriana, laboratorio de Ecología (junio – agosto 2017).

Según el análisis de varianza los porcentajes de longitud total, presentaron diferencia estadística significativa ( $P=0.0313$ ), siendo superiores en semillas inoculadas con diluciones de  $3.0 \times 10^8$  células/mL, seguido de la dilución  $6.0 \times 10^8$  células/mL y el tratamiento control, estos último no presentaron diferencia estadística significativa y el menor crecimiento con la dilución  $1.5 \times 10^8$  células/mL (Figura 11).

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





**Figura 11.** Efecto de las bacterias diazótroficas en el crecimiento de plántulas de quinua, en condiciones de laboratorio UNA - Puno (junio – agosto 2017).

También concuerda con lo reportado por Cárdenas *et al.* (2014), Orozco & Martínez (2009), quienes al inocular bacterias del género *Azospirillum* sp, lograron el crecimiento y desarrollo de plántulas de *Panicum máximum* (pasto), estimulando la germinación de semillas en comparación del tratamiento no inoculado; por otro lado, se afirma que las bacterias *Azotobacter* sp aisladas en la presente tesis, presentaron especificidad con las semillas de quinua ya presentaron efectos en la germinación y crecimiento de plántulas, todo ello siendo corroborado por Gutiérrez (2013), quien al inocular bacterias diazótroficas en variedades de maíz, demostraron la existencia de especificidad en la interacción cepa – variedad, aumentando la biomasa aérea de las plantas.

Las bacterias diazótroficas originan un buen desarrollo vegetal en plántulas de quinua, lo cual concuerda con lo determinado por Maddonni *et al.* (2003), quienes lograron mejoras en el crecimiento de las plantas incrementando su biomasa y rendimiento en asociación con bacterias rizosféricas del género *Azospirillum*, por otro lado, minimizan los efectos nocivos de los organismos fitopatógenos, incrementan la fijación de nitrógeno atmosférico, la absorción de agua, nutrientes y producen fitorreguladores de crecimiento vegetal; asimismo, concuerda con lo manifestado por Constantino *et al.* (2011), al biofertilizar plántulas de papaya con bacterias *Azotobacter chroococcum* y micorrizas *Glomus intraradices*, incrementando el crecimiento, la biomasa y su nutrición luego de dos inoculaciones, en semillas y después en plántulas, 30 días después de la emergencia.

Escobar *et al.* (2011), adiciona indicando que las cepas nativas de *Azotobacter* spp en el desarrollo vegetativo de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate”, debido a la producción de 7.10 a 57.99 mg/L de ácido indolacético, que viene a ser una fitohormona natural que estimularía el crecimiento de las plántulas, asimismo se logra fijar entre 0.13 a 1.64 mg/L de nitrógeno en forma de amonio y presenta una eficiencia del 1.61% en solubilizar la roca fosfórica de Bayóvar, aumentando la altura y el volumen radicular; estos metabolitos producidos por las bacterias diazótrofes pueden incrementarse tal como los reportan León & Rojas (2015), que en *Azotobacter* spp, logró cuantificar 36.03 ppm de nitrógeno fijado como amonio, 60.75 ppm de ácido indol acético (fitohormona) y 6.06 ppm de fósforo solubilizado, así como también presentó actividad antagónica contra hongos patógenos como *Fusarium verticillioides* debido a su actividad proteolítica y quitinolítica.

En contraste los resultados fueron diferentes a los presentados por Tang (1995), quien al inocular con *Azotobacter chroococcum* en la germinación y la altura de las plántulas de las gramíneas *Cenchrus ciliaris* y *Panicum maximum*, luego de 28 días después de la siembra, se observó una disminución de la germinación de las semillas cuando se inoculó con *Azotobacter*, esto debido probablemente a que las bacterias no tendrían un especificidad en la estimulación de su crecimiento, así como también las raíces de las gramíneas no liberan sustancias nutritivas adecuadas para las bacterias del género *Azotobacter* (Atlas & Bartha, 2002).

Las semillas de quinua inoculadas con las bacterias diazótrofes presentaron mejores resultados en los porcentajes de germinación y posterior crecimiento de los órganos de las plántulas. A pesar de que las bacterias *Azotobacter* sp son de libre libre, algunos autores manifiestan que las pectinasas y celulasas son enzimas implicadas en los mecanismos de las fitohormonas y otros metabolitos producidos por las bacterias, en tal sentido Hallman *et al.*, (1997), propusieron 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).

