



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



**Efecto de *Azotobacter* spp. y enterobacterias en
el desarrollo vegetativo de *Asparagus officinalis* L., en
condiciones de invernadero**

TESIS

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

PRESENTADA POR:

Br. Fernando Gianmarco Chafloque Capuñay
Br. Jair Gianpierre Monje Caveró

ASESORA

Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán

LAMBAYEQUE, PERÚ

2019

**Efecto de *Azotobacter* spp. y enterobacterias en
el desarrollo vegetativo de *Asparagus officinalis* L., en
condiciones de invernadero**

TESIS

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

APROBADA POR:

M. Sc. Clara Cueva Castillo

PRESIDENTA

Microbiol. Teresa Silva García

SECRETARIO

Lic. Julio Silva Estela

VOCAL

Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán

ASESORA

LAMBAYEQUE, PERÚ

2019

Índice

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. Antecedentes de la investigación.....	4
2.2. Base teórica.....	6
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1 Materiales.....	9
3.1.1 Material biológico.....	9
3.1.2 Población y muestra.....	9
3.2 Métodos.....	9
3.2.1 Variable de la fase descriptiva.....	9
3.2.2 Variable de la fase explicativa.....	9
3.2.3 Tipo de estudio de contrastación de hipótesis.....	10
3.2.4 Primera fase: Verificación de la estabilidad de las características que evidencian <i>in vitro</i> promoción de crecimiento en plantas.....	10
a) Cuantificación de nitrógeno fijado <i>in vitro</i>	12
b) Cuantificación de fosfato solubilizado <i>in vitro</i>	12
c) Cuantificación de índoles producidos <i>in vitro</i>	13
3.2.5 Segunda fase: Efecto de <i>Azotobacter</i> spp. y enterobacterias en el desarrollo vegetativo de espárrago.....	20
3.2.6 Análisis estadístico de los datos.....	20
IV.RESULTADOS.....	21
4.1 Verificación de la estabilidad de las características que evidencian promoción de crecimiento en plantas.....	21
4.2 Efecto de 16 cultivos de <i>Azotobacter</i> spp. y enterobacterias en el desarrollo vegetativo de espárrago en condiciones de invernadero.....	21
V. DISCUSIÓN.....	51
VI. CONCLUSIONES.....	54
VII. RECOMENDACIONES.....	55
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
ANEXOS.....	67

Índice de figuras

<i>Figura 1.</i>	Diseño completamente aleatorio para determinar el efecto de <i>Azotobacter</i> spp. y enterobacterias en el desarrollo vegetativo de <i>Asparagus officinalis</i> L.....	11
<i>Figura 2.</i>	Cultivos de bacterias de <i>Azotobacter</i> spp. y enterobacterias.....	14
<i>Figura 3.</i>	Suelo experimental distribuido en macetas de arcilla.....	14
<i>Figura 4.</i>	Inversión de corona de <i>Asparagus officinalis</i> L. solución del fungicida Benomyl.....	15
<i>Figura 5.</i>	Coronas de <i>Asparagus officinalis</i> L. e inóculos bacterianos.....	17
<i>Figura 6.</i>	Siembra de corona de <i>Asparagus officinalis</i> L. inoculada con bacterias.....	17
<i>Figura 7.</i>	Medida de la altura de planta de <i>Asparagus officinalis</i> L.....	18
<i>Figura 8.</i>	Raíces de <i>Asparagus officinalis</i> L.....	19
<i>Figura 9.</i>	Pesaje de raíces de <i>Asparagus officinalis</i> L.....	19
<i>Figura 10.</i>	Coloración observada en la cuantificación de amonio.....	22
<i>Figura 11.</i>	Coloración observada en la cuantificación de fósforo soluble.....	22
<i>Figura 12.</i>	Coloración observada en la cuantificación de indoles.....	23
<i>Figura 13.</i>	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 30 días después de la siembra de coronas inoculadas con <i>Azotobacter</i> sp.8.....	25
<i>Figura 14.</i>	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 30 días después de la siembra de coronas inoculadas con <i>Enterobacter</i> sp.13.31.....	25
<i>Figura 15.</i>	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 30 días después de la siembra de coronas inoculadas con <i>Enterobacter</i> sp.71.159.....	26

<i>Figura 16.</i>	Altura (cm) de plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 30 días después de la siembra de coronas inoculadas con <i>Azotobacter</i> spp. y enterobacterias.....	27
<i>Figura 17.</i>	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 60 días después de la siembra de coronas inoculadas con <i>Azotobacter</i> spp.....	31
<i>Figura 18.</i>	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 60 días después de la siembra de coronas inoculadas con <i>Azotobacter</i> sp.13.32.....	31
<i>Figura 19.</i>	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 60 días después de la siembra de coronas inoculadas con <i>Enterobacter</i> sp.13.31.....	32
<i>Figura 20.</i>	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 60 días después de la siembra de coronas inoculadas con <i>Enterobacter</i> sp.26.64.....	32
<i>Figura 21.</i>	Altura (cm) de plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 60 días después de la siembra de coronas inoculadas con <i>Azotobacter</i> spp. y enterobacterias.....	33
<i>Figura 22.</i>	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 90 días después de la siembra de coronas inoculadas con <i>Azotobacter</i> sp.83-189.....	34
<i>Figura 23.</i>	Altura (cm) de plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 90 días después de la siembra de coronas inoculadas con <i>Azotobacter</i> spp y enterobacterias.....	35
<i>Figura 24.</i>	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 120 días después de la siembra de coronas inoculadas con <i>Azotobacter</i> sp.83-189.....	36
<i>Figura 25.</i>	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 120 días después de la siembra de coronas inoculadas con <i>Azotobacter</i> sp.12-30.....	36
<i>Figura 26.</i>	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 120 días después de la siembra de coronas inoculadas con <i>Enterobacter</i> sp.13.31.....	37

<i>Figura 27.</i>	Altura (cm) de plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 120 días después de la siembra de coronas inoculadas con <i>Azotobacter</i> spp. y enterobacterias.....	38
<i>Figura 28.</i>	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 150 días después de la siembra de coronas inoculadas con <i>Azotobacter</i> sp.66-144.....	40
<i>Figura 29.</i>	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 150 días después de la siembra de coronas inoculadas con <i>Enterobacter</i> sp.88.183.....	40
<i>Figura 30.</i>	Altura (cm) de plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 150 días después de la siembra de coronas inoculadas con <i>Azotobacter</i> spp. y enterobacterias.....	41
<i>Figura 31.</i>	Número de tallos de plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 30 días después de la siembra de coronas inoculadas con <i>Azotobacter</i> spp. y enterobacterias.....	42
<i>Figura 32.</i>	Número de tallos de plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 60 días después de la siembra de coronas inoculadas con <i>Azotobacter</i> spp. y enterobacterias.....	46
<i>Figura 33.</i>	Número de tallos de plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 90 días después de la siembra de coronas inoculadas con <i>Azotobacter</i> spp. y enterobacterias.....	47
<i>Figura 34.</i>	Número de tallos de plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 150 días después de la siembra de coronas inoculadas con <i>Azotobacter</i> spp. y enterobacterias.....	48
<i>Figura 35.</i>	Biomasa radicular de <i>Asparagus officinalis</i> L. 150 días después de la siembra de coronas inoculadas con <i>Azotobacter</i> spp. y enterobacterias.....	50

Índice de tablas

Tabla 1.	<i>Nitrógeno fijado como amonio, fósforo solubilizado e indoles producidos por Azotobacter spp. y enterobacterias.....</i>	24
Tabla 2.	<i>Índices de efectividad (%) en la altura de plantas de Asparagus officinalis L. por Azotobacter spp. y enterobacterias.....</i>	28
Tabla 3.	<i>Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la altura de plantas de Asparagus officinalis L.....</i>	29
Tabla 4.	<i>Índices de efectividad (%) en el número de tallos de plantas de Asparagus officinalis L. por Azotobacter spp. y enterobacterias.....</i>	43
Tabla 5.	<i>Prueba de comparaciones múltiples de Tukey del número de tallos de Asparagus officinalis L.....</i>	44
Tabla 6.	<i>Índices de efectividad (%) y prueba de comparaciones múltiples de la biomasa radicular de Asparagus officinalis L.....</i>	56

RESUMEN

Los fertilizantes químicos aportan los nutrientes requeridos por los cultivos agrícolas; no obstante, su aplicación no controlada contamina el ambiente. El objetivo de la investigación fue determinar el efecto de 16 cultivos de *Azotobacter* spp. y enterobacterias en el desarrollo vegetativo de *Asparagus officinalis* L. “espárrago” en condiciones de invernadero. La estabilidad de las características que evidencian promoción de crecimiento en plantas se verificó *in vitro*, cuantificando el amonio, fósforo soluble e indoles producidos. Las bacterias se inocularon por aspersión en las coronas de espárrago antes de la siembra y cada 30 días se determinaron la altura, número de tallos y a los 150 días la biomasa radicular. Se cuantificaron 8,015 a 32,542ppm de amonio; 1,217 a 17,189ppm de fósforo y 0,244 a 58,688ppm de indoles. Estas bacterias incrementaron la altura (1,99 a 66,67%), el número de tallos (24,72 a 227,83%) y el peso de la biomasa radicular (1,76 a 286,84%). Se demostró el incremento en el desarrollo vegetativo de espárrago por efecto de las bacterias investigadas.

Palabras clave: *Azotobacter*, enterobacterias, *Asparagus officinalis*, desarrollo vegetativo.

ABSTRACT

Chemical fertilizers provide the nutrients required by agricultural crops; however, its uncontrolled application contaminates the environment. The objective of the research was to determine the effect of 16 cultures of *Azotobacter* spp. and enterobacteria in the vegetative development of *Asparagus officinalis* L. "asparagus" under greenhouse conditions. The stability of the characteristics that show growth promotion in plants was verified *in vitro*, quantifying the ammonium, soluble phosphorus and indoles produced. The bacteria were inoculated by aspersion in the asparagus crowns before sowing and every 30 days the height, number of stems and at 150 days the root biomass were determined. 8,015 to 32,542ppm of ammonium were quantified; 1,217 to 17,189ppm of phosphorus and 0,244 to 58,688ppm of indoles. These bacteria increased the height (1.99 to 66.67%), the number of stems (24.72 to 227.83%) and the weight of the root biomass (1.76 to 286.84%). The increase in the vegetative development of asparagus was demonstrated by the effect of the bacteria investigated.

Key words: *Azotobacter*, enterobacteria, *Asparagus officinalis*, vegetative development.

I. INTRODUCCIÓN

La necesidad de suplir con alimentos a los miles de millones de personas que habitan el planeta, ha llevado a la utilización de materiales de alta eficiencia en la agricultura, variedades vegetales resistentes a plagas y enfermedades, con ciclos de producción más cortos y agroquímicos, que brindan nutrientes y protección frente a plagas y enfermedades (Camelo, Vera & Bonilla, 2011). En este contexto, los fertilizantes químicos incrementan la productividad y rentabilidad de los cultivos agrícolas como *Asparagus officinalis* L. “espárrago”; no obstante, cada año aumenta la cantidad de fertilizantes por aplicar, debido a la menor adsorción en el suelo y absorción por la planta (Nicolalde & Quintana, 2010) y bajo un manejo inadecuado los fertilizantes químicos contaminan el ambiente (Camelo et al., 2011; Aguado, 2012).

En el desarrollo de alternativas para disminuir el uso de fertilizantes químicos se realizan investigaciones con las rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) en las que se incluyen especies de *Azotobacter* (Rico, 2009; Ashrafi & Seiedi, 2011) y enterobacterias (Schoebitz, Ribaudó, Pardo, Cantore, Ciampi & Curá, 2009; Rani, Arundhathi & Reddy, 2011; Ogbo & Okonkwo, 2012). Estas bacterias benefician a los cultivos agrícolas a través de dos mecanismos. El primero consiste en la producción de metabolitos secundarios capaces de promover respuestas fisiológicas en las células vegetales. El segundo mecanismo se encuentra en la intervención directa de las bacterias en los ciclos biogeoquímicos, con lo que hacen disponibles compuestos orgánicos e inorgánicos que son aprovechados por las plantas (Camelo et al., 2011).

La investigación de las PGPR requiere en un inicio el aislamiento y caracterización en condiciones de laboratorio, para después determinar el efecto

de su inoculación en los cultivos agrícolas, tanto en condiciones de invernadero como de campo (Carreño, 2009). En el laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas se han aislado especies de *Azotobacter* y enterobacterias en la rizósfera de plantas de espárrago (Esqueche & Quispe, 2017; Cornetero & Segura, 2017) y se ha demostrado que tienen potencial *in vitro* como promotoras de crecimiento; sin embargo, no se ha investigado el efecto de estas bacterias en el desarrollo vegetativo de espárrago en condiciones de invernadero (Rico, 2009), requisito indispensable para su aplicación en condiciones de campo.

La adopción y uso eficaz de biofertilizantes constituidos por bacterias en la agricultura es una tecnología clave para asegurar la sustentabilidad y productividad de este sector tan importante para la economía y la sociedad. Las bacterias del género *Azotobacter* así como las enterobacterias fijan nitrógeno y producen ácido indolacético; crecen rápidamente en medios de cultivo y en diferentes sustratos orgánicos de bajo costo (Rojas, 2013; Farro & Graus, 2013) tiene la capacidad de promover el crecimiento de las plantas, incrementando el rendimiento agrícola (Jarak et al., 2012; Sánchez, Gómez, Garrido & Bonilla, 2012) por lo que constituyen una alternativa para la obtención de biofertilizantes.

El cultivo de espárrago es de exportación y requiere una agricultura no contaminante. Los resultados de la presente investigación demostrarán la efectividad de las *Azotobacter* spp. y enterobacterias y la posibilidad de utilizarlas como biofertilizantes, asegurando la rentabilidad del cultivo y la reducción de la fertilización química, beneficiando a los productores, consumidores y medio ambiente.

Por lo expuesto se planteó, el siguiente problema: ¿Cuál es el efecto de *Azotobacter* spp. y enterobacterias en el desarrollo vegetativo de *Asparagus officinalis* L. en condiciones de invernadero?. La hipótesis planteada fue: La inoculación de *Azotobacter* spp. y enterobacterias, incrementa el desarrollo vegetativo de *Asparagus officinalis* L. en condiciones de invernadero.

El objetivo general de la investigación fue: Determinar el efecto de 16 cultivos de *Azotobacter* spp y enterobacterias en el desarrollo vegetativo de *Asparagus officinalis* L. en condiciones de invernadero. Los objetivos específicos

fueron: Verificar en los cultivos de *Azotobacter* spp. y enterobacterias la estabilidad de las características que evidencian *in vitro* promoción de crecimiento en plantas e identificar el efecto de 16 cultivos de *Azotobacter* spp. y enterobacterias en la altura, número de tallos y peso de la biomasa radicular de espárrago durante 150 días en condiciones de invernadero.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

El género *Azotobacter* agrupa bacterias quimio-organótrofas, catalasa positivas y Gram positivas. Usualmente son ovoides y grandes, con 1,5-2,0 μm de diámetro, pero también se pueden observar pleomórficas. No producen endosporas, pero sí forman quistes. Se mueven por flagelos peritricos, son aerobias. Fijan nitrógeno inclusive con oxígeno, en contraste con otras bacterias que fijan sólo en anaerobiosis o en microaerófilia. Son capaces de utilizar gran cantidad de fuentes de carbono como azúcares, alcoholes y sales de ácidos orgánicos. Fijan al menos 10mg de N_2 por gramo de glucosa consumida (Agüero, 2009; Obando, 2012).

El efecto positivo de *Azotobacter* spp. ha sido demostrado en *Capsicum annuum* "pimiento" (Reyes, Alvarez, El-Ayoubi & Valery, 2008), *Solanum tuberosum* "papa" (Rico, 2009), *Pinus patula* "pino" (Orozco & Martínez, 2009), *Eucalyptus* sp. "eucalipto" (Obando et al., 2010), *Cucumis sativus* "pepinillo" (Salhia, 2010), *Vigna unguiculata* L. "frijol caupí" (Obando, 2012), *Zea mays* L. "maíz" (Sánchez, Lopez, Villegas & Montaña, 2014), *Gossypium hirsutum* "algodón" (Romero et al., 2017) y *Brasica oleracea* L. "brócoli" (Ghimire, Khanal, Prasad & Bahadhu, 2018).

Con *Azotobacter* spp. se ha reportado incremento en la germinación (Aly et al., 2012), longitud radicular (Sachin & Misra, 2009), biomasa aérea y radicular (Escobar et al., 2011), número de botones florales (Reyes et al., 2008), contenido de nitrógeno en raíces (Salhia, 2010) hojas y suelo (Orozco & Martínez, 2009) número de ramas y hojas (Salhia, 2010), clorofila en hojas (Obando, 2012), contenido de nitrógeno, fósforo y potasio en frutos (Gonzáles et al., 2003) y rendimiento (Ali et al., 2018).

En el suelo rizosférico, hojas y tallos de *Ipomoea batatas* “camote” se aislaron bacterias con el objetivo de realizar su caracterización como promotoras de crecimiento en plantas. A nivel de laboratorio se investigó la capacidad para solubilizar fosfatos, producir indoles y reducir el acetileno y en condiciones de invernadero las bacterias se inocularon en las raíces de plantas de camote para determinar el efecto a los 45 días. Se obtuvieron 113 morfotipos bacterianos, identificándose a nivel molecular *A. vinelandii* y *A. chroococcum* entre otros. Estas bacterias solubilizadoras de fosfato, productoras de indoles y reductoras de acetileno incrementaron la altura, longitud radicular y peso de la biomasa aérea y radicular, demostrándose su potencial como biofertilizantes en camote (Pérez & Sánchez, 2017).

