



**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA**  
**Y PARASITOLOGÍA**



**Especies de *Pseudomonas* aisladas de rizoplasma y  
rizósfera de *Asparagus officinalis* L. y su potencial como  
promotoras de crecimiento en plantas**

**TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN  
BIOLOGÍA MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA**

**PRESENTADA POR:**

**Br. Klissman Oliver Romero Terrones**

**LAMBAYEQUE, PERÚ**

**2017**

**Especies de *Pseudomonas* aisladas de rizoplano y  
rizósfera de *Asparagus officinalis* L. y su potencial como  
promotoras de crecimiento en plantas**

**TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA  
MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA**

**APROBADA POR:**

Dr. Eduardo Tejada Sánchez

\_\_\_\_\_

**PRESIDENTE**

Mblga. María Silva García

\_\_\_\_\_

**SECRETARIA**

MSc. Consuelo Rojas Idrogo

\_\_\_\_\_

**VOCAL**

Dra. Carmen Carreño Farfán

\_\_\_\_\_

**PATROCINADORA**

**LAMBAYEQUE, PERÚ**

**2017**

## **AGRADECIMIENTOS**

*Escribo este humilde agradecimiento a TI bendito y grande JEHOVA que me has dado todo, como cada día que me regalas una oportunidad para levantarme de mi cama y darle un beso a mi madre, ver a mi padre llegar de trabajar, jugar fútbol con mi hermano, abrazar a mi hermana y cuidar a mis sobrinos que son mis hermanos, gracias por no permitir que nadie nos separe, gracias por los 9 años compartiendo cada domingo un show de risas.*

*Gracias por no abandonarme cuando mas solo me sentí, como también hacerme ver que todo va a pasar, levantándome y seguir luchando, gracias por colocar en mi camino personas que nunca olvidare “morrongo” y que a gracias a sus consejos me protegiste para no perderme.*

*Al mostrarme que por no tener dos soles y no entender un pae aun sigues en mi vida, permitirme conocer a un loco más que yo, abrir mis ojos de que tan perdido estoy sin TI y conocer TU grandeza.*

*Agradezco por darme las fuerzas suficientes para terminar mi carrera, cumplir con mis objetivos, asi como concluir mi tesis, ayudado por una gran persona y profesional como mi Asesora Dra. Carmen Carreño, que su apoyo fue vital en este trabajo.*

*Y por ultimo GRACIAS por permitirme disfrutar de la “BIOLOGIA” que no deja de asobrarme cada día.*

**¡GRACIAS SEÑOR DIOS!**

## **DEDICATORIA**

*Mi éxito es tu éxito y mis logros son los tuyos, así como el esfuerzo que realizo es por tu gloria, este trabajo es para TI MI DIOS, porque tú me has dado todo y más yo no te he dado nada, lo que logre que sea para dar a conocer tu grandeza.*

*A Mis Amados Padres “Cesar y Darlyng”, mis melosos y Amados hermanos “Evelyn y Julio” que empecé con ustedes esta vida, porque así lo quiso DIOS, más EL no se equivocó, que este trabajo sea para dejar en alto nuestro Apellido familiar, para así más tarde poder celebrar.*

*Para mi Familia Terrones Rodríguez que me enseñaron que todo tiene su tiempo, con esfuerzo y apoyo todos se logra y con la Familia Romero Llanos aprendí que la Familia debe siempre ser feliz, no me puedo olvidar que siempre estuvieron ahí.*

*Mis queridas amigas “Damaris y Ninfa” y amigos “Yahir, Luz, Kevin, Gabo, Esqueche, Chafloque” que me jalaban las orejas para mejorar cada día, a la vez que aunque no nos veíamos se preocuparon por mí y me ayudaron para terminas mi Tesis.*

**KLISSMAN OLIVER ROMERO TERRONES**

## Índice

I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1 Antecedentes de la investigación .....	2
2.2 Base teórica .....	8
2.2.1 <i>Asparagus officinalis</i> L.....	9
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	12
3.1 Material.....	12
3.1.1 Muestra biológica.....	12
3.1.2 Población y muestra .....	12
3.2 Métodos.....	12
3.2.1 Variable de la fase descriptiva.....	12
3.2.2 Variables de la fase experimental .....	12
3.2.3 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis .....	13
3.2.4 Lugar de muestreo .....	13
3.2.5 Obtención de muestras .....	16
3.2.6 Aislamiento e identificación fenotípica de <i>Pseudomonas</i> spp.....	16
3.2.7 Mantenimiento de cultivos de <i>Pseudomonas</i> spp.....	19
3.2.8 Cuantificación de nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos .....	19
3.2.9 Selección de <i>Pseudomonas</i> spp .....	24
3.2.10 Efecto de <i>Pseudomonas</i> spp. en plantas de espárrago .....	24
3.2.11 Análisis estadísticos de los datos .....	29
IV RESULTADOS.....	30
4.1 Bacterias del género <i>Pseudomonas</i> aisladas e identificadas en el rizoplaneo y rizósfera de <i>Asparagus officinalis</i> L .....	30
4.2 Nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos por <i>Pseudomonas</i> spp. ....	35
4.3 Cultivos de <i>Pseudomonas</i> spp. seleccionados.....	35
4.4 Efecto de <i>Pseudomonas</i> spp. en la altura y número de tallos de <i>Asparagus</i> <i>officinalis</i> L. ....	35
V. DISCUSIÓN .....	58

VI. CONCLUSIONES .....	62
VII. RECOMENDACIONES .....	63
VIII. RESUMEN .....	64
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
X. ANEXOS .....	73

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b>	Lote de procedencia demuestras de raíces con suelo rizosferico de <i>Asparagus officinalis</i> L. en el fundo Josymar, Viru, La Libertad.....	15
<b>Tabla 2.</b>	Análisis físico – químico de suelo rizosferico de <i>Asparagus officinalis</i> L. en Viru, La Libetad, 2016 .....	17
<b>Tabla 3.</b>	Características diferenciales de <i>Pseudomonas</i> spp. ....	33
<b>Tabla 4.</b>	Frecuencia de especies identificadas en <i>Pseudomonas</i> spp. aisladas de rizoplano y rizosféra de <i>Asparagus officinalis</i> L. ....	34
<b>Tabla 5.</b>	Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por <i>Pseudomonas</i> spp. aisladas de rizoplano y rizosféra de <i>Asparagus officinalis</i> L. ....	37
<b>Tabla 6.</b>	Fósforo cuantificado (ppm) en la solubilización por <i>Pseudomonas</i> spp. aisladas de rizoplano y rizosféra de <i>Asparagus officinalis</i> L. ....	41
<b>Tabla 7.</b>	Indoles producidos (ppm) por <i>Pseudomonas</i> spp. aisladas de rizoplano y rizosféra de <i>Asparagus officinalis</i> L. ....	45
<b>Tabla 8.</b>	Valores (ppm) de amonio, fósforo soluble e indoles correspondientes a cultivos de <i>Pseudomonas</i> spp. seleccionados .....	48
<b>Tabla 9.</b>	Índices de efectividad (%) de <i>Pseudomonas</i> spp. en la altura de <i>Asparagus officinalis</i> L. a los 30, 45 y 60 días .....	51
<b>Tabla 10.</b>	Prueba de Tukey de la altura de plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. a los 30, 45 y 60 días después de la inoculación de <i>Pseudomonas</i> spp....	52
<b>Tabla11.</b>	Índices de efectividad (%) de <i>Pseudomonas</i> spp. en el número de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L. a los 30, 45 y 60 días.....	53

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b>	Diseño completamente aleatorio para determinar el efecto de <i>Pseudomonas</i> spp. en <i>Asparagus officinalis</i> L. ....	14
<b>Figura 2.</b>	Ubicación de la provincia de Virú, región La Libertad, abril 2016 ( <a href="https://www.google.com.pe/maps/place/Vir%C3%BA/@-8.5664616,78.794859,10z/data=!4m5!3m4!1s0x91ac59407c7b0391:0x6c172095672753ce!8m2!3d-8.5528417!4d-78.6254767">https://www.google.com.pe/maps/place/Vir%C3%BA/@-8.5664616,78.794859,10z/data=!4m5!3m4!1s0x91ac59407c7b0391:0x6c172095672753ce!8m2!3d-8.5528417!4d-78.6254767</a> ).....	15
<b>Figura 3.</b>	Suspensión de raíces y suelo rizosférico de <i>Asparagus officinalis</i> L. en solución salina esterilizada.....	17
<b>Figura 4.</b>	Placas de Petri con agar Cetrimide para el aislamiento de <i>Pseudomonas</i> spp.....	18
<b>Figura 5.</b>	Siembra en agar Cetrimide mediante la técnica de agotamiento y estría.....	18
<b>Figura 6.</b>	Medios de cultivo para la identificación de <i>Pseudomonas</i> spp.....	20
<b>Figura 7.</b>	Prueba de oxidasa para la identificación de <i>Pseudomonas</i> spp.....	20
<b>Figura 8.</b>	Caldo extracto de suelo cultivado con <i>Pseudomonas</i> spp. ....	21
<b>Figura 9.</b>	Caldo National Botanical Research Institute's phosphate cultivado con <i>Pseudomonas</i> spp.. ....	23
<b>Figura 10.</b>	Caldo tripticasa soya suplementado con triptófano cultivado con <i>Pseudomonas</i> spp. ....	23
<b>Figura 11.</b>	Coronas de <i>Asparagus officinalis</i> L. ....	25
<b>Figura 12.</b>	Inóculo de <i>Pseudomonas</i> spp. solución salina esterilizada.....	27
<b>Figura 13.</b>	Medición de altura de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L. ....	27
<b>Figura 14.</b>	Conteo del número de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L. ....	28
<b>Figura 15.</b>	Colonias de bacterias desarrolladas en agar Cetrimide.....	31
<b>Figura 16.</b>	Cultivos puros de bacterias aisladas en agar Cetrimide.....	31



<b>Figura 17.</b>	Prueba de sensibilidad a la polimixina B.....	32
<b>Figura 18.</b>	Frecuencia de muestras de rizoplano y rizósfera de <i>Asparagus officinalis</i> L. positivas al aislamiento de <i>Pseudomonas</i> spp. ....	32
<b>Figura 19.</b>	Colonias de <i>Pseudomonas</i> spp. productoras y no productoras de flurosceína en agar King B.....	34
<b>Figura 20.</b>	Porcentaje de <i>Pseudomonas</i> spp. aisladas de <i>Asparagus officinalis</i> L. que fijaron nitrógeno <i>in vitro</i> .....	36
<b>Figura 21.</b>	Coloración observada en la cuantificación de amonio.....	36
<b>Figura 22.</b>	Porcentaje de <i>Pseudomonas</i> spp. aisladas de <i>Asparagus officinalis</i> L. que solubilizaron fosfato <i>in vitro</i> .....	40
<b>Figura 23.</b>	Coloración observada en la cuantificación de fósforo soluble.....	40
<b>Figura 24.</b>	Porcentaje de <i>Pseudomonas</i> spp. aisladas de <i>Asparagus officinalis</i> L. que produjeron indoles <i>in vitro</i> . ....	44
<b>Figura 25.</b>	Coloración observada en la cuantificación de indoles. ....	44
<b>Figura 26.</b>	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 30 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>P. putida</i> 33.8.....	50
<b>Figura 27.</b>	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 30 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico c) <i>P. putida</i> 61.4.....	50
<b>Figura 28.</b>	Altura (cm) de <i>Asparagus officinalis</i> L., 30 días después de la inoculación de <i>Pseudomonas</i> spp. ....	51
<b>Figura 29.</b>	Número de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L., 30 días después de la inoculación de <i>Pseudomonas</i> spp. ....	52
<b>Figura 30.</b>	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>P. fluorescens</i> 6.5.....	53

<b>Figura 31.</b>	Altura (cm) de <i>Asparagus officinalis</i> L., 45 días después de la inoculación de <i>Pseudomonas</i> spp. ....	54
<b>Figura 32.</b>	Número de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L., 45 días después de la inoculación de <i>Pseudomonas</i> spp. ....	54
<b>Figura 33.</b>	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 60 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>P. putida</i> 33.8.....	55
<b>Figura 34.</b>	Altura (cm) de <i>Asparagus officinalis</i> L., 60 días después de la inoculación de <i>Pseudomonas</i> spp. ....	55
<b>Figura 35.</b>	Número de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L., 60 días después de la inoculación de <i>Pseudomonas</i> spp. ....	57

## I. INTRODUCCIÓN

La agricultura es la base fundamental para la sostenibilidad de la seguridad alimentaria en el planeta; sin embargo, en la actualidad la población se incrementa notablemente, la demanda de alimento es mayor, requiriéndose acelerar el crecimiento vegetal para suplir las necesidades, disminuir los índices de hambre y desnutrición (Corrales et al., 2012). El uso de fertilizantes químicos junto a los plaguicidas forman parte de las prácticas, mayoritariamente utilizadas para incrementar el rendimiento de los cultivos agrícolas como *Asparagus officinalis* L. “espárrago” (Calderón, 2004). Los fertilizantes reponen los nutrientes removidos del suelo a través de la cosecha y contribuyen significativamente a la productividad (Pelletier et al., 2011); no obstante, la eficiencia de recuperación o porcentaje del nutriente aplicado que es absorbido por la planta es en promedio 50, 30 y 60% para el N, P y K respectivamente (SAGARPA, 2010), evidenciándose pérdidas significativas que contaminan el ambiente (Pedraza et al., 2010; Salhia, 2010; Aguado, 2012).

En la agricultura sostenible, no contaminante, requerida para los productos de exportación como el espárrago, los nutrientes pueden ser proporcionados por las denominadas rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas (Plant growth promoting rhizobacteria, PGPR), entre las que destacan especies de *Pseudomonas*. Estas bacterias fijan nitrógeno (Barba & Bravo, 2013), solubilizan fosfatos (León, 2014), producen ácido indolacético (Sánchez et al., 2014) y son consideradas entre las más eficaces para el control de fitopatógenos (Fan et al., 2016); no obstante, el uso de agroquímicos ha reducido considerablemente su población en el suelo (Rodríguez, 2013), requiriéndose aislarlas, caracterizarlas y propagarlas, con la perspectiva de reintroducirlas en los suelos agrícolas.

Las especies de *Pseudomonas* son fáciles de aislar y cultivar en sustratos de bajo costo así como también son eficientes colonizadoras de las plantas (Preston et al., 2001), por lo que son apropiadas para constituir biofertilizantes que pueden ser aplicados en las semillas o al suelo, con éxito en la sobrevivencia y establecimiento de las bacterias (Quinchía et al., 2006; Thomas & Sekhar, 2016). Los cultivos de espárrago tienen una diversidad de especies de *Pseudomonas* que no ha sido investigada para la promoción de crecimiento en plantas.

La presente investigación permitirá aislar e identificar especies de *Pseudomonas* propias de la región, con potencial para la biofertilización, generando valor agregado a la biodiversidad regional, a la vez que se disminuye el riesgo de la salud de los seres vivos y el efecto negativo de los insumos químicos en el ambiente. Por lo expuesto, se planteó el siguiente problema ¿Cuáles son las especies de *Pseudomonas* aisladas del rizoplasma y rizósfera de espárrago y cuál es su potencial como promotoras de crecimiento en plantas? El objetivo general fue: Identificar las especies *Pseudomonas* aisladas del rizoplasma y rizósfera de espárrago y determinar su potencial como promotoras de crecimiento en plantas.

Los objetivos específicos fueron: aislar e identificar fenotípicamente las especies de *Pseudomonas* del rizoplasma y rizósfera de plantas de espárrago, cuantificar el nitrógeno fijado, fósforo solubilizado e indoles producidos, seleccionar los seis cultivos de *Pseudomonas* spp. con los mayores valores en el nitrógeno fijado, fósforo solubilizado e indoles producidos y determinar el efecto de tres cultivos de *Pseudomonas* spp. en la altura y número de tallos de plantas de espárrago. La hipótesis planteada fue: Las especies de *Pseudomonas* aisladas del rizoplasma y rizósfera de espárrago, fijan nitrógeno, solubilizan fósforo, producen indoles e incrementan la altura y número de tallos de las plantas de espárrago.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Antecedentes de la investigación

Las especies de *Pseudomonas* se encuentran en raíces y rizósfera de diversos cultivos agrícolas, habiéndose reportado estudios de aislamiento y caracterización en *Zea mays* L. “maíz” (Becerra & Gil, 2009; Cadena & Martínez, 2011; Alvarado & Valderrama, 2014), *Phaseolus lunatus* L. “pallar” (Carreño, 2009), *Jatropha curcas* L. “piñón blanco” (Dávila & Linares, 2013), *Chenopodium quinoa* “quinua” (Ortuño et al., 2013), *Lycopersicon esculentum* Mill “tomate” (León, 2014), *Triticum aestivum* “trigo” y *Glycine max* “soya” (Marrero et al., 2015).

Estudios sobre la diversidad bacteriana del nicho rizosférico resaltan la influencia de la especie vegetal en la selección de ciertos microorganismos. Utilizando plantas “trampa” se investigó el efecto de los cultivos agrícolas sobre la estructura de las comunidades de *Pseudomonas*. Semillas de maíz desinfectadas superficialmente se sembraron en suelo prístino, bajo condiciones controladas de luz y temperatura. Después de 4 semanas la carga de *Pseudomonas* totales fue de  $6,2 \pm 0,3 \log_{10}$  UFC g<sup>-1</sup> de raíz fresca en trigo,  $5,4 \pm 0,3 \log_{10}$  UFC g<sup>-1</sup> en maíz y  $5,7 \pm 0,4 \log_{10}$  UFC g<sup>-1</sup> en soya. La densidad de *Pseudomonas* en el suelo sin raíces fue mucho mayor, alcanzando  $7,2 \pm 0,1 \log_{10}$  UFC g<sup>-1</sup>. La secuenciación parcial del gen 16S ARNr de aislados representativos confirmó la existencia de genotipos enriquecidos diferencialmente en el rizoplasma de cada especie vegetal (Marrero et al., 2015).

Los mecanismos directos a través de los cuales las especies de *Pseudomonas* promueven el crecimiento en plantas son fijación de nitrógeno (Orozco y Martínez, 2009; Cadena & Martínez, 2011; Barba & Bravo, 2013), producción de índoles (Karnwal, 2009 ;Criollo et al., 2012; Barba & Bravo, 2013;; León, 2014) y solubilización de fosfatos (Carreño, 2009; Beracochea, 2011;

Alvarado & Valderrama, 2014; Sánchez et al., 2014); no obstante, estas bacterias son reconocidas mayoritariamente por su efecto biocontrolador de fitopatógenos como *Ralstonia solanacearum* (Costa et al., 2006), *Fusarium oxysporum* (Trivedy et al., 2008) y *F. solani* (Fan et al., 2016).

En la literatura científica se encuentran reportes del efecto positivo de la inoculación de *Pseudomonas* spp., mencionándose incrementos en el poder germinativo (Barba & Bravo, 2013), emergencia (Cadena & Martínez, 2011), longitud promedio de las radículas (Beracochea, 2011), altura (Orozco y Martínez, 2009; Karakut & Aslantas, 2010; Adjanohoun et al., 2011), biomasa aérea (Egamberdiyeva, 2007; Aguado & Moreno, 2008), biomasa radical (Egamberdiyeva, 2007; Adjanohoun et al., 2011; Beracochea, 2011) y contenido de nitrógeno, fósforo y potasio de la biomasa aérea y radical (Egamberdiyeva, 2007).

Algunas especies del género *Pseudomonas* son consideradas PGPR y se ha demostrado incremento en el desarrollo vegetativo y rendimiento de cultivos agrícolas de importancia económica como *Solanum tuberosum* “papa” (Stechmann, 2011), maíz (Aguado & Moreno, 2008; Adjanohoun et al., 2011; Puicón, 2014), *Gossypium arboreum* L. “algodón” y *Phaseolus vulgaris* “frijol” (Ahmadzadeh & Tehrani, 2009), *Oryza sativa* “arroz” (Rives et al., 2009), tomate (Carreño, 2009; Sang et al., 2010), *Malus domestica* “manzana” (Karakut & Aslantas, 2010), piñón blanco (Dávila & Linares, 2013) y forestales como *Pinus patula* “pino” (Orozco & Martínez, 2009).

Los biofertilizantes constituyen una alternativa de bajo costo y no contaminante para los cultivos agrícolas. Se realizó una investigación para aislar especies de *Burkholderia* y *Pseudomonas* y determinar su potencial como promotores de crecimiento en plantas. Se colectaron muestras de suelo rizosférico de malezas, se diluyeron en solución salina, se tomaron alícuotas y se cultivaron en agar Mac Conkey a 30°C, por 48 horas, seleccionándose 70 colonias no fermentadores de lactosa, entre las que se identificó *Pseudomonas* y *Burkholderia* spp. A las bacterias se le determinó actividad

proteolítica y quitinolítica y se cuantificaron hasta 27,75 ppm de ácido indolacético; 15,85ppm de nitrógeno fijado como amonio y 14,33 ppm de fósforo solubilizado. El 8% de las bacterias investigadas fueron caracterizadas como promotoras de crecimiento en maíz, siendo identificadas como *P. fluorescens* SR39 y SR66, *P. putida* SR1 y *B. cepacia* SR58, SR27, SR48 (Barba & Bravo, 2013).

Especies de *Pseudomonas* se aislaron de la rizósfera de *Jatropha curcas* “piñón”, para determinar su potencial como promotores de crecimiento. Se colectaron muestras de suelo rizosférico y se sembraron en agar Mac Conkey, seleccionándose las colonias de bacterias no fermentadoras de lactosa. El género *Pseudomonas* se identificó con las pruebas de oxidasa, producción de pigmentos en agar King, utilización de citrato, descarboxilación de la lisina y sensibilidad a la polimixina. Se obtuvieron 92 aislados y se sembraron en caldos tripticasa soya, extracto de suelo y Sundara Rao y Sinha Medium para cuantificar indoles, nitrógeno fijado como amonio y fósforo solubilizado, respectivamente. Mediante métodos colorimétricos se cuantificaron 1,75-34,5 ppm de indoles totales; 1,17-24,74 ppm de amonio y 0,20-11,93 ppm de fósforo solubilizado, demostrándose el potencial de estas bacterias para ser utilizadas como fertilizantes en el piñón blanco (Dávila & Linares, 2013).

El fósforo es un nutriente inorgánico esencial para los vegetales; sin embargo, su disponibilidad para las plantas es limitada. Se realizó un ensayo para caracterizar bacterias solubilizadoras de fosfato en maíz, tomate y pallar. Se colectaron muestras de suelo rizosférico y las bacterias se aislaron en agar Sundara Rao y Sinha Medium ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 5,6\text{gL}^{-1}$ ). La eficacia de solubilización *in vitro* se determinó en biorreactores con sistema discontinuo y aireación (0,8 vvm), 1% de inóculo ( $10^8$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ), a 28C°, por 5 días. Se obtuvieron 323 aislados de bacterias, cuyos halos de solubilización oscilaron entre 1 y 11mm y el 79% mantuvo su capacidad solubilizadora después de dos subcultivos. Los mayores valores en la eficacia de solubilización correspondieron a *Micrococcus* sp.1 (21,63%), *Pseudomonas* sp.13 (21, 07%) y *Pseudomonas*

sp.6 (18,74%). Estas bacterias solubilizadoras de fosfato tienen potencial para ser utilizadas en la fertilización de cultivos agrícolas (Carreño, 2009).

Bacterias de los géneros *Burkholderia* y *Pseudomonas* son eficientes solubilizadoras de fosfatos minerales. Se realizó un ensayo para determinar las características de estas bacterias en maíz. Se colectaron 150 muestras de suelo rizosférico, se diluyeron en solución salina esterilizada y alícuotas se sembraron en agar Sundara Rao y Sinha Medium (SRSM) y agar National Botanical Research Institute's phosphate (NBRIP) con 1g PL<sup>-1</sup>. Las bacterias solubilizadoras de fosfato se reconocieron por las zonas transparentes formadas alrededor de las colonias, determinándose el índice de solubilización en fosfato dicálcico, tricálcico y roca fosfórica de Bayóvar y el fósforo soluble en caldo NBRIP. Se aisló e identificó *P. aeruginosa* (56,7%), *P. fluorescens* (13,3%), *P. stutzeri* (13,3%), *P. putida* (10%) y *B. cepacia* (6,7%). Los índices de solubilización de fosfato en medio sólido fueron 2,0-3,5 con fosfato de dicálcico y 1,1-3,5 con fosfato tricálcico. El fosfato soluble en medio líquido fue 1,89-7,72 ppm. Se demostró el potencial de *Burkholderia* y *Pseudomonas* como solubilizadoras de fosfatos (Alvarado & Valderrama, 2014).

La reducción de la productividad en las zonas agrícolas orienta la investigación hacia la tecnología de menor costo económico y ambiental. El efecto de *Pseudomonas* spp. solubilizadoras de fosfato se determinó en *Lactuca sativa* "lechuga" cultivar White Boston. La fuente de fósforo fue roca fosfórica con 30% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 40% Ca, 12% Si, 0,1% Mg, 40 ppm Mn, 30 ppm Cu, 10 ppm Mo, 300 ppm Zn y 3% de humedad. Se investigó la solubilización de roca fosfórica en caldo SRSM durante 5 días a 30 ± 2°C, a 150rpm; la síntesis de sideróforos en agar CAS durante 5 días a 30 ± 2°C y la producción de índoles totales en medio K-lactato por 72 horas a 150 rpm. Con las bacterias se alcanzó hasta 26,57 ppm de fósforo soluble; 7,08µg mL<sup>-1</sup> índoles totales y se detectó la producción de sideróforos evidenciada por halos de hasta 2,52 mm. *Pseudomonas* spp.FR2 y UVL027, productoras de índoles incrementaron significativamente la biomasa de lechuga, demostrando que estas bacterias solubilizadoras de roca fosfórica son



una alternativa económica y ecológica viable en sistemas de agricultura sostenible (Sánchez et al., 2014).

Las especies de *Pseudomonas* predominan entre las bacterias habitantes de la rizosfera de diversos cultivos agrícolas y son frecuentemente caracterizadas como agentes de biocontrol. Se investigó la diversidad y potencial antagonico de *Pseudomonas* spp. asociadas a la rizósfera de maíz cultivado en sistema de producción orgánica. El muestreo de suelo rizosférico se realizó a los 20, 40 y 106 días después de la siembra. Las bacterias se aislaron agar King B, a 21°C, por 48 horas y se les investigó la actividad antagonista y producción de enzimas líticas. Se obtuvieron 142 aislados entre los que el 28% presentó actividad antagonista frente a *Ralstonia solanacearum* biovar 2. Se observaron halos de hasta 7 mm y se detectó producción de proteasas, gluconasas y sideróforos. Se identificaron *P. putida*, *P. fluorescens* y *P. chlororaphis*. Se demostró el potencial de *Pseudomonas* spp. para el control de bacterias fitopatógenas (Costa et al., 2006).

La promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de patógenos para los cultivos agrícolas de importancia económica como el arroz, constituyen uno de los grandes retos de la agricultura. En ese sentido, se investigó la actividad promotora de crecimiento vegetal y el efecto antagonico de *Pseudomonas putida* aislada previamente de arroz frente al fitopatógeno *Pyricularia grisea*. En laboratorio se detectó la producción de ácido 3-indolacético (45,8-56,0 ppm) y sideróforos (7,3-39,4 µM), así como también se observó el efecto antagonico (82-86%) frente al fitopatógeno *Py. grisea*. Las bacterias cultivadas por 24 horas (108 cel mL<sup>-1</sup>) se inocularon en semillas de arroz depositadas en medio Murashife y Skoog (MS) y después de 12 días se determinó en las plántulas inoculadas incremento en la altura (5 cm), biomasa aérea (0.03 g), radicular (0.023 g) y longitud de la raíz (7 cm), en comparación con los testigo 3 cm; 0,023 g; 0,0025 g y 4,8 cm respectivamente. Se demostró el potencial de *Ps. putida* como fertilizante para el cultivo de arroz (Rives et al., 2009).

## 2.2 Base teórica

La agricultura orgánica propone para el crecimiento y desarrollo de los cultivos la utilización de opciones tecnológicas como las bacterias promotoras de crecimiento en plantas para producir alimentos sanos, proteger la calidad del ambiente y la salud humana e intensificar las interacciones biológicas y los procesos naturales beneficiosos. Se comparten los principios de la agricultura natural, ecológica, biodinámica y biológica, promoviendo la sustentabilidad de los sistemas agrícolas desde el punto de vista productivo, ecológico, económico y social (Dávila, 2004).

Kloepper & Schroth (1978), mencionados por Bhattacharyya & Jha (2012), propusieron el término rizobacterias para las bacterias del suelo que competitivamente colonizaban las raíces, estimulaban el crecimiento de las plantas y a la vez reducían la incidencia de las enfermedades. En 1981, estos mismos investigadores denominaron a estas bacterias promotoras de crecimiento en plantas (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR). En la actualidad, este concepto se usa para las bacterias que cumplen con dos de los tres criterios establecidos, como son colonización agresiva, estimulación del crecimiento vegetal y biocontrol.

Las PGPR benefician a los cultivos agrícolas a través de mecanismos directos e indirectos. Los mecanismos directos incluyen la síntesis de reguladores del crecimiento (auxinas, giberelinas, citoquininas), solubilización de fosfatos minerales, fijación de nitrógeno atmosférico, producción de sideróforos y estimulación del sistema de absorción de iones como los nitratos. Entre los mecanismos indirectos o de biocontrol se encuentran la competencia por un nicho ecológico o por nutrientes, la interacción directa con los patógenos (parasitismo y lisis enzimática), antibiosis, producción de sideróforos e inducción de resistencia sistémica a la planta (Delgado et al., 2003, Hernández et al., 2006; Bhattacharyya & Jha, 2012).

Bacterias como *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter* y *Azotobacter* promueven el crecimiento de plantas, mayoritariamente a través de mecanismos

directos, así como *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Streptomyces* lo hacen a través de mecanismos indirectos; no obstante, todas las PGPR presentan un mayor o menor grado de efectividad en ambos mecanismos (Doubou et al., 2002; Kloepper, 2003; Guillén et al., 2006; Idriss et al., 2007; Franco, 2008; Karnwal, 2009; Martínez et al., 2010; Salaheddin et al., 2010). El efecto de las PGPR también se atribuye a la denominada “hipótesis aditiva”, según la cual más de un mecanismo están involucrados en la asociación planta-rizobacteria, los mismos que operan simultáneamente o en asociación. La suma de los diferentes mecanismos refleja los cambios observados en el crecimiento de las plantas, cuando son cultivadas bajo condiciones ambientales propicias (Bashan et al., 1996).

Bacterias del género *Pseudomonas* ejercen un efecto benéfico directo, a través de la síntesis de fitohormonas y vitaminas, estimulación de la germinación de semillas y emergencia de plántulas, inhibición de la síntesis de etileno y solubilización de fosfatos inorgánicos. De manera indirecta, estas bacterias actúan como agentes de control biológicos o biocontroladores mediante la síntesis de antibióticos y fungicidas, competencia por nutrientes, producción de sideróforos o por inducción de resistencia sistémica a patógenos (Cano, 2011).

### **2.2.1 *Asparagus officinalis* L. “espárrago”**

El espárrago es originario de la región oriental del Mediterráneo y Asia menor y crece en climas templados y subtropicales, siendo la única especie de su género cultivada como hortaliza. La planta de espárrago presenta una porción subterránea conocida como araña que consiste en un rizoma expandido lateralmente y poco profundo que posee yemas en su extremo apical, raíces carnosas de almacenamiento y raíces laterales de absorción. El crecimiento de la araña ocurre cuando las yemas periféricas originan nuevos grupos de gemación para la próxima generación de la planta (Asprelli et al., 2005).

El cultivo de espárrago se inicia mediante la multiplicación de semilla en almácigo o semillero. La semilla debe ser certificada, utilizándose mayoritariamente la UC157, UC72, Mary Washington y Argenticel. La cantidad

de semilla es de 5-8 kg ha<sup>-1</sup>, estimándose que por cada kilogramo sembrado en almácigo se obtienen arañas para trasplantar 1 hectárea. El tiempo de germinación es 4-6 semanas y para acelerar el proceso se recomienda remojar la semilla durante 4-5 días antes de la siembra. Los almácigos se siembran en surcos, con una separación de 0,70m, tal que las plantas estén distanciadas 15-20 cm entre sí. La duración del almácigo es de 2-6 meses, calculándose un peso promedio de 40-60g araña<sup>-1</sup> (Calderón, 2004).

En la costa peruana, después de 2-6 meses las plantas del almácigo de espárrago híbrido UC157 se trasplantan, con una densidad de 15 000-30 000 plantas ha<sup>-1</sup>. Después del trasplante de coronas o plantones, transcurren 12 meses de crecimiento y desarrollo, el 13avo mes se obtiene la primera cosecha (15-30 días) y en promedio después de 4-5 meses la segunda (30 días), tercera (45-60 días), cuarta (30 días) y quinta (60 días) cosecha (Calderón, 2004). El ciclo vital de las plantas de espárrago verde se divide en cuatro fases: de crecimiento temprano, los primeros 2 años desde la plantación, caracterizados por un fuerte desarrollo vegetativo; de productividad creciente (3°-4° año) que corresponde a los 2 primeros años de cosecha; de productividad estable (4°-10° año) y finalmente la de productividad decreciente (más de 10 años) (Kirschenbilder et al., 2015). El aumento de temperatura propicia la emergencia de brotes jóvenes llamados turiones a partir del rizoma. Después de la cosecha, los turiones se desarrollan y forman el follaje o helecho (Asprelli et al., 2005).

El espárrago es un cultivo perenne, requiriendo de un suelo bien preparado antes de la siembra o del trasplante. Los suelos más apropiados son franco arenosos, franco limosos, con materia orgánica y un pH de 7,0-7,6 e inclusive hasta 6,5. Se adapta a precipitaciones de 1200mm año<sup>-1</sup>, con una temperatura promedio de 25-28°C. El cultivo requiere 3-4 meses para completar el ciclo vegetativo con 2 200m<sup>3</sup> de agua con riego por goteo por hectárea. Este sistema es el más eficiente y con el que se alcanza el mayor rendimiento. La fertilización está orientada a suplir parte de los nutrientes que el cultivo extrae del suelo y

salen de la planta al cosecharse los turiones. El nitrógeno es el más importante de los elementos, con una relación directa entre la disponibilidad, el crecimiento y rendimiento del espárrago. El fertilizante se aplica el momento de la siembra dentro y sobre el surco y durante la vida de la plantación se utiliza el “fertirriego” o aplicación del fertilizante a través del sistema de riego (Calderón, 2004).

Las enfermedades causadas por hongos más comunes en el cultivo de espárrago son Fusariosis (*Fusarium* spp.), mancha púrpura (*Stemphylium vesicarium*), tizón (*Cercospora asparagi*), roya (*Puccinia asparagi*), pudrición gris (*Botrytis cinerea*), mancha foliar (*Phoma asparagi*) y pudrición de la corona (*Phytophthora megasperma*). La fusariosis, marchitez, pudrición de raíces o pudrición de la corona del espárrago es causada por diferentes especies de *Fusarium*. El hongo infecta la corona y éste puede llegar a matar las plantas. En las raíces se observa decoloración del cilindro central. Las coronas se necrosan y decoloran en la parte interna de las yemas. En tallo se produce una pudrición que se inicia en la parte basal del tallo y se prolonga hacia la parte superior del tallo. En grados avanzados de la enfermedad la corona se pudre totalmente y la planta muere (Calderón, 2004; Borrego, 2014).

La producción de espárrago está determinada por el manejo técnico en el campo: un buen terreno, semilla resistente a enfermedades, sistema de riego óptimo, buen drenaje, adecuada fertilización y fumigaciones para el control de insectos plaga y fitopatógenos. La vida productiva del cultivo en forma comercial es de 8-10 años, periodo que puede ser mayor, pero el rendimiento decae y la plantación debe ser eliminada, porque no justifica su valor comercial. Uno de los principales cultivares de espárrago sembrado es el UF-157F1, el cual junto con el F2 y otros derivados ocupan mayoritariamente la superficie de suelo cultivado (Calderón, 2004; Delgado, 2007).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Materiales**

##### **3.1.1 Material biológico**

El material biológico estuvo constituido por raíces con suelo rizosférico adherido de espárrago, cultivos puros de *Pseudomonas* spp. y coronas de espárrago cultivar UC-157 F2.

##### **3.1.2 Población y muestra**

En la investigación descriptiva la población estuvo constituida por las plantas de espárrago del fundo Josymar (50ha) en Virú, Trujillo y se investigó una muestra no probabilística de 96 plantas colectadas durante abril de 2016. El número de muestras fue calculado, tomando en cuenta una prevalencia de 90% (Vásquez et al., 2012), determinada en un estudio piloto por los investigadores (Anexo 1). En la investigación explicativa la población fueron las bacterias del género *Pseudomonas* aisladas e identificadas en el rizoplaneo y rizósfera de espárrago durante abril de 2016 y la muestra no probabilística y por conveniencia estuvo constituida por seis cultivos de *Pseudomonas* spp. seleccionados.

#### **3.2 Métodos**

##### **3.2.1 Variable de la fase descriptiva**

Variable cuantitativa: Potencial como promotoras de crecimiento en plantas (nitrógeno fijado, fosfato solubilizado, indoles producidos).

##### **3.2.2 Variables de la fase explicativa**

Variable independiente: Cultivos (6) de *Pseudomonas* spp.

Variable dependiente: Desarrollo vegetativo de plantas de espárrago (altura y número de tallos).

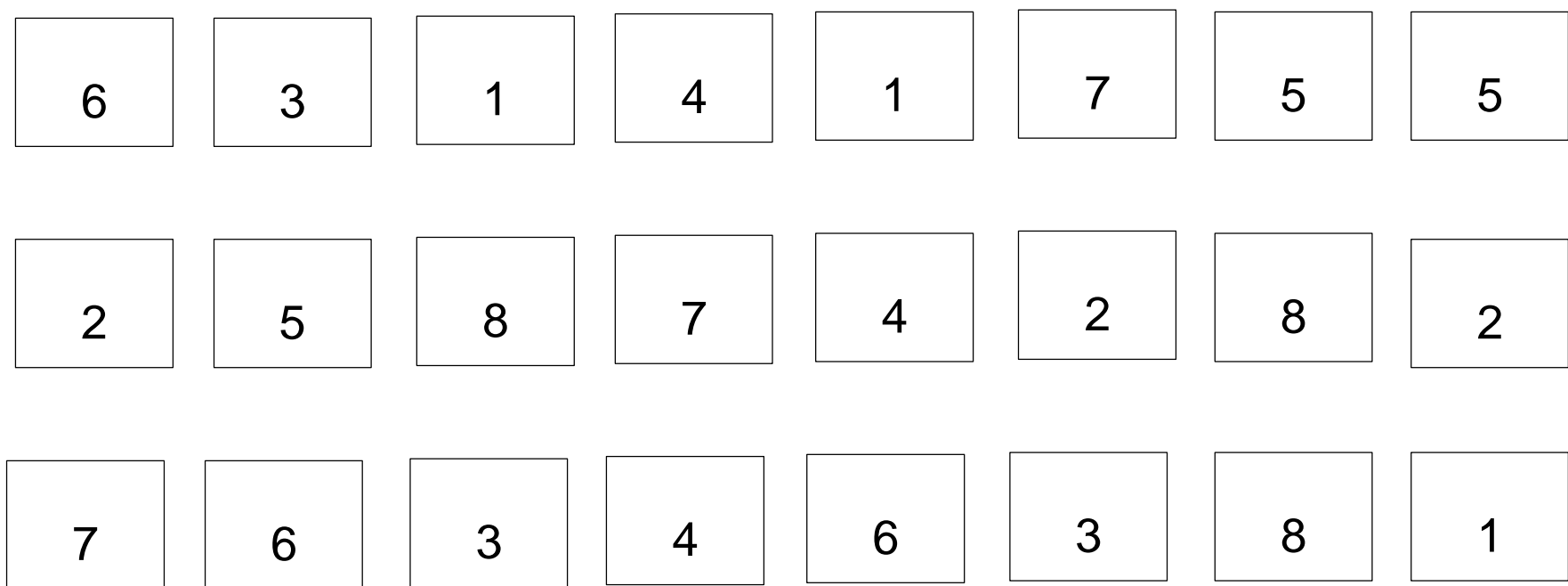
### 3.2.3 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

La investigación se realizó en dos fases. La primera fase descriptiva correspondió al aislamiento e identificación de *Pseudomonas* spp., cuantificación del nitrógeno, fosfato solubilizado e indoles producidos. En la segunda fase explicativa se determinó el efecto de seis cultivos de *Pseudomonas* spp. en la altura y número de tallos de plantas de espárrago, durante 60 días, en invernadero.

La hipótesis en la primera fase se contrastó con el diseño no experimental de “Sólo Después” (Vásquez et al., 2012) y en la segunda fase con el diseño experimental completamente aleatorio, DCA (Hernández et al., 2014). Los tratamientos fueron diez correspondientes a T1: Testigo absoluto (agua destilada), T2: Testigo químico (urea 46% N), T3 a T8 *Pseudomonas* spp. En cada tratamiento se consideraron tres repeticiones, totalizando 24 unidades experimentales (Figura 1).

### 3.2.4 Lugar de muestreo

Las 96 muestras de raíces con suelo rizósferico de espárrago se colectaron en el fundo Josymar, ubicado en el lote 10,6 del sector IV, Proyecto Especial Chavimochic, en la provincia Virú, región La Libertad (Figura 2, tabla 1). Virú tiene una superficie de 3218,74 km<sup>2</sup> y limita por el norte con la provincia de Trujillo, por el este con las provincias de Julcán y Santiago de Chuco, por el sur con la región Ancash y por el oeste con el Océano Pacífico (Municipalidad Distrital de Guadalupito, 2016). El fundo Josymar tiene 50 ha, distribuidas en 24 lotes de aproximadamente 1,5 ha cada uno. Al momento del muestreo 19 lotes estaban sembrados con espárrago cultivar UC-157 F2 (cuatro plantas por metro lineal), con 1,8-2,5 años transcurridos después del transplante de coronas y una población promedio de 30 000 plantas ha<sup>-1</sup>.



T1: Testigo absoluto

T2: Testigo químico

T3 – T8: *Pseudomonas* spp.

**Figura 1.** Diseño completamente aleatorio para determinar el efecto de *Pseudomonas* spp. en *Asparagus officinalis* L.





**Figura 2.** Ubicación de la provincia de Virú, región La Libertad, abril, 2016  
<https://www.google.com.pe/maps/place/Vir%C3%BA/@-8.5664616,-78.794859,10z/data=!4m5!3m4!1s0x91ac59407c7b0391:0x6c172095672753ce!8m2!3d-8.5528417!4d-78.6254767>).

**Tabla 1.** Lote de procedencia de muestras de raíces con suelo rizósferico de *Asparagus officinalis* en el Fundo Josymar, Virú, La Libertad

Lote	Nº de surcos	Nº de muestras
A1-B1-C1	54	15 (1-15)
A2-B2-C3	61	15 (16-30)
A3-B3-C3	62	15 (31-45)
A4-B4-C4	63	15 (46-60)
C5	56	5 (61-65)
A6-B6-C6	64	15 (66-88)
C7	49	5 (81-85)
C8	55	6 (86-91)
C9	51	5 (92-96)
Total: 19 lotes	515	96

### 3.2.5 Obtención de muestras

En el campo de cultivo de espárrago, cada cinco surcos se seleccionó la planta más vigorosa y se extrajeron aproximadamente 50 g de raíces con suelo adherido, se depositaron en bolsas de polietileno debidamente identificadas e inmediatamente se transportaron en una caja térmica ( $10 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) hacia el Laboratorio de Microbiología y Parasitología, sección Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo en Lambayeque.

En simultáneo al muestreo de raíces con suelo rizosférico de espárrago para el aislamiento de *Pseudomonas* spp., se colectó una muestra representativa de 1kg de suelo para realizar el análisis físico-químico en el Instituto Nacional de Innovación y Extensión Agraria, Estación Experimental Vista Florida de Chiclayo. Según los resultados (Tabla 2), el suelo es ligeramente ácido (pH 6,5) y ligeramente salino (CE  $3,06 \text{ dSm}^{-1}$ ), con textura arenosa, niveles bajos de materia orgánica (0,23%), nitrógeno (0,103ppm), fósforo disponible (6,0ppm) y potasio (203,0ppm).

### 3.2.6 Aislamiento e identificación fenotípica de *Pseudomonas* spp.

Las bacterias del género *Pseudomonas* se aislaron en agar Cetrimide (Guerra et al., 2011). Las muestras de raíces y suelo rizosférico se deshidrataron bajo sombra durante 72 horas, las raíces se fragmentaron (5cm), aleatoriamente se tomaron 10g de raíces junto con suelo adherido, se depositaron en frascos de 250mL de capacidad conteniendo 90mL (Figura 3) de solución salina esterilizada, NaCl 0,85%, p/v (dilución  $10^{-1}$ ) y se agitaron manualmente durante 10 minutos.

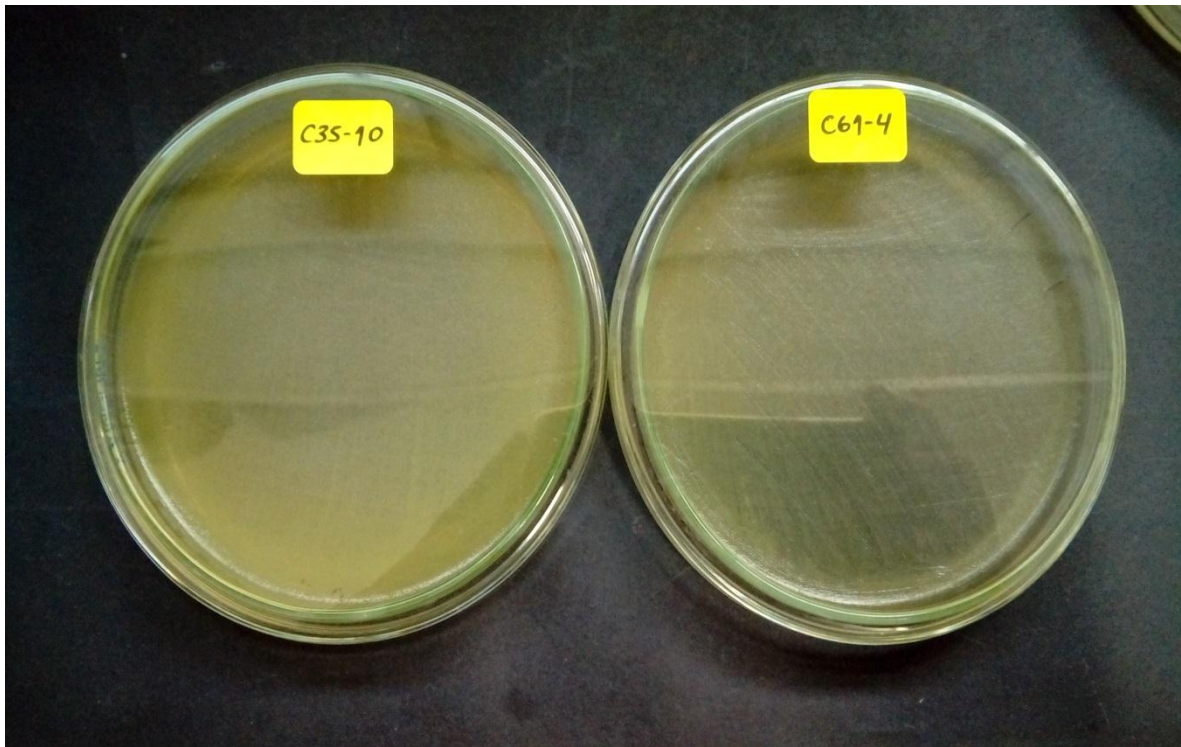
Para el aislamiento de bacterias en agar Cetrimide (Guerra et al., 2011), se tomaron alícuotas de la dilución  $10^{-1}$ , se sembraron mediante la técnica de agotamiento y estría en agar Cetrimide (Figuras 4,5, anexo 2) y se incubaron en aerobiosis a  $30^{\circ}\text{C}$ , durante 48 horas, seleccionándose las colonias pigmentadas y no pigmentadas.

**Tabla 2.** Análisis físico-químico de suelo rizosférico de *Asparagus officinalis* L. en Virú, La Libertad, 2016

Clase		CE	MO	N	P	K
Textual	pH	(dSm <sup>-1</sup> )	(%)	(%)	(ppm)	(ppm)
Arenosa	6,5	3,06	0.23	0,103	6,0	203,0



**Figura 3.** Suspensión de raíces y suelo rizosférico de *Asparagus officinalis* L. en solución salina esterilizada.



**Figura 4.** Placas de Petri con agar Cetrímide para el aislamiento de *Pseudomonas* spp.



**Figura 5.** Siembra en agar Cetrímide mediante la técnica de agotamiento y estría.



La identificación fenotípica del género y especies de *Pseudomonas* (Holt et al., 1994; Alvarado & Valderrama, 2014), se realizó mediante la tinción de Gram y las pruebas de catalasa, oxidasa, fermentación de carbohidratos en agar hierro-triple azúcar, susceptibilidad a la polimixina-B (300UI), producción del pigmento fluorescente en agar King B, crecimiento a 42°C, utilización del citrato como fuente de carbono, descarboxilación de la lisina, reducción de nitratos e hidrólisis del almidón y gelatina (Figuras 6, 7).

### **3.2.7 Mantenimiento de cultivos de *Pseudomonas* spp.**

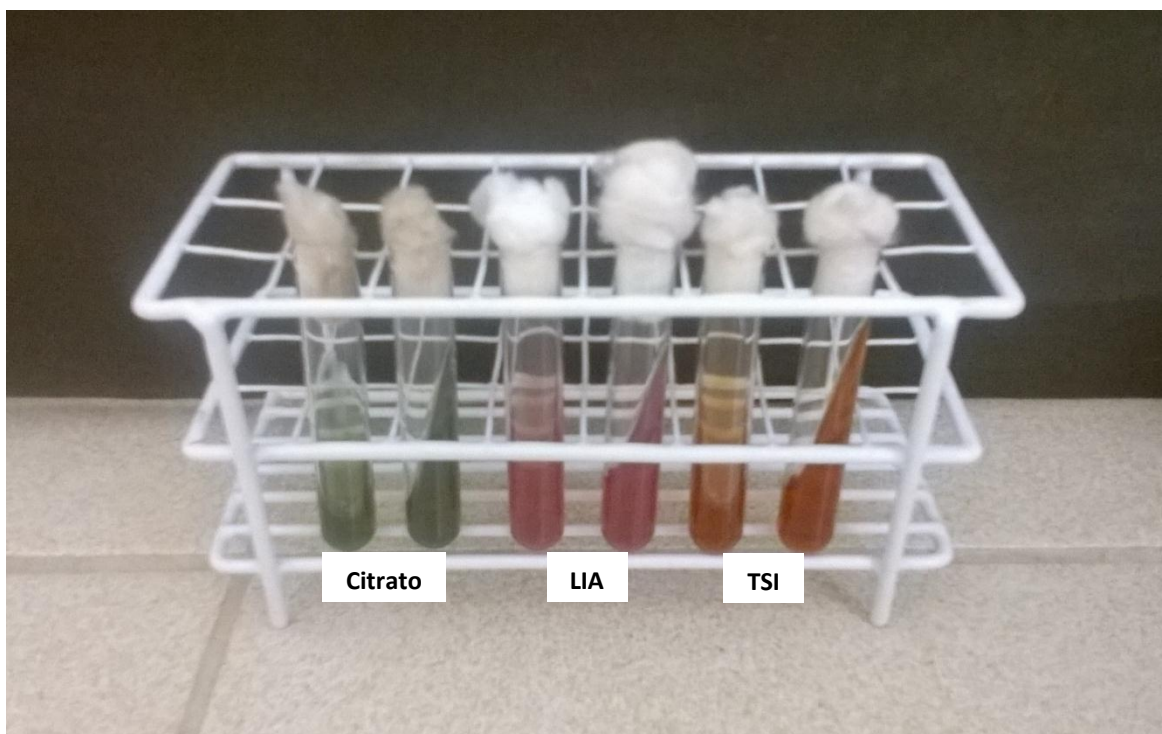
Los cultivos puros de *Pseudomonas* spp. identificados se sembraron en agar tripticasa soya (TSA) durante 24 horas y se mantuvieron en refrigeración (8°C), realizándose subcultivos cada 30 días.

### **3.2.8 Cuantificación de nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos**

Con las bacterias del género *Pseudomonas* aisladas e identificadas se cuantificó el amonio, producto de la fijación de nitrógeno, el fósforo soluble producto de la solubilización de fosfatos y los indoles producidos. Para la obtención del inóculo, cada bacteria se cultivó en 5mL de caldo nutritivo a 30°C, durante 24 horas (Córdova, 2016). Posteriormente, el caldo se centrifugó (3500rpm) durante 5 minutos, el sobrenadante se eliminó, el sedimento se lavó con solución salina esterilizada (NaCl 0,85% p/v) y su concentración se estandarizó a  $9 \times 10^8$  cel mL<sup>-1</sup> por turbidimetría (tubo 3 del nefelómetro de Mc Farland) y con el espectrofotómetro de luz visible a 540nm: absorbancia = 0,20, equivalente a  $10^8$  células mL<sup>-1</sup> (Rodríguez, 2013).