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, sugiriendo que, el efecto de la inoculación en la elongación de las raíces depende del genotipo de las bacterias (Tang, 1995), 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 (Spaepen *et al.*, 2008).

La elongación de la radícula podría atribuirse a la producción de algún metabolito bacteriano como el ácido indol acético (AIA) (León & Rojas, 2015). 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 la longitud de la raíz (Gutiérrez, 2013).

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 en el presente estudio vendrían produciendo 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.

De todo lo analizado en la investigación, aceptamos la hipótesis alterna, en razón de que la inoculación con bacterias rizosféricas ejerció efectos precoces en la germinación de semillas y crecimiento de plántulas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) en un lapso de 25 días en condiciones controladas.

## V. CONCLUSIONES

1. En suelos de los campos de cultivo del distrito de Huancané se aislaron bacterias diazótroficas del género *Azotobacter* sp, con recuentos promedios de 2733.33 NMP/g en la comunidad de Luriata, 3333.33 NMP/g en la comunidad de Yapupampa, y de 4660.00 NMP/g en la comunidad de Huancollusco, presentando diferencia estadística entre ellos ( $P < 0.05$ ) y con los mayores promedios en suelos de la comunidad de Huancollusco,
2. El género *Azotobacter* identificado y utilizado en la inoculación de semillas en condiciones de laboratorio, tiene efecto en incrementar los porcentajes de germinación en semillas de quinua inoculadas, lográndose germinaciones entre 83.33 y 93.33%, siendo superior en semillas inoculadas con una dilución de  $1.5 \times 10^8$  células/mL, frente al 63.33% del tratamiento control (agua destilada); asimismo influye en la longitud total de las plántulas de quinua obteniéndose valores promedios entre 4.67 cm y 10.33 cm presentando diferencia estadística significativa.

## VI. RECOMENDACIONES

- A futuros investigadores microbiólogos y biólogos moleculares, realizar la identificación molecular de las especies de bacterias diazótrofas, entre ellas las especies del género *Azotobacter* sp. aisladas de los campos de cultivo de la región Puno.
- A los productores de quinua de la región Puno, realizar experimentos de inoculación de bacterias *Azotobacter* sp en semillas, con diferentes concentraciones, en condiciones de invernadero o en parcelas demostrativas a campo abierto, para determinar su efecto en la germinación y crecimiento de plántulas.
- A los profesionales biólogos y agrónomos, realizar experimentos sobre la obtención de presentaciones comerciales líquidas o sobre sustratos que contengan bacterias diazótrofas *Azotobacter* sp aisladas de suelos del altiplano peruano, con fines de obtener productos agropecuarios ecológicos de venta a los agricultores para su ulterior aplicación en sus campos de cultivo.

## VII. REFERENCIAS

- Alarcón A., Davis T. Jr., Egila N., Fox C., Estrada A. & Ferrera R. (2002). Short term effects of *Glomus claroideum* and *Azospirillum brasilense* on growth and root acid phosphatase activity of *Carica papaya* L. under phosphorus stress. *Rev. Latinoam. Microbiol.* Vol. 44: 31 – 37.
- Arguello A., Madiedo N. & Moreno L. (2016). Cuantificación de bacterias diazótroficas aisladas de suelos cacaoteros (*Theobroma cacao* L.) por la técnica de Número Más Probable (NMP). *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol XVIII (2): 40 – 47.
- Astier M., Maass M. & 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. & Bartha R. (2002). Ecología microbiana y microbiología ambiental. Segunda Edición. Editorial Addison Wesley. Madrid – España. 217 – 218.
- Baca B., Soto L. & Pardo M. (2000). Fijación biológica de nitrógeno. *Elementos.* Vol 38: 43 – 49.
- Barea J. (2000). Rhizosphere and mycorrhiza of field crops. In: biological resource management: connecting science and policy (OECD). J. P. Toutnat, E. Balazs, E. Galante, J.M. Lynch J.S. Schepers, D. Werner y P. A. Werry (eds): INRA, Editions and Spinger. p. 110 – 125.
- Barea J., Azcon R. & Azcon C. (2004). Micorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria In: Plant surface microbiology. A. Varma, L. Abbott, D. Werner, R. Hampp, (eds). Heidelberg Alemania: Springer-Verlag. p. 351 – 371
- Barea J., Azcon R. & Azcon C. (2005). Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. In: Microorganism on soil: Roles in genesis and functions. F. Buscot, S. Varma (eds): Heidelberg Alemania: Springer-Verlag. p. 195 – 212.
- Bashan Y. (1986). Significance of timing and level of inoculation with rhizosphere bacteria of inoculation with rhizosphere bacteria on wheat plants. *Soil Biol. Biochem.* Vol. 18: 297 – 301.
- Becking J. (1961). Studies on Nitrogen-fixing Bacteria of the Genus *Beijerinckia*. Oxford University Press. Reino Unido.
- Bécquer C., Lazarovitz G., Nielsen L., Quintana M., Adesina M., Quigley L., Lalin I. & Ibbotson C. (2015). Efecto de la inoculación con bacterias rizosféricas y

