



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



Caracterización de bacterias del género *Azotobacter*
aisladas de rizoplasma y rizósfera de *Asparagus officinalis* L. y
su potencial como promotoras de crecimiento en plantas

TESIS

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

PRESENTADO POR:

Br. Anthony Smith Esqueche Berrú

Br. Genesis Abigail Quispe Sandoval

LAMBAYEQUE, PERÚ

2017

**Caracterización de bacterias del género *Azotobacter*
aisladas de rizoplasma y rizósfera de *Asparagus officinalis* L. y su
potencial como promotoras de crecimiento en plantas**

TESIS

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

APROBADO POR:

Mblga. María Silva García

PRESIDENTA

Dra. Gianina Llontop Barandiaran

SECRETARIA

Lic. Julio Silva Estela

VOCAL

Dra. Carmen Carreño Farfán

PATROCINADORA

LAMBAYEQUE, PERÚ

2017

AGRADECIMIENTOS

Estas líneas servirán para expresar nuestro más grande y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la elaboración del presente trabajo.

Un agradecimiento muy especial a nuestra asesora la Dra.

Carmen Rosa Carreño Farfán quien se comprometió con nosotros desde el inicio transmitiéndonos su conocimiento y sobre todo por su paciencia y dedicación por ser la gran persona y amiga y por forjarnos para dar por terminado nuestros objetivos.

Especial reconocimiento merece al grupo de amigos que iniciamos este proyecto y por habernos brindado su apoyo incondicional.

A nuestra amiga Marleny del Socorro Mija Huaman que con sus consejos y apoyo en la presente tesis.

DEDICATORIA

A Dios por haberme acompañado y guiado en todo este tiempo en la realización de la tesis.

A mis padres Patricia Elizabeth Berrú Saavedra y Elmer Antonio Esqueche Sipión por haberme brindado la mejor educación y lecciones de la vida e impulsándome a ser mejor cada día los amo infinitamente.

A mis hermanos y abuelos queridos Yamely, Joan y Luiggi, Manuel y Domitila por su apoyo moral y su cariño brindado constantemente.

A mis grandes amigos de la universidad que iniciamos este proyecto y a mis amigos de mi código 2011-I son los mejores.

ANTHONY SMITH ESQUECHE BERRÚ

DEDICATORIA

La presente tesis se la dedico en primera instancia a Dios por haberme acompañado y guiado en la realización.

A mis padres Sonia Edith Sánchez Díaz y Segundo Quispe Manayay por su infinito amor y comprensión, por haberme proporcionado la mejor educación y lecciones de la vida e impulsándome a ser mejor cada día los amo infinitamente.

A mis hermanos queridos Teresa, Mariajose, Jesus y Angela por su apoyo moral y su cariño brindado constantemente, son los mejores hermanos que puedo tener.

A mis grandes amigos de la universidad que iniciamos este proyecto y a mis amigos de mi código 2011-I son los mejores.

GENESIS ABIGAIL QUISPE SANDOVAL

Índice

I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 Antecedentes de la investigación	4
2.2 Base teórica	8
2.2.1 <i>Asparagus officinalis</i> L.....	11
III. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1 Material.....	14
3.1.1 Muestra biológica.....	14
3.1.2 Población y muestra	14
3.2 Métodos.....	14
3.2.1 Variable de la fase descriptiva.....	15
3.2.2 Variables de la fase experimental	14
3.2.3 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis	17
3.2.4 Lugar de muestreo	17
3.2.5 Obtención de muestras	19
3.2.6 Aislamiento e identificación fenotípica de <i>Azotobacter</i> spp.....	19
3.2.7 Mantenimiento de cultivos de <i>Azotobacter</i> spp.....	23
3.2.8 Cuantificación de nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos	26
3.2.9 Selección de <i>Azotobacter</i> spp	31
3.2.10 Efecto de <i>Azotobacter</i> spp. en plantas de espárrago	31
3.2.11 Análisis estadísticos de los datos	35
IV RESULTADOS.....	39
4.1 Bacterias del genero <i>Azotobacter</i> aisladas e identificadas en el rizoplano y rizósfera de <i>Asparagus officinalis</i> L	39
4.2 Nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos por <i>Azotobacter</i> spp.	45
4.3 Cultivos de <i>Azotobacter</i> spp. seleccionados.....	61
4.4 Efecto de <i>Azotobacter</i> spp. en la altura y numero de tallos de <i>Asparagus</i> <i>officinalis</i> L.	61
V. DISCUSIÓN	78

VI. CONCLUSIONES	84
VII. RECOMENDACIONES	85
VIII. RESUMEN	86
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
X. ANEXOS	97

Índice de tablas

Tabla 1.	Lote de procedencia demuestras de raíces con suelo rizosferico de <i>Asparagus officinalis</i> L. en el fundo Josymar, Viru, La Libertad.....	18
Tabla 2.	Análisis físico – químico de suelo rizosferico de <i>Asparagus officinalis</i> L. en Viru, La Libetad, 2016	20
Tabla 3.	Características diferenciales de <i>Azotobacter</i> spp.....	43
Tabla 4.	Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por <i>Azotobacter</i> spp. de <i>Asparagus officinalis</i> L. en medio Ashby Sacarosa	49
Tabla 5.	Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por <i>Azotobacter</i> spp. de <i>Asparagus officinalis</i> L. en medio LG.....	51
Tabla 6.	Fósforo cuantificado (ppm) en la solubilizacion por <i>Azotobacter</i> spp. aisladas de <i>Asparagus officinalis</i> L. en medio Ashby Sacarosa.....	53
Tabla 7.	Fósforo cuantificado (ppm) en la solubilizacion por <i>Azotobacter</i> spp. aisladas de <i>Asparagus officinalis</i> L. en medio LG	55
Tabla 8.	Indoles producidos (ppm) por <i>Azotobacter</i> spp. aisladas de <i>Asparagus officinalis</i> L. en medio Ashby Sacarosa.....	56
Tabla 9.	Indoles producidos (ppm) por <i>Azotobacter</i> spp. aisladas de <i>Asparagus officinalis</i> L. en medio LG.....	60
Tabla 10.	Valores (ppm) de amonio, fósforo soluble e indoles correspondientes a cultivos de <i>Azotobacter</i> spp. seleccionados.....	62
Tabla11.	Índices de efectividad (%) de <i>Azotobacter</i> spp. en altura de <i>Asparagus officinalis</i> L. a los 30, 45 y 60 días.....	64
Tabla 12.	Índices de efectividad (%) de <i>Azotobacter</i> spp. en el número de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L. a los 30, 45 y 60 días.....	65
Tabla 13.	Pueba de Tukey de la altura de las plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. a los 30, 45 y 60 días después de lainoculacion de <i>Azotobacter</i> spp...	77

Índice de figuras

Figura 1.	Cultivo de <i>Asparagus officinalis</i> L. Virú, región La Libertad, 2016.....	15
Figura 2.	Diseño completamente aleatorio para determinar el efecto de <i>Azotobacter</i> spp. en <i>Asparagus officinalis</i> L.	17
Figura 3.	Ubicación de la provincia de Virú, región La Libertad, abril 2016 (https://www.google.com.pe/maps/place/Vir%C3%BA/@-8.5664616,78.794859,10z/data=!4m5!3m4!1s0x91ac59407c7b0391:0x6c172095672753ce!8m2!3d-8.5528417!4d-78.6254767).....	18
Figura 4.	Raíces con suelo rizosférico de <i>Asparagus officinalis</i> L. deshidratadas.....	21
Figura 5.	Suspensión de raíces y suelo rizosférico de <i>Asparagus officinalis</i> L. en solución salina esterilizada.....	21
Figura 6.	Placa de Petri con medio LG para el aislamiento de <i>Azotobacter</i> spp.	22
Figura 7.	Siembra en medio LG mediante la técnica de agotamiento y estría.....	22
Figura 8.	Enriquecimiento de bacterias en caldo Ashby Sacarosa para el aislamiento de <i>Azotobacter</i> spp.	24
Figura 9.	Placas de Petri con medio Ashby Sacarosa para el aislamiento de <i>Azotobacter</i> spp.	24
Figura 10.	Medios de cultivo líquidos para la identificación del genero <i>Azotobacter</i>	25
Figura 11.	Cultivos puros de <i>Azotobacter</i> spp. en agar nutritivo.....	25
Figura 12.	Caldo extracto de suelo cultivado con <i>Azotobacter</i> spp.....	27
Figura 13.	Caldo extracto de suelo con cloruro de potasio.....	27
Figura 14.	Adición de solución alcohólica de fenol al caldo de extracto de suelo	28

Figura 15.	Caldo National Botanical Research Institute's phosphate cultivado con <i>Azotobacter</i> spp.	30
Figura 16.	Caldo tripticasa soya suplementado con triptófano cultivado con <i>Azotobacter</i> spp.	30
Figura 17.	Coronas de <i>Asparagus officinalis</i> L.	32
Figura 18.	Suelo agrícola, arena de río y humus.....	32
Figura 19.	Suelo experimental contenido en macetas de arcilla.....	33
Figura 20.	Inmersión de coronas de <i>Asparagus officinalis</i> L. en solución salina esterilizada	33
Figura 21.	Inoculo de <i>Aztobacter</i> spp. solución salina esterilizada.....	34
Figura 22.	Inoculo bacteriano asperjado en coronas de <i>Asparagus officinalis</i> L.	36
Figura 23.	Medicion de altura de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L.....	36
Figura 24.	Conteo del número de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L.	37
Figura 25.	Colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias aisladas en a medio Ashby Sacarosa.....	40
Figura 26.	Colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias aisladas en a medio LG	40
Figura 27.	Colonias bacterianas grandes, cremosas y consistencia mucosa seleccionadas en medio Ashby Sacarosa.....	41
Figura 28.	Colonias de bacterias grandes, cremosas y consistencia mucosa seleccionadas en medio LG.....	41
Figura 29.	Bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias subcultivadas en medio Ashby Sacarosa.....	42

Figura 30.	Bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias subcultivadas en medio LG.....	42
Figura 31.	Bacilos Gram negativos del genero <i>Azotobacter</i>	43
Figura 32.	Bacterias enquistadas del genero <i>Azotobacter</i>	44
Figura 33.	Acidificación de glucosa, sacarosa, fructosa y reducción de nitratos.....	44
Figura 34.	Frecuencia de <i>Azotobacter</i> spp. en bacterias rizosfericas fijadoras de nitrógeno aerobias aisladas en el medio Ashby Sacarosa.....	46
Figura 35.	Frecuencia de <i>Azotobacter</i> spp. en bacterias rizosfericas fijadoras de nitrógeno aerobias aisladas en el medio LG	46
Figura 36.	Frecuencia de muestras de rizoplaneo y rizósfera de <i>Asparagus officinalis</i> L. positivas al aislamiento de <i>Azotobacter</i> spp. en medio Ashby Sacarosa	47
Figura 37.	Frecuencia de muestras de rizoplaneo y rizósfera de <i>Asparagus officinalis</i> L. positivas al aislamiento de <i>Azotobacter</i> spp. en medio LG.....	47
Figura 38.	Coloración observada en la cuantificación de amonio	48
Figura 39.	Porcentaje de <i>Azotobacter</i> spp. aisladas en medio LG que solubilizaron fosfato <i>in vitro</i>	52
Figura 40.	Coloración observada en la cuantificación de fósforo soluble	52
Figura 41.	Porcentaje de <i>Azotobacter</i> spp. aisladas en medio Ashby Sacarosa que produjeron indoles <i>in vitro</i>	56
Figura 42.	Porcentaje de <i>Azotobacter</i> spp. aisladas en medio LG que produjeron indoles <i>in vitro</i>	56
Figura 43.	Coloración observada en la cuantificación de indoles	57