#### **a. Cuantificación de nitrógeno fijado *in vitro***

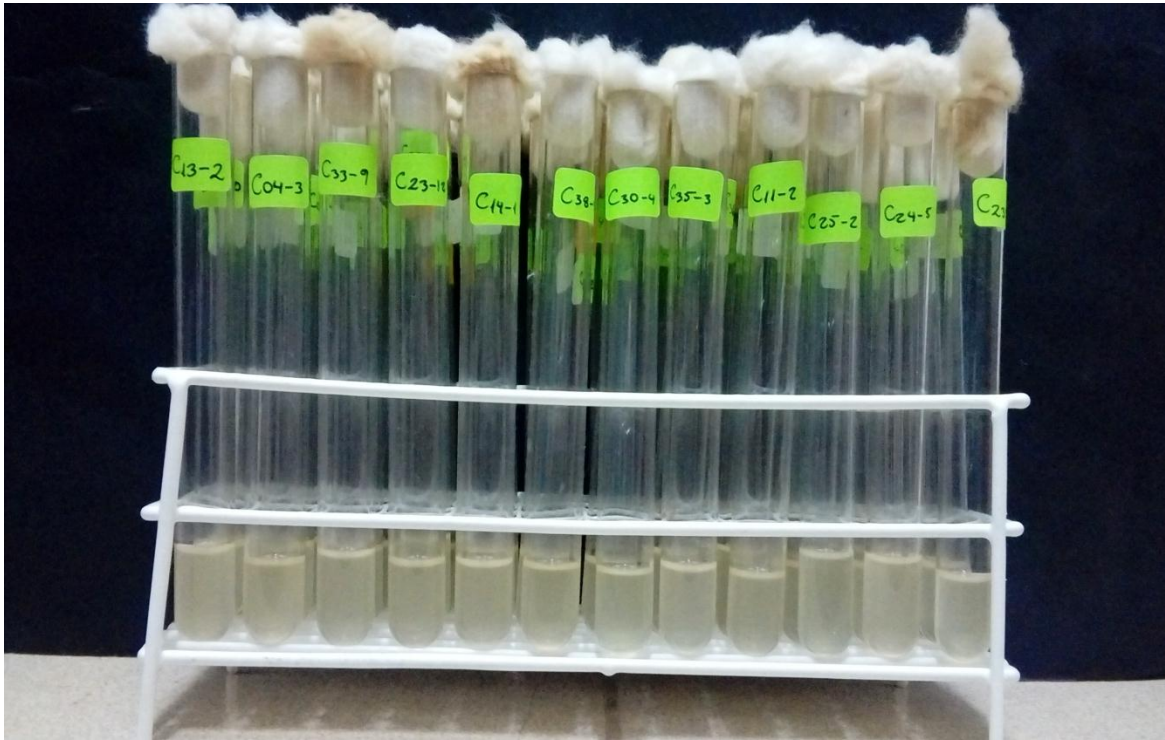
La cuantificación del nitrógeno fijado *in vitro* por las bacterias investigadas se realizó con el método colorimétrico de Berthelot o fenol hipoclorito (Lara et al., 2007; Cadena & Martínez, 2011). El inóculo (5%:0,15mL) de cada cultivo bacteriano fue sembrado por triplicado en tubos de 15x150mL conteniendo 3mL de caldo extracto de suelo 10% (Figura 8, anexo 3) y se incubaron a 30°C, por 72 horas, con agitación constante (150rpm). A continuación, se agregaron 9mL de KCl 2M, se agitaron a 150rpm durante 1 hora y se dejaron en reposo 1 hora adicional, para después tomar 10mL de sobrenadante y centrifugarlos (3000rpm) durante 5 minutos.



**Figura 6.** Medios de cultivo para la identificación de *Pseudomonas* spp.



**Figura 7.** Prueba de oxidasa para la identificación de *Pseudomonas* spp.



**Figura 8.** Caldo extracto de suelo cultivado con *Pseudomonas* spp.

Los sobrenadantes se vertieron en tubos de dilución y se añadieron 0,4mL de solución alcohólica de fenol al 10%; 0,4mL de nitroprusiato de sodio al 0,5% y 1mL de solución oxidante. Los tubos se agitaron manualmente por 2 minutos y se dejaron en reposo durante 1 hora adicional. La reacción se consideró positiva a la fijación de nitrógeno por la aparición de una coloración azul, leyéndose la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible a 632,9nm. Las concentraciones de amonio se calcularon con la ecuación de la curva de calibración, obtenida previamente con diluciones sucesivas de una solución de 100ppm de cloruro de amonio (Anexo 3).

#### **b. Cuantificación de fosfato solubilizado *in vitro***

La cuantificación de fosfato solubilizado *in vitro* por las bacterias investigadas se realizó con el método colorimétrico del molibdato (Alvarado & Valderrama, 2014). El inóculo (5%: 0,25mL) de cada cultivo bacteriano se sembró por triplicado en 5mL de caldo National Botanical Research Institute's phosphate, NBRIP (Figura 9, anexo 4) y se incubaron a 30°C, con agitación (150rpm), por 96 horas. Después, los caldos fueron centrifugados a 3000rpm por 5 minutos y en el sobrenadante se cuantificó el fósforo soluble (Rodier & Rodi, 2005), considerándose una coloración azul positiva a la solubilización del fosfato. La absorbancia se leyó en espectrofotómetro de luz visible a 690nm y las concentraciones de fósforo soluble se calcularon con la ecuación de la curva de calibración, obtenida previamente con diluciones sucesivas de una solución de 10ppm de fósforo (Anexo 4).

#### **c. Cuantificación de indoles producidos *in vitro***

La cuantificación de indoles producidos *in vitro* se realizó según la reacción colorimétrica de Salkowski (Mantilla, 2007; García & Muñoz, 2010). El inóculo (5%:0,25mL) de cada cultivo bacteriano fue sembrado por triplicado en 5mL de caldo tripticasa soya suplementado con triptófano (Figura 10, anexo 5). Después de la incubación a 30°C, por 72 horas, en agitación constante (150rpm), los cultivos se centrifugaron a 3000rpm, durante 5 minutos. A continuación, 0,4mL de cada sobrenadante se depositaron en tubos, se agregaron 1,6mL de reactivo de Salkowski modificado, se mezclaron y se dejaron en reposo durante 30 minutos en oscuridad.





**Figura 9.** Caldo National Botanical Research Institute's phosphate cultivado con *Pseudomonas* spp.



**Figura 10.** Caldo tripticasa soya suplementado con triptofano cultivado con *Pseudomonas* spp.

La reacción se consideró positiva a la producción de indoles por la aparición de una coloración grosella, leyéndose la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible a 530nm. Las concentraciones de indoles se calcularon con la ecuación de la curva de calibración obtenida previamente con diluciones sucesivas de una solución de 100ppm de ácido indolacético (Anexo 5).

### **3.2.9 Selección de *Pseudomonas* spp.**

Los cultivos de *Pseudomonas* spp. seleccionados para la fase experimental de la investigación fueron seis, correspondientes a los valores máximos en la concentración de amonio (dos cultivos), fósforo soluble (dos cultivos) e indoles producidos (dos cultivos).

### **3.2.10 Efecto de *Pseudomonas* spp. en plantas de espárrago**

Los seis cultivos de *Pseudomonas* spp. seleccionados se inocularon en coronas de espárrago (Figura 11), determinándose, durante 60 días el efecto en el desarrollo vegetativo de las plantas, en condiciones de invernadero. El suelo experimental estuvo constituido por 96 kg de una mezcla de suelo agrícola, arena de río y humus en la proporción 2:1:1, que fue distribuido en macetas de arcilla de 7 kg de capacidad, a razón de 4 kg por maceta. El cultivo de espárrago y la inoculación de *Pseudomonas* spp. se realizó entre el 12 de diciembre al 10 de febrero de 2017, registrándose las temperaturas máxima (29°C), mínima (23°C) y media (26°C), valores obtenidos por la Estación Meteorológica de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, ubicado en el fundo “El Cienago” de Lambayeque (Anexo 6).

En el ensayo se sembraron coronas de espárrago cultivar UC-157 F2, con un peso de 60 g (Regalado, 1999) luego de ser tratadas por inmersión durante 5 minutos, en una solución del fungicida Benomyl polvo mojable-WP (Benlate), en la dosis de 2gL<sup>-1</sup> de agua declorada previamente durante 24 horas. El cultivar UC-157 fue obtenido en 1980 en Estados Unidos (Farías et al., 2004). Es específico para la producción de turiones verdes. Se comercializan los híbridos F1 y F2 y son los más precoces y productivos del mercado (Delgado, 2007).



**Figura 11.** Coronas de *Asparagus officinalis* L.

El inóculo fue obtenido con *Pseudomonas* spp. cultivadas en caldo nutritivo, a 30°C, durante 24 horas y después de la centrifugación se obtuvieron 500mL (Figura 12) de cada cultivo bacteriano en solución salina esterilizada, NaCl 0,85% p/v (Córdova, 2016), cuya concentración se estandarizó a  $9 \times 10^8$  cel mL<sup>-1</sup> por turbidimetría (tubo 3 del nefelómetro de Mc Farland). Transcurridos 30 minutos del tratamiento con fungicida, las coronas de espárrago se asperjaron con el inóculo bacteriano (100 mL por corona), con ayuda de un pulverizador de plástico de 500 mL de capacidad. Después de 30 minutos de reposo a temperatura ambiental (25°C), se sembraron en el suelo experimental, a razón de una corona por maceta.

Los riegos se realizaron cada 3 días con agua potable declorada, tomando en cuenta los requerimientos hídricos de las plantas. Después de 15 días de la siembra, en el testigo químico se aplicaron 250 mL de una solución de fertilizante nitrogenado (Urea 46%), en la dosis de 5g L<sup>-1</sup> de agua, cada 30 días. Transcurridos 30, 45 y 60 días después de la siembra, se midió la altura de las plantas (Figura 13) y se contaron los tallos (Figura 14). La altura se expresó en cm, considerando desde la base del tallo más alto hasta la yema terminal (Puicón, 2014). Con los valores de altura y número de tallos se calculó el índice de efectividad de la inoculación (IEI) en porcentaje, mediante la fórmula (Carreño, 2009) siguiente:

$$IEI (\%) = \frac{\text{Tratamiento con inoculación} - \text{Control sin inoculación}}{\text{Control sin inoculación}} \times 100$$





**Figura 12.** Inóculo de *Pseudomonas* spp. solución salina esterilizada.



**Figura 13.** Medición de altura de tallo de *Asparagus officinalis* L.



**Figura 14.** Conteo del número de tallos de *Asparagus officinalis*

### 3.2.11 Análisis estadístico de los datos

Para el diseño experimental completamente aleatorio, el modelo aditivo lineal fue:

$$Y_{ij} = u + t_i + E_{ij}$$

Dónde:

$Y_{ij}$  = observación del  $i$ -ésimo tratamiento,  $j$ -ésima repetición

$u$  = media general de la variable respuesta.

$t_i$  = efecto  $i$ -ésimo tratamiento, siendo  $i = 1, 2, 3, \dots, 8$

$E_{ij}$  = error experimental en el  $i$ -ésimo tratamiento,  $j$ -ésima repetición

$H_0 = u_1 = u_2 = u_3, \dots = u_8$

$H_a$  = al menos una media diferente

Con los valores de altura y número de tallos de las plantas se realizaron las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza y según los resultados se llevaron a cabo análisis paramétricos y no paramétricos (Hernández et al., 2014). En el presente trabajo se utilizó el software estadístico SPSS versión 15,0 así como los programas de Microsoft Office Word, Excel versión 2013 y Minitab 15.

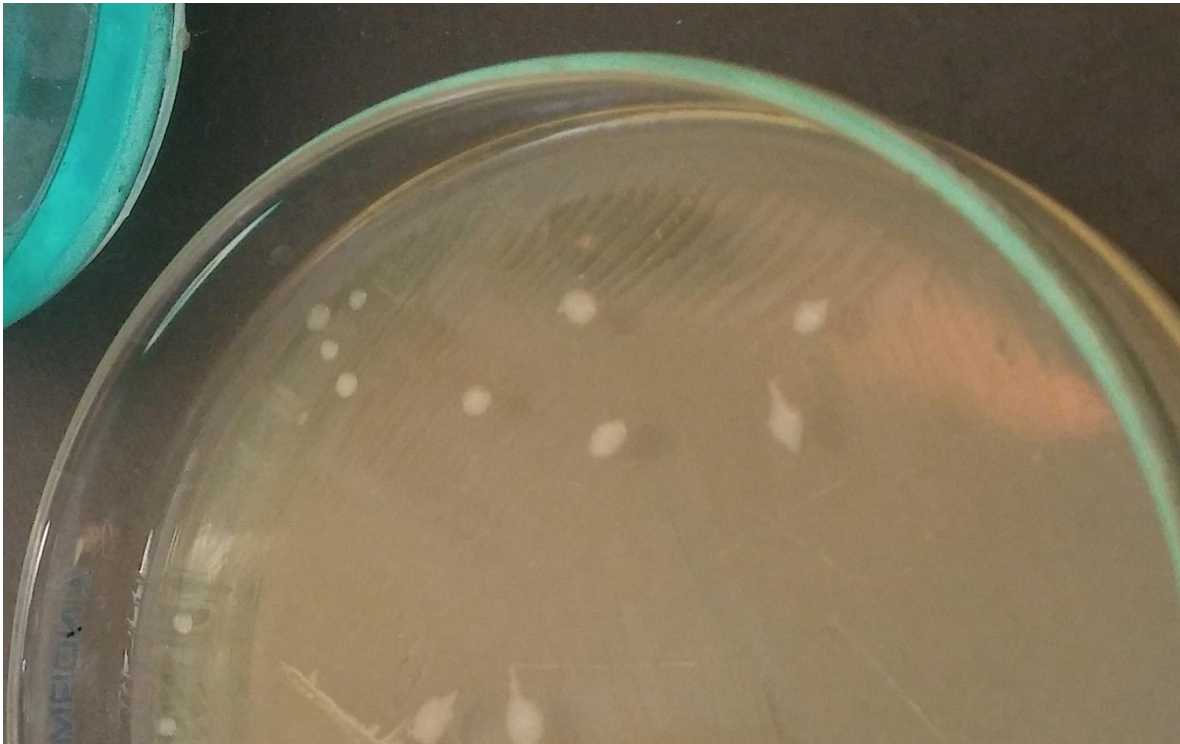
## IV RESULTADOS

### 4.1 Bacterias del género *Pseudomonas* aisladas e identificadas en el rizoplano y rizósfera de *Asparagus officinalis* L.

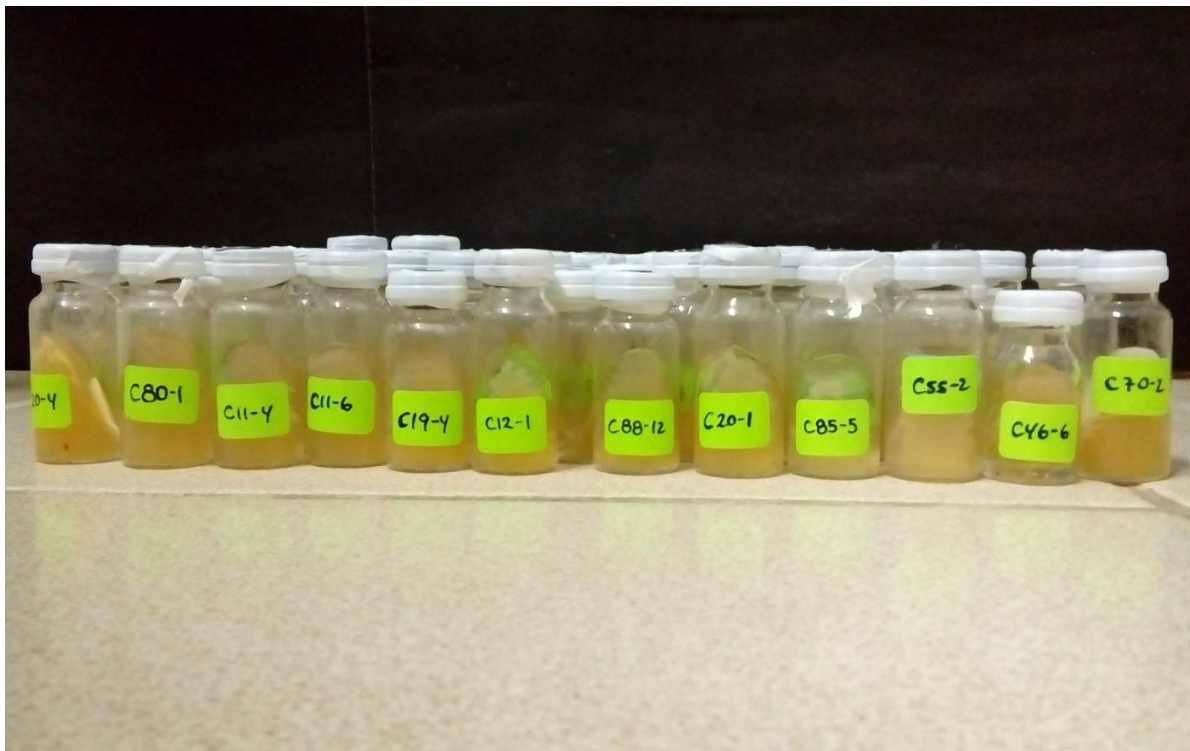
En el 87,50 % (84) de las muestras de rizoplano y suelo rizosférico de espárrago se aislaron bacterias que desarrollaron en agar Cetrimide (Figura 15), obteniéndose 470 cultivos puros (Figura 16), entre los que 68,29% (321) desarrollaron colonias pigmentadas. El 50,43% (237) de los aislados bacterianos se identificaron como pertenecientes al género *Pseudomonas*, que incluye (Tabla 3) bacilos Gram negativos, positivos en las pruebas de catalasa y oxidasa, no fermentan los carbohidratos en el agar TSI, utilizan el citrato como fuente de carbono y energía, no descarboxilan la lisina y son sensibles a la Polimixina B (Figura 17). De esta manera, el 78,13% (75) de las muestras investigadas resultó positivo al aislamiento de *Pseudomonas* spp. (Figura 18).

La producción del pigmento fluorescente en agar King B (Figura 19), crecimiento a 42°C e hidrólisis de almidón y gelatina, reducción de nitratos, identificaron cinco especies en las bacterias del género *Pseudomonas* (Tabla 4), predominando *P. aeruginosa* (33,33%), seguida de *P. fluorescens* (25,74%), *P. putida* (23,63%), *P. mendociana* (14,35%) y *P. stutzeri* (2,95%).





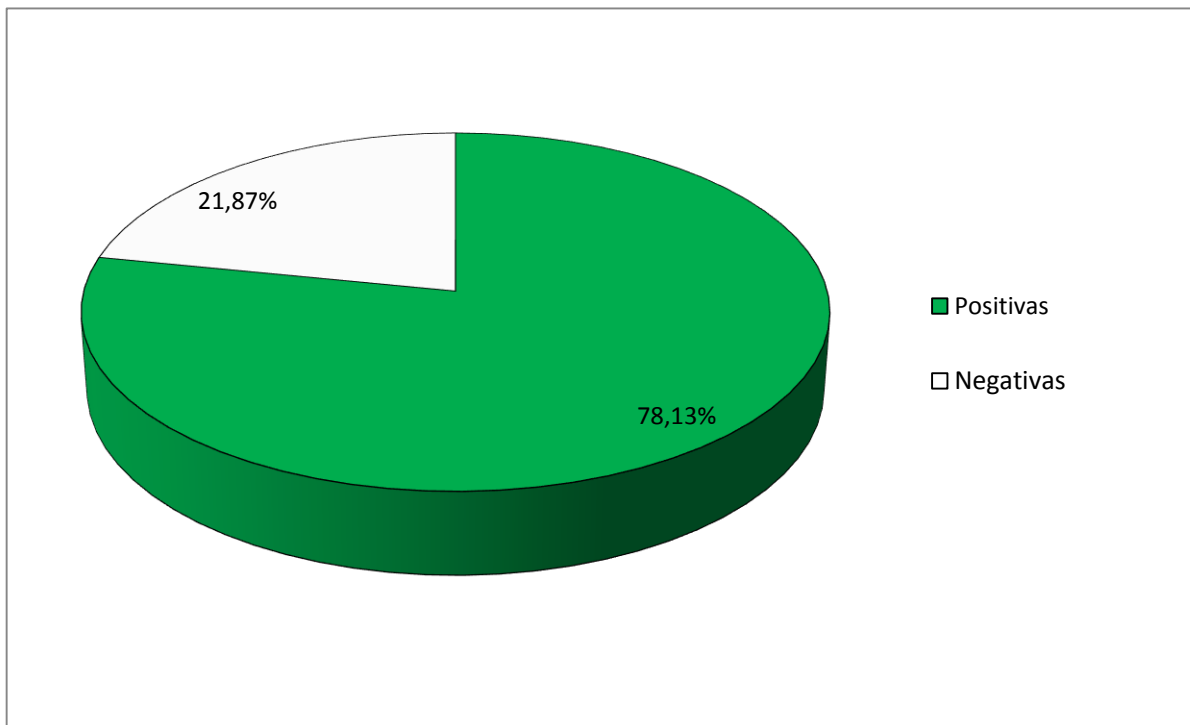
**Figura 15.** Colonias de bacterias desarrolladas en agar Cetrimide.



**Figura 16.** Cultivos puros de bacterias aisladas en agar Cetrimide.



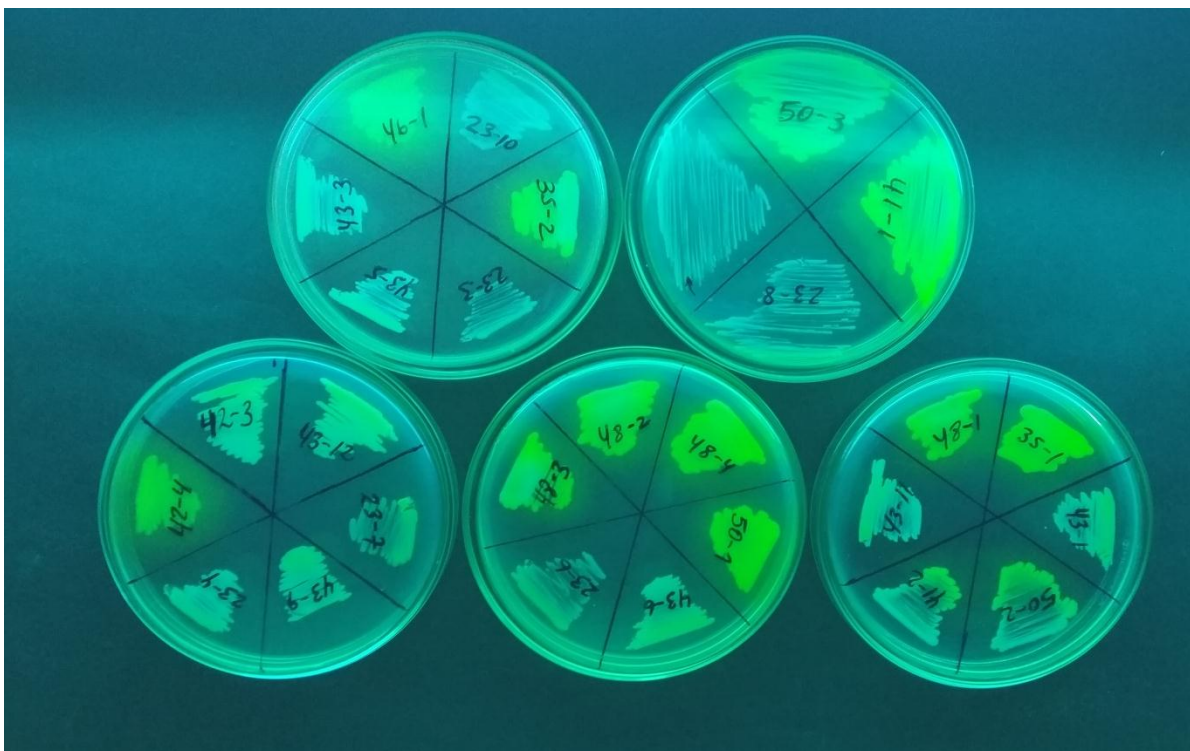
**Figura 17.** Prueba de sensibilidad a la polimixina B.



**Figura 18.** Frecuencia de muestras de rizoplaneo y rizósfera de *Asparagus officinalis* L. positivas al aislamiento de *Pseudomonas* spp.

**Tabla 3.** Características diferenciales de *Pseudomonas* spp.

Características	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. mendociana</i>	<i>P. stutzeri</i>
Coloración de Gram	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+
Agar Hierro-Triple Azucar (TSI)	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K
Utilización de citrato	+	+	+	+	+
Descarboxilación de lisina	-	-	-	-	-
Sensibilidad a la Polimixina B	S	S	S	S	S
Fluoresceína en agar King B	+	+	+	-	-
Crecimiento a 42°C	+	-	-	-	-
Hidrólisis de almidón	-	-	-	-	+
Hidrólisis de gelatina	-	+	-	-	-
Reducción de nitratos	-	-	-	+	+



**Figura 19.** Colonias de *Pseudomonas* spp. productoras y no productoras de flurosceína en agar King B.

**Tabla 4.** Frecuencia de especies identificadas en *Pseudomonas* spp. aisladas de rizoplano y rizosféra de *Asparagus officinalis* L.

Especie	Cultivo puros	
	Número	%
<i>P. aeruginosa</i>	79	33,33
<i>P. fluorescens</i>	61	25,74
<i>P. putida</i>	56	23,63
<i>P. mendociana</i>	34	14,35
<i>P. stutzeri</i>	7	2,95

#### **4.2 Nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e índoles producidos por *Pseudomonas* spp.**

El 94,94% (225) de los cultivos de *Pseudomonas* spp. (Figura 20), fijaron nitrógeno *in vitro* y como producto de la fijación se detectó amonio, evidenciado por una coloración azul (Figura 21). La concentración de amonio osciló entre 10,465 a 25,869 ppm con *P. aeruginosa* 23.8 y *P. stutzeri* 37.1, respectivamente (Tabla 5).

El 81,43% (193) de los cultivos de *Pseudomonas* spp. (Figura 22), solubilizaron fosfato *in vitro* y como producto de la solubilización se detectó fósforo soluble, evidenciado por una coloración azul (Figura 23). La concentración de fósforo soluble osciló entre 1,014 a 38,080 ppm con *P. putida* 94.3 y *P. aeruginosa* 35.10, respectivamente (Tabla 6).