El efecto de *A. chroococcum* y *Pseudomonas fluorescens* como biofertilizantes se investigó en *B. oleracea* en condiciones de campo. Tres dosis (0,08; 0,14 y 0,28g planta⁻¹), se aplicaron en la rizósfera de las plántulas después del trasplante, bajo un diseño completamente aleatorio con ocho repeticiones por tratamiento. El biofertilizante incrementó al número de hojas, área de hoja más grande, peso y diámetro de cabezas y rendimiento, correspondiendo los mayores incrementos a 0,08g planta⁻¹ (Ali et al., 2018).

La familia Enterobacteriácea está constituida por bacilos Gram negativos no esporulados, que fermentan y oxidan la glucosa, carecen de indofenol oxidasa, reducen los nitratos a nitritos y se hallan ampliamente distribuidos en la naturaleza. Los géneros de enterobacterias reportados como PGPR son *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Pantoea* y *Serratia* (Vásquez et al., 2000; Díaz et al., 2001; Carcaño et al., 2006; Cordero et al., 2008; Orozco & Martinez, 2009; Schoebitz et al., 2009; Zeinat et al., 2010; Morales et al., 2011).

La inoculación de enterobacterias en los diferentes cultivos agrícolas se relaciona con incremento en la germinación (Ogho & Okonkwo, 2012; Rani et al., 2011; Torres et al., 2003), número de pelos absorbentes, (Schoebitz et al., 2009); número de raíces laterales (Torres et al., 2003), altura (Rani et al., 2011; Schoebitz, 2006; Schoebitz et al., 2009), biomasa radical (Koo & Cho, 2009; Criollo et al., 2012; Ogho & Okonkwo, 2012; Sánchez et al., 2012) y rendimiento

(Morales et al., 2011; Sánchez et al., 2012), así como también, aumento en la concentración de fósforo (Cordero et al., 2008, p.13) y nitrógeno (Beracochea, 2011, p.13) en los tejidos vegetales.

Con el objetivo de obtener rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas, se recolectaron muestras de suelo rizosférico de *Cajanus cajan* “frijol de palo”, compost y vermicompost. Se seleccionaron 35 aislados bacterianos, determinando que 16 sintetizaron ácido indolacético, y solubilizaron fosfatos. Las diez bacterias más eficientes se inocularon en semillas de frijol de palo y después de 21 días con las bacterias se alcanzó hasta 92,59% de germinación; 13,80cm en la altura de plántula; 5,59cm en la longitud de la raíz y 6,80 mg en el peso promedio de las plantas secas, frente a 82,10%; 10,30cm; 4,10cm y 5,60mg, respectivamente en el testigo. Las dos bacterias con los mayores valores correspondieron *Enterobacter cancerogenus* y *Bacillus cereus*, capaces de promover el crecimiento de frijol de palo (Rani et al., 2011).

El potencial como promotores de crecimiento en plantas se investigó en enterobacterias aisladas de la rizósfera de malezas asociadas a *Zea mays* L. “maíz”. Las muestras de suelo se sembraron en agar Mac Conkey y se incubaron a 30°C por 48 horas. Se obtuvieron 338 cultivos de bacterias, entre los que el 66% fue identificado como enterobacterias de los géneros *Pantoea* (66%), *Serratia* (18%), *Hafnia* (5%), *Klebsiella* (5%), *Citrobacter* (2%) y *Enterobacter* (1%). Se cuantificaron hasta 57,5ppm de ácido indolacético; 31,7ppm de amonio; 5,52ppm de fosforo soluble y el 71% de las enterobacterias incrementó la emergencia de maíz amarillo, demostrándose la posibilidad de utilizar enterobacterias como promotoras de crecimiento en maíz (Farro & Graus, 2013).

2.2 Base teórica

La agricultura intensiva moderna se caracteriza por los sistemas tecnológicos que utilizan plantas muy especializadas y una alta concentración de insumos como fertilizantes, fungicidas, herbicidas, antibióticos, riego, maquinaria agrícola y energía fósil. La destructiva mecanización, el monocultivo, la concentración de la tierra en grandes empresas y la producción para la explotación también son características de la “Agricultura moderna”. La agricultura orgánica propone para el crecimiento y desarrollo de los cultivos la

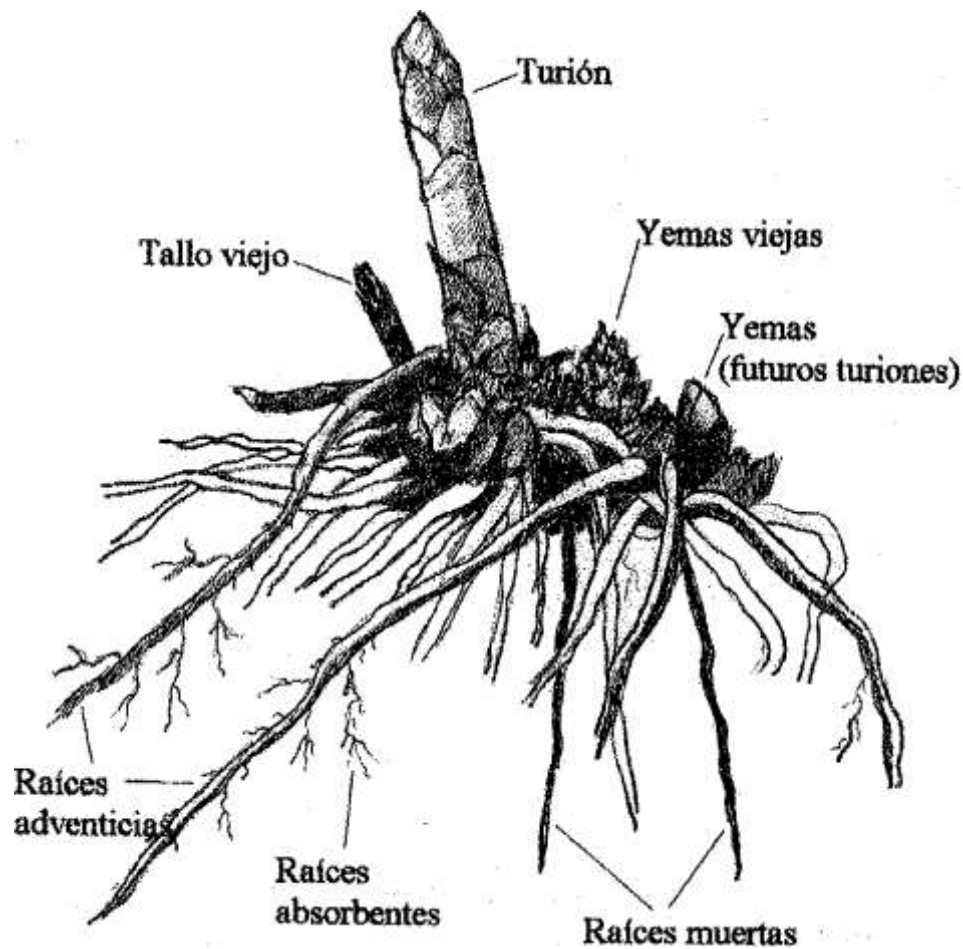
utilización de opciones tecnológicas como las bacterias promotoras de crecimiento en plantas para producir alimentos sanos, proteger la calidad del ambiente y salud humana e intensificar las interacciones biológicas y los procesos naturales beneficiosos (Dávila, 2004).

El término rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas, conocido por sus siglas en inglés PGPR (Plant growth promoting rhizobacteria) fue propuesto por Kloepper y Schroth en 1978, para describir a las bacterias que habitan la rizósfera de las plantas y que afectan en forma positiva el desarrollo vegetal. 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 (Bhattacharyya & Jha, 2012).

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. Entre los mecanismos indirectos o de biocontrol se encuentran la competencia por un nicho ecológico o por nutrientes, interacción directa con los patógenos (parasitismo y lisis enzimática), antibiosis o amensalismo, producción de sideróforos e inducción de resistencia sistémica a la planta (Moreno, García, Reyes, Vásquez & Cano, 2018).

2.2.1. *Asparagus officinales* L. “espárrago”

El espárrago es una planta herbácea perenne con tallos aéreos ramificados y un tallo subterráneo o rizoma a partir del cual se producen yemas que originan los turiones y las raíces principales o de almacenamiento (Borrego, 2014). Los turiones son la parte comestible y comercializable y cuando se dejan vegetar constituyen los tallos ramificados (Kirschenbilder et al., 2015)



El espárrago es un alimento bajo en calorías con más de 90% de agua, rico en proteínas, fibra y vitaminas A, C y E (Canto et al., 2008). Los turiones son de color verde o blanco (Agrobanco, 2007) y se exportan bajo tres formas: frascos, en conservas y congelados (Canto et al., 2008). Casi la totalidad de la producción está destinada a la exportación porque el consumo local es menor a 1kg per cápita anual (Agrobanco, 2007).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Material biológico

Coronas de espárrago y cultivos de *Azotobacter* spp. (8) y enterobacterias (8) aislados de raíz y suelo rizosférico de espárrago, caracterizadas *in vitro* como rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPR) y proporcionadas por el laboratorio de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, en la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

3.1.2 Población y muestra

En la investigación descriptiva la población correspondió a las bacterias del género *Azotobacter* y enterobacterias, aisladas de raíces y suelo rizosférico de espárrago y se investigaron 16 cultivos de bacterias (8 de *Azotobacter* spp.: 27-58, 66-144, 80-182, 88-192, 12-32, 13-32, 21-48 y 88-58 y 8 enterobacterias: *Enterobacter* spp.13.31, 26.64, 26.65, 71.159, 88.183; *Klebsiella* spp.2.4, 18.45 y *Serratia* sp.47.120). En la investigación explicativa, la población y muestra de estudio correspondió a 54 plantas de espárrago distribuidas en 18 tratamientos y tres repeticiones, bajo un diseño completamente aleatorio (Hernández, Fernández & Baptista, 2014).

3.2 Métodos

3.2.1 Variable de la fase descriptiva

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

3.2.2 Variables de la fase explicativa

Variable independiente: Cultivos de *Azotobacter* spp (8). y enterobacterias (8).

Variable dependiente: Desarrollo vegetativo de espárrago (altura, número de tallos, peso de biomasa radicular).

3.2.3 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

El trabajo de investigación se realizó en dos fases: en la primera descriptiva, con el diseño de una sola casilla de Goode y Hatt (Alvitres, 2000), se verificó en los cultivos de *Azotobacter* spp. y enterobacterias la estabilidad de las características que evidencian *in vitro* promoción de crecimiento en plantas. En la segunda fase, con un estudio experimental, bajo un diseño completamente aleatorio, DCA (Hernández, Fernández & Baptista, 2014), se investigó el efecto de las bacterias en el desarrollo vegetativo de espárrago.

Los tratamientos fueron 18, correspondientes a ocho cultivos de *Azotobacter* spp.: 27-58, 66-144, 80-182, 88-192, 12-32, 13-32, 21-48 y 88-58; ocho cultivos de enterobacterias: *Enterobacter* spp.13.31, 26.64, 26.65, 71.159, 88.183; *Klebsiella* spp.2.4, 18.45 y *Serratia* sp.47.120 y dos testigos: absoluto (agua destilada) y 100% de fertilizante químico (N:P:K). En cada tratamiento se realizaron tres repeticiones, totalizando 54 unidades experimentales (Figura 1).

3.2.4 Primera fase: Verificación de la estabilidad de las características que evidencian *in vitro* promoción de crecimiento en plantas

Con las bacterias se cuantificó el amonio producido por fijación de nitrógeno, el fósforo solubilizado, 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 (3500 rpm) 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 9×10^8 cel/mL⁻¹ (tubo 3 del nefelómetro de Mc Farland) y con el espectrofotómetro de luz visible (Model Tenso Med NV-203) a 600 nm: absorbancia = 0,20 equivalente a 10^8 células/mL⁻¹ (Rodríguez, 2013).

11	2	6	10	18	1	12	4	17	7	9	15	3	13	16	5	14	8
----	---	---	----	----	---	----	---	----	---	---	----	---	----	----	---	----	---

4	13	3	7	14	9	5	11	16	10	1	8	6	2	17	12	18	15
---	----	---	---	----	---	---	----	----	----	---	---	---	---	----	----	----	----

16	12	8	10	9	17	2	3	1	6	18	5	4	14	11	15	13	7
----	----	---	----	---	----	---	---	---	---	----	---	---	----	----	----	----	---

T1 : Testigo químico

T2 : Testigo absoluto

T3 a T10 : *Azotobacter* spp.

T10 a T18: Enterobacterias

Figura 1. Diseño completamente aleatorio para determinar el efecto de *Azotobacter* spp. y enterobacterias en el desarrollo vegetativo de *Asparagus officinalis* L.

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 (Cadena & Martínez, 2011). El inóculo (5%: 0,15mL) de cada cultivo bacteriano se sembró por triplicado en tubos de 15x150mm conteniendo 3mL de caldo extracto de suelo 10% y se incubó a 30°C, por 96 horas, con agitación constante (150 rpm). A continuación, se agregaron 9mL de KCl 2M, se agitaron a 150 rpm durante 1 hora y se dejaron en reposo 1 hora adicional, para después tomar 10mL de sobrenadante y centrifugarlos (3000 rpm) durante 5 minutos.

Los sobrenadantes se vertieron en tubos de dilución, se añadieron 0,4mL de solución alcohólica de fenol al 10%; 0,4mL de nitroprusiato de sodio al 0,5 % y 1 mL de solución oxidante. Los tubos se agitaron manualmente por 2 minutos y se dejó en reposo 1 hora. La reacción se consideró positiva a la fijación de nitrógeno por la aparición de una coloración azul, leyéndose la absorbancia en el espectrofotómetro de luz visible (Model Tenso Med NV-203) 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 100 ppm de cloruro de amonio (Anexo A).

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 y se incubaron a 30°C, con agitación constante (150 rpm), por 96 horas. Los caldos se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos y con sobrenadante se cuantificó el fósforo soluble (Rodier & Rodi, 2005). La reacción se consideró positiva a la solubilización de fosfato por la aparición de una coloración azul, leyéndose la absorbancia en el espectrofotómetro de luz visible (Model Tenso Med NV-203) a 690nm. 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 B).

c) Cuantificación de indoles producidos *in vitro*

La cuantificación de indoles producidos *in vitro* por las bacterias se realizó según el método colorimétrico: Técnica de Salkowski (García et al., 2010). El inóculo (5%: 0,25mL) de cada cultivo bacteriano fue sembrado por triplicado en 5mL de caldo tripticasa soya suplementado con triptófano. Después de la incubación a 30°C, por 96 horas, en agitación constante (150 rpm), los cultivos se centrifugaron a 3000 rpm, 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 dejó en reposo durante 30 minutos, en oscuridad.

La reacción se consideró positiva a la producción de indoles por la aparición de una coloración grosella, leyéndose la absorbancia en el espectrofotómetro de luz visible (Model Tenso Med NV-203) a 530nm. Las concentraciones de indoles se calcularon con la ecuación de la curva de calibración, obtenida previamente con diluciones sucesivas de una solución 100 ppm de ácido indolacético (Anexo C).

3.2.5 Segunda fase: Efecto de *Azotobacter* spp. y enterobacterias en el desarrollo vegetativo de espárrago

Los 16 cultivos de *Azotobacter* spp. y enterobacterias (Figura 2) se inocularon antes de la siembra en las coronas de espárrago y durante 150 días de cultivo en condiciones de invernadero se determinó el efecto en el desarrollo vegetativo de las plantas (Córdova, 2016). El suelo experimental estuvo constituido por 216kg 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 4,5kg de capacidad, a razón de 4kg por maceta (Figura 3).

En el ensayo se sembraron coronas de espárrago cultivar UC-157F1, luego de ser tratadas por inmersión durante 5 minutos (Figura 4), en una solución del fungicida Benomyl polvo mojable-WP (Benlate), en la dosis de 2gL⁻¹ de agua declorada previamente durante 24 horas.



Figura 2. Cultivos de bacterias de *Azotobacter* spp. y enterobacterias.



Figura 3. Suelo experimental distribuido en macetas de arcilla.



Figura 4. Inversión de corona de *Asparagus officinalis* L. solución del fungicida Benomyl.

El inóculo se obtuvo con las bacterias cultivadas en caldo nutritivo, a 30°C, durante 24 horas y después de la centrifugación se obtuvieron 225mL de cada cultivo bacteriano en solución salina esterilizada, NaCl 0,85% p/v (Córdova, 2016), cuya concentración se estandarizó a $9 \times 10^8 \text{ cel mL}^{-1}$ 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 (75mL por corona), con ayuda de un pulverizador de plástico de 500mL de capacidad (Figuras 5, 6). Después de 30 minutos de reposo a temperatura ambiente (25°C), se sembraron en el suelo experimental, a razón de una corona por maceta (Figura 13).

Los riegos se realizaron cada 3 días con agua potable declarada, tomando en cuenta los requerimientos hídricos de la planta. Después de 15 días de la siembra, en el testigo químico se aplicaron 250mL de una solución de fertilizante nitrogenado (Urea 46%), en la dosis de 5 g L^{-1} de agua, cada 30 días. Cada 30 días durante 5 meses se midió la altura de las plantas y se contaron los tallos (Figura 7). A los 5 meses se determinó el peso de la biomasa radicular (Figuras 8, 9). La altura de la planta se expresó en cm, considerando desde la base del tallo más alto hasta la yema terminal (Puicón, 2014).

A los 5 meses se cortó la parte aérea de cada planta, al ras del suelo y se extrajo la raíz. Ésta previamente lavada, se deshidrató en el horno a 70°C, hasta alcanzar peso constante (Córdova, 2016) y el peso se determinó en una balanza de precisión. Con los datos obtenidos se calculó el índice de efectividad de la inoculación (IEI) en porcentaje, mediante la fórmula (Carreño, 2009) siguiente:

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



Figura 5. Coronas de *Asparagus officinalis* L. e inóculos bacterianos.