- Trichoderma* en trigo (*Triticum aestivum* L.). Revista de Pastos y Forrajes. Vol. 38, No. 1: 29 – 37.
- Bécquer C., Prévost D., Juge Ch., Gauvin C. & Delaney S. (2012). Efecto de la inoculación con bacterias rizosféricas en dos variedades de trigo. Fase I: condiciones controladas. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. Vol. 3 (5): 973 – 984.
- Bekri A., Desair J., Keijers V., Proost P., Searle-van Leeuwen M., Vanderleyden J. & Vande Broek A. (1999). *Azospirillum irakense* produces a novel type of pectate lyase. J. Bacteriol. Vol. 181: 2440 – 2447.
- Benzing A. (2001). Agricultura orgánica, fundamentos para la región andina. Editorial Neckar – Verlag, Villingen – Schwenningen. Alemania. 682 p.
- Betancourt D. (2002). Characterization of diazotrophs containing Mo independent nitrogenases from diverse natural environments. Tesis de maestría en Microbiología North Carolina State University. p. 1 – 22.
- Bowen G. & Rovira A. (1999). The rizosphere and its management to improve plant grown. Advances in Agronomy. Vol 66: 1 – 102.
- Calvo P. & 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. & 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. Vol. 7 (1,2): 141 – 148.
- Cárdenas D., Garrido M., Bonilla R. & Baldani V. (2010). Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. en pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) del Valle del Cesar. Pastos y Forrajes. Vol. 33(3): 11.
- Cárdenas D., Garrido M., Roncallo B. & Bonilla R. (2014). Inoculación con *Azospirillum* spp y *Enterobacter agglomerans* en Pasto Guinea (*Panicum máximo* Jacq.) en el Departamento de César (Colombia). Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín – Colombia. Vol. 67 (2): 7271 – 7280.
- Carrillo A., Puente M., Castellanos T. & Bashan Y. (1998). Aplicaciones biotecnológicas de ecología microbiana. Manual de laboratorio. Eds. Pontificia Universidad Javeriana, Santa Fe de Bogotá, Colombia y Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste S. C. La Paz, Baja California Sur, México.

- Carrillo K., Colmenares A., Ramírez L., Moreno L. & Cárdenas D. (2015). Inoculación de cilandro (*Coriandrum sativum* L.) con rizobacterias en Villa del Rosario, Norte de Santander. Revista Fac. Nal. Agr. Medellín – Colombia. Vol. 68 (1): 7459 – 7470.
- Castillo J., Casas J. & Martínez M. (2005). Evaluación de la degradación de endosulfan por *Azotobacter chroococcum* y determinación del efecto plaguicida sobre la fijación biológica de nitrógeno y sobre la producción de auxinas. Tesis de Microbiología Agrícola y Veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana. p. 13 – 14.
- Chen H. (2006). The combined use of chemical and organic fertilizer and/or biofertilizer for crops growth and soil fertility. International Workshop on Sustained Management of the Soil-Rhizosphere System for Efficient Crop Production and Fertilizer Use. Land Development Department Bangkok, Thailand.
- CIA – UCR, Centro de Investigaciones Agronómicas – Universidad de Costa Rica (2010). Determinación de pH en suelos. Página web: <http://www.cia.ucr.ac.cr/pdf/LSF/20130520/Info%20pH.pdf>. Revisado: 15 marzo del 2016.
- Claros M., Angulo V., Gutiérrez C. & 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.
- Collados C. (2006). Impacto de inoculantes basados en *Azospirillum* modificado genéticamente sobre la diversidad y actividad de los hongos de la micorriza arbuscular en rizósfera de trigo y maíz. Tesis de doctorado. Facultad de microbiología. Universidad de Granada. España. p. 6 – 20.
- Constantino M., Gómez R., Álvarez J., Pat J. & Espín E. (2011). Efecto de la inoculación de *Azotobacter chroococcum* y *Glomus intraradices* en el crecimiento y nutrición de plántulas de papaya en fase de vivero. Agronomía Costarricense. Vol. 35 (1): 15 – 31.
- Córdova Y., Rivera M., Ferrera R., Obrador J. & Córdova V. (2009). Detección de bacterias benéficas en suelo con banano (*Musa AAA Simmonds*) cultivar Gran enano y su potencial para integrar un biofertilizante. Revista Publicaciones Uciencia. Universidad y Ciencia, México. Vol. 25 (3): 253 – 265.
- Coyne M. (2000). Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. Editorial Paraninfo. ITP An International Thomson Publishing company. Madrid – España. 416 p.