El 94,94% (225) de los cultivos de *Pseudomonas* spp. (Figura 24), produjeron índoles *in vitro*, evidenciados por una coloración grosella (Figura 25). La concentración de índoles producidos osciló entre 4,689 a 34,689 ppm con *P. mendociana* 68.4 y *P. putida* 33.8, respectivamente (Tabla 7).

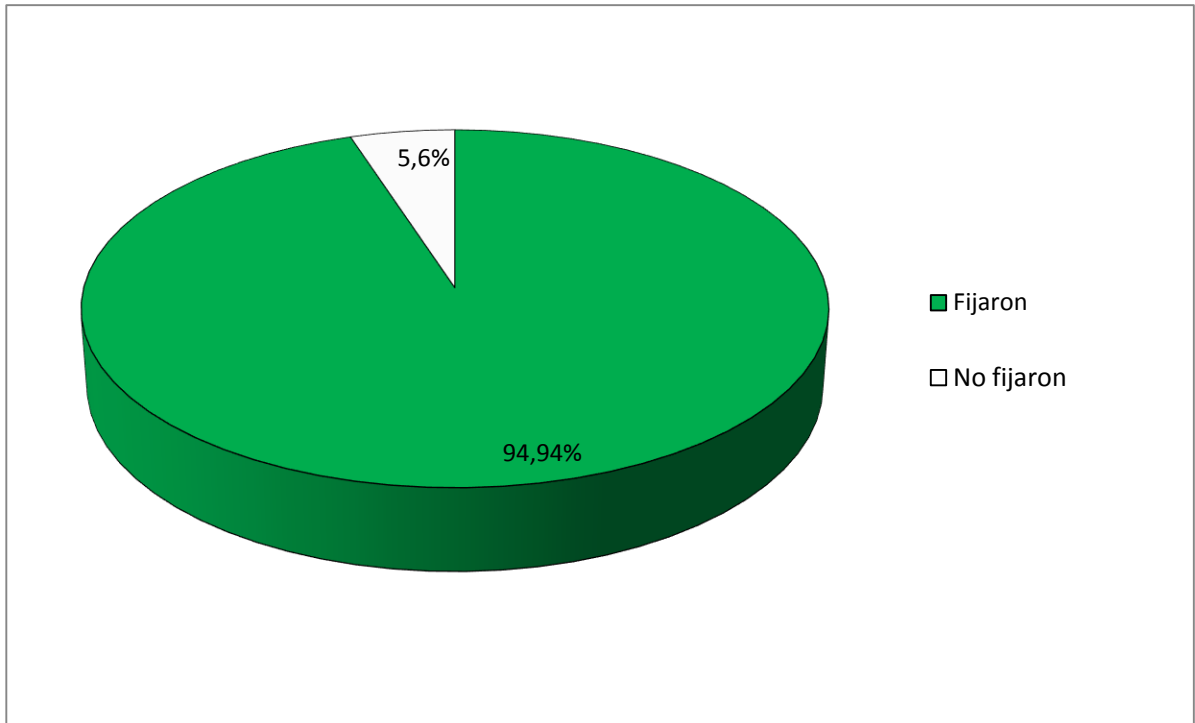
#### **4.3 Cultivos de *Pseudomonas* spp. seleccionados**

Los seis cultivos de *Pseudomonas* spp. seleccionados correspondieron a *P. stutzeri* 37.1 y *P. fluorescens* 6.5 con 25,869 y 24,931 ppm de amonio; *P. aeruginosa* 35.10 y *P. putida* 61.4 con 38,080 y 11,546 ppm de fósforo soluble; *P. putida* 33.8 y *P. mendociana* 35.5 con 34,688 y 31,800 ppm de índoles (Tabla 8).

#### **4.4 Efecto de *Pseudomonas* spp. en la altura y número de tallos de *Asparagus officinalis* L.**

Los valores de altura y número de tallos de las plantas de espárrago presentaron distribución normal ( $p > 0,05$ ) y homogeneidad de varianza ( $p > 0,05$ ), por lo que se realizó el análisis de varianza de un solo factor y la prueba múltiple de Tukey (Anexos 7 a 12).





**Figura 20.** Porcentaje de *Pseudomonas* spp. aisladas de *Asparagus officinalis* L. que fijaron nitrógeno *in vitro*.



**Figura 21.** Coloración observada en la cuantificación de amonio.

**Tabla 5.** Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por *Pseudomonas* spp. aisladas de rizoplaneo y rizosféra de *Asparagus officinalis* L.

<i>Pseudomonas</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)	<i>Pseudomonas</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)	<i>Pseudomonas</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)
<i>P. stutzeri</i> 37.1	25,869	<i>P. aeruginosa</i> 24.2	18,480	<i>P. stutzeri</i> 20.7	16,311
<i>P. fluorescens</i> 6.5	24,931	<i>P. aeruginosa</i> 83.6	18,480	<i>P. stutzeri</i> 68.3	16,292
<i>P. aeruginosa</i> 92.3	23,479	<i>P. fluorescens</i> 18.5	18,443	<i>P. mendociana</i> 16.4	16,274
<i>P. aeruginosa</i> 86.1	23,000	<i>P. putida</i> 25.3	18,443	<i>P. fluorescens</i> 70.2	16,256
<i>P. aeruginosa</i> 35.8	22,670	<i>P. mendociana</i> 9.8	18,425	<i>P. mendociana</i> 11.3	16,219
<i>P. aeruginosa</i> 2.3	22,137	<i>P. fluorescens</i> 11.4	18,369	<i>P. aeruginosa</i> 35.10	16,164
<i>P. putida</i> 25.9	22,009	<i>P. aeruginosa</i> 23.6	18,314	<i>P. aeruginosa</i> 61.4	16,072
<i>P. fluorescens</i> 28.2	21,991	<i>P. putida</i> 75.5	18,314	<i>P. fluorescens</i> 93.4	16,072
<i>P. aeruginosa</i> 42.5	21,991	<i>P. fluorescens</i> 55.2	18,296	<i>P. putida</i> 85.5	15,998
<i>P. aeruginosa</i> 31.3	21,954	<i>P. putida</i> 85.3	18,186	<i>P. putida</i> 48.4	15,978
<i>P. aeruginosa</i> 23.12	21,825	<i>P. aeruginosa</i> 24.1	18,167	<i>P. mendociana</i> 85.1	15,943
<i>P. putida</i> 11.9	21,697	<i>P. aeruginosa</i> 50.2	18,167	<i>P. aeruginosa</i> 78.6	15,925
<i>P. fluorescens</i> 32.3	21,145	<i>P. aeruginosa</i> 33.5	18,094	<i>P. fluorescens</i> 18.1	15,888
<i>P. aeruginosa</i> 82.5	20,888	<i>P. putida</i> 78.3	18,057	<i>P. aeruginosa</i> 5.3	15,851
<i>P. putida</i> 7.5	20,759	<i>P. aeruginosa</i> 30.6	18,020	<i>P. aeruginosa</i> 93.3	15,833
<i>P. fluorescens</i> 22.1	20,704	<i>P. fluorescens</i> 35.2	18,002	<i>P. mendociana</i> 10.2	15,778
<i>P. putida</i> 14.2	20,687	<i>P. fluorescens</i> 83.10	18,002	<i>P. putida</i> 28.1	15,741
<i>P. putida</i> 94.3	20,649	<i>P. fluorescens</i> 10.4	17,947	<i>P. aeruginosa</i> 93.1	15,631
<i>P. putida</i> 3.3	20,575	<i>P. putida</i> 20.4	17,928	<i>P. fluorescens</i> 62.3	15,612
<i>P. fluorescens</i> 40.1	20,557	<i>P. fluorescens</i> 71.11	17,928	<i>P. fluorescens</i> 95.1	15,594
<i>P. fluorescens</i> 47.6	20,520	<i>P. fluorescens</i> 36.1	17,910	<i>P. stutzeri</i> 21.3	15,575
<i>P. fluorescens</i> 86.2	20,409	<i>P. putida</i> 4.4	17,855	<i>P. putida</i> 40.2	15,483
<i>P. fluorescens</i> 33.2	20,392	<i>P. fluorescens</i> 23.1	17,836	<i>P. aeruginosa</i> 12.1	15,428
<i>P. aeruginosa</i> 55.1	20,392	<i>P. putida</i> 13.2	17,818	<i>P. fluorescens</i> 36.9	15,373
<i>P. aeruginosa</i> 11.2	20,336	<i>P. fluorescens</i> 36.3	17,818	<i>P. mendociana</i> 53.9	15,373

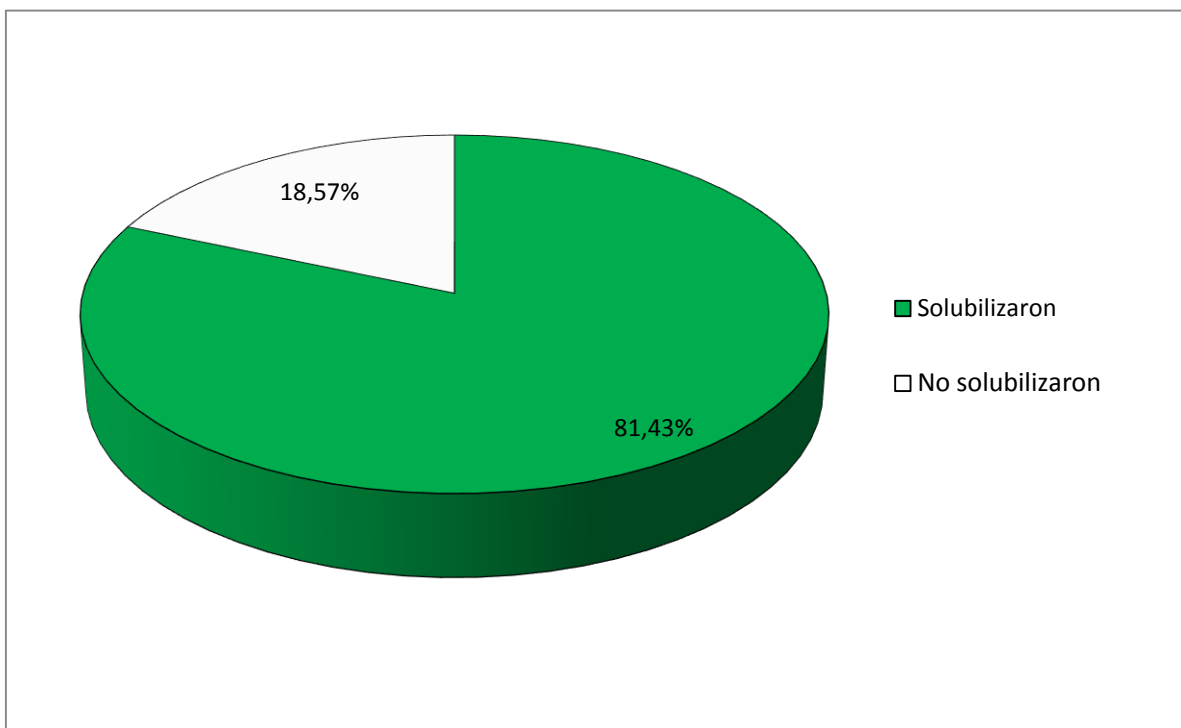
Continuación...

<i>Pseudomonas</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)	<i>Pseudomonas</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)	<i>Pseudomonas</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)
<i>P. fluorescens</i> 7.1	20,244	<i>P. aeruginosa</i> 22.3	17,799	<i>P. fluorescens</i> 33.9	15,336
<i>P. aeruginosa</i> 11.10	20,226	<i>P. aeruginosa</i> 25.2	17,799	<i>P. fluorescens</i> 52.7	15,299
<i>P. fluorescens</i> 40.6	20,226	<i>P. putida</i> 38.4	17,799	<i>P. aeruginosa</i> 31.6	15,263
<i>P. aeruginosa</i> 43.1	20,208	<i>P. aeruginosa</i> 5.10	17,781	<i>P. aeruginosa</i> 3.2	15,171
<i>P. fluorescens</i> 25.10	20,171	<i>P. fluorescens</i> 46.6	17,708	<i>P. mendociana</i> 8.3	15,171
<i>P. aeruginosa</i> 96.6	20,171	<i>P. fluorescens</i> 47.1	17,689	<i>P. putida</i> 38.5	15,171
<i>P. putida</i> 34.2	20,079	<i>P. putida</i> 83.2	17,671	<i>P. putida</i> 35.4	15,153
<i>P. fluorescens</i> 75.7	20,061	<i>P. aeruginosa</i> 24.5	17,597	<i>P. aeruginosa</i> 74.1	15,116
<i>P. aeruginosa</i> 25.4	20,024	<i>P. aeruginosa</i> 63.3	17,506	<i>P. putida</i> 33.11	15,042
<i>P. putida</i> 23.13	19,950	<i>P. aeruginosa</i> 4.2	17,469	<i>P. mendociana</i> 8.1	14,914
<i>P. aeruginosa</i> 32.10	19,932	<i>P. fluorescens</i> 82.9	17,450	<i>P. putida</i> 33.6	14,840
<i>P. aeruginosa</i> 33.8	19,932	<i>P. fluorescens</i> 45.7	17,432	<i>P. putida</i> 31.5	14,748
<i>P. aeruginosa</i> 11.6	19,825	<i>P. putida</i> 16.3	17,395	<i>P. aeruginosa</i> 34.5	14,693
<i>P. putida</i> 13.4	19,825	<i>P. fluorescens</i> 24.6	17,377	<i>P. fluorescens</i> 49.5	14,601
<i>P. mendocina</i> 46.5	19,822	<i>P. aeruginosa</i> 33.14	17,322	<i>P. aeruginosa</i> 10.1	14,491
<i>P. aeruginosa</i> 5.1	19,767	<i>P. fluorescens</i> 6.2	17,303	<i>P. fluorescens</i> 95.3	14,472
<i>P. mendocina</i> 36.7	19,767	<i>P. aeruginosa</i> 16.1	17,285	<i>P. putida</i> 3.5	14,436
<i>P. aeruginosa</i> 20.5	19,656	<i>P. aeruginosa</i> 30.1	17,285	<i>P. putida</i> 39.2	14,252
<i>P. mendocina</i> 26.1	19,619	<i>P. aeruginosa</i> 20.3	17,230	<i>P. aeruginosa</i> 2.1	14,160
<i>P. fluorescens</i> 33.7	19,601	<i>P. mendociana</i> 23.9	17,230	<i>P. aeruginosa</i> 46.3	14,160
<i>P. putida</i> 32.9	19,528	<i>P. putida</i> 36.8	17,193	<i>P. aeruginosa</i> 14.1	14,068
<i>P. fluorescens</i> 35.9	19,472	<i>P. fluorescens</i> 35.3	17,046	<i>P. putida</i> 29.2	14,031
<i>P. mendocina</i> 36.6	19,381	<i>P. putida</i> 31.8	17,028	<i>P. aeruginosa</i> 26.3	13,939
<i>P. aeruginosa</i> 12.2	19,362	<i>P. mendociana</i> 68.10	17,028	<i>P. mendociana</i> 68.6	13,939
<i>P. fluorescens</i> 30.4	19,344	<i>P. aeruginosa</i> 48.7	17,009	<i>P. aeruginosa</i> 78.5	13,921



Continuación...

<i>Pseudomonas</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)	<i>Pseudomonas</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)	<i>Pseudomonas</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)
<i>P. aeruginosa</i> 89.6	19,215	<i>P. putida</i> 68.7	17,009	<i>P. putida</i> 85.2	13,921
<i>P. stutzeri</i> 3.1	19,159	<i>P. fluorescens</i> 11.8	16,991	<i>P. aeruginosa</i> 5.9	13,884
<i>P. fluorescens</i> 20.2	19,159	<i>P. mendociana</i> 41.1	16,972	<i>P. putida</i> 15.8	13,811
<i>P. fluorescens</i> 95.2	19,123	<i>P. aeruginosa</i> 75.6	16,954	<i>P. mendociana</i> 88.11	13,737
<i>P. aeruginosa</i> 21.4	19,105	<i>P. putida</i> 82.4	16,954	<i>P. mendociana</i> 16.6	13,719
<i>P. putida</i> 83.4	19,105	<i>P. fluorescens</i> 47.13	16,936	<i>P. fluorescens</i> 27.3	13,627
<i>P. mendocinaa</i> 4.3	19,086	<i>P. mendociana</i> 15.6	16,881	<i>P. fluorescens</i> 22.6	13,498
<i>P. putida</i> 4.1	19,068	<i>P. putida</i> 13.7	16,825	<i>P. aeruginosa</i> 31.9	13,443
<i>P. stutzeri</i> 78.4	19,050	<i>P. fluorescens</i> 24.10	16,825	<i>P. stutzeri</i> 8.4	13,259
<i>P. putida</i> 83.7	19,013	<i>P. fluorescens</i> 59.5	16,807	<i>P. aeruginosa</i> 23.2	13,186
<i>P. mendocina</i> 68.1	18,994	<i>P. putida</i> 33.3	16,752	<i>P. mendociana</i> 35.5	13,149
<i>P. putida</i> 18.4	18,958	<i>P. aeruginosa</i> 18.3	16,733	<i>P. fluorescens</i> 48.3	13,039
<i>P. fluorescens</i> 23.7	18,958	<i>P. aeruginosa</i> 23.4	16,733	<i>P. fluorescens</i> 19.4	12,744
<i>P. mendocina</i> 6.4	18,939	<i>P. aeruginosa</i> 82.3	16,733	<i>P. fluorescens</i> 2.2	12,542
<i>P. aeruginosa</i> 47.3	18,921	<i>P. putida</i> 93.2	16,733	<i>P. aeruginosa</i> 7.2	12,285
<i>P. aeruginosa</i> 70.12	18,829	<i>P. aeruginosa</i> 37.5	16,715	<i>P. mendociana</i> 85.4	11,862
<i>P. aeruginosa</i> 82.8	18,829	<i>P. putida</i> 4.5	16,642	<i>P. putida</i> 83.1	11,807
<i>P. putida</i> 40.4	18,811	<i>P. aeruginosa</i> 17.1	16,642	<i>P. aeruginosa</i> 91.1	11,715
<i>P. aeruginosa</i> 94.1	18,811	<i>P. fluorescens</i> 21.5	16,642	<i>P. aeruginosa</i> 87.4	11,164
<i>P. aeruginosa</i> 23.3	18,792	<i>P. putida</i> 15.1	16,623	<i>P. aeruginosa</i> 23.10	11,090
<i>P. aeruginosa</i> 80.1	18,756	<i>P. fluorescens</i> 31.1	16,513	<i>P. mendociana</i> 68.8	10,980
<i>P. fluorescens</i> 29.1	18,719	<i>P. fluorescens</i> 42.8	16,494	<i>P. putida</i> 80.2	10,796
<i>P. putida</i> 78.7	18,700	<i>P. putida</i> 25.1	16,403	<i>P. putida</i> 49.2	10,759
<i>P. aeruginosa</i> 48.2	18,590	<i>P. aeruginosa</i> 5.4	16,384	<i>P. mendociana</i> 26.2	10,704
<i>P. putida</i> 20.1	18,553	<i>P. fluorescens</i> 61.1	16,347	<i>P. aeruginosa</i> 23.8	10,465



**Figura 22.** Porcentaje de *Pseudomonas* spp. aisladas de *Asparagus officinalis* L. que solubilizaron fosfato *in vitro*.



**Figura 23.** Coloración observada en la cuantificación de fósforo soluble.

**Tabla 6.** Fósforo cuantificado (ppm) en la solubilización por *Pseudomonas* spp. aisladas de rizoplasma y rizosfera de *Asparagus officinalis* L.

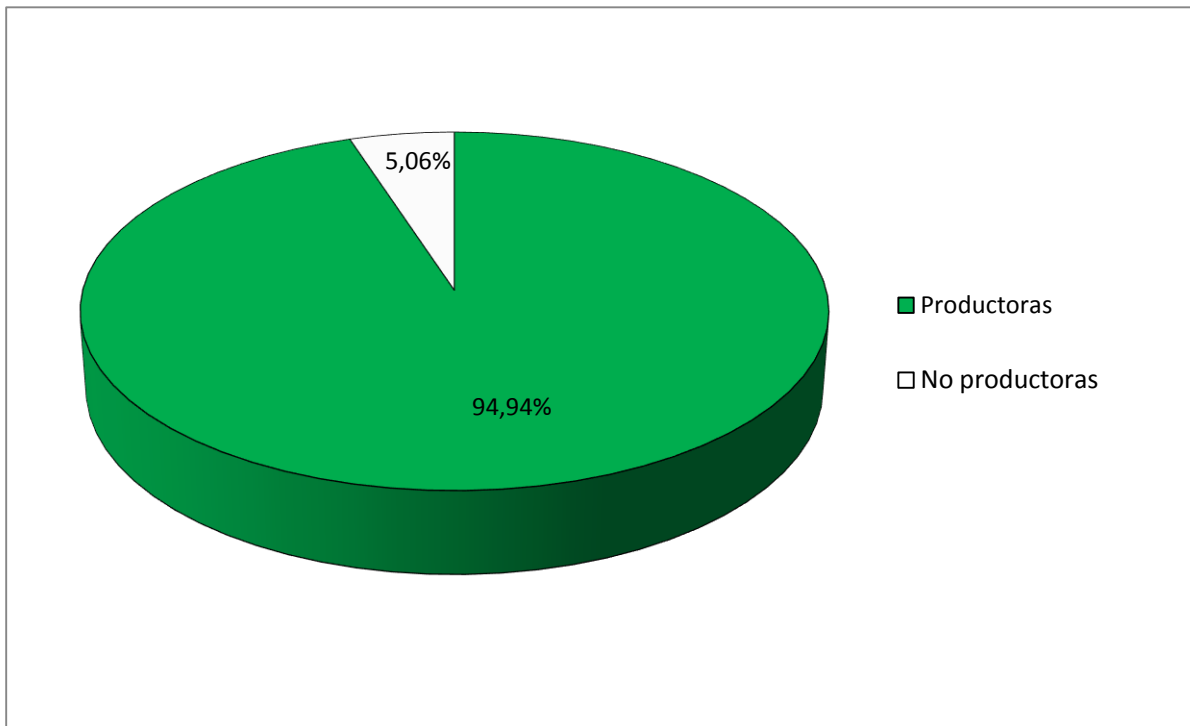
<i>Pseudomonas</i> spp. código UNPRG	P soluble (ppm)	<i>Pseudomonas</i> spp. código UNPRG	P soluble (ppm)	<i>Pseudomonas</i> spp. código UNPRG	P soluble (ppm)
<i>P. aeruginosa</i> 35.10	38,080	<i>P. stutzeri</i> 37.1	1,289	<i>P. fluorescens</i> 75.7	1,173
<i>P. putida</i> 61.4	11,546	<i>P. fluorescens</i> 40.6	1,289	<i>P. putida</i> 83.4	1,173
<i>P. aeruginosa</i> 28.1	10,708	<i>P. fluorescens</i> 48.3	1,289	<i>P. aeruginosa</i> 93.3	1,173
<i>P. aeruginosa</i> 89.6	10,606	<i>P. fluorescens</i> 49.5	1,289	<i>P. putida</i> 4.1	1,159
<i>P. aeruginosa</i> 17.1	10,563	<i>P. mendociana</i> 85.4	1,289	<i>P. fluorescens</i> 24.10	1,159
<i>P. aeruginosa</i> 18.3	9,563	<i>P. putida</i> 11.9	1,275	<i>P. putida</i> 38.5	1,159
<i>P. putida</i> 23.13	9,520	<i>P. fluorescens</i> 22.1	1,275	<i>P. fluorescens</i> 47.1	1,159
<i>P. putida</i> 25.3	6,506	<i>P. aeruginosa</i> 31.9	1,275	<i>P. aeruginosa</i> 80.1	1,159
<i>P. putida</i> 36.8	6,491	<i>P. aeruginosa</i> 33.5	1,275	<i>P. putida</i> 83.2	1,159
<i>P. mendociana</i> 68.10	5,491	<i>P. aeruginosa</i> 36.6	1,275	<i>P. mendociana</i> 87.3	1,159
<i>P. fluorescens</i> 70.2	5,491	<i>P. putida</i> 48.4	1,275	<i>P. putida</i> 14.2	1,145
<i>P. putida</i> 20.1	5,448	<i>P. putida</i> 83.1	1,275	<i>P. putida</i> 31.5	1,145
<i>P. aeruginosa</i> 31.3	5,448	<i>P. aeruginosa</i> 7.2	1,260	<i>P. aeruginosa</i> 50.2	1,145
<i>P. fluorescens</i> 36.9	4,448	<i>P. putida</i> 15.8	1,260	<i>P. aeruginosa</i> 78.5	1,145
<i>P. fluorescens</i> 28.2	4,419	<i>P. putida</i> 34.2	1,260	<i>P. putida</i> 6.6	1,130
<i>P. fluorescens</i> 31.1	4,419	<i>P. aeruginosa</i> 47.3	1,260	<i>P. stutzeri</i> 31.5	1,130
<i>P. putida</i> 35.4	4,419	<i>P. aeruginosa</i> 48.7	1,260	<i>P. putida</i> 80.2	1,130
<i>P. stutzeri</i> 3.1	4,405	<i>P. mendociana</i> 68.1	1,260	<i>P. aeruginosa</i> 93.1	1,130
<i>P. mendociana</i> 11.3	3,405	<i>P. putida</i> 85.2	1,260	<i>P. stutzeri</i> 8.4	1,116
<i>P. aeruginosa</i> 14.1	3,405	<i>P. mendociana</i> 10.2	1,246	<i>P. aeruginosa</i> 32.10	1,116
<i>P. fluorescens</i> 22.6	3,405	<i>P. putida</i> 18.4	1,246	<i>P. fluorescens</i> 47.6	1,116
<i>P. fluorescens</i> 23.1	3,405	<i>P. aeruginosa</i> 26.3	1,246	<i>P. mendociana</i> 68.6	1,116
<i>P. putida</i> 40.2	3,405	<i>P. fluorescens</i> 33.2	1,246	<i>P. aeruginosa</i> 16.1	1,101
<i>P. stutzeri</i> 68.3	3,405	<i>P. fluorescens</i> 40.1	1,246	<i>P. putida</i> 16.3	1,101
<i>P. putida</i> 96.3	2,405	<i>P. fluorescens</i> 42.8	1,246	<i>P. aeruginosa</i> 23.12	1,101

Continuación...

