



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



**Bacterias rizosféricas y endófitas aisladas de *Portulaca oleracea*  
L. como potenciales promotoras del crecimiento de plantas en  
suelos con salinidad**

**TESIS**

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

**PRESENTADO POR:**

Br. Marbil Corrales Lozada

Br. María Victoria Lumbres Sánchez

**LAMBAYEQUE, PERÚ**

**2017**

**Bacterias rizosféricas y endófitas aisladas de *Portulaca oleracea*  
L. como potenciales promotoras del crecimiento de plantas en  
suelos con salinidad**

**TESIS**

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

**APROBADO POR:**

MSc. Clara Cueva castillo

\_\_\_\_\_

**PRESIDENTE**

Dra. Gianina Llontop Barandiaran

\_\_\_\_\_

**SECRETARIO**

Dr. Eduardo Julio Tejada Sánchez

\_\_\_\_\_

**VOCAL**

Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán

\_\_\_\_\_

**PATROCINADORA**

**LAMBAYEQUE, PERÚ**

**2017**

## DEDICATORIA

Primeramente doy gracias a Dios por ser mi guía  
Y por darme la fuerza y el ímpetu de continuar  
con paso firme cada acción positiva de mi vida.

La presente tesis la dedico a mi familia por su amor  
y apoyo incondicional y a mi asesora Carmen  
Carreño Farfán gracias a su tiempo y dedicación  
brindado en todo este proceso de trabajo que se  
culminó exitosamente.

A mis amigos por su apoyo y consejos brindados  
en todo momento de mi vida universitaria.

Marbil Corrales Lozada

## DEDICATORIA

A Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A los maestros, aquellos que marcaron cada etapa de nuestro camino universitario, y que me ayudaron en asesorías y dudas presentadas en la elaboración de la tesis. A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

A mi hijo, quien es la fuerza que me impulsa a seguir creciendo académicamente. A mi hermana por ser el ejemplo de una hermana mayor, y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis.

María Victoria Lumbres Sánchez

## Agradecimiento

Agradecemos a Dios por la fortaleza que nos ha dado para poder terminar este trabajo.

A nuestros Padres y familiares por su apoyo infinito y por inculcarnos día a día a ser mejores personas.

A nuestra asesora de tesis Dra. Carmen Carreño Farfán gracias a su tiempo y enseñanzas brindadas, durante todo este tiempo y a nuestros amigos por su apoyo incondicional.

## ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	4
2.1 Antecedentes de la investigación.....	4
2.2 Marco teórico.....	5
2.2.1 Rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas.....	7
2.2.2 Salinidad de suelos.....	9
2.2.3 Tolerancia y resistencia a la salinidad.....	12
2.2.4 Recuperación de suelos salinos.....	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1 Materiales.....	17
3.1.1 Población y muestra.....	17
3.2 Métodos.....	17
3.2.1 Variables de la fase descriptiva .....	17
3.2.2 Variables de la fase experimental.....	17
3.2.3 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis .....	18
3.2.4 Lugar de muestreo.....	18
3.2.5 Obtención de muestras.....	18
3.2.6 Aislamiento de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno.....	23
3.2.7 Aislamiento de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno.....	28
3.2.8 Identificación fenotípica de bacterias rizosféricas y endófitas.....	32
3.2.9 Mantenimiento de cultivos de bacterias .....	37
3.2.10 Cuantificación de nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos .....	37
3.2.11 Tolerancia de las bacterias al cloruro de sodio.....	42
3.2.12 Efecto de bacterias en el desarrollo vegetativo de tomate.....	44
3.2.13 Análisis estadístico de los datos .....	49
IV.RESULTADOS.....	50
4.1 Bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aisladas de <i>Portulaca oleracea</i> L. ....	50
4.2 Bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno aisladas de raíces de <i>Portulaca oleracea</i> L. ....	62

4.3 Géneros de bacterias rizosféricas y endófitas fijadoras de nitrógeno identificados fenotípicamente.....	68
4.4 Nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos por bacterias rizosféricas y endófitas.....	73
4.5 Tolerancia de las bacterias rizosféricas y endófitas a diferentes concentraciones de cloruro de sodio.....	89
4.6 Bacterias rizosféricas y endófitas seleccionadas.....	89
4.7 Efecto de las bacterias rizosféricas y endófitas en <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.....	94
V. DISCUSIÓN .....	114
VI. CONCLUSIONES .....	122
VII.RECOMENDACIONES.....	123
VIII.RESUMEN.....	124
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125

## Índice de figuras

<b>Figura1.</b>	Diseño completamente aleatorio para determinar el efecto de bacterias rizosféricas y endófitas en el desarrollo vegetativo de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.....	19
<b>Figura 2.</b>	Suelo con salinidad en los Humedales de Eten en Lambayeque, 2016.....	20
<b>Figura 3.</b>	Ubicación del distrito de Reque, provincia de Chiclayo, región Lambayeque, febrero, 2016.....	21
<b>Figura 4.</b>	Ubicación de los Humedales de Eten, provincia de Chiclayo, región Lambayeque, febrero, 2016.....	21
<b>Figura 5.</b>	Extracción de raíces con suelo rizosférico de <i>Portulaca oleracea</i> L.....	22
<b>Figura 6.</b>	Muestras de raíces con suelo rizosférico de <i>Portulaca oleracea</i> L.....	22
<b>Figura 7.</b>	Raíces con suelo rizosférico de <i>Portulaca oleracea</i> L. deshidratadas.....	24
<b>Figura 8.</b>	Submuestras de raíces con suelo rizosférico de raíces de <i>Portulaca oleracea</i> L. ....	25
<b>Figura 9.</b>	Suspensión de raíces y suelo rizosférico de <i>Portulaca oleracea</i> L. en solución salina esterilizada.....	25
<b>Figura 10.</b>	Siembra en medio sólido mediante la técnica de agotamiento y estría. ....	26



<b>Figura 11.</b>	Medios semisólidos sin nitrógeno para el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas. ....	26
<b>Figura 12.</b>	Siembra en medio semisólido mediante la técnica de puntura. ....	27
<b>Figura 13.</b>	Película blanquecina y viraje del indicador por bacterias microaerófilas fijadoras de nitrógeno en medios semisólidos. ....	29
<b>Figura 14.</b>	Subcultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas en medio semisólidos. ....	29
<b>Figura 15.</b>	Lavado de raíces de <i>Portulaca oleracea</i> L. con agua potable. ....	30
<b>Figura 16.</b>	Fragmentos de raíces de <i>Portulaca oleracea</i> L. ....	30
<b>Figura 17.</b>	Lavado de raíces de <i>Portulaca oleracea</i> L. con detergente neutro. ....	31
<b>Figura 18.</b>	Enjuague de raíces de <i>Portulaca oleracea</i> L. con agua destilada esterilizada. ....	31
<b>Figura 19.</b>	Lavado de raíces de <i>Portulaca oleracea</i> L. en solución tampón fosfato de potasio. ....	33
<b>Figura 20.</b>	Inmersión de fragmentos de raíces de <i>Portulaca oleracea</i> L. en alcohol. ....	33
<b>Figura 21.</b>	Inmersión de fragmentos de raíces de <i>Portulaca oleracea</i> L. en solución de hipoclorito de sodio ....	34
<b>Figura 22.</b>	Siembra del agua de enjuague en agar nutritivo para verificar la desinfección. ....	34
<b>Figura 23.</b>	Fragmentos de raíces de <i>Portulaca oleracea</i> L. en papel secante esterilizado. ....	35
<b>Figura 24.</b>	Fragmentos de raíces de <i>Portulaca oleracea</i> L. ....	35

<b>Figura 25.</b>	Separación del macerado de <i>Portulaca oleracea</i> L. ....	36
<b>Figura 26.</b>	Siembra del macerado de raíces de <i>Portulaca oleracea</i> L. En medio semisólido sin nitrógeno para el aislamiento de bacterias endófitas. ....	36
<b>Figura 27.</b>	Cultivos puros de bacterias fijadoras de nitrógeno en agar nutritivo . ....	38
<b>Figura 28.</b>	Caldo extracto de suelo cultivado con bacterias rizosféricas y endófitas. ....	40
<b>Figura 29.</b>	Caldo extracto de suelo con cloruro de potasio. ....	40
<b>Figura 30.</b>	Adición de solución alcohólica de fenol al caldo extracto de suelo. ....	41
<b>Figura 31.</b>	Caldo National Botanical Research Institute's phosphate cultivado con bacterias rizosféricas y endófitas. ....	41
<b>Figura 32.</b>	Caldo tripticasa soya suplementado con triptófano cultivado con bacterias rizosféricas y endófitas. ....	43
<b>Figura 33.</b>	Caldo nutritivo con bacterias rizosféricas y endófitas. ....	43
<b>Figura 34.</b>	Prueba de germinación de semillas de <i>Lycopersicon Esculentum</i> Mill. ....	45
<b>Figura 35.</b>	Inóculo de bacterias rizosféricas y endófitas. ....	45
<b>Figura 36.</b>	Inoculación de bacterias rizosféricas en semillas de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. ....	47
<b>Figura 37.</b>	Semillas de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. inoculadas con bacterias rizosféricas y endófitas. ....	47
<b>Figura 38.</b>	Suelo experimental en vasos de tecnopor. ....	48
<b>Figura 39.</b>	Colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias en medio LG. ....	51
<b>Figura 40.</b>	Colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias en medio LGD. ....	51
<b>Figura 41.</b>	Colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias desarrolladas en medio Beijerinckia. ....	52

<b>Figura 42.</b>	Frecuencia de raíces con suelo rizosférico de <i>Portulaca oleracea</i> L. con bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias aisladas en tres medios semisólidos. ....	52
<b>Figura 43.</b>	Cultivos puros de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aerobias. ....	53
<b>Figura 44.</b>	Porcentaje de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aerobias aisladas en tres medios sólidos. ....	53
<b>Figura 45.</b>	Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno en cinco medios semisólidos NFb, JNFb, LGI-P, LGI y JMV. ....	54
<b>Figura 46.</b>	Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas en medio NFb. ....	55
<b>Figura 47.</b>	Frecuencia de raíces con suelo rizosférico de <i>Portulaca oleracea</i> L. con bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas observadas en NFb después de la siembra y tres subcultivos, 2016. ....	55
<b>Figura 48.</b>	Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas en medio LGI. ....	57
<b>Figura 49.</b>	Frecuencia de raíces con suelo rizosférico de <i>Portulaca oleracea</i> L con bacteria fijadoras de nitrógeno microaerófilas observadas en LGI después de la siembra y tres subcultivos, 2016. ....	57
<b>Figura 50.</b>	Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas en medio LGI-P. ....	58
<b>Figura 51.</b>	Frecuencia de raíces con suelo rizosférico de <i>Portulaca oleracea</i> L. con bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas observadas en LGI-P después de la siembra y tres subcultivos, 2016. ....	58

<b>Figura 52.</b>	Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas en medio JNFb. ....	59
<b>Figura 53.</b>	Frecuencia de raíces con suelo rizosférico de <i>Portulaca oleracea</i> L. con bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas bservadas en JNFb después de la siembra y tres subcultivos, 2016. ....	59
<b>Figura 54.</b>	Película subsuperficial formada por bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas en medio JMV .....	60
<b>Figura 55.</b>	Frecuencia de raíces con suelo rizosférico de <i>Portulaca oleracea</i> L. con bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas observadas en JMV después de la siembra y tres subcultivos, 2016. ....	60
<b>Figura 56.</b>	Frecuencia de suelo rizosférico de <i>Portulaca oleracea</i> L. con bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas aisladas en cinco medios semisólidos después de tres subcultivos. ....	61
<b>Figura 57.</b>	Porcentaje de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas aisladas en cinco medios semisólidos. ....	61
<b>Figura 58.</b>	Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en medio NFb. ....	63
<b>Figura 59.</b>	Frecuencia de raíces de <i>Portulaca oleracea</i> L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno observadas en NFb después de la siembra y tres subcultivos, 2016. ....	63
<b>Figura 60.</b>	Película subsuperficial y viraje de lindicador por bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en medio LGI.....	64
<b>Figura 61.</b>	Frecuencia de raíces de <i>Portulaca oleracea</i> L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno observadas en LGI después de siembra y tres subcultivos, 2016.....	64
<b>Figura 62.</b>	Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en medio LGI. ....	65

<b>Figura 63.</b>	Frecuencia de raíces de <i>Portulaca oleracea</i> L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno observadas en LGI-P después de la siembra y tres subcultivos, 2016. ....	65
<b>Figura 64.</b>	Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno microaerófilas en JNFb.	66
<b>Figura 65.</b>	Frecuencia de raíces de <i>Portulaca oleracea</i> L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno observadas en JNFb después la siembra y tres subcultivos, 2016. ....	66
<b>Figura 66.</b>	Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en JMV... ..	67
<b>Figura 67.</b>	Frecuencia de raíces de <i>Portulaca oleracea</i> L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno observadas en JMV después de la siembra y tres subcultivos, 2016.....	67
<b>Figura 68.</b>	Frecuencia de raíces de <i>Portulaca oleracea</i> L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno aisladas en cinco medios semisólidos después de tres subcultivos...	69
<b>Figura 69.</b>	Porcentaje de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno aisladas en cinco medio semisólidos. ....	69
<b>Figura 70.</b>	Frecuencia (%) de géneros identificados en bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno .....	70
<b>Figura 71.</b>	Frecuencia (%) de géneros identificados en bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno. ....	70
<b>Figura 72.</b>	Porcentaje de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno <i>In vitro</i> . ....	74
<b>Figura 73.</b>	Porcentaje de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno <i>in vitro</i> . ....	74
<b>Figura 74.</b>	Coloración observada en la cuantificación de amonio. ...	75
<b>Figura 75.</b>	Porcentaje de bacterias rizosféricas solubilizadoras de Fosfato <i>in vitro</i> . ....	81
<b>Figura 76.</b>	Porcentaje de bacterias endófitas solubilizadoras de fosfato <i>in vitro</i> .....	81
<b>Figura 77.</b>	Coloración observada en la cuantificación de fósforo .....	82

<b>Figura 78.</b>	Porcentaje de bacterias rizosféricas que produjeron indoles <i>in vitro</i> . ....	86
<b>Figura 79.</b>	Coloración observada en la cuantificación de indoles.	86
<b>Figura 80.</b>	Frecuencia de bacterias rizosféricas tolerantes a 5% de cloruro de sodio. ....	91
<b>Figura 81.</b>	Frecuencia de bacterias endófitas tolerantes a 5% de cloruro de sodio... ..	91
<b>Figura 82.</b>	Frecuencia de bacterias rizosféricas tolerantes a 10% de cloruro de sodio. ....	92
<b>Figura 83.</b>	Frecuencia de bacterias endófitas tolerantes a 10% de cloruro de sodio. ....	92
<b>Figura 84.</b>	Altura de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., 30 días después de la inoculación de bacterias rizosféricas, 2016. ....	95
<b>Figura 85.</b>	Altura de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. 30 días después de la inoculación de bacterias endófitas, 2016. ....	95
<b>Figura 86.</b>	Altura (cm) de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., 30 días después de la inoculación de bacterias rizosféricas y endófitas, 2016.	96
<b>Figura 87.</b>	Altura de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. 45 días después de la inoculación de bacterias rizosféricas, 2016. ....	99
<b>Figura 88.</b>	Altura de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. 45 días después de la inoculación de bacterias endófitas, 2016. ....	99
<b>Figura 89.</b>	Altura (cm) de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., 45 días después de la inoculación de bacterias rizosféricas y endófitas, 2016. ....	100
<b>Figura 90.</b>	Altura de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. en 60 días después de la inoculación de bacterias rizosféricas, 2016. ...	101
<b>Figura 91.</b>	Altura de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. en 60 días después de la inoculación de bacterias endófitas, 2016. ...	101

<b>Figura 92.</b>	Altura (cm) de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., 60 días después de la inoculación de bacterias rizosféricas y endófitas, 2016. ....	102
<b>Figura 93.</b>	Raíces de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., 60 días después de la inoculación de bacterias rizosféricas, 2016. ....	104
<b>Figura 94.</b>	Raíces de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., 60 días después de la inoculación de bacterias endófitas, 2016. ....	104
<b>Figura 95.</b>	Biomasa radicular (g) de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mil., 60 días después de la inoculación de bacterias rizosféricas y endófitas 2016. ....	105
<b>Figura 96.</b>	Biomasa aérea de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., 60 días después de la inoculación de bacterias rizosféricas, 2016...	108
<b>Figura 97.</b>	Biomasa aérea de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., 60 días después de la inoculación de bacterias endófitas, 2016. ....	108
<b>Figura 98.</b>	Biomasa aérea (g) de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mil., 60 días después de la inoculación de bacterias rizosféricas y endófitas, 2016. ....	109

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b>	Análisis físico - químico de muestra compuesta de suelo radicular de <i>Portulaca oleracea</i> L. verdolaga en Reque y Humedales de Eten en Lambayeque, 2016 .....	24
<b>Tabla 2.</b>	Características diferenciales de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aerobias. ....	72
<b>Tabla 3.</b>	Características diferenciales de las bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas. ....	71
<b>Tabla 4.</b>	Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por bacterias rizosféricas aisladas de <i>Portulaca oleracea</i> L. ....	77
<b>Tabla 4.</b>	Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por bacterias rizosféricas aisladas de <i>Portulaca oleracea</i> L. ....	78
<b>Tabla 4.</b>	Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por bacterias rizosféricas aisladas de <i>Portulaca oleracea</i> L. ....	79
<b>Tabla 5.</b>	Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por bacterias endófitas Aisladas de <i>Portulaca oleracea</i> L. ....	80
<b>Tabla 6.</b>	Fósforo (ppm) cuantificado en la solubilización por bacterias rizosféricas aisladas de <i>Portulaca oleracea</i> L. ....	83
<b>Tabla 6.</b>	Fósforo (ppm) cuantificado en la solubilización por bacterias rizosféricas aisladas de <i>Portulaca oleracea</i> L. ....	84
<b>Tabla 7.</b>	Fósforo (ppm) cuantificado en la solubilización por bacterias endófitas aisladas de <i>Portulaca oleracea</i> L. ....	85
<b>Tabla 8.</b>	Indoles producidos (ppm) por bacterias rizosféricas aisladas de <i>Portulaca oleracea</i> L. ....	87
<b>Tabla 8.</b>	Indoles producidos (ppm) por bacterias rizosféricas aisladas de <i>Portulaca oleracea</i> L. ....	88
<b>Tabla 9.</b>	Indoles producidos (ppm) por bacterias endófitas aisladas de <i>Portulaca oleracea</i> L. ....	90



<b>Tabla 10.</b>	Características de bacterias rizosféricas y endófitas aisladas de <i>Portulaca oleracea</i> L. ....	93
<b>Tabla 11.</b>	Índices de efectividad en la altura de plantas de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., 30, 45 y 60 después de la inoculación de bacterias rizosféricas y endófitas. ....	97
<b>Tabla 12.</b>	Prueba de Tukey de la altura de plantas de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. 30, 45 y 60 días después de la inoculación de bacterias rizosféricas y endófitas. ....	98
<b>Tabla 13.</b>	Índices de efectividad en la biomasa radicular y aérea de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., 60 días después de la inoculación de bacterias rizosféricas y endófitas ....	106
<b>Tabla 14.</b>	Prueba de Tukey de la biomasa radicular y aérea de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., 60 días después de la inoculación de bacterias rizosféricas y endófitas. ....	107
<b>Tabla 15.</b>	Rango de valores en las características de bacterias rizosféricas y endófitas inoculadas en <i>Lycopersicon esculentum</i> Mil. ....	111
<b>Tabla 16.</b>	Rango de valores en las características de los géneros bacterianos rizosféricas y endófitas aisladas de <i>Portulaca oleracea</i> L.....	112
<b>Tabla 17.</b>	Bacterias rizosféricas y endófitas promotoras de crecimiento en <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., durante 60 días en invernadero, 2016..	113

## I. INTRODUCCIÓN

La salinización de los suelos es uno de los problemas más graves a los que se enfrenta la agricultura mundial. Los suelos afectados, en promedio 971 millones ha (Wicke *et al.*, 2011) se caracterizan por la acumulación de cantidades excesivas de sales solubles, sodio intercambiable o ambos. Como consecuencia, se pierde la fertilidad, biodiversidad y se genera la desertificación, los suelos son abandonados por ser improductivos y las comunidades agrícolas se deterioran en su estructura y estabilidad, generando migración de trabajadores rurales hacia las grandes ciudades (Bandera, 2013).

En la recuperación de suelos afectados por la salinidad se pueden utilizar plantas tolerantes extractoras de sales o halófitas como *Portulaca oleracea* L. “verdolaga”, capaces de sobrevivir, completar su ciclo de vida y producir en estas condiciones desfavorables. En simultáneo, estas plantas modifican directamente las propiedades físicas e indirectamente las propiedades químicas y biológicas del suelo. El sistema radical descompacta el suelo e incrementa la porosidad y permeabilidad, favorece la estabilidad de los agregados y formación de macroporos que mejoran las propiedades hidráulicas. Las especies vegetales permiten el uso productivo de suelos marginales y degradados sin necesidad de gasto monetario en la compra de enmiendas químicas, que son más rápidas, pero con mayor costo (Bandera, 2013).

En la raíz y rizósfera de las plantas en general, incluyendo las tolerantes a la salinidad se encuentran las denominadas rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR), que sintetizan reguladores de crecimiento (auxinas, giberelinas, citoquininas), solubilizan minerales como los fosfatos, fijan nitrógeno atmosférico, estimulan el sistema de absorción de iones, además de disminuir el ataque de fitopatógenos mediante la competencia, el

parasitismo, lisis enzimática, antibiosis e inducción de resistencia (Hernández, 2006; Hayat *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2010; Nihorimbere *et al.*, 2011; Bhattacharyya & Jha, 2012). Las PGPR constituyen una alternativa para disminuir el uso de los fertilizantes químicos, cuya eficacia de recuperación o porcentaje del nutriente aplicado que es absorbido por la planta es en promedio 50, 30 y 60% para el N, P, K (SAGARPA, 2010). El resto se pierde por volatilización, desnitrificación, lixiviación y contamina el ambiente (Altamirano *et al.*, 2014).

Las PGPR pueden ser aisladas e inoculadas en las semillas o en la rizósfera de los cultivos agrícolas, beneficiándolos sobre todo cuando se presentan condiciones desfavorables (Stechmann, 2011; Aly *et al.*, 2012, Naz *et al.*, 2012), observándose incrementos en el desarrollo vegetativo y rendimiento, (García *et al.*, 2004; Nezarat & Gholami, 2009; Mena *et al.*, 2009; Nicolalde & Quintana 2010; Adjanohoun *et al.*, 2011; Naz *et al.*, 2012; Suwan *et al.*, 2012); así como también, una disminución de 25-50% de la dosis del fertilizante químico, (Alfonso *et al.*., 2005; Balemi *et al.*, 2007; León *et al.*, 2011; Sarajuohi *et al.*, 2012); sin embargo, también se han reportado resultados contradictorios en los que no se ha obtenido la respuesta positiva esperada, posiblemente para los microorganismos no se adaptaron a las condiciones del suelo muy diferentes a los de su procedencia, no compitieron exitosamente con la biota nativa o no fueron capaces de sobrevivir en condiciones desfavorables (Díaz *et al.*, 2001; Santillana, 2006; Stefan *et al.*, 2008).

Las malezas como la verdolaga proliferan en suelos con problemas de salinidad gracias a mecanismos propios como la tolerancia al ion sodio y el ajuste osmótico (Bandera, 2013), pero también desempeñan un rol muy importante los microorganismos asociados a la rizósfera (Chávez & Álvarez, 2011), los cuales se adaptaron a las condiciones adversas del entorno y como consecuencia maximizaron sus capacidades como PGPR. Por tanto, es posible que estas bacterias además de un mayor efecto benéfico, puedan tener éxito en el establecimiento después de la inoculación. Lambayeque tiene problemas con la salinidad de los suelos; sin embargo, en la actualidad las bacterias rizosféricas y endófitas de la verdolaga no se han aislado para ser caracterizadas y posteriormente ser utilizadas como biofertilizantes en suelos con problemas de salinidad.

La presente investigación permitirá aislar e identificar bacterias propias de la región con potencial para la biofertilización, generando valor agregado a la biodiversidad regional, a la vez que se disminuye el riesgo de la salud de los seres vivos y el efecto negativo de los insumos químicos en el ambiente. Por lo expuesto, se planteó el siguiente problema ¿Cuál es el potencial como promotoras del crecimiento de plantas en suelos con salinidad de las bacterias rizosféricas y endófitas aisladas de *Portulaca oleracea* L.? El objetivo general fue aislar bacterias rizosféricas y endófitas de *Portulaca oleracea* L. y determinar su potencial como promotoras del crecimiento de plantas en suelos con salinidad.

Los objetivos específicos fueron: aislar bacterias rizosféricas y endófitas fijadoras de nitrógeno en raíces y suelo rizosférico de plantas de verdolaga, identificar fenotípicamente las bacterias, cuantificar el nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos por las bacterias, determinar la tolerancia de las bacterias a diferentes concentraciones de cloruro de sodio, seleccionar las bacterias con la mayor tolerancia al cloruro de sodio y con los mayores valores en el nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos y determinar el efecto de estas bacterias en la altura, biomasa aérea y radicular de plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill. en suelo con salinidad. La hipótesis planteada fue: Las bacterias rizosféricas y endófitas aisladas de verdolaga fijan nitrógeno, solubilizan fosfato, producen indoles, toleran 10% de NaCl e incrementan la altura y biomasa aérea y radicular de plantas de tomate en suelos con salinidad.

## II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

### 2.1 Antecedentes de la investigación

Las PGPR tienen mayor efecto estimulador en suelos deficitarios que en suelos fértiles. En este contexto, se investigó el efecto de *Bacillus polymyxa*, *Pseudomonas* sp. y *Mycobacterium* sp. en el cultivo de *Zea mays* L. “maíz”. Se observó que las bacterias incrementaron significativamente la materia seca de los tallos (17-30%), raíces (19-52%) y peso total (17-38%) de las plantas de maíz provenientes de suelos calisoles con pH 7,8 y deficitarios en nutrientes, en comparación con las de suelo arenoso con pH 6,1. En los suelos fértiles las bacterias solo incrementaron significativamente el peso de las raíces, pero no el de los tallos, ni el peso total de las plantas (Egamberdiyeva, 2007).

Considerando la importancia del fósforo para el óptimo desarrollo de los cultivos agrícolas, se realizó una investigación para caracterizar microorganismos solubilizadores de fosfatos. Se colectaron muestras de rizósfera, rastros, malezas y materia orgánica, en descomposición, las cuales previa dilución en solución salina (NaCl 0,87% p/v) se sembraron en medio SMRS1. Después de la incubación a 30°C, por 72 horas, se seleccionaron las colonias bacterianas con halos de solubilización, entre las que 93% correspondió a bacterias Gram negativas. En medio NBRIP, después de 7 días, se determinó un rango de 1,5-4,2 mm en el índice de solubilización, alcanzando los mayores valores *Burkholderia cepacia*, *Pantoea* sp., *Pseudomonas putida*, *Aeromonas hydrophila* y *Enterobacter* sp. (Lara et al., 2011).

*Streptomyces* sp. (A1-19/01) caracterizado como PGPR fue multiplicado en sustratos con diferente contenido de materia orgánica (1,9-30,042%), cultivado con papa var. Serranita; alcanzando  $8 \times 10^7$  UFCg<sup>-1</sup>. Esta bacteria inoculada en las semillas de *Solanum tuberosum* L “papa”, al momento de la siembra, incrementó el desarrollo vegetativo y rendimiento del cultivo y el efecto se hizo más evidente en los sustratos con elevada conductividad eléctrica (9,8-9,21dSm<sup>-1</sup>), donde el desarrollo y rendimiento de las plantas testigos fue mínimo (1,14-2,50 g). En estos tratamientos, los incrementos por efecto de *Streptomyces* sp. fueron de 208 y 341% en el peso de la biomasa fresca y seca de las plantas, así como 133, 3000, 5600 y 1600 % en el número de tubérculos, peso fresco y seco de tubérculos e índice de cosecha de papa, respectivamente (Stechmann, 2011).

En suelos rizosféricos de *Triticum aestivum* L. “trigo” se aislaron 22 morfotipos de bacterias para investigar su potencial promotor del crecimiento de plantas en suelos salinos. El 77,27% sintetizó ácido indolacético y se seleccionaron dos aislados identificados como *Azotobacter vinelandii* y *Streptomyces* sp. Estas bacterias cultivadas en agar Ashby sacarosa y agar almidón-nitrato, respectivamente, fueron inoculadas independientemente y en cultivo mixto en dos oportunidades, a las semillas y después de la emergencia, observándose aumento de la germinación, así como en el crecimiento y desarrollo de las plántulas en condiciones normales y salinas. La inoculación de las bacterias disminuyó los efectos adversos del cloruro de sodio y aumentó la concentración de prolina, en comparación con el control, concluyéndose que pueden ser utilizadas como biofertilizantes en suelos salinos (Aly *et al.*, 2012).

En suelos agrícolas con problemas de salinización, se investigó el potencial como bioinoculante de *Azotobacter vinelandii* aislada de raíces de la maleza *Chrysopogon acheri*. La población de la bacteria osciló entre  $10^7$ -  $10^8$  UFCg<sup>-1</sup>. La identificación fenotípica y molecular determinó identidad con *A. vinelandii*. Esta bacteria sintetizó ácido indolacético (2,7 ppm), giberélico (2,2 ppm) y abscísico (0,5 ppm), así como también estimuló el crecimiento de plantas de maíz y aumentó el contenido de prolina en la raíz y brotes, tanto en condiciones normales como en salinos, siendo mayor en estos últimos (Naz *et al.*, 2012).

## 2.2 Marco teórico

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. Una alta y 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”; sin embargo, desde una visión ecológica, las técnicas agrícolas introducidas, el afán de lucro de los grandes productores y la necesidad de subsistencia de los campesinos, han producido una grave deforestación en el planeta, aumento de la erosión y pérdida de la capacidad productiva de los suelos (Dávila, 2004).

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

En la rizósfera de las plantas se consideran tres componentes: el suelo rizosférico, el rizoplaneo y la raíz misma. El suelo rizosférico es la zona del suelo influenciada por las raíces a través de la liberación de exudados. El rizoplaneo es la superficie de la raíz, incluidas las partículas fuertemente adheridas a la raíz. La raíz misma también forma parte de la rizósfera, porque determinados microorganismos son capaces de colonizar los tejidos internos (Nihorimbere *et al.*, 2011).

Kloepper & Schroth (1978), mencionados por Bhattacharyya & Jha (2012), propusieron el término rizobacterias para las bacterias del suelo que competitivamente colonizaban las raíces, estimulaban el crecimiento de las plantas y a la vez reducían la incidencia de las enfermedades. En 1981, estos mismos investigadores denominaron a estas bacterias promotoras de crecimiento en plantas (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, PGPR). En la actualidad, este concepto se usa para las

bacterias que cumplen con dos de los tres criterios establecidos, como son colonización agresiva, estimulación del crecimiento vegetal y biocontrol.

### **2.2.1 Rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas**

Las PGPR benefician a los cultivos agrícolas a través de mecanismos directos e indirectos. Los mecanismos directos incluyen la fijación de nitrógeno atmosférico, síntesis de reguladores del crecimiento (auxinas, giberelinas, citoquininas), solubilización de minerales fosfatos, producción de sideróforos y estimulación del sistema de absorción de iones como los nitratos. Entre los mecanismos indirectos o de biocontrol se encuentran la competencia por un nicho ecológico o por nutrientes, la interacción directa con los patógenos (parasitismo y lisis enzimática), antibiosis, producción de sideróforos e inducción de resistencia sistémica a las plantas (Delgado *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2006; Hernández *et al.*, 2009; Bhattacharyya & Jha, 2012).

Bacterias como *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter* y *Azotobacter* promueven el crecimiento de las plantas, mayoritariamente a través de mecanismos directos, así como *Pseudomonas*, *Bacillus*, y *Streptomyces* lo hacen a través de mecanismos indirectos; no obstante, todas las PGPR presentan un mayor o menor grado de efectividad en ambos mecanismos (Doubou *et al.*, 2002; Kloepper, 2003; Idriss *et al.*, 2004; Guillen *et al.*, 2006; Franco, 2009; Karnwal, 2009; Martínez *et al.*, 2010; Salaheddin *et al.*, 2010). El efecto de las PGPR también se atribuye a la “hipótesis aditiva”, según la cual más de un mecanismo están involucrados en la asociación planta-rizobacteria, los mismos que operan simultáneamente o en asociación. La suma de los diferentes mecanismos refleja los cambios observados en el crecimiento de las plantas, cuando son cultivadas bajo condiciones ambientales propicias (Bashan *et al.*, 1996)

Las bacterias fijadoras de nitrógeno convierten el nitrógeno molecular en amoníaco, gracias al complejo enzimático nitrogenasa, constituido por dos metaloproteínas: la molibdo-ferroproteína (I) y la ferro-proteína (II). A su vez, se requieren las proteínas ferredoxina y flavodoxina como donadoras de electrones y reductores naturales de la nitrogenasa. En el proceso, los electrones son llevados por la ferredoxina hacia la ferro-proteína (reducción de la ferroproteína), que a su vez



activa la molibdeno-ferroproteína (transferencia de electrones) y se produce la reducción del nitrógeno, siendo luego fijado a compuestos aminados. Los géneros de bacterias diazótrofes son: *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Clostridium*, las cuales fijan entre 3-100 kg/ha/año; sin embargo, esta cantidad es mínima si se compara con la asociación *Rhizobium* -leguminosas, que puede fijar hasta 700/kg/ha/año (Lara *et al.*, 2007).

El efecto positivo de las PGPR está relacionado con el crecimiento en longitud de las raíces laterales, así como el número y longitud de los pelos radiculares, cambios que se asocian con la síntesis de auxinas, citoquininas y giberelinas. En un modelo hipotético, el AIA sintetizado por una bacteria que está adherida a la superficie de la semilla, o bien a la raíz en desarrollo, es tomado por la planta y junto con el AIA endógeno (de la planta) puede estimular la división y alargamiento de las células o bien promover la síntesis de ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico (ACC), con la activación de la enzima ACC sintasa. Por lo tanto, aumenta la síntesis del ACC, que normalmente es un precursor inmediato del etileno y que a su vez inhibe la elongación de las raíces. El ACC es tomado por las bacterias para ser hidrolizado por la enzima amino ciclopropano carboxilasa desaminasa (ACC desaminasa), transformándose en alfa-cetobutirato y amonio. Las bacterias inducen a la planta a sintetizar más ACC de lo que necesita para que éstas tengan una fuente de nitrógeno disponible. Una consecuencia directa de la disminución del ACC en la planta (endógeno y bacteriano) es la reducción de etileno, con incremento significativo en la formación de pelos radiculares (Loredo *et al.*, 2004).

El ácido indolacético es un metabolito derivado del triptófano, aunque también puede ser sintetizado por una vía independiente, principalmente en las plantas. En las bacterias se proponen las vías dependientes de triptófano denominadas del ácido indol-3-pirúvico (IP y A), del indol-3-acetonitrilo (IAN), de la triptamina (TAM) y de la indol-3-acetamida (IAM). Esta última ha sido estudiada con detalle en *Agrobacterium tumefaciens* y *Pseudomonas syringae* pv. *Savastanoi* y en ambas la síntesis de AIA está relacionada con la formación de tumores (Aguilar *et al.*, 2008).

Desde el punto de vista funcional y de nutrición de los cultivos, se consideran tres fracciones de fósforo en el suelo: P en solución, P lábil y P no lábil. Cuando se aplica un fertilizante químico, el P soluble puede o no llegar a la fracción de P en

solución. En el primer caso, el P en solución se incrementa, promoviendo el flujo hacia la fracción de P lábil, en la cual prácticamente queda absorbido todo el P incorporado. Paralelamente, se produce una gradiente de concentración con la fracción de P no lábil, comenzando un flujo lento de difusión vía intrapartícula vinculado a los procesos de adsorción. Dependiendo del pH y de la concentración de iones en la solución suelo, otra parte del P aplicado se precipita (con el calcio, fierro o aluminio). Una tercera parte del P es inmovilizado como materia orgánica por los microorganismos. De este modo, los procesos de transferencia y disponibilidad de P ocurren mediante tres mecanismos: adsorción-desorción; precipitación-solubilización e inmovilización - mineralización (Carreño *et al.*, 2010).

La solubilización de fosfatos precipitados consiste en la liberación de fosfato inorgánico soluble a partir de fosfatos insolubles y las PGPR responsables del proceso se denominan solubilizadoras de fósforo. El principal mecanismo para la solubilización de los fosfatos, es la producción de ácidos orgánicos, aunque también se consideran ácidos inorgánicos como sulfhídrico, nitrito y carbónico, la excreción de protones acompañada de la asimilación del ion amonio y la acción de mecanismos reductores de los cationes. Por su parte, en el proceso de mineralización del fósforo, las PGPR pueden movilizar el fósforo de la materia orgánica no soluble del suelo y convertirlo en fósforo inorgánico soluble, mediante la excreción de enzimas hidrolíticas como fosfatasas, fitasas y fosfonatasas (Carreño, 2009).

### **2.2.2 Salinidad de suelos**

La salinidad es definida como una excesiva concentración de sales solubles en el suelo, que limitan el crecimiento de las plantas, e inclusive causan su muerte (Chávez & Álvarez, 2011). Los suelos salinos y sódicos tienen sales solubles, sodio intercambiable o ambos, de tal manera que afectan o alteran su productividad, (Bandera, 2013). Los problemas de salinidad se encuentran usualmente en zonas áridas y semiáridas, donde las precipitaciones no son suficientes para transportar las sales fuera de la zona explorada por las raíces (Chávez & Álvarez, 2011). El factor antrópico ha desencadenado los procesos de salinización, de forma más extrema en aquellas áreas cuyas condiciones climáticas propician su aparición. Como factores degradativos se mencionan la deforestación, sobreexplotación y cambio en el uso de

las tierras, sobrepastoreo, mal manejo de agua y las tecnologías de riego y de cultivo (Chávez & Álvarez, 2011; Bandera, 2013).

La sal en la química y en la ciencia de los suelos no significa cloruro de sodio (NaCl), pero sí los compuestos iónicos conformados por cationes y aniones. Los principales cationes de las sales solubles en los suelos salinos son el sodio, calcio y magnesio y los aniones más significativos son el sulfato, cloruro y bicarbonato. La salinidad es consecuencia de la presencia de sales más solubles que el yeso y que por sus propias características se encuentran tanto en la fase sólida como en la fase líquida, por lo que tienen una extraordinaria movilidad. Las de mayor interés para los suelos son los sulfatos ( $\text{SO}_4^{-2}$ ), bicarbonatos ( $\text{HCO}^{-3}$ ) y los cloruros ( $\text{Cl}^-$ ) de bases  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{Na}^+$ , predominando en los suelos salinos los cloruros y sulfatos (Partida *et al.*, 2005).

Los parámetros mediante los cuales se evalúan los suelos salinos son: la conductividad eléctrica, porcentaje de sodio intercambiable (PSI) y la relación de absorción de sodio (RAS). El PSI describe el nivel de  $\text{Na}^+$  adsorbido en el suelo, en los lugares de intercambio catiónico. La RAS refleja la sodicidad de los suelos. El PSI puede ser estimado desde el RAS del extracto de saturación de pasto (Hernández, 2011).

La conductividad eléctrica (CE) es el parámetro más ampliamente utilizado en la estimación de la salinidad. Se basa en la velocidad con la que la corriente eléctrica atraviesa una solución salina, la cual es proporcional a la concentración de sales de la solución. Hasta hace unos años se expresaba con mmhos/cm. Hoy en día se expresa en deciSiemens por metro ( $\text{dSm}^{-1}$ ), siendo ambas medidas equivalentes ( $1\text{mmhos/cm} = 1\text{dSm}^{-1}$ ). La CE refleja la concentración de sales solubles en la disolución. Una muestra seca y tamizada de suelo es mezclada con agua desmineralizada, hasta conseguir que se forme una pasta con suficiente agua y después se filtra al vacío. La CE es proporcional a la concentración de sales en la solución en función de la temperatura ( $25^\circ\text{C}$ ) y las lecturas se obtienen mediante el conductímetro (Dávila, 2004; Soriano, 2004).

La CE del extracto acuoso clasifica los suelos en cinco clases: grado de salinidad bajo suelos normales ( $\text{CE} = < 2\text{dSm}^{-1}$ ) con ningún efecto negativo sobre el crecimiento

de las plantas; grado de salinidad leve o suelos no salinos ( $CE = 2-4 \text{ dSm}^{-1}$ ) con leve efecto sobre las plantas; grado de salinidad alto o suelos salinos ( $CE = 4-8 \text{ dSm}^{-1}$ ), con disminución en el rendimiento de la mayoría de cultivos; grado de salinidad muy alto o suelos fuertemente salinos ( $CE = 8-16 \text{ dSm}^{-1}$ ), donde muy pocos cultivos soportan las condiciones y solo los tolerantes obtienen rendimientos aceptables y grado de salinidad extremadamente alto o suelos extremadamente salinos, ( $CE > 16 \text{ dSm}^{-1}$ ), con muchas restricciones para los cultivos (Dávila, 2004).

La CE y el PSI diferencian en las zonas áridas suelos normales, salinos, salinos sódicos y sódicos (Bandera, 2013). Los normales presentan una  $CE < 2 \text{ dSm}^{-1}$ ,  $PSI < 15$  y pH de 6-7. Los suelos salinos tienen una  $CE > 4 \text{ dSm}^{-1}$ ,  $PSI < 15$  y pH  $< 8,2$  donde los cloruros y sulfatos son los principales aniones solubles, el contenido de bicarbonatos es bajo y no se encuentran carbonatos. El sodio soluble supera la suma de  $Ca + Mg$ , pero la RAS no es elevada y pueden estar presentes sales de baja solubilidad como el sulfato de calcio (yeso), carbonatos de calcio y magnesio (caliza). El suelo es salino-sódico cuando su  $CE$  es  $> 4 \text{ dSm}^{-1}$ ,  $PSI > 15$  y pH  $> 8,5$ , como resultado de los procesos combinados de salinización y acumulación de sodio. El suelo es sódico cuando la  $CE$  es  $< 4 \text{ dSm}^{-1}$ ,  $PSI > 15$  y pH  $> 8,2$ . El principal catión es el sodio, se encuentra junto a cloruros, sulfatos y bicarbonatos y el contenido de sodio es mayor que  $Ca + Mg$ . Generalmente la salinidad del suelo está referida a  $CE$  mayor de  $4,01 \text{ dSm}^{-1}$  que afecta el rendimiento de los cultivos (Dávila, 2004; Bandera, 2013).

La CE, RAS y PSI clasifican los suelos en salinos ( $CE = > 4 \text{ dScm}^{-1}$ ;  $PSI = 0-15\%$ ;  $RAS = 0-12$ ); sódicos ( $CE = 0-4 \text{ dScm}^{-1}$ ;  $PSI > 15\%$ ;  $RAS > 12$ ); salinos-sódicos ( $CE = > 4 \text{ dScm}^{-1}$ ;  $PSI > 15\%$ ;  $RAS > 12$ ) y normales ( $EC = 0-4 \text{ dScm}^{-1}$ ,  $PSI = 0-15\%$ ;  $RAS = 0-12$ ) (Hernández, 2011). La formación de suelos afectados por sales requiere una fuente de sales solubles y un balance donde los procesos de acumulación prevalezcan sobre los de lavado (Dávila, 2004; Bandera, 2013). Los procesos de salinización o de sodificación se deben a la acumulación de sales o de sodio intercambiable en las partes más deprimidas del relieve. Éstas reciben las aguas de escorrentía o el aporte de capas freáticas salinas, que al ascender en periodos de lluvias abundantes, depositan cantidades considerables de sales en el perfil del suelo. Al finalizar las lluvias, el agua se evapora e infiltra y

comienza la desecación de las capas superiores del suelo. Asimismo se produce el ascenso capilar del agua freática que, al evaporarse, enriquece de sales el perfil, principalmente la porción superior del suelo (Bandera, 2013).

Las causas y consecuencias técnicas de la salinidad son muy similares en cualquier región agrícola del mundo, por lo que las estrategias generales son de aplicación universal y el manejo específico estará condicionado por las características del lugar. La cercanía de la costa, altura sobre el nivel del mar así como la brisa marina son fuentes primarias de la salinidad. Asimismo, la intemperización de los minerales del suelo y la existencia de sales fósiles son causas de salinidad, que se agudizan en condiciones heterogéneas de microtopografía. La calidad del agua de riego agrícola y el manejo agronómico de los cultivos son dos factores de salinidad de los suelos, susceptibles de control para conservar y mejorar el potencial productivo de los suelos afectados por las sales (Hernández, 2000; SAGARPA, 2010).