- Cupull R., Guerra G., Cupull C., Ferrer V. & Pérez C. (2002). Efecto de *Trichoderma viride* y *Azotobacter chroococcum* en la estimulación de la germinación y el desarrollo de posturas de *Carica papaya* Lin. Centro Agrícola. Vol. 4: 30 – 33.
- Dalton A & Kramer S. (2006). Plant-Associated Bacteria, p. 105-130. In S. S. Gnanamanickam (ed.). Nitrogenfixing bacteria in non-legumes. Springer, Dordrecht, Holanda.
- Desnoues N., Lin M., Guo X., Ma L., Carreño R. & Elmerich C. (2003). Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice. Journal of Microbiology. Vol 149: 2251 – 2262.
- Dhanasekar R., Viruthagiri T. & Sabarathinam L. (2003). Poly (3-hydroxybutyrate) Synthesis from a Mutant Strain *Azotobacter vinelandii* Utilizing Glucose in a Batch Reactor. Maryland, USA.
- Drummond M., Walmsley J. & Kennedy C. (1995). Expression from the nifB Promoter of *Azotobacter vinelandii* can be activated by NifA, VnfA, or AnfA Transcriptional Activators. Journal of Bacteriology. Vol. 178 (3): 788 – 792.
- Escobar C., Horna Y., Carreño C. & Mendoza G. (2011). Caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* spp y su efecto en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate” en Lambayeque. Scientia Agropecuaria. Vol. 2 (1): 29 – 49.
- Espín G. (2000). Biología de *Azotobacter vinelandii*. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Página web: [http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO\\_09/Capitulo09.pdf](http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_09/Capitulo09.pdf). Fecha de revisión: 8/abril/2016.
- Díaz P., Ferrera R., Almaraz J. & Alcántar G. (2001). Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. Revista Terra. Vol. 19 (4): 327 – 335.
- Ferrera R. & Alarcón A. (2007). Microbiología Agrícola, hongos, bacterias y micro y macrofauna, control biológico y planta – microorganismo. Editorial Trillas. México. 568 p.
- Gaitán I. & García E. (1998). Prueba a nivel de campo y escalado a planta piloto del proceso de producción de biofertilizante. Universidad Nacional de Ingeniería. Managua, Nicaragua.
- Goitia J. (2014). Aislamiento de bacterias diazótrofes en suelos de cultivo, virgen y humus de lombriz del distrito de Puno y su efecto *in vitro* en la germinación de la quinua (*Chenopodium quinoa* Wild.). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano. Puno – Perú. 69 p.