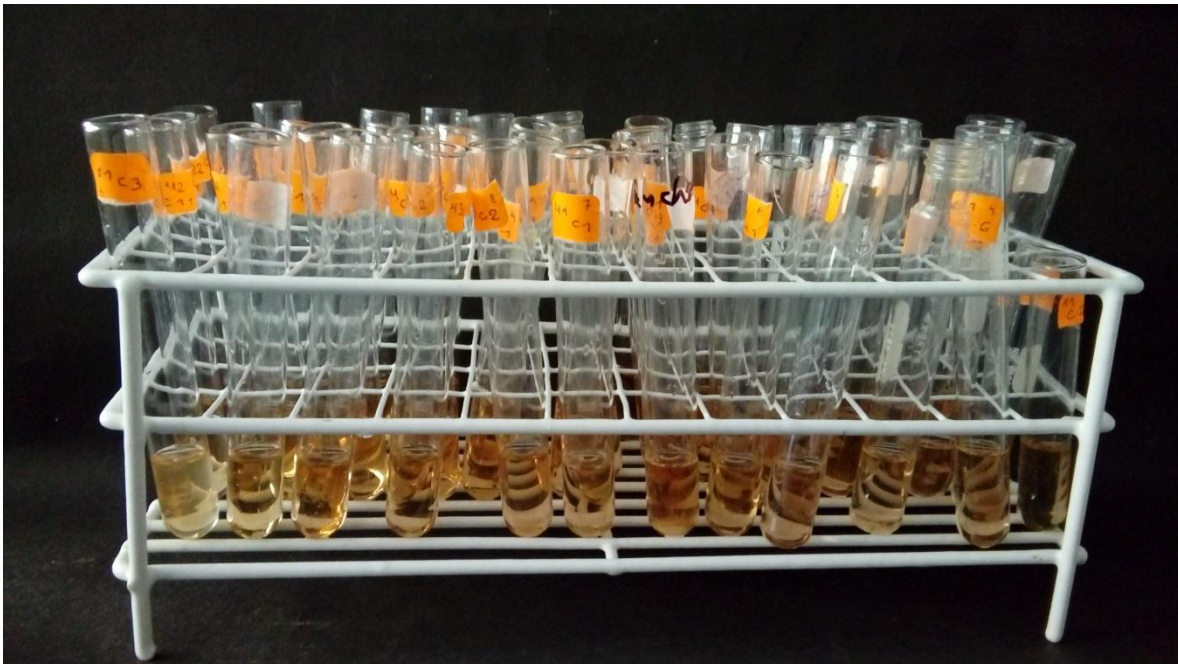
<i>Pseudomonas</i> spp. código UNPRG	P soluble (ppm)	<i>Pseudomonas</i> spp. código UNPRG	P soluble (ppm)	<i>Pseudomonas</i> spp. código UNPRG	P soluble (ppm)
<i>P. mendociana</i> 41.1	2,390	<i>P. putida</i> 82.4	1,246	<i>P. putida</i> 85.3	1,101
<i>P. aeruginosa</i> 82.5	2,390	<i>P. aeruginosa</i> 82.8	1,246	<i>P. mendociana</i> 8.3	1,087
<i>P. aeruginosa</i> 70.12	2,376	<i>P. fluorescens</i> 86.2	1,246	<i>P. fluorescens</i> 21.5	1,087
<i>P. aeruginosa</i> 92.3	2,376	<i>P. aeruginosa</i> 2.1	1,231	<i>P. putida</i> 33.11	1,087
<i>P. mendociana</i> 4.3	2,361	<i>P. putida</i> 3.3	1,231	<i>P. putida</i> 38.4	1,087
<i>P. aeruginosa</i> 5.1	2,361	<i>P. putida</i> 4.4	1,231	<i>P. fluorescens</i> 46.6	1,087
<i>P. putida</i> 25.9	2,361	<i>P. fluorescens</i> 18.5	1,231	<i>P. aeruginosa</i> 63.3	1,087
<i>P. putida</i> 33.6	2,361	<i>P. fluorescens</i> 20.2	1,231	<i>P. stutzeri</i> 78.4	1,087
<i>P. aeruginosa</i> 34.6	2,361	<i>P. aeruginosa</i> 24.5	1,231	<i>P. mendociana</i> 85.1	1,087
<i>P. aeruginosa</i> 48.2	2,361	<i>P. fluorescens</i> 59.5	1,231	<i>P. aeruginosa</i> 5.4	1,072
<i>P. mendociana</i> 16.6	2,347	<i>P. putida</i> 4.5	1,217	<i>P. fluorescens</i> 6.2	1,072
<i>P. aeruginosa</i> 25.2	2,347	<i>P. fluorescens</i> 11.4	1,217	<i>P. aeruginosa</i> 6.5	1,072
<i>P. aeruginosa</i> 30.1	2,347	<i>P. aeruginosa</i> 11.10	1,217	<i>P. fluorescens</i> 24.1	1,072
<i>P. mendociana</i> 68.8	2,347	<i>P. putida</i> 15.1	1,217	<i>P. fluorescens</i> 32.3	1,072
<i>P. aeruginosa</i> 3.2	1,332	<i>P. putida</i> 20.4	1,217	<i>P. fluorescens</i> 36.1	1,072
<i>P. aeruginosa</i> 4.2	1,332	<i>P. fluorescens</i> 35.3	1,217	<i>P. aeruginosa</i> 75.6	1,072
<i>P. fluorescens</i> 10.4	1,332	<i>P. putida</i> 75.5	1,217	<i>P. fluorescens</i> 2.2	1,058
<i>P. mendociana</i> 16.4	1,332	<i>P. aeruginosa</i> 91.1	1,217	<i>P. aeruginosa</i> 5.10	1,058
<i>P. mendociana</i> 26.1	1,332	<i>P. aeruginosa</i> 5.9	1,202	<i>P. mendociana</i> 9.8	1,058
<i>P. putida</i> 31.8	1,332	<i>P. fluorescens</i> 18.1	1,202	<i>P. mendociana</i> 23.9	1,058
<i>P. fluorescens</i> 33.9	1,332	<i>P. fluorescens</i> 45.7	1,202	<i>P. aeruginosa</i> 83.6	1,058
<i>P. putida</i> 68.7	1,332	<i>P. fluorescens</i> 82.9	1,202	<i>P. putida</i> 3.5	1,043
<i>P. aeruginosa</i> 74.1	1,332	<i>P. fluorescens</i> 83.10	1,202	<i>P. putida</i> 13.2	1,043
<i>P. putida</i> 13.4	1,318	<i>P. aeruginosa</i> 23.2	1,188	<i>P. fluorescens</i> 61.1	1,043
<i>P. aeruginosa</i> 22.3	1,318	<i>P. putida</i> 32.9	1,188	<i>P. putida</i> 83.7	1,043

Continuación...

<i>Pseudomonas</i> spp. código UNPRG	P soluble (ppm)	<i>Pseudomonas</i> spp. código UNPRG	P soluble (ppm)	<i>Pseudomonas</i> spp. código UNPRG	P soluble (ppm)
<i>P. flourescens</i> 25.10	1,318	<i>P. putida</i> 39.2	1,188	<i>P. aeruginosa</i> 87.4	1,043
<i>P. flourescens</i> 35.2	1,318	<i>P. aeruginosa</i> 86.1	1,188	<i>P. flourescens</i> 95.1	1,043
<i>P. mendociana</i> 6.4	1,303	<i>P. mendociana</i> 88.6	1,188	<i>P. aeruginosa</i> 23.6	1,029
<i>P. flourescens</i> 7.1	1,303	<i>P. flourescens</i> 93.4	1,188	<i>P. aeruginosa</i> 78.6	1,029
<i>P. aeruginosa</i> 11.6	1,303	<i>P. flourescens</i> 95.3	1,188	<i>P. putida</i> 85.5	1,029
<i>P. putida</i> 33.3	1,303	<i>P. mendociana</i> 15.6	1,173	<i>P. flourescens</i> 95.2	1,029
<i>P. mendociana</i> 35.5	1,303	<i>P. aeruginosa</i> 20.5	1,173	<i>P. aeruginosa</i> 96.6	1,029
<i>P. aeruginosa</i> 37.5	1,303	<i>P. stutzeri</i> 20.7	1,173	<i>P. aeruginosa</i> 20.3	1,014
<i>P. aeruginosa</i> 42.5	1,303	<i>P. flourescens</i> 24.6	1,173	<i>P. aeruginosa</i> 30.6	1,014
<i>P. aeruginosa</i> 46.3	1,303	<i>P. putida</i> 25.1	1,173	<i>P. mendociana</i> 36.7	1,014
<i>P. flourescens</i> 27.3	1,303	<i>P. mendociana</i> 26.2	1,173	<i>P. putida</i> 49.2	1,014
<i>P. aeruginosa</i> 10.1	1,289	<i>P. flourescens</i> 30.4	1,173	<i>P. mendociana</i> 88.5	1,014
<i>P. flourescens</i> 11.8	1,289	<i>P. flourescens</i> 33.7	1,173	<i>P. putida</i> 94.3	1,014
<i>P. aeruginosa</i> 24.2	1,289	<i>P. putida</i> 40.4	1,173		
<i>P. aeruginosa</i> 34.5	1,289	<i>P. flourescens</i> 55.2	1,173		



**Figura 24.** Porcentaje de *Pseudomonas* spp. aisladas de *Asparagus officinalis* L. que produjeron indoles *in vitro*.



**Figura 25.** Coloración observada en la cuantificación de indoles.

**Tabla 7.** Indoles producidos (ppm) por *Pseudomonas* spp. aisladas de rizoplaneo y rizosféra de *Asparagus officinalis* L.

<i>Pseudomonas</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)	<i>Pseudomonas</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)	<i>Pseudomonas</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)
<i>P. putida</i> 33.8	34,689	<i>P. fluorescens</i> 83.10	17,578	<i>P. aeruginosa</i> 5.4	12,022
<i>P. mendociana</i> 35.5	31,800	<i>P. putida</i> 4.4	17,356	<i>P. fluorescens</i> 19.4	12,022
<i>P. aeruginosa</i> 80.2	29,800	<i>P. aeruginosa</i> 30.1	17,356	<i>P. aeruginosa</i> 23.4	12,022
<i>P. putida</i> 48.4	29,133	<i>P. aeruginosa</i> 63.3	17,356	<i>P. aeruginosa</i> 86.1	12,022
<i>P. putida</i> 83.1	28,911	<i>P. aeruginosa</i> 82.5	17,356	<i>P. aeruginosa</i> 91.1	12,022
<i>P. putida</i> 93.2	28,688	<i>P. putida</i> 85.3	17,356	<i>P. aeruginosa</i> 78.5	11,800
<i>P. putida</i> 78.3	27,577	<i>P. putida</i> 20.1	17,133	<i>P. aeruginosa</i> 78.6	11,800
<i>P. fluorescens</i> 11.8	27,356	<i>P. mendociana</i> 89.6	17,133	<i>P. mendociana</i> 85.1	11,800
<i>P. fluorescens</i> 93.4	27,356	<i>P. aeruginosa</i> 2.1	16,911	<i>P. aeruginosa</i> 25.2	11,578
<i>P. fluorescens</i> 10.4	26,244	<i>P. fluorescens</i> 35.3	16,911	<i>P. aeruginosa</i> 21.4	11,356
<i>P. putida</i> 33.11	25,800	<i>P. fluorescens</i> 35.9	16,911	<i>P. fluorescens</i> 36.9	11,356
<i>P. mendociana</i> 26.2	25,578	<i>P. putida</i> 7.5	16,689	<i>P. aeruginosa</i> 70.12	11,356
<i>P. aeruginosa</i> 94.1	25,578	<i>P. aeruginosa</i> 24.5	16,689	<i>P. putida</i> 11.9	10,911
<i>P. fluorescens</i> 47.1	25,356	<i>P. putida</i> 25.9	16,689	<i>P. fluorescens</i> 75.7	10,911
<i>P. fluorescens</i> 48.3	25,356	<i>P. mendociana</i> 26.1	16,689	<i>P. putida</i> 3.5	10,689
<i>P. mendociana</i> 46.5	24,911	<i>P. fluorescens</i> 46.6	16,689	<i>P. aeruginosa</i> 5.9	10,689
<i>P. fluorescens</i> 29.1	24,689	<i>P. fluorescens</i> 70.2	16,689	<i>P. aeruginosa</i> 12.1	10,689
<i>P. aeruginosa</i> 46.3	24,689	<i>P. fluorescens</i> 15.3	16,467	<i>P. aeruginosa</i> 31.9	10,689
<i>P. aeruginosa</i> 26.3	24,244	<i>P. aeruginosa</i> 23.10	16,467	<i>P. fluorescens</i> 22.1	10,467
<i>P. putida</i> 40.2	24,022	<i>P. fluorescens</i> 32.3	16,467	<i>P. aeruginosa</i> 23.12	10,467
<i>P. fluorescens</i> 71.11	24,022	<i>P. putida</i> 40.4	16,244	<i>P. aeruginosa</i> 25.4	10,467
<i>P. aeruginosa</i> 16.1	23,578	<i>P. aeruginosa</i> 23.3	16,022	<i>P. mendociana</i> 36.6	10,467
<i>P. stutzeri</i> 20.7	23,356	<i>P. aeruginosa</i> 34.6	16,022	<i>P. mendociana</i> 36.7	10,467
<i>P. fluorescens</i> 42.8	23,133	<i>P. stutzeri</i> 78.4	15,800	<i>P. putida</i> 6.6	10,244
<i>P. aeruginosa</i> 87.4	22,911	<i>P. aeruginosa</i> 82.8	15,800	<i>P. mendociana</i> 8.3	10,244

Continuación...

<i>Pseudomonas</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)	<i>Pseudomonas</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)	<i>Pseudomonas</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)
<i>P. putida</i> 20.4	22,687	<i>P. putida</i> 36.8	15,578	<i>P. putida</i> 15.8	10,244
<i>P. fluorescens</i> 24.10	22,467	<i>P. aeruginosa</i> 31.3	15,356	<i>P. fluorescens</i> 33.9	10,244
<i>P. fluorescens</i> 52.7	22,244	<i>P. aeruginosa</i> 32.10	15,356	<i>P. putida</i> 29.2	10,022
<i>P. aeruginosa</i> 24.2	22,022	<i>P. mendociana</i> 75.1	15,356	<i>P. aeruginosa</i> 3.2	9,800
<i>P. putida</i> 32.9	22,022	<i>P. aeruginosa</i> 11.10	15,133	<i>P. fluorescens</i> 22.6	9,800
<i>P. fluorescens</i> 45.7	22,022	<i>P. fluorescens</i> 18.5	15,133	<i>P. aeruginosa</i> 23.2	9,800
<i>P. fluorescens</i> 2.2	21,800	<i>P. putida</i> 38.4	15,133	<i>P. mendociana</i> 48.9	9,578
<i>P. aeruginosa</i> 12.2	21,800	<i>P. putida</i> 75.5	15,133	<i>P. aeruginosa</i> 80.1	9,578
<i>P. putida</i> 28.1	21,800	<i>P. fluorescens</i> 55.2	14,911	<i>P. mendociana</i> 10.2	9,356
<i>P. fluorescens</i> 24.6	21,578	<i>P. putida</i> 16.3	14,689	<i>P. aeruginosa</i> 11.2	9,356
<i>P. aeruginosa</i> 93.3	21,578	<i>P. fluorescens</i> 40.1	14,689	<i>P. putida</i> 3.3	9,133
<i>P. putida</i> 13.4	21,133	<i>P. mendociana</i> 68.1	14,689	<i>P. aeruginosa</i> 10.1	9,133
<i>P. aeruginosa</i> 31.6	21,133	<i>P. putida</i> 23.13	14,244	<i>P. fluorescens</i> 11.4	9,133
<i>P. putida</i> 49.2	21,133	<i>P. fluorescens</i> 61.1	14,244	<i>P. putida</i> 13.2	9,133
<i>P. aeruginosa</i> 34.5	20,911	<i>P. putida</i> 83.4	14,244	<i>P. fluorescens</i> 21.5	9,133
<i>P. fluorescens</i> 35.2	20,911	<i>P. putida</i> 96.3	14,244	<i>P. aeruginosa</i> 14.1	8,911
<i>P. fluorescens</i> 95.2	20,689	<i>P. aeruginosa</i> 4.2	14,022	<i>P. putida</i> 18.4	8,911
<i>P. aeruginosa</i> 42.5	20,467	<i>P. aeruginosa</i> 11.6	14,022	<i>P. aeruginosa</i> 47.3	8,911
<i>P. aeruginosa</i> 92.3	20,244	<i>P. fluorescens</i> 20.2	14,022	<i>P. fluorescens</i> 86.2	8,911
<i>P. aeruginosa</i> 24.1	19,800	<i>P. fluorescens</i> 27.3	14,022	<i>P. stutzeri</i> 21.3	8,689
<i>P. aeruginosa</i> 20.5	19,578	<i>P. aeruginosa</i> 75.6	14,022	<i>P. fluorescens</i> 95.3	8,467
<i>P. aeruginosa</i> 35.10	19,578	<i>P. aeruginosa</i> 23.6	13,800	<i>P. mendociana</i> 8.1	8,244
<i>P. fluorescens</i> 47.6	19,578	<i>P. aeruginosa</i> 22.3	13,578	<i>P. aeruginosa</i> 33.5	8,244
<i>P. putida</i> 35.4	19,356	<i>P. fluorescens</i> 23.1	13,578	<i>P. mendociana</i> 41.1	8,244
<i>P. putida</i> 83.2	19,356	<i>P. fluorescens</i> 47.13	13,578	<i>P. mendociana</i> 68.8	8,244



Continuación...

<i>Pseudomonas</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)	<i>Pseudomonas</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)	<i>Pseudomonas</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)
<i>P. aeruginosa</i> 20.3	19,133	<i>P. putida</i> 82.4	13,578	<i>P. mendociana</i> 85.4	8,244
<i>P. mendociana</i> 23.9	19,133	<i>P. aeruginosa</i> 83.6	13,578	<i>P. putida</i> 94.3	8,244
<i>P. fluorescens</i> 6.2	18,911	<i>P. mendociana</i> 4.3	13,133	<i>P. aeruginosa</i> 5.3	8,022
<i>P. putida</i> 33.6	18,911	<i>P. putida</i> 4.5	13,133	<i>P. stutzeri</i> 8.4	7,800
<i>P. fluorescens</i> 40.6	18,911	<i>P. mendociana</i> 11.3	13,133	<i>P. fluorescens</i> 18.1	7,800
<i>P. fluorescens</i> 49.5	18,911	<i>P. mendociana</i> 16.6	13,133	<i>P. fluorescens</i> 59.5	7,800
<i>P. fluorescens</i> 82.9	18,911	<i>P. fluorescens</i> 36.3	13,133	<i>P. aeruginosa</i> 55.1	7,578
<i>P. putida</i> 83.7	18,911	<i>P. aeruginosa</i> 61.4	13,133	<i>P. fluorescens</i> 7.1	7,133
<i>P. putida</i> 13.7	18,689	<i>P. mendociana</i> 88.3	13,133	<i>P. fluorescens</i> 33.2	7,133
<i>P. putida</i> 31.8	18,689	<i>P. mendociana</i> 9.8	12,911	<i>P. aeruginosa</i> 6.5	6,911
<i>P. putida</i> 33.3	18,689	<i>P. putida</i> 25.1	12,911	<i>P. mendociana</i> 16.4	6,689
<i>P. fluorescens</i> 33.7	18,689	<i>P. putida</i> 39.2	12,911	<i>P. aeruginosa</i> 48.7	6,689
<i>P. putida</i> 38.5	18,467	<i>P. aeruginosa</i> 50.2	12,911	<i>P. putida</i> 85.2	6,689
<i>P. mendociana</i> 53.9	18,467	<i>P. putida</i> 15.1	12,689	<i>P. fluorescens</i> 25.10	6,467
<i>P. aeruginosa</i> 93.1	18,467	<i>P. fluorescens</i> 31.1	12,689	<i>P. aeruginosa</i> 17.1	6,244
<i>P. putida</i> 78.7	18,244	<i>P. stutzeri</i> 37.1	12,689	<i>P. stutzeri</i> 68.3	6,244
<i>P. fluorescens</i> 30.4	18,022	<i>P. aeruginosa</i> 96.6	12,689	<i>P. fluorescens</i> 88.1	6,244
<i>P. aeruginosa</i> 43.1	18,022	<i>P. stutzeri</i> 3.1	12,467	<i>P. aeruginosa</i> 5.10	5,800
<i>P. putida</i> 14.2	17,800	<i>P. fluorescens</i> 23.7	12,467	<i>P. fluorescens</i> 62.3	5,800
<i>P. mendociana</i> 15.6	17,800	<i>P. aeruginosa</i> 23.8	12,467	<i>P. putida</i> 85.5	5,800
<i>P. putida</i> 25.3	17,800	<i>P. aeruginosa</i> 30.6	12,467	<i>P. aeruginosa</i> 48.2	5,578
<i>P. putida</i> 34.2	17,800	<i>P. aeruginosa</i> 37.5	12,467	<i>P. aeruginosa</i> 74.1	5,578
<i>P. aeruginosa</i> 18.3	17,578	<i>P. fluorescens</i> 36.1	12,244	<i>P. mendociana</i> 68.6	5,133
<i>P. putida</i> 31.5	17,578	<i>P. putida</i> 68.7	12,244	<i>P. mendociana</i> 87.3	5,133
<i>P. aeruginosa</i> 82.3	17,578	<i>P. fluorescens</i> 95.1	12,244	<i>P. mendociana</i> 68.4	4,689

**Tabla 8.** Valores (ppm) de amonio, fósforo soluble e indoles correspondientes a cultivos de *Pseudomonas* spp. seleccionados

<i>Pseudomonas</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)	Fósforo soluble (ppm)	Indoles (ppm)
<i>P. stutzeri</i> 37.1	25,869	0,289	12,689
<i>P. fluorescens</i> 6.5	24,931	0,072	6,911
<i>P. aeruginosa</i> 35.10	16,144	38,080	19,578
<i>P. putida</i> 61.4	16,072	11,546	13,133
<i>P. putida</i> 33.8	19,932	0	34,689
<i>P. mendociana</i> 35.5	13,149	0,303	31,800

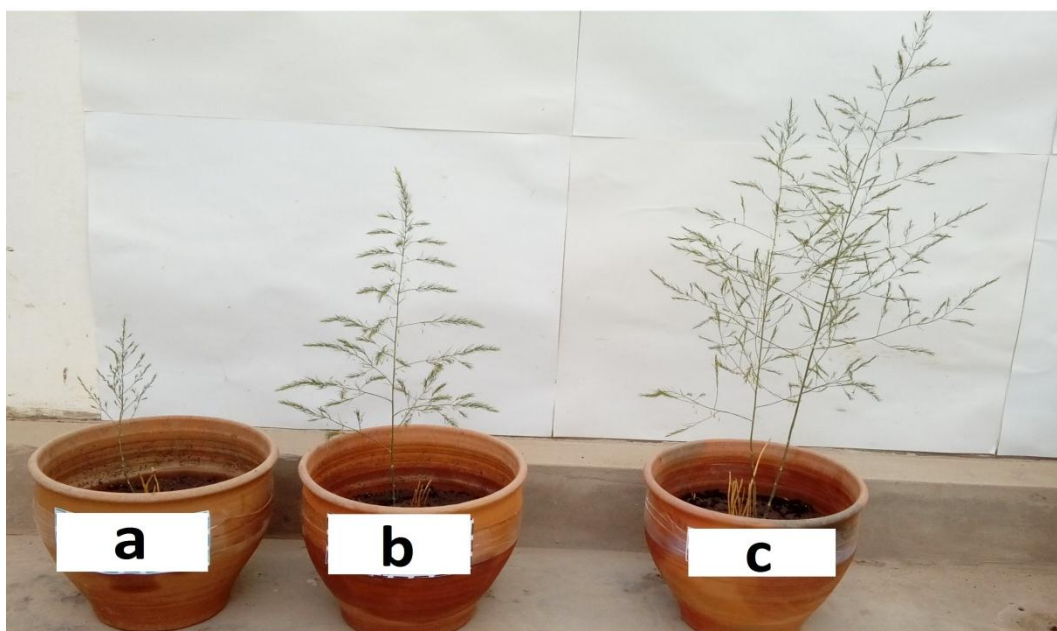
La altura de las plantas de espárrago a los 30 días fue de 36,00 a 48,00 cm con *Pseudomonas* spp.; 27,67 cm en el testigo absoluto y 29,67 cm en el testigo químico (Figuras 26 a 28), registrándose índices de efectividad de 30,10% con *P. putida* 33.8 y 73,47% con *P. putida* 33.8 (Tabla 9). El análisis de varianza de los valores de altura demostró alta significancia (Anexo 7) y según la prueba múltiple de Tukey (Tabla 10) el mayor valor se alcanzó con *P. putida* 33.8, no diferenciándose significativamente de *P. stutzeri* 37.1, *P. mendociana* 35.5 y *P. fluorescens* 6.5, pero si de los demás tratamientos.

El número de tallos de las plantas de espárrago a los 30 días fue de 1,67 a 2,33 con *Pseudomonas* spp.; 1,0 tallo en el testigo absoluto y 1,33 en el testigo químico (Figura 29), registrándose índices de efectividad de 67,00% con *P. putida* 33.8 y *P. aeruginosa* 35.10; *P. stutzeri* 37.1 y 133,00% con *P. fluorescens* 6.5 y *P. mendociana* 35.5 (Tabla 11). El análisis de varianza de los valores del número de tallos no demostró significancia (Anexo 8).

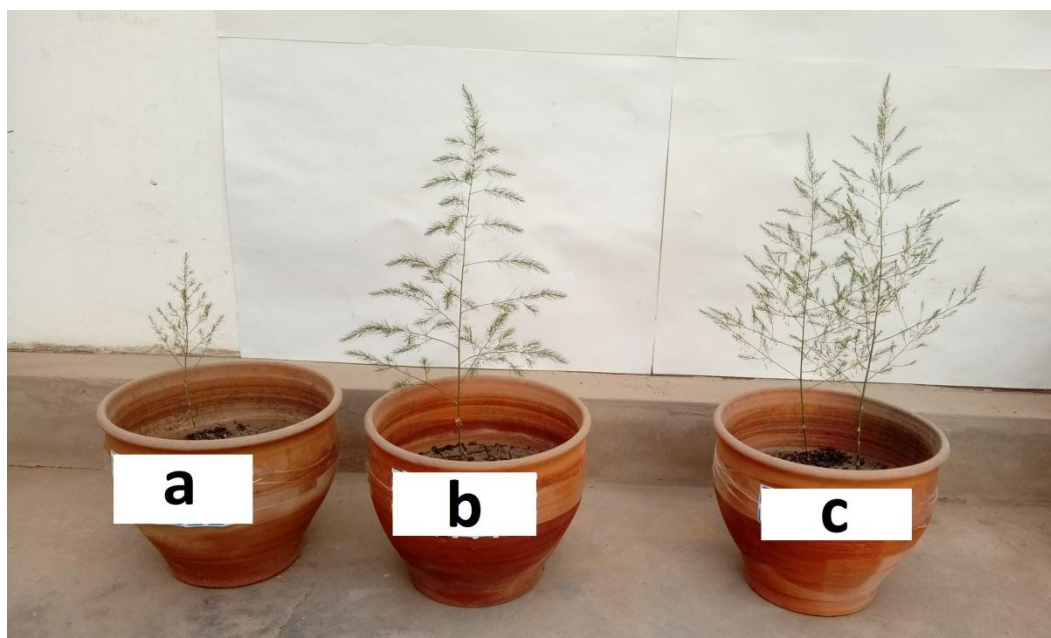
La altura de las plantas de espárrago a los 45 días fue de 52,67 a 68,67 cm con *Pseudomonas* spp.; 38,00 cm en el testigo absoluto y 39,33 cm en el testigo químico (Figuras 30, 31), registrándose índices de efectividad de 38,61% con *P. putida* 61.4 y 80,71% con *P. putida* 33.8 (Tabla 9). El análisis de varianza de los valores de altura demostró alta significancia y según la prueba múltiple de Tukey (Tabla 10) el mayor valor se alcanzó con *P. putida* 33.8, no diferenciándose significativamente de *P. stutzeri* 37.1, pero si de los demás tratamientos.