Figura 44.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 30 días después de la siembra de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) <i>Azotobacter</i> sp.12-17ASHBY, d) <i>Azotobacter</i> sp.16-28ASHB.....	62
Figura 45.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 30 días después de la siembra de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) <i>Azotobacter</i> sp.25-60LG, d) <i>Azotobacter</i> sp.95-221ASHBY	63
Figura 46.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 30 días después de la siembra de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) <i>Azotobacter</i> sp.76-165LG, d) <i>Azotobacter</i> sp.21-42ASHBY	63
Figura 47.	Altura (cm) de <i>Asparagus officinalis</i> L., 30 días después de la inoculación de <i>Azotobacter</i> spp	64
Figura 48.	Número de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L., 30 días después de la inoculación de <i>Azotobacter</i> sp.....	65
Figura 49.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) <i>Azotobacter</i> sp.16-28ASHBY	66
Figura 50.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) <i>Azotobacter</i> sp.12-17ASHBY	66
Figura 51.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) <i>Azotobacter</i> sp.95-215ASHBY	67
Figura 52.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) <i>Azotobacter</i> sp.76-164LG.....	67
Figura 53.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) <i>Azotobacter</i> sp.76-165LG	68
Figura 54.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) <i>Azotobacter</i> sp.21-42LG.....	68

Figura 55.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) <i>Azotobacter</i> sp. 95-221ASHBY	69
Figura 56.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) <i>Azotobacter</i> sp. 25-60LG	69
Figura 57.	Altura (cm) de <i>Asparagus officinalis</i> L., 45 días después de la inoculación de <i>Azotobacter</i> spp	70
Figura 58.	Número de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L., 45 días después de la inoculación de <i>Azotobacter</i> spp	72
Figura 59.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 60 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>Azotobacter</i> sp. 95-215ASHBY	72
Figura 60.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 60 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>Azotobacter</i> sp.95-221ASHBY	73
Figura 61.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 60 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>Azotobacter</i> sp.12-17ASHBY	73
Figura 62.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 60 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>Azotobacter</i> sp. 21-42LG	74
Figura 63.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 60 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>Azotobacter</i> sp. 76-164LG	74
Figura 64.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 60 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>Azotobacter</i> sp. 16-28ASHBY	75
Figura 65.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 60 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>Azotobacter</i> sp. 76-165LG	75

Figura 66.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 60 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>Azotobacter</i> sp. 25-60LG	76
Figura 67.	Altura (cm) de <i>Asparagus officinalis</i> L., 60 días después de la inoculación de <i>Azotobacter</i> spp	76
Figura 68.	Número de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L., 60 días después de la inoculación de <i>Azotobacter</i> spp.	77

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de *Asparagus officinalis* L. “espárrago” lidera los productos alimenticios de exportación en el Perú (Reyes, 2006; Albuquerque, 2014) y al igual que en otros países, el rendimiento está relacionado con la aplicación de fertilizantes químicos en las épocas de mayor demanda de las plantas (Delgado, 2007). Estos insumos reponen los nutrientes removidos del suelo y contribuyen significativamente a la productividad agrícola; no obstante, la eficacia de recuperación o porcentaje de fertilizante que es absorbido por las plantas es en promedio 50, 30, 60% para el N, P, K (SAGARPA, 2010). El resto, se pierde e inclusive contamina el ambiente (Pedraza et al., 2010).

En la agricultura sostenible los requerimientos nutricionales de los cultivos agrícolas como el espárrago, pueden ser proporcionados por las rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR), que incluyen especies del género *Azotobacter* (Kizilkaya, 2009; Guzmán et al., 2012; Obando, 2012). Las PGPR benefician a las plantas a través de mecanismos directos e indirectos. La promoción directa es consecuencia de la síntesis de metabolitos facilitando la disponibilidad de nutrientes a las plantas, mientras que en la promoción indirecta las PGPR disminuyen o previenen el efecto deletéreo de los fitopatógenos (Delgado et al., 2003; Hernández et al., 2006; Bhattacharyya & Jha, 2012).

Las bacterias del género *Azotobacter* tienen potencial para la promoción de crecimiento en plantas, debido a que fijan nitrógeno (Obando, 2012); producen ácido indolacético (Guzmán et al., 2012), giberélico y abscísico (Naz et al., 2012), solubilizan fosfatos (Escobar et al., 2011) e inclusive presentan efecto antagónico a hongos fitopatógenos (Rojas, 2013). Ensayos con *Azotobacter* spp. en condiciones de invernadero y campo demostraron incremento en el desarrollo vegetativo y rendimiento de cultivos de importancia económica como *Solanum tuberosum* L “papa” (Rico, 2009) y *Zea mays* L “maíz” (Ashrafi & Seiedi, 2011); sin embargo, también se han reportado resultados contradictorios, en los que no se ha obtenido la respuesta esperada, posiblemente porque las bacterias no se adaptaron a las condiciones del suelo, muy diferentes a las de su procedencia o no compitieron exitosamente con la biota nativa (Gonzáles et al., 2003).

El éxito de la inoculación de las PGPR como *Azotobacter* spp. reside en la investigación de bacterias compatibles y muchas veces específicas al cultivo y condiciones ecológicas del suelo (Reyes et al., 2008). Las especies de *Azotobacter* son fáciles de aislar y cultivar en sustratos de bajo costo. Asimismo, forman quistes que permanecen viables bajo condiciones desfavorables, por lo que se consideran apropiadas para constituir biofertilizantes que pueden ser aplicados a las semillas o el suelo, con éxito en la sobrevivencia y establecimiento de las bacterias. En el rizoplasma y rizósfera de los cultivos de espárrago se encuentran especies de *Azotobacter*; sin embargo, no se ha realizado investigación para aislarlas, caracterizarlas y determinar su efecto en los cultivos agrícolas.

La presente investigación permitirá identificar especies de *Azotobacter* propias de la región, con potencial para la biofertilización, generando valor agregado a la biodiversidad regional, a la vez que se disminuye el riesgo de la salud de los seres vivos y el efecto negativo de los insumos químicos en el ambiente. Por lo expuesto, se planteó el siguiente problema ¿Cuáles son las características de las bacterias del género *Azotobacter* aisladas del rizoplasma y rizósfera de espárrago y cuál es su potencial como promotoras de crecimiento en

plantas?. El objetivo general fue: Aislar e identificar bacterias del género *Azotobacter* en el rizoplano y rizósfera de espárrago y determinar su potencial como promotoras de crecimiento en plantas.

Los objetivos específicos fueron: aislar e identificar fenotípicamente bacterias del género *Azotobacter* en el rizoplano y rizósfera de plantas de espárrago, cuantificar el nitrógeno fijado, fosfato solubilizado y los indoles producidos *in vitro* por las bacterias, seleccionar los ocho cultivos de bacterias con los mayores valores en el nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos y determinar el efecto de las bacterias seleccionadas en la altura y número de tallos de plantas de espárrago. La hipótesis planteada fue: Las bacterias del género *Azotobacter* aisladas del rizoplano y rizósfera de espárrago fijan nitrógeno, solubilizan fosfatos, producen indoles e incrementan el desarrollo vegetativo de las plantas de espárrago.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

El género *Azotobacter* pertenece al dominio Eubacteria, phylum, Proteobacteria, clase Deltaproteobacteria y familia *Azotobacteriaceae*. Las bacterias son quimio-organótrofas, catalasa positivas y Gram negativas. Usualmente son ovoides y grandes, con 1,5-2,0 μm de diámetro, pero también se pueden observar pleomórficas. No producen endosporas, pero si forman quistes. Se mueven por flagelos peritricos, son aerobias, pero pueden crecer en concentraciones bajas de oxígeno. Fijan nitrógeno inclusive con oxígeno, en contraste con otras bacterias diazotróficas que lo fijan sólo en anaerobiosis o en microaerófilia. Son capaces de utilizar gran cantidad de fuentes de carbono como azúcares, alcoholes y sales de ácidos orgánicos. Fijan al menos 10mg de N_2 por gramo de glucosa consumida. En presencia de nitrógeno combinado crecen en suelos con pH de 4,8-8,5 y cuando fijan el nitrógeno el pH es de 7,0-7,5 (Agüero, 2009; Obando, 2012).

Las bacterias del genero *Azotobacter* son de vida libre, presentes en la mayoría de suelos, con un promedio de 10^4 g^{-1} de suelo y son capaces de fijar en promedio $20 \text{ Kg N h}^{-1} \text{ año}^{-1}$. *A. chroococum* es la especie más predominante, pero también se han descrito *A. agilis*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. insignis*, *A. macrocytogenes* y *A. paspali* (Kizilkaya, 2009). Se han reportado aislados en suelo rizosférico de cultivos de *Musa paradisiaca* “plátano”, *Dichanthium aristatum* “pasto”, *Zea mays* L. “maíz” y rastrojos (Lara et al., 2007); *Spinacia oleracea* L. “espinaca” y *Cucurbita pepo* L. “calabacín” (Jiménez, 2007),

Bambusa bamboo “bambú” (Sachin & Misra, 2009), *Pinus patula* Shcl. “pino” (Orozco & Martínez, 2009), *Solanum tuberosum* L. “papa” (Rico, 2009), *Stevia rebaudiana* Bert (Borda et al., 2009), *Eucaliptus* sp. “eucalipto” (Obando et al., 2010), *Lactuca sativa* “lechuga” (Vélez & Orellana, 2010), *Lycopersicum esculentum* Mill “tomate” (Escobar et al., 2011), *Vigna unguiculata* “frijol caupí” (Obando, 2012) e inclusive malezas (Rojas, 2013).

El potencial biológico de las especies de *Azotobacter* como PGPR, es consecuencia de su actividad en la fijación de nitrógeno (Lara et al., 2007; Kizilkaya, 2009; Escobar et al., 2011; Obando, 2012), producción de ácido indolacético (García et al., 2005; Rico, 2009; Obando et al., 2010; Naz et al., 2012; Aly et al., 2012; Guzmán et al., 2012), giberélico y abscísico (Naz et al., 2012), solubilización de fosfatos (Rico, 2009; Escobar et al., 2011; Obando, 2012; Rojas, 2013) e inclusive efecto antagónico de hongos fitopatógenos como *Fusarium solani* (Rico, 2009) y *Fusarium verticillioides* (Rojas, 2013).

Ensayos con *Azotobacter* spp. demostraron incremento en la germinación de *Coffea arabica* L. “café” (Delgado et al., 2003), bambú (Sachin & Misra, 2009), *Triticum aestivum* “trigo” (Aly et al., 2012), maíz (Rojas, 2013); altura de trigo (García et al., 2005), pino (Orozco & Martínez, 2009), *Cucumis sativus* “pepinillo” (Salhia, 2010), pasto (Mantilla et al., 2011), maíz (Ashrafi & Seiedi, 2011; Exebio, 2013), longitud radicular de bambú (Sachin & Misra, 2009); biomasa aérea y radicular de pino (Orozco & Martínez, 2009), pepinillo (Salhia, 2010), tomate (Escobar et al., 2011), frijol caupí (Obando, 2012), maíz (Córdova & Manayay, 2013); contenido de nitrógeno en raíces de pepinillo (Salhia, 2010), clorofila en hojas frijol caupí (Obando, 2012); contenido de nitrógeno, fósforo y potasio en frutos de tomate (Gonzáles et al., 2003), rendimiento de *Allium cepa* “cebolla” (Balemi et al., 2007), papa (Rico, 2009), lechuga (Vélez & Orellana, 2010) y de maíz (Ashrafi & Seiedi, 2011; Jarak et al., 2012) y disminución de la dosis del fertilizante químico: 25% en cebolla (Balemi et al., 2007) y 50% en trigo (García et al., 2005) y maíz (Sánchez et al., 2014).