- González J. & Lliuch C. (1992). *Biología del Nitrógeno, Interacción Planta Microorganismo*. Editorial Rueda. Madrid, España.
- González J., Salmerón V., Martínez M., Ballesteros F. & Ramos A. (1986). Production of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter vinelandii* ATCC12837 in chemically defined media and dialyzed soil media. España.
- González L. & Orozco A. (1996). Métodos de análisis de datos en la germinación de semillas, un ejemplo: *Manfreda brachystachya*. Bol. Soc. Bot. México. Vol. 58: 15 – 30.
- Googlemap. (2016). 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](http://www.google.com.pe). Fecha de revisión: 29 de junio del 2013.
- Gryndler M. (2000). Interactions of arbuscular micorrhizal fungi with other soil organism. In: *Arbuscular micorrizas: physiology and function*. Y Kapulnick and D.D Douns Jr. (eds). Kluwer Academic Press. p. 239 – 262.
- Gutiérrez P. (2013). Efecto de la inoculación con bacterias diazótroficas en plantas de maíz (*Zea mays* L.) de distintas variedades. Informe de investigación. Laboratorio de Microbiología Vegetal, Facultad de Agronomía, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Montevideo – Uruguay. 80 p.
- Hallmann J., Mahaffee F. & Kloepper W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*. Vol. 914 (10): 895 – 914.
- Hansel C., Fendorf S., Jardine P. & 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.
- Horan N., Jarman T. & Dawes E. (1983). Studies of some enzymes of aliginic acid biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* grown in continuous culture. USA.
- IAB, Centro de Investigaciones y Aplicaciones Biotecnológicas. (2001). *Biofertilizantes*. Valencia, España. Página web: <http://www.iabiotec.com/respuestas.htm>. Fecha de revisión: 12 / 09 / 2006)
- Ibañez V. (2009). *Métodos estadísticos*. Maestría en Ganadería Andina. Escuela de Post Grado, Universidad Nacional del Altiplano. Editorial Universitaria. Puno – Perú. 582 p.
- Ibarra Cl. (2010). *Diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de suelo de Chinampa y su efecto en plantas de interés agrícola*. Tesis de Maestría en Ciencias.

- Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. México. 85 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.
- Itzigsohn R., Burdman S. & Okon Y. (2000). Plant growth promotion in natural pastures by inoculation with *Azotobacter chroococcum* under suboptimal growth conditions. *Arid Soil research and Rehabilitation*. Vol. 13: 151 – 158.
- Jadin P. & Jacquemart P. (1978). Effet de l'irrigation sur la précocité des jeunes cacaoyers. *Café Cacao*. Vol. 22 (1): 31 – 35.
- Jiménez D. (2007). Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de *Azotobacter* spp mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal 16S. Tesis de Licenciatura. E. P. Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias Básicas, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá – Colombia. 105 p.
- Joerger R., Loveless. M., Pau R., Mitchenall L., Simon B. & Bishop P. (1990). Nucleotide sequence and mutational analysis of the structural genes for nitrogenase 2 of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*. Vol. 172: 3400 – 3408.
- Juárez B., Martínez M. & González J. (2004). Growth of *Azotobacter chroococcum* in chemically defined media containing p-hydroxybenzoic acid and protocatechuic acid. *Chemosphere*. Vol 59: 1361 – 1365
- La Manna L., Buduba C., Alonso V., Davel M., Puentes C. & 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 (2): 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.
- León L. & Rojas L. (2015). Determinación del potencial promotor del crecimiento vegetales de *Azotobacter* spp aislados de la rizósfera de malezas en cultivos de maíz (*Zea mays* L.). *Scientia Agropecuaria*. Vol. 6 (4): 247 – 257.
- Lin L. & Sadoff H. (1968). Encystment and polymer production of *Azotobacter vinelandii* in the presence of  $\beta$ -hidroxibutirato. Londres.

- Maddonni G., Ruíz R., Vilariño P. & Garía I. (2003). Capítulo 17: Dinámica de los nutrientes en el sistema Suelo – Planta. En Producción de Granos. Bases funcionales para su manejo. Editorial Facultad de Agronomía. p. 469 – 479.
- Madigan M., Martinko J. & Parker J. (2003). Brock Biología de los Microorganismos. 10ma edición. Editorial Prentice – Hall. Madrid – España.
- Marín V., Baldani V., Dos Santos K. & Baldani J. (1998). Fijación biológica de nitrógeno: bacterias fijadoras de nitrógeno de importancia para la agricultura tropical. Embrapa - Agrobiología, Seropedica, Río de Janeiro, Brasil.
- 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.
- Martínez I., Little R., Shearer N., Johnson P & Dixon R. (2005). Nitrogen fixation: key genetic regulatory mechanisms Biochemical Society Transactions. Vol. 33. Part 1.
- Martínez V. (1996). Ciclo biológico del nitrógeno en el suelo. Editorial Científico-técnica. Habana, Cuba.
- Mayea S., Carone M., Novo R., Boado I., Silveira E., Soria M., Moralez, Y. & Valiño A. (1998). Aplicaciones de la Microbiología Agropecuaria. Biofertilizantes. Tomo II. Ed. Félix Varela. Cuba.
- Melloni R., Nóbrega R., Moreira F. & Siqueira J. (2004). Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxite, em reabilitação. Revista Brasileira de Ciência do Solo. Vol. 28 (1): 85 – 93.
- Mishustin E., & Shilnikova V. (1969). The Biological fixation of Atmospheric Nitrogen by Free-living Bacteria. Soil Biology Reviews of Research. UNESCO Belgium.
- Mokwunye U., De Jager A. & Smaling A. (1996). Restoring and Maintaining the Productivity of West African Soil: Key to sustainable Development. (eds.) In: Miscellaneous Fertilizer Studies N°. 14.
- Moraga N., Gamboni O., Amoroso M. & 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.
- Moshiri F., Kim J., Fu C. & Maier M. (1994). The FeSII protein of *Azotobacter vinelandii*: is not essential for aerobic nitrogen fixation, but confers significant protection to oxygen-mediated inactivation of nitrogenase in vitro and in vivo. Molecular Microbiology. Vol 14: 101 – 114.