Figura 6. Siembra de corona de *Asparagus officinalis* L. inoculada con bacterias.



Figura 7. Medida de la altura de planta de *Asparagus officinalis* L.



Figura 8. Raíces de *Asparagus officinalis* L.



Figura 9. Pesaje de raíces de *Asparagus officinalis* L.

3.2.6 Análisis estadístico de los datos

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

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

Donde:

Y_{ij} = observación del i-ésimo tratamiento, J-enésima repetición

u = media general de la variable respuesta

T_i = efecto i-ésimo tratamiento, siendo $i = 1, 2, 3, \dots, 18$

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

$H_0 = u_1 = u_2 = u_3, \dots = u_{18}$

H_a = Al menos una media diferente

Con los valores de la altura, número de tallos y biomasa radicular se realizaron las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza (Hernández et al., 2014). El análisis de varianza determinó las diferencias entre los tratamientos y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey la significancia entre ellos ($0 < 0,001$). 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 Verificación de la estabilidad de las características que evidencian promoción de crecimiento en plantas

Las bacterias investigadas fijaron nitrógeno, solubilizaron fósforo y produjeron indoles *in vitro*, cuantificándose 8,075 a 32,542ppm de amonio, 1,217 a 17,189ppm de fósforo y 0,244 a 58,688ppm de indoles (Figuras 10 a 12, tabla 1). Los valores en las concentraciones de amonio, fósforo e indoles aumentaron o disminuyeron ligeramente; no obstante, con dos cultivos de *Klebsiella* spp. no se cuantificó fósforo soluble en el ensayo de verificación.

4.2 Efecto de 16 cultivos de *Azotobacter* spp. y enterobacterias en el desarrollo vegetativo de espárrago en condiciones de invernadero

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 de comparaciones múltiples de Tukey.

La altura de las plantas de espárrago a los 30 días fue de 31,83 (*Azotobacter* sp.12-30) a 62,0cm (*Enterobacter* sp.88.183), 38,0cm en el testigo absoluto y 45,67cm en el testigo químico (Figuras 13 a 16), alcanzándose índices de efectividad de 6,05% con *Azotobacter* sp.83-189 y 63,16% con *Enterobacter* sp.88.183 (Tabla 2). La prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia (Anexo D) y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey el mayor valor se alcanzó con *Enterobacter* sp.88.183, no diferenciándose significativamente de *Serratia* sp.47.120 y *Klebsiella* sp.2.4, pero sí de los demás tratamientos (Tabla 3).



Figura 10. Coloración observada en la cuantificación de amonio.



Figura 11. Coloración observada en la cuantificación de fósforo soluble.



Figura 12. Coloración observada en la cuantificación de indoles.

Tabla 1

Nitrógeno fijado como amonio, fósforo solubilizado e indoles producidos por Azotobacter spp. y enterobacterias

Bacterias	Amonio (ppm)		Fósforo soluble (ppm)		Indoles (ppm)	
	1° caracterización	Verificación	1° caracterización	Verificación	1° caracterización	Verificación
<i>Azotobacter</i> sp.27-58	8,075	7,904	2,550	2,630	42,244	40,852
<i>Azotobacter</i> 66-144	32,542	31,330	4,371	4,320	0,244	2,336
<i>Azotobacter</i> 80-182	32,395	30,198	4,559	4,140	21,800	23.250
<i>Azotobacter</i> 83-189	22,027	24,010	1,582	1,001	41,355	40,588
<i>Azotobacter</i> 12-30	28,340	27,120	2,000	1,940	58,688	56,755
<i>Azotobacter</i> 13-32	28,152	27,910	3,130	3,262	43,133	41,699
<i>Azotobacter</i> 21-48	32,340	31,142	1,333	1,436	9,355	10,360
<i>Azotobacter</i> 88-192	32,330	31,989	1,217	1,300	9,133	11,112
<i>Enterobacter</i> sp.13.31	19,031	21,133	5,556	5,804	32,991	33,756
<i>Enterobacter</i> sp.26.64	8,865	9,765	3,547	3,903	34,466	33,226
<i>Enterobacter</i> sp.26.65	8,865	9,696	2,825	3,000	36,911	37,423
<i>Enterobacter</i> sp.71.159	19,251	21,459	17,189	18,140	8,244	10,145
<i>Enterobacter</i> sp.88.183	19,417	20,874	3,562	1,234	9,355	10,533
<i>Klebsiella</i> sp.2.4	19,325	20,796	1,775	0	6,022	10,498
<i>Klebsiella</i> sp.18.45	10,115	12,110	1,914	0	37,133	38,15
<i>Serratia</i> sp.47.120	19,380	21,580	3,878	4,150	3,133	6,133

*Esqueche y Quispe (2017),Cornetero y Segura (2017)



Figura 13. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 30 días después de la siembra de coronas inoculadas con *Azotobacter* sp.8.



Figura 14. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 30 días después de la siembra de coronas inoculadas con *Enterobacter* sp.13.31.



Figura 15. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 30 días después de la siembra de coronas inoculadas con *Enterobacter* sp.71.159.

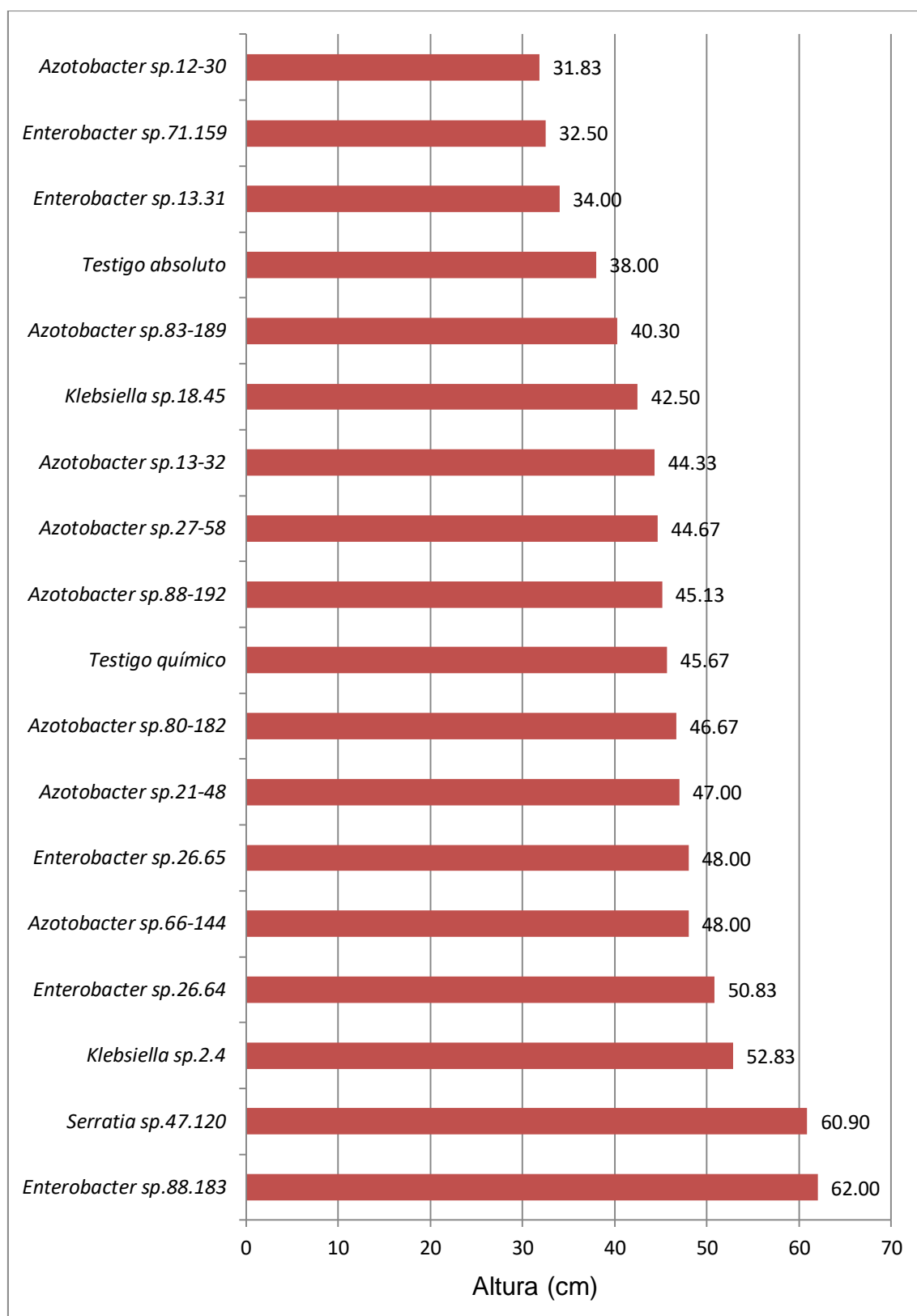


Figura 16. Altura (cm) de plantas de *Asparagus officinalis* L. 30 días después de la siembra de coronas inoculadas con *Azotobacter* spp. y enterobacterias.

Tabla 2

Índices de efectividad (%) en la altura de plantas de Asparagus officinalis L. por Azotobacter spp. y enterobacterias

Tratamientos	IE(%) / días*				
	30	60	90	120	150
Testigo químico	20,18	20,60	2,66	6,63	15,03
<i>Azotobacter</i> sp.27-58	17,55	17,45	0	0	5,19
<i>Azotobacter</i> 66-144	26,32	34,12	30,48	25,30	13,48
<i>Azotobacter</i> 80-182	22,81	17,45	3,32	5,72	13,48
<i>Azotobacter</i> 83-189	6,05	26,98	24,52	20,50	19,70
<i>Azotobacter</i> 12-30	0	0	0	0	5,19
<i>Azotobacter</i> 13-32	16,66	18,26	1,99	8,44	21,76
<i>Azotobacter</i> 21-48	23,68	30,50	11,27	10,84	12,96
<i>Azotobacter</i> 88-192	18,76	21,43	7,29	3,61	5,19
<i>Enterobacter</i> sp.13.31	0	14,28	11,27	14,77	14,52
<i>Enterobacter</i> sp.26.64	33,76	22,62	57,30	45,49	28,24
<i>Enterobacter</i> sp.26.65	26,32	40,48	30,48	21,09	29,29
<i>Enterobacter</i> sp.71.159	0	9,52	40,41	30,13	17,63
<i>Enterobacter</i> sp.88.183	63,16	66,67	55,31	44,59	41,46
<i>Klebsiella</i> sp.2.4	39,03	33,30	41,07	32,53	56,49
<i>Klebsiella</i> sp.18.45	11,84	15,23	7,95	3,61	17,63
<i>Serratia</i> sp.47.120	60,26	50,00	31,79	26,51	16,59

*Promedio de tres repeticiones

Tabla 3

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la altura de plantas de *Asparagus officinalis* L.

Tratamientos	Altura(cm)/días*									
	30	Sign.	60	Sign.	90	Sign.	120	Sign.	150	Sign.
Testigo absoluto	38,00	efg	42,00	ef	50,33	e	55,33	hi	64,33	f
Testigo químico	45,67	cde	50,67	cde	51,67	de	59,00	fghi	74,00	de
<i>Azotobacter</i> sp.27-58	44,67	cdef	49,33	cde	50,33	e	51,67	i	67,67	ef
<i>Azotobacter</i> 66-144	48,00	cde	56,33	bcd	65,67	bc	69,33	cde	73,00	de
<i>Azotobacter</i> 80-182	46,67	cde	49,33	cde	52,00	de	58,50	ghi	73,00	de
<i>Azotobacter</i> 83-189	40,30	defg	53,33	bcd	62,67	bcd	66,67	cdef	77,00	cd
<i>Azotobacter</i> 12-30	31,83	g	36,00	f	39,67	f	55,00	hi	67,67	ef
<i>Azotobacter</i> 13-32	44,33	cdef	49,67	cde	51,33	e	60,00	fghi	78,33	cd
<i>Azotobacter</i> 21-48	47,00	cde	54,83	bcd	56,00	cde	61,33	efgh	72,67	de
<i>Azotobacter</i> 88-192	45,13	cde	51,00	cde	54,00	de	57,33	ghi	67,67	ef
<i>Enterobacter</i> sp.13.31	34,00	fg	48,00	cde	56,00	cde	63,50	defg	73,67	de
<i>Enterobacter</i> sp.26.64	50,83	bcd	51,50	cde	79,17	a	80,50	a	82,50	c
<i>Enterobacter</i> sp.26.65	48,00	cde	59,00	abc	65,67	bc	67,00	cdef	83,17	bc
<i>Enterobacter</i> sp.71.159	32,50	g	46,00	def	70,67	ab	72,00	bc	75,67	cde
<i>Enterobacter</i> sp.88.183	62,00	a	70,00	a	78,17	a	80,00	ab	91,00	b
<i>Klebsiella</i> sp.2.4	52,83	abc	56,00	bcd	71,00	ab	73,33	abc	100,67	a
<i>Klebsiella</i> sp.18.45	42,50	cdefg	48,40	cde	54,33	de	57,33	ghi	75,67	cde
<i>Serratia</i> sp.47.120	60,90	ab	63,00	ab	66,33	b	70,00	cd	75,00	cde

*Promedio de tres repeticiones

La altura de las plantas de espárrago a los 60 días fue de 36,0 (*Azotobacter* sp.12-30) a 70,0cm (*Enterobacter* sp.88.183), 42,0cm en el testigo absoluto y 50,67cm en el testigo químico (Figuras 17 a 21), alcanzándose índices de efectividad de 9,52% con *Enterobacter* sp.71.159 y 66,67% con *Enterobacter* sp.88.183 (Tabla 2). La prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia (Anexo E) y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey el mayor valor se alcanzó con *Enterobacter* sp.88.183, no diferenciándose significativamente de *Serratia* sp.47.120 y *Enterobacter* sp.26.65, pero sí de los demás tratamientos (Tabla 3).

La altura de las plantas de espárrago a los 90 días fue de 39,67 (*Azotobacter* sp.12-30) a 79,17cm (*Enterobacter* sp.26.64), 50,33cm en el testigo absoluto y 51,67cm en el testigo químico (Figuras 22, 23), alcanzándose índices de efectividad de 1,99% con *Azotobacter* sp.13-32 y 57,30% con *Enterobacter* sp.26.64 (Tabla 2). La prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia (Anexo F) y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey el mayor valor se alcanzó con *Enterobacter* sp.26.64 y *Enterobacter* sp.88.183, no diferenciándose significativamente con *Enterobacter* sp.71.159 y *Klebsiella* sp.2.4, pero sí de los demás tratamientos (Tabla 3).

La altura de las plantas de espárrago a los 120 días fue de 51,67 (*Azotobacter* sp.27-58) a 80,50cm (*Enterobacter* sp.26.64), 55,33cm en el testigo absoluto y 59,00cm en el testigo químico (Figuras 24 a 27), alcanzándose índices de efectividad de 3,61% con *Azotobacter* sp.88-192, *Klebsiella* sp.18.45 y 45,49% con *Enterobacter* sp.26.64 (Tabla 2). La prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia (Anexo G) y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey el mayor valor se alcanzó con *Enterobacter* sp.26.64, no diferenciándose significativamente con *Enterobacter* sp.88.183 y *Klebsiella* sp.2.4, pero sí de los demás tratamientos (Tabla 3).



Figura 17. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 60 días después de la siembra de coronas inoculadas con *Azotobacter* spp.



Figura 18. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 60 días después de la siembra de coronas inoculadas con *Azotobacter* sp.13.32.



Figura 19. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 60 días después de la siembra de coronas inoculadas con *Enterobacter* sp.13.31.



Figura 20. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 60 días después de la siembra de coronas inoculadas con *Enterobacter* sp.26.64.