Bacterias aisladas de la rizósfera de *Brachiaria decumbens*, *B. humidicola*, *Phaseolus vulgaris*, *Theobroma cacao* “cacao” y plantas silvestres, se caracterizaron para determinar su potencial como PGPR. Se realizó tinción de Gram, prueba de motilidad y se investigó la presencia de cápsula y gránulos de volutina, actividad de la catalasa, tolerancia salina, fijación de nitrógeno y solubilización de fosfatos. Estas pruebas permitieron seleccionar las bacterias con potencial, con las que se investigó el efecto en pimentón y maíz en invernadero. El 68% de bacterias demostraron ser diazótrofes, identificándose *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Rhizobium*. *Azotobacter* sp.1, incrementó la germinación de semillas de pimentón y maíz, alcanzando 76 y 57% respectivamente, en comparación con el testigo (71 y 56%). En pimentón incrementó el número de botones florales, peso de la biomasa total, porcentaje de nitrógeno y de fósforo y en maíz solo aumentó el porcentaje de nitrógeno. La caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica permitió seleccionar bacterias con potencial para la promoción de crecimiento en pimentón y maíz (Reyes et al., 2008).

El potencial como promotoras del crecimiento de plantas se determinó en especies de *Azotobacter* aisladas de la rizósfera de malezas asociadas a maíz. Las bacterias de las muestras se enriquecieron en caldo Ashby-sacarosa y se aislaron en el mismo agar. Los aislados se identificaron fenotípicamente y se sembraron en caldo tripticosa soya, caldo extracto de suelo y caldo Sundara Rao Sinha Medium para cuantificar los indoles producidos, nitrógeno fijado y fosfato solubilizado, respectivamente. Se obtuvieron 229 cultivos puros de bacterias, entre los que se identificaron *A. vinelandii* (58%), *A. paspali* (13%), *A. armeniacus* (8%) y *A. nigricans* (8%). Se cuantificaron 2,25-60,75ppm de indoles; 10,37-36,03ppm de amonio y 1,72-6,06ppm de fósforo soluble. La actividad demostrada corroboró, el potencial de las especies de *Azotobacter* para incrementar el desarrollo vegetativo y rendimiento de los cultivos agrícolas (Rojas, 2013).

Las PGPR son una alternativa para la disminución de la dosis del fertilizante nitrogenado químico. En este contexto, se investigó la respuesta de maíz a la inoculación de *Azotobacter* sp. y *Burkholderia* sp. junto a 50% de la dosis de nitrato de amonio, NH_4NO_3 . El experimento se realizó bajo un diseño experimental de bloques al azar, teniendo como variables el porcentaje de germinación y la biomasa aérea y radical. Las bacterias incrementaron la germinación de las semillas, alcanzando 95% y superando significativamente al testigo 100% fertilizante (85%) y al testigo absoluto (75%). A los 62 días después de la siembra la aplicación de 50% del fertilizante químico más *Azotobacter* sp. y la coinoculación de *Azotobacter* sp. - *Burkholderia* sp. incrementó la biomasa seca aérea y radical de las plantas de maíz, alcanzando 8,54-10,35g y 5,78-7,03g, respectivamente, en comparación con 6,28 y 2,60g en el testigo 100% de fertilizante químico. Se demostró la posibilidad de disminuir en 50% el fertilizante químico cuando se aplica junto a bacterias como *Azotobacter* sp. y *Burkholderia* sp. (Sánchez et al., 2014).

Jatropha curcas L. “piñón” es una especie utilizada para la producción de biodiesel. Desarrolla en suelos no aptos para la producción de alimentos: no fértiles y con problemas de contaminación. Se investigó al crecimiento de esta especie en suelo contaminado con metales pesados al que se le aplicó enmiendas de residuos industriales y el biofertilizante *Azotobacter chroococcum*. Las bacterias se aplicaron a las semillas, las plántulas se trasplantaron a los 15 días y durante 6 meses se evaluó la sobrevivencia y características biométricas. Las plántulas sobrevivieron a niveles de arsénico, cromo y zinc superiores de 250, 100 y 3000 mg Kg^{-1} , respectivamente. La aplicación en conjunto de las enmiendas orgánicas y la combinación del biofertilizante con las enmiendas orgánicas incrementó la altura y biomasa de las plantas. Por el contrario, el biofertilizante solo no presentó efecto positivo en el crecimiento de las plantas, demostrándose que se requieren enmiendas orgánicas para disminuir la toxicidad de los metales, facilitar el desarrollo de *Azotobacter chroococcum* y viabilizar su uso en la biorremediación de suelos contaminados (Kumar et al., 2008).

2.2 Base teórica

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

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 por efecto de la actividad microbiana. 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).

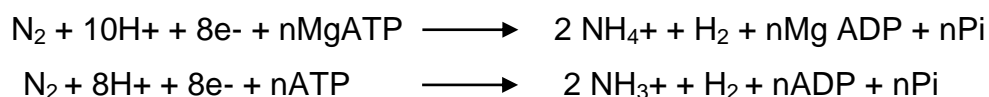
El término rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas, conocido por sus siglas en inglés PGPR (Plant growth promoting rhizobacteria) fue propuesto por Kloepper y Schroth en 1978, para describir a las bacterias que habitan la rizósfera de las plantas y que pueden tener un efecto sobre los cultivos (Kloepper, 2003). Las PGPR benefician a los cultivos agrícolas a través de mecanismos directos e indirectos. La promoción directa ocurre cuando las PGPR sintetizan metabolitos y facilitan a las plantas la toma de nutrientes mientras que la promoción indirecta es consecuencia de la disminución o prevención del efecto deletéreo de fitopatógenos por las PGPR. Los mecanismos directos incluyen la síntesis de reguladores del crecimiento (auxinas, giberelinas, citoquininas), solubilización de fosfatos minerales, fijación de nitrógeno atmosférico, producción de sideróforos y estimulación del sistema de absorción de iones. Entre los mecanismos indirectos o de biocontrol se encuentran la competencia por un nicho ecológico o por nutrientes, interacción directa con los patógenos

(parasitismo y lisis enzimática), antibiosis o amensalismo, producción de sideróforos e inducción de resistencia sistémica a la planta (Delgado et al., 2003; Hernández et al., 2006; Bhattacharyya & Jha, 2012).

Bacterias como *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter* y *Azotobacter* promueven el crecimiento de plantas, mayoritariamente a través de mecanismos directos, así como *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Streptomyces* lo hacen a través de mecanismos indirectos; no obstante, todas las PGPR presentan un mayor o menor grado de efectividad en ambos mecanismos (Doubou et al., 2002; Kloepper, 2003; Idris et al., 2007; Guillén et al., 2006; Franco, 2008; Karnwal, 2009; Martínez et al., 2010; Salaheddin et al., 2010). El efecto de las PGPR también se atribuye a la denominada “hipótesis aditiva”, según la cual más de un mecanismo están involucrados en la asociación planta-rizobacteria, los mismos que operan simultáneamente o en asociación. La suma de los diferentes mecanismos refleja los cambios observados en el crecimiento de las plantas, cuando son cultivadas bajo condiciones ambientales propicias (Bashan & Levnony, 1990, mencionados por Kloepper, 2003).

Los fijadores de nitrógeno o diazótrofos reducen el nitrógeno molecular hasta amonio. Los de vida libre pueden ser anaerobios obligados o facultativos (*Clostridium pasteurianum*, *Klebsiella* spp, *Desulfovibrio* spp.), aerobios obligados (*Azotobacter* spp., *Beijerinckia* spp.) y fotosintéticos como las bacterias púrpuras sulfurosas y no sulfurosas y bacterias verdes sulfurosas. El número de bacterias diazótrofes es potencialmente elevado en la rizósfera. Estos microorganismos son categorizados dentro de las PGPR al ejercer un efecto benéfico en el crecimiento de las plantas (Coyne, 2000; Agüero, 2009; Altamirano et al., 2014). Bacteria y Archea son los únicos organismos que pueden fijar el nitrógeno gracias al complejo enzimático nitrogenasa, formado por dos proteínas, una que contiene hierro (proteína-Fe) y otra con molibdeno y hierro (proteína Mo-Fe). La nitrogenasa que contiene Mo es la más ampliamente distribuida (Loredo et al., 2004).

El complejo nitrogenasa cataliza la conversión del N_2 a NH_3 bajo la reacción expuesta por Agüero, (2009):



La reducción de N_2 a NH_3 requiere ocho electrones con un mínimo de 16 ATP para reducir una molécula de N_2 atmosférico. La reducción de N_2 está siempre acoplada a la reducción de H^+ a H_2 , requiriéndose la reducción obligada de protones en un número de 1 mol de H_2 producido por mol de N_2 reducido. Bajo condiciones fisiológicas normales el requerimiento de ATP es de 20-30 moléculas de Mg ATP, en consecuencia, la fijación de nitrógeno puede consumir una fracción significativa de la reserva celular de ATP. La actividad de la nitrogenasa se inactiva rápidamente en presencia de oxígeno. Las bacterias capaces de fijar nitrógeno en total aerobiosis presentan un sistema de protección de su nitrogenasa que comprende: elevada tasa respiratoria, protección conformacional, autoprotección y otros cambios morfológicos y fisiológicos (Loredo et al., 2004; Agüero, 2009).

El efecto positivo de las PGPR está relacionado con el aumento en la longitud de las raíces laterales, así como el número y longitud de los pelos radicales, 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 activamente 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 los pelos radiculares (Loredo et al., 2004).

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 del fósforo. El principal mecanismo para la solubilización de fosfatos, es la producción de ácidos orgánicos, aunque también se consideran los ácidos inorgánicos como el sulfhídrico, nítrico 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).

2.2.1 *Asparagus officinalis* L.

El espárrago es una planta originaria de la cuenca del Mediterráneo cuya clasificación taxonómica mencionada por Bernabé (2011) y Valdivia (2015) es: Reino: Plantae, Division: Espermatófitas, Subdivision: Angiospermas, Clase: Monocotiledóneas, Orden: Asparagales, Familia: Asparagaceae, Subfamilia: Asparagoideae, Género: *Asparagus*, Especie: *A. officinalis* L.

Las plantas de espárrago tienen raíces que nacen directamente del tallo subterráneo y son cilíndricas y carnosas porque acumulan reservas para la producción de turiones (Borrego, 2014). De estas raíces nacen las raicillas o pelos absorbentes. Las raíces principales tienen una vida de 2-3 años y cuando mueren son sustituidas por otras nuevas que se sitúan en la parte superior de las anteriores, tal que las yemas van quedando más altas y la parte subterránea va acercándose a la superficie del suelo, a medida que pasan los años. El tallo es único, subterráneo y modificado en su rizoma. Se desarrolla horizontalmente en forma de base, desde la cual se producen otros órganos de la planta. De las yemas brotan los turiones o parte comestible, que cuando se dejan vegetar son

los futuros tallos ramificados. Las flores son pequeñas, generalmente solitarias, campanuladas y con la corola verde amarillenta. El fruto es una baya redondeada de 0,5cm de diámetro, al principio verde y rojo cuando madura. Cada fruto tiene 1-2 semillas de color pardo oscuro o negras, con elevado poder germinativo (Delgado, 2007; Canto et al., 2008).