Los efectos de la elevada concentración de sales en los suelos se expresan en la planta de varias formas, destacando la reducción del crecimiento foliar. En gramíneas el macollamiento se reduce (Bandera, 2013). La salinidad produce: i) limitaciones nutricionales mediante el incremento del fósforo, potasio, nitrato y calcio, ii) citotoxicidad iónica debido al  $\text{Na}^+$  y  $\text{SO}_4^-$  y iii) estrés osmótico. El  $\text{NaCl}$  provoca estrés primario o daño directo sobre la membrana y alteraciones metabólicas o estrés o daño secundario. El  $\text{Na}^+$  compite con el  $\text{K}^+$ , siendo hostil en los procesos celulares. Bajo salinidad, los iones  $\text{Na}^+$  penetran las capas hidratadas de las proteínas e interfieren con las interacciones no covalentes entre los aminoácidos, generando cambios conformacionales y pérdida de función de las proteínas. La toxicidad iónica, estrés osmótico y deficiencias nutricionales originan desequilibrio metabólico y como consecuencia un estrés oxidativo (Castelán, 2009).

### **2.2.3 Tolerancia y resistencia a la salinidad**

La ley del Mínimo afirma que todos los seres vivos necesitan un nivel mínimo de factores ambientales para su desarrollo y que el eslabón más débil de la cadena ecológica puede controlar a los organismos. La ley del Máximo indica que después de cierto nivel de un factor ambiental, los organismos no pueden desarrollarse. La ley de la Tolerancia, sostiene que existe un rango en los factores ambientales en el cual las especies se desarrollan en forma óptima. La tolerancia de las especies vegetales a la

salinidad se define como el rendimiento relativo de las especies a un nivel dado de salinidad. También se define como la capacidad que tienen ciertas especies a desarrollarse en diversas concentraciones de salinidad, sin afectar en forma drástica su división celular y la plasticidad de sus paredes celulares (Dávila, 2004).

La tolerancia a la salinidad se puede analizar desde tres puntos de vista: (1) aptitud para sobrevivir en condiciones salinas, (2) rendimiento absoluto en condiciones salinas y (3) rendimiento en condiciones salinas relativo al obtenido en condiciones no salinas. El enfoque 1 es útil en programas de mejora genética, pero su interés empírico es irrelevante. El enfoque 2 puede ser el más apropiado por ser el que proporciona un mayor rendimiento económico, pero depende del ambiente en que se desarrollan los cultivos. El enfoque 3 se utiliza para expresar tolerancia a la salinidad, aunque sobreestima la tolerancia del material menos productivo en condiciones no salinas y no refleja necesariamente la máxima productividad en condiciones salinas; no obstante, es adoptado para generar las tablas de tolerancia de los cultivos a la salinidad (Maas, 1990, mencionado por Chávez & Álvarez, 2011).

La homeostasis iónica y osmótica es necesaria para que las plantas sean tolerantes a la sal. La homeostasis iónica requiere determinantes que controlan la captura de iones tóxicos y facilitan su compartimentalización hacia la vacuola. La homeostasis osmótica se logra mediante la acumulación de osmolitos compatibles en el citoplasma. Los osmolitos son azúcares (sucrosa, fructuosa), glicerol, inositoles metilados, azúcares complejos (trehalosa, rafinosa, fructuosa), iones  $K^+$ , metabolitos cargados (glicin- betaína) y aminoácidos como la prolina. Su función no está limitada en el balance osmótico y puedan reemplazar el agua de la superficie de las proteínas o membranas, por lo tanto actúan como chaperonas de elevado peso molecular (Castelán, 2009).

La hormona del estrés: ácido abscísico (ABA) tiene un papel que desencadena factores implicados en la tolerancia al estrés en una gran cantidad de especies vegetales. Parece actuar como un desencadenante en el incremento de ciertos azúcares, mientras se adquiere la tolerancia, produciendo cambios fisiológicos en los tejidos de las plantas. Los niveles endógenos de ABA se incrementan significativamente bajo estrés hídrico y alta salinidad. La actividad fotosintética es reducida debido a eventos como el cierre de los estomas y una reducción en la

actividad de las enzimas fotosintéticas. Se asume que el cierre de los estomas es desencadenado por el ABA (Castelán, 2009).

La tolerancia a la salinidad genera dos grupos de plantas: Glicophytas que toleran baja concentración de sales y Halophytas que toleran relativamente altas concentraciones (Chávez & Álvarez, 2011). Las plantas halófitas son capaces de sobrevivir, completar su ciclo de vida e incluso expresar su máximo potencial de crecimiento y producir en condiciones de elevada salinidad. Por el contrario, la sobrevivencia de las glicofitas su crecimiento y rendimiento se reducen severamente en salinidad relativamente baja (Dávila, 2004). La mayoría de especies comestibles son glicofitas, muy susceptibles a la salinidad, aun cuando la conductividad eléctrica sea menor de  $4 \text{ dSm}^{-1}$ . *Phaseolus vulgaris* “frijol”, *Solanum melongena* “berenjena”, *Zea mays* “maíz”, *Solanum tuberosum* “papa” y *Saccharum officinarum* “caña de azúcar” son muy susceptibles a la salinidad. Por el contrario, *Beta vulgaris* “remolacha azucarera” y *Hordeum vulgare* “cebada” pueden tolerar una CE de más de  $7 \text{ dSm}^{-1}$  (Chinnusamy *et al.*, 2005).

Los problemas que generalmente enfrentan las plantas expuestas a las condiciones salinas son: mantenimiento de relaciones hídricas intracelulares en forma favorable, tolerancia específica a toxicidad de iones y abastecimiento de iones de nutrientes esenciales, a pesar de la predominancia de otros no esenciales. Las plantas halófitas acumulan altas concentraciones de iones en las células, la cual favorece su ajuste osmótico en respuesta al medio salino, en cambio las glicofitas responden a la salinidad, principalmente por exclusión de iones. Algunas características que permiten resistir a la salinidad incluyen la presencia de pocos estomas por unidad de superficie foliar, engrosamiento de las hojas y superficie cubierta de ceras, reducida diferenciación de tejido vascular, temprana lignificación de raíces, succulencia foliar y mayor proporción de crecimiento radicular en relación con el aéreo (Dávila, 2004).

Para que una planta se adapte a las condiciones salinas debe aumentar la capacidad de obtener o retener agua y restituir la homeostasis iónica. Estos mecanismos de adaptación se reflejan en un menor crecimiento, modificación de la relación parte aérea/raíz y limitación de la expansión foliar, siendo consecuencia de cambios bioquímicos (síntesis de ácido abscísico y solutos osmoprotectores) y

fisiológicos: alteración de la permeabilidad de las membranas a los iones y el agua, cierre estomático y disminución de transpiración y fotosíntesis.

Los mecanismos de control en las plantas para el mantenimiento de un nivel constante de la concentración de sodio en los tejidos vegetales pueden ser de escape, adaptación, evasión y de tolerancia (Dávila, 2004). En los de escape se mencionan el crecimiento solo durante temporadas favorables, crecimiento en sitios favorables y limitación del crecimiento de las raíces. Como procesos de adaptación y evasión se consideran la selectividad contra el Na y Cl, lixiviación de sales mediante las raíces, desvío de las sales hacia los tejidos asimiladores, compartimentalización de las sales dentro de la planta, tejidos y células, acumulación de sales en el parénquima del xilema en raíces y brotes, síntesis de solutos orgánicos, eliminación de las partes más viejas (salt-filled organs) y secreción mediante estructuras como glándulas. Como mecanismos de tolerancia se consideran el incremento de la tolerancia a la sal en los tejidos, células y organelos y el incremento de la halo-suculencia (Castelán, 2009).

#### **2.2.4 Recuperación de suelos salinos**

Las prácticas de mejoramiento y manejo de los suelos salinos y salinizados son agrupadas en físicas, químicas, biológicas y agrotécnicas (Chávez & Álvarez, 2011). El método más utilizado es el lavado o lixiviación de las sales solubles con agua de baja salinidad, que se aplica en una lámina grande para disolver las sales y removerlas de la zona radical. Es indispensable que el suelo sea permeable y que exista una salida para el agua de drenaje. Los métodos químicos se usan para sustituir el Na<sup>+</sup> y el Mg<sup>++</sup> contenidos en el complejo de cambio, por el Ca<sup>++</sup>, usándose frecuentemente sulfato y cloruro de calcio. Los métodos agrotécnicos como la aplicación de materia orgánica están dirigidos a mejorar las propiedades físicas y la fertilidad del suelo. Entre los métodos biológicos están las plantas tolerantes extractoras de sales, fundamentalmente de interés forrajero (Chávez & Álvarez, 2011).

El uso de seres vivos para rehabilitar ambientes contaminados se denomina biorremediación. La utilización de plantas y su microbiota asociada para el tratamiento *in situ* del suelo se denomina fitorremediación. Esta estrategia está basada en los cambios generados en el suelo por el crecimiento de especies vegetales tolerantes a la sodicidad, como *Cynodon dactylon* (Rivera *et al.*, 2014) *Ulmus* sp., *Tamarix* sp., *Acacia* sp., *Sesbania exaltata*, *Cyperus* sp. (Dávila, 2004). *Atriplex canescens*



(Bojórquez, 2007), *Leptochloa fuscal.*, *Lolium perenne*, *Sesbania bispinosa* L. *Medicago sativa*, *Sorghum sudanense*, *Salicornia bigelorii* Ton., *Chenopodium album*, *Echinochloa crusgalli* L. y *Portulaca oleracea* L. (Chávez & Álvarez, 2011).

Las plantas de *Portulaca oleracea* L. son herbáceas anuales, con raíces axonomorfas de hasta 40 cm y tallos ramificados de hasta 60 cm de longitud, postrados, formando rosetas cuando crecen en espacio abierto, a baja densidad y con fuerte iluminación. Las hojas son oblongas sésiles, alternas o subopuestas aglomeradas bajo las flores con cinco pétalos y dos sépalos, reunidas en grupos de 3 o 5, en las axilas de los tallos o en los extremos apicales. El fruto es un pixidio o cápsula ovoide con dehiscencia ecuatorial y numerosas semillas negras y brillantes (Rodríguez, 2014).

La verdolaga se consume como verdura o como ingrediente de sopas y ensaladas y es la fuente mas rica de ácido linoleico (LNA): 4mg g<sup>-1</sup> de peso seco entre los vegetales de hojas verdes (Páez *et al.*, 2007). El mayor componente es el agua: 90,5% en los tallos y 91,8% en la hojas y se han encontrado 27 ácidos grasos en las hojas, siendo los más abundantes el ácido linoleico (27,7-39,14%), palmítico (19,3-24,3%) y oleico (11,6-19,5%). La verdolaga también contiene ácidos orgánicos como el fumárico, cítrico y málico (Rodríguez, 2014) y B-caroteno; no obstante, también acumula ciertos principios tóxicos como oxalatos, nitratos y saponinos (Fernández *et al.*, 2009).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Materiales**

##### **3.1.1 Material biológico**

El material biológico estuvo constituido por raíces con suelo rizosférico de verdolaga, bacterias rizosféricas y endófitas aisladas de verdolaga y semillas de tomate.

##### **3.1.2 Población y muestra**

En la investigación descriptiva la población estuvo constituida por las plantas de verdolaga del distrito de Reque y Humedales de Eten en la región Lambayeque y la muestra por 54 plantas colectadas durante febrero-abril de 2016. El número de muestras fue calculado según la fórmula mencionada por Vásquez *et al.* (2012), tomando en cuenta una prevalencia de 90% (Anexo 1), determinada en un estudio piloto por los investigadores. En la investigación explicativa, la población fueron los cultivos de bacterias rizosféricas y endófitas aisladas de plantas de verdolaga durante febrero-abril de 2016 y la muestra no probabilística y por conveniencia estuvo constituida por 24 cultivos de bacterias seleccionadas.

#### **3.2 Métodos**

##### **3.2.1 Variables de la fase descriptiva**

Variables cuantitativas: Nitrógeno fijado, fosfato solubilizado, indoles producidos.

##### **3.2.2 Variables de la fase experimental**

Variable independiente: Cultivos (24) de bacterias rizosféricas y endófitas.

Variable dependiente: Altura, peso de biomasa aérea y radicular de plantas de tomate.

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

La investigación se realizó en dos fases. La primera fase descriptiva correspondió el aislamiento e identificación de bacterias rizosféricas y endófitas, cuantificación de nitrógeno, fosfato solubilizado e indoles producidos. En la segunda fase experimental se determinó el efecto de 24 cultivos de bacterias en la altura y peso de la biomasa aérea y radicular de plantas de tomate, durante 60 días.

La hipótesis en la primera fase se contrastó con el diseño no experimental “Solo Después”, mencionado por Vásquez *et al.* (2012) y en la segunda fase con el diseño experimental completamente aleatorio, DCA. Los tratamientos fueron 25 correspondientes a T1: Testigo absoluto (agua destilada), T2 a T17 bacterias rizosféricas y T18 a T25 bacterias endófitas. En cada tratamiento se consideraron tres repeticiones, totalizando 75 unidades experimentales (Figura 1).

### **3.2.4 Lugar de muestreo**

En suelos con problemas de salinidad (Figura 2), reconocidos por su dureza y costras blancas en la superficie (Tena, 2002), en el distrito de Reque y Humedales de Eten, región Lambayeque (Figura 3,4), se colectaron 54 muestras de raíces con suelo adherido de verdolaga. El distrito de Reque tiene una superficie de 47,03 Km<sup>2</sup> y se ubica entre los paralelos 06° 52' 00" latitud sur y 79° 49' 27" longitud oeste (Municipalidad de Reque, 2013). Los Humedales de Eten tienen una superficie de 1,7 Km<sup>2</sup> y se ubican entre los paralelos 06° 53' 40" latitud sur y 79°52'22" longitud oeste (Municipalidad de Eten 2012).

### **3.2.5 Obtención de muestras**

Las plantas de verdolaga incluyendo las raíces se extrajeron con ayuda de una palana, se seleccionaron aproximadamente 50 g de raíces (Figura 5) y suelo adherido, se depositaron en bolsas de polietileno (Figura 6) debidamente identificadas e inmediatamente se transportaron en una caja térmica (10± 1°C) hacia el Laboratorio de Microbiología y Parasitología, sección Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo en Lambayeque.

1	6	24	8	5	25	19	7	11	22	12	17	2	16	10	4	15	23	14	21	18	3	9	13	20
3	20	2	19	10	23	9	14	24	16	22	25	6	13	11	4	21	15	7	1	12	18	5	17	8
7	15	22	11	4	20	6	1	21	17	3	18	13	8	10	24	9	5	16	2	12	19	23	25	22

T1 = Testigo absoluto

T2 - T9 = Bacterias rizosféricas aerobias

T10 - T17 = Bacterias rizosféricas microaerófilas

T18 –T25 = Bacterias endófitas

**Figura1.** Diseño completamente aleatorio para determinar el efecto de bacterias rizosféricas y endófitas en el desarrollo vegetativo de *Lycopersicon esculentum* Mill.



**Figura 2.** Suelo con salinidad en los Humedales de Eten en Lambayeque, 2016.



**Figura 3.** Ubicación del distrito de Reque, provincia de Chiclayo, región Lambayeque, febrero, 2016.  
<https://www.google.com.pe/search?q=mapa+de+reque&source>.



**Figura 4.** Ubicación de los Humedales de Eten, provincia de Chiclayo, región Lambayeque, febrero, 2016.  
[https://www.google.com. ubicacion+de+humedales+de+eten+mapa](https://www.google.com.ubicacion+de+humedales+de+eten+mapa)).





**Figura 5.** Extracción de raíces con suelo rizosférico de *Portulaca oleracea* L.



**Figura 6.** Muestras de raíces con suelo rizosférico de *Portulaca oleracea* L.

En simultáneo al muestreo de raíces con suelo rizosférico, para el aislamiento de bacterias, se colectó una muestra compuesta de la masa radicular de plantas de verdolaga, representativa de 1kg de suelo para realizar el análisis físico-químico en el Instituto Nacional de Innovación y Extensión Agraria, Extensión Experimental Vista Florida de Chiclayo. Según los resultados (Tabla 1), el suelo es fuertemente alcalino (pH 9,3), fuertemente salino (CE 29,45 dSm<sup>-1</sup>), con textura arenosa, niveles bajos de materia orgánica (0,3%), y nitrógeno (0,103%) y nivel medio de fósforo disponible (14,6 ppm) y potasio (287,0 ppm).

### **3.2.6 Aislamiento de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno**

Las bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aerobias y microaerófilas se aislaron (Garrido, 2007; Altamirano *et al.*, 2014) de las raíces con suelo rizosférico (Figura 7), previamente deshidratadas bajo sombra, durante 72 horas. Las raíces fueron fragmentadas (5 cm), aleatoriamente se tomaron 10 g de raíces junto con el suelo adherido y se depositaron en frascos de 250 mL de capacidad, conteniendo 90 mL de solución salina esterilizada: NaCl 0,87% p/v (Figura 8).

Después de agitar manualmente durante 10 minutos los frascos conteniendo la suspensión de raíces y suelo en solución salina (Figura 9) se tomaron alícuotas y se sembraron mediante la técnica de agotamiento y estría sobre la superficie de medios sólidos sin nitrógeno para aislar bacterias aerobias y mediante la técnica de puntura en medios semisólidos sin nitrógeno (una gota por tubo) para aislar bacterias microaerófilas (Figuras 10,11, 12, anexo 2). Ambos medios sólidos y semisólidos sin nitrógeno fueron suplementados con antimicótico.

Las bacterias aerobias fueron aisladas en los medios de cultivo sólidos LG para *Azotobacter*, LGD para *Derxia* y BEIJ para *Beijerinckia* spp. (Garrido, 2007; Jha *et al.*, 2009). Después de la incubación a 30 ± 2°C por 2 días, con los morfotipos de las bacterias representativas se obtuvieron suspensiones en solución salina esterilizada y se sembraron en los medios sólidos respectivos y posteriormente en agar batata.



**Tabla 1.** Análisis físico - químico de muestra compuesta de suelo radicular de *Portulaca oleracea* L. verdolaga en Reque y Humedales de Eten en Lambayeque, 2016

Clase		CE	MO	N	P	K
Textural	pH	(dSm <sup>-1</sup> )	(%)	(%)	(ppm)	(ppm)
Arenoso	9,30	29,45	0,30	0,103	14,60	287,0



**Figura 7.** Raíces con suelo rizosférico de *Portulaca oleracea* L



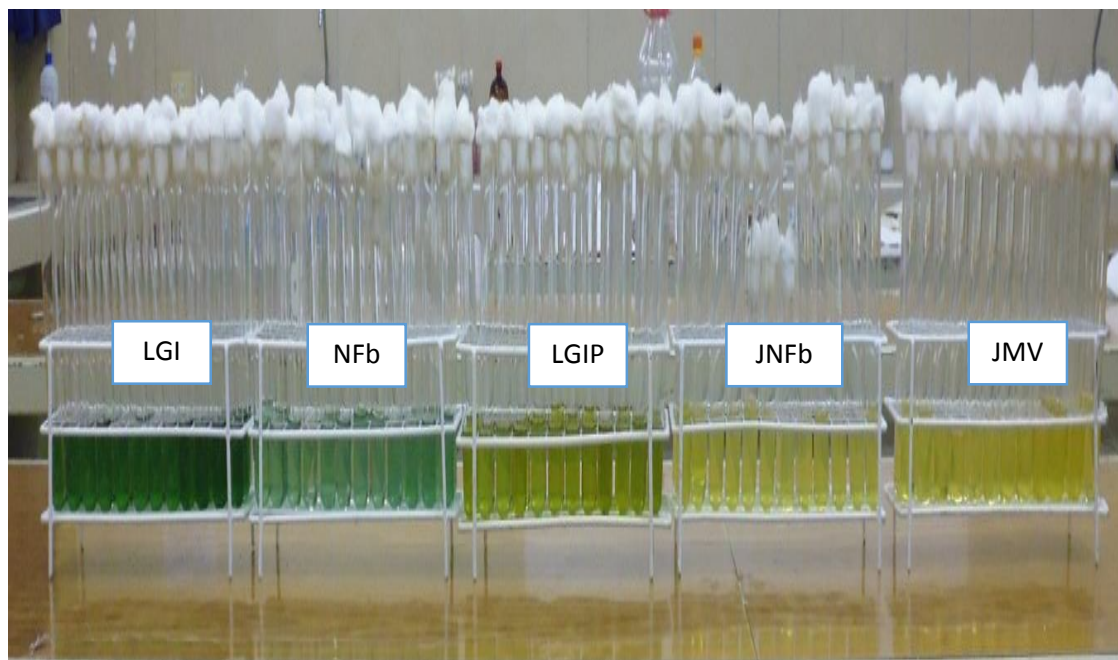
**Figura 8.** Submuestras de raíces con suelo rizosférico de raíces de *Portulaca oleracea* L.



**Figura 9.** Suspensión de raíces y suelo rizosférico de *Portulaca oleracea* L. en solución salina esterilizada.



**Figura 10.** Siembra en medio sólido mediante la técnica de agotamiento y estría.



**Figura 11.** Medios semisólidos sin nitrógeno para el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas.





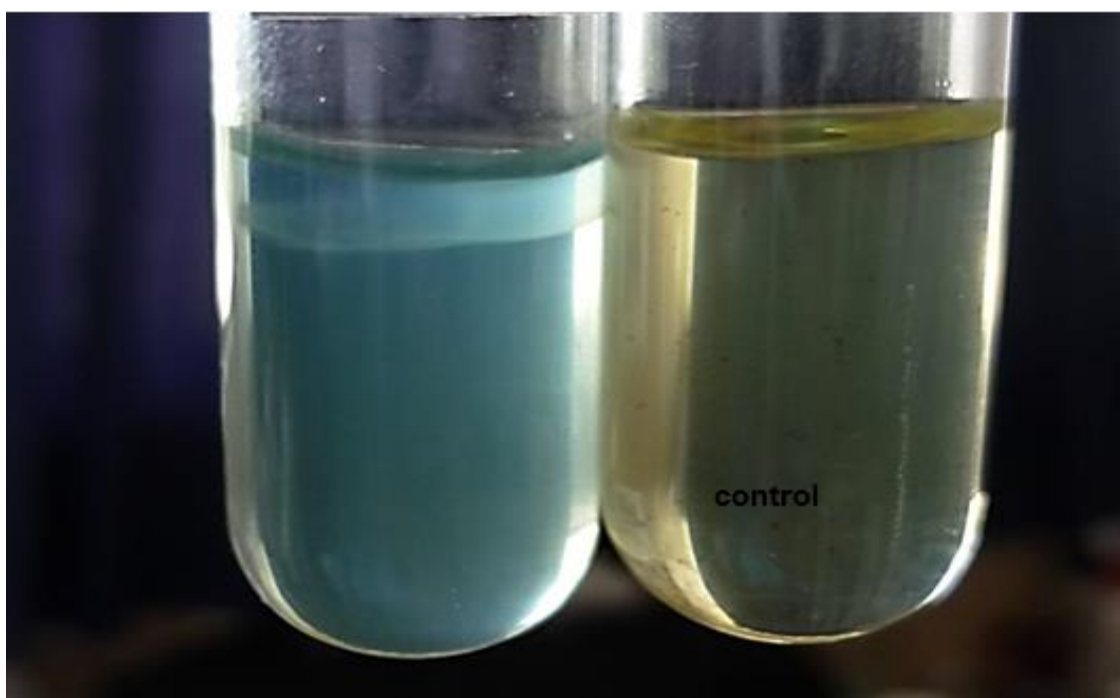
**Figura 12.** Siembra en medio semisólido mediante la técnica de puntura.

Los medios de cultivo semisólidos para bacterias microaerófilas fueron NFb y LGI para *Azospirillum* spp., JNFb para *Herbaspirillum* spp., LGI-P para *Gluconacetobacter* spp y JMV para *Burkholderia* spp. (Garrido, 2007; Jha *et al.*, 2009, Marra *et al.*, 2012). Después de la incubación a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  por 7 días, se seleccionaron los medios donde se observó una película blanquecina bajo la superficie y el viraje del indicador (Figura 13) y se realizaron subcultivos en similares medios por dos veces consecutivas: primer y segundo subcultivo (Figura 14).

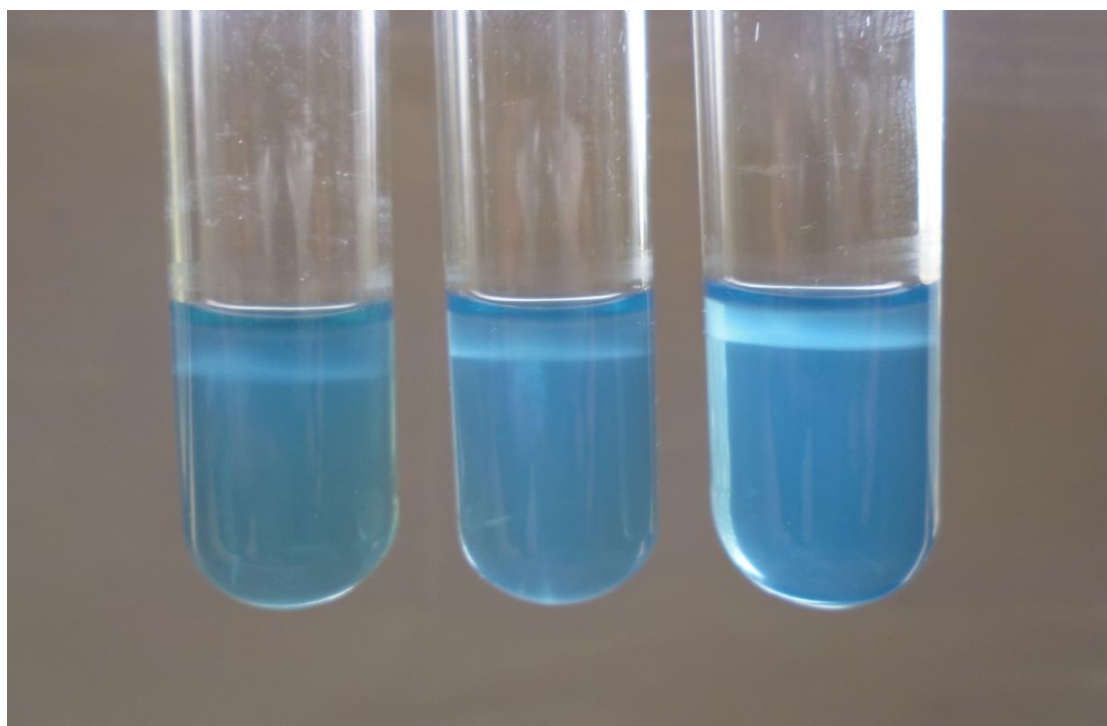
Para el aislamiento de bacterias microaerófilas, con la película bacteriana se obtuvo una suspensión en solución salina esterilizada y se sembró en los medios sólidos respectivos, incubando a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  por 48 horas. Los diversos morfotipos de las bacterias aisladas se cultivaron nuevamente en el medio semisólido (tercer subcultivo) y posteriormente en el medio sólido correspondiente contenido en placa de Petri y luego en vial. Con las colonias de las bacterias aerobias y microaerófilas se realizaron tinciones de Gram y se cultivaron en agar nutritivo y medios sólidos y semisólidos sin nitrógeno, constituyendo los cultivos puros de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno, que se guardaron en refrigeración ( $8^\circ\text{C}$ ).

### **3.2.7 Aislamiento de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno**

Las bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno microaerófilas se aislaron de las raíces desinfectadas superficialmente (Pérez *et al.*, 2010; Altamirano *et al.*, 2014). Las raíces fueron lavadas con agua potable para retirar el suelo adherido (Figura 15). Para la desinfección, se seleccionaron las diez raíces laterales más engrosadas, se cortaron en fragmentos de aproximadamente 5 cm, se pesaron 5 g (Figura 16) y se depositaron en frascos de 500 mL de capacidad, con tapa, previamente esterilizados, para ser lavadas con 50 mL de agua destilada más detergente neutro 0,005% (Figura 17) por 1 minuto y enjuagadas por cuatro veces consecutivas con agua destilada esterilizada a razón de 1 minuto por enjuague (Figura 18).



**Figura 13.** Película blanquecina y viraje del indicador por bacterias microaerófilas fijadoras de nitrógeno en medios semisólidos.



**Figura 14.** Subcultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas en medio semisólidos.



**Figura 15.** Lavado de raíces de *Portulaca oleracea* L. con agua potable.



**Figura 16.** Fragmentos de raíces de *Portulaca oleracea* L.





**Figura 17.** Lavado de raíces de *Portulaca oleracea* L. con detergente neutro.



**Figura 18.** Enjuague de raíces de *Portulaca oleracea* L. con agua destilada esterilizada.

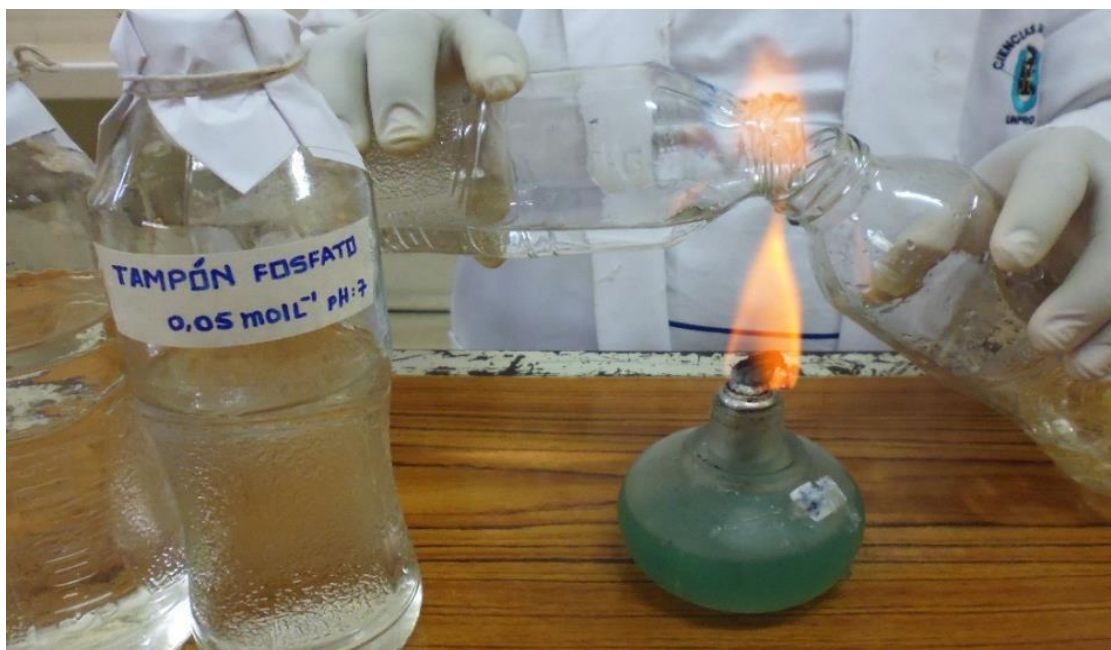


Después de la desinfección, las raíces se agitaron por 15 minutos en solución tampón de fosfato de potasio  $0,05\text{molL}^{-1}$ , pH 7,0 (Figura 19); se sometieron a inmersión por 1 minuto en alcohol 70% (Figura 20) y agitación por 5 minutos en solución de hipoclorito de sodio (NaCl) 5% más Tween 80 (Figura 21). A continuación, el tejido fue llevado a nuevos frascos previamente esterilizados, para la inmersión por 1 minuto en alcohol 70%, seguida de agitación por 15 minutos en solución tampón y finalmente, lavado por cuatro veces con agua destilada esterilizada.

Para verificar la desinfección de la superficie de las raíces (Pérez *et al.*, 2010), alícuotas del último lavado fueron sembradas en agar nutritivo (Figura 22) e incubadas a  $30^{\circ}\text{C}$ , por 48 horas. El tejido vegetal previamente desinfectado fue depositado en papel secante para eliminar el exceso de humedad (Figura 23) y luego fue llevado a bolsas de polietileno de 16x15 cm (Figura 24), donde fue macerado (Figura 25) y resuspendido en  $0,5\text{mL}^{-1}$  de solución salina esterilizada (NaCl 0,87% p/v), en caso de ser necesario. Con una jeringa se extrajo 1 mL, sembrándose inmediatamente una gota por doble puntura en los medios de cultivo semisólidos sin nitrógeno (Figura 26): NFb y LGI para *Azospirillum* spp., JNFb para *Herbaspirillum* spp., LGI-P para *Gluconacetobacter* spp. y JMV para *Burkholderia* spp. (Garrido, 2007; Jha *et al.*, 2009). Después de la inoculación se procedió de manera similar a la explicada en bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas (ítem 3.2.6).

### **3.2.8 Identificación fenotípica de bacterias rizosféricas y endófitas**

La identificación del género de las bacterias rizosféricas y endófitas fijadoras de nitrógeno se realizó en función de las características morfológicas y fisiológicas según el Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática (Brenner *et al.* 2005), Schoebitz, (2006) y Garrido, (2007). Con todas las bacterias se realizaron pruebas de catalasa, oxidasa y motilidad. Para bacterias aerobias del género *Azotobacter*, las pruebas fueron reducción de nitratos y acidificación de glucosa, sacarosa, maltosa y fructuosa. Para los géneros *Derxia* y *Beijerinckia*, las pruebas fueron producción de indol, utilización del citrato como fuente de carbono, crecimiento en 1% de peptona y acidificación de glucosa, sacarosa y manitol.



**Figura 19.** Lavado de raíces de *Portulaca oleracea* L. en solución tampón fosfato de potasio.



**Figura 20.** Inmersión de fragmentos de raíces de *Portulaca oleracea* L. en alcohol.



**Figura 21.** Inmersión de fragmentos de raíces de *Portulaca oleracea* L. en solución de hipoclorito de sodio – Tween 80.



**Figura 22.** Siembra del agua de enjuague en agar nutritivo para verificar la desinfección.





**Figura 23.** Fragmentos de raíces de *Portulaca oleracea* L. en papel secante esterilizado.



**Figura 24.** Fragmentos de raíces de *Portulaca oleracea* L. desinfectados.



**Figura 25.** Separación del macerado de *Portulaca oleracea* L.



**Figura 26.** Siembra del macerado de raíces de *Portulaca oleracea* L. en medio semisólido sin nitrógeno para el aislamiento de bacterias endófitas.

Para la identificación de los géneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* y *Burkholderia* se investigó la utilización de glucosa, manitol y sacarosa como fuentes de carbono para la fijación de nitrógeno. Adicionalmente para *Azospirillum* se realizaron pruebas de hidrólisis de urea, gelatina y reducción de nitratos; para *Herbaspirillum* pruebas de hidrólisis de urea y crecimiento de caldo NFb; para *Gluconacetobacter* pruebas de hidrólisis de urea, gelatina, almidón y reducción de nitratos y para *Burkholderia* pruebas de hidrólisis de gelatina, descarboxilación de lisina y resistencia a la Polimixina B (Altamirano *et al.*, 2014).

### **3.2.9 Mantenimiento de cultivos de bacterias**

Los cultivos puros de bacterias fijadoras de nitrógeno rizosféricas y endófitas identificados se sembraron en el medio sólido y semisólido sin nitrógeno correspondiente y en agar nutritivo (Figura 27) y se mantuvieron a temperatura ambiente (28°C) y refrigeración (8°C), respectivamente, realizándose subcultivos cada 30 días.

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

Con las bacterias rizosféricas y endófitas aisladas e identificadas se cuantificó el amonio, producto de la fijación de nitrógeno y el fósforo soluble producto de la solubilización de fosfatos y los indoles producidos. Para la obtención del inóculo, cada bacteria se cultivó en 5mL de caldo nutritivo a 30°C, durante 24 horas (Córdova, 2016). Posteriormente, el caldo se centrifugó (3500 rpm) durante 5 minutos, el sobrenadante se eliminó, el sedimento se lavó en solución salina esterilizada (NaCl 0,87% p/v) y su concentración se estandarizó por turbidimetría a  $9 \times 10^8$  cel mL<sup>-1</sup> (tubo 3 del nefelómetro de Mc Farland).





**Figura 27.** Cultivos puros de bacterias fijadoras de nitrógeno en agar nutritivo .

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

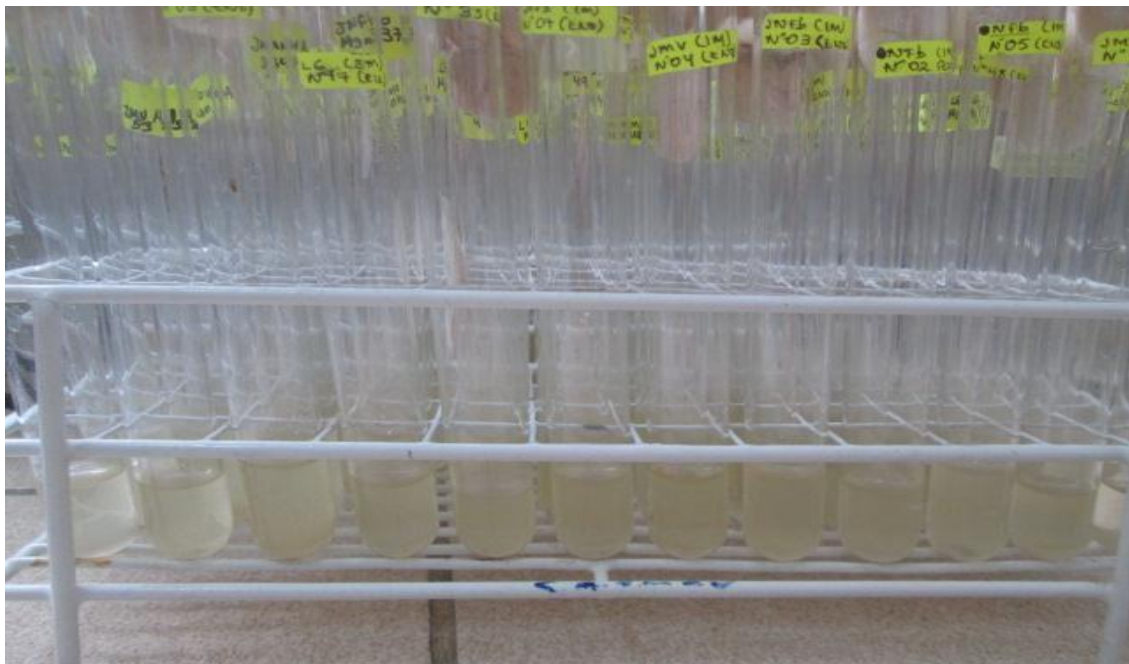
La cuantificación del amonio producto de la fijación de nitrógeno *in vitro* por las bacterias investigadas se realizó con el método colorimétrico de Berthelot o fenol hipoclorito (Lara *et al.*, 2007; Cadena & Martínez., 2011). El inóculo (5%: 0,15mL) de cada cultivo bacteriano se sembró por triplicado en tubos de 15x150 mL conteniendo 3mL de caldo extracto de suelo 10% (Figura 28, anexo 3) y se incubaron a 30°C, por 72 horas, con agitación constante (150 rpm). A continuación, se agregaron 9 mL de KCl 2M, (Figura 29) se agitaron a 150 rpm durante 1 hora y se dejaron en reposo por 1 hora adicional, para después tomar 10 mL de sobrenadante y centrifugarlos (3000 rpm) durante 5 minutos.

Los sobrenadantes se vertieron en tubos de dilución y se añadieron 0,4 mL de solución alcohólica de fenol al 10% (Figura 30); 0,4 mL de nitroprusiato de sodio al 0,5% y 1 mL de solución oxidante. Los tubos se agitaron manualmente por 2 minutos y se dejaron en reposo durante 1 hora adicional. La reacción se consideró positiva a la fijación de nitrógeno por la aparición de una coloración azul, leyéndose la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible a 632,9 nm. 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 3).

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

La cuantificación del fósforo producto de la solubilización de fosfato *in vitro* por las bacterias investigadas se realizó con el método colorimétrico de molibdato (Alvarado & Valderrama, 2014). El inóculo (5%: 0,25mL) de cada cultivo bacteriano se sembró por triplicado en 5mL de caldo National Botanical Reserch Institute's phosphate NBRIP (Figura 31, anexo 4) y se incubaron a 30°C, con agitación constante (150rpm), por 96 horas. Después, los caldos se centrifugaron (3000 rpm) durante 5 minutos y en el sobrenadante se cuantificó el fósforo soluble, considerándose una coloración azul positiva a la solubilizacion del fosfato. La absorbancia se leyó en espectrofotómetro de luz visible a 690nm y las concentraciones de fósforo soluble se calcularon con la ecuación de la curva de calibración obtenida previamente con diluciones sucesivas de una solución de 2ppm de fósforo (Anexo 4).





**Figura 28.** Caldo extracto de suelo cultivado con bacterias rizosféricas y endófitas.



**Figura 29.** Caldo extracto de suelo con cloruro de potasio.



**Figura 30.** Adición de solución alcohólica de fenol al caldo extracto de suelo.



**Figura 31.** Caldo National Botanical Research Institute's phosphate cultivado con bacterias rizosféricas y endófitas.

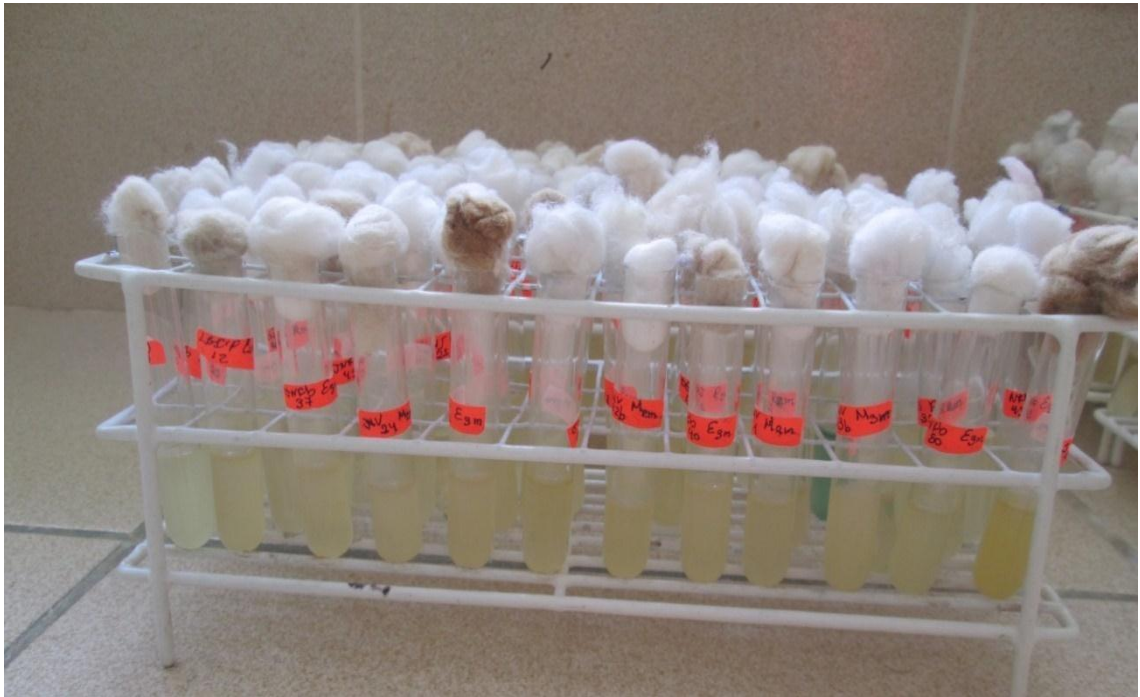
### **c. Cuantificación de indoles producidos *in vitro***

La cuantificación de indoles producidos *in vitro* se realizó según la reacción colorimétrica de Salkowski (Mantilla, 2007; García & Muñoz, 2010). El inóculo (5% : 0,25 mL) de cada cultivo bacteriano fue sembrado por triplicado en 5mL de caldo tripticasa soya suplementado con triptófano (Anexo 5). Después de la incubación a 30°C, por 72 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 1,6 mL del reactivo de Salkowski modificado, se mezclaron y se dejaron 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 espectrofotómetro de luz visible a 530nm. Las concentraciones de indoles se calcularon con la ecuación de curva de calibración obtenida previamente con diluciones sucesivas de una solución de 100ppm de ácido indolacético.

#### **3.2.11 Tolerancia de las bacterias al cloruro de sodio**

Las bacterias rizosféricas y endófitas fueron cultivadas en caldo nutritivo (Figura 33) con 5% NaCl (p/v), a 30°C, durante 24 horas. El crecimiento bacteriano fue denotado por turbidez o película superficial, procediéndose inmediatamente al cultivo en caldo nutritivo con 10% NaCl (p/v), considerándose las bacterias tolerantes por el crecimiento observado. Este criterio junto a los mayores valores en la concentración de amonio, fósforo soluble e indoles fueron considerados para la selección de las bacterias rizosféricas: ocho aerobias y ocho microaerófilas, así como también ocho endófitas.