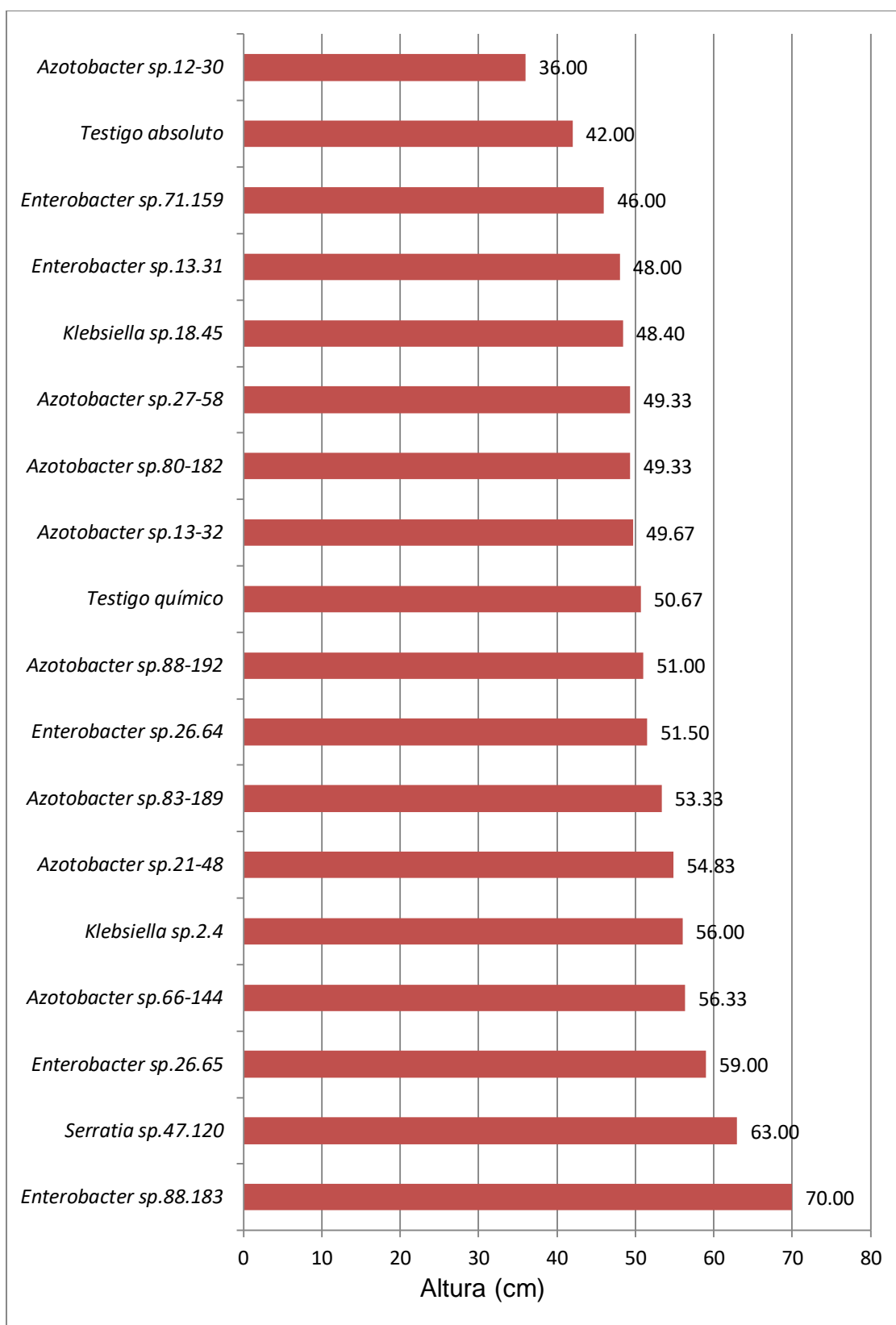


Figura 21. Altura (cm) de plantas de *Asparagus officinalis* L. 60 días después de la siembra de coronas inoculadas con *Azotobacter* spp. y enterobacterias.



Figura 22. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 90 días después de la siembra de coronas inoculadas con *Azotobacter* sp.83-189.

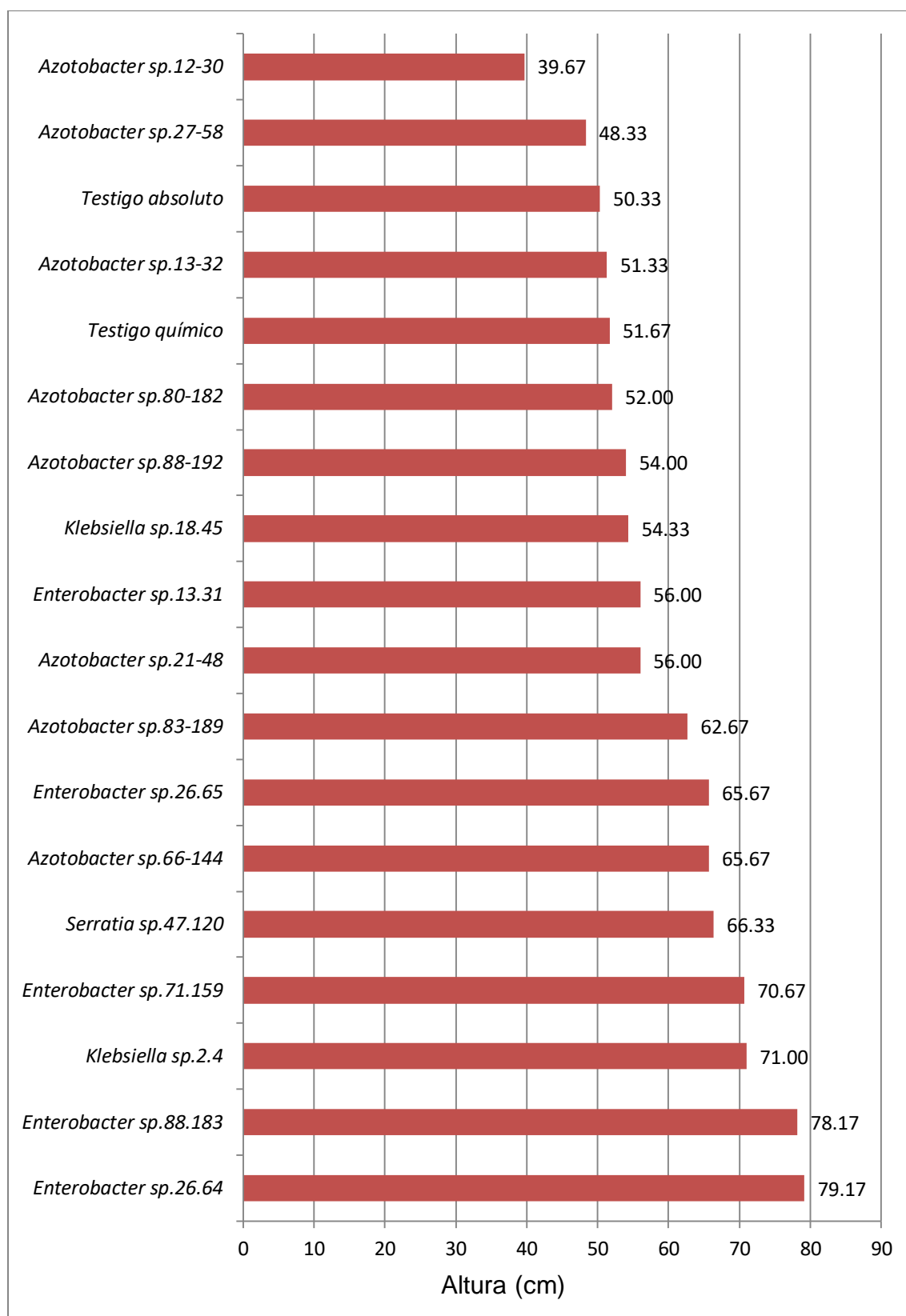


Figura 23. Altura (cm) de plantas de *Asparagus officinalis* L. 90 días después de la siembra de coronas inoculadas con *Azotobacter* spp y enterobacterias.

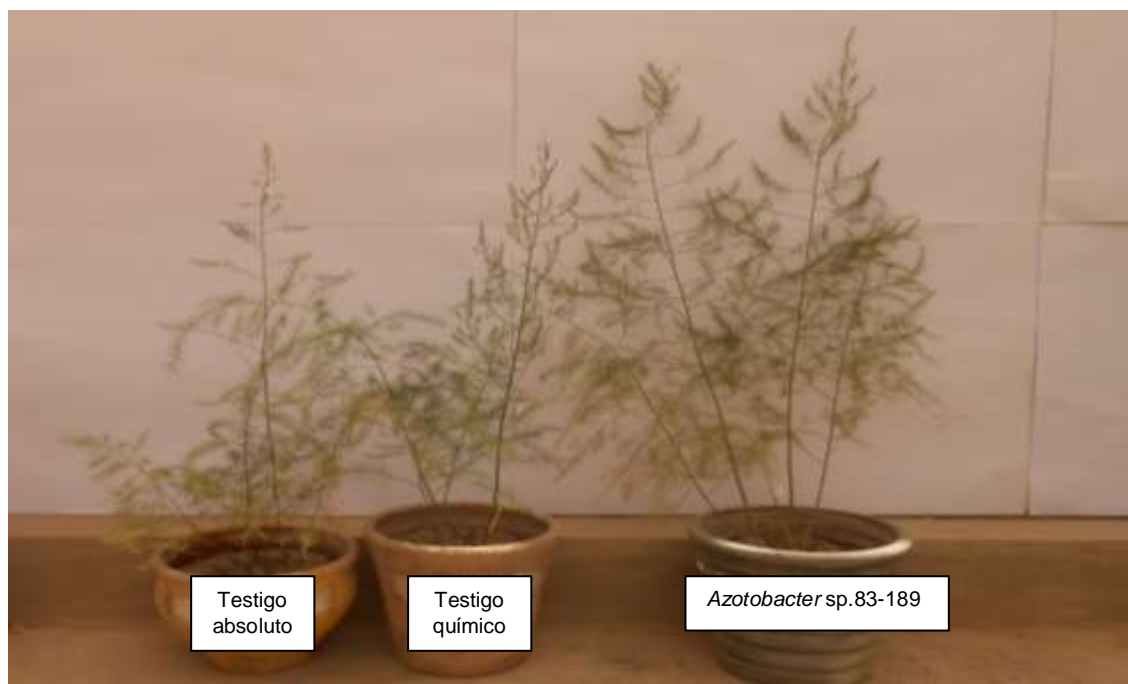


Figura 24. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 120 días después de la siembra de coronas inoculadas con *Azotobacter* sp.83-189.



Figura 25. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 120 días después de la siembra de coronas inoculadas con *Azotobacter* sp.12-30.



Figura 26. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 120 días después de la siembra de coronas inoculadas con *Enterobacter* sp.13.31.

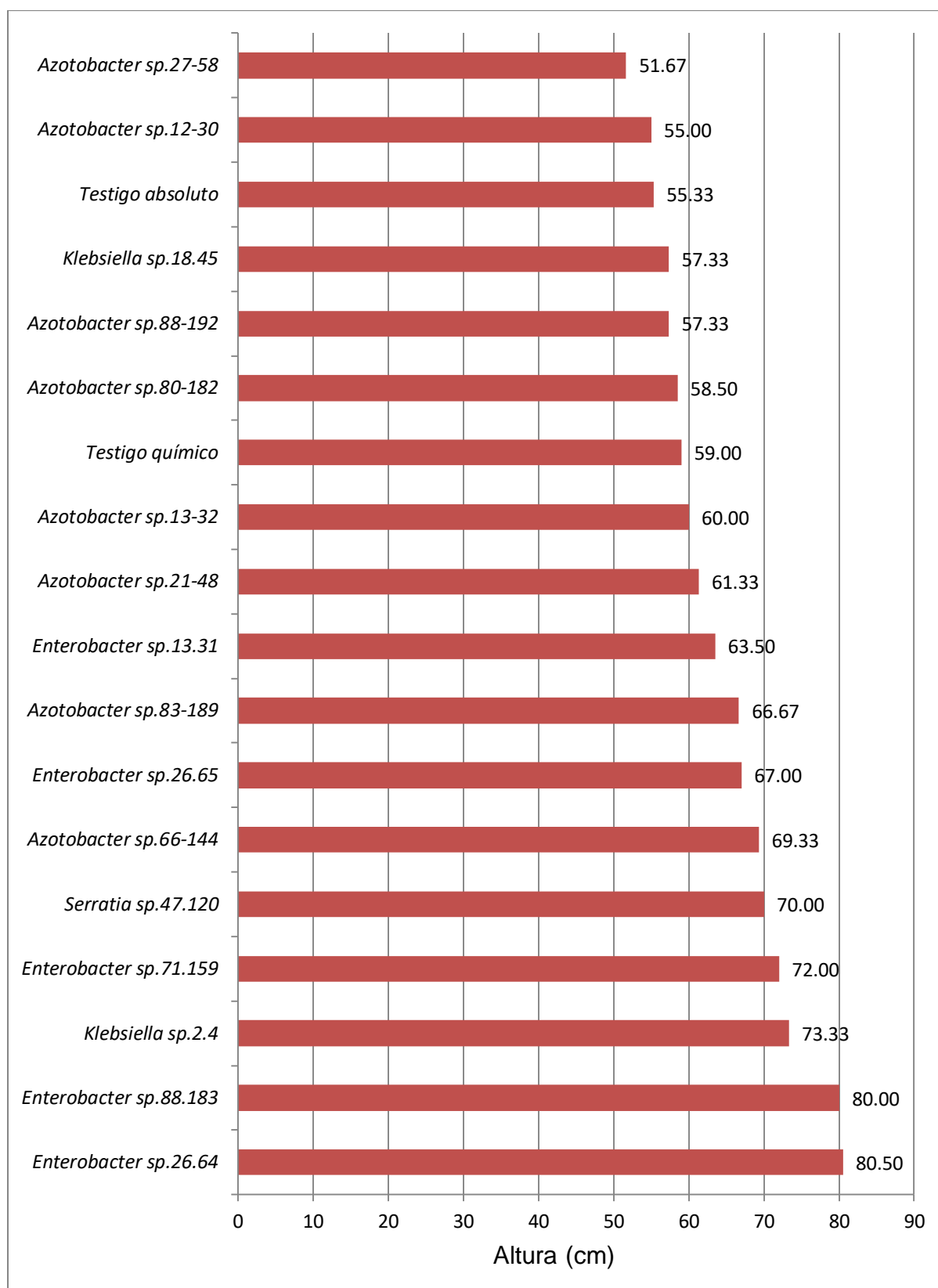


Figura 27. Altura (cm) de plantas de *Asparagus officinalis* L. 120 días después de la siembra de coronas inoculadas con *Azotobacter* spp. y enterobacterias.

La altura de las plantas de espárrago a los 150 días fue de 67,67 (*Azotobacter* spp.27-58, 12-30, 88-192) a 100,67cm (*Klebsiella* sp.2.4), 64,33cm en el testigo absoluto y 74,00cm en el testigo químico (Figuras 28 a 30), alcanzándose índices de efectividad de 5,19% con *Azotobacter* spp.12-30, 88-192 y 56,49% con *Klebsiella* sp.2.4 (Tabla 2). La prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia (Anexo H) y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey el mayor valor se alcanzó con *Klebsiella* sp.2.4 diferenciándose significativamente de los demás tratamientos (Tabla 3).

El número de tallos de las plantas de espárrago a los 30 días fue de 2,0 (*Klebsiella* sp.2.4) a 8,0 (*Serratia* sp.47.120), 2,67 en el testigo absoluto y 4,0 en el testigo químico (Figura 31), alcanzándose índices de efectividad de 24,72% con *Enterobacter* sp.71.159 y 8,0% con *Serratia* sp.47.120 (Tabla 4). La prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia (Anexo I) y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey el mayor valor se alcanzó con *Serratia* sp.47.120, no diferenciándose significativamente con *Azotobacter* sp.88.183, *Azotobacter* sp.27-58, *Azotobacter* sp.21-48, *Azotobacter* sp.80-182 y *Azotobacter* sp.66-144, pero sí de los demás tratamientos (Tabla 5).

El número de tallos de las plantas de espárrago a los 60 días fue de 6,0 (*Azotobacter* sp.83-189, *Enterobacter* sp.13.31) a 11,33 (*Enterobacter* sp.88.183), 3,67 en el testigo absoluto y 4,67 en el testigo químico (Figura 32), alcanzándose índices de efectividad de 27,25% con el testigo químico y 208,72% con *Enterobacter* sp.88.183 (Tabla 4). La prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia (Anexo J) y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey el mayor valor se alcanzó con *Enterobacter* sp.88.183 y *Serratia* sp.47.120 no diferenciándose significativamente con *Azotobacter* sp.21-48, pero sí de los demás tratamientos (Tabla 5).



Figura 28. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 150 días después de la siembra de coronas inoculadas con *Azotobacter* sp.66-144.



Figura 29. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 150 días después de la siembra de coronas inoculadas con *Enterobacter* sp.88.183.

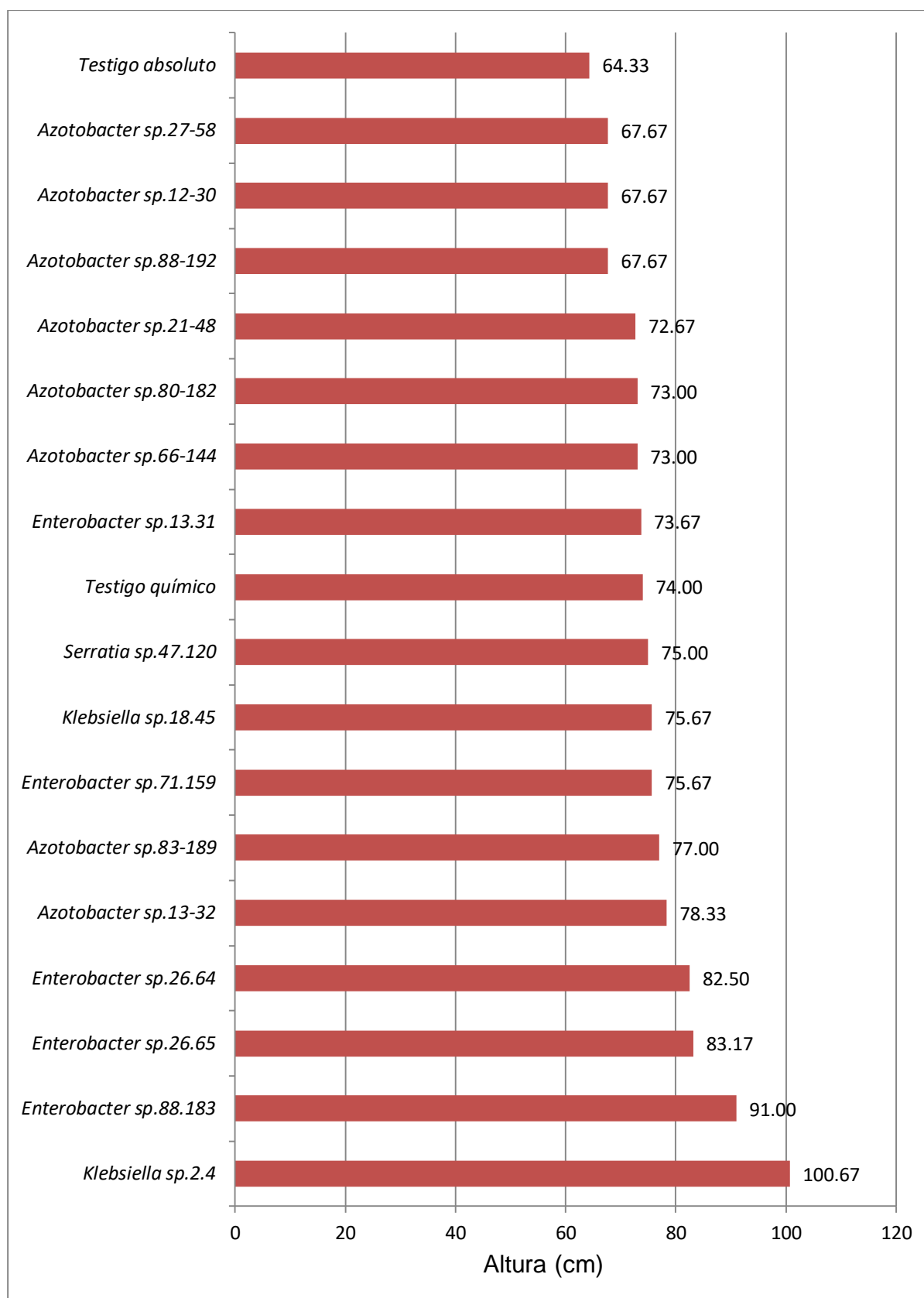


Figura 30. Altura (cm) de plantas de *Asparagus officinalis* L. 150 días después de la siembra de coronas inoculadas con *Azotobacter* spp. y enterobacterias.