El número de tallos de las plantas de espárrago a los 45 días fue de 1,67 a 2,67 con *Pseudomonas* spp.; 1,33 tallos en el testigo absoluto y 2,0 tallos en el testigo químico (Figura 32), registrándose índices de efectividad de 25,56% con *P. aeruginosa* 35.10 y 100,75% con *P. putida* 61.4, *P. mendociana* 35.5 y *P. stutzeri* 37.1 (Tabla 11). El análisis de varianza de los valores del número de tallos no demostró significancia.

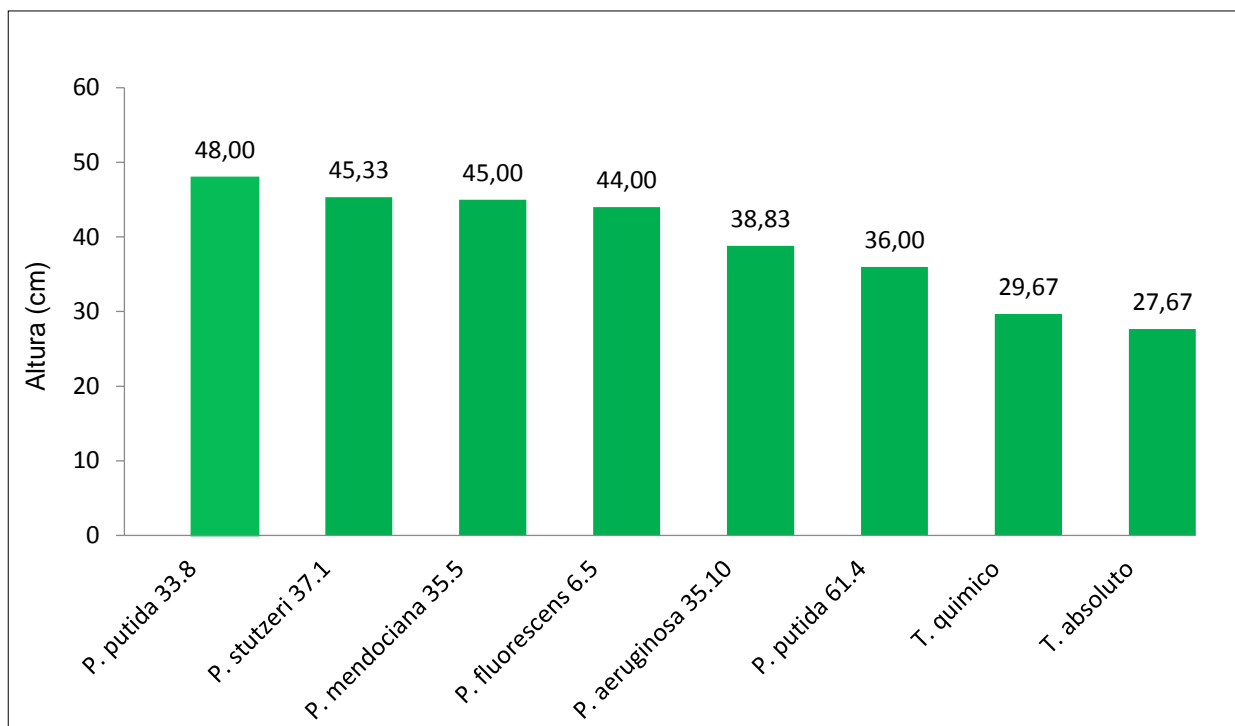
La altura de las plantas de espárrago a los 60 días fue de 62,0 a 85,33 cm con *Pseudomonas* spp.; 55,0 cm en el testigo absoluto y 56,33 cm en el testigo químico (Figuras 33,34), registrándose índices de efectividad de 12,73% con *P. putida* 61.4 y 55,15% con *P. putida* 33.8 (Tabla 9).



**Figura 26.** Plantas de *Asparagus officinalis* L. 30 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *P. putida* 33.8.



**Figura 27.** Plantas de *Asparagus officinalis* L. 30 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico c) *P. putida* 61.4.



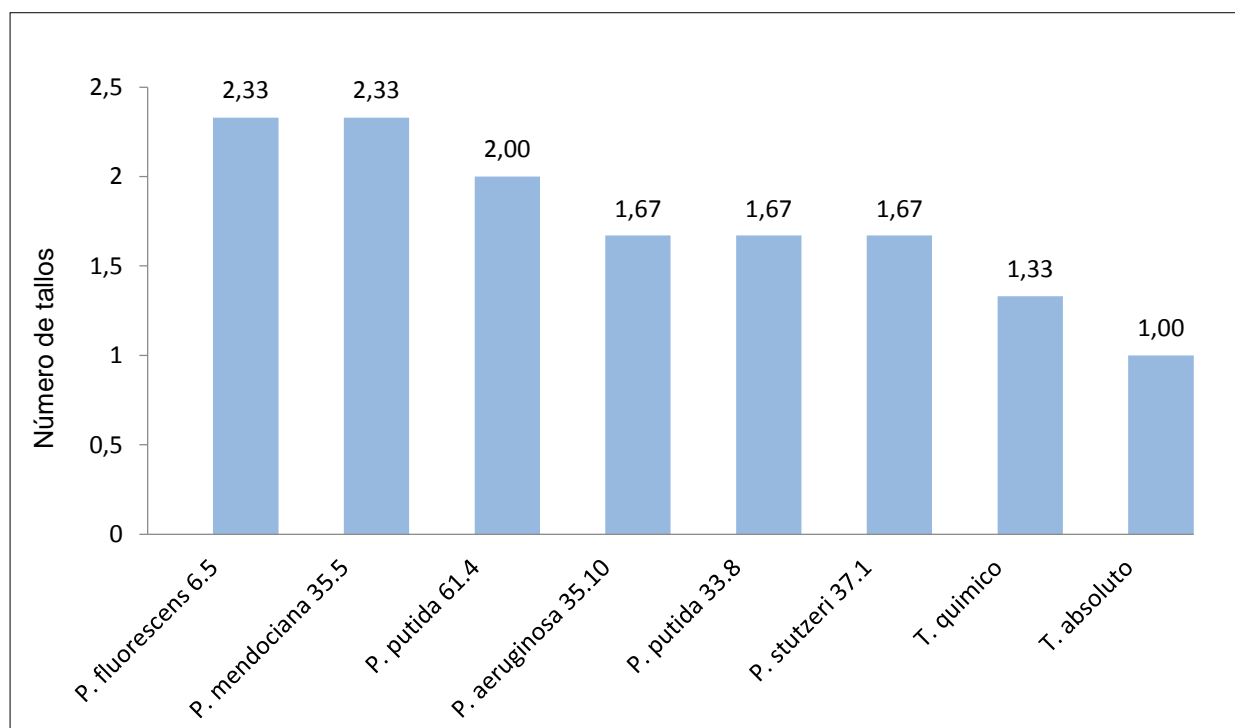
**Figura 28.** Altura (cm) de *Asparagus officinalis* L., 30 días después de la inoculación de *Pseudomonas* spp.

**Tabla 9.** Índices de efectividad (%) de *Pseudomonas* spp. en la altura de *Asparagus officinalis* L. a los 30, 45 y 60 días

<i>Pseudomonas</i> spp. código UNPRG	IE%		
	30 días	45 días	60 días
<i>P. fluorescens</i> 6.5	59,02	46,50	16,96
<i>P. mendociana</i> 35.5	62,63	46,50	33,33
<i>P. putida</i> 61.4	30,10	38,61	12,73
<i>P. aeruginosa</i> 35.10	40,33	43,87	14,55
<i>P. putida</i> 33.8	73,47	80,71	55,15
<i>P. stutzeri</i> 37.1	63,82	56,13	47,87
T. químico	7,23	3,50	2,42

**Tabla 10.** Prueba de Tukey de la altura de plantas de *Asparagus officinalis* L. a los 30, 45 y 60 días después de la inoculación de *Pseudomonas* spp.

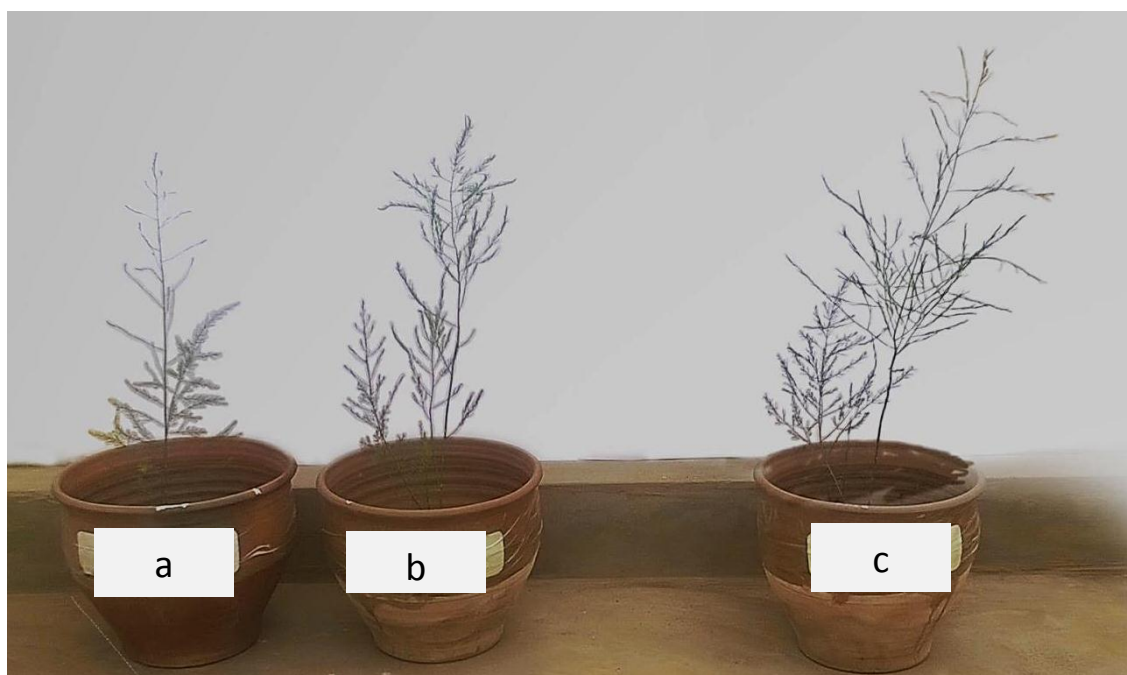
<i>Pseudomonas</i> spp. código UNPRG	Altura (cm)					
	30 días	Sign	45 días	Sign	60 días	Sign
<i>P. fluorescens</i> 6.5	44,00	ab	55,67	b	64,33	c
<i>P. mendociana</i> 35.5	45,00	ab	55,67	b	73,33	b
<i>P. putida</i> 61.4	36,00	cd	52,67	b	62,00	cde
<i>P. aeruginosa</i> 35.10	38,83	bc	54,67	b	63,00	cd
<i>P. putida</i> 33.8	48,00	a	68,67	a	85,33	a
<i>P. stutzeri</i> 37.1	45,33	ab	59,33	ab	81,33	a
T. químico	29,67	de	39,33	c	56,33	de
T. absoluto	27,67	e	38,00	c	55,00	e



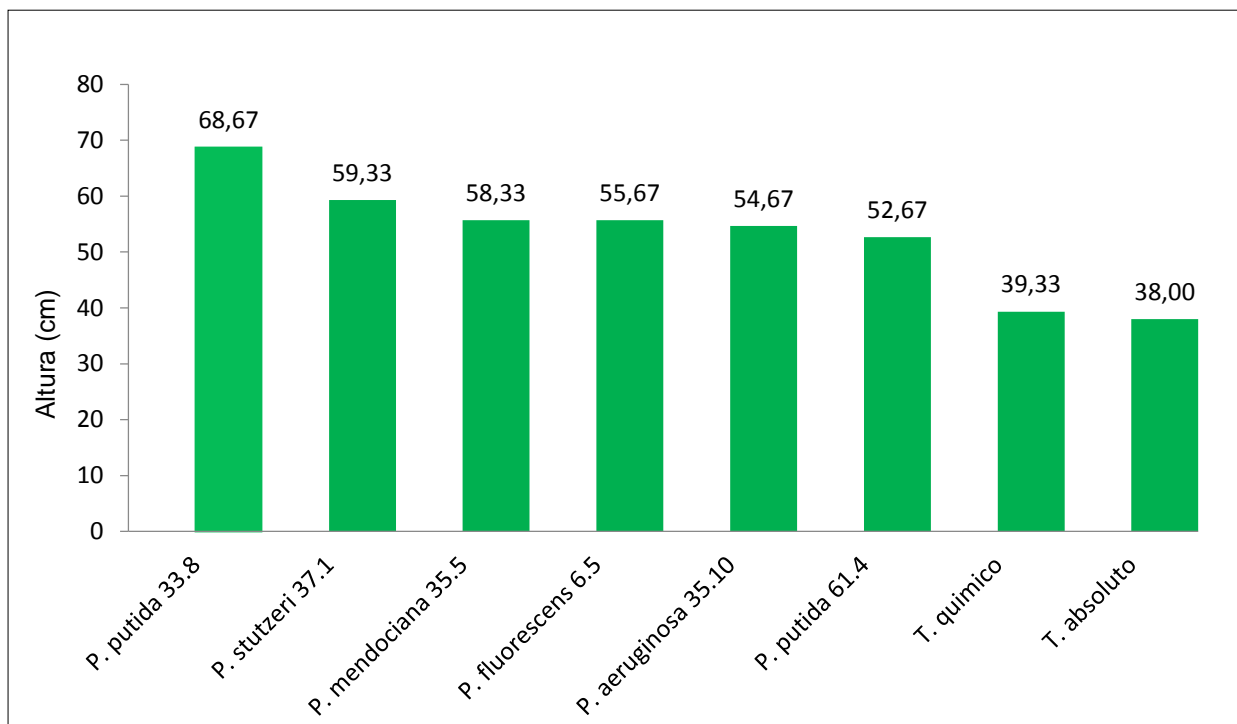
**Figura 29.** Número de tallos de *Asparagus officinalis* L., 30 días después de la inoculación de *Pseudomonas* spp.

**Tabla 11.** Índices de efectividad (%) de *Pseudomonas* spp. en el número de tallos de *Asparagus officinalis* L. a los 30, 45 y 60 días

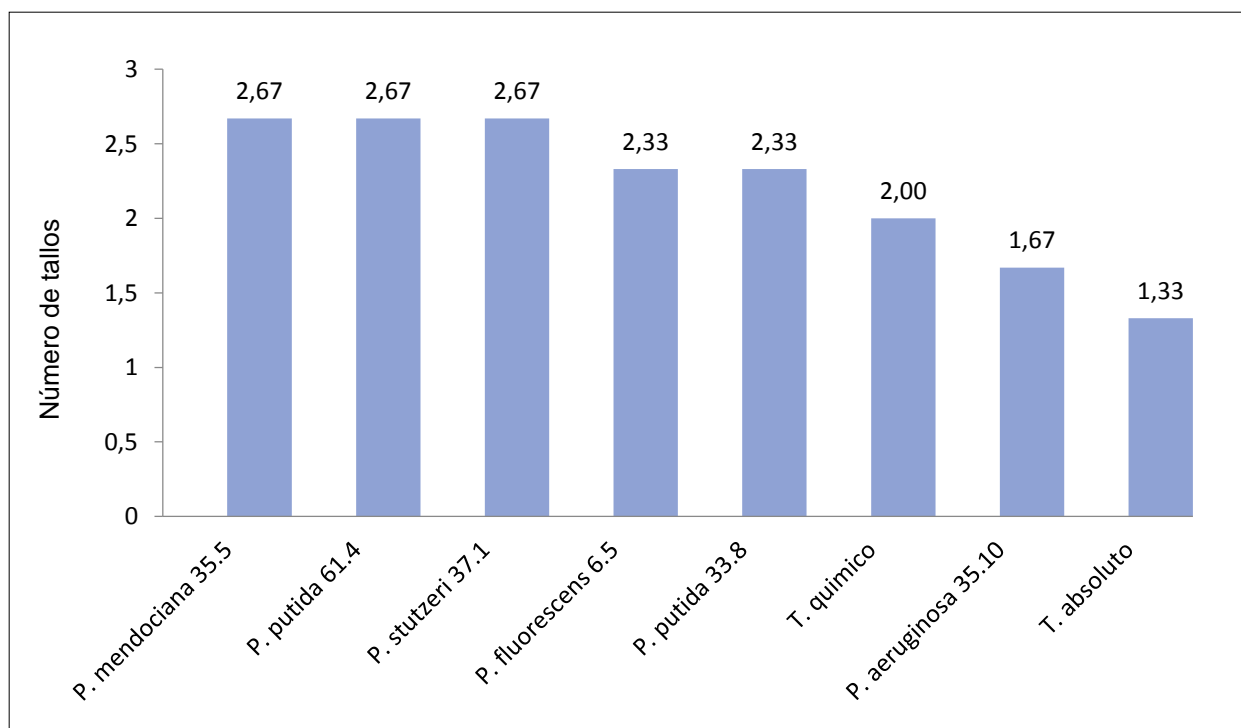
<i>Pseudomonas</i> spp. código UNPRG	IE%		
	30 días	45 días	60 días
<i>P. fluorescens</i> 6.5	113,00	100,00	99,40
<i>P. mendociana</i> 35.5	113,00	100,75	139,52
<i>P. putida</i> 61.4	100,00	100,75	119,76
<i>P. aeruginosa</i> 35.10	67,00	25,56	79,64
<i>P. putida</i> 33.8	67,00	100,00	99,40
<i>P. stutzeri</i> 37.1	67,00	100,75	119,76
T. químico	33,00	58,38	100,00



**Figura 30.** Plantas de *Asparagus officinalis* L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *P. fluorescens* 6.5.



**Figura 31.** Altura (cm) de *Asparagus officinalis* L., 45 días después de la inoculación de *Pseudomonas* spp.

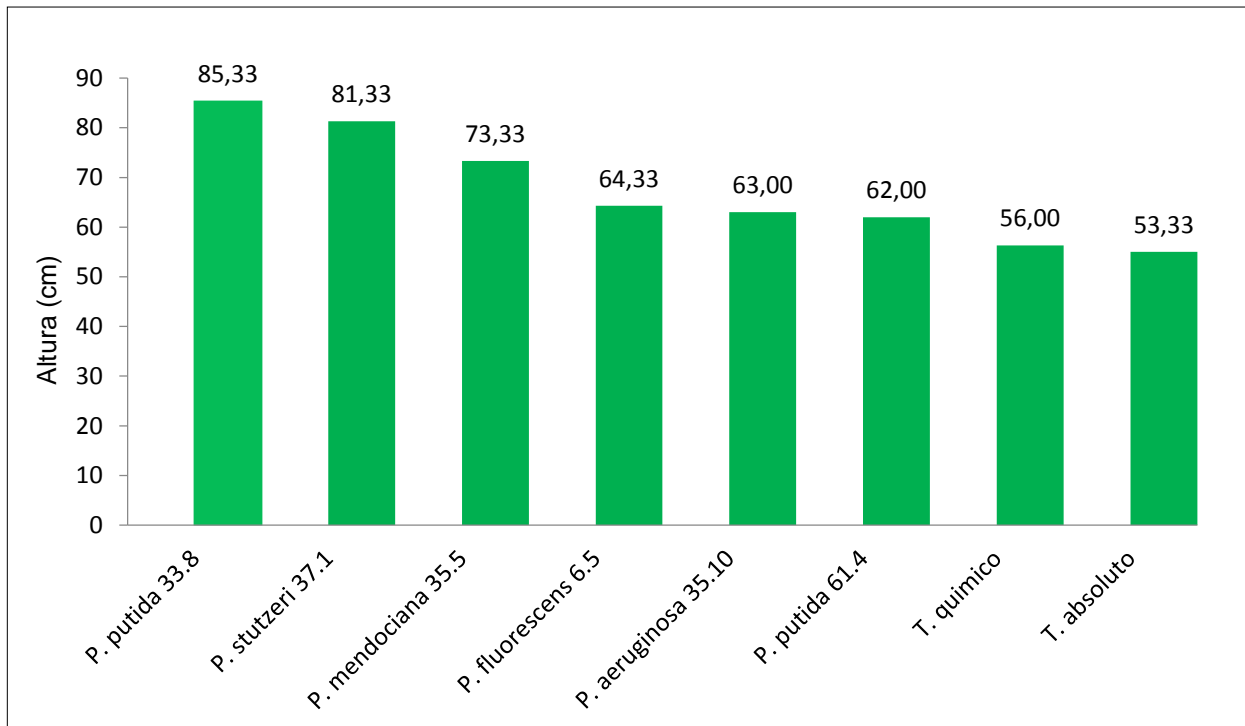


**Figura 32.** Número de tallos de *Asparagus officinalis* L., 45 días después de la inoculación de *Pseudomonas* sp.





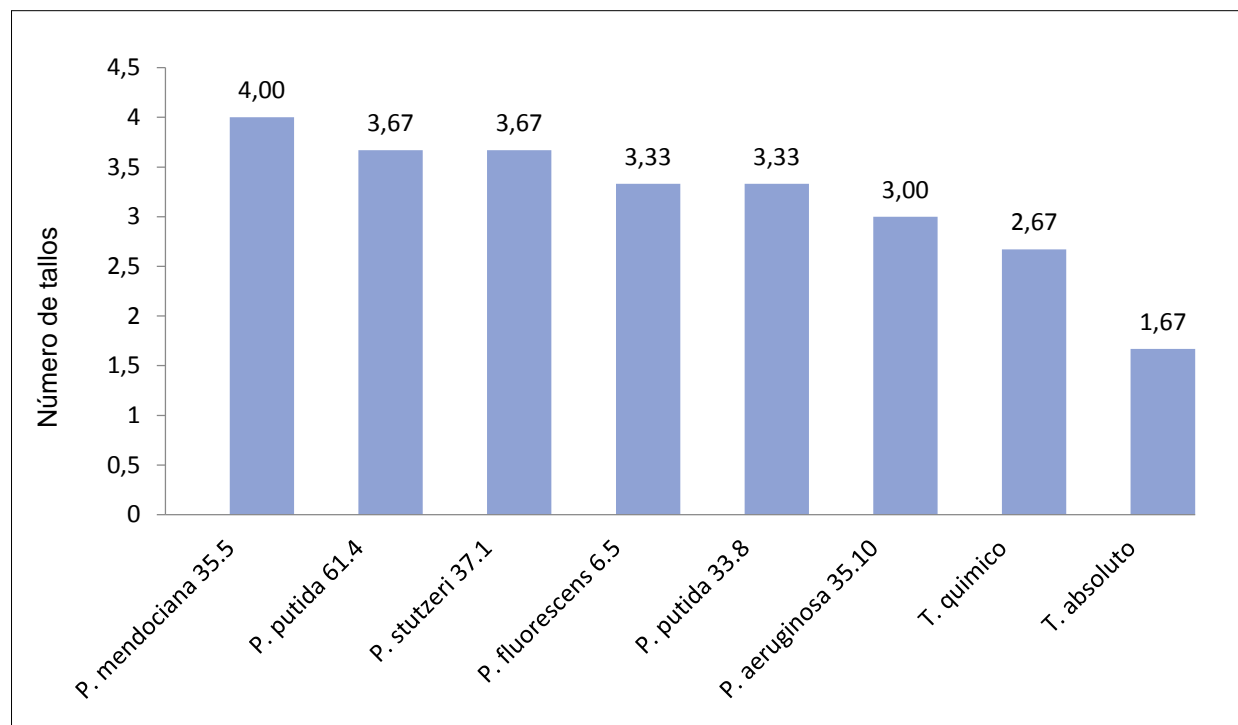
**Figura 33.** Plantas de *Asparagus officinalis* L. 60 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *P. putida* 33.8.



**Figura 34.** Altura (cm) de *Asparagus officinalis* L., 60 días después de la inoculación de *Pseudomonas* spp.

El análisis de varianza de los valores de altura demostró alta significancia y según la prueba múltiple de Tukey (Tabla 10) los mayores valores se alcanzaron con *P. putida* 33.8 y *P. stutzeri* 37.1, sin diferencias significativas entre ellas, pero sí con los demás tratamientos.

El número de tallos de las plantas de espárrago a los 60 días fue de 3,00 a 4,0 con *Pseudomonas* spp.; 1,67 tallos en el testigo absoluto y 2,67 tallos en el testigo químico (Figura 35), registrándose índices de efectividad de 79,64% con *P. aeruginosa* 35.10 y 139,52% con *P.mendociana* 35.5 (Tabla 11). El análisis de varianza de los valores de número de tallos no demostró significancia.



**Figura 35.** Número de tallos de *Asparagus officinalis* L., 60 días después de la inoculación de *Pseudomonas* spp.

## V. DISCUSIÓN

El aislamiento de las bacterias del género *Pseudomonas* en el rizoplasma y rizósfera de espárrago coinciden con Pérez et al. (2004). En la rizósfera y rizoplasma existe una intensa actividad microbiana y entre los microorganismos probióticos que habitan este nicho se encuentran las rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPR), que agrupan especies de *Pseudomonas* (Droge et al., 2012). De igual manera, estas bacterias fueron reportadas en la rizósfera de *Lycopersicon esculentum* Mill “tomate” (Alfonso et al., 2005; León, 2014), *Zea mays* L. “maíz” (Costa et al., 2006; Alvarado & Valderrama, 2014), *Oryza sativa* L. “arroz” (Rives et al., 2008), *Phaseolus lunatus* L. “pallar” (Carreño, 2009), *Gossypium herbaceum* L. “algodón” (Salaheddin et al., 2010) y *Musa* sp. “banano” (Thomas & Sekhar, 2016).