**Figura 32.** Caldo tripticasa soya suplementado con triptófano cultivado con bacterias rizosféricas y endófitas.



**Figura 33.** Caldo nutritivo cultivado con bacterias rizosféricas y endófitas.

### 3.2.12 Efecto de bacterias en el desarrollo vegetativo de tomate

Las 24 cultivos de bacterias rizosféricas y endófitas seleccionadas se inocularon en semillas de tomate, determinándose la altura y biomasa aérea y radicular después de 60 días, en condiciones de invernadero. El suelo experimental estuvo constituido por 28,5 kg de una mezcla de suelo de la masa radicular de verdolaga, arena de río y humus en una proporción 1:1:2, (CE: 8,1dSm<sup>-1</sup>) que fueron distribuidos en 75 vasos de tecnopor de 0,5L de capacidad, a razón de 0,49kg por vaso, totalizando 36,7kg.

El cultivo de tomate y la inoculación de las bacterias se realizó entre el 27 de julio al 25 de setiembre de 2016, registrándose las temperaturas máxima (26°C), mínima (18°C) y media (22°C), valores obtenidos por la Estación Meteorológica de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, ubicada en el fundo “El Ciénago” de Lambayeque.

En el ensayo se sembraron semillas de tomate cultivar Rio Grande, comercializadas luego de ser tratadas con el fungicida Tiofanate metil Tiram (Homai WP), en la dosis de 2 g kg<sup>-1</sup> de semilla. Las plantas son de maduración media a tardía, con crecimiento determinado y buen follaje, un tamaño de fruto de aproximadamente 4 cm y un peso máximo de 140g (Ríos & Zúñiga, 2012).

El porcentaje de germinación de las semillas de tomate se determinó en cinco placas de Petri, en cuyo fondo se colocó papel filtro, humedecido con agua destilada esterilizada y con ayuda de pinzas esterilizadas se depositaron 20 semillas de tomate por placa (Figura 34). Las placas de Petri se taparon y se mantuvieron a una temperatura de 30°C, humedeciéndolas diariamente hasta observar el máximo de germinación que fue 98% después de 5 días.

El inóculo fue obtenido con bacterias cultivadas en caldo nutritivo, a 30°C, durante 24 horas y después de la centrifugación se obtuvieron 2mL de una suspensión de células de cada cultivo bacteriano seleccionado (Figura 35), cuya concentración se estandarizó a 9x10<sup>8</sup> cel mL<sup>-1</sup> por turbidimetría (tubo 3 del nefelómetro de Mc Farland).



**Figura 34.** Prueba de germinación de semillas de *Lycopersicon esculentum* Mill.



**Figura 35.** Inóculo de bacterias rizosféricas y endófitas.

En 25 bolsas de polietileno transparentes de 2,5x8,0 cm se depositaron 12 semillas de tomate por bolsa. En 24 bolsas se inoculó 0,1 mL de la suspensión bacteriana (Figura 36), correspondiente por bolsa, equivalente a 35 mL Kg<sup>-1</sup> de semilla y en una bolsa se aplicó agua destilada (testigo). El contenido de las bolsas fue homogenizado para que las bacterias se distribuyan uniformemente en las semillas y después las bolsas se llevaron hacia la estufa a 30°C, durante 30 minutos para disminuir el exceso de humedad (Figura 37). A continuación, las semillas se sembraron en el suelo experimental, a razón de tres semillas por vaso y se realizaron los riegos correspondientes, con agua de clorada, según los requerimientos de las plantas (Figura 38).

Después de 8 días de la siembra, se eliminó la plántula menos vigorosa en cada vaso, quedando dos por tratamiento. A los 30, 45 y 60 días se midió la altura de las plantas y a los 60 se determinó el peso de la biomasa seca de la parte aérea y radicular. La altura se expresó en cm, considerando desde la base del tallo hasta la yema terminal de la hoja. A continuación, se cortó la parte aérea de cada una de las plantas, a ras del suelo y junto con la raíz y suelo adherido se depositaron en bandejas de plástico. Para determinar el peso de la materia seca, tanto la raíz previamente lavada como la biomasa aérea se deshidrataron en el horno a 70°C hasta alcanzar peso constante (Puicón, 2014). El peso de la biomasa se determinó en una balanza de precisión y con los valores obtenidos, se calculó el índice de efectividad de la inoculación (IEI) en porcentaje, mediante la fórmula: (Carreño, 2009) siguiente:

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





**Figura 36.** Inoculación de bacterias rizosféricas en semillas de *Lycopersicon esculentum* Mill.



**Figura 37.** Semillas de *Lycopersicon esculentum* Mill. inoculadas con bacterias rizosféricas y endófitas.





**Figura 38.** Suelo experimental en vasos de tecnopor.

### 3.2.13 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,  $J$ -ésima repetición

$u$  = media general de la variable respuesta

$t_i$  = efecto  $i$ -ésimo tratamiento, siendo  $i = 1, 2, 3, 4, 5, \dots, 25$

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

$H_0 = u_1 = u_2 = u_3 = u_4 = u_5 \dots = u_{25}$

$H_a$  = Al menos una media diferente

Los valores de altura y biomasa aérea y radicular de las plantas de tomate fueron ordenadas en tablas y se les realizó las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza. El análisis de varianza determinó las diferencias entre tratamientos y la prueba múltiple de Tukey, la superioridad entre ellos, utilizándose el software estadístico SPSS versión 15.0, así como los programas Microsoft Office Word, Excel versión 2007 y Minitab 15

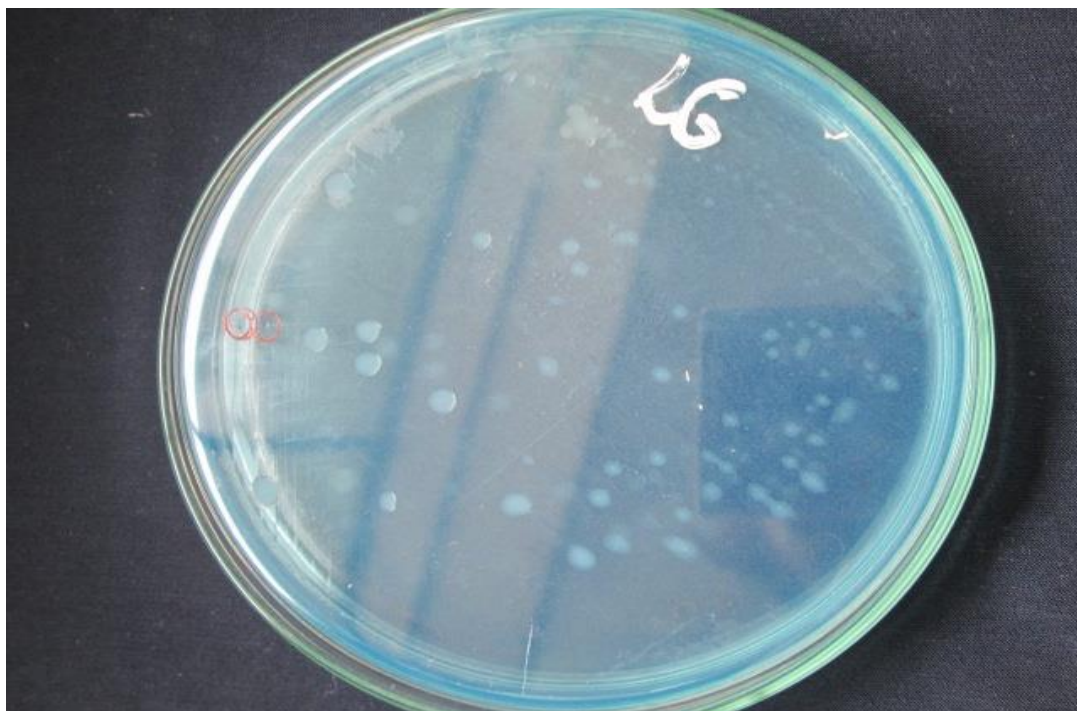
## IV. RESULTADOS

### 4.2 Bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aisladas de *Portulaca oleracea* L.

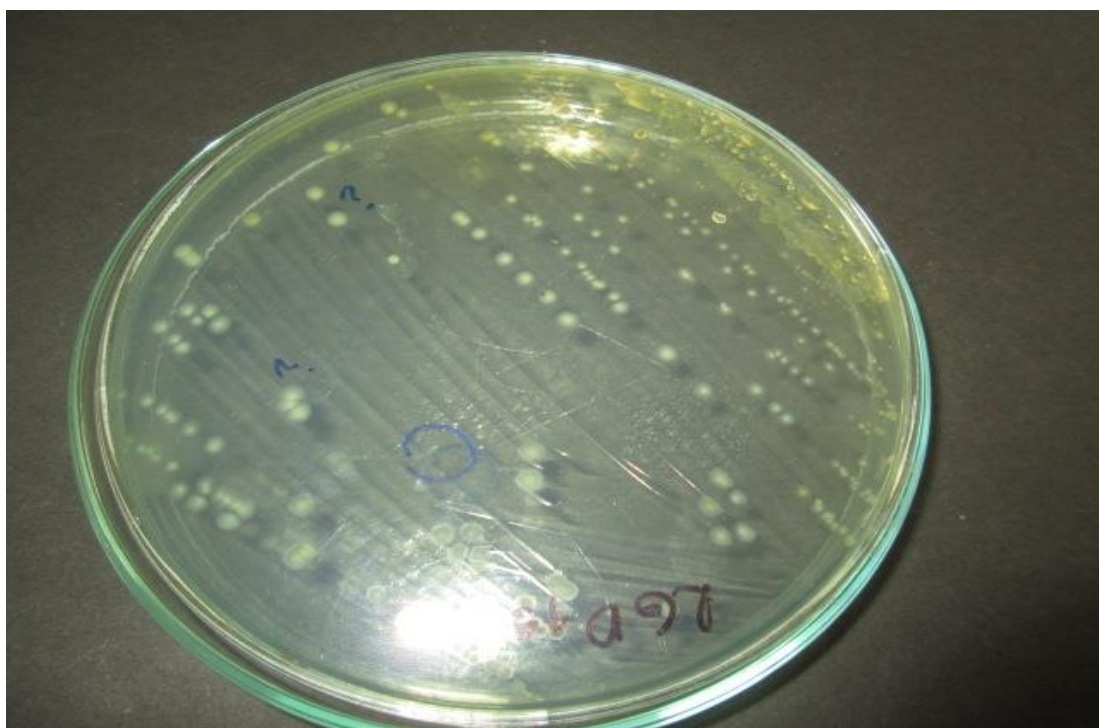
En tres medios de cultivo sólidos sin nitrógeno se aislaron bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias, cuya presencia se evidenció por las colonias desarrolladas (Figuras 39, 40, 41) y el viraje del indicador al amarillo. En el medio LGD, con un color inicial amarillo-verdoso se observó viraje del indicador al celeste-verdoso. Los medios LG, con un color celeste y *Beijerinckia* crema-opaco mantuvieron su color inicial.

La frecuencia de muestras de raíces con suelo rizosférico de verdolaga con bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias fue 62,9%(34) en LG; 33,3%(18) en el medio *Beijerinckia* y 14,8%(8) en LGD (Figura 42). En el aislamiento se obtuvieron 73 cultivos puros de bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias (Figura 43), cuya procedencia correspondió al 47,9%(35) en LG; 32,8%(24) en medio *Beijerickia* y 19,17%(14) en LGD (Figura 44).

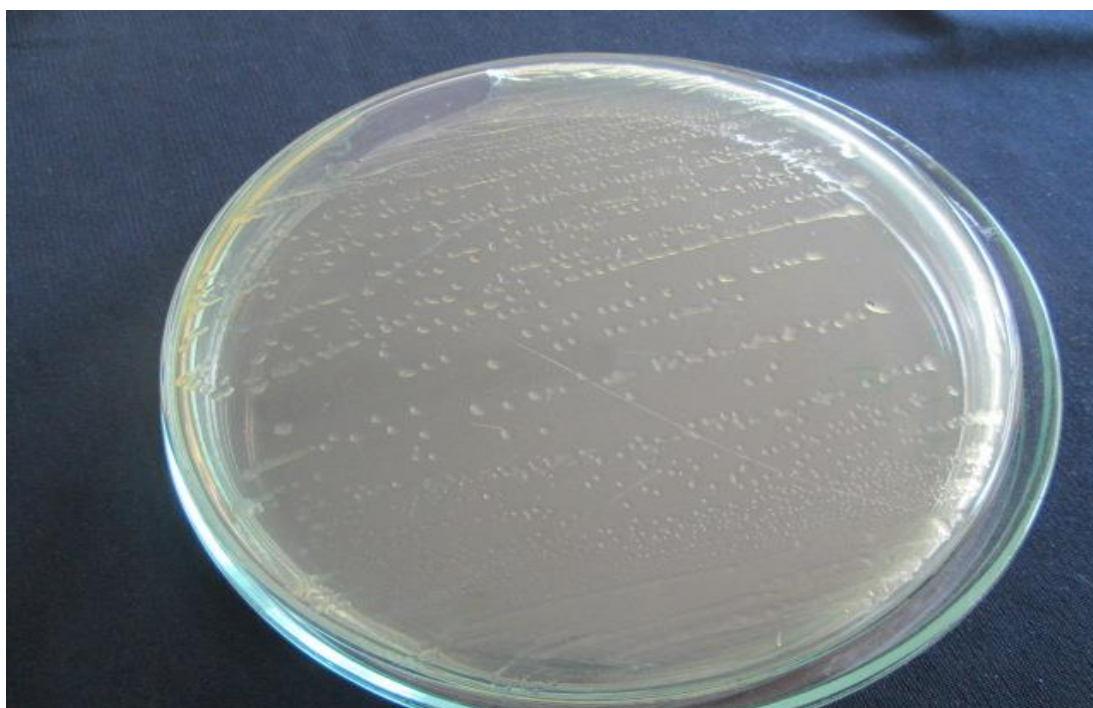
En cinco medios de cultivo semisólido se aislaron bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas, cuya presencia se evidenció por una película blanquecina formada bajo la superficie del medio y el viraje del indicador (Figura 45). En el medio NFb, con un color inicial celeste-verdoso, se observó viraje del indicador al celeste-azulado (Figura 46). La frecuencia de muestras de raíces con suelo rizosférico de verdolaga positivas para bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas fue 55,5% después de la siembra, así como 50; 42,5 y 29,6% después de tres subcultivos respectivamente (Figura 47).



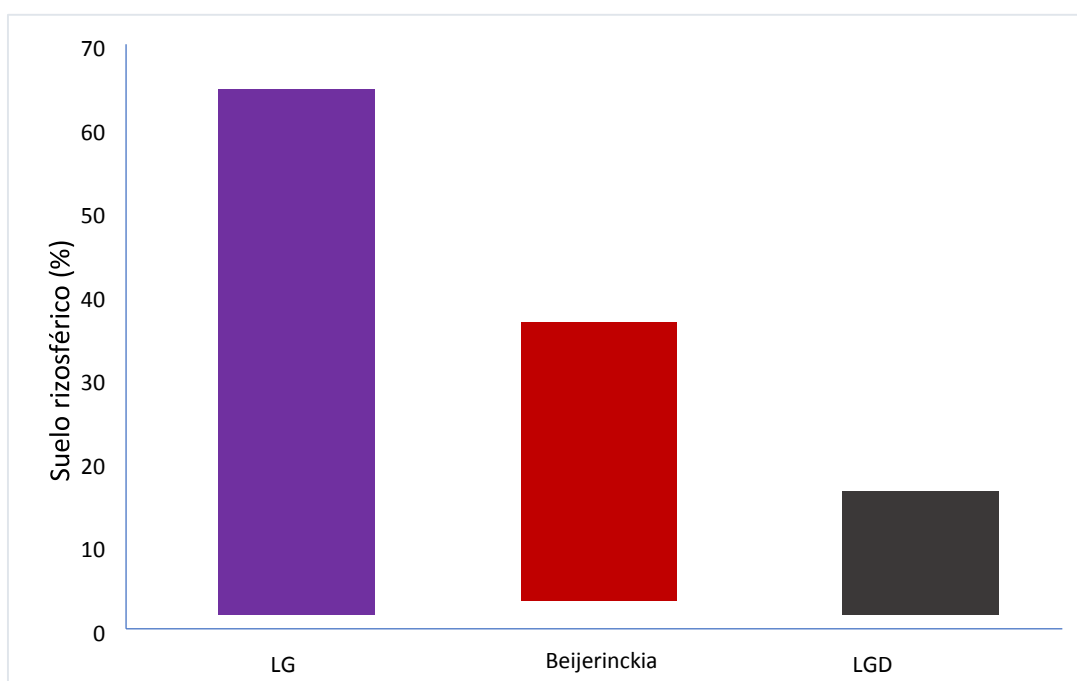
**Figura 39.** Colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias en medio LG.



**Figura 40.** Colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias en medio LGD.



**Figura 41.** Colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias desarrolladas en medio Beijerinckia.

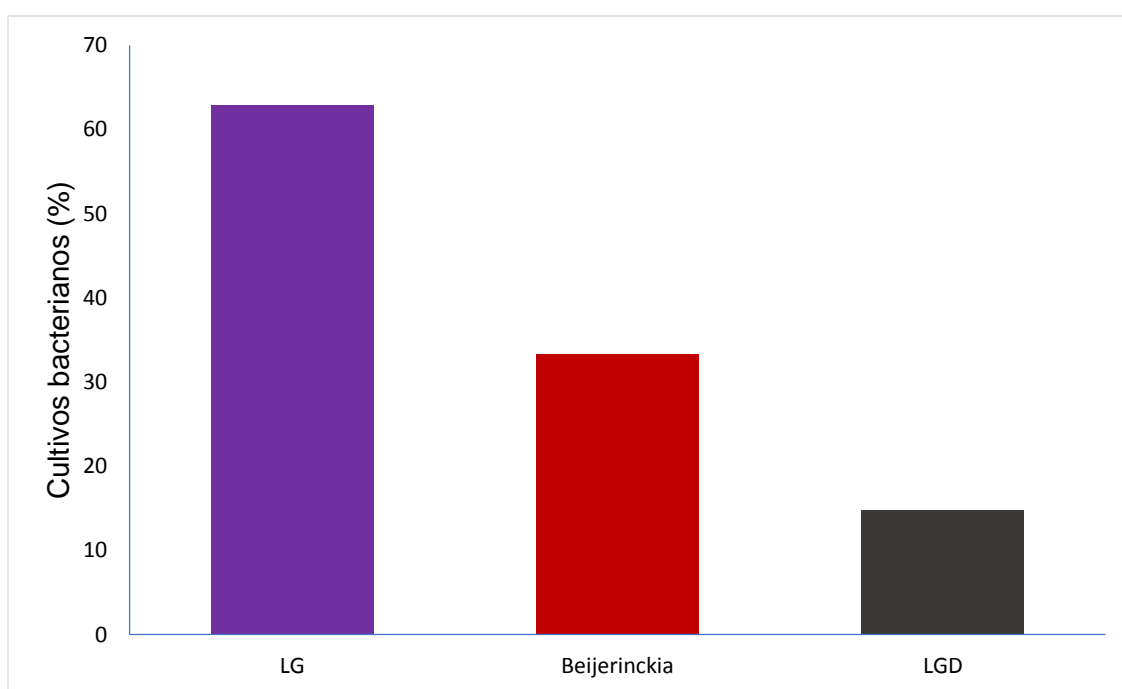


**Figura 42.** Frecuencia de raíces con suelo rizosférico de *Portulaca oleracea* L. con bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias aisladas en tres medios semisólidos.

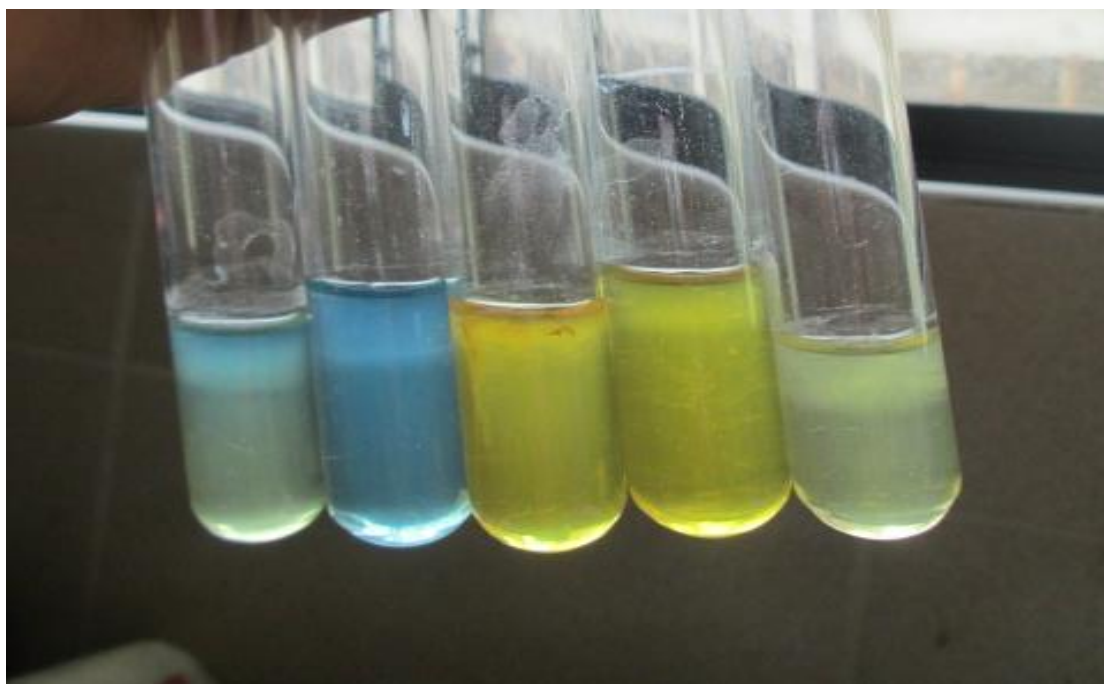




**Figura 43.** Cultivos puros de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aerobias.



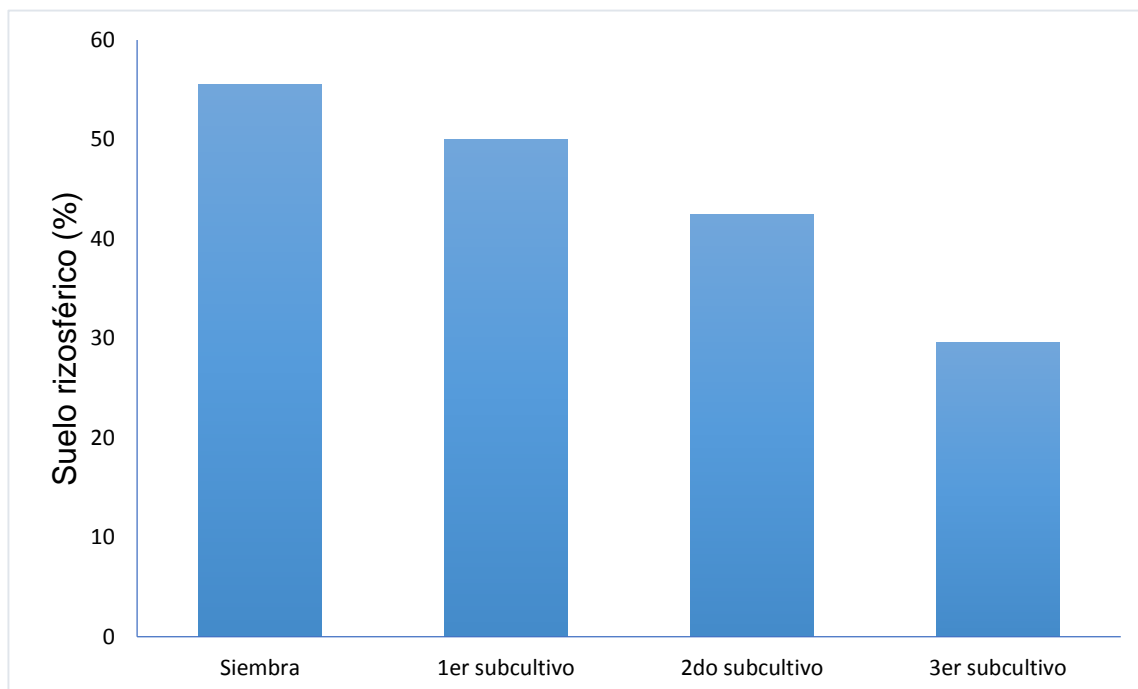
**Figura 44.** Porcentaje de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aerobias aisladas en tres medios sólidos.



**Figura 45.** Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno en cinco medios semisólidos NFb, JNFb, LGI-P, LGI y JMV.



**Figura 46.** Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas en medio NFb.



**Figura 47.** Frecuencia de raíces con suelo rizosférico de *Portulaca oleracea* L. con bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas observadas en NFb después de la siembra y tres subcultivos, 2016.



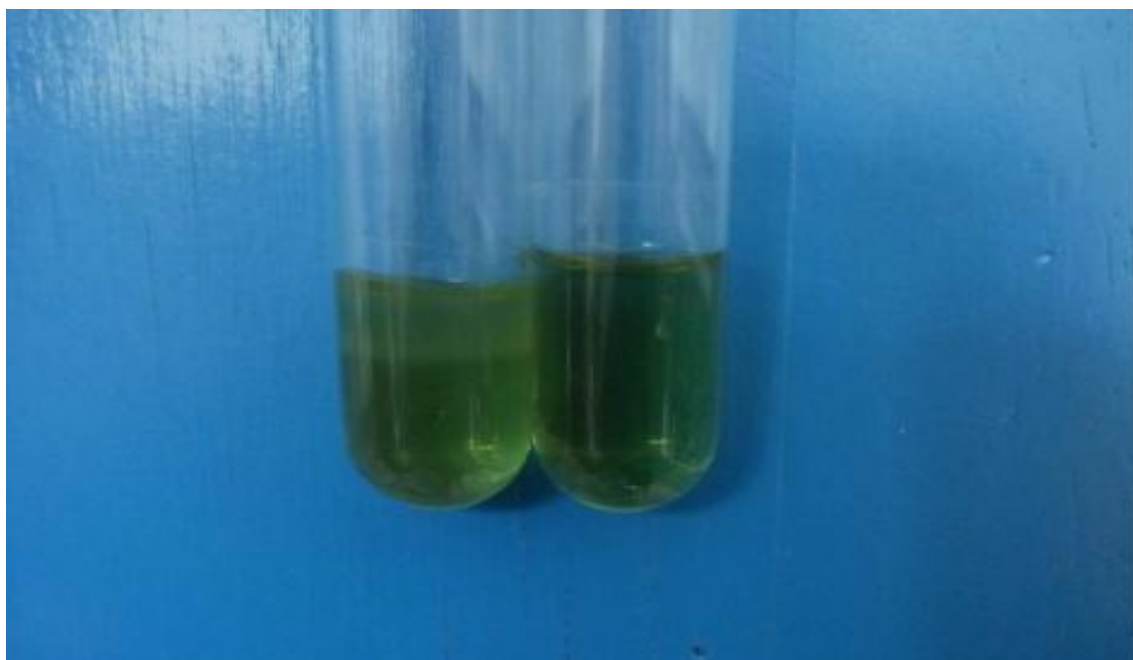
En el medio LGI, con un color inicial verde, se observó viraje del indicador al verde azulado (Figura 48). La frecuencia de muestras de suelo rizosférico de verdolaga positivas para bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas fue 64,8% después de la siembra, así como 51,5; 46,2 y 38,5 % después de tres subcultivos, respectivamente (Figura 49).

En el medio LGI-P, con un color inicial verde-amarillento, se observó viraje del indicador al amarillo y verde (Figura 50). La frecuencia de muestras de suelo rizosférico de verdolaga positivas para bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas fue 64,8% después de la siembra, así como 59,2; 37,0 y 16,6 % después de tres subcultivos, respectivamente (Figura 51).

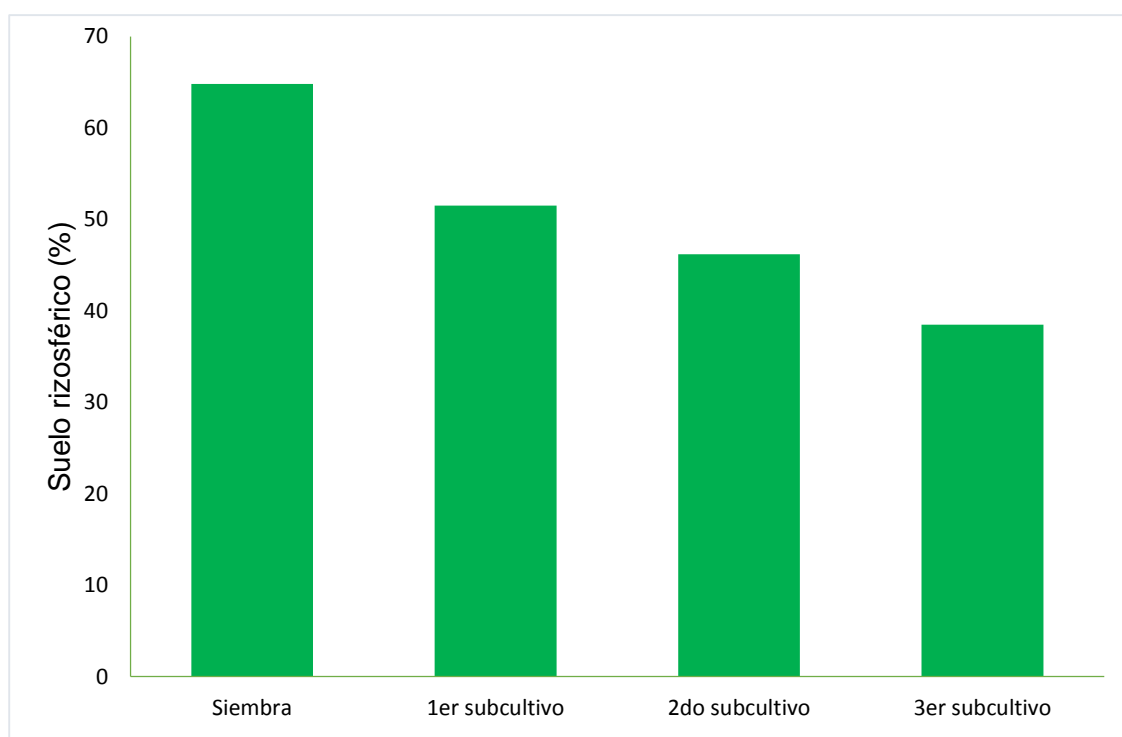
En el medio JNFb, con un color inicial amarillo, se observó viraje del indicador al celeste-azulado (Figura 52). La frecuencia de muestras de suelo rizosférico de verdolaga positivas para bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas fue 74% después de la siembra, así como 68,5; 59,2 y 48,1% después de tres subcultivos, respectivamente (Figura 53).

En el medio JMV, con un color inicial amarillo opaco, no se observó viraje del indicador (Figura 54). La frecuencia de muestras de suelo rizosférico de verdolaga positivas para bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas fue 72,2% después de la siembra, así como 72,2; 55,5 y 27,7 % después de tres subcultivos, respectivamente (Figura 55).

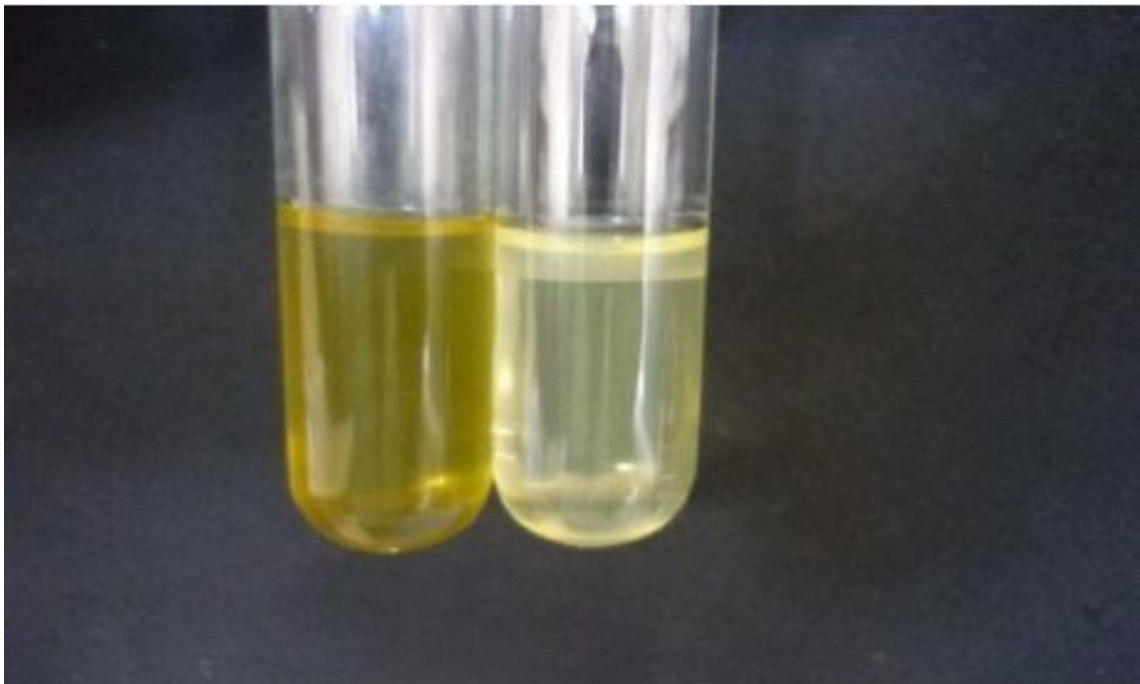
La frecuencia de muestras de raíces con suelo rizosférico de verdolaga con bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas después de tres subcultivos fue 48,1 %(26) en JNFb; 38,8 %(21) en LGI; 29,6 %(16) en NFB; 27,7%(15) en JMV así como 16,6 %(9) en LGI-P; (Figura 56). En el aislamiento se obtuvieron 91 cultivos puros de bacterias fijadoras de nitrógeno, cuya procedencia correspondió al 29,6%(27) en JNFb, 24,1%(22) en LGI, 18,6%(17) en JMV, 17,5%(16) en NFB y 9,8%(9) en LGI-P (Figura 57).



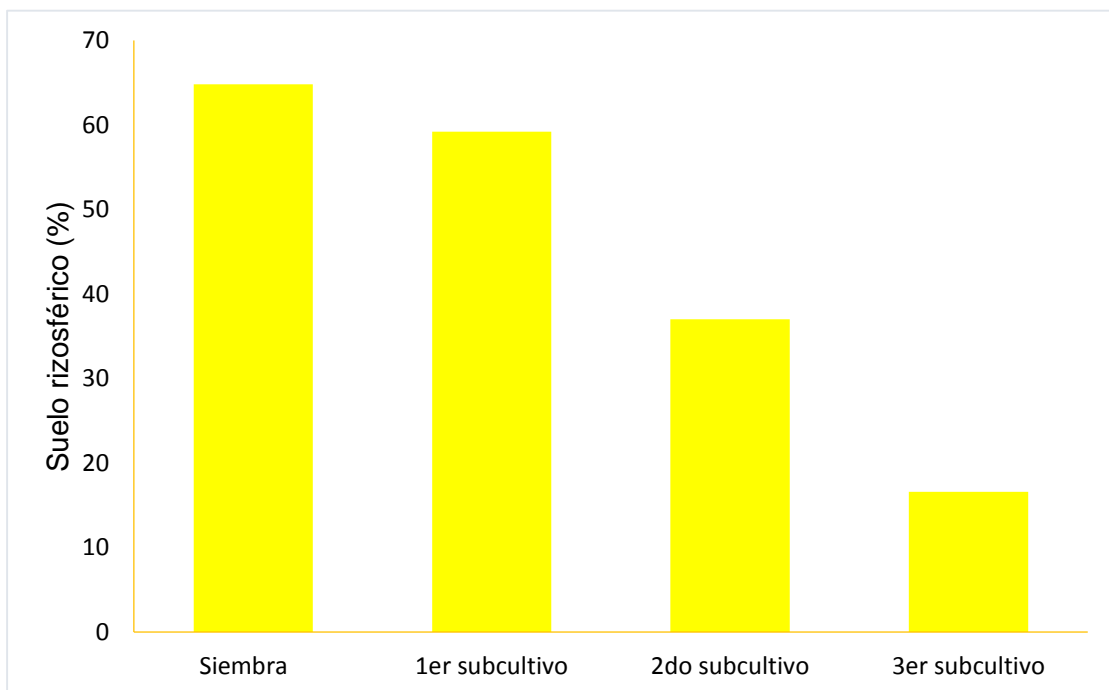
**Figura 48.** Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas en medio LGI.



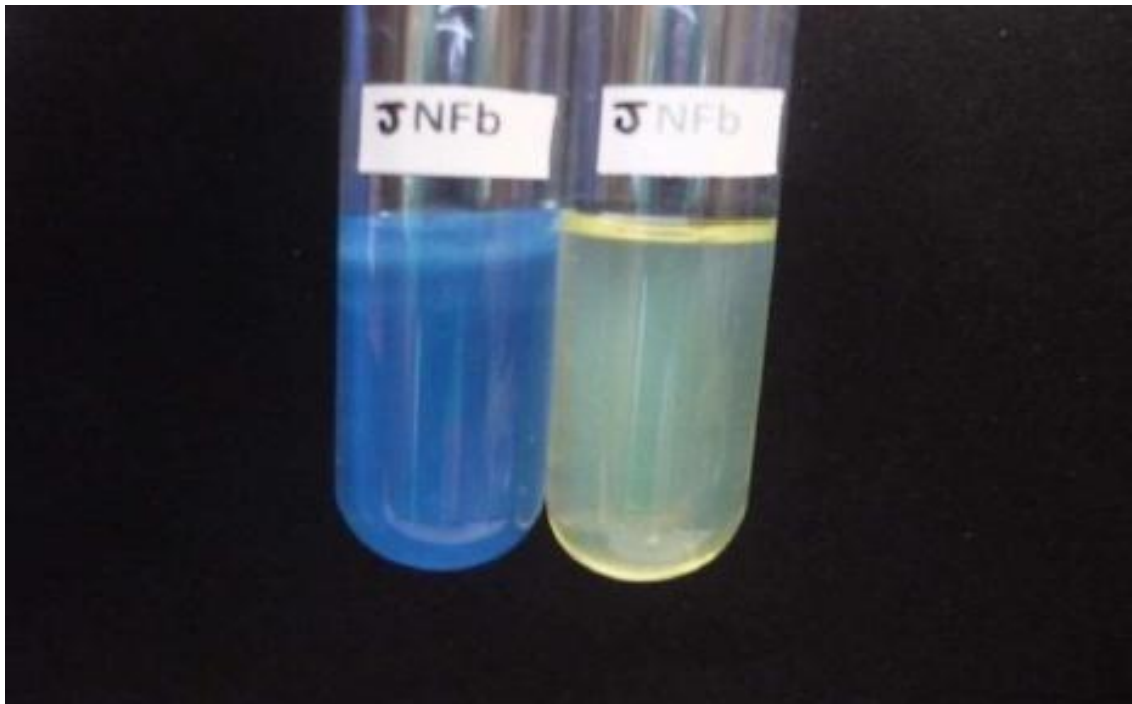
**Figura 49.** Frecuencia de raíces con suelo rizosférico de *Portulaca oleracea* L. con bacteria fijadoras de nitrógeno microaerófilas observadas en LGI después de la siembra y tres subcultivos, 2016.



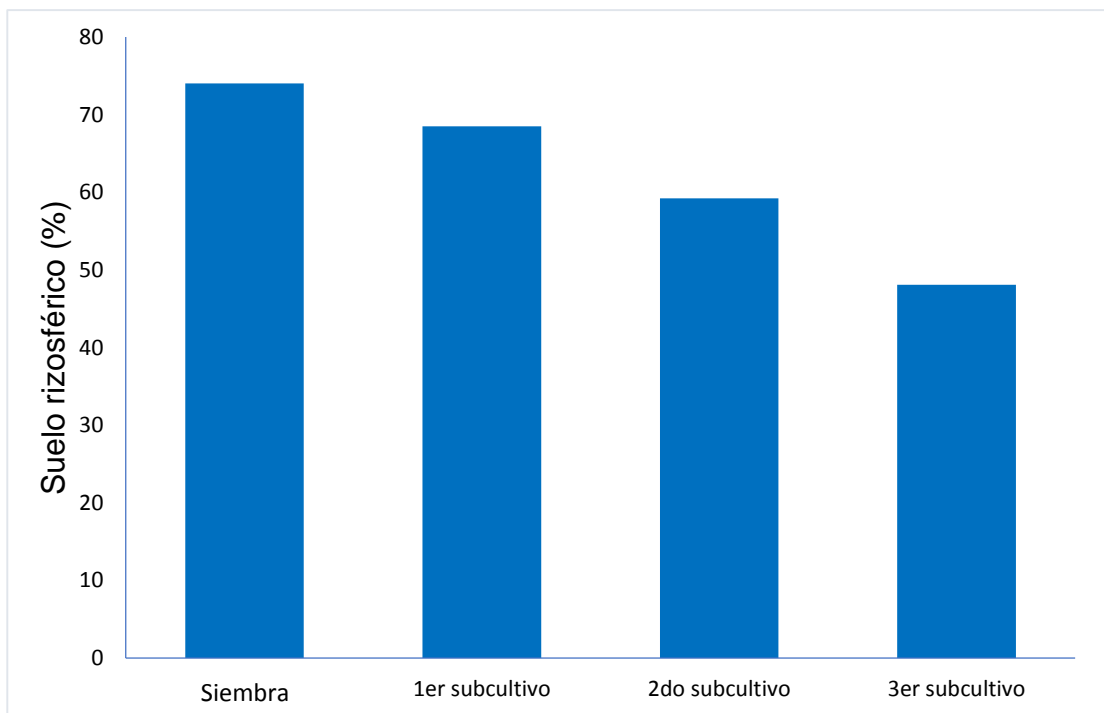
**Figura 50.** Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas en medio LGI-P.



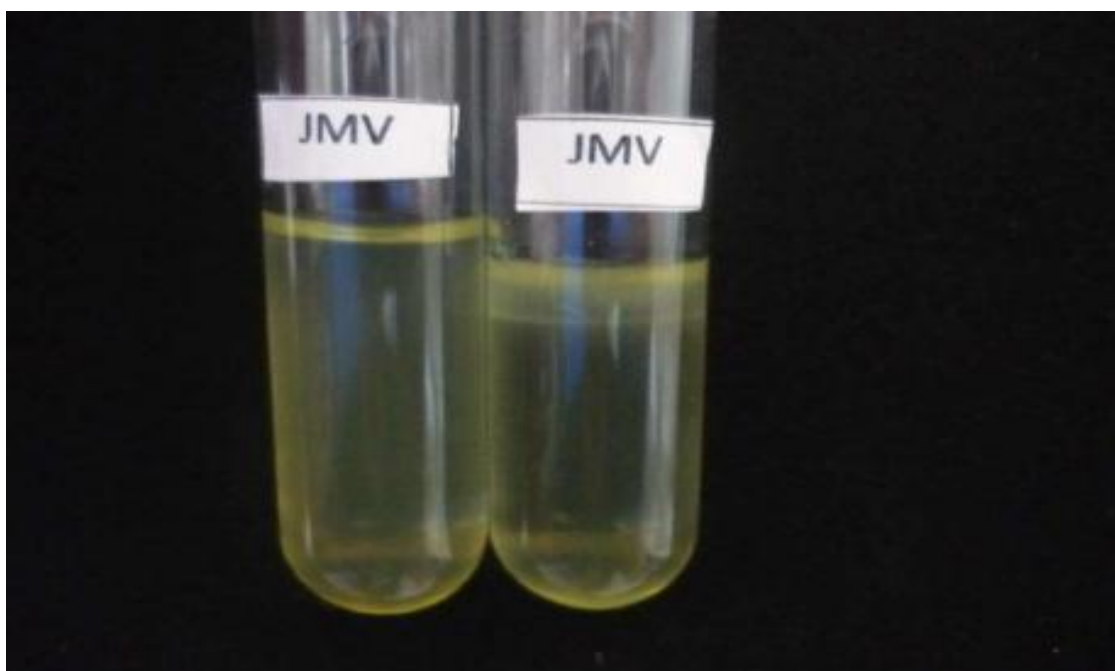
**Figura 51.** Frecuencia de raíces con suelo rizosférico de *Portulaca oleracea* L. con bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas observadas en LGI-P después de la siembra y tres subcultivos, 2016



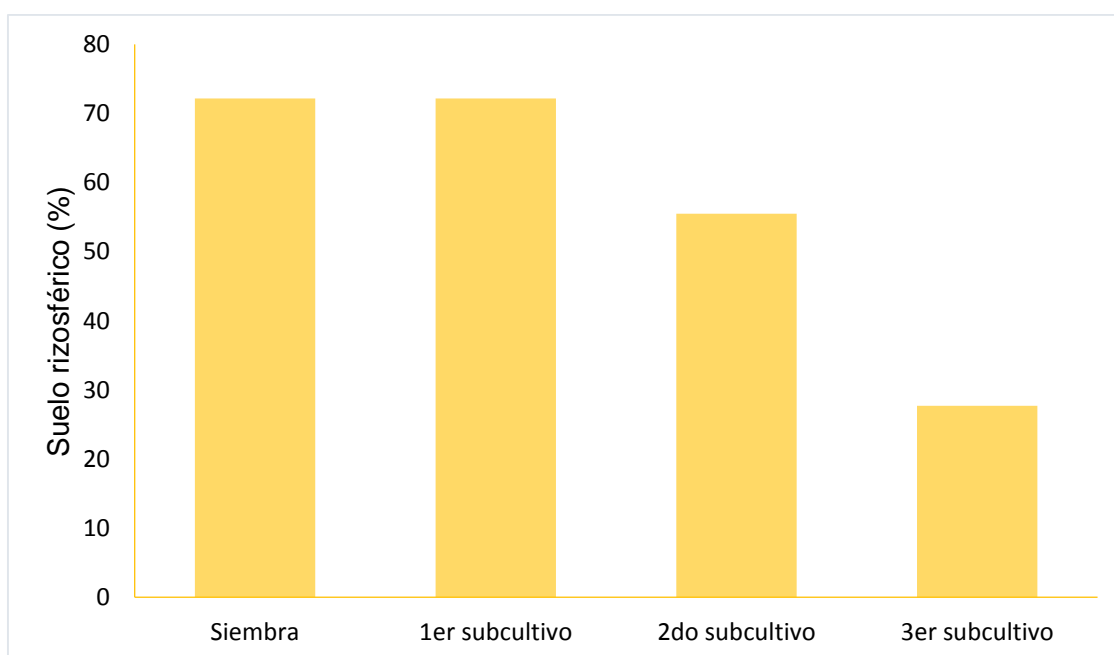
**Figura 52.** Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas en medio JNFb.