Las plantas de espárrago son dioicas. Las plantas macho son más productivas en turiones, debido a que las plantas hembra utilizan parte de las reservas en la formación de flores, frutos y semillas. Desde el punto de vista agronómico la planta de espárrago tiene tres fases diferenciadas: desarrollo vegetativo, producción de turiones y periodo vegetativo. El cultivo se realiza en suelo con textura franca, con inclinación a franco-arenoso o limoso. El pH debe ser 7,5-8,0 aunque tolera un pH 6,5. La producción de turiones requiere de 11-13°C de temperatura media mensual, con 60-70% de humedad relativa. Temperaturas mayores favorecen al desarrollo vegetativo (Kirschenbilder et al., 2015). El producto comestible es de textura carnosa y firme, aroma intenso y un sabor ligeramente dulce. Su alta cantidad de fibras, facilita el proceso de digestión (Agrobanco, 2007).

La siembra del espárrago puede ser directa por semillas o por trasplante de plántulas o de garras. Las plántulas se obtiene de semillas híbridadas, al momento del trasplante presentan plumerillos de 10-12cm de longitud y después de 1-2 años se cosecha. Las garras se obtienen en los semilleros y después de 1 año se realiza la primera recolección. El primer riego tiene lugar en la plantación, para mantener la humedad del sistema radicular y favorecer la formación de la garra. Los otros dos riegos corresponden a la recolección y al desarrollo anual de la parte aérea. El riego de recolección debe mantener la humedad en la zona donde van a emerger los turiones y el riego de desarrollo de la parte aérea se debe hacer por gravedad sino se dispone de riego por goteo; aplicando 1-2 riegos semanales. El ultimo riego se realiza 3 meses antes de la cosecha para evitar las brotaciones tardías que puedan consumir las reservas de las raíces (Reyes, 2006; Delgado, 2007; Vallejo et al., 2009).

Según el manejo agronómico, los espárragos son blancos, morados y verdes. Los blancos se cultivan bajo la tierra, sin recibir la luz del sol y se cosechan cuando la tierra se eleva ligeramente, antes que la yema esté en contacto con la luz. Los espárragos morados se cultivan igual que los blancos, pero se recolectan cuando la yema ha traspasado la superficie de la tierra y ha entrado en contacto con la luz solar. Los espárragos verdes se cultivan al aire libre y reciben su color de la luz solar y se recolectan cuando sobresalen 20-25cm de la tierra. Su sabor es más aromático, parecido al espárrago silvestre y contienen mayor cantidad de vitaminas por la clorofila (Reyes 2006; Delgado, 2007).

El rendimiento de los cultivos y la calidad de sus productos, están determinados por un componente genético y un ambiental. El componente genético es el germoplasma o cultivar utilizado. El espárrago, a diferencia de otras especies hortícolas, tiene un número reducido de cultivares comerciales que, a partir de una base genética e histórica muy restringida, han sido mejorados y seleccionados con distintos objetivos, con potenciales de rendimiento y características cualitativas bastante diferentes para distintos países o regiones productivas. Uno de las principales cultivares de espárrago es el UC-157 F1, el cual junto con el F2 y otros derivados ocupan mayoritariamente la superficie cultivada (Farías et al., 2004). El cultivar UC-157 fue obtenido en Estados Unidos, en 1980 y es específica para la producción de turiones verdes. El híbrido F1 es más productivo y de mejor calidad que el F2 y es una de los cultivares más precoces y productivos en el mercado (Delgado, 2007).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Material biológico

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

3.1.2 Población y muestra

En la investigación descriptiva la población estuvo constituida por las plantas de espárrago (Figura 1) del fundo Josymar (50ha) en Virú, Trujillo y se investigó una muestra no probabilística de 96 plantas colectadas durante abril de 2016. El número de muestras fue calculado (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 las bacterias del género *Azotobacter* aisladas e identificadas en el rizoplano y rizósfera de espárrago durante abril de 2016 y la muestra no probabilística y por conveniencia estuvo constituida por ocho cultivos de *Azotobacter* spp. seleccionados.

3.2 Métodos

3.2.1 Variable de la fase descriptiva

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

3.2.2 Variables de la fase experimental

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

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



Figura 1. Cultivo de *Asparagus officinalis* L. Virú, región La Libertad, 2016.

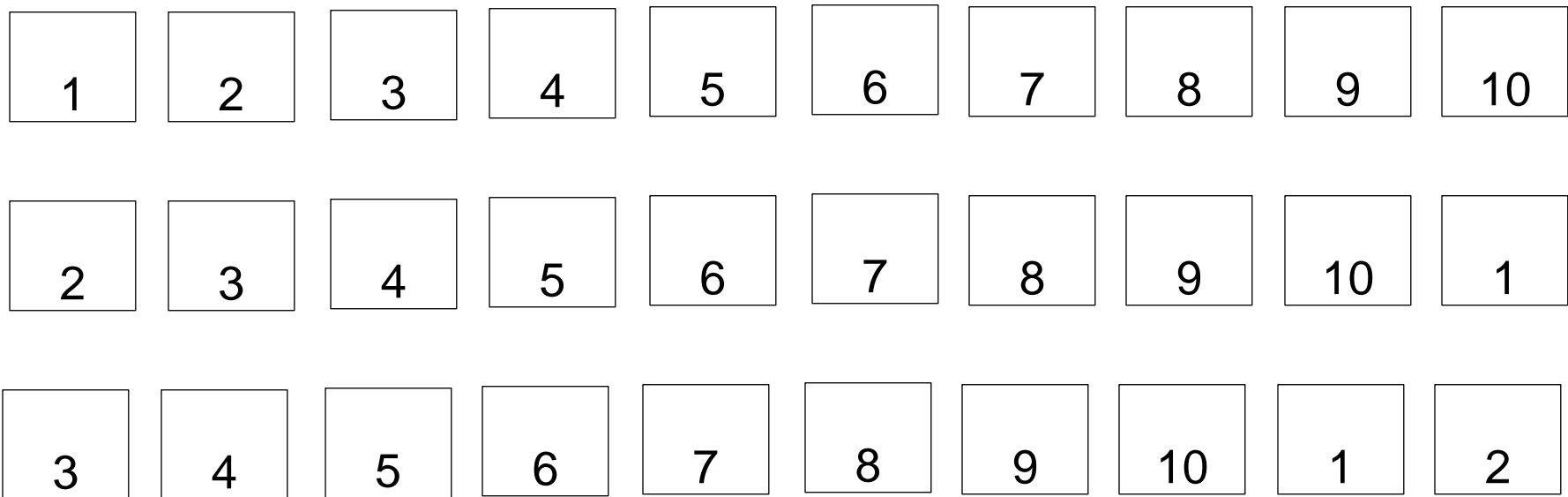
3.2.3 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

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

La hipótesis en la primera fase se contrastó con el diseño no experimental de “Solo Después” (Vásquez et al., 2012) y en la segunda fase con el diseño experimental completamente aleatorio, DCA (Hernández et al., 2003). Los tratamientos fueron diez correspondientes a T1: Testigo absoluto (agua destilada), T2: Testigo químico (urea 46% N), T3-T10 *Azotobacter* spp. En cada tratamiento se consideraron tres repeticiones, totalizando 30 unidades experimentales (Figura 2).

3.2.4 Lugar de muestreo

Las 96 muestras de raíces con suelo rizósferico de espárrago se colectaron en el fundo Josymar, ubicado en el lote 10,6 del sector IV, Proyecto Especial Chavimochic, en la provincia Virú, región La Libertad (Figura 3, tabla 1, anexo 2). Virú tiene una superficie de 3218,74 km² y limita por el norte con la provincia de Trujillo, por el este con las provincias de Julcán y Santiago de Chuco, por el sur con el Departamento de Ancash y por el oeste con el océano Pacífico (Municipalidad Provincial de Virú, 2016). El fundo Josymar tiene 50 ha, distribuidas en 24 lotes de aproximadamente 1,5 ha cada uno. Al momento del muestreo 19 lotes estaban sembrados con espárrago cultivar UC-157 F2 (cuatro plantas por metro lineal), con 1,8-2,5 años transcurridos después del transplante de coronas y una población promedio de 30 000 plantas ha⁻¹.



T1: Testigo absoluto

T2: Testigo químico

T3 – T10: *Azotobacter* spp.

Figura 2. Diseño completamente aleatorio para determinar el efecto de *Azotobacter* spp. en *Asparagus officinalis* L.



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

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

Total: 19 lotes	515	96
-----------------	-----	----

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

3.2.5 Obtención de muestras

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

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

3.2.6 Aislamiento e identificación fenotípica de *Azotobacter* spp.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias del género *Azotobacter* fueron aisladas con enriquecimiento (Escobar et al., 2011) y sin enriquecimiento previo (Ramírez & Ugaz, 2014). Las muestras de raíces con suelo rizosférico (Figura 4) se deshidrataron bajo sombra durante 72 horas se fragmentaron (5cm), aleatoriamente se tomaron 10g de raíces junto con el suelo adherido, se depositaron en frascos de 250mL de capacidad conteniendo 90mL de solución salina esterilizada (NaCl 0,87% p/v) constituyendo una suspensión de raíces con suelo rizosférico o dilución 10^{-1} (Figura 5) que se agitó manualmente durante 10 minutos.

Para el aislamiento de las bacterias sin previo enriquecimiento (Ramírez & Ugaz, 2014), alícuotas de la dilución 10^{-1} se sembraron mediante la técnica de agotamiento y estría sobre la superficie del medio sólido sin nitrógeno LG (Figuras 6, 7, anexo 3) y se incubaron a 30°C por 48 horas.

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

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



Figura 4. Raíces con suelo rizosférico de *Asparagus officinalis* L. deshidratadas.



Figura 5. Suspensión de raíces y suelo rizosférico de *Asparagus officinalis* L. en solución salina esterilizada.

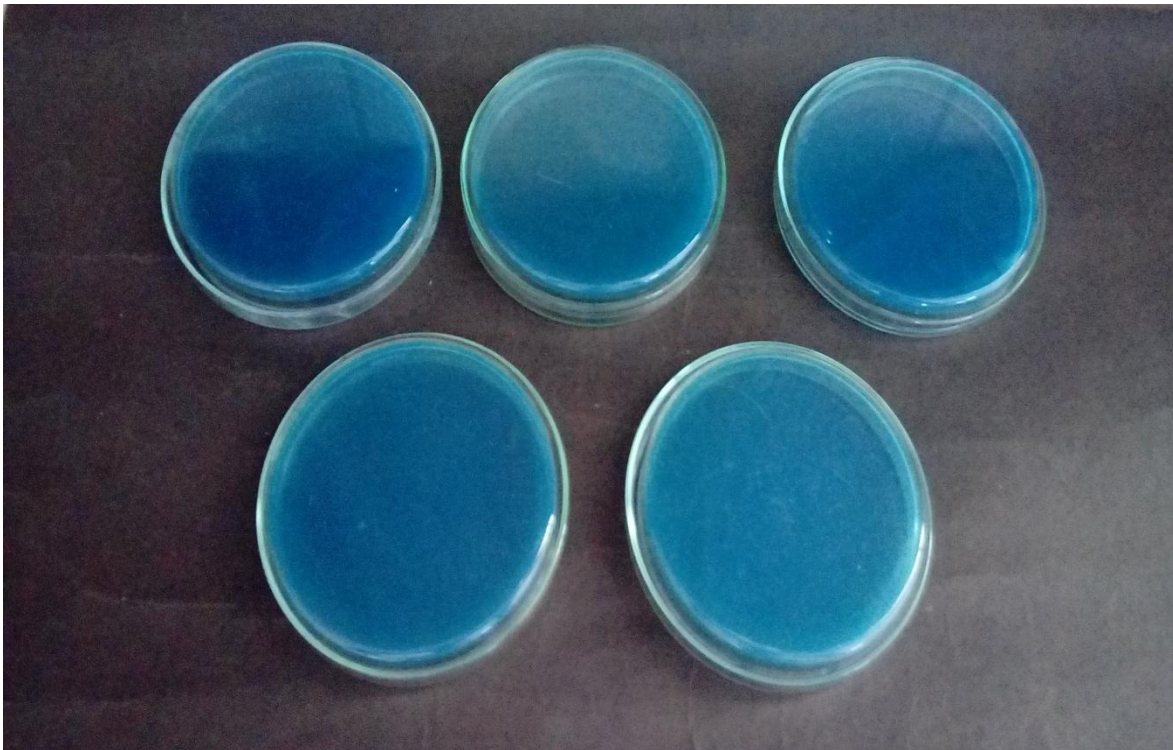


Figura 6. Placas de Petri con medio LG para el aislamiento de *Azotobacter* spp.