- Nagananda G., Das A., Bhattacharya S. & 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*. Vol. 6 (4): 394 – 403.
- Nogales B. (2005). Microbiología del suelo en la era de la biología molecular: Descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas*. Vol 2: 1 – 10.
- Ogata K. & Zúñiga D. (2008). Estudio de la microflora de la rizósfera de *Caesalpinia spinosa* en la provincia de Huánuco. *Revista Zonas Áridas*. Vol. 12 (1): 191 – 208.
- Ormeño M. & Ovalle A. (2011). Efecto de la aplicación de abonos orgánicos en la calidad química de los suelos cacaoteros y el crecimiento de las plántulas en vivero. Ed. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, INIA, Mérida. En: *Memorias XIX Congreso Venezolano de la Ciencia del Suelo*. p. 6.
- Orozco C. & Martínez P. (2009). Evaluación de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno asimbióticos aislados de la rizósfera de *Pinus patula* en Colombia. *Revista Bosque*. Vol. 30 (2): 70 – 77.
- Park M., Kim C., Yang J., Lee J., Shin W., Kim S. & Ta S. (2005). Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microb. Res*. Vol. 160: 127 – 133.
- Perín L., Martínez L., Castro R., Estrada P., Cabellos T., Guedes H., Resi V. & Caballero, J. (2006). Diazotrophic *Burkholderia* Species Associated with Field-Grown Maize and Sugarcane. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 72 (5): 3103 – 3110.
- Pernasetti O. (2010). Cátedra de salinidad y sodicidad de los suelos. Catamarca Argentina: Universidad Nacional de Catamarca. 56 p.
- Prescott L., Harley J. & Klein D. (2009). Microbiología. 5ta edición. Editorial McGraw – Hill Interamericana. Madrid – España.
- Punschke K. & Mayans M. (2011). Selección de cepas de *Herbaspirillum* spp. promotoras del crecimiento de arroz. *Agrociencia Uruguay*. Vol. 15 (1): 19 – 26.
- Ramos F. (1992). Genética de la regulación de la asimilación de nitrato en *Azotobacter vinelandii*. Sevilla, España.
- Rao M., Kerridge P. & Macedo M. (1998). Requerimientos nutricionales y adaptación a los suelos ácidos de especies de *Brachiaria*. CIAT. *Brachiaria: biología, agronomía y mejoramiento*. Cali, Valle del Cauca, Colombia.
- 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.
- Robson R. & Postgate J. (1980). Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. *Annual Review Microbiology*. Vol 34: 183 – 207.
- Rodelas B., González J., Pozo C., Martínez M. & Salmerón V. (2001). Interacción *Rhizobium/Azospirillum* y *Rhizobium/Azotobacter*, efecto sobre el crecimiento, nodulación y fijación simbiótica de N<sub>2</sub> en *Vicia faba*. Universidad de Granada – España. Página web <http://www.edumicro.usal.es/sefin/Rodelas.html>. Fecha de revisión: 15 julio 2018.
- Rodríguez H. (1984). Nutrición en frutales. *Psidium guajaba* y *Carica papaya*. Boletín de reseñas. Cítricos y otros frutales. CIDA. MINAGRI. Cuba. p. 27 – 51.
- Rodríguez V. & Blanco A. (2001). Eficiencia de *Azotobacter chroococcum* en la producción de posturas de *Coffea arabica*. II Taller sobre biofertilización en los trópicos. Habana, Cuba.
- Rodríguez V. & Blanco A. (2001). Eficiencia de *Azotobacter chroococcum* en la producción de posturas de *Coffea arabica*. II Taller sobre biofertilización en los trópicos. Habana, Cuba.
- Sabra W., Zeng A., Sabry S., Omar S. & Deckwer W. (1999). Effect of Phosphate and Oxygen Concentrations on Alginate Production and Stoichiometry of Metabolism of *Azotobacter vinelandii* under Microaerobic Conditions”. Londres.
- Sánchez J., López I., Villegas J. & Montaña N. (2014). Respuesta del maíz (*Zea mays* L.) a la inoculación con *Azotobacter* sp y *Burkholderia* sp a dosis reducida de fertilizante nitrogenado. *Scientia Agropecuaria*. Vol. 5: 17 – 23.
- Santana M., Vásquez C., Martínez M. & Franco M. (2002). Evaluación de cepas de *Azotobacter* spp. y de bacterias solubilizadoras de fosfato (BFS), como biofertilizante mixto en cultivo de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* var. Regal Suerte). Tesis de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá – Colombia. p. 24.
- 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.