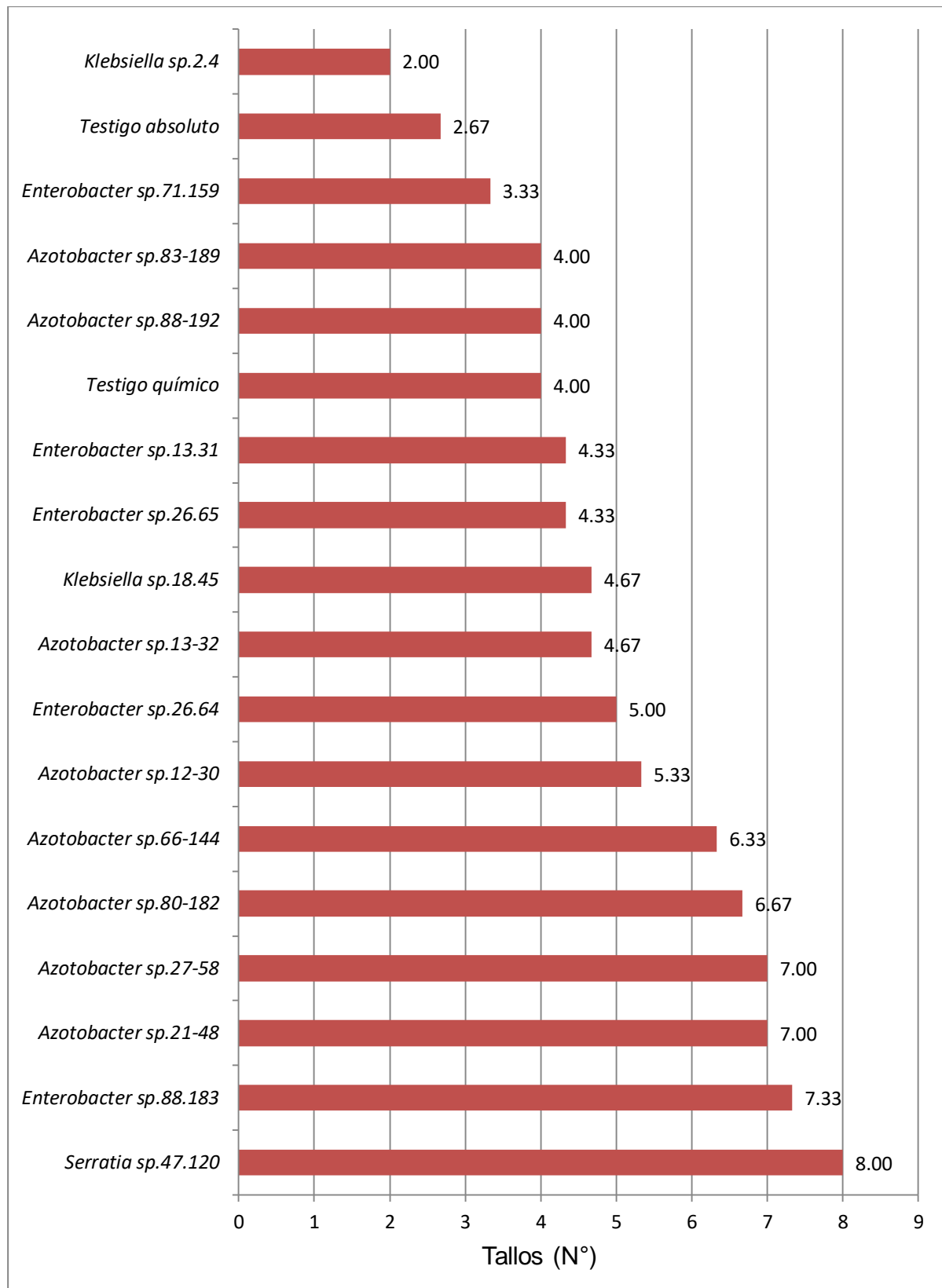


Figura 31. Número de tallos de plantas de *Asparagus officinalis* L. 30 días después de la siembra de coronas inoculadas con *Azotobacter* spp. y enterobacterias.

Tabla 4

Índices de efectividad (%) en el número de tallos de plantas de Asparagus officinalis L. por Azotobacter spp. y enterobacterias

Tratamientos	IE(%) / días*			
	30	60	90	150
Testigo químico	49,81	27,25	0	66,67
<i>Azotobacter</i> sp.27-58	162,17	90,74	60,0	66,67
<i>Azotobacter</i> 66-144	137,08	99,73	80,0	105,50
<i>Azotobacter</i> 80-182	149,81	108,99	80,0	66,67
<i>Azotobacter</i> 83-189	49,81	63,49	66,6	105,50
<i>Azotobacter</i> 12-30	99,63	117,98	120,0	150,00
<i>Azotobacter</i> 13-32	74,07	54,49	60,0	66,67
<i>Azotobacter</i> 21-48	162,17	190,74	180,0	183,33
<i>Azotobacter</i> 88-192	49,81	108,99	40,0	133,33
<i>Enterobacter</i> sp.13.31	62,17	63,49	60,0	111,17
<i>Enterobacter</i> sp.26.64	87,27	117,98	80,0	105,50
<i>Enterobacter</i> sp.26.65	62,17	99,73	66,6	122,17
<i>Enterobacter</i> sp.71.159	24,72	72,48	66,6	72,17
<i>Enterobacter</i> sp.88.183	174,53	208,72	146,6	227,83
<i>Klebsiella</i> sp.2.4	0	63,49	40,0	66,67
<i>Klebsiella</i> sp.18.45	74,91	99,73	80,0	116,67
<i>Serratia</i> sp.47.120	199,63	199,73	146,6	205,50

*Promedio de tres repeticiones

Tabla 5

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey del número de tallos de *Asparagus officinalis* L.

Tratamientos	Altura(cm)/días*							
	30	Sign.	60	Sign.	90	Sign.	150	Sign.
Testigo absoluto	2,67	gh	3,67	e	5,00	e	6,00	f
Testigo químico	4,00	efgh	4,67	de	5,00	e	10,00	e
<i>Azotobacter</i> sp.27-58	7,00	abc	7,00	cd	8,00	cde	10,00	e
<i>Azotobacter</i> 66-144	6,33	abcde	7,33	cd	9,00	bcd	12,33	cde
<i>Azotobacter</i> 80-182	6,67	abcd	7,67	c	9,00	bcd	10,00	e
<i>Azotobacter</i> 83-189	4,00	efgh	6,00	cde	8,33	cde	12,33	cde
<i>Azotobacter</i> 12-30	5,33	bcdef	8,00	bc	11,00	abc	15,00	bc
<i>Azotobacter</i> 13-32	4,67	cdefg	5,67	cde	8,00	cde	10,00	e
<i>Azotobacter</i> 21-48	7,00	abc	10,67	ab	14,00	a	17,00	ab
<i>Azotobacter</i> 88-192	4,00	efgh	7,67	c	7,00	de	14,00	c
<i>Enterobacter</i> sp.13.31	4,33	defgh	6,00	cde	8,00	cde	12,67	cde
<i>Enterobacter</i> sp.26.64	5,00	bcdefgh	8,00	bc	9,00	bcd	12,33	cde
<i>Enterobacter</i> sp.26.65	4,33	defgh	7,33	cd	8,33	cde	13,33	c
<i>Enterobacter</i> sp.71.159	3,33	fgh	6,33	cde	8,33	cde	10,33	de
<i>Enterobacter</i> sp.88.183	7,33	ab	11,33	a	12,33	ab	19,67	a
<i>Klebsiella</i> sp.2.4	2,00	h	6,00	cde	7,00	de	10,00	e
<i>Klebsiella</i> sp.18.45	4,67	cdefg	7,33	cd	9,00	bcd	13,00	cd
<i>Serratia</i> sp.47.120	8,00	a	11,00	a	12,33	ab	18,33	a

*Promedio de tres repeticiones

El número de tallos de las plantas de espárrago a los 90 días fue de 7,0 (*Enterobacter* sp.88-192, *Klebsiella* sp.2.4) a 14,0 (*Enterobacter* sp.21-48), 5,0 en el testigo absoluto y 5,0 en el testigo químico (Figura 33), alcanzándose índices de efectividad de 40,0% con *Enterobacter* sp.88-192, *Klebsiella* sp.2.4 y 180,0% con *Enterobacter* sp.21-48 (Tabla 4). La prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia (Anexo K) y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey el mayor valor se alcanzó con *Azotobacter* sp.21-48 no diferenciándose significativamente con *Enterobacter* sp.88-183, *Serratia* sp.47.120 y *Azotobacter* sp.12-30, pero sí de los demás tratamientos (Tabla 5).

El número de tallos de las plantas de espárrago a los 150 días fue de 10,0 (*Enterobacter* spp.27-58, 80-182, 13-32, *Klebsiella* sp.2.4) a 19,67 (*Enterobacter* sp.88.183), 6,0 en el testigo absoluto y 10,0 en el testigo químico (Figura 34), alcanzándose índices de efectividad de 66,67% con *Enterobacter* sp.27-58, *Enterobacter* sp.80-182, *Enterobacter* sp.13-32, *Klebsiella* sp.2.4, testigo químico y 227,83% con *Enterobacter* sp.88.183 (Tabla 4). La prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia (Anexo L) y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey el mayor valor se alcanzó con *Enterobacter* sp.88.183 y *Serratia* sp.47.120, no diferenciándose significativamente con *Azotobacter* sp.21-48, pero sí de los demás tratamientos (Tabla 5).

La biomasa radicular de espárrago a los 150 días fue de 30g (*Azotobacter* sp.12-30) a 147g (*Enterobacter* sp.26.64), 38g en el testigo absoluto y 54g en el testigo químico, alcanzándose índices de efectividad de 0,87% con *Azotobacter* 80-182 y 286,84% con *Enterobacter* sp.26.64 (Tabla 6). La prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia (Anexo M) y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey el mayor valor se alcanzó con *Enterobacter* sp.26.64, no diferenciándose significativamente con *Enterobacter* sp.88.183, *Azotobacter* sp.83-189, *Enterobacter* sp.26.65, *Klebsiella* sp.18.45 y *Azotobacter* sp.66-144, pero sí de los demás tratamientos (Tabla 6).

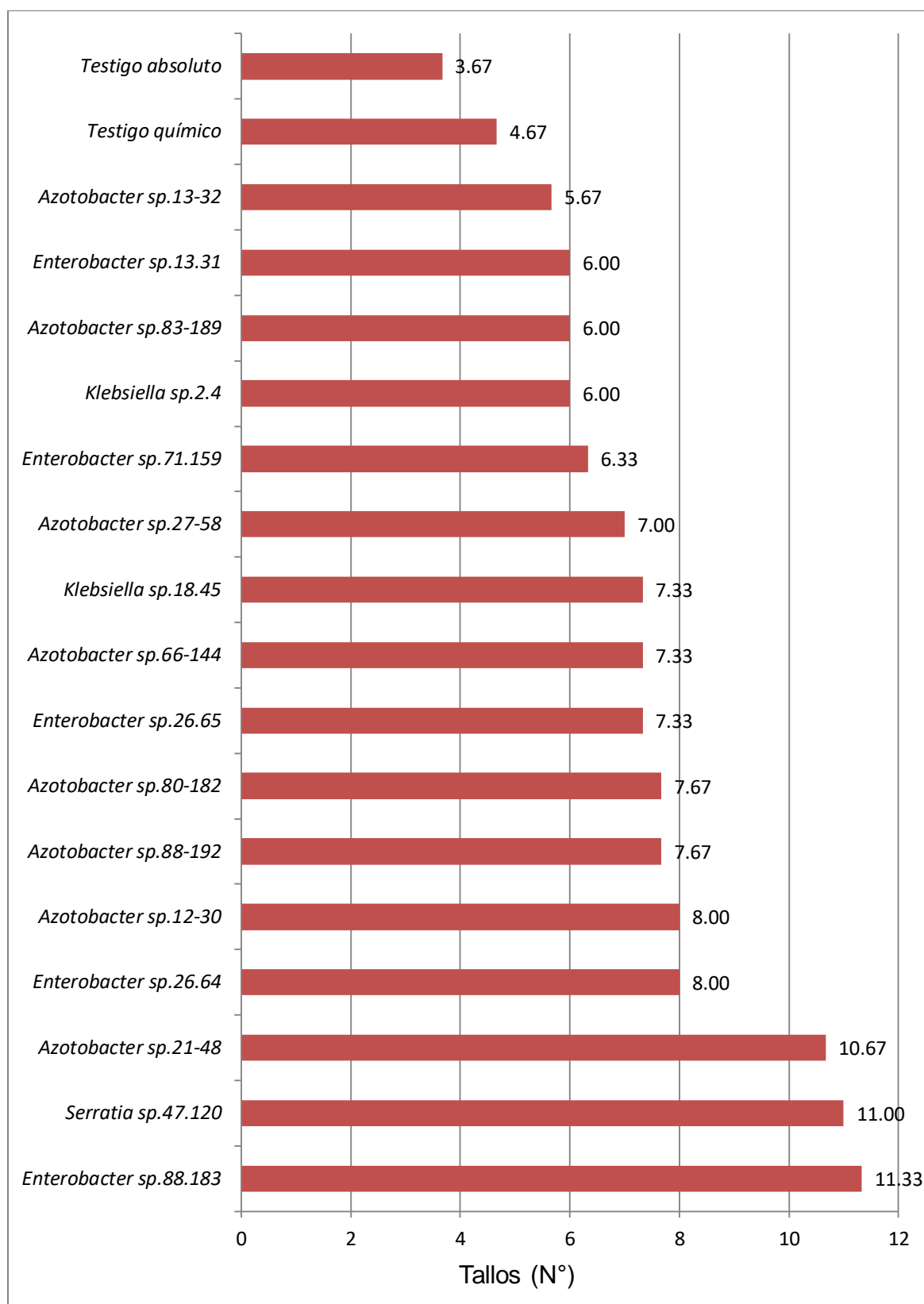


Figura 32. Número de tallos de plantas de *Asparagus officinalis* L. 60 días después de la siembra de coronas inoculadas con *Azotobacter* spp. y enterobacterias.

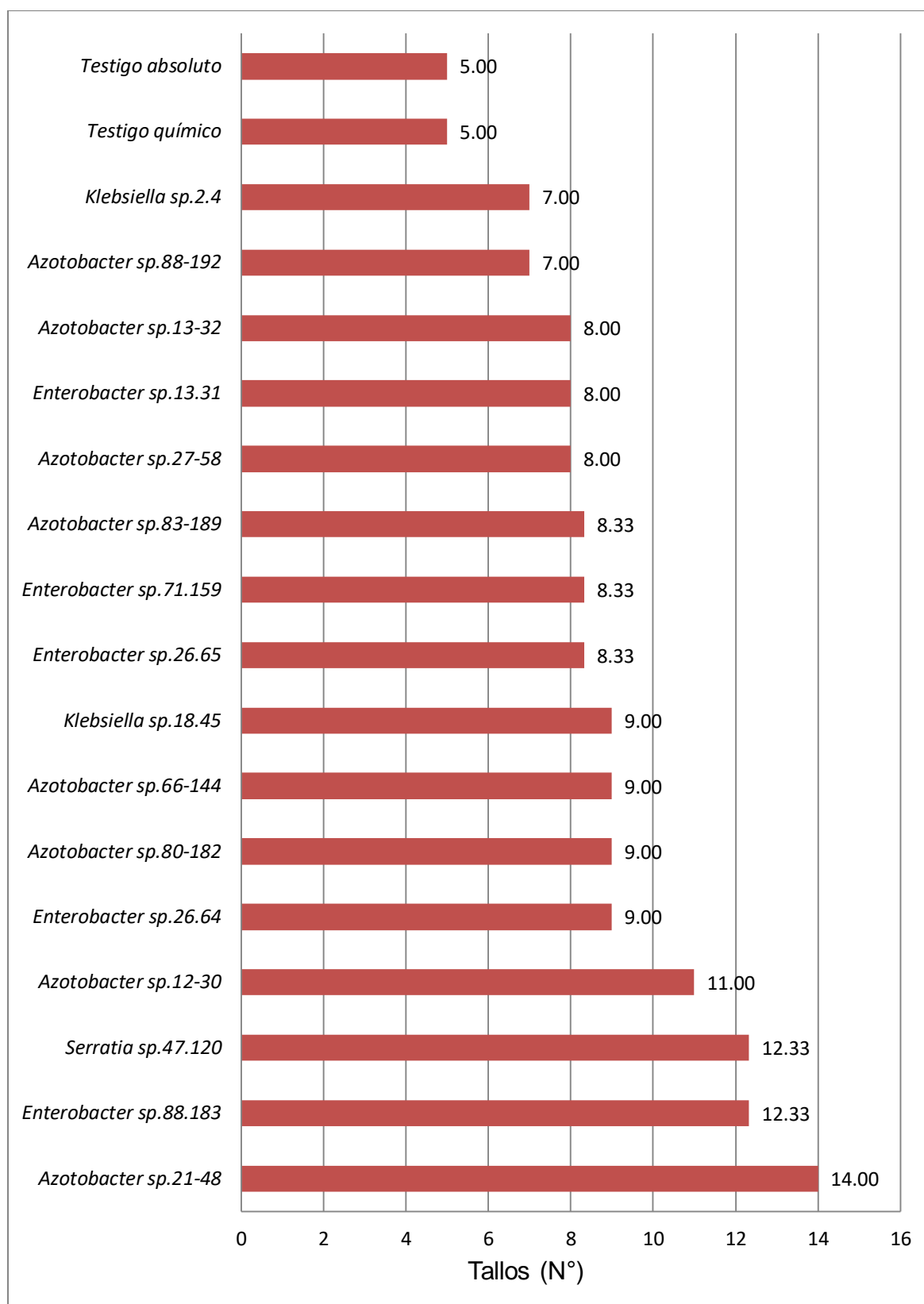


Figura 33. Número de tallos de plantas de *Asparagus officinalis* L. 90 días después de la siembra de coronas inoculadas con *Azotobacter* spp. y enterobacterias.