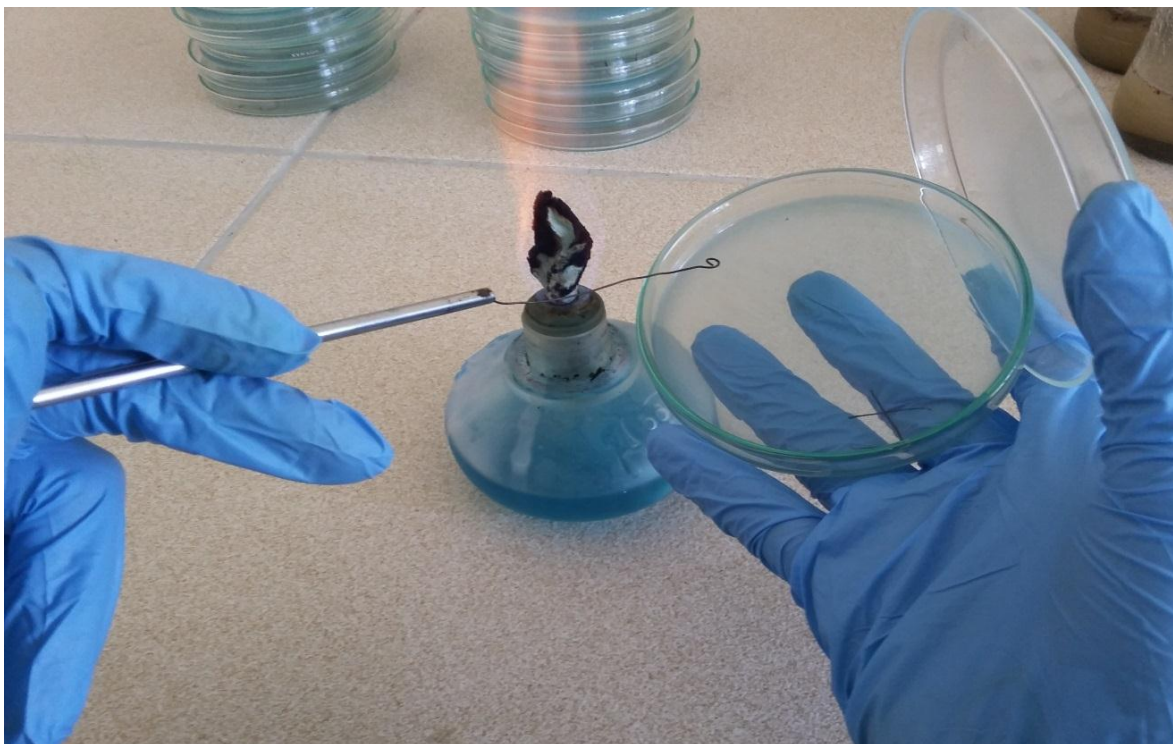


Figura 7. Siembra en medio LG mediante la técnica de agotamiento y estría.

Para el enriquecimiento (Escobar et al., 2011), las bacterias de la dilución 10^{-1} se cultivaron en caldo sin nitrógeno Ashby Sacarosa con azul de bromotimol (Figura 8, anexo 2), se incubaron a 30°C, por 96 horas y se reportaron como positivos al enriquecimiento, los caldos donde se observó viraje del indicador del verde al amarillo, turbidez y una película superficial. Para el aislamiento de las bacterias se tomó una alícuota del caldo cultivado, se sembró en medio sólido sin nitrógeno Ashby Sacarosa (Figura 9), mediante la técnica francesa de agotamiento y estría y se incubó a 30°C por 96 horas.

Las colonias desarrolladas en los medios LG y Ashby Sacarosa, con viraje del indicador al amarillo, grandes y consistencia mucosa se seleccionaron y purificaron mediante subcultivos sucesivos en el medio de aislamiento (Escobar et al., 2011). Se realizaron coloraciones de Gram y cuando se observaron bacilos Gram negativos, grandes con o sin quistes, se sembraron en agar tripticasa soya (TSA) y en el medio sin nitrógeno correspondiente, se incubaron a 30°C durante 24 horas y constituyeron los cultivos puros de bacterias que se guardaron en refrigeración (8°C). En la identificación fenotípica del género *Azotobacter* (Escobar et al., 2011) se realizaron pruebas de catalasa, oxidasa, acidificación de glucosa, sacarosa, fructosa, maltosa y reducción de nitratos (Figura 10).

3.2.7 Mantenimiento de cultivos de *Azotobacter* spp.

Los cultivos puros de *Azotobacter* spp. identificados se sembraron en el medio sólido sin nitrógeno de aislamiento y en agar tripticasa soya durante 24 horas (Figura 11) y se mantuvieron a temperatura ambiente (28°C) y en refrigeración (8°C), respectivamente, realizándose subcultivos cada 30 días (Escobar et al., 2011).



Figura 8. Enriquecimiento de bacterias en caldo Ashby Sacarosa.

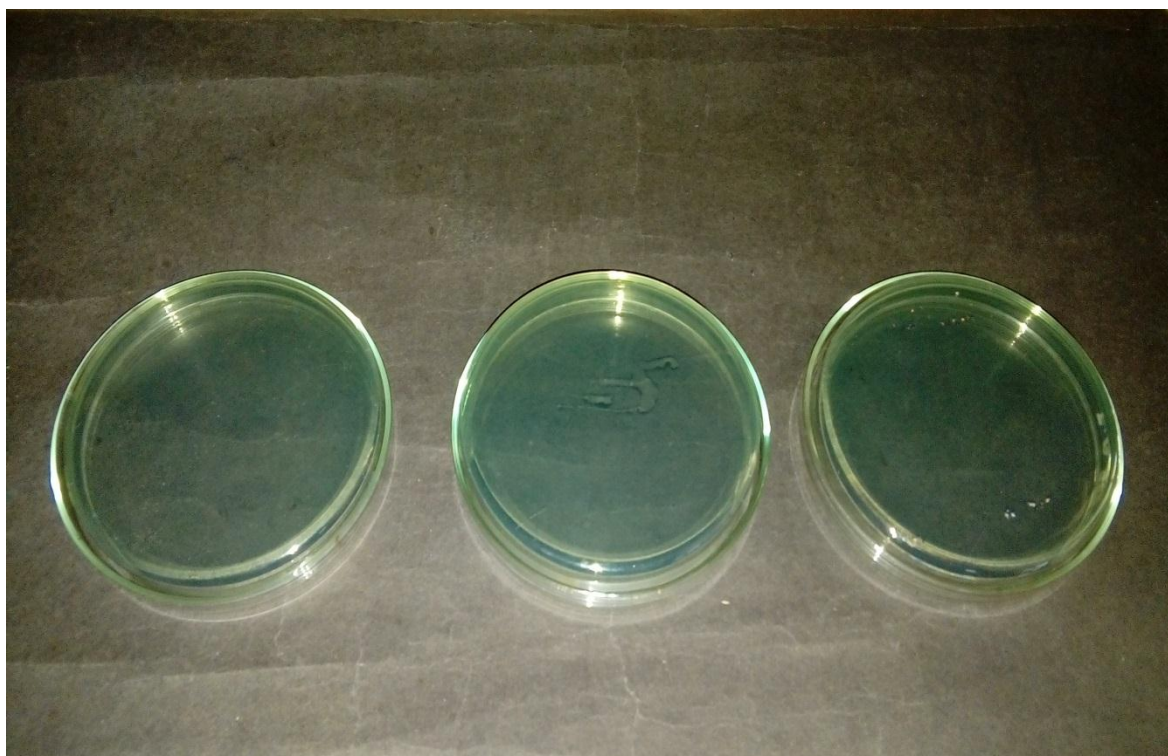


Figura 9. Placas de Petri con medio Ashby Sacarosa para el aislamiento de *Azotobacter* spp.

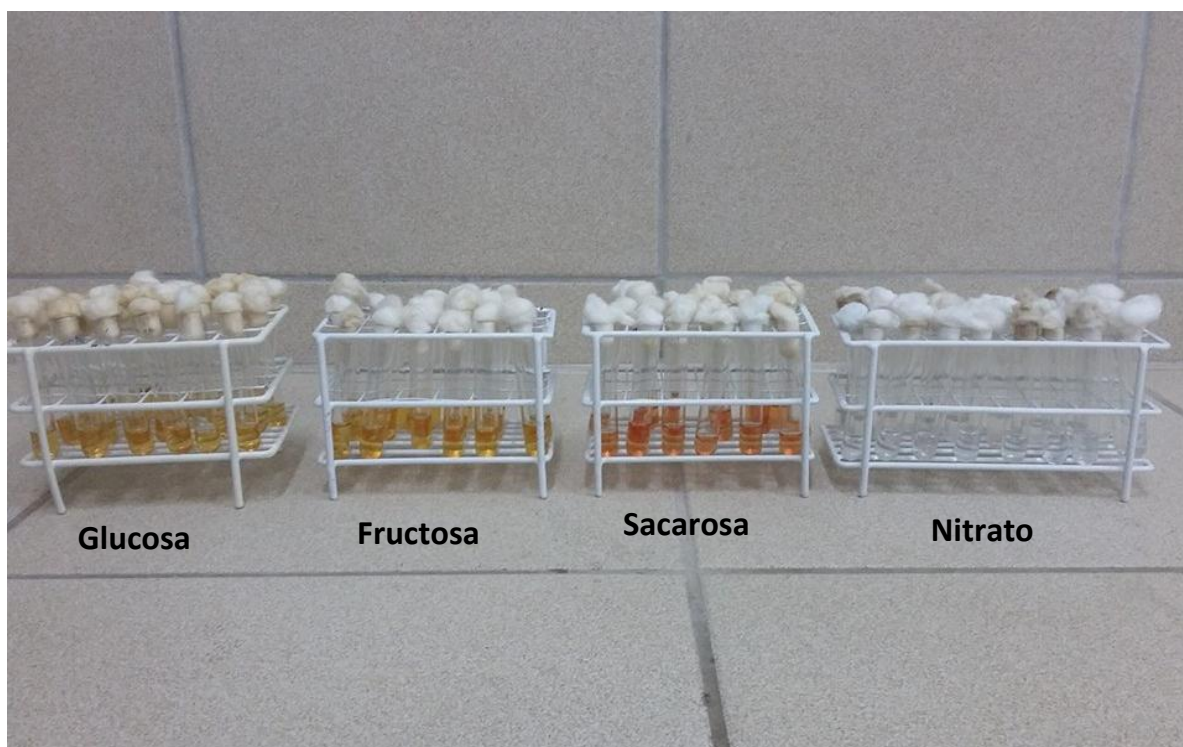


Figura 10. Medios de cultivo líquidos para la identificación del género *Azotobacter*.