El porcentaje de las muestras de espárrago positivo al aislamiento e identificación de *Pseudomonas* spp. superó a 53,13% reportado por Cadena & Martínez, (2011) en la rizósfera de maíz. Bacterias de las familias Burkholderiaceae y Pseudomonadaceae son dominantes en la microbiota rizosférica, por su habilidad para utilizar un amplio rango de sustratos carbonados (Philippot et al., 2013), por lo que se postula que estas bacterias son atraídas y estimuladas por la presencia y composición de los distintos exudados radiculares (Berg & Smalla, 2009). En la interacción de cooperación, la especificidad entre la bacteria y la planta es menos estricta que en las asociaciones planta-microorganismo de los tipos parasitismo y mutualismo; no obstante, existe una tendencia de reconocimiento y adaptación de cepas no específicas hacia rasgos específicos del genotipo vegetal, lo que implicaría un papel relevante por parte de los exudados de las plantas hacia las PGPR (Droge et al., 2012).

El medio de cultivo agar Cetrimide fue utilizado previamente por Pérez et al. (2004) y Guerra et al. (2011) para aislar *Pseudomonas* spp. de raíces de espárrago y *Pisum sativum* L. “arveja”. En el agar Cetrimide desarrollan *Pseudomonas* fluorescentes y no fluorescentes (Campos et al., 2007; Ávila et al., 2014). Las *Pseudomonas* fluorescentes incluyen entre otras a *P. fluorescens*, *P. putida* y *P. aeruginosa*. Las *Pseudomonas* no fluorescentes agrupan a *P. mendociana* y *P. stutzeri* (Botelho & Mendoca, 2006). A diferencia, en la búsqueda de *Pseudomonas* spp. promotoras de crecimiento en plantas, investigadores como Costa et al. (2006) y Uribe et al. (2012) utilizaron agar King B, medio diferencial para especies productoras de pigmentos fluorescentes, importantes colonizadoras vegetales, con eficiente control de patógenos en el suelo (Guerra et al., 2011).

La identificación fenotípica del género *Pseudomonas* también fue realizada por Costa et al. (2006), Stechmann (2011) y Barba & Bravo (2013); no obstante, la caracterización molecular determina una mayor diversidad en los microorganismos investigados (De la Torre et al., 2016). En las bacterias aisladas de espárrago se identificaron cinco especies, tres de ellas reportadas previamente por Costa et al. (2006) en maíz (*P. putida*, *P. fluorescens*) y Pérez et al. (2004) en espárrago (*P. aeruginosa*).

El amonio cuantificado *in vitro* evidenció la fijación de nitrógeno *in vitro*, coincidiendo con Trivedy et al. (2008) y Cadena & Martínez (2011). Especies de *Pseudomonas* pueden fijar el nitrógeno atmosférico a través del complejo enzimático nitrogenasa, tal que una molécula de nitrógeno es reducida a dos de amoníaco, que rápidamente se ionizan hasta amonio, fácilmente asimilable por la planta (Mayz, 2004). La concentración de amonio alcanzó 25,869 ppm, valor que superó 24,74 ppm registradas por Dávila & Linares (2013) para *Pseudomonas* spp. aisladas de piñon blanco.

La solubilización de fosfato insolubles es una característica en la que destacan las especies de *Pseudomonas* y fue demostrada previamente por Carreño (2009), Kumar & Saraf (2011) y Patiño & Sánchez (2012). Como producto de la solubilización de fosfato se cuantificaron hasta 38,088 ppm de fósforo soluble o disponible, valor similar a 37,8 ppm reportadas por De la Torre et al. (2016) para *Pseudomonas mosselii*. En términos de capacidad

solubilizadora de fosfatos, *Pseudomonas* es uno de los géneros bacterianos mas eficientes (Patiño & Sánchez, 2012). Los mecanismos de solubilización están asociados a la producción de ácidos orgánicos, respectivamente a través de la oxidación de glucosa a ácido glucónico por oxidación directa, con la consecuente acidificación del medio de cultivo (Naik et al., 2008).

La producción de indoles por *Pseudomonas* spp. fue reportada previamente en aislados de maíz (Picard & Bosco, 2005), papa (Stechmann, 2011) y piñon blanco (Kumar & Saraf, 2011). Se cuantificaron hasta 34,689 ppm de indoles, valor superior a 15,7 ppm alcanzadas por *P. mosselli* aisladas en *Agave americana* (De la Torre et al., 2016); no obstante, el valor es inferior a 52 ppm registradas para aislados de piñon blanco (Kumar & Saraf, 2011)

Las bacterias seleccionadas para determinar el efecto en el desarrollo de las plantas de espárrago alcanzaron las mayores concentraciones de amonio, fósforo soluble e indoles, coincidiendo De la Torre et al., (2016). La selección de las PGPR es crítica, debido a que la respuesta de la planta es muy variable, dependiendo de la cepa bacteriana, genotipo de la planta y condiciones del experimento (Khalid et al., 2009).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fosfato y productoras de indoles incrementaron la altura y número de tallos de las plantas de espárrago, efecto promotor del crecimiento previamente observado en arroz (Rives et al., 2009), *Pisum sativum* L. “arveja” (Guerra et al., 2011), maíz (Alvarado & Valderrama, 2014), lechuga (Sánchez et al., 2014) y *Agave americana* (De la Torre et al., 2016).

La promoción de crecimiento en plantas por *Pseudomonas* spp. se evidencia en el incremento de la emergencia (Guerra et al., 2011), altura, biomasa, área foliar, longitud de raíces, contenido de fósforo en hojas (Sánchez et al., 2014), peso de las plantas, diámetro de tallo, número de hojas, contenido de inulina de hojas y raíces (De la Torre et al., 2016). Asimismo, se observa disminución de la incidencia de enfermedades en condiciones de invernadero y campo (Costa et al., 2006; Trivedy et al., 2008; Guerra et al., 2011).

*P. aeruginosa* 35.10 demostró potencial *in vitro* e *in vivo* como promotor de crecimiento en plantas de espárrago. Esta especie bacteriana es patogénica para los seres vivos (Villa et al., 2013); no obstante, constituye un modelo de investigación, considerando su frecuente aislamiento como rizósferico y endófito y su efecto antagonista a diferentes fitopatógenos (Liu & Li, 2008; Thomas & Sekhar, 2016).

## VI. CONCLUSIONES

- ✓ En el rizoplasma y rizósfera de espárrago fueron aisladas bacterias del género *Pseudomonas*, identificándose fenotípicamente *P. aeruginosa* (33,33%), *P. fluorescens* (25,74%), *P. putida* (23,63%), *P. mendociana* (14,35%) y *P. stutzeri* (2,95%).
- ✓ Las *Pseudomonas* aisladas e identificadas fijaron *in vitro* nitrógeno (10,465 a 25,869 ppm de amonio), solubilizaron fosfato tricálcico (1,014 a 38,080 ppm de fósforo soluble) y produjeron indoles (4,689 a 34,689 ppm de indoles).
- ✓ Los cultivos de *Pseudomonas* seleccionados fueron los que alcanzaron los mayores valores en la concentración de amonio: *P. stutzeri* 37.1 y *P. fluorescens* 6.5; concentración de fósforo soluble: *P. aeruginosa* 35.10 y *P. putida* 61.4 y concentración de indoles: *P. putida* 33.8 y *P. mendociana* 35.5.
- ✓ Las *Pseudomonas* demostraron su potencial como promotoras de crecimiento en plantas, al incrementar la altura con IE= 12,73 a 80,71% y el número de tallos con IE= 25,56 a 139,52% de plantas de espárrago, en condiciones de invernadero.



## VII. RECOMENDACIONES

- ✓ Identificar a nivel molecular *P. fluorescens* 6.5; *P. mendociana* 35.5; *P.putida* 61.4 y 33.8; *P. aeruginosa* 35.10 y *P. stutzeri* 37.1.
- ✓ Determinar el efecto de *P. fluorescens* 6.5; *P. mendociana* 35.5; *P.putida* 61.4 y 33.8; *P. aeruginosa* 35.10 y *P. stutzeri* 37.1 en el desarrollo vegetativo y rendimiento en condiciones de campo, con y sin fertilizante químico.
- ✓ Investigar sustratos orgánicos de bajo costo para el incremento masivo de *P. fluorescens* 6.5; *P. mendociana* 35.5; *P.putida* 61.4 y 33.8; *P. aeruginosa* 35.10 y *P. stutzeri* 37.1.

## VIII. RESUMEN

En el rizoplasma y rizósfera de *Asparagus officinalis* L. “espárrago” se aislaron *Pseudomonas* spp., con el objetivo de determinar su potencial como promotoras de crecimiento en plantas. Las bacterias se aislaron en agar Cetrimide y las colonias desarrolladas se identificaron fenotípicamente. Se cuantificó el nitrógeno fijado como amonio, fósforo soluble producto de la solubilización de fosfato tricálcico e indoles producidos por las bacterias *in vitro*. Los seis cultivos de *Pseudomonas* spp. que alcanzaron los mayores valores, se inocularon por aspersión en coronas de espárrago cultivar UC-157 F2 y se determinó el efecto en la altura y número de tallos, durante 60 días en invernadero. Se obtuvieron 237 cultivos de *Pseudomonas* spp., identificándose *P. aeruginosa* (33,33%), *P. fluorescens* (25,74%), *P. putida* (23,63%), *P. mendociana* (14,35%) y *P. stutzeri* (2,95%). Las *Pseudomonas* spp. fijaron nitrógeno, solubilizaron fosfato tricálcico y produjeron indoles *in vitro*, cuantificándose 10,465 a 25,869 ppm de amonio; 1,014 a 38,080 ppm de fósforo soluble y 4,689 a 34,689 ppm de indoles. Los seis cultivos de *Pseudomonas* spp. con los mayores valores demostraron su potencial como promotores de crecimiento en plantas, incrementando la altura (IE= 12,73 a 80,71%) y el número de tallos (IE= 25,56 a 139,52%) de plantas de espárrago, en condiciones de invernadero.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adjanohoun, A., Allagbe, M., Noumavo, P., Gotoechan, H., Sikirou, R., Dossa, K., GleleKakaï, R., Kotchoni, S. & Baba, L. (2011). Effects of plant growth promoting rhizobacteria on field grown maize. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 11(3), 1457–1465.
- Aguado, A. & Moreno, B. (2008). Potencial de bioinoculantes microbianos como una alternativa para reducir costos de fertilización en maíz de temporal. Recuperado de <http://www.google.com.pe/url?sa=t&rct=j&q=Potencialdebioinoculantesmicrobianos.formularios%2Fdownload.php%3Fid%3DINIFAP.pdf>
- Aguado, S. (Ed.). (2012). *Introducción al Uso y Manejo de los Biofertilizantes en la Agricultura*. Celaya, México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, INIFAP/Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA.
- Ahmadzadeh, M. & Tehrani, A. (2009). Evaluation of *fluorescent Pseudomonas* for plant growth promotion, antifungal activity against *Rhizoctonia solani* in common bean, and biocontrol potencial. *Biological Control*, 48(2), 101-107.
- Alfonso, E., Leyva, A. & Hernández, A. (2005). Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 7(2), 47-54.
- Alvarado, P. & Valderrama, M. (2014). *Caracterización de los géneros Burkholderia y Pseudomonas solubilizadoras de fosfato aisladas de Zea mays L. en el distrito de Reque en Lambayeque marzo-mayo, 2014*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.

- Asprelli, P., López, F. & Cointy, E. (2005). Caracteres agronómicos en el cultivo de espárrago de diferentes edades y manejos. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 40(1), 47-52.
- Ávila, S., Estupiñán, S., Mejía, M. & Mora, L. (2014). La calidad bacteriológica del agua del Humedal Jaboque (Bogotá, Colombia) en dos épocas contrastantes. *Caldasia*, 36(2), 323-329.
- Barba, S. & Bravo, R. (2013). *Especies de Burkholderia y Pseudomonas aisladas de la rizósfera de malezas y su potencial como promotoras del crecimiento de plantas en Lambayeque, 2012*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Bashan, Y., Holguin, G. & Ferrera, R. (1996). Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos I. *Azospirillum*. *Terra*, 14(2), 159-194.
- Becerra, M. & Gil, L. (2009). *Efecto de Pseudomonas spp. solubilizadoras de fosfatos en el desarrollo vegetativo de "maíz" (Zea mays L.) en Ferreñafe, Lambayeque*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Beracochea, M. (2011). *Respuesta de variedades comerciales de maíz (Zea mays L.) a la inoculación con bacterias endófitas diazótrofes nativas*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de la República, Uruguay.
- Berg, G. & Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 68(1), 1-13.
- Bhattacharyya, P. & Jha, D. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327-1350.
- Borrego, A. (2014). *Las enmiendas orgánicas del suelo en el control de las Fusariosis del espárrago y del tomate*. (Tesis Doctorado). Universidad de Córdoba, España.
- Botelho, G. & Mendonca, L. (2006). Fluorescent Pseudomonads associated with the rhizosphere of crops-an overview. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37, 401-416.
- Cadena, S. & Martínez, B. (2011). *Caracterización de cepas de Pseudomonas spp. y su efecto en la germinación y emergencia de Zea mays L. "maíz" en Lambayeque*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Calderón, M. (2004). *Presencia de enfermedades fungosas en el cultivo de espárrago (Asparagus officinalis L.) en la península de Santa Elena, Guayas, Ecuador*. (Tesis de Ingeniero Agropecuario). Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.

- Campos, V., Valenzuela, C., Alcorta, M., Escalante, G. & Mondaca, M. (2007). Aislamiento de bacterias resistentes a arsénico desde muestras de rocas volcánicas de la quebrada Camarones, Región Parinacota. Chile. *Gayana*, 71(2), 150-155.
- Cano, M. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. *Revista U.D.C.A. Actualidad & Divulgación Científica*, 14(2), 15–31.
- Carreño, C. (2009). *Efecto de la inoculación de bacterias nativas solubilizadoras de fósforo en el desarrollo y rendimiento de tres cultivos agrícolas en Mochumí, Lambayeque, Perú*. (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Córdova, L. (2016). *Efecto de Azospirillum spp. nativas en el desarrollo vegetativo de Zea mays L. “maíz” en invernadero*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Corrales, L., Sánchez, L., Cuervo, J., Joya, J. & Márquez, K. (2012). Efecto biocontrolador de *Bacillus* spp. frente a *Fusarium* sp. bajo condiciones de invernadero en plantas de tormillo (*Thymus vulgaris* L.). *Nova-Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 10(17), 64-82.
- Costa, R., Gomes, N., Peixoto, R., Rumjanek, N., Berg, G., Mendonça-Hagler, L. & Smalla, K. (2006). Diversity and antagonistic potential of *Pseudomonas* spp. associated to the rhizosphere of maize grown in a subtropical organic farm. *Soil Biology & Biochemistry*, 38, 2434-2447.
- Criollo, P., Obando, M., Sánchez, L. & Bonilla, R. (2012). Efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) asociadas a *Pennisetum clandestinum* en el altiplano cundiboyacense. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 13(2), 189-195.
- Dávila, J. & Linares, V. (2013). *Especies de Burkholderia y Pseudomonas aisladas de la rizósfera de Jatropha curcas L. “piñón blanco” y su potencial como promotores del crecimiento de plantas en Lambayeque, 2012*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Dávila, J. (2004). *Elementos para una agricultura orgánica e introducción de cultivos alternativos para suelos con problemas de salinidad*. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- De la Torre, N., Ruíz, V., Rincón, C., Rodríguez, M., Arias, C., Guitiérrez, A., Palomeque, H. & Rincón, R. (2016). Effect of plant growth-promoting bacteria on the growt and fructan production of *Agave americana* L. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 587-596.
- Delgado, A. (2007). *Producción y comercialización de espárrago en el valle de Virú*. (Tesis de Maestría). Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, Perú.

- Delgado, Y., Cupull, R., Pérez, C., Sánchez, A. & Vílchez, M. (2003). Efecto de *Azotobacter* spp. en la estimulación de la germinación y el desarrollo de posturas de *Coffea arabica* L. *Centro Agrícola*, 30(1), 26-32.
- Doumbou, C., Hamby, M., Crawford, D. & Beaulieu, C. (2002). Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection*, 82(3), 85-102.
- Droge, B., Dore, H., Borland, S., Wisniewski, F. & Prigent, C. (2012). Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants? *Research in Microbiology*, 163, 500-510.
- Egamberdiyeva, D. (2007). The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology*, 36, 184-189.
- 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* 2(1), 39-49.
- Fan, Z., Miao, C., Qiao, X., Zheng, Y., Chen, H., Chen, Y., Xu, L., Zhao, L. & Guan, H. (2016). Diversity, distribution, and antagonistic activities of rhizobacteria of *Panax notoginseng*. *Journal of Ginseng Research*, 40, 97-104.
- Farías, V., Krarup, C. & Contreras, S. (2004). Efectos de población sobre rendimiento y calidad de turiones de cuatro cultivares de espárrago. *Scientia Agropecuaria*, 31, 119-127.
- Franco, M. (2008). *Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas*. (Tesis de Doctorado). Universidad de Granada, España.
- García, F. & Muñoz, H. (2010). *Caracterización de cepas nativas de Azospirillum spp. y su efecto como promotoras del desarrollo vegetativo de arroz (Oryza sativa)*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Guerra, G., Betancourth, C. & Salazar, C. (2011). Antagonismo de *Pseudomonas fluorescens* Migula frente a *Fusarium oxysporum* fsp. *pisi* Schtdl en arveja *Pisum sativum* L. *Revista U.D.C.A. Actualidad & Divulgación Científica*, 14(2), 33-42.
- Guillen, R., Hernández, F., Gallegos, G., Rodríguez, R., Aguilar, C., Padrón, E. & Reyes, M. (2006). *Bacillus* spp., como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(2), 105-114.

- Hernández, A., Heydrich, M., Velázquez, M. & Hernández, A. (2006). Perspectivas del empleo de rizobacterias como agentes de control biológico en cultivos de importancia económica. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24 (1), 42-49.
- Hernández, R., Fernández, C. & Baptista, P. (2014). *Metodología de la Investigación* (6<sup>ta</sup> ed). México: Mc Graw, Hill Interamericana Editores S.A.
- Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Stanley, J. & Willians, S. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. (9<sup>th</sup>ed.) Estados Unidos: Lippincott Willians & Wilkins.
- Idriss, E. Iglesias, D., Talon, M. & Borris, R. (2007). Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular Plant-Microbe Interactions* (MPMI), 20(6), 619-626.
- Karakut, H. & Aslantas, R. (2010). Effects of some plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) strains on plant growth and leaf nutrient content of apple. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 18(1), 101-110.
- Karnwal, A. (2009). Production of indole acetic acid by fluorescent *Pseudomonas* in the presence of L-tryptophan and rice root exudates. *Journal of plant Pathology*, 91(1), 61-63.
- Khalid, A., Arshad, M., Shaharoona, B. & Mahmood, T. (2009). Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Sustainable Agriculture En: Khan, M., Zaidi, A. & Musarrat, J. Microbial Strategies for Crop Improvement. E-book: Springer Berling Heidelberg. 371.
- Kirschenbilder E., Castagnino, A., Díaz, K., Rosini M. & Falavigna A. (2015). Cadena espárrago: producción de diferentes genotipos en su quinto año y comportamiento en poscosecha. *Agronomía Mesoamericana*, 26(1), 99-109.
- Kloepper, J. (2003). A review of mechanisms for plant growth promotion by PGPR. 6<sup>th</sup> International PGPR workshop 5-10 october. Calicut, India.
- Kumar, Ch. & Saraf, M. (2011). *In vitro* evaluation of indigenous plant growth promoting rhizobacteria isolated from *Jatropha curcas* rhizosphere. *International Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2(1), 91-100.
- Lara, C., Villalba, M. & Oviedo, L. (2007). Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, IX (2), 6-14.
- León, C. (2014). *Pseudomonas spp. aisladas de la rizósfera de Lycopersicon esculentum Mill "tomate" y su potencial como promotoras del crecimiento de plantas en Lambayeque, 2012*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.

- Liu, Y. & Li, J. (2008). Role of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in the initial adhesion, growth and detachment of *Escherichia coli* in porous media. *Environmental Science & Technology* 42, 443-449.
- Mantilla, M. (2007). *Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (Chrysanthemum morifolium var. Yoko ono) en periodo de enraizamiento*. (Tesis Microbiólogo Agrícola Veterinario). Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Marrero, A., Agaras, B., Wall, L. & Valverde, C. (2015). Enriquecimiento diferencial de *Pseudomonas* spp. en el rizoplaneo de distintas especies cultivadas. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(2), 132-137.
- Martínez, O., Jorquera, M., Crowley, D., Gajardo, G. & Mora, M. (2010). Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10(3), 293-319.
- Mayz, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista UDO Agrícola*, 4 (1), 1-20.
- Municipalidad Distritos de Guadalupe (2016). Plan de Desarrollo concertado Distrito de Guadalupe. 2016-2021. Recuperado de [http://www.mdg.gob.pe/Transparencia/Gestion/PDC\\_2016\\_2021.pdf](http://www.mdg.gob.pe/Transparencia/Gestion/PDC_2016_2021.pdf)
- Naik, P., Raman, G., Narayanan, B. & Sakthivel, N. (2008). Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. *BMC Microbiology*. 8(2), 227-230.
- Orozco, C. & Martínez, P. (2009). Evaluación de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno simbióticos aislados de la rizósfera de *Pinus patula* en Colombia. *Bosque*, 30(2), 70-77.
- Ortuño, N., Castillo J., Claros M., Navia O., Angulo M., Barja D., Gutiérrez C. & Angulo V. (2013). Enhancing the sustainability of quinoa production and soil resilience by using bioproducts made with native microorganisms. *Agronomy*, 3(4), 732-746.
- Patiño, C. & Sánchez, M. (2012). Aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos, habitantes de la rizósfera de chontaduro (*B. gassipaes* kunth). *Biotechnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10(2), 177-187.
- Pedraza, R., Bellone, C. & de Bellone, C. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 11(2), 155-164.
- Pelletier, N. Andsley, E. Brodt, S. Garnett, T. Henriksson, P. Kendall, A... & Troell, M. (2011). Energy intensity of agriculture and food systems. *Annual Review of Environment and Resources*, 36(1), 223-246.



- Pérez, J., Osorio, N. & Álvarez, C. (2004). Crecimiento, absorción de fósforo y morfología de la raíz en espárragos inoculados con hongos micorrizales y *Pseudomonas* fluorescentes. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín* 57(2), 2373-2382.
- Philippot, L., Raaijmakers, J., Lemanceau, P. & van der Putten W. (2013). Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11) 789-799.
- Picard, C. & Bosco, M. (2005). Maize heterosis affects the structure and dynamics of indigenous rhizospheric auxins-producing *Pseudomonas* populations. *FEMS Microbiology Ecology*, 53, 349-357.
- Preston, G., Bertrand, N. & Rainey, P. (2001). Type III secretion in plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Molecular Microbiology*, 41(5), 999-1014.
- Puicón, H. (2014). *Efecto de Pseudomonas spp. nativas en el desarrollo vegetativo de Zea mays L. "maíz" en condiciones de invernadero, 2013*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Regalado, F. (1999). *Espárrago: Condición de viveros*. Perú: Colegio de Ingenieros del Perú.
- Rives, N., Acebo, Y., Almaguer, M., García, J. & Hernández, A. (2009). Actividad antagónica frente a *Pyricularia grisea* (Sacc) y fitoestimulación en el cultivo del arroz de cepas autóctonas de *Pseudomonas putida* (Trev). *Revista Protección Vegetal*, 24(2), 106-116.
- Rodier, J. & Rodi, L. (2005). *Análisis de Aguas*. España: Ediciones Omega.
- Rodríguez, C. (2013). *Evaluación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal en tomate (Solanum lycopersicum) variedad santa clara, aislados de residuos lignocelulósicos de higuera (Ricinus communis)*. (Tesis de Especialidad). Universidad Católica de Manizales, Colombia.
- Salaheddin, K., Valluvaparidasan, V., Ladhakshmi, D. & Velazhahan, R. (2010). Management of bacterial blight of cotton using a mixture of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *Plant Protection Science*, 46(2), 41–50.
- Salhia, B. (2010). *The effect of Azotobacter chroococcum as nitrogen biofertilizer on the growth and yield of Cucumis sativus*. (Degree of Master). The Islamic University, Gaza.
- Sánchez, D., García, A., Romero, F. & Bonilla, R. (2014). Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal solubilizadoras de fosfato en *Lactuca sativa* cultivar White Boston. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XVI (2), 122-128.

- Sang, L., Lee, S., Sim, S., Lee, S., Seo, M., Ahn, L., Kim, S., Park, S., Lee, Y. & kong, S. (2010). *Pseudomonas* sp. LSW25R, antagonistic to plant pathogens, promoted plant growth and reduced blossom end rot of tomato fruits in a hydroponic system. *European Journal of Plant Pathology*, 126(1), 1-11.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA (2010). Uso de Fertilizantes. Recuperado de <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrollorural/documens/fichasaapt/uso%20de%20fertilizantes>.
- Stechmann, L. (2011). *Crecimiento de Bacillus spp., Pseudomonas putida y Streptomyces spp., en sustratos de diferente contenido de materia orgánica y pH y su efecto en Solanum tuberosum L. "papa" en invernadero*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Perú.
- Thomas, P. & Sekhar, A. (2016). Effects due to rhizospheric soil application of an antagonistic bacterial endophyte on native bacterial community and its survival in soil: A case study with *Pseudomonas aeruginosa* from Banana. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-16.
- Trivedy, P., Pandey, A. & Palni, L. (2008). *In vitro* evaluation of antagonistic properties of *Pseudomonas corrugata*. *Microbiological Research*, 163, 329-336.
- Quinchía, A., Gómez, F., Palencia, K. & Giraldo, C. (2006). Evaluación de la resistencia de un aislado bacteriano nativo compatible con *Pseudomonas* sp. al insecticida Lorsban 4 EC. *Revista EIA*, 5, 101-108.
- Uribe, D., Ortiz, E., Portillo, M., Bautista, G. & Cerón, J. (1999). Diversidad de *Pseudomonas* fluorescentes en cultivos de papa de la región Cundiboyacense y su actividad antagonista *in vitro* sobre *Rhizoctonia solani*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2(1), 50-58.
- Vásquez, A., Díaz, N., Vásquez, O. & Vásquez, W. (2012). *Metodología de la Investigación Científica*. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- Villa, L., Cortés, J., Leal, A., Meneses, A. & Meléndez, M. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* resistente a antimicrobianos en hospitales colombianos. *Revista Chilena de Infectología*, 30(6), 605-610.

## **X. ANEXOS**

## ANEXO 1

### Cálculo del número de muestras para el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno (en Vásquez et al., 2012)

$$n = \frac{Z^2 p \cdot q}{T^2}$$

$$n = \frac{(1,96)^2 (0,90 \cdot 0,10)}{(0,06)^2}$$

$$n = 96,04 \text{ muestras}$$

Dónde:

n = Tamaño de la muestra

Z = 1,96 ( $\alpha = 0,05$ ) valor estándar

p = Prevalencia de especies de *Pseudomonas* promotoras del crecimiento en plantas (0,90).

q = 1-p, ausencia (0,10).