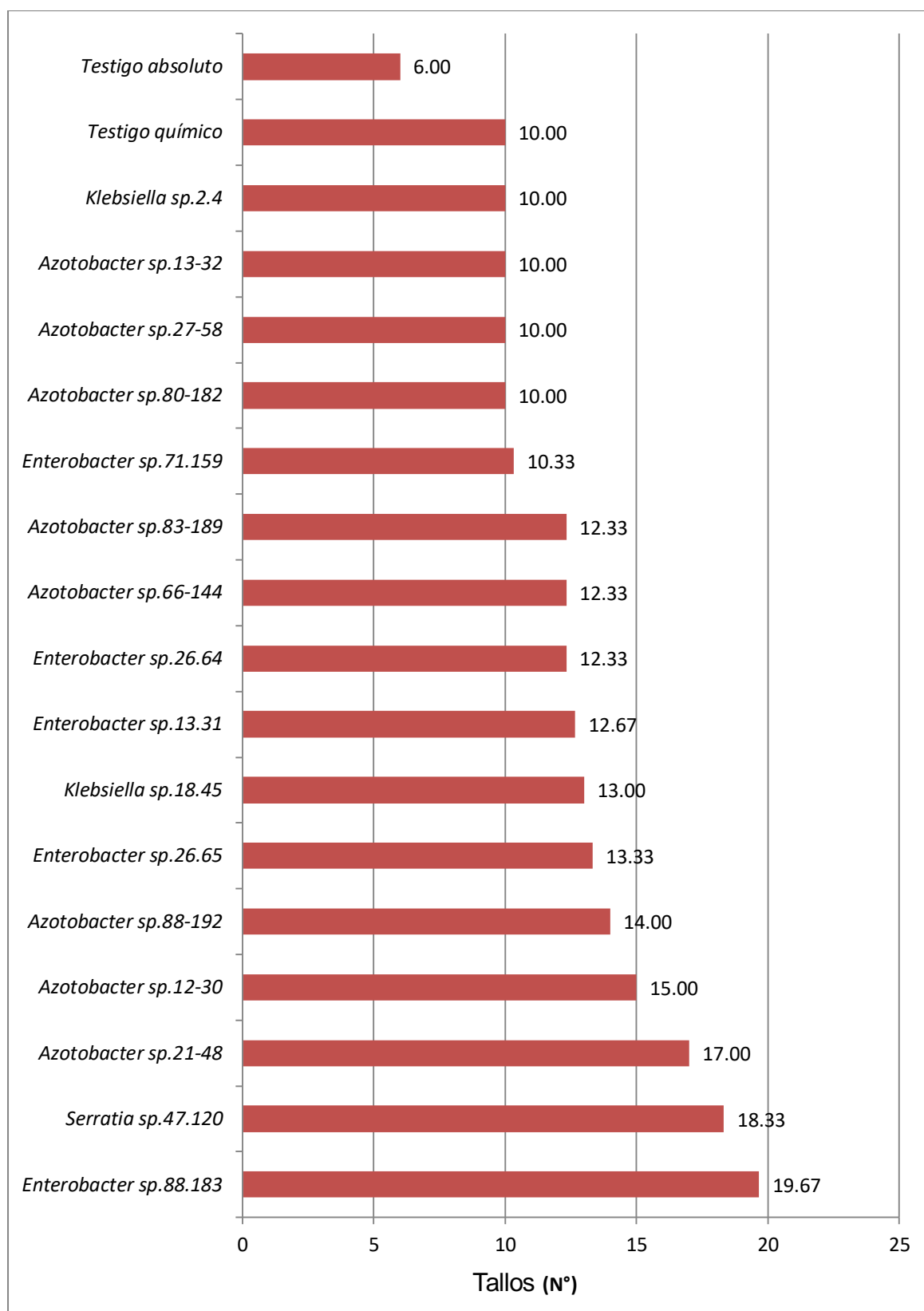


Figura 34. Número de tallos de plantas de *Asparagus officinalis* L. 150 días después de la siembra de coronas inoculadas con *Azotobacter* spp. y enterobacterias.

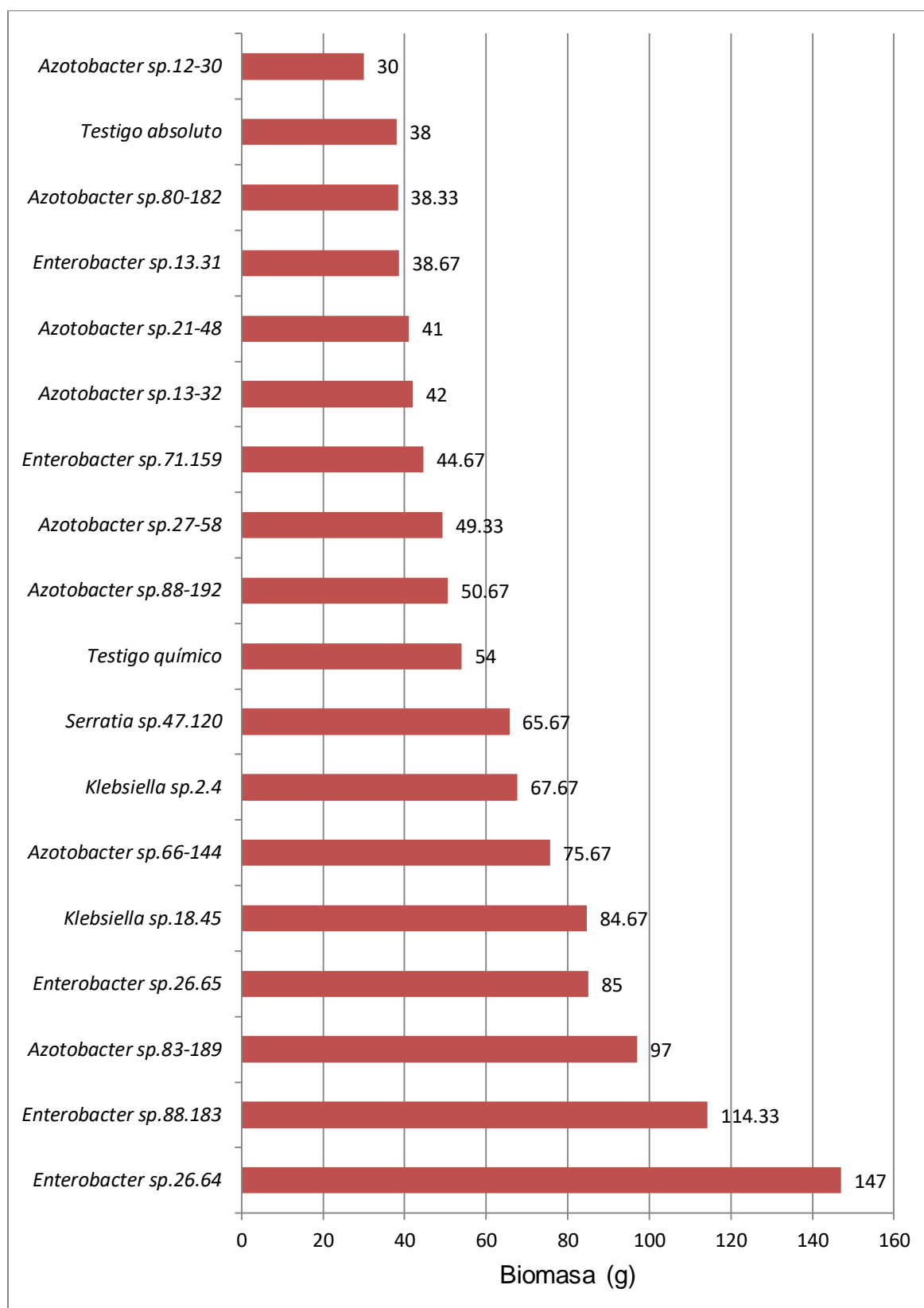


Figura 35. Biomasa radicular de *Asparagus officinalis* L. 150 días después de la siembra de coronas inoculadas con *Azotobacter* spp. y enterobacterias.

Tabla 6

Índices de efectividad (%) y prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la biomasa radicular de Asparagus officinalis L.

Tratamientos	g	IE(%)	Sign.
Testigo absoluto	38,00	-	c
Testigo químico	54,00	42,11	bc
<i>Enterobacter</i> sp.26.64	147,00	286,84	a
<i>Enterobacter</i> sp.88.183	114,33	200,87	ab
<i>Azotobacter</i> 83-189	97,00	155,26	abc
<i>Enterobacter</i> sp.26.65	85,00	123,68	abc
<i>Klebsiella</i> sp.18.45	84,67	122,82	abc
<i>Azotobacter</i> 66-144	75,67	99,13	abc
<i>Klebsiella</i> sp.2.4	67,67	78,08	bc
<i>Serratia</i> sp.47.120	65,67	72,82	bc
<i>Azotobacter</i> 88-192	50,67	33,34	bc
<i>Azotobacter</i> sp.27-58	49,33	29,82	bc
<i>Enterobacter</i> sp.71.159	44,67	17,55	bc
<i>Azotobacter</i> 13-32	42,00	10,53	bc
<i>Azotobacter</i> 21-48	41,00	7,89	bc
<i>Enterobacter</i> sp.13.31	38,67	1,76	c
<i>Azotobacter</i> 80-182	38,33	0,87	c
<i>Azotobacter</i> 12-30	30,00	0	c

*Promedio de tres repeticiones

V. DISCUSIÓN

Las bacterias investigadas se obtuvieron en un ensayo previo y no se seleccionaron por alcanzar los valores máximos con las características que evidencian promoción de crecimiento en plantas (Cornetero & Segura, 2017; Esqueche & Quispe, 2017), pero sí por demostrar actividad *in vitro* por lo menos en dos de las tres características a las que más se atribuye la promoción de crecimiento vegetal, como son la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos y producción de indoles (Moreno et al., 2018). Estas características han sido reportadas previamente en *Azotobacter* spp. (Abdel, Eweda, Girgis & Abdel, 2014; Romero et al., 2017) y en las enterobacterias (Hernández et al., 2015; Kachhap, Chaudhary & Singh, 2015).

Los ensayos con bacterias promotoras de crecimiento en plantas a nivel de invernadero, en su mayoría son realizados después de una selección de los microorganismos con base a su potencial "*in vitro*"; no obstante, estas características deben ser verificadas, porque con el subcultivo algunos microorganismos disminuyen o pierden sus capacidades fisiológicas (Carreño, 2009). La solubilización microbiana de fosfatos es muy variable (Abdel et al., 2014) e inestable, requiriéndose el subcultivo en agar con fosfato insoluble para verificar la actividad metabólica (Carreño, 2009), hasta por cinco generaciones consecutivas (Patiño & Sánchez, 2012).

El incremento en los parámetros del desarrollo vegetativo de espárrago observado con la inoculación de *Azotobacter* spp. y las enterobacterias evidenció su capacidad para promover el crecimiento de plantas tanto *in vitro* como *in vivo* (Moreno et al., 2018). Esta característica ha sido reportada en *Azotobacter* spp. por Escobar et al. (2011) en tomate, Rojas et al. (2012) en maíz, Ali et al. (2018) en brócoli y Esqueche y Quispe (2017) en espárrago.

En las enterobacterias fue demostrado por Sánchez et al. (2012) en tomate (*Enterobacter* sp.), Schoebitz, Ceballos & Ciampi (2013) en trigo (*Serratia* sp.), Hernández et al. (2015) en maíz (*Serratia* sp., *Klebsiella* sp.) y Flores, Bautista, Aragón y Martínez (2018) en frijol (*Enterobacter* sp.).

El mecanismo exacto por el cual las PGPR promueven el crecimiento de las plantas no está establecido de forma clara; no obstante, se han formulado hipótesis como la producción de fitohormonas, inhibición de organismos deletéreos, solubilización de fosfatos e incremento de la absorción de nutrientes (Zaidi et al., 2009, citados por Kachhap et al., 2015).

El incremento en la altura de las plantas por efecto de *Azotobacter* spp. fue reportado previamente con comino (Abdel at al., 2014), algodón (Romero at al., 2017); brócoli (Ghimire at al., 2018) y por las enterobacterias en tomate (Sánchez et al., 2012), trigo (Schoebitz et al., 2013) y maíz (Hernández et al., 2015). Las bacterias investigadas presentaron más de una característica que evidencian *in vitro* promoción de crecimiento vegetal, a los cuales se les puede atribuir los resultados en condiciones de invernadero. Al respecto, Abdel et al. (2014) explicaron el incremento en la altura de plantas de comino inoculadas con *A. chroococcum* como producto de los reguladores de crecimiento vegetal bacterianos.

El incremento en la biomasa radicular de las plantas también fue observado con la inoculación de *Azotobacter* spp. por Escobar et al. (2011) y Pérez y Sánchez (2017) y con las enterobacterias *Enterobacter* spp. por Morales et al. (2011) y Sánchez et al. (2012), *Serratia* spp. por Schoebitz et al. (2013) y *Klebsiella* spp. por Hernández et al. (2015). Los PGPR incrementan el desarrollo del sistema radicular, con el consecuente aumento en la absorción de agua y nutrientes, biomasa aérea y radicular (Creus, 2017).

El incremento en los parámetros de las plantas se atribuye a la producción de reguladores de crecimiento pero también a la solubilización de fosfatos; sin embargo, los resultados obtenidos *in vitro* no siempre están relacionados con los de condiciones de invernadero o campo (López et al., 2013; Pérez & Sánchez, 2017). Al respecto, López et al. (2013) inocularon la cepa de *A. vinelandii* AVS, seleccionada por alcanzar el mayor valor en indoles producidos ($65\mu\text{g mL}^{-1}$) y

observaron que las plantas inoculadas no se diferenciaron estadísticamente en la biomasa aérea y radicular del testigo inoculado. Por el contrario, *A. chroococcum* AC10 (55ug indoles mL⁻¹) y *Klebsiella variicola* CG3 (45ug indoles mL⁻¹) incrementaron en forma significativa la biomasa radicular (0,25 a 39g), en comparación con el testigo.

Pérez y Sánchez (2017) investigaron en camote el efecto de cepas de *A. vinelandii* con actividad multifuncional: VC74 (P=3,83ppm; indoles= 65ppm; acetileno= 0,074mmol.mol⁻¹h⁻¹) y VC57 (P= 12,88ppm; indoles= 41ppm; acetileno 0,151mmol.mol⁻¹h⁻¹). Estos investigadores determinaron diferencias significativas con VC74 en la biomasa radicular (381mg) en comparación con el testigo (255mg); no obstante, con VC57 el valor (248mg), no se diferenció del testigo. Asimismo, la altura y biomasa aérea se incrementaron con ambas cepas bacterianas, sin diferencias significativas entre ellas, pero sí del testigo no inoculado.

VI. CONCLUSIONES

- 6.1 La estabilidad de las características que evidencian promoción de crecimiento se verificó con todos los cultivos de *Azotobacter* spp. y enterobacterias en cuanto a la fijación de nitrógeno y producción de indoles y en el 87,85% de cultivos respecto a la solubilización de fosfatos.
- 6.2 *Azotobacter* spp. y las enterobacterias incrementaron, la altura (1,99 a 66.67%), el número de tallos (24,72 a 227,83%) y el peso de la biomasa radicular (1,76 a 286,84%) de espárrago durante 150 días en condiciones de invernadero.