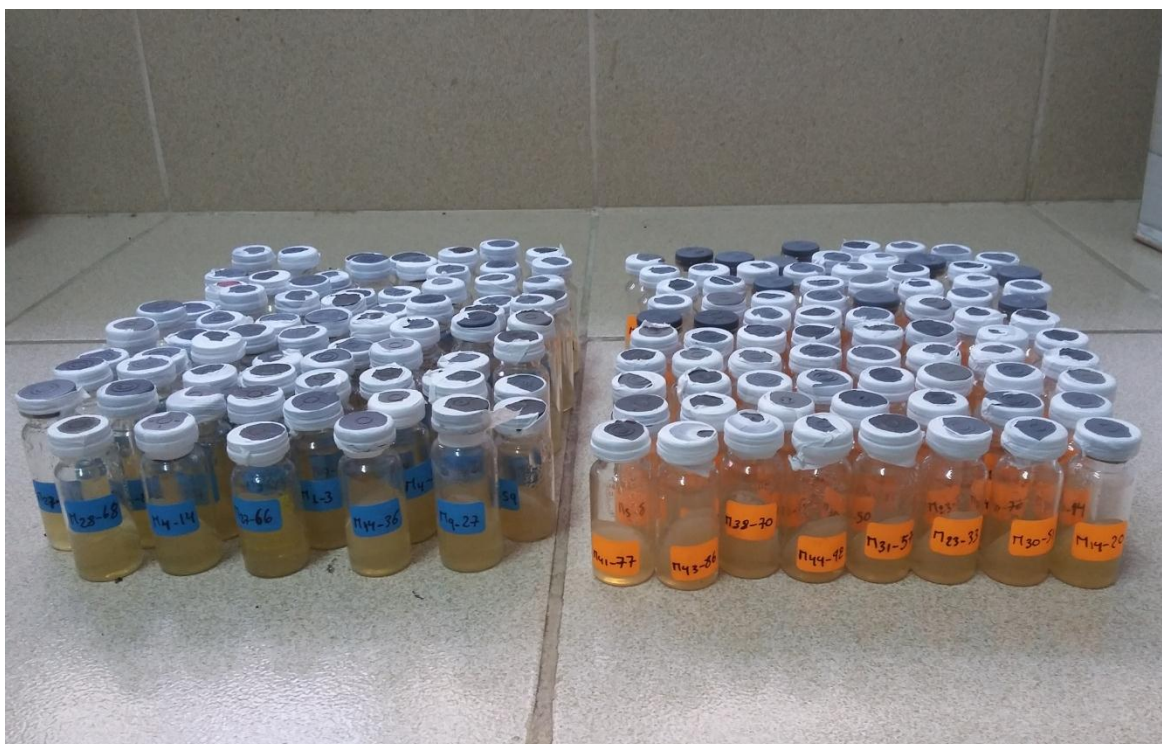


Figura 11. Cultivos puros de *Azotobacter* spp. en agar nutritivo.

3.2.8 Cuantificación de nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos

Con las bacterias del género *Azotobacter* aisladas e identificadas se cuantificó el amonio, producto de la fijación de nitrógeno, el fósforo soluble producto de la solubilización de fosfatos y los indoles producidos. Para la obtención del inóculo, cada bacteria se cultivó en 5mL de caldo nutritivo a 30°C, durante 24 horas (Córdova, 2016). Posteriormente, el caldo se centrifugó (3500rpm) durante 5 minutos, el sobrenadante se eliminó, el sedimento se lavó con solución salina esterilizada (NaCl 0,87% p/v) y su concentración se estandarizó a 9×10^8 cel mL⁻¹ por turbidimetría (tubo 3 del nefelómetro de Mc Farland) y con el espectrofotómetro de luz visible a 540nm: absorbancia = 0,20, equivalente a 10^8 células mL⁻¹ (Rodríguez, 2013).

a. Cuantificación de nitrógeno fijado *in vitro*

La cuantificación del nitrógeno fijado *in vitro* por las bacterias investigadas se realizó con el método colorimétrico de Berthelot o fenol hipoclorito (Lara et al., 2007; Cadena & Martínez, 2011). El inóculo (5%:0,15mL) de cada cultivo bacteriano fue sembrado por triplicado en tubos de 15x150mL conteniendo 3mL de caldo extracto de suelo 10% (Figura 12, anexo 3) y se incubaron a 30°C, por 72 horas, con agitación constante (150rpm). A continuación, se agregaron 9mL de KCl 2M, (Figura 13) se agitaron a 150rpm durante 1 hora y se dejaron en reposo 1 hora adicional, para después tomar 10mL de sobrenadante y centrifugarlos (3000rpm) durante 5 minutos.

Los sobrenadantes se vertieron en tubos de dilución y se añadieron 0,4mL de solución alcohólica de fenol al 10% (Figura 14); 0,4mL de nitroprusiato de sodio al 0,5% y 1mL de solución oxidante. Los tubos se agitaron manualmente por 2 minutos y se dejaron en reposo durante 1 hora adicional. La reacción se consideró positiva a la fijación de nitrógeno por la aparición de una coloración azul, leyéndose la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible a 632,9nm. Las concentraciones de amonio se calcularon con la ecuación de la curva de calibración, obtenida previamente con diluciones sucesivas de una solución de 100ppm de cloruro de amonio (Anexo 3).



Figura 12. Caldo extracto de suelo cultivado con *Azotobacter* spp.



Figura 13. Caldo extracto de suelo con cloruro de potasio.

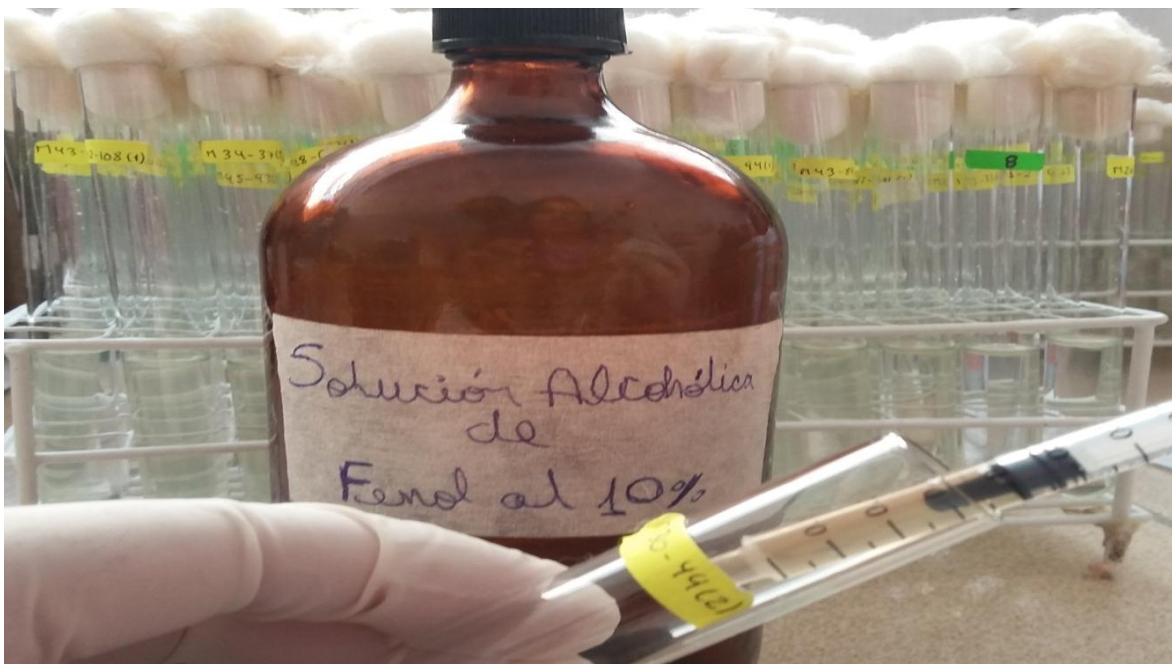


Figura 14. Adición de solución alcohólica de fenol al caldo extracto de suelo.

b. Cuantificación de fosfato solubilizado *in vitro*

La cuantificación de fosfato solubilizado *in vitro* por las bacterias investigadas se realizó con el método colorimétrico del molibdato (Alvarado & Valderrama, 2014). El inóculo (5%: 0,25mL) de cada cultivo bacteriano se sembró por triplicado en 5mL de caldo National Botanical Research Institute's phosphate, NBRIP (Figura 15, anexo 4) y se incubaron a 30°C, con agitación (150rpm), por 96 horas. Después, los caldos fueron centrifugados a 3000rpm por 5 minutos y en el sobrenadante se cuantificó el fósforo soluble (Rodier & Rodi, 2005), considerándose una coloración azul positiva a la solubilización del fosfato. La absorbancia se leyó en espectrofotómetro de luz visible a 690nm y las concentraciones de fósforo soluble se calcularon con la ecuación de la curva de calibración, obtenida previamente con diluciones sucesivas de una solución de 10ppm de fósforo (Anexo 4).

c. Cuantificación de indoles producidos *in vitro*

La cuantificación de indoles producidos *in vitro* se realizó según la reacción colorimétrica de Salkowski (Mantilla, 2007; García & Muñoz, 2010). El inóculo (5%:0,25mL) de cada cultivo bacteriano fue sembrado por triplicado en 5mL de caldo tripticasa soya suplementado con triptófano (Figura 16, anexo 5). Después de la incubación a 30°C, por 72 horas, en agitación constante (150rpm), los cultivos se centrifugaron a 3000rpm, durante 5 minutos. A continuación, 0,4mL de cada sobrenadante se depositaron en tubos, se agregaron 1,6mL de reactivo de Salkowski modificado, se mezclaron y se dejaron en reposo durante 30 minutos en oscuridad. La reacción se consideró positiva a la producción de indoles por la aparición de una coloración grosella, leyéndose la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible a 530nm. Las concentraciones de indoles se calcularon con la ecuación de la curva de calibración obtenida previamente con diluciones sucesivas de una solución de 100ppm de ácido indolacético (Anexo 5).