- Scragg A. (2000). Biotecnología para ingenieros, sistemas biológicos en procesos tecnológicos. Editorial Limusa. México
- SENAMHI, Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología. (2000). Boletines agro – hidrometeorológico. Dirección Regional de Puno. Puno – Perú.
- Sharma A., Parmar K., Kumar P., Singh Y. & Sharma P. (2008). *Azotobacter* soil amendment integrated with cow manure reduces need for NPK fertilizers in Sprouting Broccoli. Internal Journal of vegetable Science. Vol. 14: 273 – 285.
- Singleton P. (2004). Bacterias en biología, biotecnología y medicina. Editorial Acribia. Zaragoza (España). p. 265 – 273.
- Spaepen S., Dobbelaere S., Croonenborghs A. & Vanderleyden J. (2008). Effects of *Azospirillum brasilense* indole – 3 – acetic acid production on inoculated wheat plants. Plant Soil. Vol. 312: 15 – 23.
- Sudhir U., Meshram., Jager G. (1983). Antagonism of *Azotobacter chroococcum* isolates to *Rhizoctonia solani*. European Journal of Plant Phatology. Vol 89 (5): 191 – 197.
- Taiz L. & Zeiger E. (2006). Fisiología vegetal. Plant physiology. 4th ed. Sunderland, MA. Sianuer Associates Inc., p. 1338.
- Tang M. (1995). Efecto de la inoculación con *Azotobacter chroococcum* en la germinación y altura de las plántulas en dos leguminosas y dos gramíneas. Revista de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes. Vol. 18 (2).
- Telisa M., Loveless J., Royden S. & Paul B. (1999). Isolation of Nitrogen Fixing Bacteria Containing Molybdenum-Independent Nitrogenases from Natural Environments. Applied and Enviromental Microbiology. p. 4223 – 4226.
- Thorneley R. & Ashby A. (1989). Oxydation of nitrogenase iron protein by dioxygen without inactivation could contribute to high respiration rates in *Azotobacter* species and facilitate nitrogen fixation in other aerobic enviroments. Biochemical Journal. Vol 261: 181 – 187.
- Torriente D. (2010). Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de la caña de azúcar. Perspectivas de su uso en Cuba. Revisión bibliográfica. Revista Cultivos Tropicales. Vol. 31 (1): 19 – 26.
- Useche Y., Valencia H. & Pérez H. (2004). Caracterización de bacterias y hongos solubilizadores de fosfato bajo tres suelos en el sur del trapecio amazónico. Universidad Nacional de Colombia. Acta Biológica Colombiana. Vol. 9 (2).