VII. RECOMENDACIONES

- 7.1 Determinar el efecto de *Azotobacter* spp. y las enterobacterias en el rendimiento de espárrago.
- 7.2 Identificar el efecto de *Azotobacter* spp. y las enterobacterias en el desarrollo de espárrago a nivel de campo.
- 7.3 Comparar el efecto de *Azotobacter* spp. y las enterobacterias junto a diferentes dosis de fertilizante químico en el desarrollo de espárrago.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel, S., Eweda, W., Girgis, M. & Abdel, B. (2014). Improving the productivity and quality of black cumin (*Nigella sativa*) by using *Azotobacter* as N2 biofertilizer. *Annals of Agricultural Science*, 59(1), 95-108. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aoas.2014.06.014>.
- Agrobanco (2007). Cultivo de espárrago, Lima, Perú. Recuperado de: Http://www.agrobanco.com.pe/pdfs/publicacionagroinforma/2_cultivo_del_esparrago.pdf
- Aguado, G. (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.
- Agüero, A. (2009). *Producción de bacterias fijadoras de nitrógeno (Azotobacter, Bacillus y Pseudomonas); en medio líquido a base de maleza, para su aplicación en el cultivo de caña de azúcar (Saccharum spp.) en azucarera el Viejo* (tesis de pregrado). Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica. Recuperado de: [Recuperado de: http://hdl.handle.net/2238/553](http://hdl.handle.net/2238/553).
- Ali, H., Khanawi, A., Hadi, M., Abdul, M., Hakim, M., Mohammed, ... & Ayal, T. (2018). Effect of Bio-fertilizers *Azotobacter chroococcum* and *Pseudomonas fluorescens* on growth of Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. Italica). *Journal of Advances in Biology*, 11(1), 2236-2240. doi: <https://doi.org/10.24297/jab.v11i1.7590>.
- Aly, M., El Sayed, H., El- Sayed, A. & Jastaniah, S. (2012). Synergistic effect between *Azotobacter vinelandii* and *Streptomyces* sp. isolation from saline soil on seed germination and growth of wheat plants. *Journal of American Science*, 8 (5), 667-677. Recuperado de: http://www.sciencepub.net/american/am0805/072_9224am0805_667_676.pdf.

- 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 pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Lambayeque, Perú. Recuperado de: <http://repositorio.unprg.edu.pe/handle/UNPRG/795>.
- Alvitres, V. (2000). *Método Científico. Planificación de la Investigación*. Lambayeque, Perú: Editorial Ciencia.
- Ashrafi, V. & Seiedi, M. (2011). Influence of different plant densities and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and yield attributes of corn (*Zea mays* L.). *Recent Research in Science and Technology*, 3(1), 63-66. Recuperado de: <https://updatepublishing.com/journal/index.php/rrst/article/view/566>
- Bhattacharyya, P. & Jha, D. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 28, 1327-1350. doi: doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9.
- Beracochea, M. (2011). *Respuesta de variedades comerciales de maíz (Zea mays L.) a la inoculación con bacterias endófitas diazotrofas nativas* (tesis de pregrado). Universidad de la República, Uruguay.
- Borrego, A. (2014). *Las enmiendas orgánicas del suelo en el control de las Fusariosis del espárrago y del tomate* (tesis de doctorado). Universidad de Córdoba, España. Recuperado de: <https://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/12492/2014000001078.pdf?sequence=1>
- 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 pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Camelo, M., Vera, S. & Bonilla, R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 12 (2), 159-166. Recuperado de: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

- Canto, B., Hurtado, E., Ma, W., Wang, C. & Wang, N. (2008). *Proyecto de importación de espárragos verdes frescos*. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid.
- Carcaño, M., Ferrera, R., Pérez, Jesús., Molina, J. & Bashan, Y. (2006). Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle. *TERRA Latinoamericana*, 24 (4), 493-502. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/573/57324407.pdf>
- 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. Recuperado de: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/10375>.
- Creus, C. (2017). Inoculantes microbianos: piezas de un rompecabezas que aún requiere ser ensamblado. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(3), 207-209. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2017.07.001>.
- 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. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5624579>
- Cordero, J., Ortega, P. y Ortega, E. (2008). La inoculación de plantas con *Pantoea* sp., bacteria solubilizadora de fosfatos, incrementa la concentración de P en los tejidos foliares. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10 (1), 111 – 121. doi:10.15446/rev.colomb.biote.
- 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. Recuperado de: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/3692>

- Cornetero, J. & Segura, J. (2017). *Enterobacterias aisladas de rizoplasma y rizósfera y su potencial como promotoras de crecimiento de Asparagus officinalis L.* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Lambayeque, Perú. Recuperado de: <http://repositorio.unprg.edu.pe/handle/UNPRG/1539>
- 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. Recuperado de: <http://eprints.uanl.mx/5538/1/1020150309.PDF>
- Díaz, P., Ferrera, R., Almaraz, J. & Alcántar, G. (2001). Inoculación de bacterias promotoras del crecimiento en lechuga. *Terra*, 19, 327-335. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/html/573/57319405/>
- 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. doi: [org/10.17268/sci.agropecu.2011.01.05](https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2011.01.05)
- Esqueche, A. & Quispe, G. (2017). *Caracterización de bacterias del género Azotobacter aisladas de rizoplasma y rizósfera de Asparagus officinalis L. y su potencial como promotoras de crecimiento en plantas* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Lambayeque, Perú. Recuperado: <http://repositorio.unprg.edu.pe/handle/UNPRG/1123>
- Farro, O., & Graus, A. (2013). *Potencial como promotoras del crecimiento de plantas de las enterobacterias aisladas de la rizósfera de malezas asociadas a Zea mays L. “maíz”, en Lambayeque, 2013* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú. Recuperado de: <http://repositorio.unprg.edu.pe/handle/UNPRG/258>
- Flores, M., Bautista, A., Aragón, F. & Martínez, V. (2018). Coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato y su efecto en la germinación y desarrollo del frijol. *INTERCIENCIA*, 43(2), 137-143. doi: [0378-1844/14/07/468-08](https://doi.org/10.378-1844/14/07/468-08).

- 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 pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Lambayeque, Perú. Recuperado de: <http://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/UNPRG/1025/BC-TES-5825.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- García, F., Muñoz, H., Carreño, C. & Mendoza, G. (2010). Caracterización de cepas de *Azospirillum* spp. y su efecto en el desarrollo de *Oryza sativa* L. "arroz" en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 1, 107-116. doi: [org/10.17268/sci.agropecu.2010.02.01](https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2010.02.01).
- Ghimire, R., Khanal, A., Prasad, B. & Bahadhu, J. (2018). Effect of nitrogen and pre-planting treatment of seedling with *Azotobacter* on growth and productivity of brócoli (*Brassica oleracea* var.italica). *World Scientific News*, 109, 267 – 273. Recuperado de: <http://bwmeta1.element.psjd-dab2a73b-226f-4314-8933-31457d217614>.
- Gonzáles, M., Martínez, R., Corrales, I., Pérez, D., Gandarilla, J., Alonso, R., Curbelo, R. & Méndez, V. (2003). Efectividad de un bioestimulador en la calidad de las hortalizas como sostenibilidad de las producciones en la agricultura urbana. *Centro Agrícola*, 4(30), 10-15. Recuperado de: <https://go.galegroup.com>
- Hernández, F., Velásquez, K., Carreño, C., Lloclla, H., Estela, C. & Altamirano, C. (2015). Efecto de enterobacterias en el desarrollo vegetativo de *Zea mays* en invernadero. "*UCV-HACER*" *Revista de Investigación y Cultura*, 4(1)6, 10-19. doi: 2305-8552.
- Hernández, R., Fernández, C. & Baptista, P. (2014). *Metodología de la Investigación*. (6^{ta}ed.) México: Mc Graw, Hill Interamericana Editores S.A.
- Hernández, A., Heydrich, M., Velásquez, 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. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61224107.pdf>

- Jarak, M., Mrkovacki, N., Bjelic, D., Josic, D., Hajnal-Jafari, T. & Stamenov, D. (2012). Effects of plant growth promoting rhizobacteria on maize in greenhouse and field trial. *African Journal of Microbiology Research*, 6(27), 5683-5690. doi: 10.5897/AJMR12.759.
- Kachhap, S., Chaudhary, A. & Singh, S. (2015). Response of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) in relation to elevated temperature conditions in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *The Ecoscan*, 9 (3&4), 771 – 178. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/286053867_Response_of_plant_growth_promoting_rhizobacteria_PGPR_in_relation_to_elevated_temperature_conditions_in_groundnut_Arachis_hypogaea_L
- 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. doi: 10.15517/am.v26i1.16933
- Koo, S. & Cho, S. (2009). Isolation and characterization of a plant growth- promoting rhizobacterium, *Serratia* sp. SY5. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(11), 1431–1438. doi: 10.4014/jmb.0904.04014.
- Lara, C., Villalba, M. & Oviedo, L. (2007). Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, IX (2), 6-14. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/776/77690202.pdf>
- López, M., Criollo, P., Gómez, R., Camelo, M., Estrada, G. Garrido, M. & Bonilla, R. (2013). Characterization of diazotrophic phosphate solubilizing bacteria as growth promoters of maize plants. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(2), 115-123. Recuperado de: <https://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v15n2.36303>

- 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 de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Recuperado de: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8381/tesis35.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Morales, Y., Juárez, D., Aragón, C., Mascarua, M., Bustillos, M., Fuentes, L., Martínez, R. & Muñoz, J. (2011). Growth response of maize plantlets inoculated with *Enterobacter spp.*, as a model for alternative agriculture. *Revista Argentina de Microbiología*, 43, 287-293. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/html/2130/213021188009/>
- Moreno, A., García, V., Reyes, J., Vásquez, J. & Cano, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XX (1), 68-83. doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707.
- Nicolalde, A. & Quintana, D. (2010). *Utilización de bacterias fijadoras de nitrógeno (Azotobacter) y solubilizadoras de fósforo en el cultivo de brócoli (Brassica oleracea var. Legacy) en Otavalo* (tesis de pregrado). Universidad Técnica del Norte, Ecuador. Recuperado de: <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/264>.
- Obando, D., Burgos, L., Rivera, D., Rubiano, M., Divan, V. & Bonilla, R. (2010). Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, Cesar (Colombia). *Acta Biología Colombiana*, 15(3), 107-120. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/html/3190/319027886008/>
- Obando, D. (2012). *Respuesta fisiológica frijol caupí (Vigna unguiculata L.) Walp a la coinoculación de bacterias diazotróficas de los géneros Azotobacter y Rhizobium en suelos del departamento del Cesar* (tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Colombia. Recuperado de: <http://bdigital.unal.edu.co/7266/1/07790779.2012.pdf>

- Ogho, F. & Okonkwo, J. (2012). Some characteristics of a plant growth promoting *Enterobacter* sp isolated from roots of maize. *Advances in Microbiology*, (2), 368-374. doi: 10.4236/aim.2012.23046.
- 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. doi: org/10.4067/S0717-92002009000200002.
- Patiño, C. & Sánchez, M. (2012). Aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de fosfato, habitantes de la rizósfera de Chontaduro (*Bactris gasipaes* kunth.). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10 (2), 1777 – 1787. doi:10.15517/am.v28i1.22021.
- Pérez, J. & Sánchez, D. (2017). Caracterización y efecto de *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* asociadas a *Ipomoea batatas* del Caribe Colombiano. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XIX (2), 39-50. doi: 10.15446/rev.colomb.biotc.v19n2.69471.
- Puicón, H. (2014). *Efecto de Pseudomonas spp. Nativas en el desarrollo vegetativo de Zea mays L. "maíz" en condiciones de invernadero, 2013* (tesis de pregrado). Universidad Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú. Recuperado de: <http://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/UNPRG/1123/BC-TES-5903.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Rani, M., Arundhati, & Reddy, G. (2011). *Bacillus cereus* and *Enterobacter cancerogenus* screened for their efficient plant growth promoting traits rhizobacteria (PGPR) and antagonistic traits among sixteen bacterial isolates from rhizospheric soils of Pigeon pea. *African Journal of Microbiology Research*, 5 (15), 2090-2094. doi: 10.5897/AJMR11.217.
- Reyes, I., Alvarez, L., El-Ayoubi, H. & Valery, A. (2008). Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro*, 20 (1), 37-48. Recuperado de: <https://www.researchgate.net/publication/28214296>.

- Rico, M. (2009). *Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género Azotobacter y Actinomicetos aislados de cultivos de Solanum tuberosum Linnaeus, 1753 (papa) cultivados en zonas altoandinas del Perú* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. Recuperado de: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/875/Rico_gm.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- 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 postgrado). Universidad Católica de Manizales, Colombia. Recuperado de: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/23384>
- Rojas, L. (2013). *Potencial como promotoras del crecimiento de plantas de las especies de Azotobacter aisladas de rizósfera de malezas asociadas a Zea mays L. "maíz", en Lambayeque, 2013* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú. Recuperado de: <http://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/UNPRG/1123/BC-TES-5903.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Rojas, D., Moreno, A., Pardo, S., Obando, M., Rivera, D. & Bonilla, R. (2012). Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). *Applied Soil Ecology*, 61, 264-272. doi: 10.1016/j.apsoil.2012.01.006.
- Romero, F., Abril, J., Camelo, M., Moreno, A., Pastrana, I., Rojas, D. & Bonilla, R. (2017). *Azotobacter chroococcum* as a potentially useful bacterial biofertilizer for cotton (*Gossypium hirsutum*): Effect in reducing N fertilization. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(4), 377 – 383. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2017.04.006>
- Sachin, D. & Misra, P. (2009). Effect of *Azotobacter chroococcum* (PGPR) on the growth of Bamboo (*Bambus abamboo*) and maize (*Zea mays*) plants. *Biofrontiers*, 1(1), 24-31. doi: 10.5897/AJMR12.759.

- Salhia, B. (2010). *The effect of Azotobacterchroococcum as nitrogen biofertilizer on the growth and yield of Cucumis sativus* (degree of master). The Islamic University, Gaza. Recuperado de: <https://library.iugaza.edu.ps/thesis/94335.pdf>
- Sánchez, D., Gómez, R., Garrido, M. & Bonilla, R. (2012). Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(7), 401-1415. Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342012000700009&lng=es&nrm=iso.
- Sánchez, J., Lopez, I., Villegas, J. & Montaña, N. (2014). Respuesta del maíz (*Zea mays* L.) a la inoculación con *Azotobacter* sp.y *Burkholderia* sp. a dosis reducida de fertilizante nitrogenado. *Scientia Agropecuaria*, 5, 17-23. Recuperado de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2077-99172014000100002&lng=es&tlng=es.
- Schoebitz, M. (2006). *Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de Lolium perenne L. de suelo volcánico (modelo género Azospirillum spp.)* (tesis de pregrado). Universidad Austral de Chile, Chile. Recuperado de: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2006/fas364a/doc/fas364a.pdf>
- Schoebitz, M., Ribaud, C., Pardo, M., Cantore, M., Ciampi, L. & Curá, J. (2009). Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 1768-1774. doi: 10.1016/j.soilbio.2007.12.031.
- Schoebitz, M., Ceballos, C. & Ciampi, L. (2013). Effect of immobilized phosphate solubilizing bacteria on wheat growth and phosphate uptake. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13(1), 1-10. doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162013005000001>

- Torres, R., Perez, C. & Suarez, N. (2003). Influencia de la inoculación de rizobacterias sobre la germinación de semillas de frejol común *Phaseolus vulgaris* L. *Centro Agrícola*, 30(2), 56-60. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/5217/521751973001.pdf>
- Vásquez, P., Holguin, G., Puente, M., López, A. & Bashan, Y. (2000). Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils*, 30(1), 460-468. doi: <https://doi.org/10.1007/s003740050024>
- Zeinat, K., Nagwa, M., El Sayed, S. & Abd, G.(2010). Optimization of microbial biomass production as biocontrol agent against root knot nematode on faba plants. (2010). *Journal of American Science*, 6(6), 245-255. Recuperado de: http://www.jofamericanscience.org/journals/am-sci/am0606/34_2622_am0606_245_255.pdf

ANEXOS

ANEXO A

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

a. Reactivos (Lara, Villalba & Oviedo, 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 (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 (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 NH_4Cl

Para obtener la curva patrón se prepara una solución madre de 100ppm de NH_4Cl , para lo cual se pesa 0,1g de NH_4Cl 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 ₂ O bidestilada [mL]	NH ₄ Cl (Ug/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

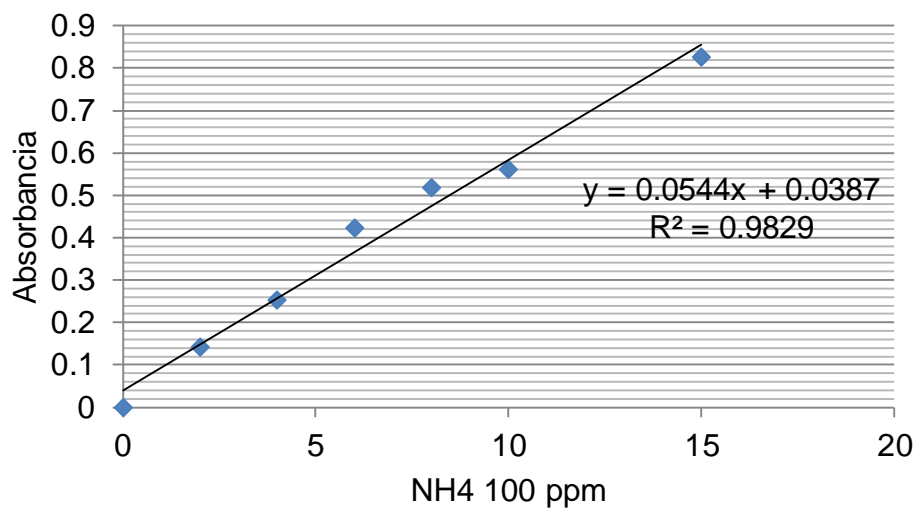
b.3 Procedimiento para la cuantificación de amonio por colorimetría

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 ₄ 100 (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 obtenerla cantidad de amonio (ppm) fijado por cada bacteria nativa.