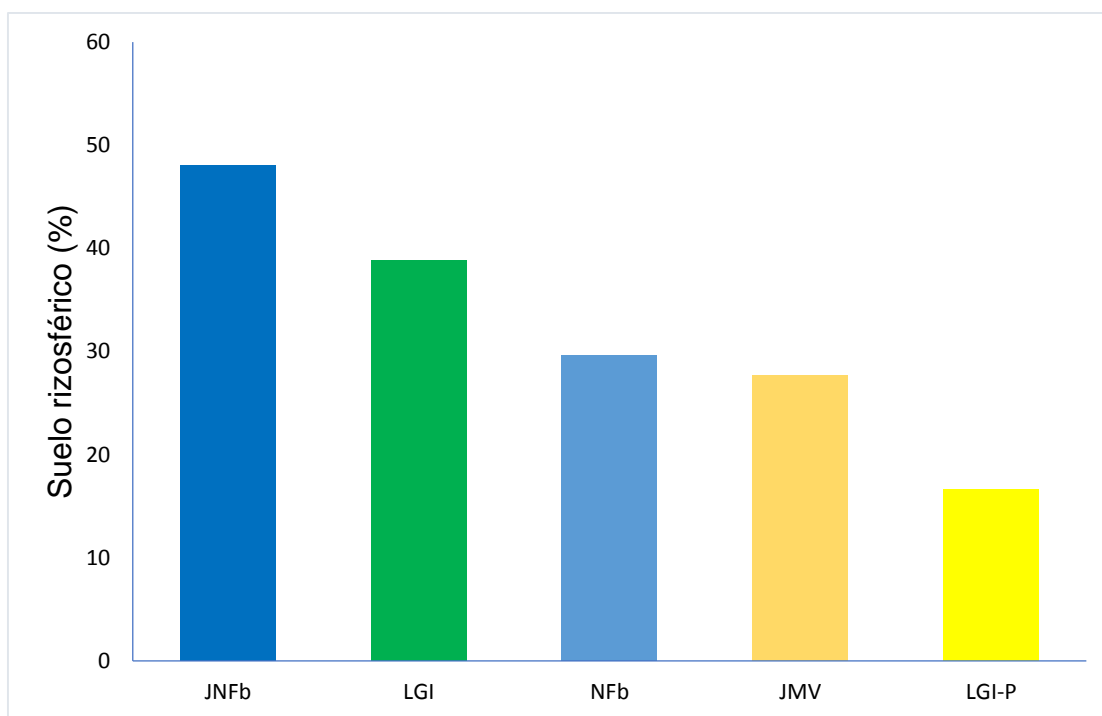
**Figura 53.** Frecuencia de raíces con suelo rizosférico de *Portulaca oleracea* L. con bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas observadas en JNFb después de la siembra y tres subcultivos, 2016



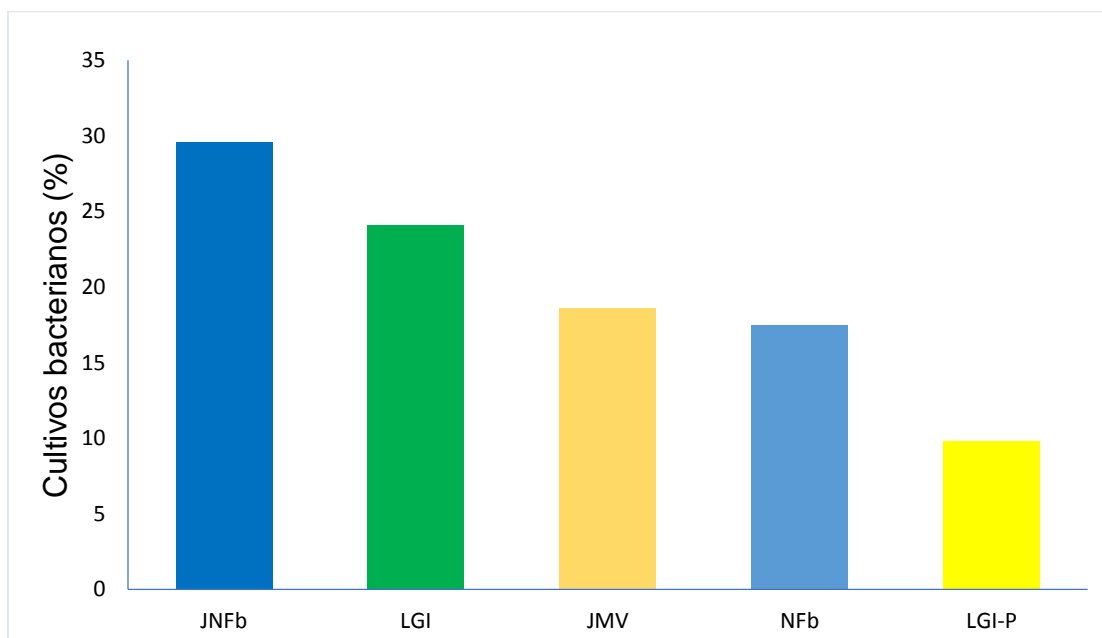
**Figura 54.** Película subsuperficial formada por bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas en medio JMV.



**Figura 55.** Frecuencia de raíces con suelo rizosférico de *Portulaca oleracea* L. con bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas observadas en JMV después de la siembra y tres subcultivos, 2016.



**Figura 56.** Frecuencia de suelo rizosférico de *Portulaca oleracea* L. con bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas aisladas en cinco medios semisólidos después de tres subcultivos.



**Figura 57.** Porcentaje de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas aisladas en cinco medios semisólidos.

#### **4.7 Bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno aisladas de raíces de *Portulaca oleracea* L.**

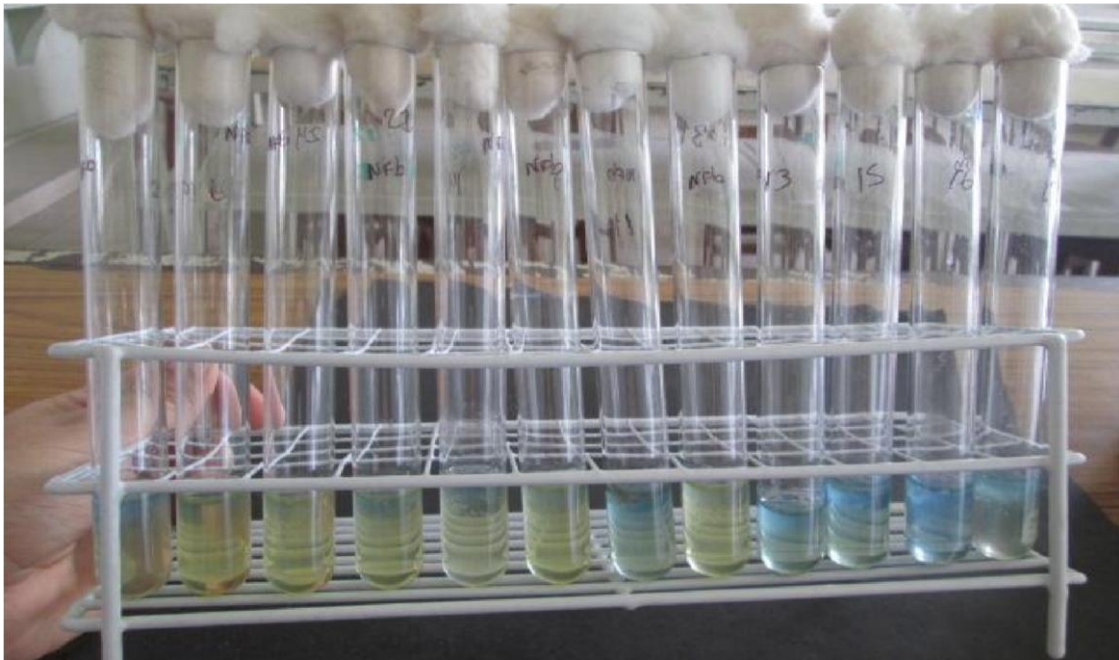
En cinco medios de cultivo semisólidos sin nitrógeno se aislaron bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno microaerófilas, cuya presencia se evidenció por una película blanquecina formada bajo la superficie del medio y el viraje del indicador. En el medio NFb, con un color inicial celeste-verdoso, se observó viraje del indicador al celeste-azulado (Figura 58). La frecuencia de muestras de raíces de verdolaga positivas para bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno microaerófilas fue 98,1% después de la siembra, así como 87,0; 75,9 y 44,1% después de tres subcultivos, respectivamente (Figura 59).

En el medio LGI, con un color inicial verde, se observó viraje del indicador al verde azulado (Figura 60). La frecuencia de muestras de raíces de verdolaga positivas para bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno microaerófilas fue 74,1% después de la siembra, así como 50,0; 35,0; 18,0; y 20,3 % después de tres subcultivos, respectivamente (Figura 61).

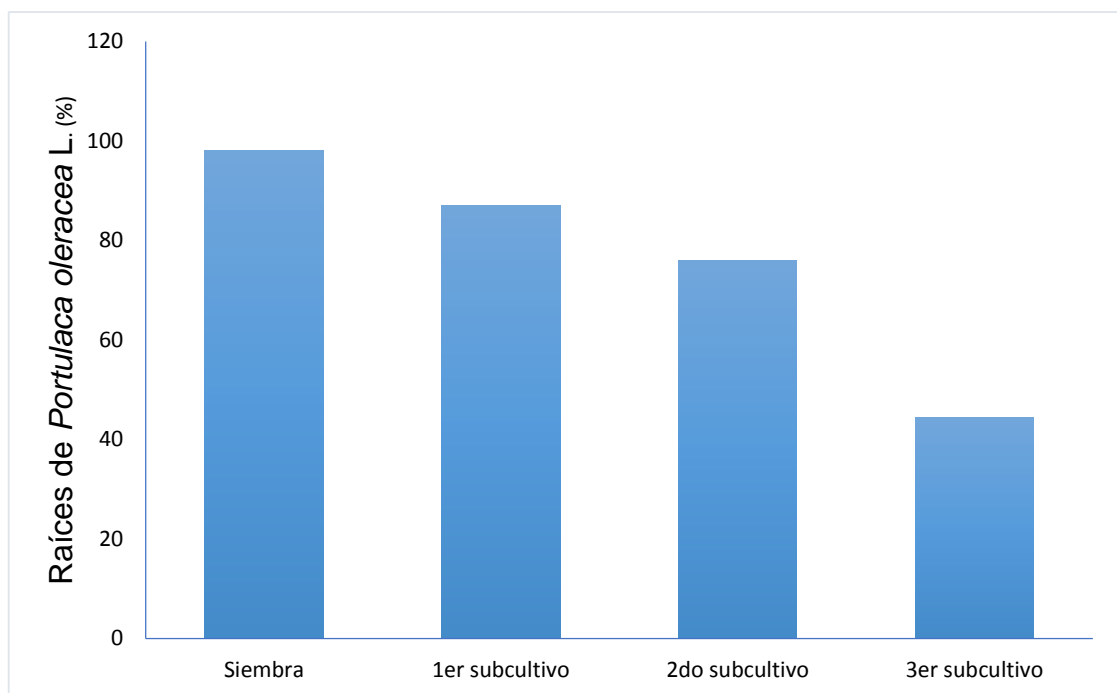
En el medio LGI-P, con un color inicial verde-amarillento, se observó viraje del indicador al amarillo y verde (Figura 62). La frecuencia de muestras de raíces de verdolaga positivas para bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno microaerófilas fue 72,2 %; después de la siembra, así como 66,6; 35,18 y 20,37 % después de tres subcultivos, respectivamente (Figura 63).

En el medio JNFb, con un color inicial amarillo, se observó viraje del indicador al celeste-azulado (Figura 64). La frecuencia de muestras de raíces de verdolaga positivas para bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno microaerófilas fue 85%; después de la siembra, así como 72,2; 53,7 y 29,6 % después de tres subcultivos, respectivamente (Figura 65).

En el medio JMV, con un color inicial amarillo opaco, no se observó viraje del indicador (Figura 66). La frecuencia de muestras de raíces de verdolaga positivas para bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno microaerófilas fue 72,2%; después de la siembra, así como 70,37; 51,8 y 25,9 % después de tres subcultivos, respectivamente (Figura 67).



**Figura 58.** Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en medio NFb.

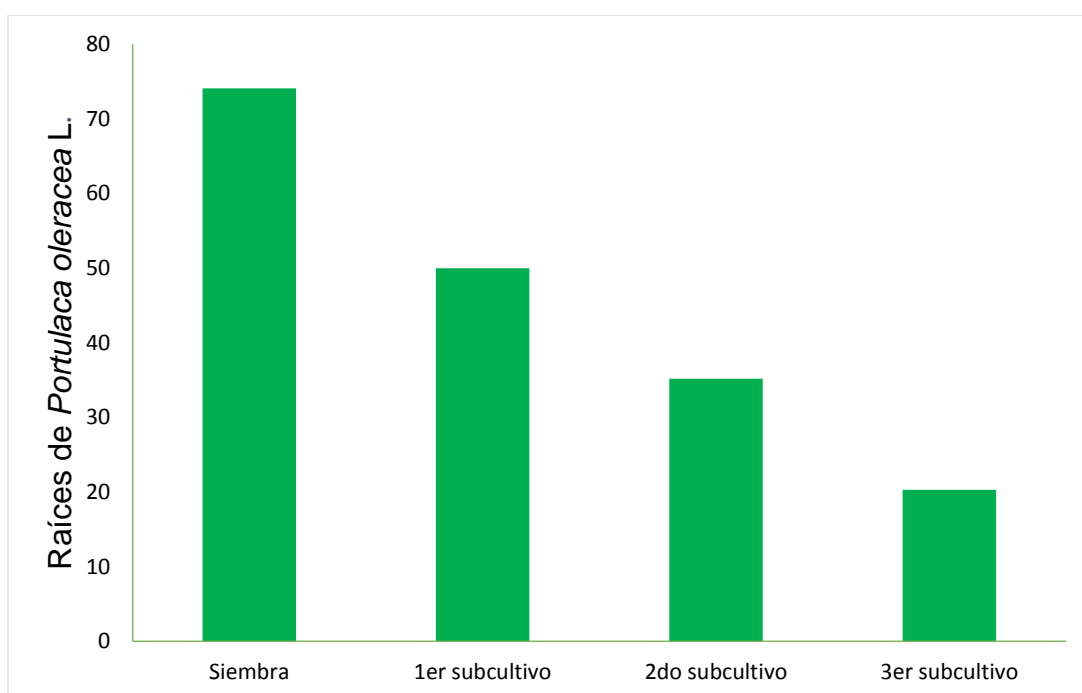


**Figura 59.** Frecuencia de raíces de *Portulaca oleracea* L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno observadas en NFb después de la siembra y tres subcultivos, 2016.

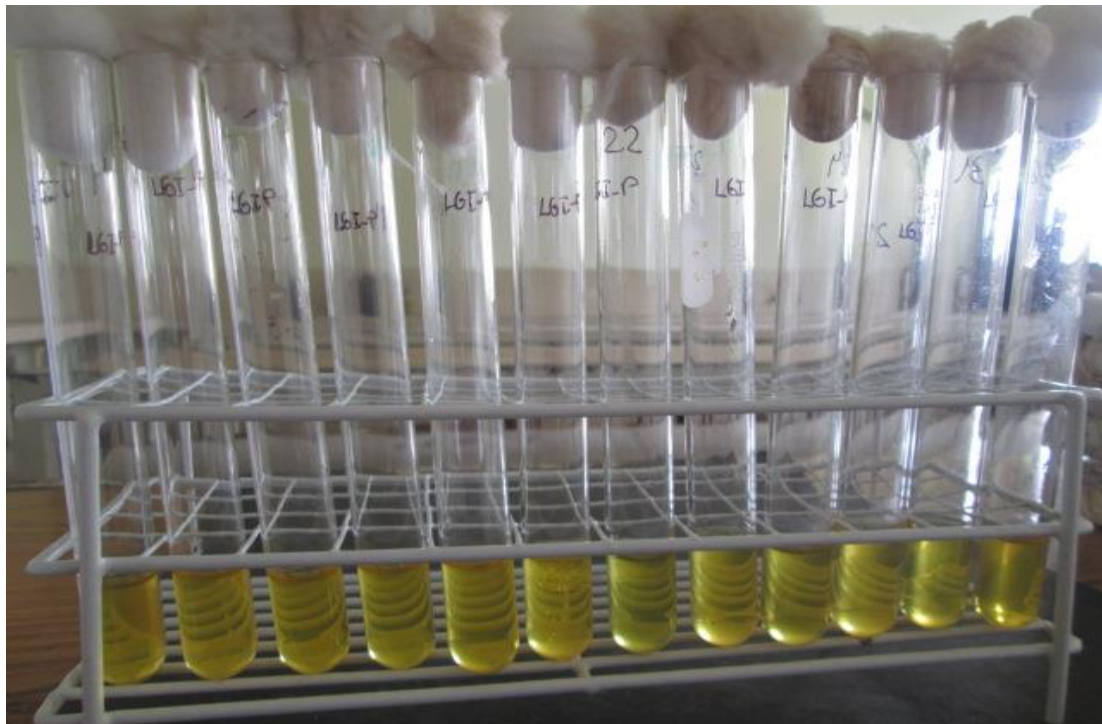




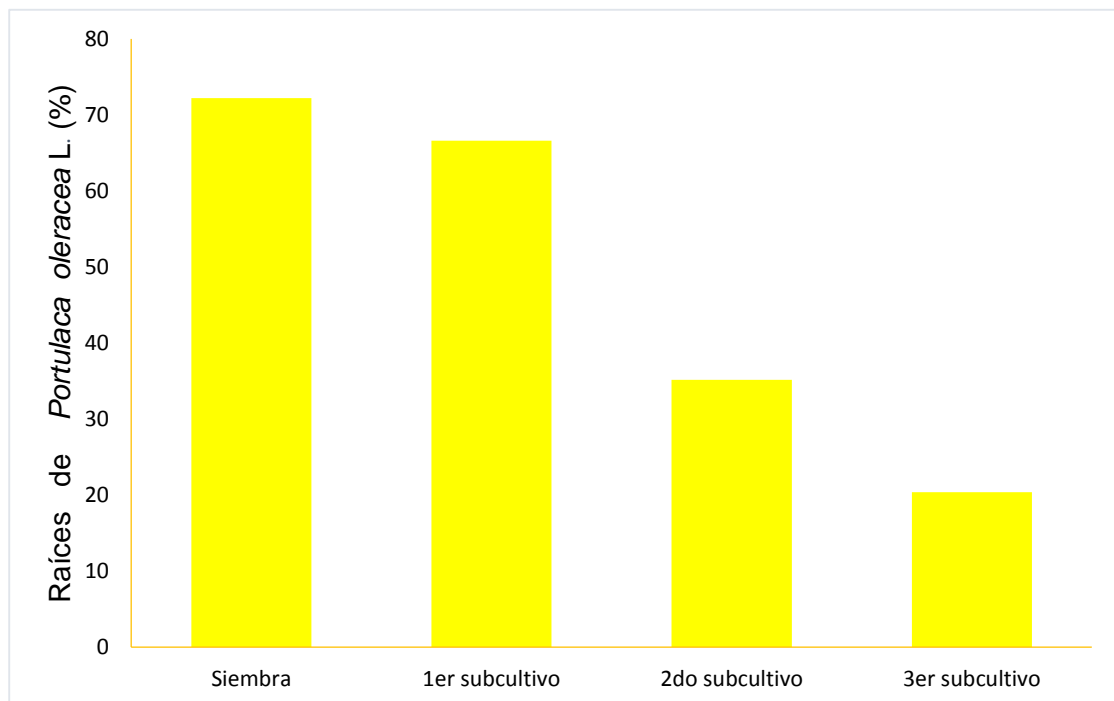
**Figura 60.** Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en medio LGI.



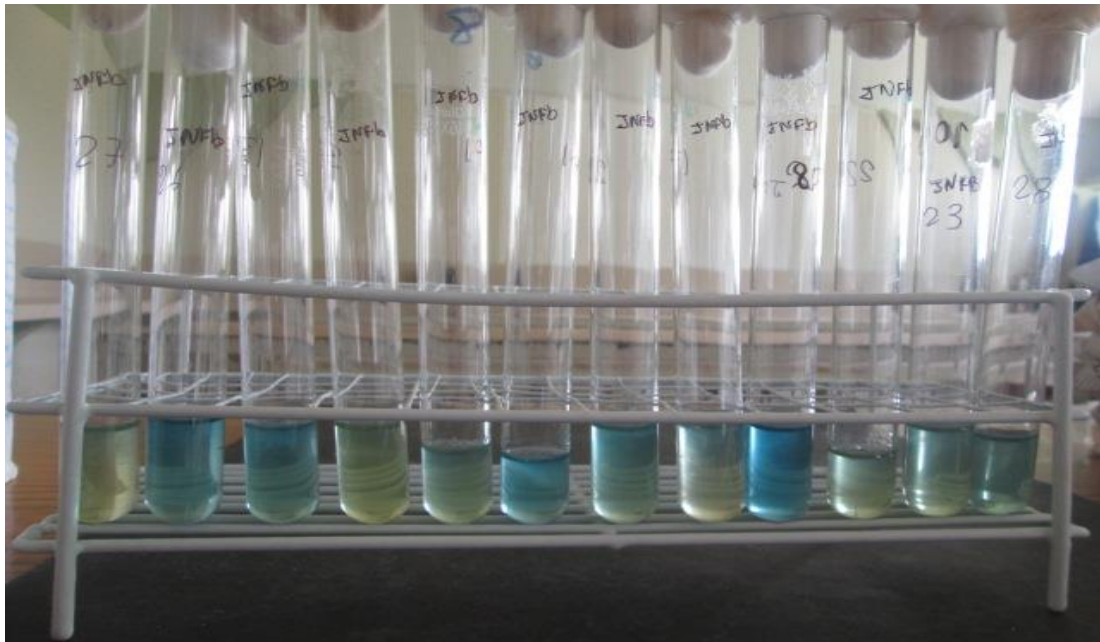
**Figura 61.** Frecuencia de raíces de *Portulaca oleracea* L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno observadas en LGI después de siembra y tres subcultivos, 2016.



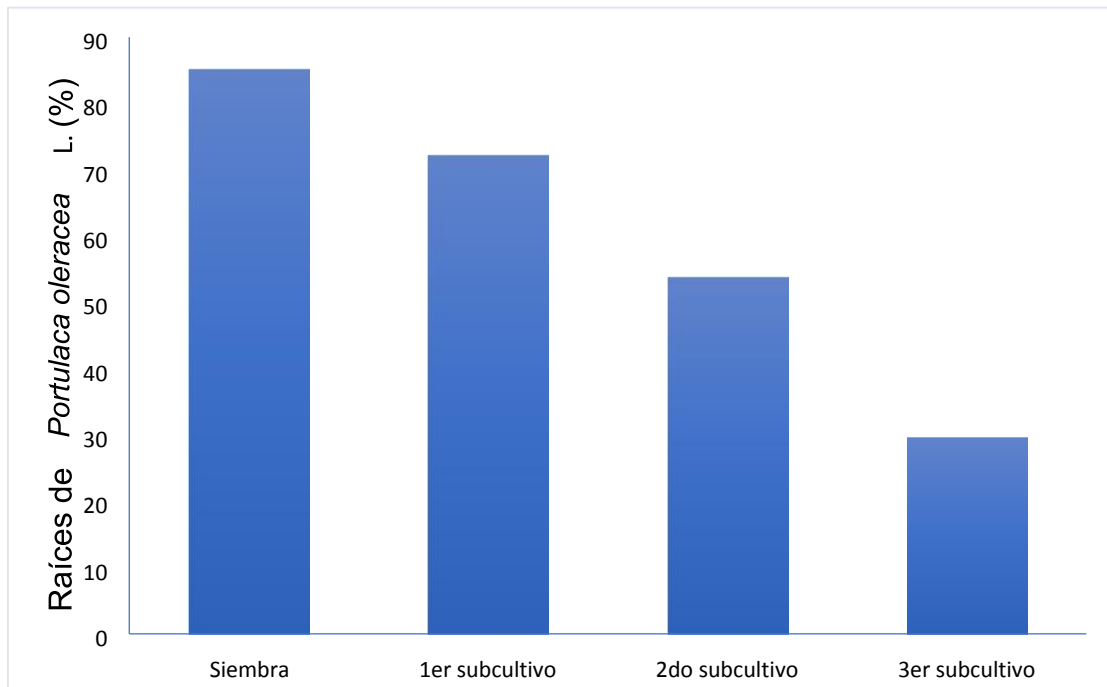
**Figura 62.** Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en medio LGIP.



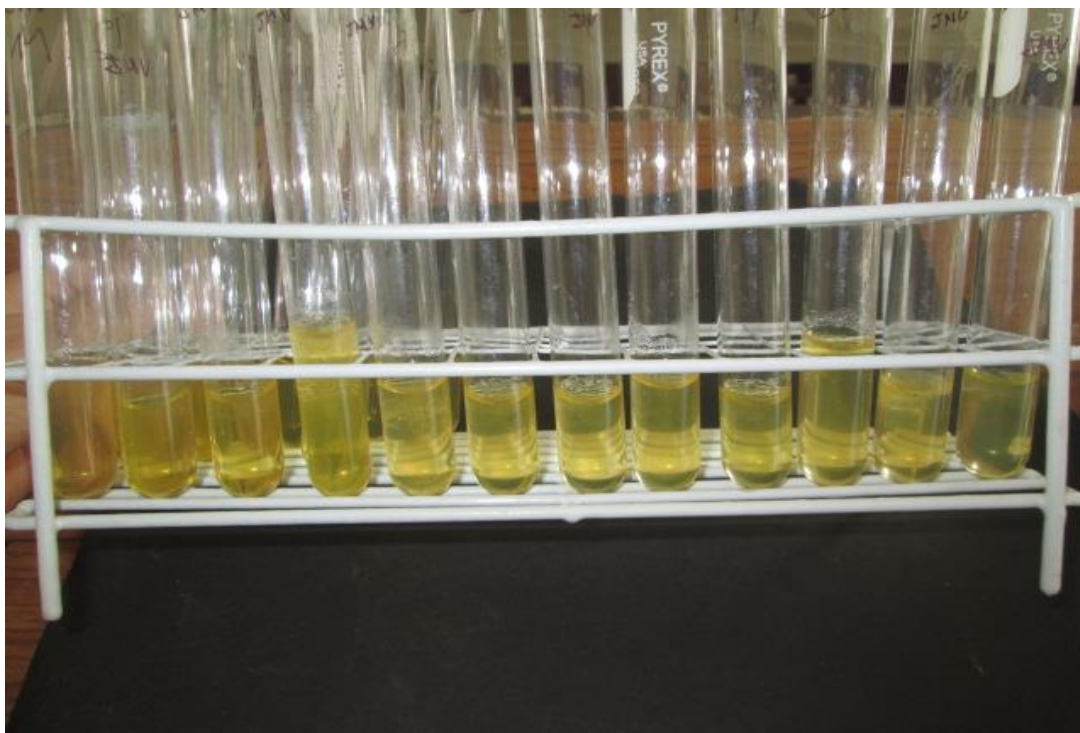
**Figura 63.** Frecuencia de raíces de *Portulaca oleracea* L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno observadas en LGI-P después de la siembra y tres subcultivos, 2016.



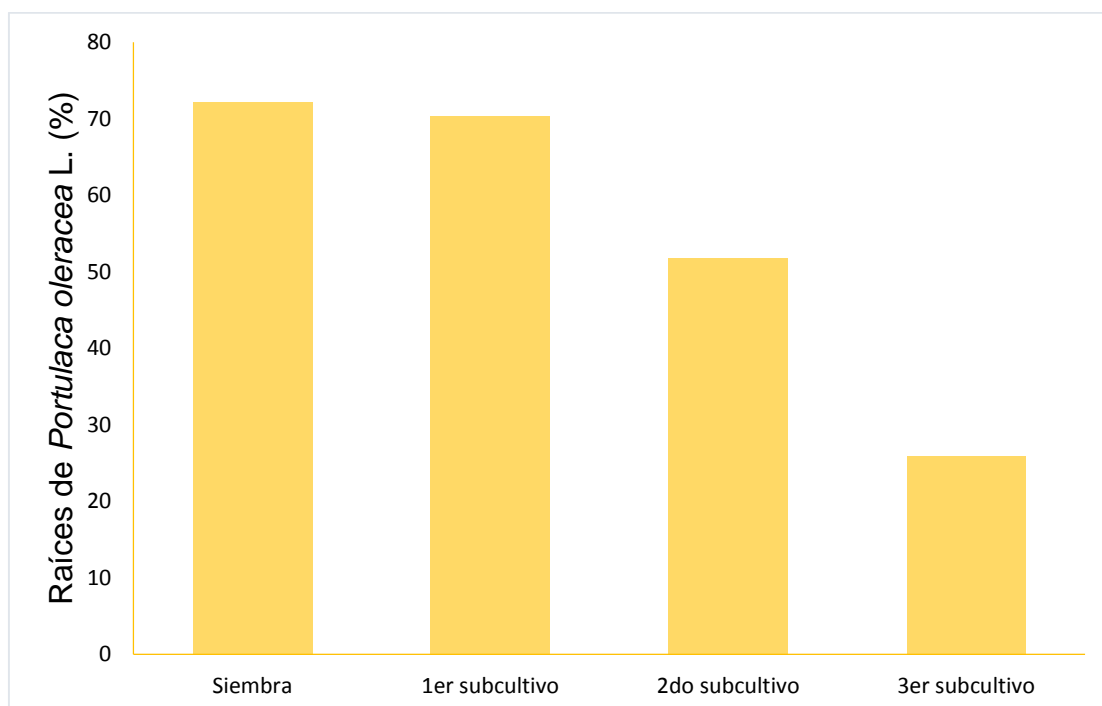
**Figura 64.** Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno microaerófilas en medio JNFb.



**Figura 65.** Frecuencia de raíces de *Portulaca oleracea* L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno observadas en JNFb después la siembra y tres subcultivos, 2016.



**Figura 66.** Película subsuperficial y viraje del indicador por bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en medio JMV.



**Figura 67.** Frecuencia de raíces de *Portulaca oleracea* L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno observadas en JMV después de la siembra y tres subcultivos, 2016.

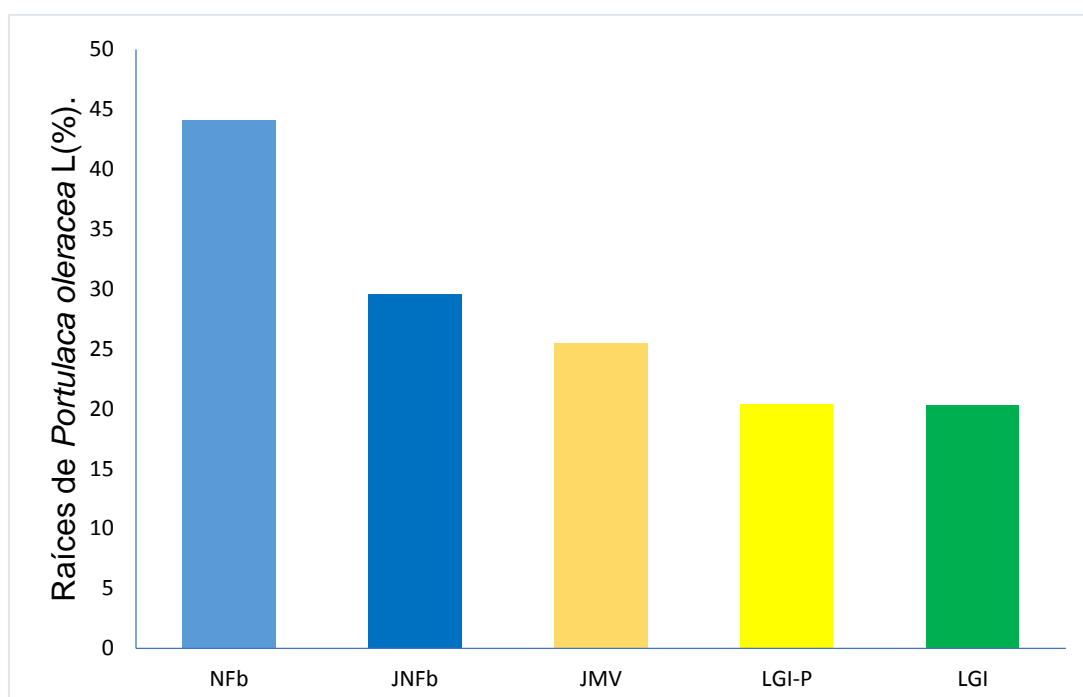
La frecuencia de muestras de raíces de verdolaga con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno después de tres subcultivos fue 44,1 %(24) en NFb; 29,6 %(16) en JNFb; 25,9 %(14) en JMV; 20,37 %(11) en LGI-P así como 20,3 %(11) en LGI (Figura 68). En el aislamiento se obtuvieron 83 cultivos puros de bacterias fijadoras de nitrógeno, cuya procedencia correspondió al 30,9%(26) en NFb; 21,4%(17) en JNFb, 16,6%(14) en LGI; 16,6(14) en JMV y 14,2%(12) en LGI-P (Figura 69).

#### **4.8 Géneros de bacterias rizosféricas y endófitas fijadoras de nitrógeno identificados fenotípicamente**

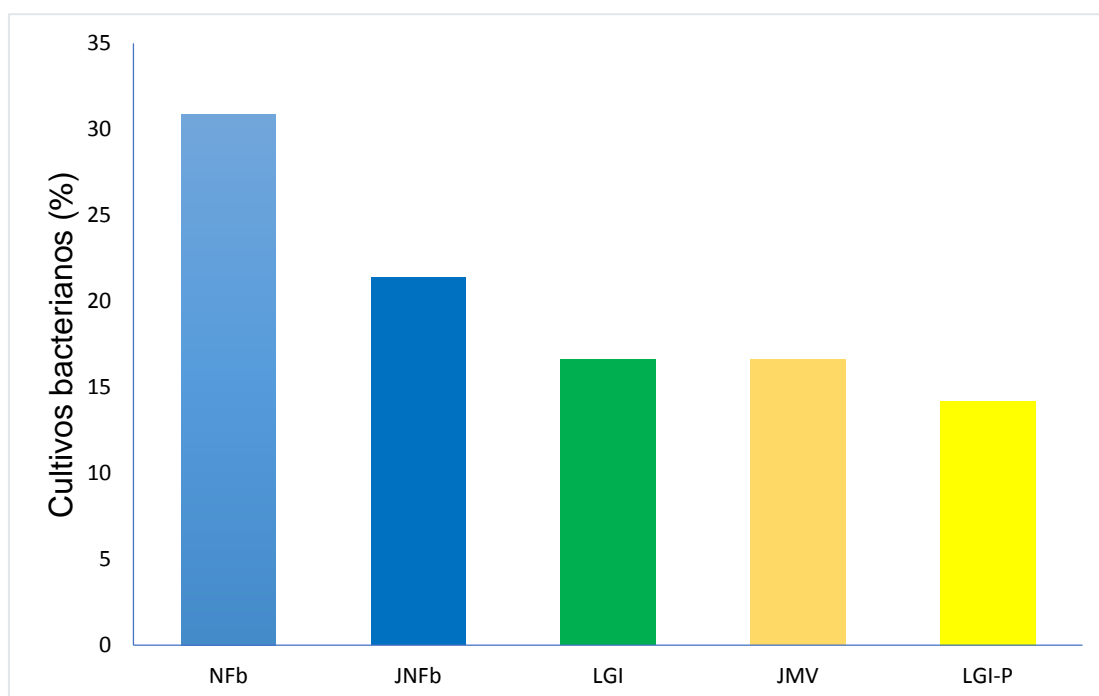
En las bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno (Figura 70) aisladas de verdolaga se identificaron los géneros *Azospirillum* (23,1%), *Azotobacter* (18,2%), *Herbaspirillum* (15,8%), *Beijerinckia* (12,1%), *Burkholderia* (9,1%), *Derxia* (6,09%) y *Gluconacetobacter* (4,2%). En las bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno (Figura 71) se identificaron los géneros *Azospirillum* (43,3%), *Herbaspirillum* (16,8%), *Burkholderia* (14,4%), y *Gluconacetobacter* (12,04%). En este contexto, no se identificó el género del 11,4% de bacterias rizosféricas y 13,4% de bacterias endófitas.

Las bacterias de los géneros *Azotobacter* y *Beijerinckia* se observaron como bacilos Gram negativos, positivos en catalasa y oxidasa (Tabla 2). Estas pruebas junto a la acidificación de glucosa, sacarosa, fructosa, maltosa y reducción de nitratos diferenciaron al género *Azotobacter* sp. El género *Derxia* se identificó por la producción de indol, utilización de citrato como fuente de carbono y energía, crecimiento en 1% de peptona y acidificación de la glucosa, manitol y sacarosa. El género *Beijerinckia* se identificó por la acidificación de glucosa, manitol y sacarosa y no producción de indol, ni crecimiento en 1% de peptona.

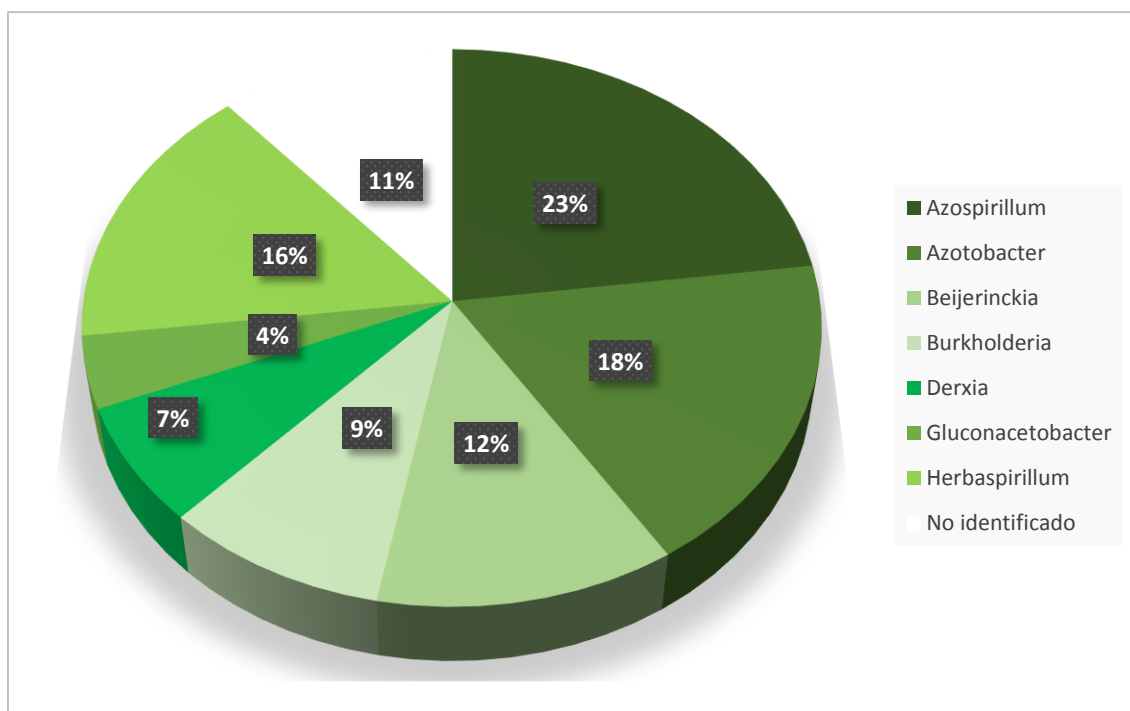
Las bacterias de los géneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* y *Burkholderia* se observaron como bacilos Gram negativos, móviles, positivos en las pruebas de catalasa, oxidasa y utilización del ácido málico como fuente de carbono para la fijación de nitrógeno (Tabla 3). Las pruebas mencionadas, junto a la hidrólisis de la urea, reducción de nitratos y presencia de gránulos de polihidroxialcanoatos (PHA), identificaron al género *Azospirillum*.



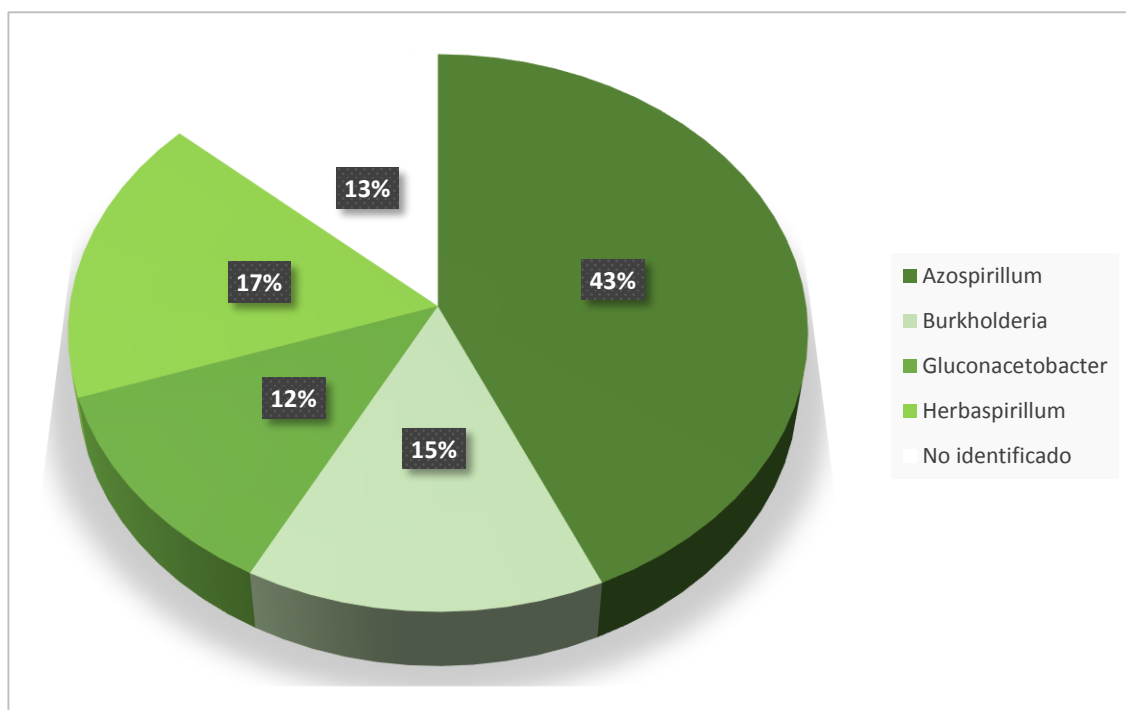
**Figura 68.** Frecuencia de raíces de *Portulaca oleracea* L. con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno aisladas en cinco medios semisólidos después de tres subcultivos.