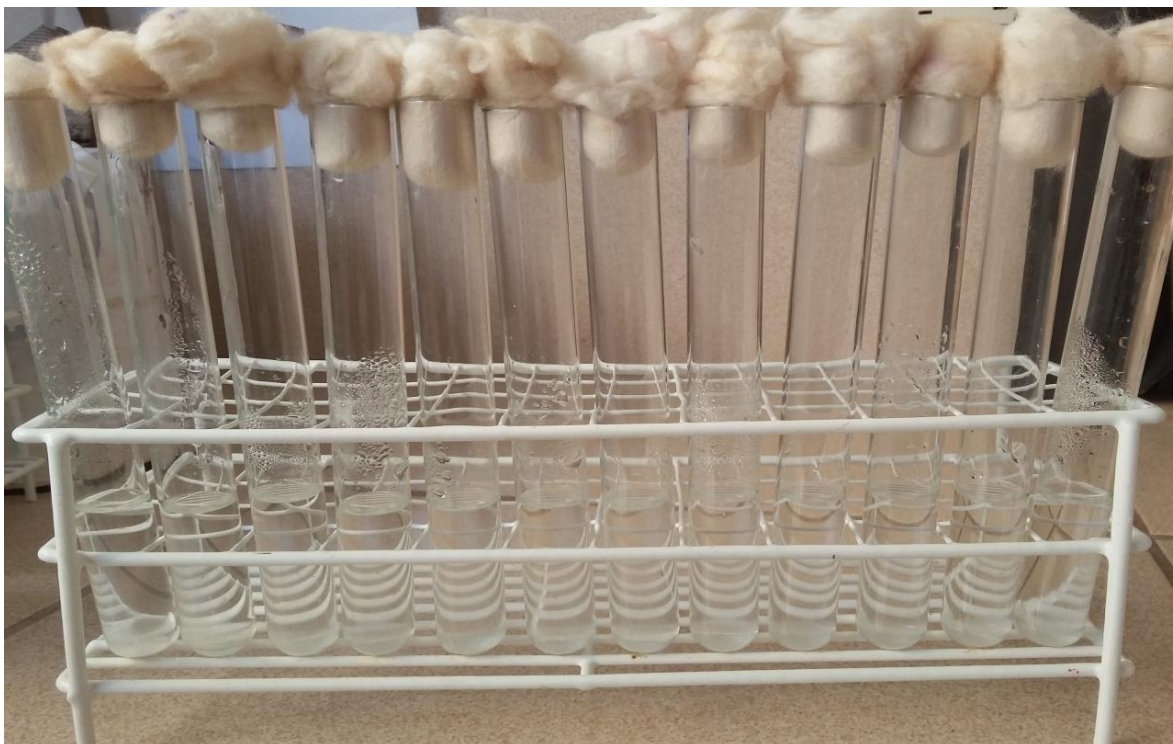


Figura 15. Caldo National Botanical Research Institute's phosphate cultivado con *Azotobacter* spp.

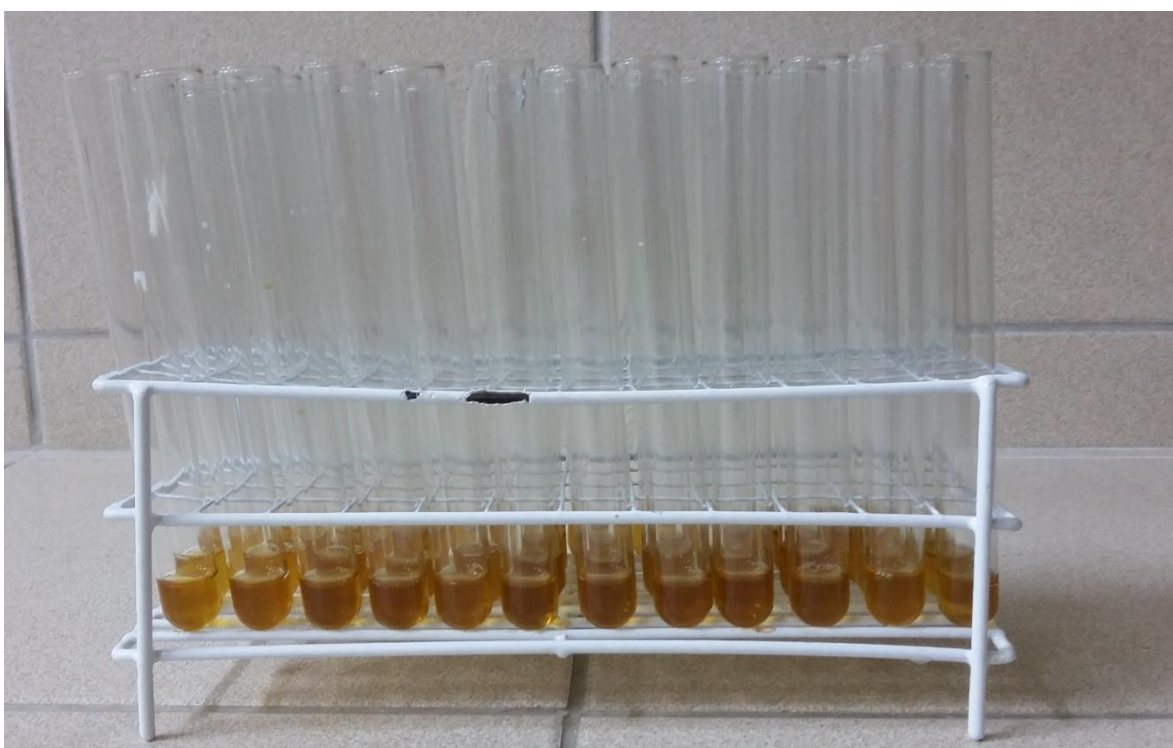


Figura 16. Caldo tripticasa soya suplementado con triptofano cultivado con *Azotobacter* spp.

3.2.9 Selección de *Azotobacter* spp.

Los cultivos de *Azotobacter* spp seleccionados para la fase experimental de la investigación fueron ocho, correspondientes a los valores máximos en la concentración de amonio (dos cultivos), fósforo soluble (dos cultivos), índoles producidos (dos cultivos), concentración de amonio y fósforo soluble (un cultivo) y concentración de amonio e índoles producidos (un cultivo).

3.2.10 Efecto de *Azotobacter* spp. en plantas de espárrago

Los ocho cultivos de *Azotobacter* spp. seleccionados se inocularon en coronas de espárrago (Figura 17), determinándose, durante 60 días el efecto en el desarrollo vegetativo de las plantas, en condiciones de invernadero.

El suelo experimental estuvo constituido por 120kg de una mezcla de suelo agrícola, arena de río y humus en la proporción 2:1:1 (Figura 18), que fue distribuido en macetas de arcilla de 4,5kg de capacidad, a razón de 4kg por maceta (Figura 19). El cultivo de espárrago y la inoculación de *Azotobacter* spp. se realizó entre el 19 de agosto al 17 de octubre de 2016, registrándose las temperaturas máxima (29⁰C), mínima (23⁰C) y media (26⁰C), valores obtenidos por la Estación Meteorológica de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, ubicado en el fundo “El Cienago” de Lambayeque (Anexo 6).

En el ensayo se sembraron coronas de espárrago cultivar UC-157 F2, luego de ser tratadas por inmersión durante 5 minutos (Figura 20), en una solución del fungicida Benomyl polvo mojable-WP (Benlate), en la dosis de 2gL⁻¹ de agua declorada previamente durante 24 horas. El cultivar UC-157 fue obtenido en 1980 en Estados Unidos (Farias et al., 2004). Es específico para la producción de turiones verdes. Se comercializan los híbridos F1 y F2 y son los más precoces y productivos del mercado (Delgado, 2007).

El inóculo fue obtenido con *Azotobacter* spp. cultivadas en caldo nutritivo, a 30⁰C, durante 24 horas y después de la centrifugación se obtuvieron 500mL de cada cultivo bacteriano en solución salina esterilizada, NaCl 0,87% p/v (Figura 21), cuya concentración se estandarizó a 9x10⁸ cel mL⁻¹ por turbidimetría (tubo 3 del nefelómetro de M_C Farland).



Figura 17. Coronas de *Asparagus officinalis* L.



Figura 18. Suelo agrícola, arena de río y humus.



Figura 19. Suelo experimental contenido en macetas de arcilla.

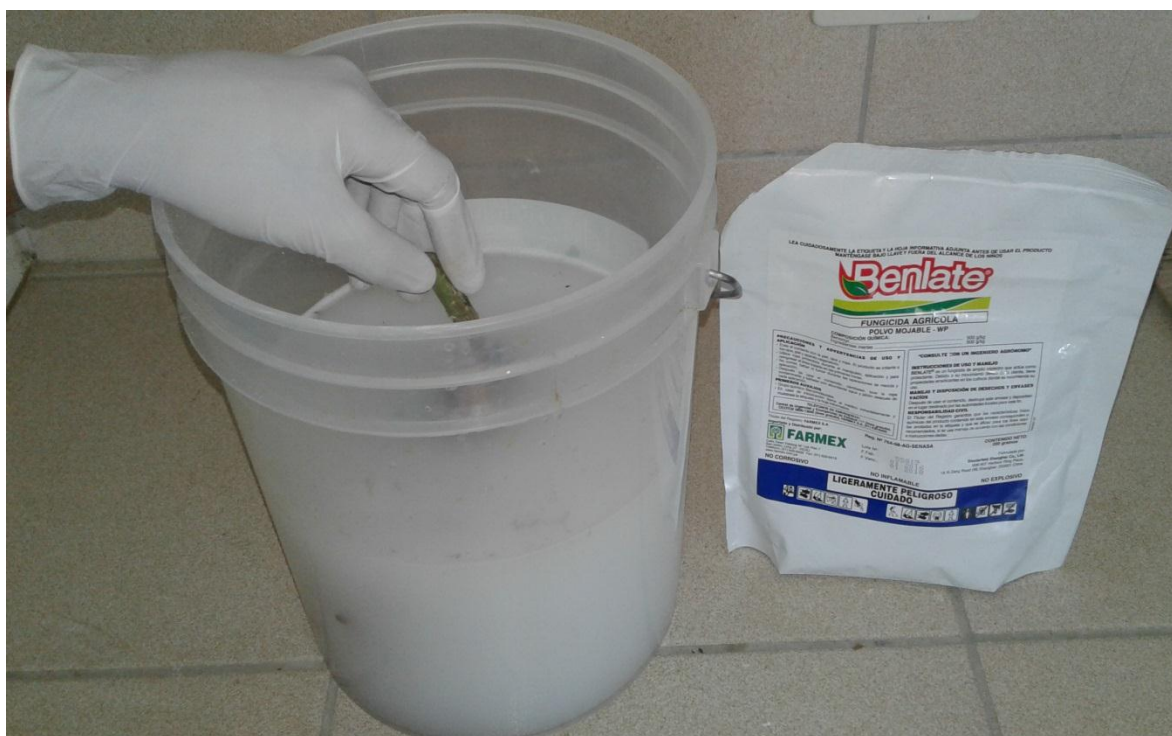


Figura 20. Inmersión de coronas de *Asparagus officinalis* L. en solución de fungicida.



Figura 21. Inóculo de *Azotobacter* spp. solución salina esterilizada.

Transcurridos 30 minutos del tratamiento con fungicida, las coronas de espárrago se asperjaron con el inóculo bacteriano (100mL por corona), con ayuda de un pulverizador de plástico de 500mL de capacidad (Figura 22). Después de 30 minutos de reposo a temperatura ambiental (25⁰C), se sembraron en el suelo experimental, a razón de una corona por maceta. Los riegos se realizaron cada 3 días con agua potable decolorada, tomando en cuenta los requerimientos hídricos de las plantas. Después de 15 días de la siembra, en el testigo químico se aplicaron 250mL de una solución de fertilizante nitrogenado (Urea 46%), en la dosis de 5gL⁻¹ de agua, cada 30 días.

Transcurridos 30, 45 y 60 días después de la siembra, se midió la altura de las plantas (Figura 23) y se contaron los tallos (Figura 24). La altura se expresó en cm, considerando desde la base del tallo más alto hasta la yema terminal (Puicón, 2014). Con los valores de altura y número de tallos se calculó el índice de efectividad de la inoculación (IEI) en porcentaje, mediante la fórmula (Carreño, 2009) siguiente:

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

3.2.11 Análisis estadístico de los datos

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

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

Dónde:

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

u = media general de la variable respuesta.

t_i = efecto i- ésimo tratamiento, siendo $i = 1, 2, 3, \dots, 10$

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

$H_0 = u_1 = u_2 = u_3, \dots = u_{10}$

H_a = al menos una media diferente



Figura 22. Inóculo bacteriano asperjado en corona de *Asparagus officinalis* L.