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

ANEXO B

Cuantificación de fósforo solubilizado *in vitro*

a. Reactivos (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 $0,2 \text{ mgL}^{-1}$ de fósforo**

Fosfato monopotásico previamente desecado en estufa a 100°C	877 g
Agua destilada hasta enrase	100 mL
- **Solución hija de 2 mgL^{-1} de fósforo**

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

b. Método colorimétrico del Molibdato para cuantificar fósforo soluble (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:

Número de matraces	T	I	II	III
Solución salina de fósforo de 2 mgL^{-1}	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^{-1}	0	0,1	0,2	0,5

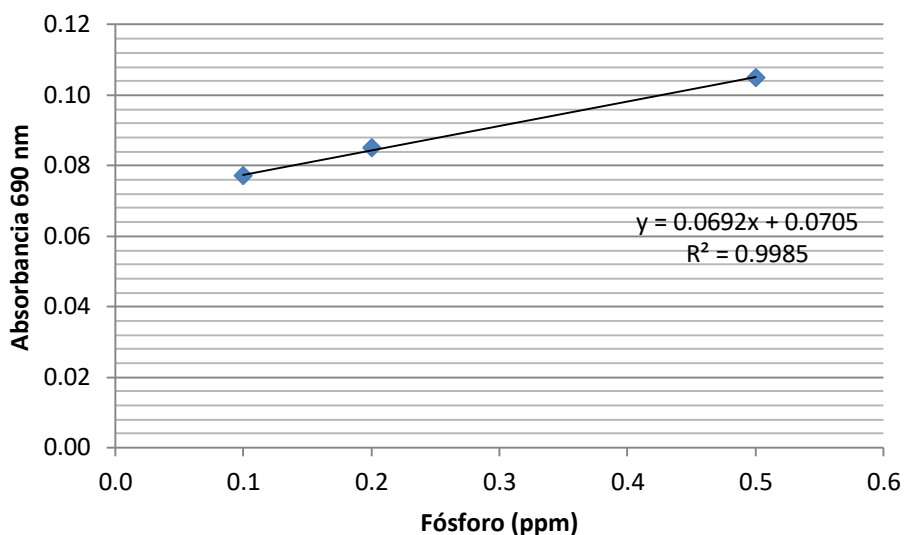
Esperar 20 minutos y efectuar las lecturas en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 690nm en cubetas de 10cm. Construir la curva de calibración. Los datos de la absorbancia corregida se analizan mediante regresión lineal con el programa Microsoft Excel 2007 para obtener la ecuación de la recta 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.

Nº 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 C

Procedimiento para elaborar la curva de calibración para cuantificar indoles

a. Reactivos

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

Componentes	g ^L ⁻¹
H ₂ SO ₄ concentrado	150 mL
Agua destilada	250 mL
FeCl ₃ 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 FeCl₃, 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 µg mL ⁻¹)	H ₂ O bidestilada [µL]*	Concentración AIA (mg L ⁻¹)
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

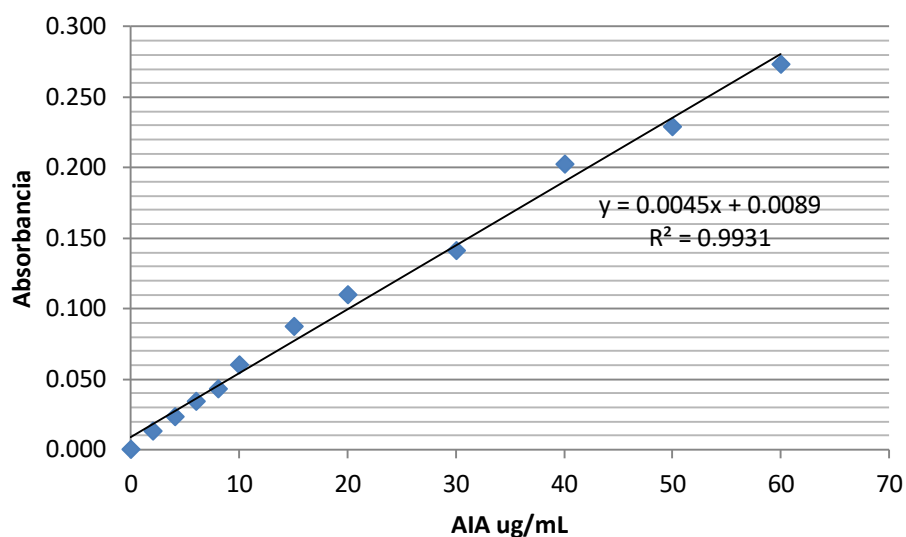
b.3. Procedimiento para la cuantificación de AIA por colorimetría

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 rojiza 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 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 D

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

Tratamientos	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Testigo absoluto	,993	3	,843
Testigo químico	,964	3	,637
Azotobacter sp.27-58	,964	3	,637
Azotobacter sp.12-30	,987	3	,780
Azotobacter sp.80-182	,987	3	,780
Azotobacter sp.13-32	,750	3	,000
Azotobacter sp.21-48	,942	3	,537
Azotobacter sp.66-144	,893	3	,363
Azotobacter sp.83-189	,990	3	,806
Azotobacter sp.88-192	,980	3	,726
Enterobacter sp.26.64	,871	3	,298
Klebsiella sp.2.4	,987	3	,780
Enterobacter sp.26.65	1,000	3	1,000
Klebsiella sp.18.45	1,000	3	1,000
Enterobacter sp.71.159	1,000	3	1,000
Serratia sp.47.120	1,000	3	1,000
Enterobacter sp.13.31	1,000	3	1,000
Enterobacter sp.88.183	1,000	3	1,000

Prueba de homogeneidad de varianzas

ALTURA A LOS 30 DIAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,396	17	36	,196

ANOVA de un factor

ALTURA A LOS 30 DIAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3575,790	17	210,341	17,202	,000
Dentro de grupos	440,200	36	12,228		
Total	4015,990	53			

ANEXO E

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

Tratamientos	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Testigo absoluto	,893	3	,363
Testigo químico	,923	3	,463
Azotobacter sp.27-58	,993	3	,843
Azotobacter sp.12-30	1,000	3	1,000
Azotobacter sp.80-182	,750	3	,000
Azotobacter sp.13-32	,964	3	,637
Azotobacter sp.21-48	,871	3	,298
Azotobacter sp.66-144	,881	3	,328
Azotobacter sp.83-189	,964	3	,637
Azotobacter sp.88-192	,942	3	,537
Enterobacter sp.26.64	,955	3	,593
Klebsiella sp.2.4	1,000	3	1,000
Enterobacter sp.26.65	1,000	3	1,000
Klebsiella sp.18.45	1,000	3	1,000
Enterobacter sp.71.159	1,000	3	1,000
Serratia sp.47.120	1,000	3	1,000
Enterobacter sp.13.31	1,000	3	1,000
Enterobacter sp.88.183	1,000	3	1,000

Prueba de homogeneidad de varianzas

ALTURA A LOS 60 DIAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,229	17	36	,293

ANOVA de un factor

ALTURA A LOS 60 DIAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2944,208	17	173,189	13,233	,000
Dentro de grupos	471,167	36	13,088		
Total	3415,375	53			

ANEXO F

Prueba de normalidad, homogeneidad de varianzas y análisis de varianza de la altura de *Asparagus officinalis* L. a los 90 días

Tests of Normality a los 90 días

Tratamientos	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Testigo absoluto	,964	3	,637
Testigo químico	,964	3	,637
Azotobacter sp.27-58	,964	3	,637
Azotobacter sp.12-30	,807	3	,132
Azotobacter sp.80-182	1,000	3	1,000
Azotobacter sp.13-32	,964	3	,637
Azotobacter sp.21-48	1,000	3	1,000
Azotobacter sp.66-144	,923	3	,463
Azotobacter sp.83-189	,964	3	,637
Azotobacter sp.88-192	,750	3	,000
Enterobacter sp.26.64	,999	3	,948
Klebsiella sp.2.4	,893	3	,363
Enterobacter sp.26.65	,996	3	,878
Klebsiella sp.18.45	,750	3	,000
Enterobacter sp.71.159	,964	3	,637
Serratia sp.47.120	,855	3	,253
Enterobacter sp.13.31	1,000	3	1,000
Enterobacter sp.88.183	,964	3	,637

Prueba de homogeneidad de varianzas

ALTURA A LOS 90 DIAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2,348	17	36	,015

ANOVA de un factor

ALTURA A LOS 90 DIAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	6387,148	17	375,715	36,392	,000
Dentro de grupos	371,667	36	10,324		
Total	6758,815	53			

ANEXO G

Prueba de normalidad, homogeneidad de varianzas y análisis de varianza de la altura de *Asparagus officinalis* L. a los 120 días

Tests of Normality a los 120 días

Tratamientos	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Testigo absoluto	,923	3	,463
Testigo químico	1,000	3	1,000
Azotobacter sp.27-58	,964	3	,637
Azotobacter sp.12-30	1,000	3	1,000
Azotobacter sp.80-182	,983	3	,747
Azotobacter sp.13-32	,750	3	,000
Azotobacter sp.21-48	,923	3	,463
Azotobacter sp.66-144	,923	3	,463
Azotobacter sp.83-189	,750	3	,000
Azotobacter sp.88-192	,987	3	,780
Enterobacter sp.26.64	1,000	3	1,000
Klebsiella sp.2.4	,855	3	,253
Enterobacter sp.26.65	1,000	3	1,000
Klebsiella sp.18.45	,964	3	,637
Enterobacter sp.71.159	1,000	3	1,000
Serratia sp.47.120	,893	3	,363
Enterobacter sp.13.31	1,000	3	1,000
Enterobacter sp.88.183	1,000	3	1,000

Prueba de homogeneidad de varianzas

ALTURA A LOS 120 DIAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,320	17	36	,235

ANOVA de un factor

ALTURA A LOS 120 DIAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3710,208	17	218,248	31,874	,000
Dentro de grupos	246,500	36	6,847		
Total	3956,708	53			

ANEXO H

Prueba de normalidad, homogeneidad de varianzas y análisis de varianza de la altura de *Asparagus officinalis* L. a los 150 días

Tests of Normality a los 150 días

Tratamientos	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Testigo absoluto	,750	3	,000
Testigo químico	1,000	3	1,000
Azotobacter sp.27-58	,980	3	,726
Azotobacter sp.12-30	,871	3	,298
Azotobacter sp.80-182	1,000	3	1,000
Azotobacter sp.13-32	,964	3	,637
Azotobacter sp.21-48	,964	3	,637
Azotobacter sp.66-144	1,000	3	1,000
Azotobacter sp.83-189	1,000	3	1,000
Azotobacter sp.88-192	,987	3	,780
Enterobacter sp.26.64	1,000	3	1,000
Klebsiella sp.2.4	,750	3	,000
Enterobacter sp.26.65	,997	3	,900
Klebsiella sp.18.45	,993	3	,843
Enterobacter sp.71.159	,750	3	,000
Serratia sp.47.120	1,000	3	1,000
Enterobacter sp.13.31	,996	3	,878
Enterobacter sp.88.183	1,000	3	1,000

Prueba de homogeneidad de varianzas

ALTURA A LOS 150 DIAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,564	17	36	,127

ANOVA de un factor

ALTURA A LOS 150 DIAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3949,537	17	232,326	32,376	,000
Dentro de grupos	258,333	36	7,176		
Total	4207,870	53			

ANEXO I

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

Tratamientos	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Testigo absoluto	,750	3	,000
Testigo químico	1,000	3	1,000
Azotobacter sp.27-58	1,000	3	1,000
Azotobacter sp.12-30	,750	3	,000
Azotobacter sp.80-182	,750	3	,000
Azotobacter sp.13-32	,750	3	,000
Azotobacter sp.21-48	1,000	3	1,000
Azotobacter sp.66-144	,750	3	,000
Azotobacter sp.83-189	1,000	3	1,000
Enterobacter sp.26.64	1,000	3	1,000
Enterobacter sp.26.65	,750	3	,000
Klebsiella sp.18.45	,750	3	,000
Enterobacter sp.71.159	,750	3	,000
Serratia sp.47.120	1,000	3	1,000
Enterobacter sp.13.31	,750	3	,000
Enterobacter sp.88.183	,750	3	,000

Prueba de homogeneidad de varianzas

NÚMERO DE TALLOS A LOS 30 DIAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,210	17	36	,306

ANOVA de un factor

NÚMERO DE TALLOS A LOS 30 DIAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	145,259	17	8,545	13,571	,000
Dentro de grupos	22,667	36	,630		
Total	167,926	53			

ANEXO J

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

Tratamientos	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Testigo absoluto	,750	3	,000
Testigo químico	,750	3	,000
Azotobacter sp.27-58	1,000	3	1,000
Azotobacter sp.12-30	1,000	3	1,000
Azotobacter sp.80-182	,750	3	,000
Azotobacter sp.13-32	,750	3	,000
Azotobacter sp.21-48	,750	3	,000
Azotobacter sp.66-144	,750	3	,000
Azotobacter sp.83-189	1,000	3	1,000
Azotobacter sp.88-192	,750	3	,000
Enterobacter sp.26.64	1,000	3	1,000
Klebsiella sp.2.4	1,000	3	1,000
Enterobacter sp.26.65	,750	3	,000
Klebsiella sp.18.45	,964	3	,637
Enterobacter sp.71.159	,750	3	,000
Serratia sp.47.120	1,000	3	1,000
Enterobacter sp.13.31	1,000	3	1,000
Enterobacter sp.88.183	,750	3	,000

Prueba de homogeneidad de varianzas

NÚMERO DE TALLOS A LOS 60 DIAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
,822	17	36	,660

ANOVA de un factor

NÚMERO DE TALLOS 60 DIAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	214,315	17	12,607	13,615	,000
Dentro de grupos	33,333	36	,926		
Total	247,648	53			

ANEXO K

Prueba de normalidad, homogeneidad de varianzas y análisis de varianza del número de tallos de *Asparagus officinalis* L. a los 90 días

Tests of Normality a los 90 días

Tratamientos	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Testigo absoluto	1,000	3	1,000
Testigo químico	1,000	3	1,000
Azotobacter sp.27-58	1,000	3	1,000
Azotobacter sp.12-30	1,000	3	1,000
Azotobacter sp.80-182	1,000	3	1,000
Azotobacter sp.13-32	1,000	3	1,000
Azotobacter sp.21-48	1,000	3	1,000
Azotobacter sp.66-144	1,000	3	1,000
Azotobacter sp.83-189	,964	3	,637
Enterobacter sp.26.64	1,000	3	1,000
Klebsiella sp.2.4	1,000	3	1,000
Enterobacter sp.26.65	,750	3	,000
Klebsiella sp.18.45	1,000	3	1,000
Enterobacter sp.71.159	,750	3	,000
Serratia sp.47.120	,750	3	,000
Enterobacter sp.13.31	1,000	3	1,000
Enterobacter sp.88.183	,750	3	,000

Prueba de homogeneidad de varianzas

NÚMERO DE TALLOS A LOS 90 DIAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
,769	17	36	,713

ANOVA de un factor

NÚMERO DE TALLOS A LOS 90 DIAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	284,815	17	16,754	12,742	,000
Dentro de grupos	47,333	36	1,315		
Total	332,148	53			

ANEXO L

Prueba de normalidad, homogeneidad de varianzas y análisis de varianza del número de tallos de *Asparagus officinalis* L. a los 150 días

Tests of Normality a los 150 días

Tratamientos	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Testigo absoluto	1,000	3	1,000
Testigo químico	1,000	3	1,000
Azotobacter sp.27-58	1,000	3	1,000
Azotobacter sp.12-30	1,000	3	1,000
Azotobacter sp.80-182	1,000	3	1,000
Azotobacter sp.21-48	1,000	3	1,000
Azotobacter sp.66-144	,750	3	,000
Azotobacter sp.83-189	,750	3	,000
Enterobacter sp.26.64	,750	3	,000
Klebsiella sp.2.4	1,000	3	1,000
Enterobacter sp.26.65	,964	3	,637
Klebsiella sp.18.45	1,000	3	1,000
Enterobacter sp.71.159	,750	3	,000
Serratia sp.47.120	,964	3	,637
Enterobacter sp.13.31	,964	3	,637
Enterobacter sp.88.183	,750	3	,000

Prueba de homogeneidad de varianzas

NÚMERO DE TALLOS A LOS 150 DIAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,227	17	36	,294

ANOVA de un factor

NÚMERO DE TALLOS A LOS 150 DIAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	579,870	17	34,110	36,839	,000
Dentro de grupos	33,333	36	,926		
Total	613,204	53			

ANEXO M

Prueba de normalidad, homogeneidad de varianzas y análisis de varianza de la biomasa radicular de *Asparagus officinalis* L. a los 150 días

Tests of Normality a los 150 días

Tratamientos	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Testigo absoluto	,942	3	,537
Testigo químico	,842	3	,220
Azotobacter sp.27-58	,991	3	,817
Azotobacter sp.12-30	1,000	3	1,000
Azotobacter sp.80-182	,984	3	,762
Azotobacter sp.13-32	,993	3	,843
Azotobacter sp.21-48	,936	3	,510
Azotobacter sp.66-144	,999	3	,948
Azotobacter sp.83-189	,947	3	,557
Azotobacter sp.88-192	,998	3	,924
Enterobacter sp.26.64	,823	3	,172
Klebsiella sp.2.4	1,000	3	,962
Enterobacter sp.26.65	,951	3	,576
Klebsiella sp.18.45	,977	3	,712
Enterobacter sp.71.159	,987	3	,780
Serratia sp.47.120	,964	3	,637
Enterobacter sp.13.31	,992	3	,831
Enterobacter sp.88.183	,841	3	,217

Prueba de homogeneidad de varianzas

BIOMASA RADICULAR

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
3,875	17	36	,015

ANOVA de un factor

BIOMASA RADICULAR

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	49609,648	17	2918,215	4,845	,000
Dentro de grupos	21684,667	36	602,352		
Total	71294,315	53			