**Figura 69.** Porcentaje de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno aisladas en cinco medio semisólidos.



**Figura 70.** Frecuencia (%) de géneros identificados en bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno .



**Figura 71.** Frecuencia (%) de géneros identificados en bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno.



**Tabla 2.** Características diferenciales de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aerobias

Características	<i>Azotobacter</i> spp.	<i>Derxia</i> spp.	<i>Beijerinckia</i> spp.
Células	Bacilos rectos	Bacilos pequeños	Bacilos pequeños
Tinción de Gram	-	-	-
Motilidad	+	+	+
Catalasa	+	+	+
Oxidasa	+	+	+
Producción de indol		+	-
Utilización de citrato		+	+/-
Crecimiento en 1% peptona		+	-
Acidificación de :			
- Glucosa	+	+	+
- Sacarosa	+	+	+
- Fructosa	+		
- Maltosa	+		
- Manitol		+	+
Reducción de nitratos	+		

**Tabla 3.** Características diferenciales de las bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas

Características	<i>Azospirillum</i> spp.	<i>Herbaspirillum</i> spp.	<i>Gluconacetobacter</i> spp.	<i>Burkholderia</i> spp.
Células	Pleomórficas	Bacilos curvos	Bacilos pequeños	Bacilos rectos
Tinción de Gram	-	-	-	-
Motilidad	+	+	+	+
Catalasa	+	+/-	+	+
Oxidasa	+	+	+	+
Hidrólisis de la úrea	+	+/-	+	
Hidrólisis de gelatina	-/+		+	+
Reducción de nitratos	+		+	
Hidrólisis de almidón			+	
Descarboxilación de lisina		+		+
Crecimiento en caldo NFb				
Fuente de C(fijación de N):				
▪ Ácido málico	+	+	+	+
▪ Glucosa	-/+	+	+	+
▪ Manitol	-/+	+	+	+
▪ Sacarosa	-/+	+	+	+
Gránulos de PHA	+		+	
Resistencia a la Polimixina B(300J)				+

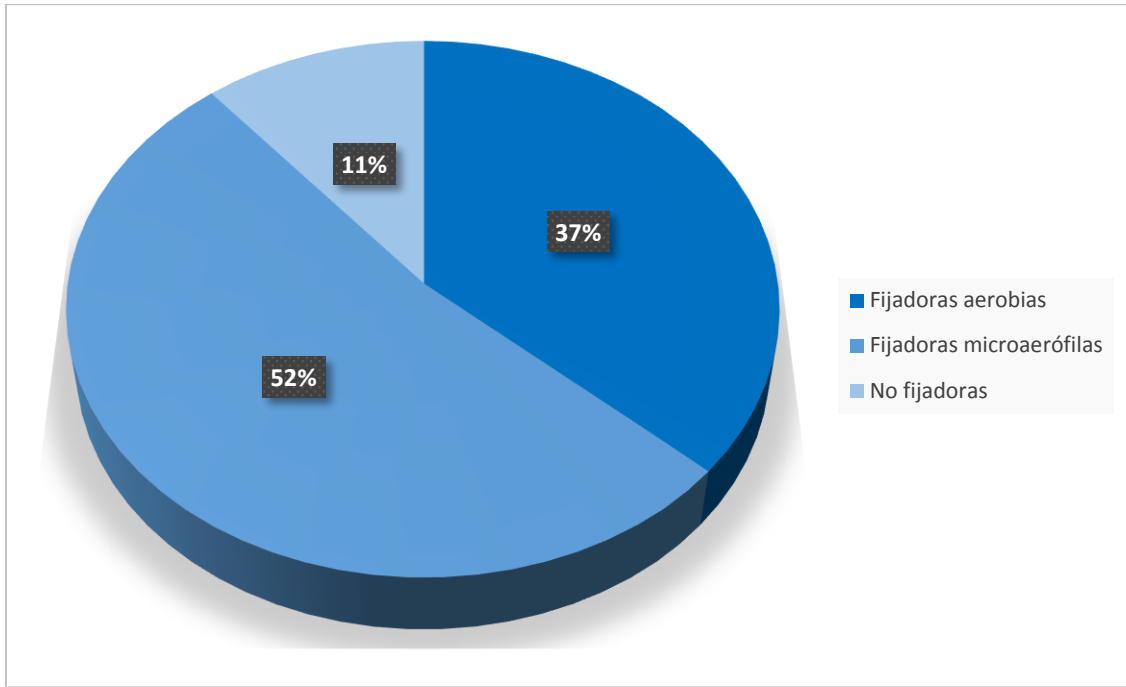
\* (+) positivo; (-) negativo.

Los géneros de las bacterias restantes se identificaron por la utilización de glucosa, manitol y sacarosa como fuentes de carbono para la fijación de nitrógeno, así como por el crecimiento en caldo NFb, para *Herbaspirillum*; hidrólisis de urea, gelatina y reducción de nitratos para *Gluconacetobacter*; hidrólisis de la gelatina, descarboxilación de lisina y resistencia a 300UI de Polimixina B para *Burkholderia*.

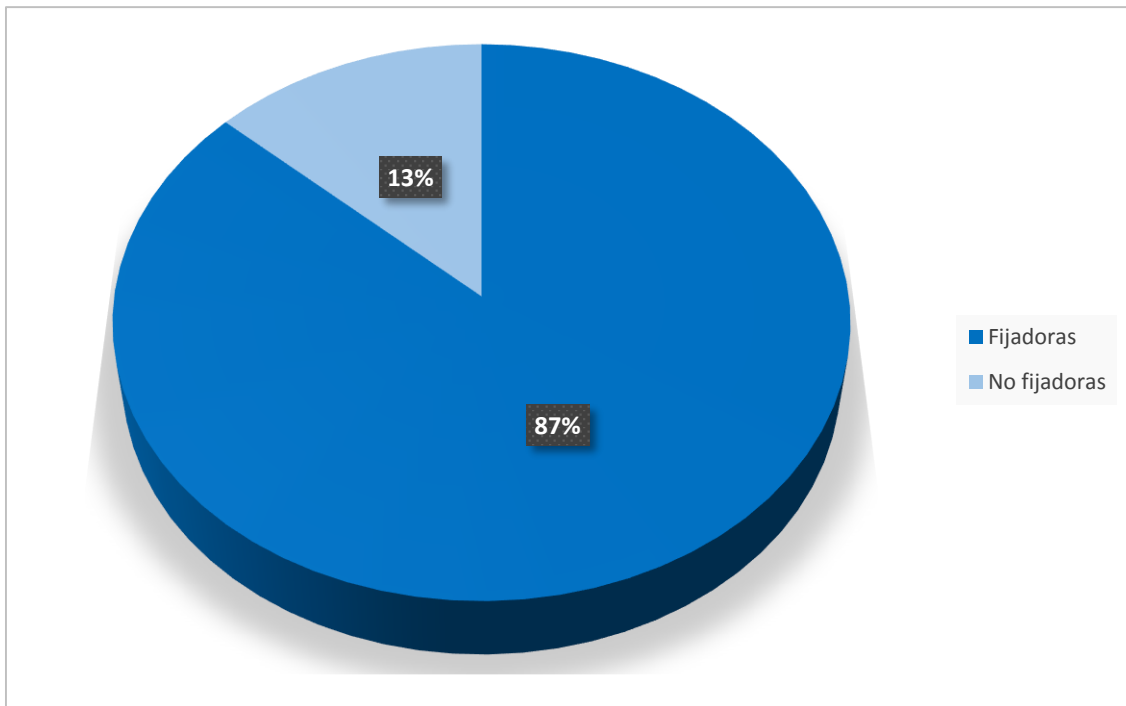
En el 85,7% (30) de las bacterias rizosféricas aisladas en el medio LG se identificó el género *Azotobacter*, en el 83,3% (20) de las bacterias aisladas en el medio Beijerinckia se identificó el género *Beijerinckia* y en el 71,4%(10) de las bacterias aisladas en el medio LGD se identificó el género *Derxia*. En el 100%(38) de las bacterias aisladas en NFb y LGI se identificó el género *Azospirillum*, en el 96,2%(26) de las bacterias aisladas en JNFb se identificó el género *Herbaspirillum*; en el 88,2% (15) de las bacterias aisladas en JMV se identificó el género *Burkholderia* y en el 77,7% (7) de bacterias aisladas en LGI-P se identificó el género *Gluconacetobacter*. Asimismo en el 90% (36) de las bacterias endófitas aisladas en los medios NFb y LGI se identificó el género *Azospirillum*; en el 82,6% (14) de bacterias aisladas en JNFb se identificó el género *Herbaspirillum*; en el 85,7% (12) de las bacterias aisladas en JMV se identificó el género *Burkholderia*; y en el 83,3% (10) de las bacterias aisladas en LGIP se identificó el género *Gluconacetobacter*.

#### **4.9 Nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos por bacterias rizosféricas y endófitas**

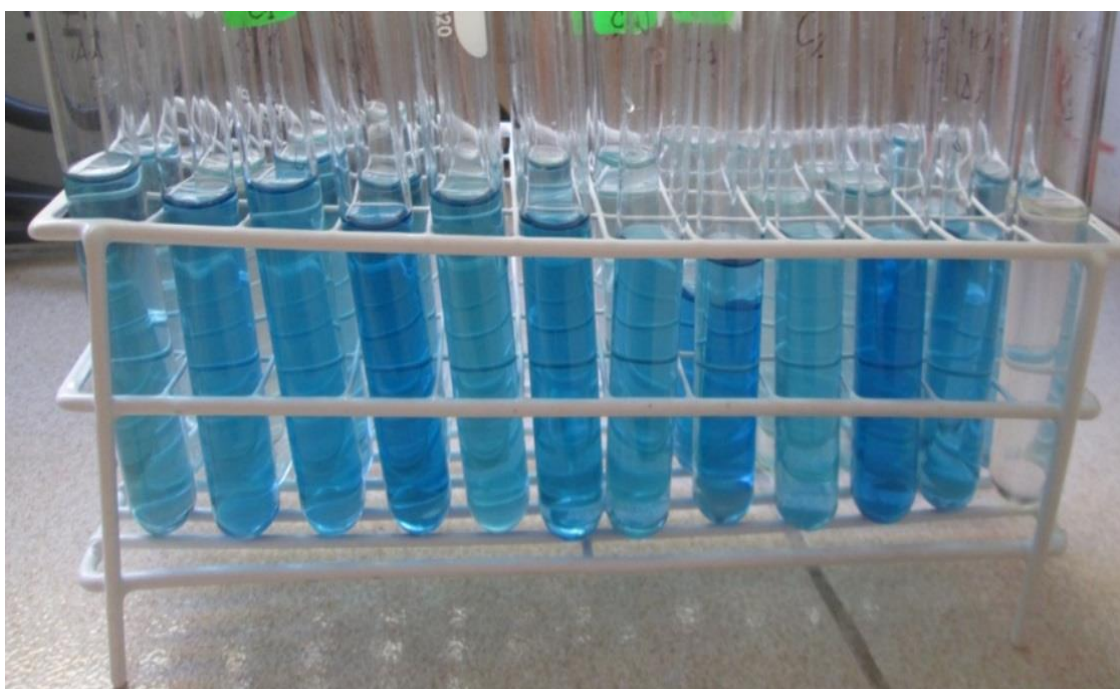
El 88,9% (146) de cultivos de bacterias rizosféricas: 36,5% (60) aerobias y 52,4%(86) microaerófilas y 86,7%(72) de cultivos de bacterias endófitas fijaron nitrógeno *in vitro* (Figuras 72,73) y como producto de la fijación se detectó amonio, evidenciado por una coloración azul (Figura 74).



**Figura 72.** Porcentaje de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno *in vitro*.



**Figura 73.** Porcentaje de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno *in vitro*.



**Figura 74.** Coloración observada en la cuantificación de amonio.

Con cada género identificado en las bacterias rizosféricas (Tabla 4) las concentraciones máximas de amonio fueron: 64 ppm (*Azospirillum* sp.NFb19R); 27,2 ppm (*Azotobacter* sp.LG11A); 25,6ppm (*Burkholderia* sp.JMV22bR); 20,8ppm (*Herbaspirillum* sp.JNFb20R); 16,0ppm (*Beijerinckia* sp.9AR) y 8ppm (*Derxia* sp.LGD5B y *Gluconacetobacter* sp.LGI-P45). Con las bacterias endófitas (Tabla 5) las concentraciones máximas de amonio fueron 23,2ppm (*Azospirillum* sp. LGI 34AE); 21,6ppm (*Burkholderia* sp.JMV1E); 13,6ppm (*Herbaspirillum* sp. JNFb15E) y 8,0ppm (*Gluconacetobacter* sp.LGI-P2BE).

El 96%(154) de cultivos de bacterias rizosféricas: 54%(67) aerobias y 42%(87) microaerófilas y 95%(78) de cultivos de bacterias endófitas solubilizaron fosfato *in vitro* (Figuras 75,76) y como producto de la solubilización se detectó fósforo soluble, evidenciado por una coloración azul (Figura 77). Con cada género identificado en las bacterias rizosféricas (Tabla 6) las concentraciones máximas de fósforo solubilizado fueron: 64,9ppm (*Burkholderia* sp.JMV53bR); 51,4ppm (*Gluconacetobacter* sp.LGI-P33R); 19,2ppm (*Herbaspirillum* sp. JNFb49R); 16,9ppm (*Azospirillum* sp.LGI38R); 49,2ppm (*Derxia* sp.LGD5C); 14,4ppm (*Azotobacter* sp.LG11B) y 14,3ppm (*Beijerinckia* sp.4R). Con las bacterias endófitas (Tabla 7) las concentraciones máximas de fósforo solubilizado fueron: 16,02ppm (*Azospirillum* sp.LGI54E); 11,89ppm (*Gluconacetobacter* sp.LGI-P12E). 11,86ppm (*Burkholderia* sp.JMV19E) y 11,39ppm (*Herbaspirillum* sp.JNFb15E).

El 99,3%(162) de cultivos de bacterias rizosféricas 43%(69) aerobias y 56,3%(93) microaerófilas y 100%(80) de bacterias endófitas produjeron indoles *in vitro* (Figura 78), evidenciados por una coloración grosella (Figura 79). Con cada género identificado en las bacterias rizosféricas (Tabla 8) las concentraciones máximas de indoles producidos fueron: 142,2ppm (*Azospirillum* sp.LGI18R); 92,2ppm (*Herbaspirillum* sp.JNFb13R); 80,8ppm (*Burkholderia* sp.JMV53bR); 64,9ppm (*Gluconacetobacter* sp.LGI-P45R); 56,7ppm (*Azotobacter* sp.LG27); 51,4ppm (*Beijerinckia* sp.1R) y 49,2ppm (*Derxia* sp.LGD 5C).

**Tabla 4.** Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por bacterias rizosféricas aisladas de *Portulaca oleracea* L.

Bacterias rizosféricas código UNPRG	Amonio (ppm)	Bacterias rizosféricas código UNPRG	Amonio (ppm)
<i>Azospirillum</i> sp. NFb19R	64,0	<i>Beijerinckia</i> sp. 48 <sup>a</sup>	8,0
<i>Azospirillum</i> sp. NFb16R	48,0	<i>Azotobacter</i> sp. LG27	8,0
<i>Azotobacter</i> sp. LG11A	27,2	<i>Azotobacter</i> sp. LG25	8,0
<i>Burkholderia</i> sp. JMV22bR	25,6	<i>Azotobacter</i> sp. LG37B	8,0
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB20R	20,8	<i>Derxia</i> sp. LGD5B	8,0
<i>Beijerinckia</i> sp. 9AR	16,0	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB41R	7,2
<i>Azospirillum</i> sp. NFb42R	14,4	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB16R	7,2
<i>Burkholderia</i> sp. JMV17R	14,4	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P33R	7,2
<i>Azospirillum</i> sp. NFb40R	12,8	<i>Azotobacter</i> sp. LG11B	7,2
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB21R	12,8	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB40R	6,4
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB39aR	12,0	<i>Burkholderia</i> sp. JMV53bR	6,4
<i>Burkholderia</i> sp. JMV47R	12,0	<i>Burkholderia</i> sp. JMV41R	6,4
<i>Burkholderia</i> sp. JMV24R	12,0	<i>Azospirillum</i> sp. NFb24R	5,6
<i>Beijerinckia</i> sp. 1R	12,0	<i>Azospirillum</i> sp. NFb45R	5,6
<i>Azospirillum</i> sp. LGI21R	11,2	<i>Azospirillum</i> sp. LGI34aR	5,6
<i>Burkholderia</i> sp. JMV49R	11,2	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB11R	5,6
<i>Burkholderia</i> sp. JMV19R	11,2	<i>Azospirillum</i> sp. LGI22R	5,6
<i>Azospirillum</i> sp. NFb37R	10,4	<i>Azospirillum</i> sp. LGI323R	5,6
<i>Azospirillum</i> sp. LGI49R	10,4	<i>Azospirillum</i> sp. LGI34BR	5,6
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB22R	10,4	<i>Azospirillum</i> sp. LGI24R	5,6
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB14R	10,4	<i>Azospirillum</i> sp. NFb36R	5,6
<i>Beijerinckia</i> sp. 5R	10,4	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB50R	5,6
<i>Beijerinckia</i> sp. 4R	10,4	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P54R	5,6
<i>Azospirillum</i> sp. LGI12R	9,6	<i>Beijerinckia</i> sp. 2BR	5,6
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB13R	9,6	<i>Beijerinckia</i> sp.3R	5,6
<i>Azospirillum</i> sp. NFb47R	8,8	<i>Azotobacter</i> sp. LG29R	5,6
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB19R	8,8	<i>Derxia</i> sp. LGD54R	5,6
<i>Azotobacter</i> sp. LG33R	8,8	<i>Azotobacter</i> sp. LG30R	5,6
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB49R	8,0	<i>Derxia</i> sp. LGD5ER	5,6
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB37R	8,0	<i>Burkholderia</i> sp. JMV27R	5,6
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P45R	8,0	<i>Beijerinckia</i> sp. 2AR	5,6



Continuación...

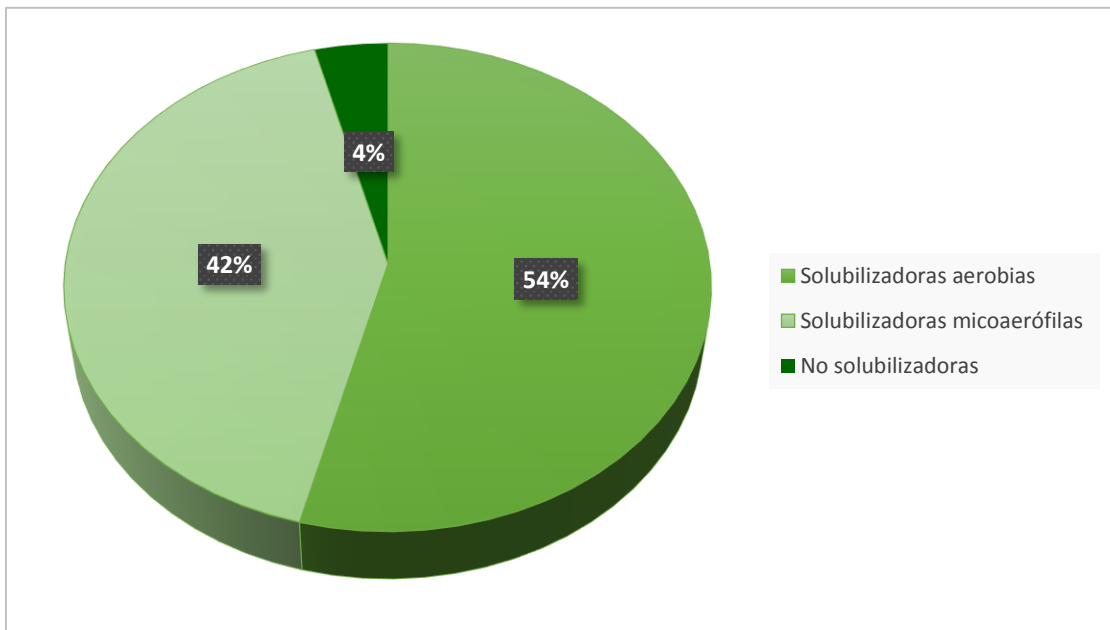
Bacterias rizosféricas código UNPRG	Amonio (ppm)	Bacterias rizosféricas código UNPRG	Amonio (ppm)
<i>Azotobacter</i> sp. LG32	5,6	<i>Azotobacter</i> sp. LG47	3,2
<i>Azospirillum</i> sp. LGI12R	5,6	<i>Azospirillum</i> sp. LGI27R	3,2
<i>Azospirillum</i> sp. LGI42R	5,6	<i>Azospirillum</i> sp. LGI19R	3,2
<i>Azospirillum</i> sp. NFb13R	5,6	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB29R	2,4
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB38R	5,6	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB39bR	2,4
<i>Derxia</i> sp. LGD34BR	5,4	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB48R	2,4
<i>Azotobacter</i> sp. LG26R	5,4	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB47R	2,4
<i>Beijerinckia</i> sp.25R	5,4	<i>Burkholderia</i> sp. JMV31R	2,4
<i>Azotobacter</i> sp. LG24R	5,4	<i>Azotobacter</i> sp. LG10R	2,4
<i>Beijerinckia</i> sp.43	5,4	<i>Derxia</i> sp. LGD5CR	2,4
<i>Azotobacter</i> sp. LG4R	5,4	<i>Azospirillum</i> sp. NFb49R	2,4
<i>Beijerinckia</i> sp.37BR	5,4	<i>Azospirillum</i> sp. NFb11R	2,4
<i>Azotobacter</i> sp. LG42R	5,4	<i>Azospirillum</i> sp. LGI53R	2,4
<i>Beijerinckia</i> sp.39A	5,4	<i>Azospirillum</i> sp. LGI17R	2,4
<i>Azospirillum</i> sp. LGI38R	4,8	<i>Azospirillum</i> sp. LGI20R	2,4
<i>Azospirillum</i> sp. LGI46R	4,8	<i>Burkholderia</i> sp. JMV39R	1,6
<i>Azospirillum</i> sp. NFb21R	4,0	<i>Burkholderia</i> sp. JMV53aR	1,6
<i>Azospirillum</i> sp. NFb14R	4,0	<i>Beijerinckia</i> sp. 9B	1,6
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB27R	4,0	<i>Beijerinckia</i> sp. 14	1,6
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB23R	4,0	<i>Beijerinckia</i> sp. 37a	1,6
<i>Azotobacter</i> sp. LG12	4,0	<i>Azotobacter</i> sp. LG37A	1,6
<i>Derxia</i> sp. LGD7R	4,0	<i>Azotobacter</i> sp. LG13	1,6
<i>Azospirillum</i> sp. LGI16R	4,0	<i>Derxia</i> sp. LGD5D	1,6
<i>Azospirillum</i> sp. LGI11R	4,0	<i>Azospirillum</i> sp. LGI18R	1,6
<i>Azospirillum</i> sp. LGI32R	4,0	<i>Azospirillum</i> sp. LGI30R	1,6
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB34R	3,2	<i>Azospirillum</i> sp. LGI26R	1,6
<i>Burkholderia</i> sp. JMV11R	3,2	<i>Azospirillum</i> sp. NFb31R	1,6
<i>Beijerinckia</i> sp. 11BR	3,2	<i>Azospirillum</i> sp. NFb27R	1,6
<i>Beijerinckia</i> sp. 32R	3,2	<i>Azospirillum</i> sp. NFb17R	1,6

Continuación...

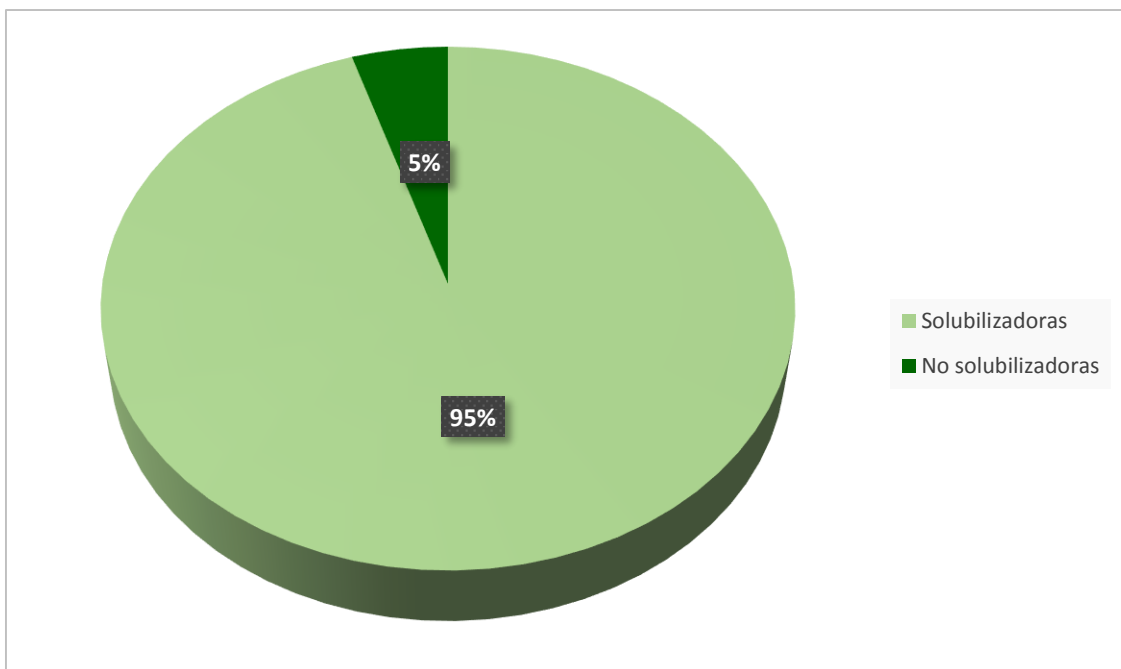
Bacterias rizosféricas código UNPRG	Amonio (ppm)	Bacterias rizosféricas código UNPRG	Amonio (ppm)
<i>Azospirillum</i> sp. NFb20R	1,6	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB12R	1,6
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB26R	1,6	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P53R	1,6
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB42R	1,6	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P36R	1,6
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P15R	1,6	<i>Derxia</i> sp. LGD52R	1,4
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P37R	1,6	<i>Azotobacter</i> sp. LG35R	1,4
<i>Burkholderia</i> sp. JMV37R	1,6	<i>Azotobacter</i> sp. LG41R	1,4
<i>Burkholderia</i> sp. JMV48R	1,6	<i>Azotobacter</i> sp. LG2R	1,4
<i>Beijerinckia</i> sp.47R	1,6	<i>Azotobacter</i> sp. LG15R	1,2
<i>Beijerinckia</i> sp.33R	1,6	<i>Azotobacter</i> sp. LG50R	1,2
<i>Derxia</i> sp. LGD16R	1,6	<i>Beijerinckia</i> sp.53BR	1,2
<i>Azotobacter</i> sp. LG51R	1,6	<i>Azotobacter</i> sp. LG46R	1,2
<i>Derxia</i> sp. LGD5AR	1,6	<i>Azotobacter</i> sp. LG35R	1,2
<i>Azotobacter</i> sp. LG8R	1,6	<i>Azotobacter</i> sp. LG44	1,2

**Tabla 5.** Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por bacterias endófitas aisladas de *Portulaca oleracea* L.

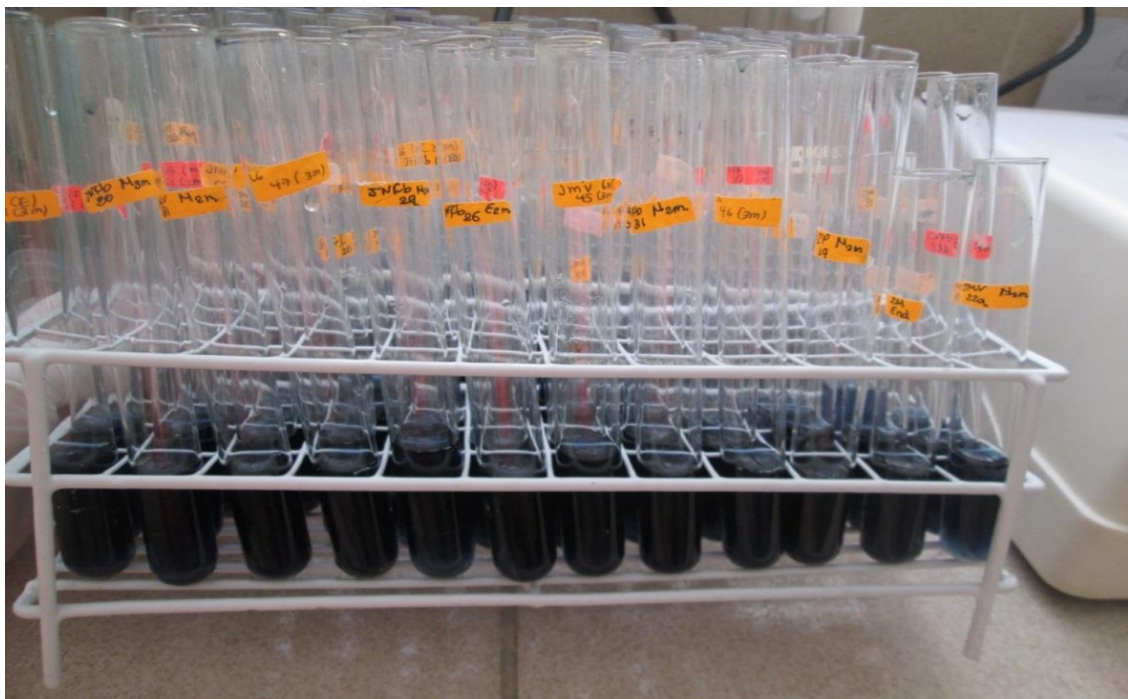
Bacterias endófitas código UNPRG	Amonio (ppm)	Bacterias endófitas código UNPRG	Amonio (ppm)
<i>Azospirillum</i> sp. LGI34AE	23,2	<i>Azospirillum</i> sp. LGI40E	3,2
<i>Burkholderia</i> sp. JMV1E	21,6	<i>Azospirillum</i> sp. NFb46E	3,2
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB15E	13,6	<i>Burkholderia</i> sp. JMV21E	3,0
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB13E	9,6	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P53E	2,4
<i>Azospirillum</i> sp. NFb22BE	8,0	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P38dE	2,4
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P2BE	8,0	<i>Azospirillum</i> sp. NFb15E	2,4
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P12E	8,0	<i>Azospirillum</i> sp. NFb47E	2,4
<i>Burkholderia</i> sp. JMV5E	7,4	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB29E	1,6
<i>Azospirillum</i> sp. LGI38E	4,8	<i>Burkholderia</i> sp. JMV6E	1,6
<i>Azospirillum</i> sp. NFb17E	4,8	<i>Azospirillum</i> sp. LGI54E	1,6
<i>Burkholderia</i> sp. JMV27E	4,8	<i>Azospirillum</i> sp. LGI26E	1,6
<i>Azospirillum</i> sp. LGI13E	4,0	<i>Azospirillum</i> sp. NFb33E	1,6
<i>Azospirillum</i> sp. LGI34BE	4,0	<i>Azospirillum</i> sp. NFb53E	1,6
<i>Azospirillum</i> sp. NFb12E	4,0	<i>Burkholderia</i> sp. JMV20E	1,6
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB32E	3,2	<i>Burkholderia</i> sp. JMV19E	1,6
<i>Azospirillum</i> sp. LGI46AE	3,2	<i>Azospirillum</i> sp. NFb50E	1,6
<i>Azospirillum</i> sp. NFb43E	3,2	<i>Azospirillum</i> sp. LGI45E	1,6
<i>Azospirillum</i> sp. LGI46BE	3,2	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P2AE	1,6
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P38CE	3,2	<i>Azospirillum</i> sp. LGI9E	1,6
<i>Azospirillum</i> sp. NFb26E	3,2	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P14E	1,4
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P20E	3,2	<i>Azospirillum</i> sp. NFb27E	1,4
<i>Burkholderia</i> sp. JMV27E	3,2	<i>Burkholderia</i> sp. JMV20E	1,4
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB27E	3,2	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB14E	1,4
<i>Burkholderia</i> sp. JMV14E	3,2	<i>Burkholderia</i> sp. JMV21	1,4
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB20E	3,2	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB21E	1,4
<i>Azospirillum</i> sp. LGI34CE	3,2	<i>Azospirillum</i> sp. LGI17E	1,4
<i>Azospirillum</i> sp. NFb7E	3,2	<i>Azospirillum</i> sp. NFb20E	1,4
<i>Azospirillum</i> sp. LGI53E	3,2	<i>Azospirillum</i> sp. NFb11BE	1,4
<i>Azospirillum</i> sp. NFb2E	3,2	<i>Azospirillum</i> sp. NFb32E	1,4
<i>Azospirillum</i> sp. NFb21E	3,2	<i>Azospirillum</i> sp. NFb23E	1,2
<i>Burkholderia</i> sp. JMV44E	3,2	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB36AE	1,2
<i>Azospirillum</i> sp. NFb5E	3,2	<i>Azospirillum</i> sp. NFb11A	1,2
<i>Burkholderia</i> sp. JMV14E	3,2	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB7E	1,2
<i>Azospirillum</i> sp. NFb22AE	3,2	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB43BE	1,2
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB18E	3,2	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P38BE	1,2
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P38AE	3,2	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB3E	1,2



**Figura 75.** Porcentaje de bacterias rizosféricas solubilizadoras de fosfato *in vitro*.



**Figura 76.** Porcentaje de bacterias endófitas solubilizadoras de fosfato *in vitro*.



**Figura 77.** Coloración observada en la cuantificación de fósforo soluble.

**Tabla 6.** Fósforo (ppm) cuantificado en la solubilización por bacterias rizosféricas aisladas de *Portulaca oleracea* L.

Bacterias rizosféricas código UNPRG	Fósforo soluble (ppm)	Bacterias rizosféricas código UNPRG	Fósforo soluble (ppm)
<i>Burkholderia</i> sp.JMV53bR	64,9	<i>Azotobacter</i> sp. LG37AR	11,80
<i>Gluconacetobacter</i> sp.LGI-P33R	51,4	<i>Azotobacter</i> sp. LG37BR	11,75
<i>Derxia</i> sp. LGD5C	49,2	<i>Burkholderia</i> sp.JMV39R	11,4
<i>Derxia</i> sp.LGD5B	22,1	<i>Azospirillum</i> sp.LGI30R	11,27
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB49R	19,2	<i>Azospirillum</i> sp.NFb27R	11,27
<i>Derxia</i> sp.LGD7	19,0	<i>Azotobacter</i> sp. LG33R	11,24
<i>Gluconacetobacter</i> sp.LGI-P45R	16,6	<i>Azospirillum</i> sp.NFb45R	11,17
<i>Burkholderia</i> sp.JMV49R	16,0	<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB47R	11,05
<i>Azospirillum</i> sp.LGI38R	16,9	<i>Azospirillum</i> sp.NFb16R	10,92
<i>Azospirillum</i> sp.LGI26R	15,8	<i>Beijerinckia</i> sp. 9BR	10,52
<i>Burkholderia</i> sp.JMV53aR	15,5	<i>Azospirillum</i> sp. LGI22R	10,52
<i>Azospirillum</i> sp.NFb31R	15,3	<i>Azospirillum</i> sp. LGI323R	10,52
<i>Burkholderia</i> sp.JMV19R	15,0	<i>Azospirillum</i> sp. LGI34BR	10,52
<i>Azospirillum</i> sp.NFb42R	15,6	<i>Azospirillum</i> sp. LGI24R	1052
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB23R	14,0	<i>Azospirillum</i> sp. NFb36R	10,52
<i>Azotobacter</i> sp. LG11BR	14,4	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB50R	10,52
<i>Beijerinckia</i> sp. 4R	14,3	<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB41R	10,46
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB39aR	13,81	<i>Azospirillum</i> sp.LGI53R	10,30
<i>Beijerinckia</i> sp. 2AR	13,48	<i>Azospirillum</i> sp.LGI32R	10,27
<i>Beijerinckia</i> sp. 32R	13,38	<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB21R	10,00
<i>Azospirillum</i> sp.NFb47R	12,83	<i>Azospirillum</i> sp.LGI11R	9,50
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB34R	12,77	<i>Azospirillum</i> sp.LGI16R	9,90
<i>Azospirillum</i> sp.LGI18R	12,73	<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB11R	9,66
<i>Azospirillum</i> sp.NFb21R	12,71	<i>Azospirillum</i> sp.LGI19R	9,51
<i>Burkholderia</i> sp.JMV22bR	12,51	<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB27R	9,39
<i>Azospirillum</i> sp.NFb40R	12,43	<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB22R	9,36
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB19R	12,35	<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB14R	9,36
<i>Azospirillum</i> sp.NFb49R	12,24	<i>Azospirillum</i> sp.LGI49R	9,30
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB16R	12,22	<i>Burkholderia</i> sp.JMV41R	9,30
<i>Derxia</i> sp. LGD5D	12,10	<i>Azospirillum</i> sp.NFb19R	9.26
<i>Azospirillum</i> sp.NFb24R	11,91	<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB29R	9,20

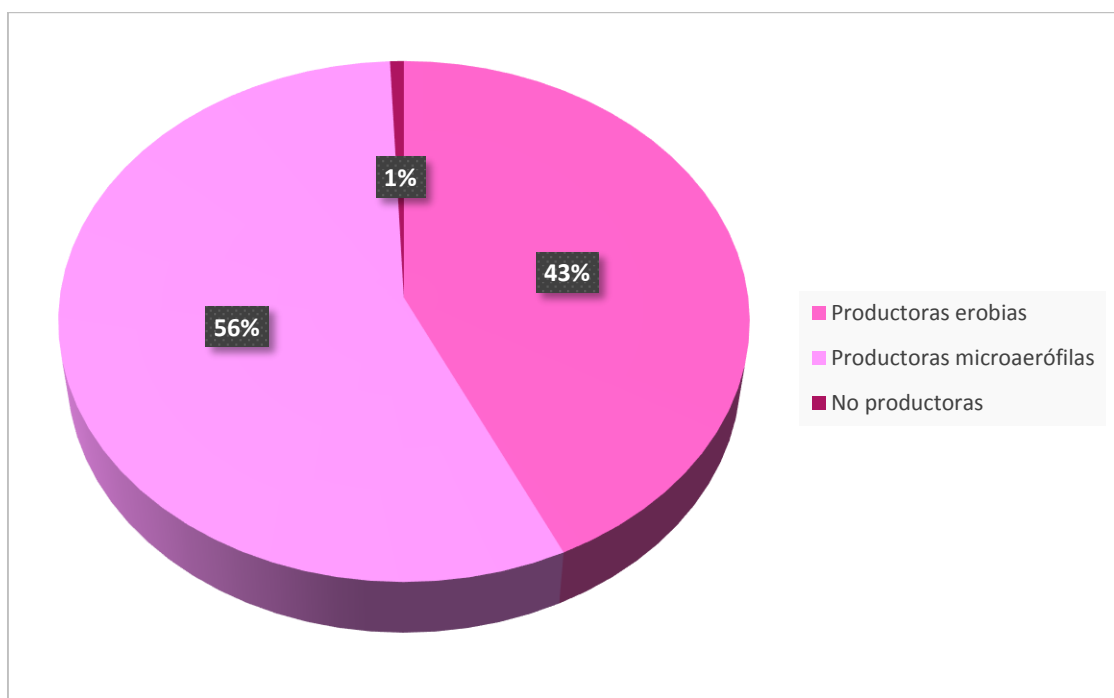
Continuación...

Bacterias rizosféricas	Fósforo	Bacterias rizosféricas	Fósforo
código UNPRG	Soluble (ppm)	código UNPRG	soluble (ppm)
<i>Burkholderia</i> sp.JMV11R	9,05	<i>Azospirillum</i> sp.NFb37R	5,54
<i>Beijerinckia</i> sp. 14R	9,02	<i>Azospirillum</i> sp.LGI34aR	5,43
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB39bR	8,95	<i>Beijerinckia</i> sp.48aR	5,10
<i>Beijerinckia</i> sp.1R	8,84	<i>Azospirillum</i> sp.LGI46R	4,84
<i>Azotobacter</i> sp. LG27R	8,66	<i>Azotobacter</i> sp.LG11AR	4,41
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB13R	8,58	<i>Beijerinckia</i> sp.11BR	4,31
<i>Azospirillum</i> sp.LGI21R	8,52	<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB37R	3,91
<i>Azotobacter</i> sp.LG12R	7,96	<i>Azotobacter</i> sp.LG13R	3,55
<i>Azospirillum</i> sp.NFb11R	7,83	<i>Beijerinckia</i> sp.5R	3,52
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB40R	7,60	<i>Azospirillum</i> sp.LGI27R	2,36
<i>Azospirillum</i> sp.LGI12R	7,43	<i>Azospirillum</i> sp. NFb20R	2,36
<i>Azospirillum</i> sp. sp.LGI17R	6,92	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB26R	2,36
<i>Burkholderia</i> sp.JMV17R	6,78	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB42R	2,36
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB20R	6,40	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P15R	1,96
<i>Azospirillum</i> sp. sp.NFb14R	6,17	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P37R	1,96
<i>Azotobacter</i> sp.LG32R	5,71	<i>Burkholderia</i> sp. JMV37R	1,96
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P54R	5,60	<i>Burkholderia</i> sp. JMV48R	1,96
<i>Beijerinckia</i> sp. 2BR	5,60	<i>Beijerinckia</i> sp.47R	1,96
<i>Beijerinckia</i> sp.3R	5,60	<i>Beijerinckia</i> sp.33R	1,96
<i>Azotobacter</i> sp. LG29R	5,60	<i>Derxia</i> sp. LGD16R	1,82
<i>Derxia</i> sp. LGD54R	5,60	<i>Azotobacter</i> sp. LG51R	1,82
<i>Azotobacter</i> sp. LG30R	5,60	<i>Derxia</i> sp. LGD5AR	1,82
<i>Derxia</i> sp. LGD5ER	5,60	<i>Azotobacter</i> sp. LG8R	1,82



**Tabla 7.** Fósforo (ppm) cuantificado en la solubilización por bacterias endófitas aisladas de *Portulaca oleracea* L.

Bacterias endófitas código UNPRG	Fósforo soluble (ppm)	Bacterias endófitas código UNPRG	Fósforo soluble (ppm)
<i>Azospirillum</i> sp.LGI54E	16,02	<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB32E	11,05
<i>Azospirillum</i> sp.NFb47E	13,98	<i>Burkholderia</i> sp.JMV6E	10,71
<i>Azospirillum</i> sp.NFb15E	13,35	<i>Burkholderia</i> sp.JMV21E	10,21
<i>Azospirillum</i> sp.NFb33E	13,30	<i>Gluconacetobacter</i> sp.LGI-P2BE	10,02
<i>Azospirillum</i> sp.LGI26E	12,64	<i>Burkholderia</i> sp.JMV27E	10,02
<i>Gluconacetobacter</i> sp.LGI-P12E	11,89	<i>Gluconacetobacter</i> sp.LGI-P38dE	9,65
<i>Burkholderia</i> sp.JMV19E	11,86	<i>Azospirillum</i> sp.LGI13E	9,31
<i>Burkholderia</i> sp.JMV1E	11,54	<i>Burkholderia</i> sp.JMV5E	8,87
<i>Burkholderia</i> sp.JMV20E	11,45	<i>Gluconacetobacter</i> sp.LGI-P53E	8,34
<i>Azospirillum</i> sp.LGI40E	11,44	<i>Azospirillum</i> sp.NFb17E	7,38
<i>Azospirillum</i> sp.NFb12E	11,44	<i>Azospirillum</i> sp.LGI34AE	6,99
<i>Azospirillum</i> sp.NFb46E	11,44	<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB29E	3,09
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB15E	11,39	<i>Azospirillum</i> sp.LGI34BE	2,75
<i>Azospirillum</i> sp.NFb22BE	11,32	<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB13E	2,51
<i>Azospirillum</i> sp.NFb53E	11,07	<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB21E	2,51
<i>Azospirillum</i> sp. LGI46AE	11,10	<i>Azospirillum</i> sp. NFb50E	2,51
<i>Azospirillum</i> sp. NFb43E	11,10	<i>Azospirillum</i> sp. LGI45E	2,51
<i>Azospirillum</i> sp. LGI46BE	11,10	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P2AE	2,51
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P38CE	11,10	<i>Azospirillum</i> sp. LGI9E	2,04
<i>Azospirillum</i> sp. NFb26E	11,10	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P14E	2,04
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P20E	11,10	<i>Azospirillum</i> sp. NFb27E	1,95
<i>Burkholderia</i> sp. JMV27E	11,10	<i>Burkholderia</i> sp. JMV20E	1,92
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB27E	11,10	<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB14E	1,91
<i>Burkholderia</i> sp. JMV14E	11,10	<i>Burkholderia</i> sp. JMV21	1,90
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB20E	11,10		



**Figura 78.** Porcentaje de bacterias rizosféricas que produjeron indoles *in vitro*.



**Figura 79.** Coloración observada en la cuantificación de indoles.

**Tabla 8.** Indoles producidos (ppm) por bacterias rizosféricas aisladas de *Portulaca oleracea* L.

Bacterias rizosféricas código UNPRG	Indoles (ppm)	Bacterias rizosféricas código UNPRG	Indoles (ppm)
<i>Azospirillum</i> sp.LGI18R	142,2	<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB21R	44,7
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB13R	92,2	<i>Burkholderia</i> sp.JMV53aR	44,1
<i>Azospirillum</i> sp.LGI12R	84,3	<i>Beijerinckia</i> sp.37aR	42,5
<i>Burkholderia</i> sp.JMV53bR	80,8	<i>Azospirillum</i> sp.NFb27R	41,7
<i>Azospirillum</i> sp.LGI27R	77,1	<i>Azospirillum</i> sp.NFb40R	40,3
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB16R	76,9	<i>Azotobacter</i> sp.LG47R	40,2
<i>Burkholderia</i> sp.JMV22bR	70,1	<i>Azotobacter</i> sp.LG37AR	39,6
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB20R	67,1	<i>Azospirillum</i> sp.NFb45R	39,1
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB40R	66,9	<i>Azotobacter</i> sp.LG13R	39,1
<i>Burkholderia</i> sp.JMV39R	66,7	<i>Azospirillum</i> sp.NFb37R	38,9
<i>Gluconacetobacter</i> spLGI-P45R	64,9	<i>Azospirillum</i> sp.NFb11R	38,9
<i>Burkholderia</i> sp.JMV17R	62,7	<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB39aR	37,4
<i>Burkholderia</i> sp.JMV41R	62,5	<i>Azotobacter</i> sp.LG10R	36,7
<i>Azospirillum</i> sp.LGI53R	62,2	<i>Azotobacter</i> sp.LG12R	36,0
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB34R	60,5	<i>Azospirillum</i> sp. LGI22R	36,0
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB19R	60,2	<i>Azospirillum</i> sp. LGI323R	36,0
<i>Burkholderia</i> sp.JMV11R	58,3	<i>Azospirillum</i> sp. LGI34BR	36,0
<i>Azospirillum</i> sp.NFb49R	58,3	<i>Azospirillum</i> sp. LGI24R	36,0
<i>Azospirillum</i> sp.NFb24R	56,9	<i>Azospirillum</i> sp. NFb36R	36,0
<i>Azotobacter</i> sp. LG27R	56,7	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB50R	35,0
<i>Azospirillum</i> sp.LGI17R	54,1	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P54R	35,0
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB37R	52,5	<i>Beijerinckia</i> sp. 2BR	35,0
<i>Azospirillum</i> sp.LGI34aR	52,5	<i>Beijerinckia</i> sp.3R	34,2
<i>Azotobacter</i> sp.LG37BR	51,9	<i>Azotobacter</i> sp. LG29R	34,2
<i>Azospirillum</i> sp.NFb47R	51,4	<i>Azotobacter</i> sp.LG25R	34,7
<i>Gluconacetobacter</i> spLGI-P33R	51,4	<i>Azotobacter</i> sp. LG30R	33,2
<i>Beijerinckia</i> sp. 1R	51,4	<i>Beijerinckia</i> sp.9AR	33,3
<i>Azospirillum</i> sp.LGI20R	50,8	<i>Derxia</i> sp. LGD54R	33,2
<i>Derxia</i> sp. LGD5CR	49,2	<i>Derxia</i> sp. LGD5ER	32,3
<i>Burkholderia</i> sp.JMV49R	46,0	<i>Beijerinckia</i> sp.2AR	32,7
<i>Azospirillum</i> sp.LGI30R	45,9	<i>Burkholderia</i> sp.JMV19R	31,9
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB23R	45,2	<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB29R	31,6

Continuación...