- Valdés M., Reza F. & Furlan V. (1993). Response of *Leucaena esculenta* to endomycorrhizae and *Rhizobium inoculation*. World J Microbiol Biotechnol. Vol. 9: 97 – 99.
- Verma K., Jamaluddin S. & Thakur K. (2008). Economics of biofertilizer application on production of planting propagules of teak in a commercial nursery. Indian Forester. Vol. 134: 923 – 929.
- Wasy A., Shyamamma S. & Nache V. (2010). Effect of bio-inoculants on nursery establishment of papaya cv. Solo. Acta Hort. (ISHS). Vol. 851: 389 – 394.
- Xie H., Pasternak J. & Glick B. (1996). Isolation and characterization of mutants of plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2. that over produce indole acetic acid. Curr. Microbiol. Vol. 32: 67 – 71.
- 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.
- Zúniga D. (2012). Manual de Microbiología Agrícola, *Rhizobium*, PGPRs, indicadores de fertilidad e inocuidad. Q & I Impresores S. R. L. Lima – Perú. 112 p.

## ANEXOS



**Anexo 1.** Análisis de varianza y prueba de Tukey del recuento de bacterias diazótrofes en tres suelos de la provincia de Huancané.

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Nº DE DIAZÓTROFAS (NMP/g)	9	0.91	0.87	8.92

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

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5832088.89	2	2916044.44	28.69	0.0008
ZONAS DE MUESTREO	5832088.89	2	2916044.44	28.69	0.0008
Error	609933.33	6	101655.56		
Total	6442022.22	8			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=798.75599

Error: 101655.5556 gl: 6

ZONAS DE MUESTREO Medias n E.E.

Luriata	2733.33	3	184.08	A
Yapupampa	3333.33	3	184.08	A
Huancollusco	4660.00	3	184.08	B

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

**Anexo 2.** Análisis de varianza y prueba de Tukey de la germinación de semillas de quinua según concentración bacteriana inoculada.

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
GERMINACIÓN (%)	12	0.85	0.79	7.07

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

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1500.00	3	500.00	15.00	0.0012
CONCENTRACIÓN BACTERIANA	1500.00	3	500.00	15.00	0.0012
Error	266.67	8	33.33		
Total	1766.67	11			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=15.09603

Error: 33.3333 gl: 8

CONCENTRACIÓN BACTERIANA Medias n E.E.

Control	63.33	3	3.33	A
6.0 x 10 E8 cel./mL	83.33	3	3.33	B
3.0 x 10 E8 cel./mL	86.67	3	3.33	B
1.5 x 10 E8 cel./mL	93.33	3	3.33	B

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

**Anexo 3.** Análisis de varianza y prueba de Tukey de la longitud total de plántulas de quinua según concentración bacteriana inoculada.

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
LONGITUD TOTAL	12	0.65	0.52	10.61

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

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	75.58	3	25.19	4.96	0.0313
CONCENTRACIÓN BACTERIANA	75.58	3	25.19	4.96	0.0313
Error	40.67	8	5.08		
Total	116.25	11			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=5.89519

Error: 5.0833 gl: 8

CONCENTRACIÓN BACTERIANA	Medias	n	E.E.
1.5 x 10 <sup>8</sup> cel./mL	17.67	3	1.30 A
Control	20.33	3	1.30 A B
6.0 x 10 <sup>8</sup> cel./mL	22.67	3	1.30 A B
3.0 x 10 <sup>8</sup> cel./mL	24.33	3	1.30 B

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

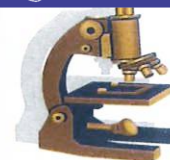
**Anexo 4.** Zonas de ubicación de las comunidades de muestreo de suelos para el trabajo de investigación.



Fuente: Google.map (2016).



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO – PUNO  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA ACADÉMICO DE ECOLOGÍA  
LABORATORIO DE ECOLOGÍA ACUÁTICA



## CONSTANCIA

EL QUE SUSCRIBE LABORATORISTA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE ECOLOGÍA ACUÁTICA DE LA UNA-PUNO

### HACE CONSTAR:

Que el Bachiller **JAVIER FRANKLIN MAMANI CALLATA**, egresado de la escuela profesional de Biología de la Universidad Nacional Del Altiplano, ha realizado el trabajo de investigación “**EFECTO DE LA INOCULACION CON BACTERIAS DIAZOTROFICAS EN LA GERMINACION Y CRECIMIENTO DE QUINUA (*Chenopodium quinoa* WILD.) EN CONDICIONES CONTROLADAS**” Realizado en los meses de Junio - Agosto del 2017 en este laboratorio.

Se emite la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que se estime por conveniente

Puno, 01 de octubre del 2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO

M.Sc. Alfredo L. Liza Del Carpio  
FACULTAD CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Asociado T. C.