T = Error estimado (6%).

## ANEXO 2

### Medios de cultivo y soluciones para el aislamiento, identificación y mantenimiento de especies de *Pseudomonas*

#### a. Agar Cetrimide (en Guerra et al., 2011)

Componentes	gL <sup>-1</sup>
Peptona de gelatina	20,0
Sulfato de Potasio	10,0
Cloruro de Magnesio	1,4
Cetrimida	0,3
Glicerol	10,0 mL
Agar	13,6
Agua destilada	1000 mL

#### b. Agar nutritivo (en Escobar & Horna, 2011)

Componentes	gL <sup>-1</sup>
Peptona	5,0
Extracto de carne	3,0
Agar agar	15,0
Agua destilada csp	1000 mL

**c. Caldo extracto de suelo al 10% (en García & Muñoz, 2010)**

Componentes	gL <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,4
MgCl <sub>2</sub>	0,1
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,05
FeCl <sub>3</sub>	0,01
CaCl <sub>2</sub>	0,1
Triptona	1,0
Extracto de levadura	1,0
Extracto de suelo al 10 %	250mL
Agua destilada	750mL

Ajustar a pH 7,3. Para obtener extracto de suelo al 10%, depositar en un matraz 250g de suelo agrícola y 500mL de agua destilada. Hervir 2 horas, completar a 500mL con agua destilada y filtrar el sobrenadante. Tomar 25mL del filtrado y completar a 500mL con agua destilada.

**d. Medio de cultivo National Botanical Research Institute, NBRIP (en Alvarado & Valderrama, 2014)**

Componentes	gL <sup>-1</sup>
Glucosa	10,0
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,25
KCl	0,2
MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	5,0
Agar agar	15,0
Agua destilada	1000mL

**Solución de antimicótico (en Alvarado & Valderrama, 2014)**

Disolver una capsula de 150mg de Fluconazol en 10mL de alcohol al 95%. Agregar 2mL de solución de antimicótico por litro de medio de cultivo para tener 45mg de Fluconazol por litro.

**e. Caldo tripticasa Soya suplementado con triptófano (en Escobar & Horna, 2011)**

Componentes	gL <sup>-1</sup>
Peptona de caseína	17,0
Peptona de harina de Soya	3,0
D (+) glucosa (dextrosa)	2,5
Cloruro de sodio	5,0
Fosfato dipotasico	2,5
Triptofano	0,01
Agua destilada cps	1000 mL

Disolver por calentamiento y ajustar a pH 7,3

### ANEXO 3

#### Procedimiento para elaborar la curva de calibración para cuantificar el ion amonio

##### a. Reactivos (en Lara et al; 2007., Cadena & Martínez, 2011)

- **Cloruro de potasio 2M**

Cloruro de potasio	149,12g
Agua destilada	1000mL

- **Solución alcohólica de fenol 10%**

Fenol concentrado	10mL
Alcohol 97°	90mL

- **Nitroprusiato de sodio 0,5%**

Nitroprusiato de sodio	0,5g
Agua destilada	100mL

- **Solución oxidante**

Citrato de sodio	20,0g
Hidróxido de sodio	1,0g
Hipoclorito de sodio 5% (lejía comercial)	2mL
Agua destilada	100mL

##### b. Método colorimétrico de Berthelot para cuantificar el nitrógeno en amonio (en Lara et al., 2007)

###### b.1 Fundamento del método colorimétrico de Berthelot (fenolhipoclorito)

Se basa en la formación de un color azul intenso de indofenol, que resulta de la reacción del ión amonio ( $\text{NH}_4$ ) con los compuestos fenólicos, en presencia de un agente oxidante como el hipoclorito de sodio u o-fenol y un catalizador, principalmente nitroprusiato de sodio o de potasio. El mecanismo de la reacción depende de la luz presente, la temperatura ambiente, catalizadores y pH alcalino. Cuando se utiliza fenol o sodio la reacción puede ser representada de la siguiente manera:



###### b.2 Preparación de diluciones a partir de una solución madre de $\text{NH}_4\text{Cl}$

Para obtener la curva patrón se prepara una solución madre de 100ppm de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , para lo cual se pesa 0,1g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y se disuelve en 1L de agua bidestilada. Posteriormente, a partir de la solución madre se efectúan las siguientes diluciones:



N° de tubo	Solución patrón [mL]	H <sub>2</sub> O bidestilada [mL]	NH <sub>4</sub> Cl (Ug/mL = ppm) NH <sub>4</sub> Cl [μg /mL= ppm]
1	0,0	10,0	0
2	0,2	9,8	2
3	0,4	9,6	4
4	0,6	9,4	6
5	0,8	9,2	8
6	1,0	9,0	10
7	1,5	8,5	15
8	2,0	8,0	20

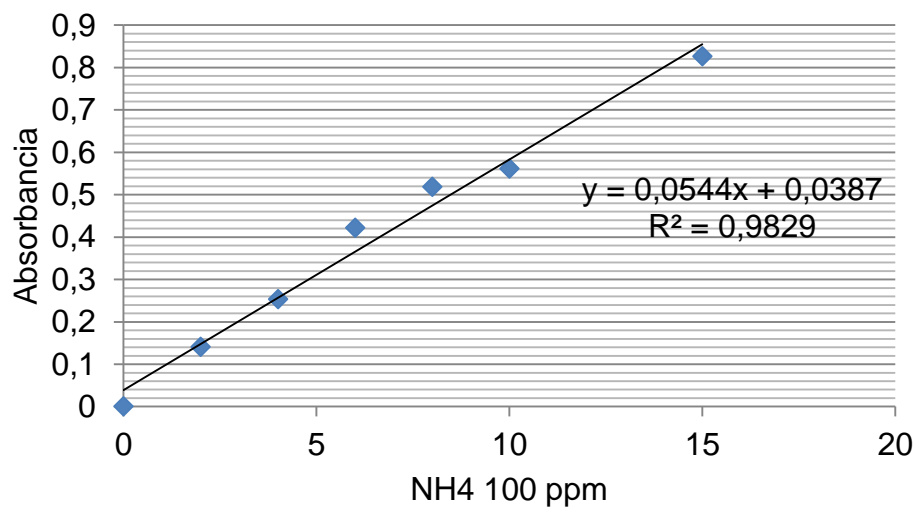
### b.3 Procedimiento para la cuantificación de amonio por colorimetría

Obtenidas las diluciones, agregar a cada tubo 0,4mL de solución alcohólica de fenol al 10%; 0,4mL de nitroprusiato de sodio al 0,5% y 1mL de solución oxidante, luego agitar para mezclar y dejar en reposo durante 1 hora. Observar una coloración que varía del verde azul al azul intenso según la concentración de amonio. Leer la absorbancia de cada dilución en el espectrofotómetro a 632,9nm.

Una vez obtenida la absorbancia de todas las concentraciones de amonio, corregir los valores y mediante regresión lineal con el programa Microsoft Excel 2010, obtener la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) que deberá ser mayor a 0,9 para demostrar una dispersión homogénea de los valores sobre la recta.

N° tubo	NH <sub>4</sub> 100 (ppm)	Absorbancia	Absorbancia corregida
01	0	0,058	0,000
02	2	0,199	0,141
03	4	0,311	0,253
04	6	0,480	0,422
05	8	0,576	0,518
06	10	0,619	0,561
07	15	0,884	0,826

Obtenida la absorbancia de las siete concentraciones de amonio, introducir los datos en el programa Microsoft Office Excel 2007 y construir la curva patrón de calibración:



En la ecuación obtenida:

$$y = 0,0544x + 0,0387$$

Donde:

y: representa la absorbancia captada (variable dependiente).

x: cantidad de amonio en ppm (variable independiente).

Despejar "x" para obtener la cantidad de amonio (ppm) correspondiente a cada bacteria.

$$x = \frac{y - 0,0387}{0,0544}$$

## ANEXO 4

### Cuantificación de fósforo solubilizado *in vitro*

#### a. Reactivos (en Rodier & Rodi, 2005)

- **Solución de ácido sulfúrico 5N**

Ácido sulfúrico (d = 1,84)	14 mL
Agua destilada hasta enrase	100 mL
- **Solución de molibdato amónico 4 %** 20 mL
- **Solución de ácido ascórbico**

Ácido ascórbico	1,76 mL
Agua destilada hasta enrase	100 mL
- **Solución de amético (Preparar al momento del uso)**

Tartrato doble de antimonio y potasio	0,0274 g
Agua destilada hasta enrase	100 mL
- **Reactivo para determinación de ortofosfatos**

Ácido sulfúrico 5 N	40 mL
Solución de Molibdato amónico	12 mL
Solución de ácido ascórbico	24 mL
Solución de emético	4 mL
- **Solución madre de 0,2 mgL<sup>-1</sup> de fósforo**

Fosfato monopotásico previamente desecado en estufa a 100 °C	877 g
Agua destilada hasta enrase	100 mL
- **Solución hija de 2mgL<sup>-1</sup> de fósforo**

Diluir 1mL de solución madre en 99mL de agua destilada (1/100)

#### b. Método colorimétrico del Molibdato para cuantificar fósforo soluble ( en Rodier & Rodi, 2005)

##### b.1. Fundamento

En medio ácido y en presencia de molibdato amónico, los ortofosfatos forman un complejo fosfomolibdico que, reducido por el ácido ascórbico, desarrolla una coloración azul susceptible de una determinación colorimétrica y cuya

aparición se acelera utilizando el catalizador emético, tartrato doble de antimonio y potasio.

### **b.2. Limpieza de los recipientes de vidrio**

Para la limpieza del material de vidrio no utilizar detergentes que contengan fosfato. Lavados con ácido clorhídrico diluido y enjuagados cuidadosamente con agua destilada.

### **b.3. Preparación de la curva de calibración**

Colocar en una serie de matraces aforados de 25 mL:

<b>Número de matraces</b>	<b>T</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>
Solución salina de fósforo de 2 mgL <sup>-1</sup> (mL)	0	1	2	5
Agua bidestilada (mL)	20	19	18	15
Reactivo indicador (mL)	4	4	4	4
Agua destilada hasta enrase (mL)	25	25	25	25
Correspondencia de fósforo en mgL <sup>-1</sup>	0	0,1	0,2	0,5

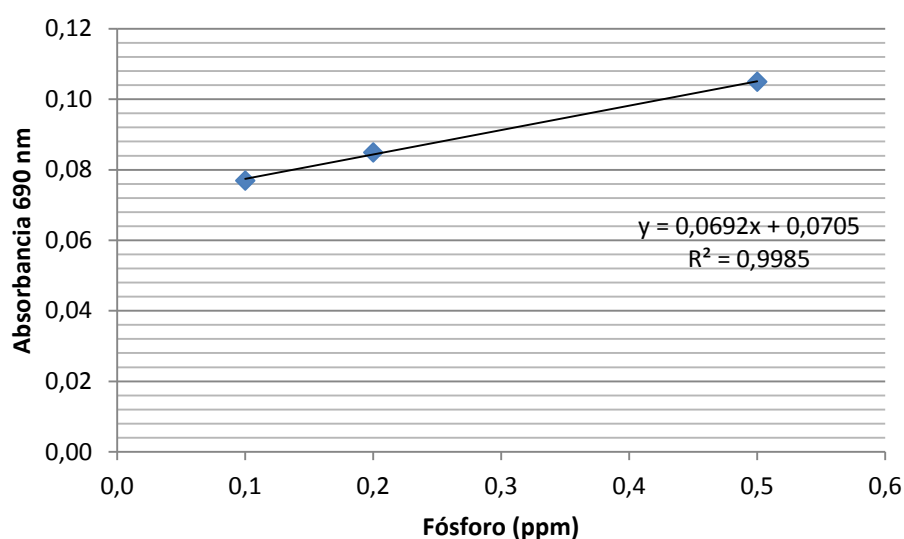
Esperar 20 minutos y efectuar las lecturas en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 690nm en cubetas de 10cm. Construir la curva de calibración. Los datos de la absorbancia corregida se analizan mediante regresión lineal con el programa Microsoft Excel 2007 para obtener la ecuación de la recta y el coeficiente ( $R^2$ ) que deberá ser mayor a 0,9 para demostrar una dispersión homogénea de los valores sobre la recta.

### **b.4. Procedimiento para cuantificar fosfatos en la muestra**

Introducir 20mL de la muestra a analizar en un matraz aforado de 25mL. Añadir 4mL de reactivo indicador, completar el volumen a 25mL con agua destilada. Esperar 20 minutos y efectuar la lectura en el espectrofotómetro de luz visible con una longitud de onda de 690nm. Tener en cuenta el valor leído para el testigo. Obtener los resultados en la curva de calibración. Para una muestra de 20mL, la curva indica el contenido de fósforo expresado en miligramos por litro.

N° de tubo	Fósforo soluble (ppm)	Absorbancia
1	0,1	0,077
2	0,2	0,085
3	0,5	0,105

Una vez obtenida la absorbancia de las tres concentraciones de fosfato dicálcico, introducir los datos en el programa Microsoft Office Excel 2007 y construir la curva patrón de calibración:



En la ecuación obtenida:

$$y = 0,0692x + 0,071$$

Donde:

y: representa la absorbancia captada (variable dependiente)

x: cantidad de fósforo en ppm (variable independiente)

Despejar "x" para obtener la cantidad de fósforo (ppm) producido por cada bacteria nativa.

$$x = \frac{y - 0,071}{0,0692}$$

## ANEXO 5

### Procedimiento para elaborar la curva de calibración para cuantificar indoles

#### a. Rectivos

- **Reactivo de Salkowski (en García & Muñoz, 2010)**

Componentes	g <sup>L</sup> <sup>-1</sup>
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado	150 mL
Agua destilada	250 mL
FeCl <sub>3</sub> 0,5M en Agua destilada	7,5 mL

Al momento de la preparación, verter el ácido sulfúrico concentrado en un balón con 250mL de agua destilada y simultáneamente enfriar con chorro de agua constante. Finalmente agregar el cloruro férrico al 0,5 M.

Utilizar 4mL del reactivo para 1mL de la muestra investigada.

#### b. Método colorimétrico de Salkowski para cuantificar indoles (en Mantilla, 2007)

##### b.1. Fundamento de la reacción de Salkowski

Mediante la reacción de Salkowski se detectan grupos indol presentes en el medio de cultivo y la concentración de indol es directamente proporcional a la intensidad de color rojo producido. A su vez, el cambio de color es el resultado de una reacción oxidativa con el ácido sulfúrico, donde por medio de una transaminación un grupo amino es sustituido por el cloro proveniente del FeCl<sub>3</sub>, originando un compuesto visible de color rosado a rojo en el caso del indolacético. Otras coloraciones indican la presencia de productos intermedios de la síntesis del ácido indolacético, que pueden ser generados a partir del triptófano.

##### b.2. Preparación de diluciones a partir de una solución madre de AIA

Para obtener una curva patrón de ácido indolacético, preparar una solución madre de 100ppm, para lo cual se pesan 10mg de ácido indolacético y se disuelven con unas gotas de NaOH en un matraz aforado a 100mL. A continuación, enrasar con agua bidestilada y agitar hasta homogenizar. Posteriormente se realizan las siguientes diluciones:

N° de tubo	Solución patrón (100 µgmL <sup>-1</sup> )	H <sub>2</sub> O bidestilada [µL]*	Concentración AIA (mgL <sup>-1</sup> )
1	0	1000	0
2	20	980	2
3	40	960	4
4	60	940	6
5	80	920	8
6	100	900	10
7	150	850	15
8	200	800	20
9	300	700	30
10	400	600	40
11	500	500	50
12	600	400	60

\*1000 µL = 1 mL

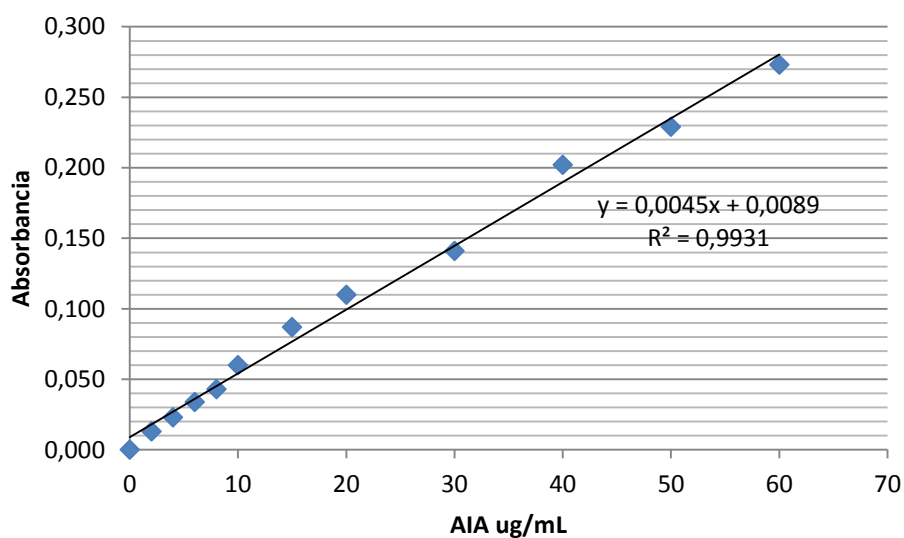
### **b.3. Procedimiento para la cuantificación de AIA por colorimetría**

Obtenidas las concentraciones parciales de AIA extraer de cada tubo 0,4mL de solución, verter en tubos de 13 x 75mm y agregar 1,6mL de reactivo de Salkowski (1:4). Dejar en reposo en oscuridad por 30 minutos. Observar la presencia de una coloración grosella en los tubos. A continuación, leer la absorbancia de cada dilución en espectrofotómetro a 530nm.

Una vez obtenida la absorbancia en todas las concentraciones de ácido indolacético, corregir los valores y mediante regresión lineal en el programa Microsoft Excel 2007, obtener la ecuación de la recta y el coeficiente ( $R^2$ ) que deberá ser mayor a 0,9 para demostrar una dispersión homogénea de los valores sobre la recta.

N° de tubo	AIA (µg/mL)	Absorbancia
01	0	0,000
02	2	0,013
03	4	0,023
04	6	0,034
05	8	0,043
06	10	0,060
07	15	0,087
08	20	0,110
09	30	0,141
10	40	0,202
11	50	0,229
12	60	0,273

Obtenida la absorbancia de las doce concentraciones de ácido indol acético, introducir los datos en el programa Microsoft Office Excel 2007 y y construir la curva patrón de calibración:



En la ecuación obtenida:

$$y = 0,0045x + 0,0089$$

Donde:

y: representa la absorbancia captada (variable dependiente)

x: ácido indol acético en ppm (variable independiente)



Despejar “x” para obtener la cantidad de ácido indol acético (ppm) producido por cada bacteria nativa.

$$x = \frac{y - 0,0089}{0,0045}$$

## ANEXO 6

### Temperaturas mínima, media y máxima durante el cultivo de *Asparagus officinalis* L.

Fecha	Temperatura mínima (°C)	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)
12/12/16	18,0	22,0	26,0
13/12/16	18,0	22,0	26,0
14/12/16	18,0	22,0	26,0
15/12/16	18,0	21,5	25,0
16/12/16	19,0	22,5	26,0
17/12/16	19,0	22,5	26,0
18/12/16	19,0	22,0	25,0
19/12/16	19,0	22,0	25,0
20/12/16	19,0	22,5	26,0
21/12/16	17,0	21,5	26,0
22/12/16	16,0	21,5	27,0
23/12/16	19,0	23,5	28,0
24/12/16	19,0	22,5	26,0
25/12/16	19,0	23,5	28,0
26/12/16	20,0	23,5	27,0
27/12/16	19,0	23,5	28,0
28/12/16	18,0	22,5	27,0
29/12/16	20,0	24,0	28,0
30/12/16	19,0	23,5	28,0
31/12/16	19,0	23,5	28,0
01/01/17	20,0	24,0	28,0
02/01/17	20,0	24,0	28,0
03/01/17	19,0	24,0	28,0
04/01/17	18,0	24,0	29,0
05/01/17	20,0	25,0	29,0
06/01/17	21,0	25,0	28,0
07/01/17	20,0	24,0	28,0
08/01/17	21,0	25,0	29,0
09/01/17	20,0	24,0	29,0
10/01/17	21,0	26,0	31,0
11/01/17	20,0	24,0	28,0
12/01/17	19,0	24,0	28,0
13/01/17	20,0	25,0	29,0
14/01/17	21,0	25,0	29,0
15/01/17	21,0	25,0	29,0
16/01/17	20,0	25,0	30,0
17/01/17	22,0	26,0	30,0
18/01/17	22,0	26,0	30,0
19/01/17	21,0	25,0	29,0

Continuación...

Fecha	Temperatura mínima (°C)	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)
20/01/17	22,0	27,0	31,0
21/01/17	22,0	26,0	30,0
22/01/17	22,0	26,0	30,0
23/01/17	23,0	27,0	31,0
24/01/17	22,0	27,0	31,0
25/01/17	22,0	27,0	31,0
26/01/17	22,0	26,0	29,0
27/01/17	23,0	27,0	31,0
28/01/17	23,0	28,0	32,0
29/01/17	24,0	28,0	31,0
30/01/17	23,0	28,0	33,0
31/01/17	23,0	27,0	30,0
01/02/17	23,0	27,0	30,0
02/02/17	23,0	26,0	29,0
03/02/17	23,0	27,0	30,0
04/02/17	24,0	27,0	30,0
05/02/17	23,0	26,0	29,0
06/02/17	23,0	27,0	30,0
07/02/17	24,0	27,0	30,0
08/02/17	24,0	28,0	32,0
09/02/17	24,0	28,0	31,0
10/02/17	24,0	28,0	31,0
11/02/17	23,0	27,0	30,0
12/02/17	24,0	28,0	31,0
13/02/17	24,0	28,0	31,0

## Anexo 7

### Prueba de normalidad, homogeneidad de varianzas y análisis de varianza de la altura de *Asparagus officinalis* L. a los 30 días

Tests of Normality a los 30 días

Tratamiento	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>		
	Statistic	df	Sig.
1	,199	3	,867
2	,223	3	,764
3	,243	3	,662
4	,189	3	,903
5	,201	3	,858
6	,206	3	,838
7	,257	3	,788
8	,142	3	,993

### Prueba de homogeneidad de varianzas

#### ALTURA A LOS 30 DÍAS

Estadístico de Levene	g/1	g/2	Sig.
,664	7	16	,699

### Anova de un Factor

ALTURA A LOS 30 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1217,740	7	173,963	26,721	,000
Intra-grupos	104,167	16	6,510		
Total	1321,906	23			

## Anexo 8

### Prueba de normalidad, homogeneidad de varianzas y análisis de varianza del número de tallos de *Asparagus officinalis* L. a los 30 días

Tests of Normality a los 30 días

Tratamiento	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>		
	Statistic	df	Sig.
1	,175	3	1,000
2	,175	3	1,000
3	,219	3	,999
4	,253	3	,991
5	,219	3	,999
6	,337	3	,886
7	,328	3	,904
8	,328	3	,904

### Prueba de homogeneidad de varianzas

#### NÚMERO DE TALLOS A LOS 30 DÍAS

Estadístico de Levene	g/1	g/2	Sig.
2,051	7	16	,111

### Anova de un Factor

NÚMERO DE TALLOS A LOS 30 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	Inter- grupos	4,500	7	,643	,571
Intra-grupos	Intra- grupos	18,000	16	1,125	
Total	Total	22,500	23		

## Anexo 9

### Prueba de normalidad, homogeneidad de varianzas y análisis de varianza de la altura de *Asparagus officinalis* L. a los 45 días

#### Tests of Normality a los 45 días

Tratamiento	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>		
	Statistic	df	Sig.
1	,314	3	,929
2	,232	3	,997
3	,299	3	,952
4	,175	3	1,000
5	,253	3	,991
6	,204	3	1,000
7	,231	3	,997
8	,343	3	,871

#### Prueba de homogeneidad de varianzas

#### ALTURA A LOS 45 DÍAS

Estadístico de Levene	g/1	g/2	Sig.
1,058	7	16	,432



### Anova de un Factor

ALTURA A LOS 45 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2143,333	7	306,190	26,529	,000
Intra-grupos	184,667	16	11,542		
Total	2328,000	23			

## Anexo 10

### Prueba de normalidad, homogeneidad de varianzas y análisis de varianza del número de tallos de *Asparagus officinalis* L. a los 45 días

Tests of Normality a los 45 días

Tratamiento	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>		
	Statistic	df	Sig.
1	,175	3	1,000
2	,253	3	,991
3	,292	3	,960
4	,175	3	1,000
5	,314	3	,929
6	,276	3	,976
7	,385	3	,766
8	,328	3	,904

### Prueba de homogeneidad de varianzas

#### NÚMERO DE TALLOS A LOS 45 DÍAS

Estadístico de Levene	g/1	g/2	Sig.
1,307	7	16	,309

### Anova de un Factor

NÚMERO DE TALLOS A LOS 45 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	5,292	7	,756	,422	,875
Intra-grupos	28,667	16	1,792		
Total	33,958	23			

## Anexo 11

### Prueba de normalidad, homogeneidad de varianzas y análisis de varianza de la altura de *Asparagus officinalis* L. a los 60 días

#### Tests of Normality a los 60 días

Tratamiento	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>		
	Statistic	df	Sig.
1	,191	3	1,000
2	,253	3	,991
3	,343	3	,871
4	,253	3	,991
5	,175	3	1,000
6	,229	3	,997
7	,191	3	1,000
8	,200	3	1,000

#### Prueba de homogeneidad de varianzas

##### ALTURA A LOS 60 DÍAS

Estadístico de Levene	g/1	g/2	Sig.
1,869	7	16	,142

### Anova de un Factor

ALTURA A LOS 60 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2654,500	7	379,214	50,006	,000
Intra-grupos	121,333	16	7,583		
Total	2775,833	23			

## Anexo 12

### Prueba de normalidad, homogeneidad de varianzas y análisis de varianza del número de tallos de *Asparagus officinalis* L. a los 60 días

Tests of Normality a los 60 días

Tratamiento	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>		
	Statistic	df	Sig.
1	,385	3	,766
2	,253	3	,991
3	,276	3	,976
4	,175	3	1,000
5	,292	3	,960
6	,337	3	,886
7	,314	3	,929
8	,385	3	,766

### Prueba de homogeneidad de varianzas

NÚMERO DE TALLOS A LOS 60 DÍAS

Estadístico de Levene	g/1	g/2	Sig.
1,693	7	16	,181

### Anova de un Factor

NÚMERO DE TALLOS A LOS 60 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	11,333	7	1,619	,447	,858
Intra-grupos	58,000	16	3,625		
Total	69,333	23			