Bacterias rizosféricas código UNPRG	Indoles (ppm)	Bacterias rizosféricas código UNPRG	Indoles (ppm)
<i>Azospirillum</i> sp.NFb14R	30,9	<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB11R	17,4
<i>Burkholderia</i> spJMV27R	30,5	<i>Azospirillum</i> sp.LGI38R	17,1
<i>Azotobacter</i> sp.LG33R	30,5	<i>Azotobacter</i> sp.LG32R	17,0
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB47R	30,3	<i>Beijerinckia</i> sp.14R	16,5
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB39bR	30,1	<i>Beijerinckia</i> sp.4R	16,3
<i>Azospirillum</i> sp.LGI26R	28,6	<i>Azospirillum</i> sp.LGI19R	13,7
<i>Burkholderia</i> spJMV47R	27,7	<i>Azospirillum</i> sp.NFb16R	12,3
<i>Azospirillum</i> sp.LGI46R	27,6	<i>Derxia</i> sp. LGD5DR	12,1
<i>Azospirillum</i> sp.NFb19R	26,5	<i>Azospirillum</i> sp.LGI11R	9,8
<i>Azospirillum</i> sp.LGI21R	26,2	<i>Burkholderia</i> spJMV31R	9,0
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB49R	26,1	<i>Azospirillum</i> sp.LGI32R	8,6
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB48R	26,1	<i>Azospirillum</i> sp.NFb31R	8,6
<i>Beijerinckia</i> sp.5R	25,7	<i>Azospirillum</i> sp.LGI49R	8,6
<i>Azospirillum</i> sp.LGI16R	25,4	<i>Azotobacter</i> sp. LG8R	7,4
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB27R	25,1	<i>Azospirillum</i> sp. NFb20R	7,4
<i>Beijerinckia</i> sp.32R	24,8	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB26R	7,4
<i>Azospirillum</i> sp.NFb42R	23,7	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFB42R	6,8
<i>Beijerinckia</i> sp.11BR	23,4	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P15R	6,8
<i>Derxia</i> sp. LGD5BR	22,1	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P37R	6,2
<i>Azotobacter</i> sp.LG11AR	19,6	<i>Burkholderia</i> sp. JMV37R	6,2
<i>Beijerinckia</i> sp.48aR	19,4	<i>Burkholderia</i> sp. JMV48R	6,2
<i>Azotobacter</i> sp.LG11BR	19,1	<i>Beijerinckia</i> sp.47R	5,5
<i>Derxia</i> sp. LGD7R	19,1	<i>Beijerinckia</i> sp.33R	5,5
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB22R	18,5	<i>Derxia</i> sp. LGD16R	5,5
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB14R	18,5	<i>Azotobacter</i> sp. LG51R	5,2
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB41R	18,0	<i>Derxia</i> sp. LGD5AR	5,2
<i>Azospirillum</i> sp.NFb21R	17,4	<i>Azotobacter</i> sp. LG8R	4,3

Con las bacterias endófitas (Tabla 9) las concentraciones máximas de indoles producidos fueron: 85,3ppm (*Herbaspirillum* sp.JNFb15E); 64,9ppm (*Gluconacetobacter* sp.LGI-P45E); 60ppm (*Azospirillum* sp.NFb 33E) y 49,6ppm (*Burkholderia* sp.JMV21E).

#### **4.10 Tolerancia de las bacterias rizosféricas y endófitas a diferentes concentraciones de cloruro de sodio**

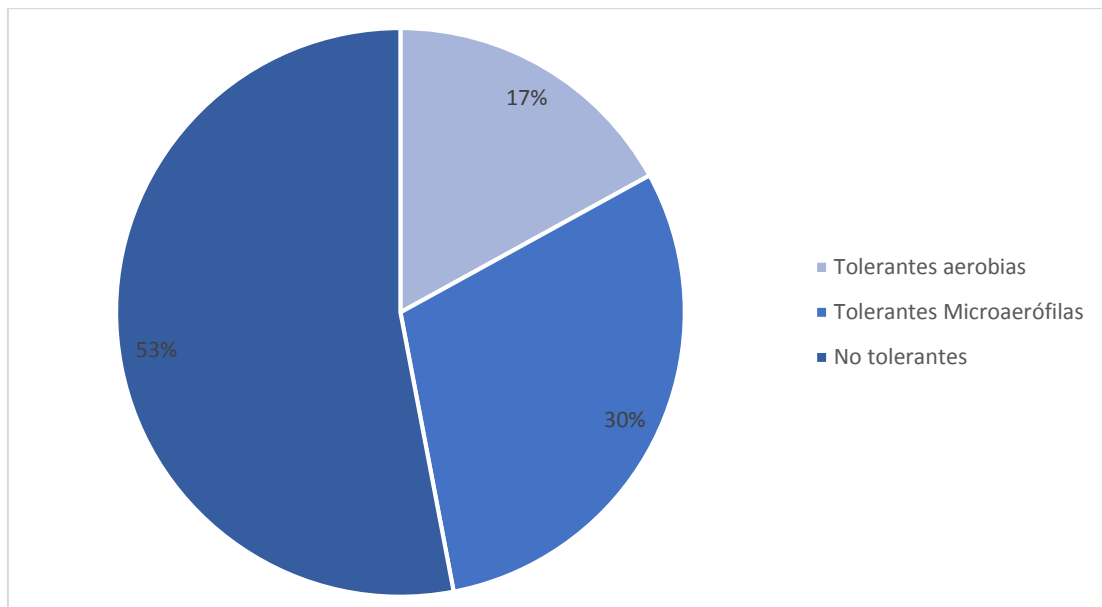
El 47%(121) de cultivos de bacterias rizosféricas; 17%(44) aerobias y 30%(77) microaerófilas y el 26%(66) de bacterias endófitas toleraron una concentración de 5% de cloruro de sodio (Figuras 80,81). Asimismo, el 20% (50) de cultivos de bacterias rizosféricas: 8%(20); aerobias y 12%(30) microaerófilas y 16%(41) de bacterias endófitas toleraron una concentración de 10% de cloruro de sodio (Figuras 82,83).

#### **4.11 Bacterias rizosféricas y endófitas seleccionadas**

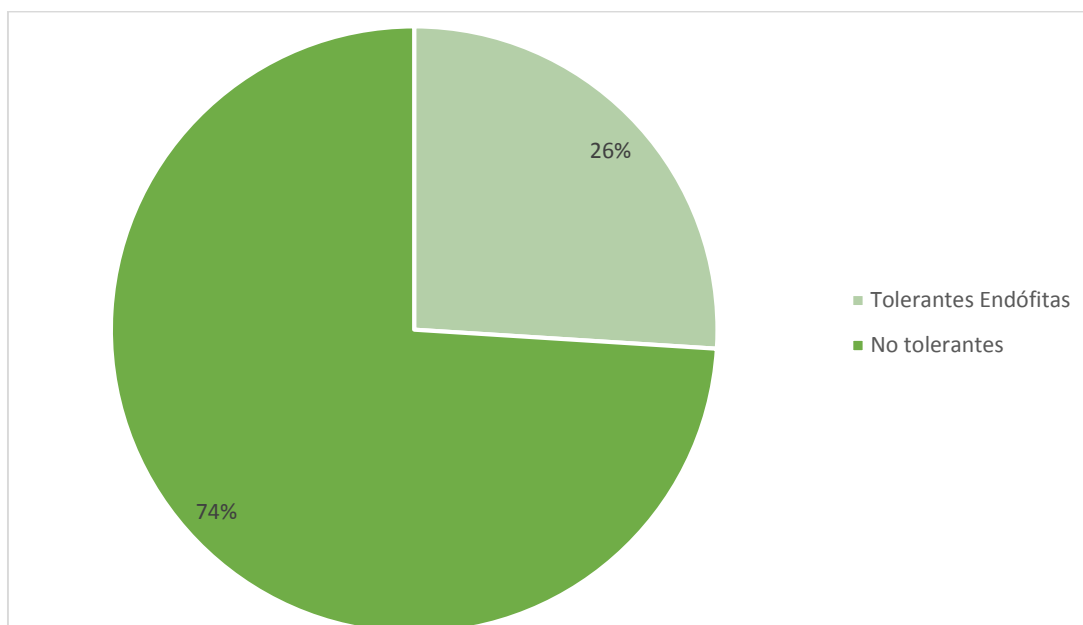
Las bacterias que toleraron 10 % de cloruro de sodio y alcanzaron los mayores valores en la concentración de amonio, fósforo soluble e indoles, fueron investigadas para determinar el efecto en el desarrollo vegetativo de *Lycopersicon esculentum* Mill. considerándose 16 cultivos de bacterias rizosféricas: (ocho aerobias y ocho microaerófilas) y ocho endófitas (Tabla 10).

**Tabla 9.** Indoles producidos (ppm) por bacterias endófitas aisladas de *Portulaca oleracea* L.

Bacterias endófitas código UNPRG	Indoles producidos (ppm)	Bacterias endófitas código UNPRG	Indoles producidos (ppm)
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB15E	85,3	<i>Azospirillum</i> sp.NFb53E	28,4
<i>Gluconacetobacter</i> sp.LGI-P45E	64,9	<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB29E	28,1
<i>Gluconacetobacter</i> sp.LGI-P2BE	64,5	<i>Azospirillum</i> sp.NFb17E	27,9
<i>Azospirillum</i> sp.NFb33E	60,0	<i>Azospirillum</i> sp.NFb15E	25,6
<i>Azospirillum</i> sp.NFb46E	54,2	<i>Burkholderia</i> spJMV20E	23,4
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB13E	53,0	<i>Burkholderia</i> spJMV1E	20,0
<i>Burkholderia</i> spJMV21E	49,6	<i>Azospirillum</i> sp.LGI54E	19,9
<i>Azospirillum</i> sp.LGI34AE	46,5	<i>Burkholderia</i> spJMV19E	19,1
<i>Azospirillum</i> sp.LGI40E	46,5	<i>Gluconacetobacter</i> spLGI-P12E	18,0
<i>Azospirillum</i> sp.NFb47E	46,2	<i>Azospirillum</i> sp.NFb12E	17,4
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB32E	37,5	<i>Burkholderia</i> spJMV5E	12,1
<i>Burkholderia</i> spJMV6E	33,7	<i>Azospirillum</i> sp.LGI13E	12,1
<i>Azospirillum</i> sp.LGI38E	30,9	<i>Azospirillum</i> sp.LGI34BE	12,1
<i>Azospirillum</i> sp.NFb22BE	30,6	<i>Burkholderia</i> spJMV27E	11,5
<i>Azospirillum</i> sp. LGI46AE	30,6	<i>Azospirillum</i> sp. NFb50E	11,5
<i>Azospirillum</i> sp. NFb43E	30,6	<i>Azospirillum</i> sp. LGI45E	10,8
<i>Azospirillum</i> sp. LGI46BE	30,6	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P2AE	10,8
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P38CE	30,6	<i>Azospirillum</i> sp. LGI9E	10,8
<i>Azospirillum</i> sp. NFb26E	26,2	<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P14E	10,5
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P20E	26,2	<i>Azospirillum</i> sp. NFb27E	10,5
<i>Burkholderia</i> sp. JMV27E	25,3	<i>Burkholderia</i> sp. JMV20E	9,6
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB27E	25,3	<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB14E	9,5
<i>Burkholderia</i> sp. JMV14E	24,1	<i>Burkholderia</i> sp. JMV21	9,3
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB20E	27,6	<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFB21E	8,8

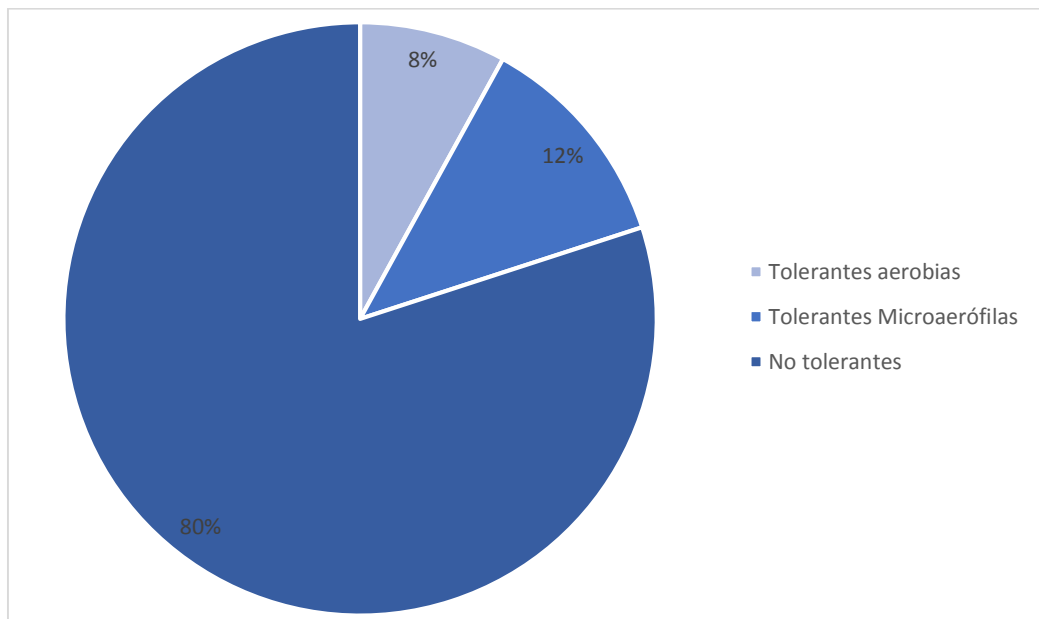


**Figura 80.** Frecuencia de bacterias rizosféricas tolerantes a 5% de cloruro de sodio.

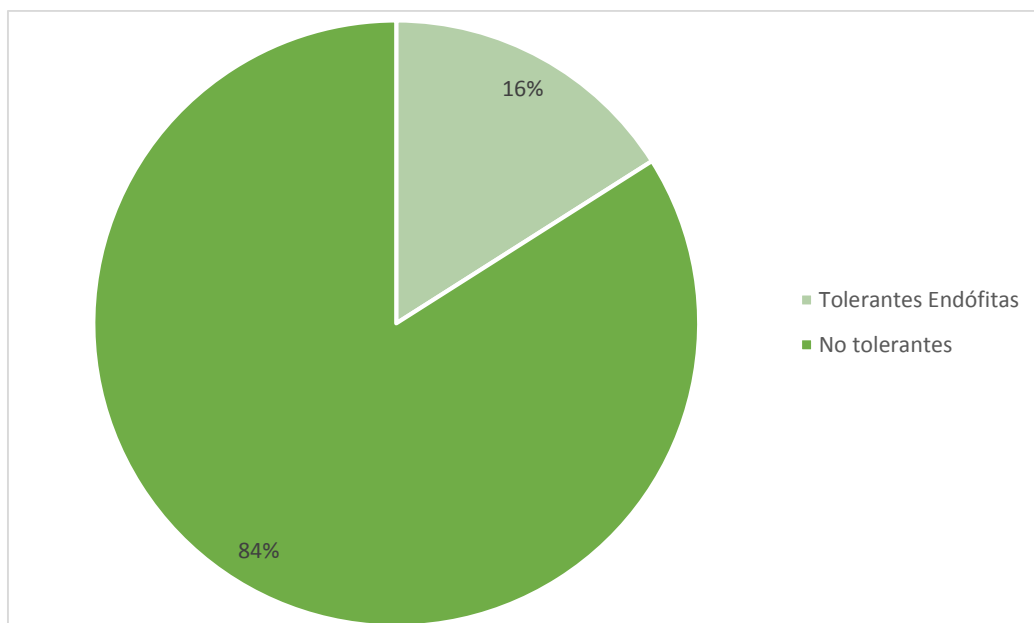


**Figura 81.** Frecuencia de bacterias endófitas tolerantes a 5% de cloruro de sodio.





**Figura 82.** Frecuencia de bacterias rizosféricas tolerantes a 10% de cloruro de sodio.



**Figura 83.** Frecuencia de bacterias endófitas tolerantes a 10% de cloruro de sodio.

**Tabla 10.** Características de bacterias rizosféricas y endófitas aisladas de *Portulaca oleracea* L.

Bacterias código	Amonio (ppm)	Fósforo (ppm)	Indoles (ppm)	Tolerancia NaCl 10%
<i>Azotobacter</i> sp. LG11ARA	27,2	4,4	19,1	+
<i>Azotobacter</i> sp. LG11BRA	7,2	14,7	19,6	+
<i>Azotobacter</i> sp. LG33RA	8,8	11,2	30,0	+
<i>Azotobacter</i> sp. LG25RA	8,0	8,6	34,7	+
<i>Azotobacter</i> sp. LG27RA	8,0	8,6	56,7	+
<i>Beijerinckia</i> sp. 53AA	1,6	15,3	95,6	+
<i>Derxia</i> sp. LGD5CRA	2,4	6,7	49,2	+
<i>Derxia</i> sp. LGD7RA	4,0	10,9	19,1	+
<i>Azospirillum</i> sp. NFb42RM	14,4	13,9	23,7	+
<i>Azospirillum</i> sp. NFb447RM	8,8	12,8	51,4	+
<i>Azospirillum</i> sp. LGI49RM	10,4	9,3	3,6	+
<i>Azospirillum</i> sp. LGI12RM	9,6	7,4	84,3	+
<i>Burkholderia</i> sp. JMV47RM	12,0	6,7	27,7	+
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P40RM	1,6	8,8	73,3	+
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb22RM	10,4	9,6	18,5	+
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb20RM	20,8	6,4	67,1	+
<i>Azospirillum</i> sp. NFb46E	3,2	11,4	54,2	+
<i>Azospirillum</i> sp. NFb50E	13,6	4,7	85,3	+
<i>Azospirillum</i> sp. LGI34AE	21,6	6,9	46,5	+
<i>Azospirillum</i> sp. LGI38E	4,8	8,4	30,9	+
<i>Burkholderia</i> sp. JMV1E	23,2	11,5	20,0	+
<i>Burkholderia</i> sp. JMV44E	3,2	13,2	36,2	+
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P20E	3,2	11,1	26,2	+
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb15E	13,2	4,7	85,3	+

RA= Rizosféricas aerobias, RM= Rizosféricas microaerófilas, E= Endófitas

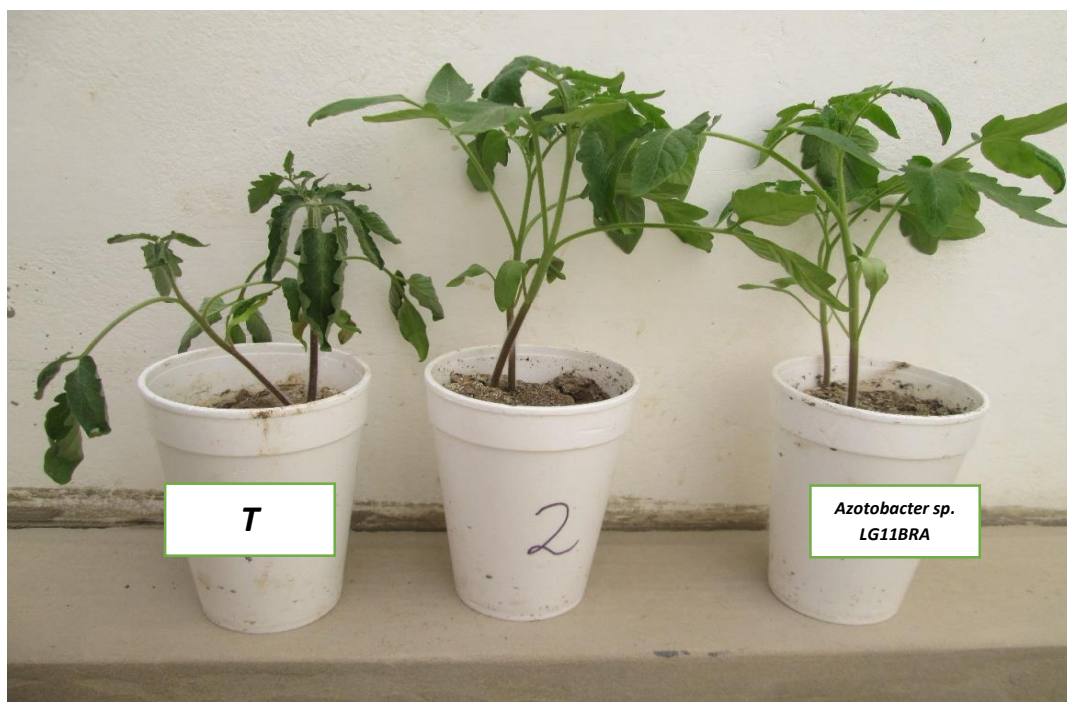
#### 4.8 Efecto de las bacterias rizosféricas y endófitas en *Lycopersicon esculentum* Mill.

El análisis de los valores de la altura, biomasa radicular y aérea de las plantas de tomate, demostró que el desarrollo vegetativo fue incrementado con la inoculación de las bacterias rizosféricas y endófitas investigadas. Los valores de altura de planta a los 30, 45 y 60 días de la inoculación así como la biomasa radical y aérea a los 60 días, presentaron distribución normal ( $p>0,05$ ) y homogeneidad de varianzas ( $p>0,05$ ), por lo que se realizó el análisis de varianza y la prueba de Tukey (Anexos 6 a 10).

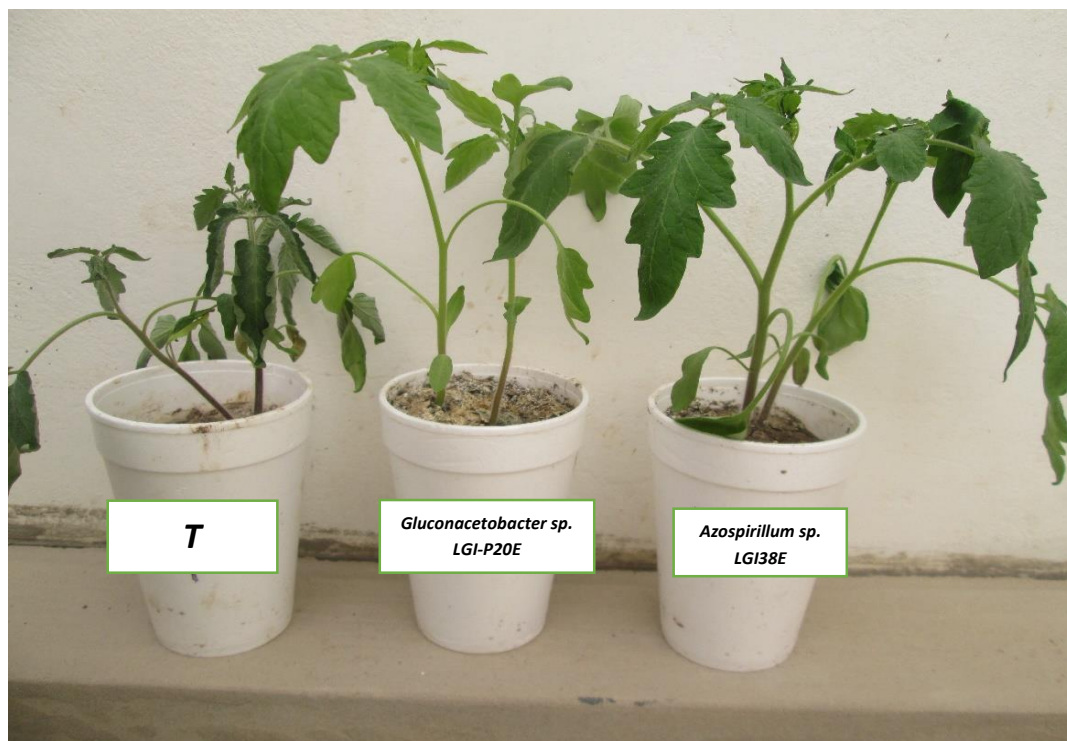
La altura de las plantas de tomate a los 30 días fue de 7,0-13,3cm con *Burkholderia* sp.JMV44E y *Azospirillum* sp.LGI38E, respectivamente y 7,0cm en el testigo absoluto (Figuras 84, 85, 86), registrándose índices de efectividad de 14,2% con *Derxia* sp.LGD5CRA y 90,0% con *Azospirillum* sp.LGI38E (Tabla 11). El análisis de varianza de los valores de altura demostró alta significancia (Anexo 6) y según la prueba múltiple de Tukey el mayor valor se alcanzó con *Azospirillum* sp.LGI38E no diferenciándose significativamente de *Azotobacter* sp.33RA y *Burkholderia* sp. 47RM, 1E, pero si de los demás tratamientos. (Tabla 12).

La altura de las plantas de tomate a los 45 días fue de 10,8-17,3cm con *Herbaspirillum* sp.JNFb20RM y *Azospirillum* sp.LGI38E, respectivamente y 12cm en el testigo absoluto (Figuras 87, 88, 89), registrándose índices de efectividad de 2,1% con *Azospirillum* sp.NFb50E 44,4% y con *Azospirillum* sp.LGI38E (Tabla 11). El análisis de varianza demostró alta significancia (Anexo 7) y según la prueba múltiple de Tukey el mayor valor se alcanzó con *Azospirillum* sp.LGI38E no diferenciándose significativamente de *Azospirillum* spp. 42RM, 47 RM; *Azotobacter* spp. 11ARA, 11BRA, 33RA, 25RA, 27RA; *Beijerinckia* sp.53AA; *Burkholderia* sp.47RM; *Derxia* sp.7RA y *Gluconacetobacter* sp.20E, pero si de los demás tratamientos (Tabla12).

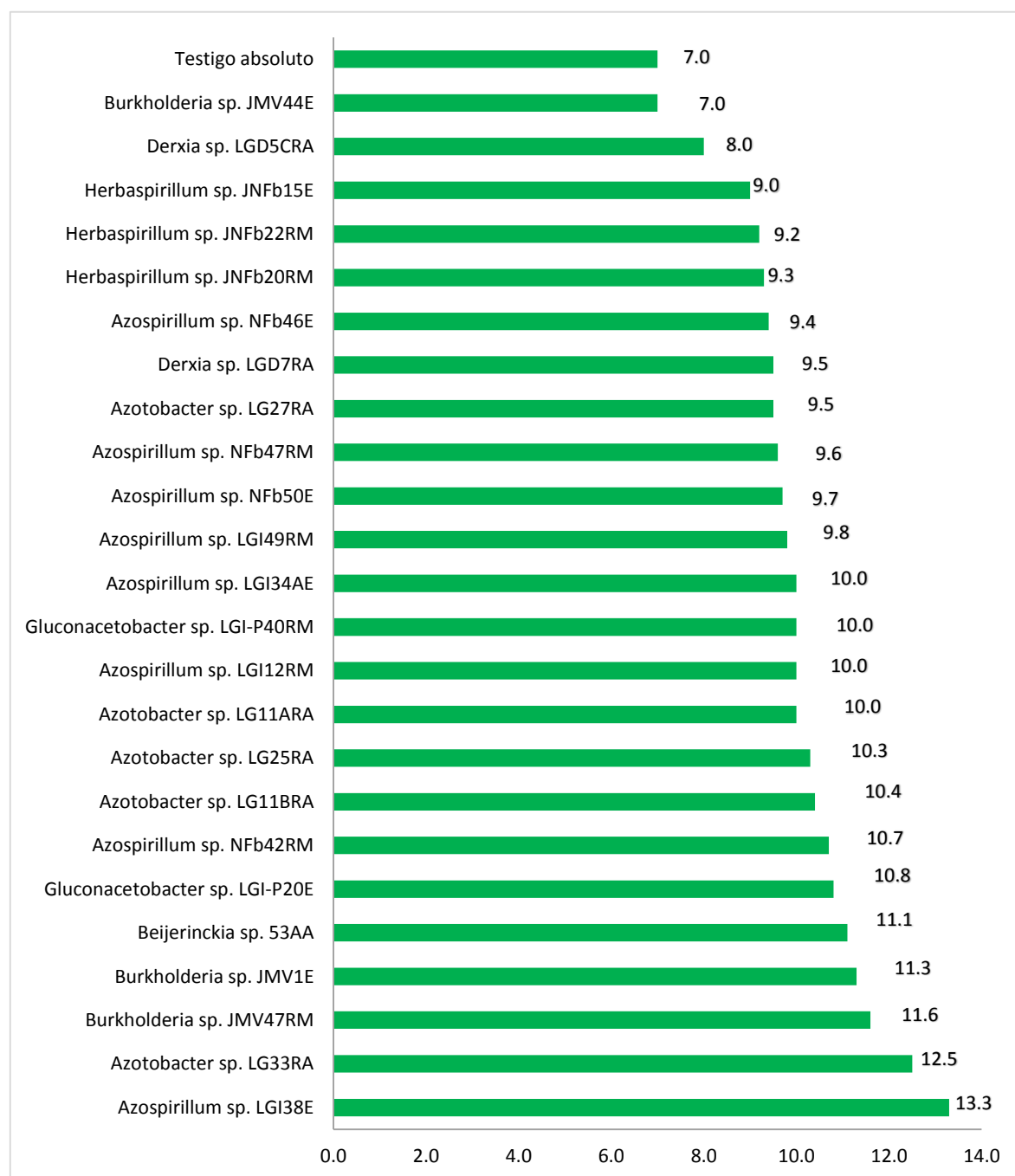
La altura de las plantas de tomate a los 60 días fue de 15,6-22,1cm con *Herbaspirillum* sp.JNFb20RM y *Azospirillum* sp.NFb42RM, respectivamente y 16,1 cm en el testigo absoluto (Figuras 90, 91, 92), registrándose índices de efectividad de 3,1% con *Herbaspirillum* sp.JNFb20RM y 37,2% con *Azospirillum* sp.NFb42RM (Tabla 11).



**Figura 84.** Altura de *Lycopersicon esculentum* Mill., 30 días después de la inoculación de bacterias rizosféricas, 2016.



**Figura 85.** Altura de *Lycopersicon esculentum* Mill. 30 días después de la inoculación de bacterias endófitas, 2016.



**Figura 86.** Altura (cm) de *Lycopersicon esculentum* Mill., 30 días después de la inoculación de bacterias rizosféricas y endófitas, 2016.

**Tabla 11.** Índices de efectividad en la altura de plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill., 30, 45 y 60 después de la inoculación de

Tratamientos UNPRG	IE%		
	30días	45días	60días
<i>Azotobacter</i> sp. LG11ARA	42,9	21,5	19,2
<i>Azotobacter</i> sp. LG11BRA	48,5	38,9	30,4
<i>Azotobacter</i> sp. LG33RA	78,6	25,7	19,0
<i>Azotobacter</i> sp. LG25RA	47,1	20,1	23,7
<i>Azotobacter</i> sp. LG27RA	28,5	20,1	8,6
<i>Beijerinckia</i> sp. 53AA	58,6	24,3	26,7
<i>Derxia</i> sp. LGD5CRA	14,2	4,2	5,5
<i>Derxia</i> sp. LGD7RA	35,7	33,1	26
<i>Azospirillum</i> sp. NFb42RM	52,8	43,1	37,2
<i>Azospirillum</i> sp. NFb47RM	37,1	29,9	11,8
<i>Azospirillum</i> sp. LGI49RM	40,0	18,8	4,9
<i>Azospirillum</i> sp. LGI12RM	42,9	15,3	14,2
<i>Burkholderia</i> sp. JMV47RM	65,7	24,3	12,4
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P40RM	42,9	14,6	8,6
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb22RM	31,4	0	21,1
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb20RM	32,8	0	3,1
<i>Azospirillum</i> sp. NFb46E	34,2	0	6,21
<i>Azospirillum</i> sp. NFb50E	38,6	2,1	9,31
<i>Azospirillum</i> sp. LGI34AE	42,9	16,9	13,6
<i>Azospirillum</i> sp. LGI38E	90,0	44,4	35,4
<i>Burkholderia</i> sp. JMV1E	61,4	21,5	26,0
<i>Burkholderia</i> sp. JMV44E	0	13,8	4,34
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P20E	54,2	33,3	18,1
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb15E	28,5	14,6	8,0

bacterias rizosféricas y endófitas.

\*Promedio de tres repeticiones

**Tabla 12.** Prueba de Tukey de la altura de plantas de *Lycopersicon esculentum* Mil.

30, 45 y 60 días después de la inoculación de bacterias rizosféricas y endófitas

\*Promedio de tres repeticiones

Tratamientos UNPRG	Altura (cm)*					
	30días	Sign.	45días	Sign.	60días	Sign.
<i>Azotobacter</i> sp. LG11ARA	10,0	c d e	14,6	a b c f e f g	19,2	a b c d e f
<i>Azotobacter</i> sp. LG11BRA	10,4	c d e	16,7	a c	21,0	a b
<i>Azotobacter</i> sp. LG33RA	12,5	a b	15,1	a b c d e	19,1	a b c d e f
<i>Azotobacter</i> sp. LG25RA	10,3	c d e	14,4	a b c d e f g	19,9	a b c d
<i>Azotobacter</i> sp. LG27RA	9,5	d e f g	14,4	a b c d e f g	17,5	b c d e f
<i>Beijerinckia</i> sp. 53AA	11,1	b c d	14,9	a b c d e f	20,4	a b c d
<i>Derxia</i> sp. LGD5CRA	8,0	f g h i	12,5	d e f g h	17,0	c d e f
<i>Derxia</i> sp. LGD7RA	9,5	d e f	16,0	a b c	20,3	a b c
<i>Azospirillum</i> sp. NFb42RM	10,7	b c d e	17,2	a b	22,1	a
<i>Azospirillum</i> sp. NFb47RM	9,6	d e f	15,6	a b c d e	18,0	a b c d e f
<i>Azospirillum</i> sp. LGI49RM	9,8	d e f	14,3	a b c d e f g	16,9	c d e f
<i>Azospirillum</i> sp. LGI12RM	10,0	c d e	13,8	c d e f g h	18,4	a b c d e f
<i>Burkholderia</i> sp. JMV47RM	11,6	a b c	14,9	a b c d e f	18,1	b c d e f
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P40RM	10,0	b c d e	13,8	c d e f g h	17,5	a b c d e f
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb22RM	9,2	e f g h	11,4	g h	19,5	a b c d
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb20RM	9,3	e f g h	10,8	h	15,6	f
<i>Azospirillum</i> sp. NFb46E	9,4	d e f g	11,7	f g h	16,1	d e f
<i>Azospirillum</i> sp. NFb50E	9,7	d e f	12,3	e f g h	17,6	b c d e f
<i>Azospirillum</i> sp. LGI34AE	10,0	c d e	14,0	b c d e f g	18,3	a b c d e f
<i>Azospirillum</i> sp. LGI38E	13,3	a	17,3	a	21,8	a b
<i>Burkholderia</i> sp. JMV1E	11,3	a b c	14,6	a b c d e f g	20,3	a b c
<i>Burkholderia</i> sp. JMV44E	7,0	h i	13,7	c d e f g h	16,8	c d e f
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P20E	10,8	b c d e	16,0	a b c	19,1	a b c d e f
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb15E	9,0	g h i	13,8	c d e f g h	17,4	b c d e f
Testigo	7,0	i	12,0	e f g h	16,1	e f

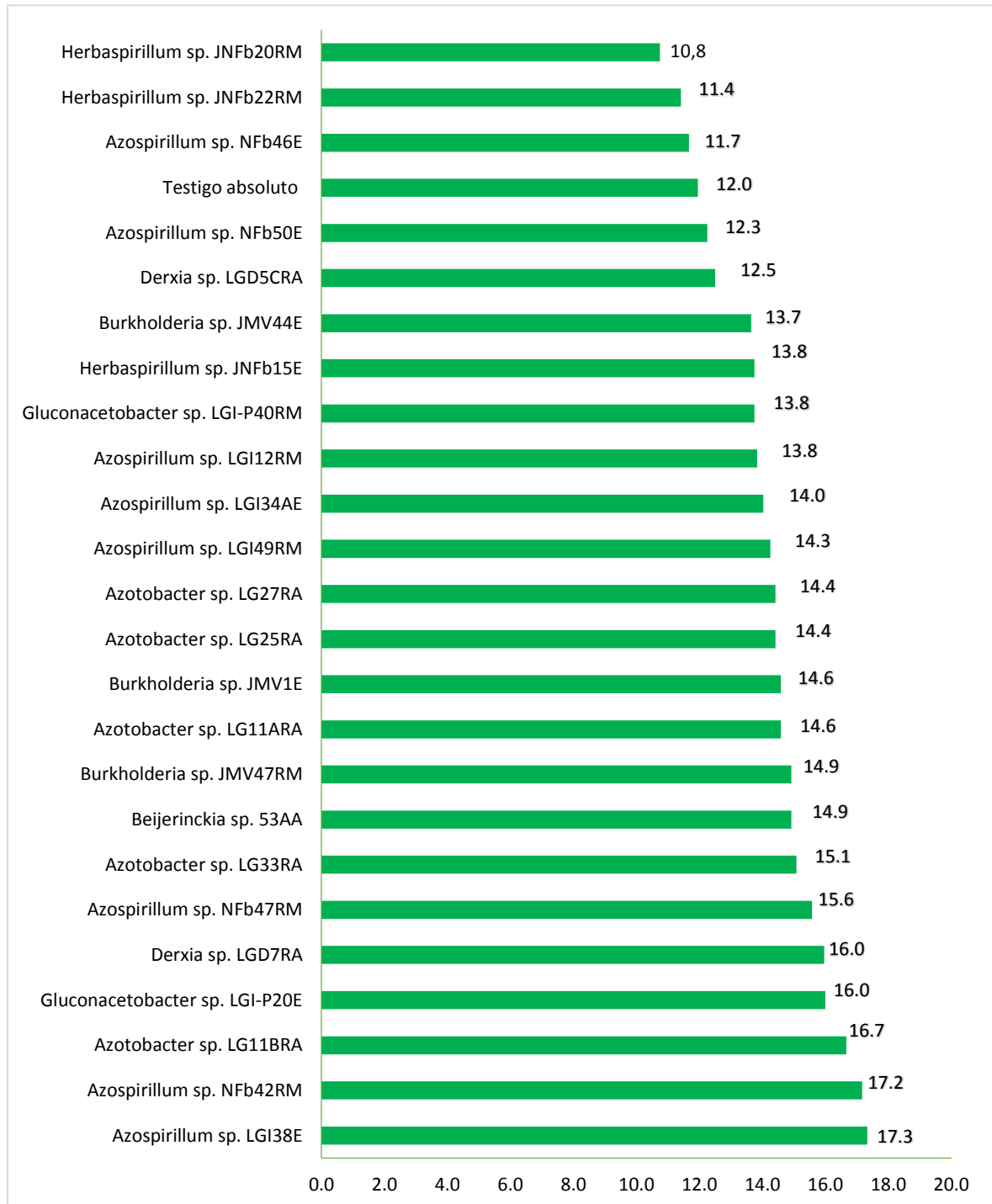




**Figura 87.** Altura de *Lycopersicon esculentum* Mill. 45 días después de la inoculación de bacterias rizosféricas, 2016.



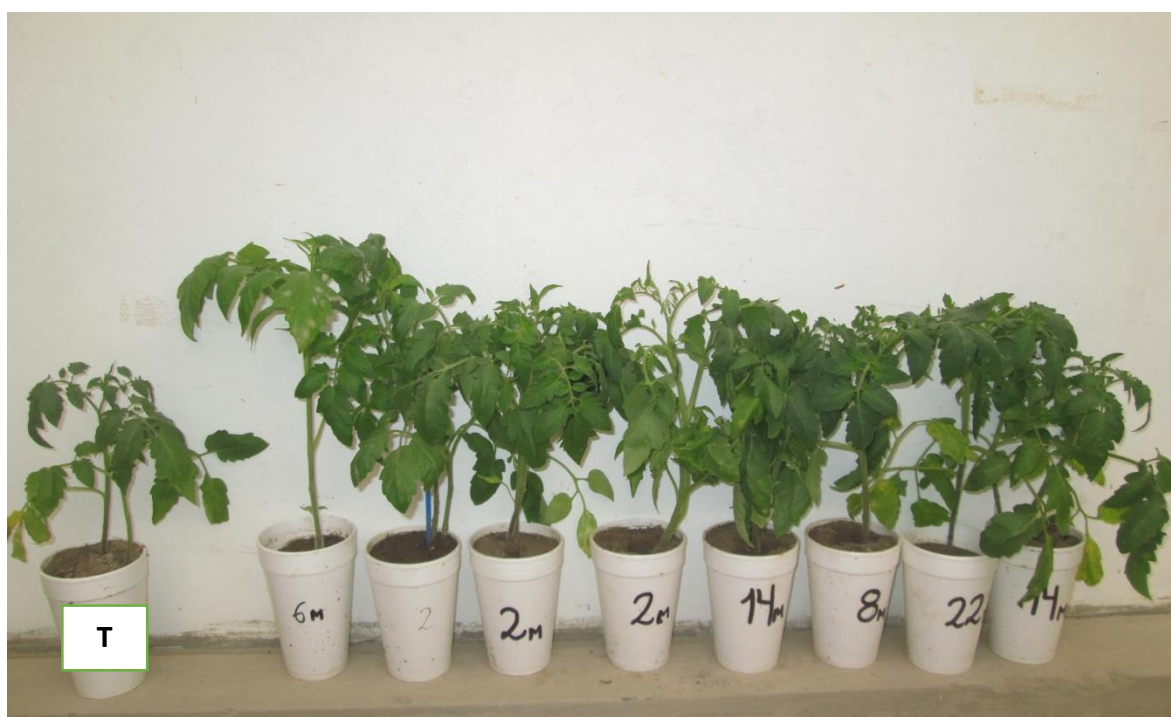
**Figura 88.** Altura de *Lycopersicon esculentum* Mill. 45 días después de la inoculación de bacterias endófitas, 2016.



**Figura 89.** Altura (cm) de *Lycopersicon esculentum* Mill., 45 días después de la inoculación de bacterias rizosféricas y endófitas, 2016.

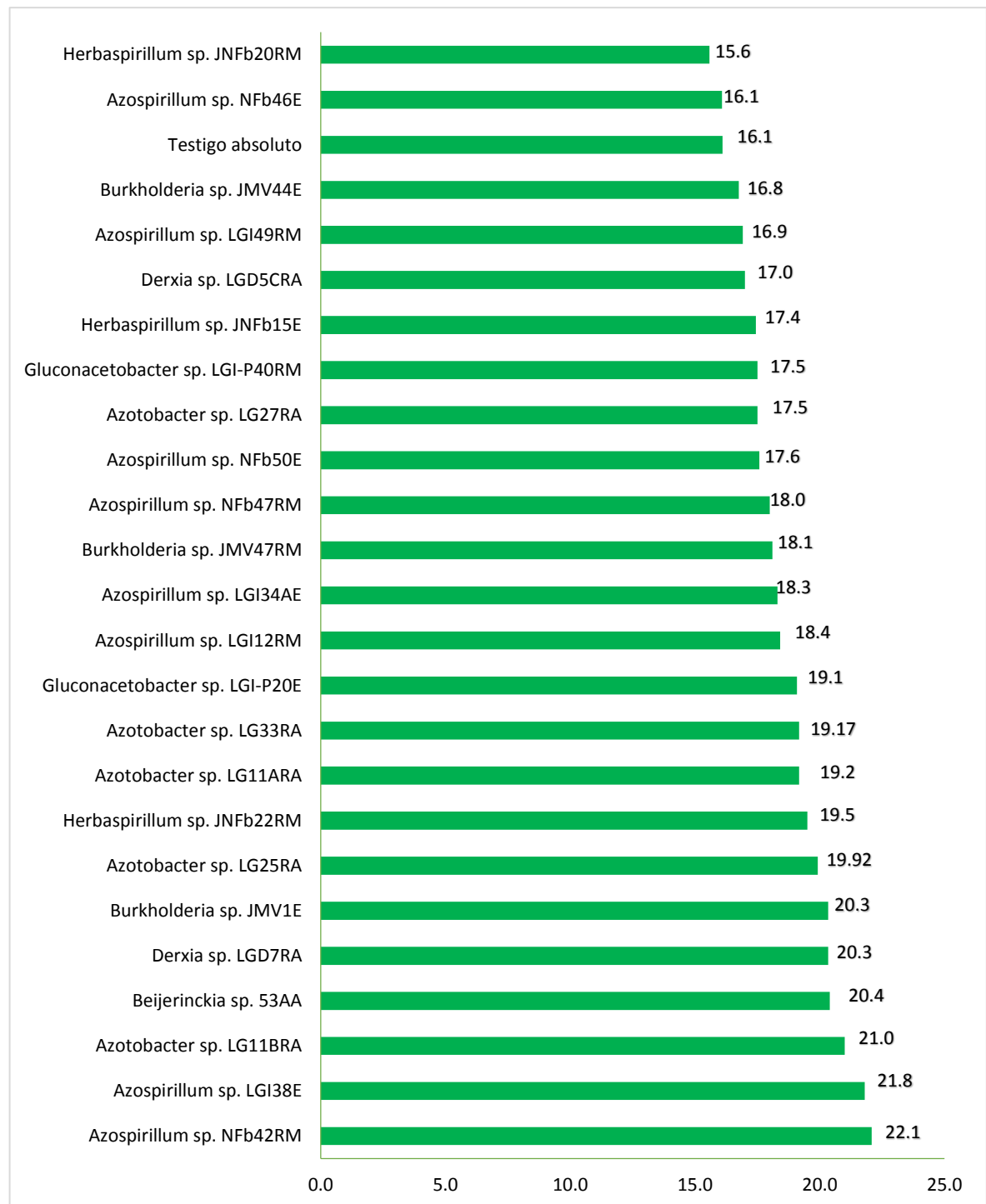


**Figura 90.** Altura de *Lycopersicon esculentum* Mill. en 60 días después de la inoculación de bacterias rizosféricas, 2016.



**Figura 91.** Altura de *Lycopersicon esculentum* Mill. en 60 días después de la inoculación de bacterias endófitas , 2016.

**Figura 92.** Altura (cm) de *Lycopersicon esculentum* Mill., 60 días después de la



inoculación de bacterias rizosféricas y endófitas, 2016.

El análisis de varianza demostró alta significancia (Anexo 8) y según la prueba múltiple de Tukey los mayores valores se alcanzaron con *Azospirillum* spp.NFb42RM no diferenciándose significativamente de *Azotobacter* spp. 11ARA, 11BRA, 33RA, 25RA, 53RM, 47RM, 12RM, 34AE, 38E; *Beijerinckia* sp.53AA; *Burkholderia* sp.1E, *Dexia* sp.7RA y *Gluconacetobacter* spp.40RM, 20E, pero si de los demás tratamientos (Tabla 12).

La biomasa radicular seca de las plantas de tomate a los 60 días fue de 0,1-0,6g con *Azotobacter* sp.LG25RA y *Azospirillum* sp.NFb50E-*Burkholderia* sp.JMV47RM, respectivamente y 0,2g en el testigo absoluto (Figuras 93, 94, 95), registrándose índices de efectividad de 50% con *Azotobacter* sp.LG33RA, *Beijerinckia* sp.53AA, *Dexia* sp.LGD7RA, *Azospirillum* spp.NFb47RM, y LGI49RM, *Azospirillum* sp.NFb46E y *Burkholderia* sp.JMV44E y 200% con *Azospirillum* sp. NFb50E y *Burkholderia* sp.JMV47RM (Tabla 13). El análisis de varianza de los valores de la biomasa radicular demostró alta significancia y según la prueba múltiple de Tukey el mayor valor se alcanzó con *Azospirillum* spp.NFb50E, no diferenciándose significativamente de *Azospirillum* spp. 12RM, 47RM, 49RM, 42RM, 38E, 34AE, 46E; *Azotobacter* spp. 11BRA, 33RA; *Beijerinckia* sp.53AA; *Burkholderia* sp.47RM; *Gluconacetobacter* spp.P20E, P40RM; y *Herbaspirillum* sp. 15E pero si diferenciándose significativamente de los demás tratamientos (Tabla 14).

La biomasa aérea seca de las plantas de tomate a los 60 días fue de 0,7-4,2g con *Dexia* sp.LGD7RA y *Azospirillum* sp.LGI38E, respectivamente y 2,6g en el testigo absoluto (Figuras 96, 97, 98), registrándose índices de efectividad de 4% con *Dexia* sp.LGD5CRA y 62% con *Azospirillum* sp.LGI38E (Tabla 14). El análisis de varianza de los valores de la biomasa demostró alta significancia y según la prueba múltiple de Tukey el mayor valor se alcanzó *Azospirillum* sp.LGI38E, no diferenciándose significativamente de *Herbaspirillum* sp.JNFb15E; *Azospirillum* sp.NFb50E y *Burkholderia* sp.JMV47RM, pero si de los demás tratamientos (Tabla14).

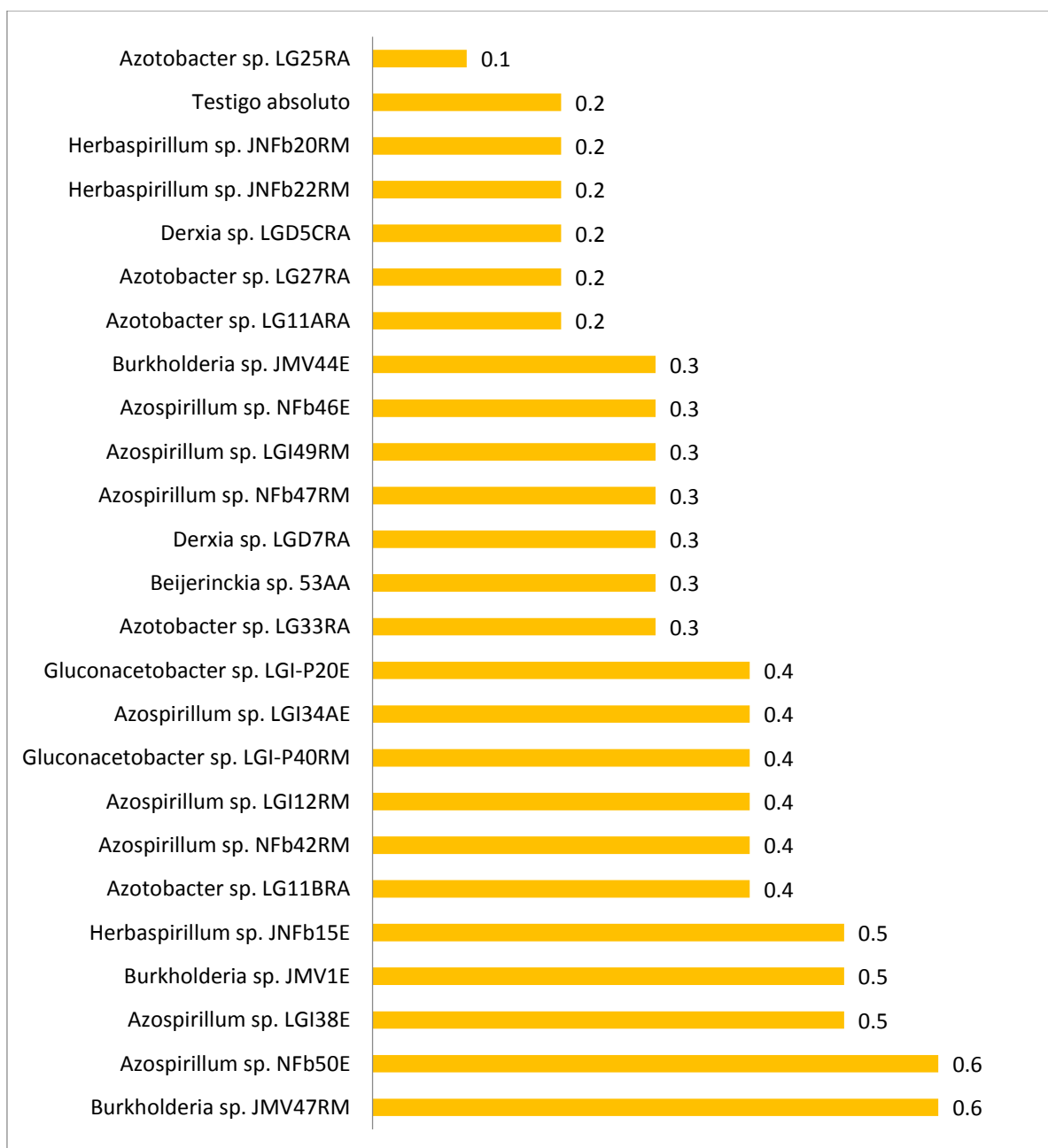




**Figura 93.** Raíces de *Lycopersicon esculentum* Mill., 60 días después de la inoculación de bacterias rizosféricas, 2016.



**Figura 94.** Raíces de *Lycopersicon esculentum* Mill., 60 días después de la inoculación de bacterias endófitas, 2016.



**Figura 95.** Biomasa radicular (g) de *Lycopersicon esculentum* Mil., 60 días después de la inoculación de bacterias rizosféricas y endófitas 2016.

**Tabla 13.** Índices de efectividad en la biomasa radicular y aérea de *Lycopersicon esculentum* Mill., 60 días después de la inoculación de bacterias rizosféricas y endófitas

Tratamientos	Biomasa (IE%)	
	Radicular	Aérea
UNPRG		
<i>Azotobacter</i> sp. LG11ARA	0	0
<i>Azotobacter</i> sp. LG11BRA	100	8
<i>Azotobacter</i> sp. LG33RA	50	0
<i>Azotobacter</i> sp. LG25RA	0	0
<i>Azotobacter</i> sp. LG27RA	0	0
<i>Beijerinckia</i> sp. 53AA	50	15
<i>Derxia</i> sp. LGD5CRA	0	4
<i>Derxia</i> sp. LGD7RA	50	0
<i>Azospirillum</i> sp. NFb42RM	100	8
<i>Azospirillum</i> sp. NFb47RM	50	0
<i>Azospirillum</i> sp. LGI49RM	50	0
<i>Azospirillum</i> sp. LGI12RM	100	0
<i>Burkholderia</i> sp. JMV47RM	200	27
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P40RM	100	0
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb22RM	0	0
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb20RM	0	0
<i>Azospirillum</i> sp. NFb46E	50	0
<i>Azospirillum</i> sp. NFb50E	200	30
<i>Azospirillum</i> sp. LGI34AE	100	0
<i>Azospirillum</i> sp. LGI38E	150	62
<i>Burkholderia</i> sp. JMV1E	150	19
<i>Burkholderia</i> sp. JMV44E	50	12
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P20E	100	46
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb15E	150	41

\*Promedio de tres repeticiones



**Tabla 14.** Prueba de Tukey de la biomasa radicular y aérea de *Lycopersicon esculentum* Mill., 60 días después de la inoculación de bacterias rizosféricas y endófitas

Tratamientos UNPRG	Biomasa (g)			
	Radicular	Sign.	Aérea	Sign.
<i>Azotobacter</i> sp. LG11ARA	0,2	c d	2,6	d e f g h
<i>Azotobacter</i> sp. LG11BRA	0,4	a b c d	2,8	c d e f g
<i>Azotobacter</i> sp. LG33RA	0,3	a b c d	1,9	h i
<i>Azotobacter</i> sp. LG25RA	0,1	d	2,0	g h i
<i>Azotobacter</i> sp. LG27RA	0,2	d	2,6	e f g h i
<i>Beijerinckia</i> sp. 53AA	0,3	a b c	3,0	b c d e
<i>Derxia</i> sp. LGD5CRA	0,2	d	2,7	c d e f g h
<i>Derxia</i> sp. LGD7RA	0,3	b c d	0,7	j
<i>Azospirillum</i> sp. NFb42RM	0,4	a b c d	2,8	c d e f
<i>Azospirillum</i> sp. NFb47RM	0,3	a b c d	2,6	d e f g h
<i>Azospirillum</i> sp. LGI49RM	0,3	a b c d	2,1	f g h i
<i>Azospirillum</i> sp. LGI12RM	0,4	a b c d	2,8	d e f g
<i>Burkholderia</i> sp. JMV47RM	0,6	a b	3,4	a b c d
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P40RM	0,4	a b c d	2,4	a b c d
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb22RM	0,2	c d	2,5	e f g h
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb20RM	0,2	d	1,4	i j
<i>Azospirillum</i> sp. NFb46E	0,3	a b c d	1,5	i
<i>Azospirillum</i> sp. NFb50E	0,6	a	3,5	a b c
<i>Azospirillum</i> sp. LGI34AE	0,4	a b c d	2,5	e f g h
<i>Azospirillum</i> sp. LGI38E	0,5	a b c	4,2	a
<i>Burkholderia</i> sp. JMV1E	0,5	a b c	3,1	b c d e
<i>Burkholderia</i> sp. JMV44E	0,3	b c d	2,9	b c d e f
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P20E	0,4	a b c d	2,7	c d e f g h
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNFb15E	0,5	a b c	3,8	a b
Testigo	0,2	b c d	2,6	e f g h

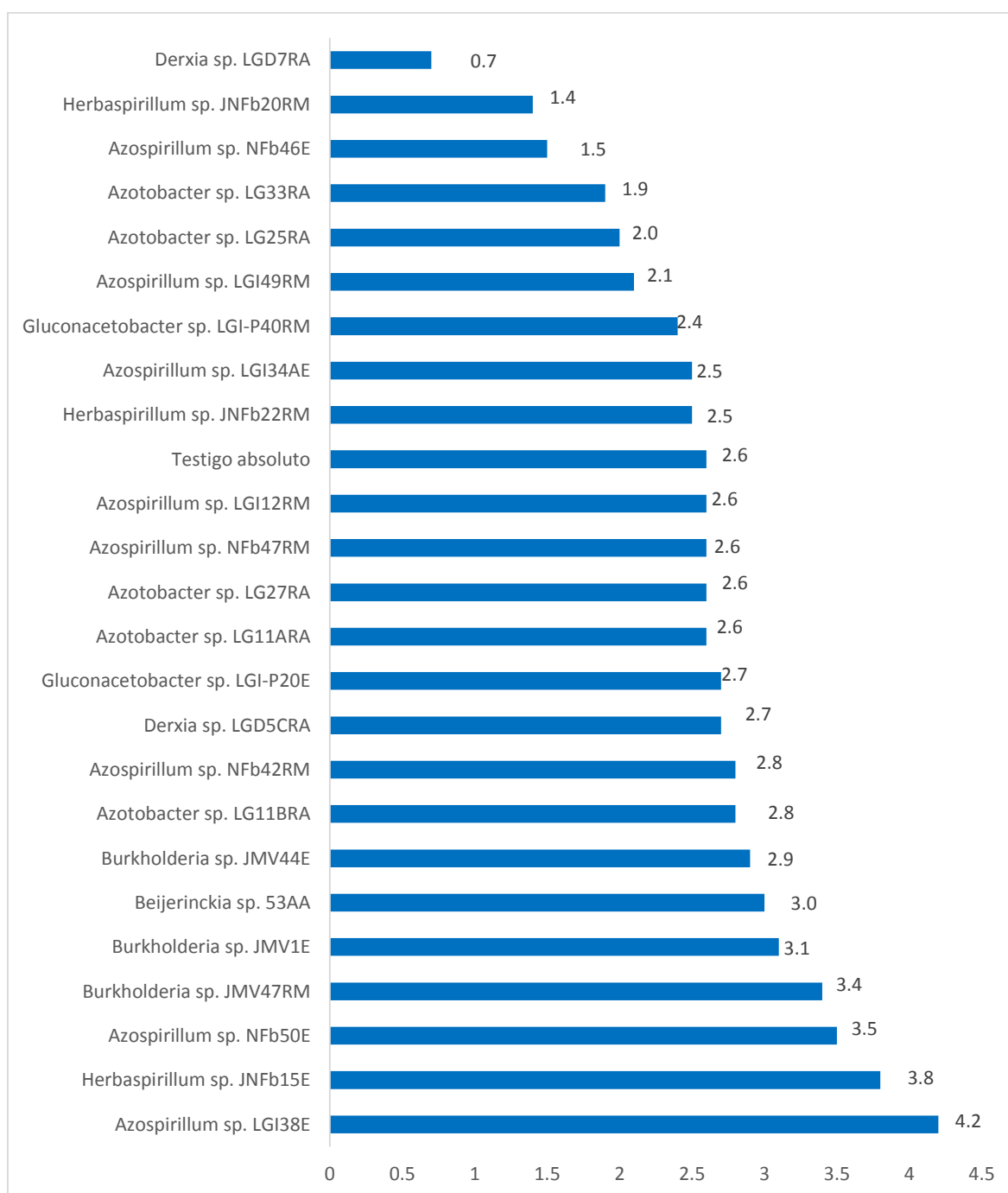
\*Promedio de tres repeticiones,



**Figura 96.** Biomasa aérea de *Lycopersicon esculentum* Mill., 60 días después de la inoculación de bacterias rizosféricas, 2016.



**Figura 97.** Biomasa aérea de *Lycopersicon esculentum* Mill., 60 días después de la inoculación de bacterias endófitas, 2016



**Figura 98.** Biomasa aérea (g) de *Lycopersicon esculentum* Mil., 60 días después de la inoculación de bacterias rizosféricas y endófitas 2016.

Los mayores índices de efectividad en las plantas de tomate correspondieron a las bacterias endófitas, alcanzándose 90% en la altura, 200% en la biomasa radicular y 62% en la biomasa aérea (Tabla 15). Estos valores correspondieron a las bacterias rizosféricas y endófitas del género *Azospirillum* (Tabla 16).

Las bacterias rizosféricas: *Azospirillum* sp.NFb42RM; *Azotobacter* sp.LG11BRA; *Beijerinckia* sp.53AA; *Burkholderia* sp.JMV47RM y endófitas: *Azospirillum* spp.NFb50E, LGI38E; *Burkholderia* spp.JMV44E, JMV1E, *Gluconacetobacter* sp. LGI-P20E y *Herbaspirillum* sp.JNFb15E incrementaron la altura (3,1-37,2%); biomasa aérea (8-62%) y biomasa radicular (50-200%) de las plantas de tomate cultivado en condiciones de invernadero, durante 60 días (Tabla 17).

**Tabla 15.** Rango de valores en las características de bacterias rizosféricas y endófitas inoculadas en *Lycopersicon esculentum* Mil.

Rango de valores	Rizosféricas		Endófitas
	Aerobias	Microaerófilas	
Amonio (ppm)	1,6-27,2	1,6-20,8	3,2-23,2
Fosforo soluble (ppm)	4,4-15,3	6,4-13,9	4,7-13,9
Indoles (ppm)	19,1-95,6	3,6-84,3	20,0-85,3
IE (%) Altura 30días	14,2-78,6	31,4-55,7	34,2-90,0
IE (%) Altura 45días	4,2-38,9	14,6-43,1	2,1-44,4
IE (%) Altura 60días	5,5-30,4	3,1-37,2	6,2-35,4
IE (%) biomasa radicular 60 días	50,0-100,0	50,0-200,0	50,0-200,0
IE (%) biomasa aérea 60 días	4,0-15,0	0,0-8,0	4,0-62,0

**Tabla 16.** Rango de valores en las características de los géneros de bacterias rizosféricas y endófitas inoculadas en *Lycopersicon esculentum* Mill

Género de	Amonio	Fósforo	Indoles	Altura (IE%)			Biomasa	60 días (IE%)
Bacterias	ppm	ppm	ppm	30días	45días	60días	Radicular	Aérea
<i>Azospirillum</i> spp.	3,2-21,6	4,7-11,4	30,9-85,3	34,2-90,2	0-44,4	6,21-35,4	50-200	0-62
<i>Azotobacter</i> spp.	7,2 – 27,2	4,4-14,7	19,1-56,7	28,5-78,6	21,5-38,9	8,6-30,4	0-100	0-8
<i>Beijerinckia</i> spp.	1,6	15,3	95,6	58,6	24,3	26,7	50	15
<i>Burkholderia</i> spp.	3,2-23,2	11,5-13,2	20,0-36,2	0-61,4	13,8-21,5	4,34-26,0	50-150	12-19
<i>Derxia</i> spp.	2,4-4,0	6,7-10,8	19,1-49,2	14,2-35,7	4,2-33,1	5,5-26,0	0-50	0-4
<i>Gluconacetobacter</i> spp.	1,6	8,8	73,3	42,9	14,6	8,6	100	0
<i>Herbaspirillum</i> spp.	13,2	4,7	85,3	28,5	14,6	8,0	150	41

**Tabla 17.** Bacterias rizosféricas y endófitas promotoras de crecimiento en *Lycopersicon esculentum* Mill., durante 60 días en invernadero, 2016

Tratamientos	Altura IE(%)	Biomasa	
		Radicular (IE(%))	Aérea (IE%)
<i>Azospirillum</i> sp. LG138E	35,4	150	62
<i>Azospirillum</i> sp. NFb50E	9,31	200	30
<i>Azospirillum</i> sp. NFb42RM	73,2	100	8
<i>Azotobacter</i> sp. LG11BRA	30,4	100	8
<i>Beijerinckia</i> sp. 53AA	26,7	50	15
<i>Burkholderia</i> sp. JMV47RM	12,4	200	27
<i>Burkholderia</i> sp. JMV1E	20,0	150	19
<i>Burkholderia</i> sp. JMV44E	4,34	50	12
<i>Gluconacetobacter</i> sp. LGI-P20E	18,1	100	46
<i>Herbaspirillum</i> sp.JNFb15E	8,0	150	41



## V. DISCUSIÓN

En los ambientes desfavorables, las bacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPR) se adaptan y maximizan su potencial benéfico (Stechman, 2011; Aly *et al.*, 2012; Naz *et al.*, 2012), destacando mecanismos como la fijación de nitrógeno (Lara *et al.*, 2007), solubilización de fosfatos (Carreño, 2009) y producción de indoles (Aguilar *et al.*, 2008), entre otros. En este contexto, se aislaron bacterias rizosféricas y endófitas fijadoras de nitrógeno de *Portulaca oleracea* L. “verdolaga”, capaz de desarrollarse en suelos afectados con salinidad (Bandera, 2013). De igual manera, bacterias fijadoras de nitrógeno se aislaron de rizósfera, raíces y hojas de *Syngonanthus* sp. “siempre viva”, que desarrolla en suelos pobres en nutrientes y materia orgánica (Marra *et al.*, 2012), rizósfera de malezas (Carreño, 2013) y *Jatropha curcas* L. “piñón” (Dávila & Linares, 2013).

Las bacterias rizosféricas que habitan el suelo rizosférico o la superficie de raíces (Aguado, 2012) se aislaron de raíces con suelo adherido, coincidiendo con Ramírez & Ugaz (2014), aunque también se pueden aislar sólo del suelo rizosférico (Garrido, 2007; Menezes, 2009). Las bacterias asociativas establecen una relación con las plantas, aunque no de manera obligatoria y se consideran endófitas porque viven dentro de los tejidos (Aguado, 2012), durante una etapa (facultativas) o todo (obligadas) su ciclo de vida (Bandera, 2013), por lo que se aislaron de raíces previamente desinfectadas. El término “endófita” hace referencia a las bacterias aisladas de tejidos vegetales desinfectados superficialmente y que no causan enfermedad visible a la planta hospedera (Hallman *et al.*, 1997, mencionados por Mano & Morisaki, 2008). De igual manera, se aislaron bacterias endófitas de pastos (Pérez *et al.*, 2010), maíz (Altamirano & Plasencia, 2014) y arroz (Elbeltagy *et al.*, 2001).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno se aislaron en medios de cultivo sin nitrógeno, sólidos para las rizosféricas aerobias y semisólidos para las rizosféricas y endófitas microaerófilas. En estos medios las bacterias reducen el nitrógeno atmosférico en una reacción catalizada por el complejo enzimático nitrogenasa, muy sensible al oxígeno molecular (Coyne, 2000); no obstante, las bacterias aerobias emplean como mecanismos de protección una elevada tasa respiratoria y la protección conformacional (Mayz, 2004).

Los medios de cultivo en las que se aislaron bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias: LG (*Azotobacter* spp., *Azomonas* spp.), LGD (*Derxia* spp.) y Beijerinckia (*Beijerinckia* spp.), fueron previamente utilizados por Garrido (2007), Menezes (2009) y Ramírez & Ugaz (2014). La mayor frecuencia (62,9%) de raíces con suelo rizosférico de verdolaga con bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias y el mayor porcentaje (47,9%) de estas bacterias correspondieron al medio LG coincidiendo con Ramirez & Ugaz (2014), quienes reportaron 55,5% de muestras de suelo rizosférico de arroz con bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias y el 42,3% de estas bacterias procedentes del medio LG.

Los medios de cultivo en las que se aislaron bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas: NFb y LGI (*Azospirillum* spp.), JNFb (*Herbaspirillum* spp.), LGI-P (*Gluconacetobacter* spp.) y JMV (*Burkholderia* spp.), fueron previamente utilizados por (Garrido, 2007) en pastos, Marra *et al.* (2012) en “siempre viva” y Altamirano & Plasencia (2014) en maíz. Las bacterias fijadoras de nitrógeno fueron reconocidas por una película blanquecina formada bajo la superficie de estos medios semisólidos, en los que la consistencia favorece el crecimiento y desplazamiento hacia el lugar, donde la tasa de reproducción está en equilibrio con la tasa de difusión del oxígeno y se mantiene la microaerofilia requerida para la actividad de la nitrogenasa (Garrido, 2007; Franco, 2008). La película bacteriana es observada varios mm debajo de la superficie del medio después de 4-10 días de incubación y en la superficie después de 10 días a más (Koomnok *et al.*, 2007). En los medios semisólidos NFb, LGI, JNFb y LGI-P, además de la película bacteriana se observó viraje del indicador producto de la alcalización por la actividad metabólica de las bacterias, con utilización de la fuente de carbono (Mantilla, 2007; Sánchez, 2008).

La frecuencia de muestras de raíces y suelo rizosférico positivas para bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas disminuyó conforme los subcultivos en medios

semisólidos, coincidiendo con Altamirano & Plasencia (2014), Ramirez & Ugaz (2014), Hernández (2015). Los medios semisólidos utilizados en la presente investigación son semiselectivos y contienen trazas de nitrógeno, provenientes de los reactivos y del agua destilada, que posibilitan el crecimiento de organismos no fijadores de nitrógeno. Por esta razón, deben realizarse subcultivos sucesivos para evitar el crecimiento de contaminantes y minimizar la ocurrencia de falsos positivos (Menezes, 2009), tal como lo reportaron Koomnok *et al.* (2007) quienes aislaron bacterias formadoras de película subsuperficial en NFb; no obstante, éstas no demostraron la diazotrofia *in vitro* en la prueba de reducción del acetileno.

Las bacterias microaerófilas se aislaron en los medios sólidos con similar composición a los medios semisólidos. De igual manera, Sánchez (2008) observó el desarrollo de la película aerotóxica de bacterias diazotróficas bajo la superficie de medios semisólidos y en los mismos medios sólidos las bacterias desarrollaron normalmente en la superficie, evidenciando su condición de microaerófilas facultativas.

La mayor frecuencia (48,1%) de raíces con suelo rizosférico de verdolaga con bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno microaerófilas y el mayor porcentaje (29,6%) de estas bacterias correspondieron al medio JNFb. Diferenciándose de estos resultados, Ramírez y Ugaz (2014) determinaron en el medio NFb la mayor frecuencia para ambos casos. La mayor frecuencia (44,1%) de raíces de verdolaga con bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno microaerófilas y el mayor porcentaje (30,1%) de estas bacterias correspondieron al medio NFb, coincidiendo con Altamirano & Plasencia (2014) y Hernández (2015) en muestras de maíz y arroz, respectivamente.

En las bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno aisladas de verdolaga se identificaron los géneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia* y *Gluconacetobacter*, reportados previamente en cultivos de maíz (Altamirano & Plasencia, 2014) y arroz (De la Cruz & Mestanza, 2014). También han sido identificadas como bacterias endófitas: *Herbaspirillum* spp. en arroz (Punschke & Mayans, 2004), *Gluconacetobacter* spp. en *Saccharum officinarum* “caña de azúcar” (Eskin, 2012) y maíz, *Ipomoea batatas* “camote”, *Cucurbita maxima* “calabaza”, *Carica papaya* L “papaya”, *Rosa canina* L. “rosa” y *Manihot esculenta* “yuca” (Dibut *et al.*, 2005)

En las bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno se identificaron *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* y *Derxia* spp. Estos géneros bacterianos han sido reportados previamente en la rizósfera de diversos cultivos agrícolas: *Gluconacetobacter azotocaptan* en maíz (Mehnaz *et al.*, 2006), *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerinckia* y *Burkholderia* en arroz (Ramírez & Ugaz, 2014), *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerinckia* y *Derxia* en pastos *Panicum maximun*, *Dichanthium aristatum* y *Brachiaria* sp. (Garrido, 2007).

Los géneros *Azotobacter*, *Beijerinckia* y *Derxia* son aerobios obligados, considerados entre las bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno, además de los anaerobios obligados facultativos y fotosintéticos (Mayz, 2004). Los géneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* y *Burkholderia* son endófitas porque atraviesan la barrera epidérmica y se les aísla del interior de tejidos vegetales previamente desinfectados (Loaces, 2011); no obstante, el suelo rizosférico es la mayor fuente de bacterias endófitas (Beracochea, 2011). Las endófitas provienen del ambiente externo e ingresan a la planta a través de los estomas, lenticelas, heridas, zonas de emergencia de raíces laterales y radículas de germinación. Por esta razón, en diversos cultivos agrícolas se ha demostrado que casi todas las bacterias endófitas son identificadas en la rizósfera (Mano & Morisaki, 2008), donde el número de bacterias fijadoras de nitrógeno es particularmente elevado, debido a los componentes orgánicos liberados que sirven como nutrientes (Mayz, 2004).

El género *Azospirillum* predominó en las bacterias rizosféricas y endófitas, fijadoras de nitrógeno, coincidiendo con Ramírez & Ugaz (2014) y Hernández (2015) en arroz y Altamirano & Plasencia (2014) en maíz. Este género bacteriano es considerado representante de las endófitas facultativas, que colonizan tanto el suelo rizosférico como el interior de las raíces (Toniutti & Fornasero, 2008).

Las bacterias aisladas de verdolaga fijaron nitrógeno, solubilizaron fosfato y sintetizaron indoles, coincidiendo con bacterias aisladas de arroz (Ji *et al.*, 2013; Mbai *et al.*, 2013). La concentración máxima de amonio: 64ppm correspondió a *Azospirillum* sp. Nfb11R, superando el rango 20-32 ppm reportado por Baiocchi & Saavedra (2011), Casos & Santiago (2013), Altamirano & Plasencia (2014) y De la Cruz & Mestanza

(2014), para *Azospirillum* spp. aisladas de tomate, malezas, maíz y arroz, respectivamente.

La concentración máxima de fósforo soluble (64,9ppm) correspondió a *Burkholderia* sp.JMV53bR, género bacteriano que agrupa especies reconocidas como solubilizadoras de fosfato por Barba & Bravo, 2013 (maíz) y Dávila & Linares, 2013 (piñon blanco). Los fosfatos inorgánicos insolubles pueden ser incorporados al ecosistema, a través del proceso microbiano de solubilización de fosfatos. Las bacterias solubilizadoras (BSF) mediante la acción quelante de ácidos orgánicos, reducción de hierro y acidificación desestabilizan los minerales, liberando fósforo soluble, que puede ser aprovechado por las plantas (Cordero *et al.*, 2008, Becerra *et al.*, 2011, Alvarez, 2012).

*Azospirillum* sp.LGI18R alcanzó la concentración máxima de indoles: 142,2 ppm, valor cercano a 145,6 ppm reportadas por Díaz *et al.* (2012) para bacterias rizosféricas y endófitas aisladas de sorgo. Asimismo, se superó el valor de 43 ppm, alcanzado por *Azospirillum* sp. aislada de *Panicum maximum* “pasto guinea” (Córdova *et al.*, 2016) y el rango 10-24 ppm registrado con bacterias endófitas diazotróficas aisladas de arroz (Ji *et al.*, 2013).

Las bacterias rizosféricas y endófitas fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fosfato y productoras de indoles incrementaron el desarrollo vegetativo de las plantas, demostrándose su potencial como promotoras de crecimiento (PGPR), como se ha reportado previamente en tomate (Mena *et al.*, 2009; Escobar *et al.*, 2011; Luna *et al.*, 2013) y otros cultivos agrícolas como papa (Eskin *et al.*, 2009), arroz (García *et al.*, 2010; Mbai *et al.*, 2013), trigo (Aly *et al.*, 2012), maíz (Naz *et al.*, 2012; Moreno & Galvis, 2013) y quinua (Ortuño *et al.*, 2013).

Las PGPR benefician a los cultivos agrícolas mediante mecanismos directos e indirectos. Los directos incluyen la síntesis de reguladores del crecimiento (auxinas, giberelinas y citoquininas), solubilización de fosfatos y fijación de nitrógeno atmosférico (Mantelin & Touraine, 2003; Loredó *et al.*, 2004; Lara *et al.*, 2007). Los mecanismos indirectos son responsables del biocontrol de patógenos (Kloepper *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2009; Bhattacharyya & Jha, 2012). Según la “Hipótesis aditiva” el efecto de las PGPR se atribuye a más de un mecanismo involucrados en la asociación planta-bacteria, los mismos que operan simultáneamente o en asociación. La suma de los

diferentes mecanismos refleja los cambios observados en el crecimiento de las plantas (Bashan *et al.*, 1996).

Las bacterias rizosféricas y endófitas incrementaron la altura y biomasa radicular y aérea de las plantas, efecto positivo reportado previamente en tomate (Escobar *et al.*, 2011), arroz (Jha *et al.*, 2009; Mbai *et al.*, 2013), trigo (Bécquer *et al.*, 2012) y quinua (Ortuño *et al.*, 2013). También existen reportes de incremento en la germinación de *Phaseolus vulgaris* L. (Torres *et al.*, 2003), emergencia de *Capsicum annum* (Di Barbaro *et al.*, 2005), diámetro de tallo, longitud de hojas y raíces de arroz (Moreno & Galvis, 2013), contenido de nitrógeno en hojas y raíces de *Setaria lachnea* (Toniutti & Fornasero, 2008), número de nódulos y tasa de fijación de nitrógeno en *Glycine max* (Uhrich & Benintende, 2005) y rendimiento de maíz (Ashrafi & Seiedi, 2011).

El mayor índice de efectividad (200%) de las bacterias investigadas se alcanzó en la biomasa radical, coincidiendo con Carreño (2009), quien determinó que el incremento alcanzado en el peso de la materia seca de las raíces (74% en maíz y 37% en tomate) de las plantas inoculadas con PGPR fue mayor al de la parte aérea (69 y 25%, respectivamente), sugiriéndose un efecto hormonal mas que nutricional. A diferencia, con el fertilizante químico, el crecimiento fue mayor en la parte aérea que en las raíces.

El efecto positivo de las PGPR está relacionado con aumento en la longitud de raíces laterales y número y longitud de pelos radiculares, cambios que se asocian con la síntesis de auxinas, citoquininas y giberelinas. La auxina AIA sintetizada por las bacterias es tomada por la planta y junto con el AIA endógeno, pueden estimular la división y alargamiento de las células o bien promover la síntesis de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), precursor del etileno, que a su vez inhibe la elongación de las raíces y retrasa su crecimiento (Aguado, 2012). Las PGPR utilizan el ACC como fuente de nitrógeno y mediante la ACC desaminasa, lo hidrolizan en alfa-cetobutirato y amoníaco (Glick *et al.*, 2007). Consecuentemente, el ACC disminuye, el etileno se reduce y los pelos radicales se incrementan significativamente (Loredo *et al.*, 2004).

El efecto positivo de las bacterias investigadas se demostró en las plantas de tomate, cultivadas en suelo con salinidad, coincidiendo con Stechmann (2011), Aly *et al.* (2012) y Naz *et al.* (2012), respecto a que las PGPR benefician a los cultivos agrícolas, sobre todo cuando se presentan condiciones desfavorables. En este contexto, las plantas en respuesta a diversos tipos de estrés como salinidad, sequía y anegamiento, incrementan la síntesis de ACC que origina etileno, dióxido de carbono y cianuro de hidrógeno por acción de la enzima ACC oxidasa. La ACC desaminasa bacteriana

hidroliza el ACC (Glick *et al.*, 2007) y consecuentemente el nivel de etileno disminuye en la planta y el desarrollo de la raíz aumenta visiblemente (Muhammed *et al.*, 2007).

Stechman (2011) demostró que los mayores incrementos por efecto de PGPR inoculadas en papa se alcanzaron en sustratos con una conductividad eléctrica,  $CE=6,33-9,21 \text{ dSm}^{-1}$ , atribuyendo el resultado a la actividad de ACC desaminasa de las bacterias. La CE es el indicador de sales solubles en el suelo (Soriano, 2004). El tomate es moderadamente tolerante a la salinidad:

$CE= 2,5 \text{ dSm}^{-1}$  (Chinnusamy *et al.*, 2005). El efecto negativo de la salinidad en los cultivos agrícolas es consecuencia de la deficiencia de agua o estrés de sequía (Partida *et al.*, 2005). La salinidad genera limitaciones nutricionales, citotoxicidad iónica y estrés osmótico (Castelán, 2009). El incremento en la biomasa radicular favorece la absorción de agua y nutrientes y la acumulación de biomasa aérea (Mantelin & Touraine, 2003).

Las bacterias endófitas alcanzaron los mayores índices de efectividad en la altura, biomasa radicular y aérea de las plantas, coincidiendo con Moreno (2012). Este investigador manifestó que considerándose que se encuentran en contacto íntimo con las plantas, se espera que las bacterias endófitas brinden beneficios más directos a su hospedero, en comparación con las bacterias rizosféricas, ya sea secretando factores de estimulación de crecimiento al interior de las plantas o protegiéndolas más efectivamente contra los fitopatógenos. Asimismo, el interior de las plantas es propicio para la fijación biológica de nitrógeno (fuentes de carbono y mínima concentración de oxígeno) favoreciendo la reducción del nitrógeno y liberación directa a las plantas (Moreno, 2012).

Los mayores índices de efectividad en la altura a los 30,45 y 60 días y biomasa radical y aérea a los 60 días, se alcanzaron con las bacterias de género *Azospirillum*, inicialmente reconocidas por su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico. Actualmente destacan por la producción y liberación de reguladores de crecimiento (Guzmán *et al.*, 2012), pero también se ha reportado solubilización de fosfatos (García *et al.*, 2010) e inclusive control biológico de fitopatógenos (Casos & Santiago, 2013). Las especies de *Azospirillum* spp. ejercen sobre la planta un efecto multiparamétrico, observándose incremento en la germinación, desarrollo de raíces, altura, tamaño de hojas y precocidad en la floración (Córdova, 2016).

Los cultivos de bacterias: *Azospirillum* spp. NFb42RM, NFb50E, LGI38E; *Azotobacter* sp. LG11BRA; *Beijerinckia* sp.53ARA; *Burkholderia* spp. JMV47RM, JMV44E, JMV1E; *Gluconacetobacter* LGI-P20E y *Herbaspirillum* sp. JNFb15E,



incrementaron la altura, biomasa radicular y aérea de las plantas de tomate, por lo que son consideradas bacterias promotoras de crecimiento, cuyo efecto en tomate deberá investigarse en condiciones de campo (Carreño, 2009) para constituir biofertilizantes que puedan ser aplicados en los campos comerciales.

## VI. CONCLUSIONES

- ✓ En raíces y suelo rizosférico de verdolaga se obtuvieron bacterias fijadoras de nitrógeno: 73 rizosféricas aerobias, 91 rizosféricas microaéofilas y 83 endófitas.
- ✓ En las bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno se identificaron los géneros *Azospirillum* (23,1%), *Azotobacter* (18,2%), *Herbaspirillum* (15,85), *Beijerinckia* (12,2%), *Burkholderia* (9,1%), *Derxia* (6,01%) y *Gluconacetobacter* (4,2%). En las bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno se identificaron los géneros *Azospirillum* (43,3%), *Herbaspirillum* (16,8%), *Burkholderia* (14,4%) y *Gluconacetobacter* (12,04%).
- ✓ Las bacterias rizosféricas y endófitas fijaron nitrógeno, solubilizaron fosfato y produjeron índoles, cuantificándose 1,2-64,0ppm de amonio; 1,8-64,9ppm de fósforo soluble y 8,8-142,2ppm de índoles.
- ✓ El 20% de cultivos de bacterias rizosféricas y el 16% de las endófitas toleraron 10% de cloruro de sodio.
- ✓ Las bacterias rizosféricas: *Azospirillum* sp.NFb42RM; *Azotobacter* sp.LG11BRA; *Beijerinckia* sp.53AA; *Burkholderia* sp.JMV47RM y endófitas: *Azospirillum* spp.NFb50E, LGI38E, *Burkholderia* spp.JMV44E, JMV1E, *Gluconacetobacter* sp. LGI-P20E y *Herbaspirillum* sp.JNFb15E, fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fosfato, productoras de índoles y tolerantes a 10% de NaCl, incrementaron la altura (3,1-37,2%), biomasa radicular (50-200%) y aérea (8-62%) de plantas de tomate en suelo con salinidad.

## VII. RECOMENDACIONES

- ✓ Determinar el efecto de *Azospirillum* spp. NFb42RM, NFb50E, LGI38E; *Azotobacter* sp. LG11BRA; *Beijerinckia* sp.53ARA; *Burkholderia* spp. JMV47RM, JMV44E, JMV1E; *Gluconacetobacter* LGI-P20E y *Herbaspirillum* sp. JNFb15E, en el desarrollo vegetativo y rendimiento de tomate en condiciones de campo.
- ✓ Investigar sustratos orgánicos de bajo costo para el incremento masivo de las bacterias promotoras de crecimiento en tomate.
- ✓ Identificar a nivel molecular las bacterias promotoras de crecimiento en tomate.

## VIII. RESUMEN

En las raíz y rizósfera de *Portulaca oleracea* L. “verdolaga” se aislaron bacterias rizosféricas y endófitas para investigar su potencial como promotoras del crecimiento en *Lycopersicum esculentum* L. “tomate” en un suelo con salinidad. Los medios de cultivo sin nitrógeno para el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno fueron LG, LGD y BEIJ para las rizosféricas aerobias y NFb, LGI, JNFb, LGI-P y JMV para las rizosféricas y endófitas microaerófilas. Las bacterias se identificaron fenotípicamente y se cuantificó el amonio, fósforo soluble, indoles producidos y tolerancia a 10% NaCl. Los 24 cultivos de bacterias que eligieron los mayores valores se inocularon en semillas de tomate y se determinó el efecto en las plantas, durante 60 días en invernadero. Se aislaron e identificaron las bacterias rizosféricas *Azospirillum* (23,1%), *Azotobacter* (18,2%), *Herbaspirillum* (15,85), *Beijerinckia* (12,2%), *Burkholderia* (9,1%), *Derxia* (6,01%) y *Gluconacetobacter* (4,2%) y las bacterias endófitas *Azospirillum* (43,3%), *Herbaspirillum* (16,8%), *Burkholderia* (14,4%) y *Gluconacetobacter* (12,04%). Las bacterias rizosféricas: *Azospirillum* sp.NFb42RM; *Azotobacter* sp.LG11BRA; *Beijerinckia* sp.53AA; *Burkholderia* sp.JMV47RM y endófitas: *Azospirillum* spp.NFb50E, LGI38E, *Burkholderia* spp.JMV44E, JMV1E, *Gluconacetobacter* sp. LGI-P20E y fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fosfato, productoras de indoles y *Gluconacetobacter* sp.LGI-P20E tolerantes a 10% de NaCl, incrementaron la altura (3,1-37,2%), biomasa radicular (50-200%) y aérea (8-62%) de plantas de tomate en un suelo con salinidad.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adjanohoun, A., Allagbabe, M., Noumavo, P., Gotoechan, H., Sikirou, R., Dossa, K. GleleKakai, R., Kotchoni, S. & Baba, L. (2011). Effects of plant growth promoting rhizobacteria on field grown maize. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 11(3), 1457-1465.
- Aguilar, J., Xiqui, L., García, S. & Baca, B. (2008). Producción de ácido indol-3-acético en *Azospirillum*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50(1-2), 29-37.
- Aguado, S. (Ed). (2012). *Introducción al Uso y Manejo de los Biofertilizantes en la Agricultura*. México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, INIFAP/Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA.
- Alfonso, T., Leyva, A. & Hernández, A. (2005). Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). *Revista Colombiana de Biotecnología*, VII (2), 47-54.
- Aly, M., El Sayed, H., El-Sayed, H & Jastaniah, S. (2012). Synergistic effect between *Azotobacter vinelandii* and *Streptomyces* sp. isolated from saline soil on seed germination and growth of wheat plant *Journal of American Science*, 8(5), 667-677.
- Altamirano, C., Carreño, C., Plasencia, V., Ramírez, L., Silva, J. & Ugaz, F. (2014). *Bacterias rizosféricas y endófitas fijadoras de nitrógeno*. Perú: Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo.

- Altamirano, C. & Plasencia, R. (2014). *Caracterización de bacterias endófitas diazotróficas aisladas de raíces de Zea mays L., en Lambayeque, marzo-mayo de 2014*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Álvarez, P. (2012). *Selección y solución de microorganismos solubilizadores de fosfatos en suelos calcáreos del valle del Mantaro*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú.
- Alvarado, P. & Valderrama, M. (2014). *Caracterización de los géneros Burkholderia y Pseudomonas solubilizadoras de fosfato aisladas de Zea mays L. en el distrito de Reque en Lambayeque, marzo-mayo, 2014* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Ashrafi, V. & Seiedi, M. (2011). Influence of different plant densities and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and yield attributes of corn (*Zea maize* L.) *Recent Research in Science and Technology*, 3(1), 63-66.
- Balemi, T., Pal, N. & Saxena, A. (2007). Response of onion (*Allium cepa* L.) to combined application of biological and chemical nitrogenous fertilizers. *Acta Agriculturae Slovenica*, 89 (1), 107-114.
- Bashan, Y., Holguin, G. & Ferrera, R. (1996). Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. I. *Azospirillum*. *Terra*, 14(2), 159-194.
- Bandera, R. (2013). *Rehabilitación de suelos salino-sódicos: Evaluación de enmiendas y de especies forrajeras*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de la Plata, Argentina.
- Barba, S. & Bravo, R. (2013). *Especies de Burkholderia y Pseudomonas aisladas de la rizósfera de malezas y su potencial como promotoras del crecimiento de plantas en Lambayeque*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Bhattacharyya, P. & Jha, D. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 28, 1327-1350.

- Bécquer, C., Lazarovits, G., Nielsen, L., Quintana, M., Adesina, M., Quigley, L., Lalin, I. & Ibbotson, Ch. (2012). Efecto de la inoculación de bacterias rizosféricas en dos variedades de trigo. Fase II: invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(5), 985-997.
- Becerra, J., Quintero, D., Martínez, M. & Matiz, A. (2011). Caracterización de microorganismos solubilizadores de fosfato aislados de suelos destinados al cultivo de uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 5(2), 195-208.
- Beracochea, M. (2011). *Respuesta de variedades comerciales de maíz (Zea mays L.) a la inoculación con bacterias endófitas-diazótrofas nativas*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de la República, Uruguay.
- Brenner, D., Krieg N. & Staley, J. (2005). *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology. The Proteobacteria, Part B, the Gammaproteobacteria*. 2(2) USA: Springer.
- Baiocchi, A & Saavedra, A. (2011). *Caracterización de cepas nativas de Azosporillum spp. y su efecto como promotoras del desarrollo vegetativo del tomate (Lycopersicon esculentun Mill.). en invernadero* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Bojórquez, J. (2007). *Atriplex canescens, una alternativa de desarrollo sustentable en suelos salino sódico de la cuenca de Sayula, Jalisco*. (Tesis de Maestría). Universidad de Guadalajara, Mexico.
- Cadena, S. & Martínez, B. (2011). *Caracterización de cepas de Pseudomonas spp. y su efecto en la germinación y emergencia de Zea mays L. "maíz" en Lambayeque*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- 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.

- Carreño, C., Escobar, C., García, F., Horna, Y., Mendoza, G. & Muñoz, H. (2010). *Rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPRs)*. Perú: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- Carreño, C. (2013). Caracterización molecular y genómica de bacterias aisladas de la rizósfera de malezas y su potencial como promotoras del crecimiento de *Zea mays* L. “maíz” en Lambayeque: Del genoma a la biotecnología agroalimentaria. Informe Técnico Investigación Financiada N° 356-2012-CONCYTEC-OAJ, Perú.
- Casos, J. & Santiago, P. (2013). *Potencial promotor del crecimiento de plantas de las especies de Azospirillum aisladas de raíces de malezas asociadas a Zea mays L. “maíz” en Lambayeque, 2013*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Castelán, M. (2009). *Plantas mexicanas adaptadas a la sequía: Dos nuevos modelos para el estudio de la tolerancia al estrés hídrico*. (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional, México.
- Cordero, J., Ortega, P. & Ortega, E. (2008). La inoculación de plantas con *Pantoea* sp., bacteria solubilizadora de fosfatos, incrementa la concentración de fósforo en los tejidos foliares. *Revista Colombiana de Biotecnología*, x (1), 11-120.
- 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.
- Coyne, M. (2000). *Microbiología del Suelo: Un enfoque exploratorio*. España: Editorial Paraninfo.
- Chávez, L. & Álvarez, A. (2011). La selección de variedades tolerantes. Una alternativa para la rehabilitación de suelos afectados por la salinidad. *Revista Granma Ciencia*, 15(3), 1-10.
- Chinnusamy, V., Jagendorf, A. & Zhu, J. (2005). Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science*. 45, 437-448.



- 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.
- Dávila, J. & Linares, S. (2013). *Especies de Burkholderia y Pseudomonas aisladas de rizósfera de Jatropha cucars L., piñón blanco y su potencial como promotoras del cremiento de las plantas en Lambayeque, 2012* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Delgado, Y., Cupull, R., Pérez, C., Sánchez, A. & Vílchez, M. (2003). Efecto de *Azotobacter* spp. en la estimulación de la germinación y el desarrollo de posturas de *Coffea arabica* L. *Centro Agrícola*, 30(1), 26-32.
- De La Cruz, E. & Mestanza, A. (2014). *Caracterización de bacterias endófitas diazotróficas aisladas de raíces de Oryza sativa L., arroz, en Lambayeque, 2014*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Díaz, P., Ferrera, R., Almaraz, J. & Alcántar, G. (2001). Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra*, 19, 327-335.
- Díaz, B., Cupull, R., Alvarado, J., Torres, R., Suárez, A. & Hernández, P. (2012). Caracterización de bacterias endófitas y rizosféricas aisladas de sorgo con potencialidades en la estimulación del crecimiento vegetal. *Centro Agrícola*, 39(4), 45-48.
- Di Bárbaro, G., Pernasetti, S. & Stegmayer, A. (2005). Evaluación del efecto de *Azospirillum brasilensis* en la germinación y emergencia del pimiento pimentonero (*Capsicum annuum* L. var. Trompa de elefante). *Revista del CIZAS*, 6 (12) ,74-85.
- Dibut, B., Ortega, M., Martinez, R., Fey, L. & Rios, Y. (2005). Nuevos aislados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en cultivos de importancia económica para Cuba. *Cultivos Tropicales*, 26(2), 5-10
- Doumbou, C., Hamby, M., Crawford, D. & Beaulieu, C. (2002). Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection*, 82, 85-102.

- Elbeltagy, A., Nishioka, K., Sato, T., Suzuki, H., Ye, B., Hamada, T., Isawa, T., Mitsui, H. & Minamisawa, K. (2001). Endophytic colonization and in plant nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11), 5285-5293.
- Egamberdiyeva, D. (2007). The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology*, 36(2), 184-189.
- Escobar, C., Horna, Y., Carreño, C. & Mendoza, G. (2011). Caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* spp. y su efecto en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill. "tomate" en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 2(1), 39 – 49.
- Eskin, N. (2012). *Colonization of Zea mays by the nitrogen fixing bacterium Gluconacetobacter diazotrophicus*. (Degree of Master). Western University London, Canadá.
- Fernandez, J., Niñirola, D., Vicente, M., Conesa, E., López J. & Gonzáles, J. (2009). Efecto de la densidad de plantación y del tipo de sustrato sobre la producción de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) en un cultivo hidropónico de bandejas flotantes. *Seminario de Técnicos y Especialistas en Horticultura*, 37, 707-7014.
- Franco, M. (2008). *Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas* (Tesis de Doctorado). Universidad de Granada, España.
- Franco, M. (2009). Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización, *Revista Peruana de Biología*, 16(2), 239-242.
- García, M., Farias, R., Peña, J. & Sánchez, J. (2004). Inoculación del trigo var. Pavón con *Azospirillum* spp. y *Azotobacter beijerinckii*. *Terra Latinoamericana*, 23, 65 – 72.
- García, F., Muñoz, H., Carreño, C. & Mendoza, G. (2010). Caracterización de cepas nativas de *Azospirillum* spp. y su efecto en el desarrollo de *Oryza sativa* L. "arroz" en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 1: 107-116.

- Garrido, R. (2007). *Aislamiento e identificación de bacterias diazotróficas rizosféricas y endófitas asociados a suelos y pastos del valle y sabana del Cesar en dos épocas climáticas*. (Tesis de Maestría). Universidad Militar Nueva Granada, Colombia.
- Glick, B., Todorovic, B., Czarny, J., Cheng, Z., Duam, J. & McConkey, B. (2007). Promoting of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Critical Reviews in Plant Science*, 26, 227-242.
- Guillen, R., Hernández, F., Gallegos, G., Rogriguez, R., Aguilar, C., Padron, E. & Reyes, M. (2006). *Bacillus* spp., como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de Chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(2), 105-114.
- Guzmán, A., Obando, M., Rivera, D. & Bonilla, R. (2012). Selección y caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14 (1), 182-190.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R. & Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60 (4), 579-598.
- Hernández, A., López, R., Rodríguez, A. & Barrios, J. (2000). *Temperatura, pH y conductividad eléctrica en el compostaje de cuatro estiércoles*. (Tesis de pregrado). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México.
- Hernández, A., Heydrich, M., Velázquez, M. & Hernández, A. (2006). Perspectivas del empleo de rizobacterias como agentes de control biológico en cultivos de importancia económica. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24 (1), 42-49.
- Hernández, A. Heydriej, M., Rojas. M, Manzano, J, Trujillo, I., Gonzales, M. & Acebo, Y. (2009). *Metodología para el empleo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en la biotecnología agrícola*. Recuperado en [http://www.foruncyt.cu/User\\_Filos/Forum\\_Textos0300297Pdf](http://www.foruncyt.cu/User_Filos/Forum_Textos0300297Pdf) 5 de agosto (2010).

- Hernández, J. (2011). *Biorecuperación de suelos salinos con el uso de materiales orgánicos*. (Tesis de Doctorado). Universidad Politécnica de Madrid, España.
- Hernández, E. (2015). *Caracterización de bacterias endófitas diazotróficas aisladas de tallos y hojas de Oryza sativa L. "arroz", Lambayeque, marzo-mayo de 2014*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Idriss, E., Iglesias, D., Talon, M. & Borris, R. (2004). Tryptophan- dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular Plant-Microbe Interactions* (MPMI), 20(6), 619-626.
- Jha, B., Thakur, M., Gontia, I., Albrecht, V., Stoffels, M., Schmid, M. & Hartmann, A. (2009). Isolation, partial identification and application of diazotrophic rhizobacteria from traditional Indian rice cultivars. *European Journal of Soil Biology*, 45, 62-72.
- Ji, S., Gururani, M. & Chun, S. (2013). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiological Research*, 169 (1), 83-98.
- Karnwal, A. (2009). Production of indole acid by fluorescent *Pseudomonas* in the presence of L-tryptophan and rice root exudates. *Journal of Plant Pathology*, 91(1), 61-63.
- Koomnok, CH., Teaumroong, N., Rerkasem, B. & Lumyong, S. (2007). Diazotroph endophytic bacteria in cultivated and wild rice in Thailand. *Science Asia*, 33, 429-435.
- Kloepper, J. (2003). A review of mechanisms for plant growth promotion by PGPR. 6<sup>th</sup> International PGPR workshop 5-10 october. Calicut, India.
- Kloepper, J., Ryu, C. & Zhang, S. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94, 1259-1266.
- 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.

- Lara, C., Oviedo, L. & Betancur, C. (2011). Bacterias nativas con potencial en la producción de ácido indolacético para mejorar los pastos. *Zootecnia Tropical*, 29 (2), 187-194.
- León, Y., Martínez, R., Hernández, J. & Cruz Y. (2011). Resultados preliminares del efecto de la aplicación de *Azotobacter chroococcum* y *Bacillus megaterium* var. phosphaticum en el cultivo del tabaco negro al sol. *Cuba Tabaco*, 12 (1), 16 - 22.
- Loaces, I. (2011). *Caracterización de bacterias endófitas productoras de siteróforos en arroz (Oryza sativa)*. (Tesis de Maestría). Universidad de la República, Uruguay.
- Loredo, C., López, L. & Espinosa, D. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana*, 22 (2), 225-239.
- Luna, I., Martínez, R., Hernández, M., Arvizu, S. & Pacheco, J. (2013). Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Revista Fitotecnológica Mexicana*, 36(1) ,63-69.
- Mantilla, M. (2007). *Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (Chrysanthemum morifolium var. yoko ono) en periodo de enraizamiento*. (Tesis Microbiólogo Agrícola y Veterinario). Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Mano, H. & Morisaki, H. (2008). Endophytic Bacteria in the Rice Plant. *Microbes and Environments*, 23 (2) ,109-117.
- Mantelin, S. & Touraine, B. (2003). Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *Journal of Experimental Botany*, 55(394), 27-34.
- Martínez, O., Jorquera, M., Crowley, D., Gajardo, G. & Mora, M. (2010). Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10 (3), 293-319.
- Marra, L., Graziotti, P., Nunes, U. & de Souza, F. (2012). Diazotrophic bacteria in star flowers. *Bioscience Journal Uberlandia*, 28(1), 17-24.

- Mayz, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista UDO Agrícola*, 4(1):1-20.
- Mbai, F., Magiri, E., Matiru, V., Ng'ang'a, V., & Nyambati, V. (2013). Isolation and characterisation of bacterial root endophytes with potential to enhance plant growth from Kenyan Basmati rice. *American International Journal of Contemporary Research*, 3(4), 25-40
- Mehnaz, S., Weselowski, B. & Lazarovits, G. (2006). Isolation and identification of *Gluconacetobacter azotocaptans* from corn rhizosphere. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(6), 496-501.
- Menezes, A. (2009). *Aislamiento y caracterización de bacterias diazótrofes asociadas a maíz (Zea mays) variedad PAU871* (Tesis de Licenciatura). Universidad de la República, Uruguay.
- Mena, H., Cruz, A., Paredes, O., Gómez, M. & Portugal, V. (2009). Fruit texture related changes and enhanced shelf-life through tomato root inoculation with *Bacillus subtilis* BEB-13BS. *Agrociencia*, 43(6), 559-557.
- Moreno, L. & Galvis, F. (2013). Potencial biofertilizante de bacterias diazótrofes aisladas de muestras de suelo rizosférico. *Pastos y Forrajes*, 36 (1), 33-37.
- Moreno, B. (2012). *La rizósfera y las relaciones entre plantas y los microorganismos*. En: G. Aguado (Ed). Introducción al uso y manejo de los biofertilizantes en la Agricultura, (pp 23-33.). México: Instituto Nacional de Investigaciones, Forestales, Agrícolas y Pecuarias, INIFAP/Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA.
- Muhammad, S., Muhammad A., Safraz, H. & Ahmad, S. B. (2007). *Perspective of plant growth promoting rizobacteria* (PGPR) Containig. ACC deaminase en stress agriculture. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34(10), 635-648.
- Naz, L., Bano, A., Rehman, B., Pervaiz, S., Iqbal, M., Sarwar, A. & Yasmin, F. (2012). Potential of *Azotobacter vinelandii* KhSr1 as bio-inoculant. *African Journal of Biotechnology*, 11 (45), 10368-10372.

- Nezarat, S. & Gholami, A. (2009). Screening Plant Growth Promoting Rhizobacteria for improving seed germination, seedling growth and yield of maize. *Pakistan Journal of Biological Science*, 12(1), 26-32.
- Nicolalde, A. & Quintana, D. (2010). *Utilización de bacterias fijadoras de nitrógeno (Azotobacter) y solubilizadoras de fósforo en el cultivo de brócoli (Brassica oleraceae var. Legacy) en Otavalo*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Técnica del Norte, Ecuador.
- Nihorimbere, V., Ongena, M., Smargiassi, M. & Thonart, P. (2011). Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnology Agronomy Society and Environment*, 15(2), 327-337.
- Ortuño, N., Castillo J., Claros, M., Navia, O., Angulo, M., Barja, D., Gutiérrez, C. & Angulo, V. (2013). Enhancing the sustainability of quinoa production and soil resilience by using bioproducts made with native microorganisms. *Agronomy*, 3(4), 732-746.
- Páez, A., Páez, P., Gonzalez, M., Vera, A., Ringelberg, D. & Tschaplinnski, J. (2007). Crecimiento, carbohidratos solubles y ácidos grasos de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) sometida a tres niveles de radiación. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 24(4), 642-660.
- Partida, L., Velázquez, T., Acosta, B. & Angulo, C. (2005). Extractos vegetales y su efecto en la conductividad eléctrica de dos suelos salinos y de soluciones. *Terra Latinoamericana*, 24(1), 83-89.
- Pérez, A., Rojas, J. & Fuentes, J. (2010). Diversidad de bacterias endófitas asociadas a las raíces del pasto colosua (*Bothriochloa pertusa*) en tres localidades del departamento de Sucre, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 15(2), 219-228.
- Puicón, H. (2014). *Efecto de Pseudomonas spp. nativas en el desarrollo vegetativo de Zea mays L. "maíz" en condiciones de invernadero, 2013*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Punschke, K., & Mayans, M. (2011). Selección de cepas de *Herbaspirillum* spp. promotoras del crecimiento de arroz. *Agrociencia Uruguay*, 15(1), 19-26.

- Ramírez, L. & Ugaz, J. (2014). *Bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno en Oryza sativa L. "arroz"*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Rios, P. & Zúñiga, L. (2012). *Bacillus spp. aisladas de la rizósfera de Lycopersicon esculentum Mill. "tomate" en Lambayeque y su potencial como promotoras del crecimiento de plantas*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Rivera, M., Polomo, M., Delgado, G., Estrada, J. & Muñoz, J. (2014). Evaluación de la tolerancia a la salinidad y sodicidad de cuatro especies de pasto, en un suelo salino sódico de un bosque urbano. *Agrofaz*, 14(2), 79-82.
- Rodríguez, C. (2013) *Evaluación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal en tomate (Solanum lycopersicum) variedad Santa Clara, aislados de residuos lignocelulósicos de higuera (Ricinus communis)*. (Tesis de Especialidad). Universidad Católica de Manizales, Colombia.
- Rodríguez, C. (2014). *Estudio comparativo de la propagación y el efecto de la radiación lumínica, en una variedad comercial y una población natural de Portulaca oleracea L.* (Tesis de Maestría). Universidad de Sevilla, España.
- Salaheddin, K., Valluvaparidasan, V., Ladhalakshmi, D. & Velazhahan, R. (2010). Management of bacterial blight of cotton using a mixture of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *Plant Protection Science*, 46 (2), 41 – 50.
- 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 Licenciatura). Universidad Austral de Chile, Chile.
- Sánchez, S. (2008). *Especies vegetales y microorganismos rizosféricos tolerantes a metales pesados de un ecosistema contaminado*. (Tesis de Maestría). Universidad Agraria la Habana, Cuba
- Santillana, N. (2006). Producción de biofertilizantes utilizando *Pseudomonas* sp. *Ecología Aplicada*, 5(1-2), 87-91.



- Sarajuohi, M., Ardakani, M., Nurmohammadi, G., Kashani, A., Rejali, F. & Mafakheri, S. (2012). Response of yield and yield components of maize (*Zea mays* L.) to different biofertilizers and chemical fertilizers. *American Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 12(3), 315 – 320.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA, 2010. Uso de Fertilizantes. Recuperado de <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrollorural/documens/fichasaapt/uso%20de%20fertilizantes>.
- Soriano, M. (2004). *Prácticas de Diagnóstico y Fertilidad de Suelos*. España: Universidad de Valencia.
- Suwan, N., To-anun, C., Soyton, K & Nalumpang, S. (2012). Evaluation of *Streptomyces*- biofungicide to control chili anthracnose in pot experiment. *Journal of Agricultural Technology*, 8(5), 1663-1676.
- Stechmann, L. (2011). *Crecimiento de Bacillus spp., Pseudomonas putida y Streptomyces spp., en sustratos con diferente contenido de materia orgánica y pH y su efecto en Solanum tuberosum L. “papa” en invernadero*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Stefan, M., Mihasan, M. & Dunca, S. (2008) Plant growth promoting rhizobacteria can inhibit the *in vitro* germination of *Glycine max* L. seeds. *Scientific Annals of University “Alexandru Ioan Cuza”. Iasi Section Genetics and Molecular Biology*, T. IX, 3, 105-110.
- Tena, A. (2002). *Presencia de hongos micorrizicos arbusculares en plantas silvestres de suelos salinos en el estado de Colima*. (Tesis de Maestría). Universidad de Colima, México.
- Toniutti, M. & Fornasero, L. (2008). Efecto de la inoculación de *Azospirillum brasilense* sobre el crecimiento y desarrollo de *Setaria lachnea* (Neez) Kunth. *Revista FAVE- Ciencias Agrarias*, 7(1-2), 33-41.
- Torres, R., Pérez, C. & Suárez, N. (2003). Influencia de la inoculación de semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Centro Agrícola*, 30(2) ,56-60.

- Uhrich, W. & Benintende, S. (2005). Aplicación de *Azospirillum brasilense* en cultivo de soja en co-inoculación con *Bradyrhizobium japonicum*. *Revista Agropecuaria*, 9(1), 71-75.
- Vasquez, A., Díaz, N., Vázquez, O & Vázquez, W. (2012). *Metodología de la Investigación Científica*. Perú: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- Wicke, B., Smeets, E., Dornburg, V., Vashev, Gaiser, T.,Turkenburg, W. & Faaij. A, (2011). The global technical and economic potential of bioenergy from salt-affected soils. *Energy Environment Science*, 4, 2669-2681.

# **ANEXOS**

## ANEXO 1

### **Cálculo del número de muestras para el aislamiento de bacterias rizosféricas y endófitas (en Vásquez *et al.*, 2012)**

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

$$n = \frac{(1,96)^2 (0,90 \cdot 0,10)}{(0,8)^2}$$

$$n = 54,02 \text{ muestras}$$

Dónde:

n = Tamaño de la muestra

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

p = prevalencia o presencia de bacterias rizosféricas y endófitas  
en raíces (0,90)

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

T= error estimado (0,08)

## ANEXO 2

**Medios de cultivo y soluciones para el aislamiento, identificación y mantenimiento de bacterias rizosféricas y endófitas (en Garrido, 2007; Jha *et al.*, 2009; Marra *et al.*, 2012)**

**a. Medio de cultivo LG (*Azotobacter* spp. y *Azomonas* spp.)**

El medio LG fue elaborado por Lipman (1904)

Componentes	gL <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,05
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,20
CaCl <sub>2</sub>	0,02
Fe Cl <sub>3</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,002
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,15
CaCO <sub>3</sub>	1,00
Sacarosa	20,0
Azul de bromotimol (0,5 % en KOH 0,2N)	5,00mL
Agua destilada en cantidad suficiente	1000mL

Ajustar el pH a 7,0 con NaOH y adicionar 15g de agar agar.

**b. Medio de cultivo BEIJERINCKIA (*Beijerinickia* spp.)**

Componentes	gL <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,80
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,10
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,02
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,005
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20
ZnSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,005
CuSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,004
Glucosa	10,0
Agua destilada en cantidad suficiente	1000mL

Ajustar el pH a 6,5 con NaOH y adicionar 15g de agar agar. Esterilizar la glucosa por separado (10g en 50mL de H<sub>2</sub>O) y mezclar después de frío.

**c. Medio de cultivo LGD (*Derxia* spp.)**

El medio LGD o medio LG (Lipman, 1094) fue modificado por Campêlo & Döbereiner (1970)

Componentes	gL <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,05
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,20
CaCl <sub>2</sub>	0,01
Fe Cl <sub>3</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,002
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,15
NaHCO <sub>3</sub>	1,00
Glucosa	20,0
Azul de bromotimol (0,5 % en KOH 0,2N)	5,00mL
Agua destilada en cantidad suficiente	1000mL

Ajustar el pH a 7,0 con NaOH y adicionar 15g de agar agar.

**d. Solución tampón fosfato de potasio, 0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0**

Componentes	gL <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9,304
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,709
Agua destilada csp	1000mL

Verificar el pH 7,0 y autoclavar.

**e. Agar nutritivo (AN)**

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

**f. Medio de cultivo NFb (*Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *A. irakense* y *A. halopraeferens*)**

Componentes	gL <sup>-1</sup>
Ácido málico DL	5,0
K <sub>2</sub> .HPO <sub>4</sub>	0,5
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,2
NaCl	0,1
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.02g
Solución de micronutrientes I	2mL
Azul de bromotimol (0,5% en KOH 0,2N)	2mL
FeEDTA (Solución 1,64%)	4mL
Solución de vitaminas I (Biotinol)	1mL
KOH	4,5g

Pesar los compuestos en el orden indicado, posteriormente completar el volumen a 1000mL con agua destilada y ajustar el pH a 6,5 - 6.8. Para el medio semisólido agregar 1,75 - 1.8g de agar agarL<sup>-1</sup> y para el medio sólido 15g de agar agarL<sup>-1</sup> y 20mgL<sup>-1</sup> de extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

**Solución de micronutrientes I:**

Componentes	gL <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub>	0,04
ZnSO <sub>4</sub>	1,20
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	1,40
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,00
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1,175

Completar el volumen a 1000mL con agua destilada.

FeEDTA (Solución 1,64%)

Preparar una solución madre con 7,0g de Fe SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O y 2g de EDTA dipotásico en 1L de agua destilada. Luego, tomar 1,17mL de la solución madre y completar a 1L con agua desmineralizada, para obtener la solución 1,64% de Fe deseada.

#### g. Medio de cultivo LGI (*Azospirillum amazonense*)

El medio de cultivo LGI, fue desarrollado a partir del medio LG (Lipman, 1904). La I hace referencia al investigador J. Ivo Baldani. Este medio promueve el aislamiento de *Azospirillum amazonense*.

Componentes	gL <sup>-1</sup>
Cristales de azúcar	5,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2
MgSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,2
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,002
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6
Azul de bromotimol (0,5% en KOH 0,2N)	5mL
FeEDTA (Solución 1,64%)	4mL
Solución de vitaminas I (Biotinol)	1mL
Agua destilada en cantidad suficiente	1000mL

Ajustar el pH a 6,0–6,2. Para medio semisólido adicionar 1,75g de agar agarL<sup>-1</sup>, para medio sólido 15g de agarL<sup>-1</sup> y 20mgL<sup>-1</sup> de extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

#### h. Medio de Cultivo JNFb (*Herbaspirillum* spp.)

El medio JNFb fue desarrollado por la investigadora Johanna Döbereiner a partir del medio NFb. La J hace referencia a la investigadora.

Componentes		gL <sup>-1</sup>	
Acido málico		5.0	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		0,6	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O		0,2	
NaCl		0.1	
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O		0,02	
Ajustar el medio agregar	Solución de micronutrientes I	2mL	pH a 5,8. Para
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8	semisólido
			1,8g de agarL <sup>-1</sup>



1, para	Azul de bromotimol (0,5 % en KOH 0,2N)	2mL	medio sólido
18g de	FeEDTA (Solución 1,64 %)	4mL	agar agarL <sup>-1</sup> ,
20mgL <sup>-1</sup>	Solución de vitaminas I (Biotinol)	1mL	de extracto de
levadura	KOH	4,5	como fuente
de	Agua destilada en cantidad suficiente	1000mL	nitrógeno y
6mL de			azul de

bromotimol.

**i. Medio de cultivo LGI-P (*Gluconacetobacter diazotrophicus*)**

Este medio fue desarrollado a partir del medio de cultivo LGI (Baldani, 1984), en donde la P hace referencia a Pernambuco, lugar de aislamiento de la primera cepa de *Acetobacter diazotrophicus*.

Componentes	gL <sup>-1</sup>
Cristales de azúcar	100
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,002
Azul de bromotimol (0,5 % en KOH 0,2N)	5mL
FeCl <sub>3</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,01mL
Solución de vitaminas I (Biotinol)	1mL
Agua destilada en cantidad suficiente	1000mL

Ajustar el pH a 5.5. Para medio semisólido agregar 1,8g de agarL<sup>-1</sup>, para medio sólido 17g de agar agarL<sup>-1</sup> y 20mgL<sup>-1</sup> de extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

**j. Medio de cultivo JMV (*Burkholderia* spp.)**

Componentes	gL <sup>-1</sup>
Manitol	5,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
NaCl	0,1
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02
Azul de bromotimol (0,5 % en KOH 0,2N)	2mL
FeEDTA (solución 1,64%)	2,1mL
Solución de micronutrientes II	2mL
Solución de vitaminas II	2mL
Agua destilada en cantidad suficiente	1000mL

Ajustar el

pH a 5,0.

Para obtener la solución de vitaminas II, diluir una pastilla de complejo B comercial en 10mL de agua destilada.

Solución de micronutrientes II:

Componentes	gL <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub>	0,1
MnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,03
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,3
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,2
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,03
Agua destilada csp	1000mL

**k. Caldo extracto de suelo al 10% (en García *et al.*, 2010)**

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

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

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

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

Solucion de antimicótico (en Alvarado & Valderrama, 2014).

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

**m. Caldo Tripticasa Soya suplementado con triptófano.**

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

Disolver por calentamiento y ajustar a ph 7,3

**ANEXO 3**

## Procedimiento para elaborar la curva de calibración para cuantificar el ión amonio (en Lara *et al.*, 2007)

### a. Reactivos

- **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

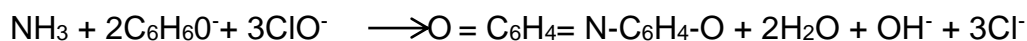
- **Solución oxidante**

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

### b. Método colorimétrico de berthelot para cuantificar el ion amonio (en Lara *et al.*, 2007)

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

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



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

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

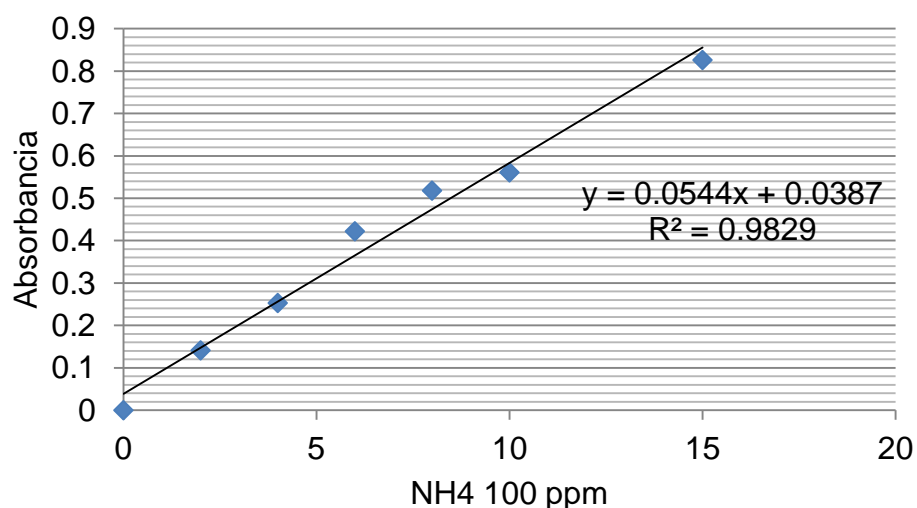
N° de tubo	Solución patrón [mL]	H <sub>2</sub> O bidestilada [mL]	NH <sub>4</sub> Cl (Ug/mL = ppm) NH <sub>4</sub> Cl
1	0,0	10,0	0
2	0,2	9,8	2
3	0,4	9,6	4
4	0,6	9,4	6
5	0,8	9,2	8
6	1,0	9,0	10
7	1,5	8,5	15
8	2,0	8,0	20

### **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 2007, 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.

Nº tubo	NH <sub>4</sub> 100 (ppm)	Absorbancia	Absorbancia corregida
01	0	0,058	0,000
02	2	0,199	0,141
03	4	0,311	0,253
04	6	0,480	0,422
05	8	0,576	0,518
06	10	0,619	0,561
07	15	0,884	0,826

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



En la ecuación obtenida:

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

Donde:

y: representa la absorbancia captada (variable dependiente)

x: cantidad de amonio en ppm (variable independiente)

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

$$x = (y - 0.0387)/(0.0544)$$



## ANEXO 4

### Cuantificación de fósforo solubilizado *in vitro*

#### a. Reactivos

- **Solución de ácido sulfúrico 5N**

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

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

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

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

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

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

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

##### b.1 Fundamento

En medio ácido y en presencia de molibdato amónico, los ortofosfatos forman un complejo fosfomolibdico que, reducido por el ácido ascórbico, desarrolla una coloración azul susceptible de una determinación colorimétrica y cuya aparición se acelera utilizando el catalizador emético, tartrato doble de antimonio y potasio.

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

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

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

Colocar en una serie de matraces aforados de 25 mL:

Número de matraces	T	I	II	III
Solución salina de fósforo de $2 \text{ mgL}^{-1}$ (mL)	0	1	2	5
Agua bidestilada (mL)	20	19	18	15
Reactivo indicador (mL)	4	4	4	4
Agua destilada hasta enrase (mL)	25	25	25	25
Correspondencia de fósforo en $\text{mgL}^{-1}$	0	0,1	0,2	0,5

Esperar 20 minutos y efectuar las lecturas en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 690 nm en cubetas de 10 cm. 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

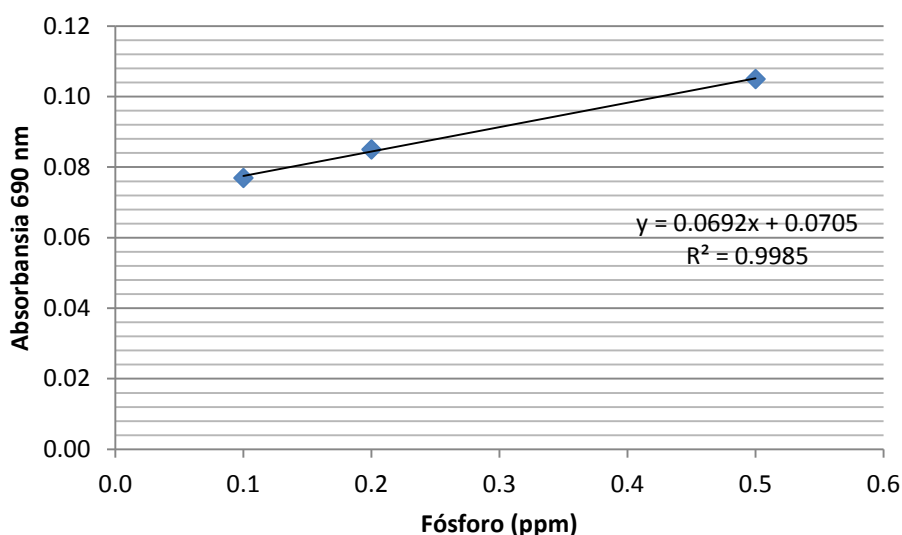
Introducir 20 mL de la muestra a analizar en un matraz aforado de 25 mL. Añadir 4 mL de reactivo indicador, completar el volumen a 25 mL con agua destilada. Esperar 20 minutos y efectuar la lectura en el espectrofotómetro de luz visible con una longitud de onda de 690 nm. Tener en cuenta el valor leído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

Nº de tubo	Fosforo soluble (ppm)	Absorbancia
1	0,1	0,077

2	0,2	0,085
3	0,5	0,105

---

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



En la ecuación obtenida:

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

Donde:

y: representa la absorbancia captada (variable dependiente)

x: cantidad de fósforo en ppm (variable independiente)

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

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

## ANEXO 5

### Procedimiento para elaborar la curva de calibración para cuantificar indoles (en Mantilla, 2007)

### **a. Reactivos**

#### **Reactivo de Salkowski (en Garcia % Muñoz, 2010)**

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Concentrado	150mL
Agua destilada	250mL
FeCl <sub>3</sub> 0,5M en agua destilada	7,5mL

Al momento de la preparación, verter el ácido sulfúrico concentrado en un balón con 25mL de agua destilada y simultáneamente enfriar con cloruro de agua constantemente. Finalmente agregar el cloruro férrico. Utilizar 4mL del reactivo para 1mL de la muestra investigada.

### **b. Método Colorimétrico de Salkowski para cuantificar indoles**

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

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

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

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

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

\*1000 µL = 1 mL

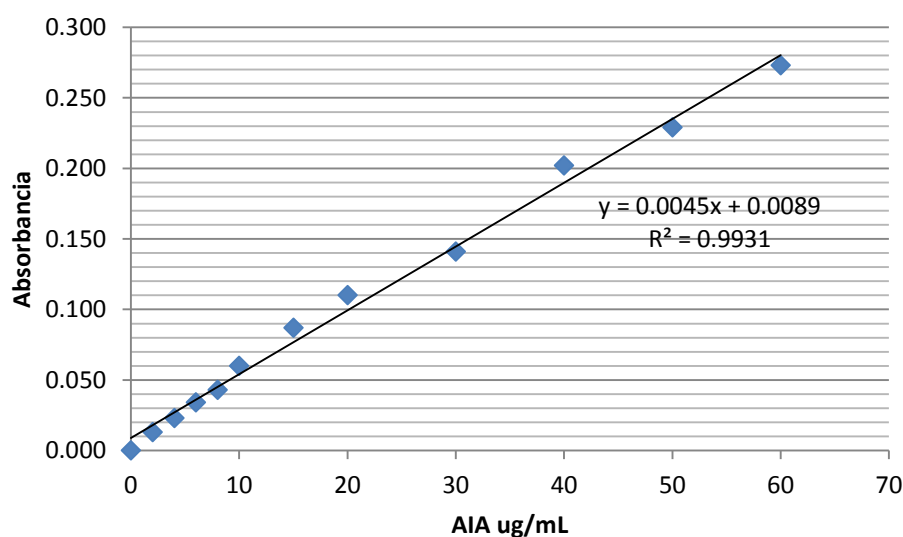
### **b. 3 Procedimiento para la cuantificación de AIA por colorimetría**

Obtenidas las concentraciones parciales de AIA extraer de cada tubo 0,4mL de solución, verter en tubos de 13 x 75 mm y agregar 1,6 mL 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 530 nm.

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

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



En la ecuación obtenida:

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

Donde:

y: representa la absorbancia captada (variable dependiente)

x: ácido indol acético en ppm (variable independiente)

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

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

## Anexo 6

**Prueba de normalidad, homogeneidad de varianzas y análisis de varianza de *Portulaca oleracea* L. a los 30 días.**

**Tests of Normality ALTURA A LOS 30 DIAS**

TRATAMIENTOS	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		Shapiro-Wilk <sup>a</sup>
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
1	,283	6	,514	,921	6	,514
2	,279	6	,607	,933	6	,607
3	,389	6	,018	,746	6	,018
4	,359	6	,143	,845	6	,143
5	,318	6	,030	,769	6	,030
6	,204	6	,493	,918	6	,493
7	,162	6	,745	,951	6	,745
8	,268	6	,102	,827	6	,102
9	,209	6	,415	,907	6	,415
10	,267	6	,070	,809	6	,070
11	,199	6	,405	,905	6	,405
12	,283	6	,514	,921	6	,514
13	,225	6	,240	,873	6	,240
14	,333	6	,075	,812	6	,075
15	,208	6	,425	,908	6	,425
16	,283	6	,514	,921	6	,514
17	,267	6	,070	,809	6	,070
18	,261	6	,369	,899	6	,369
19	,333	6	,078	,814	6	,078
20	,191	6	,540	,925	6	,540
21	,272	6	,080	,815	6	,080
22	,229	6	,830	,961	6	,830
23	,204	6	,389	,902	6	,389
24	,170	6	,409	,906	6	,409
25	,223	6	,233	,872	6	,233

**Prueba de homogeneidad de varianzas**

ALTURA A LOS 30 DIAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,004	24	125	,466

**ANOVA de un factor**

ALTURA A LOS 30 DIAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	324,405	24	13,517	17,264	,000
Intra-grupos	97,867	125	,783		
Total	422,272	149			

**Anexo 7**



**Prueba de normalidad, homogeneidad de varianzas y análisis de varianza de la altura de *Portulaca oleracea* L. a los 45 días**

**Tests of Normality ALTURA A LOS 45 DIAS**

Tratamientos	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		Shapiro-Wilk <sup>a</sup>
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
1	,270	6	,331	,892	6	,331
2	,251	6	,557	,927	6	,557
3	,208	6	,425	,908	6	,425
4	,289	6	,011	,723	6	,011
5	,149	6	,932	,976	6	,932
6	,214	6	,718	,947	6	,718
7	,170	6	,719	,947	6	,719
8	,231	6	,641	,938	6	,641
9	,237	6	,554	,927	6	,554
10	,147	6	,866	,966	6	,866
11	,387	6	,002	,648	6	,002
12	,215	6	,610	,934	6	,610
13	,226	6	,452	,912	6	,452
14	,190	6	,614	,934	6	,614
15	,200	6	,801	,958	6	,801
16	,204	6	,389	,902	6	,389
17	,209	6	,415	,907	6	,415
18	,254	6	,212	,866	6	,212
19	,359	6	,097	,825	6	,097
20	,178	6	,946	,979	6	,946
21	,309	6	,057	,799	6	,057
22	,249	6	,469	,915	6	,469
23	,167	6	,960	,982	6	,960
24	,283	6	,560	,927	6	,560
25	,183	6	,535	,924	6	,535

**Prueba de homogeneidad de varianzas**

ALTURA A LOS 45 DIAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
3,289	24	125	,000

**ANOVA de un factor**

ALTURA A LOS 45 DIAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	443,162	24	18,465	8,096	,000
Intra-grupos	285,093	125	2,281		
Total	728,255	149			

## Anexo 8

Prueba de normalidad, homogeneidad de varianzas y análisis de varianza de la altura de *Portulaca oleracea* L. a los 60 días

Tests of Normality ALTURA A LOS 60 DIAS

Tratamientos	T	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		Shapiro-Wilk <sup>a</sup>
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
1		,159	6	,801	,958	6	,801
2		,260	6	,252	,876	6	,252
3		,204	6	,493	,918	6	,493
4		,186	6	,817	,960	6	,817
5		,251	6	,595	,932	6	,595
6		,260	6	,533	,924	6	,533
7		,170	6	,719	,947	6	,719
8		,185	6	,918	,974	6	,918
9		,217	6	,236	,872	6	,236
10		,268	6	,396	,904	6	,396
11		,221	6	,548	,926	6	,548
12		,264	6	,130	,840	6	,130
13		,294	6	,165	,852	6	,165
14		,209	6	,625	,936	6	,625
15		,304	6	,229	,871	6	,229
16		,333	6	,184	,859	6	,184
17		,283	6	,514	,921	6	,514
18		,255	6	,330	,892	6	,330
19		,238	6	,338	,894	6	,338
20		,238	6	,151	,848	6	,151
21		,274	6	,389	,902	6	,389
22		,187	6	,413	,906	6	,413
23		,276	6	,095	,824	6	,095
24		,245	6	,196	,862	6	,196
25		,167	6	,817	,960	6	,817

Prueba de homogeneidad de varianzas

ALTURA A LOS 60 DIAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,499	24	125	,080

**ANOVA de un factor**

ALTURA A LOS 60 DIAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	443,231	24	18,468	5,836	,000
Intra-grupos	395,578	125	3,165		
Total	838,809	149			