Figura 23. Medición de altura de tallo de *Asparagus officinalis* L.



Figura 24. Conteo del número de tallos de *Asparagus officinalis* L.

Con los valores de altura y número de tallos de las plantas se realizaron las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza y según los resultados se llevaron a cabo análisis paramétricos y no paramétricos (Hernández et al., 2003). En el presente trabajo se utilizó el software estadístico SPSS versión 15,0 así como los programas de Microsoft Office Word, Excel versión 2013 y Minitab 15.

IV RESULTADOS

4.1 Bacterias del género *Azotobacter* aisladas e identificadas en el rizoplaneo y rizósfera de *Asparagus officinalis* L.

En muestras de rizoplaneo y rizósfera de espárrago sembradas en los medios de cultivo sólidos sin nitrógeno: agar Ashby y LG, se aislaron bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias con y sin previo enriquecimiento, respectivamente (Figuras 25, 26). Las bacterias se enriquecieron en el caldo Ashby sin nitrógeno en el que se observó viraje del indicador al amarillo, turbidez y una película superficial.

En el agar Ashby y LG se seleccionaron las colonias con viraje del indicador al amarillo, grandes, de forma irregular, bordes enteros, convexas, aspecto brillante, consistencia mucosa, no pigmentadas, constituidas por bacilos Gram negativos y positivos en la prueba de catalasa (Figuras 27, 28), obteniéndose 238 cultivos en agar Ashby y 211 en LG. Después de su cultivo por dos veces consecutivas en agar similar al de su aislamiento, se verificó su pureza y actividad fijadora de nitrógeno (Figuras 29, 30), obteniéndose 140 cultivos puros de bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias en agar Ashby y 117 en LG, provenientes del 59,38%(57) y 55,21%(53) de las muestras de raíces con suelo rizosférico de espárrago, respectivamente.

Las bacterias del género *Azotobacter* se observaron como bacilos Gram negativos, con y sin quistes, positivos en catalasa y oxidasa (Tabla 3, figuras 31, 32). Estas pruebas junto a la acidificación de glucosa, sacarosa, fructosa, maltosa y reducción de nitratos (Figura 33), diferenciaron al género *Azotobacter*.



Figura 25. Colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias aisladas en medio Ashby Sacarosa.

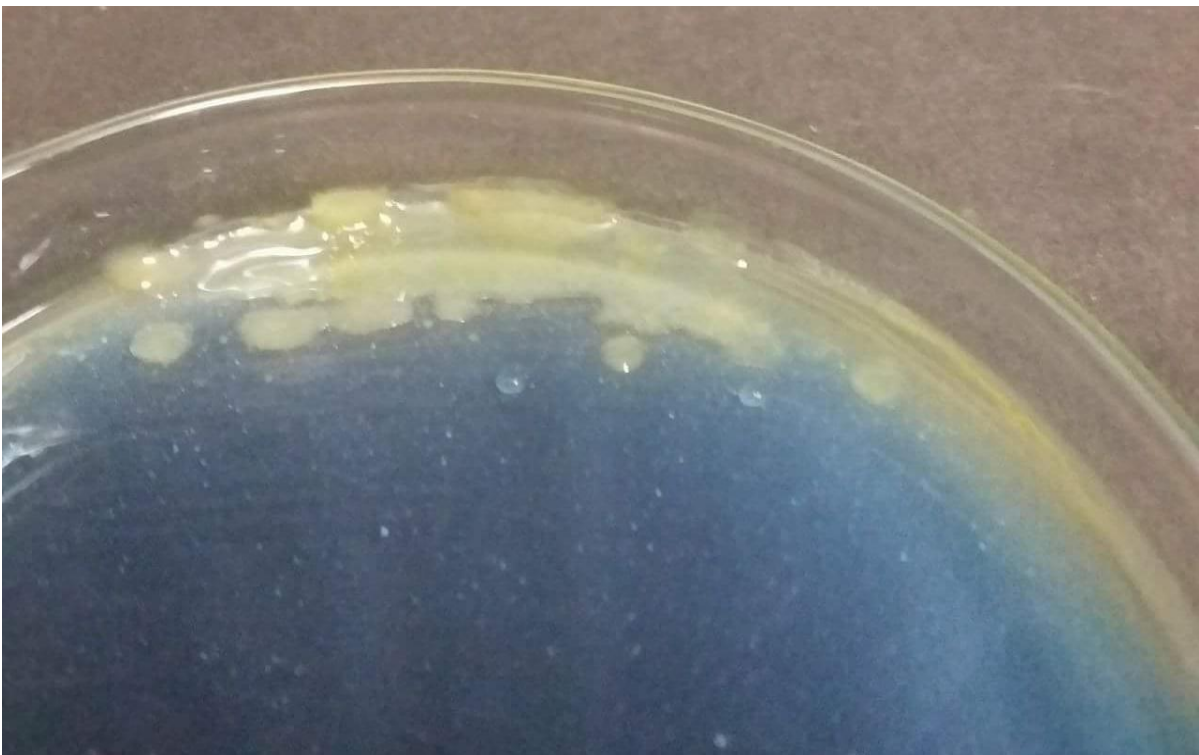


Figura 26. Colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias aisladas en medio LG.

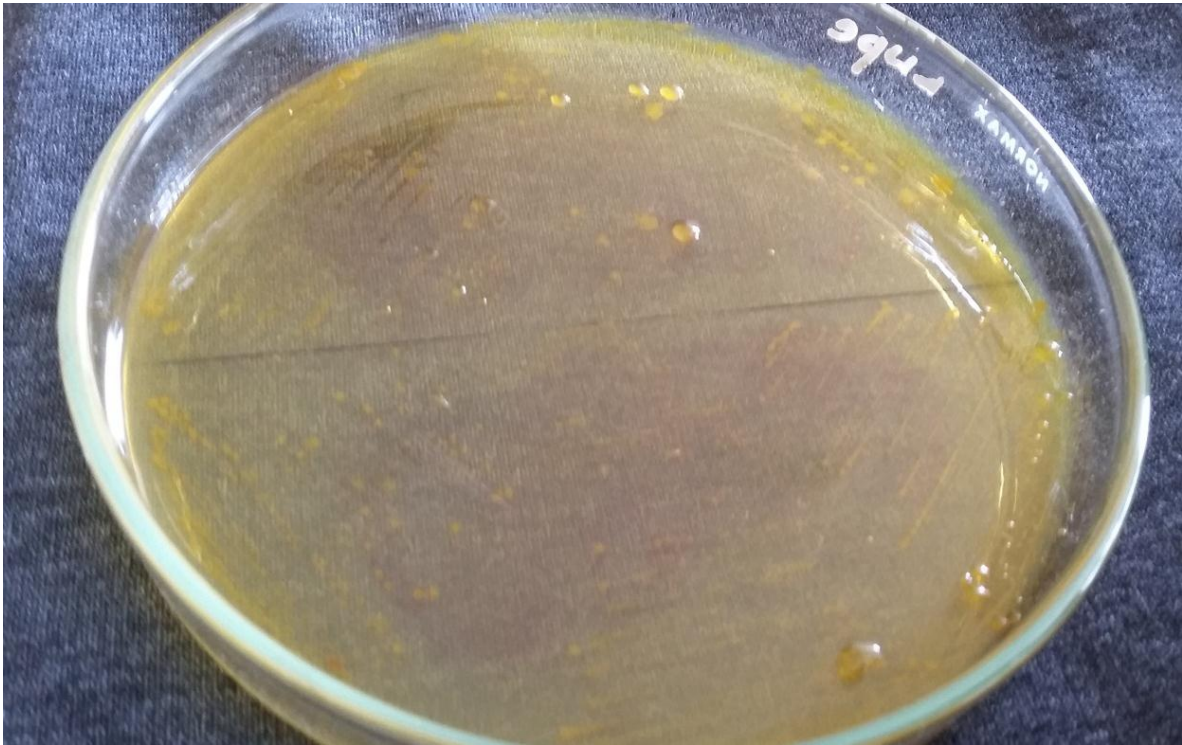


Figura 27. Colonias bacterianas grandes, cremosas y de consistencia mucosa seleccionadas en el medio Ashby Sacarosa.

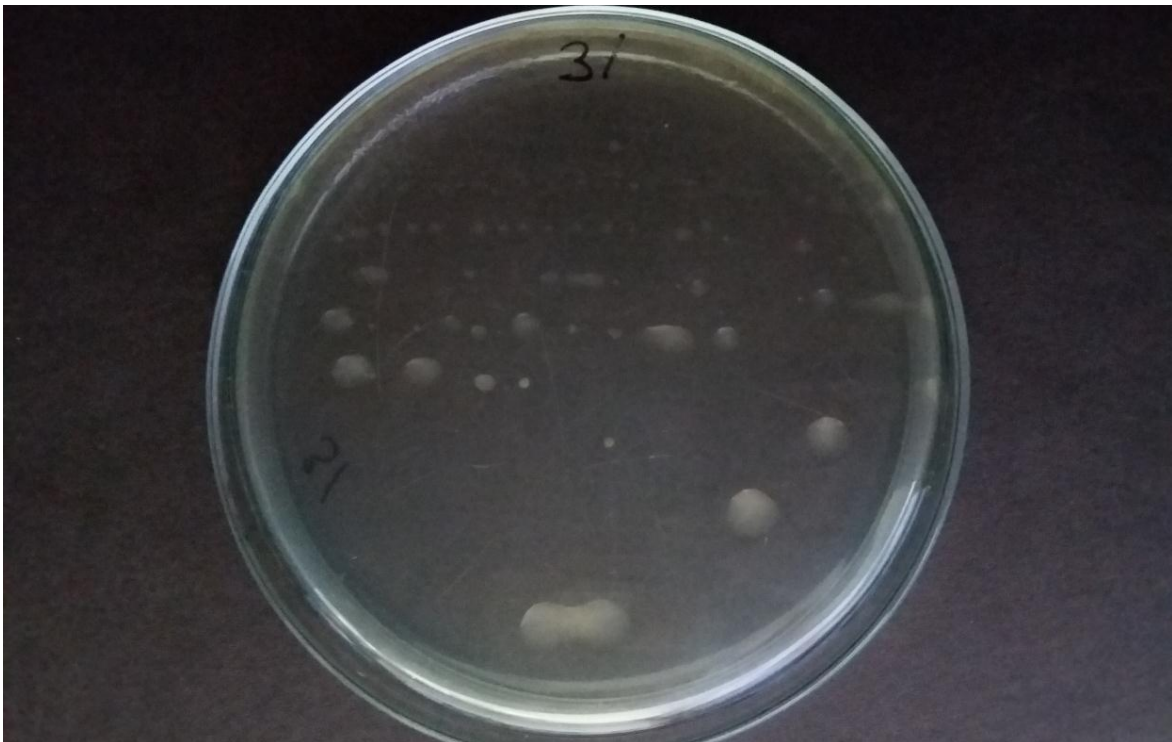


Figura 28. Colonias bacterianas grandes, cremosas y de consistencia mucosa seleccionadas en el medio LG.



Figura 29. Bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias subcultivadas en medio Ashby Sacarosa.



Figura 30. Bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias subcultivadas en medio LG.

Tabla 3. Características diferenciales de *Azotobacter* spp.

Características	<i>Azotobacter</i> spp.
Células	Bacilos rectos
Coloración de Gram	-
Catalasa	+
Oxidasa	+
Acidificación de:	
- Glucosa	+
- Sacarosa	+
- Fructosa	+
- Maltosa	+
Reducción de nitratos	+

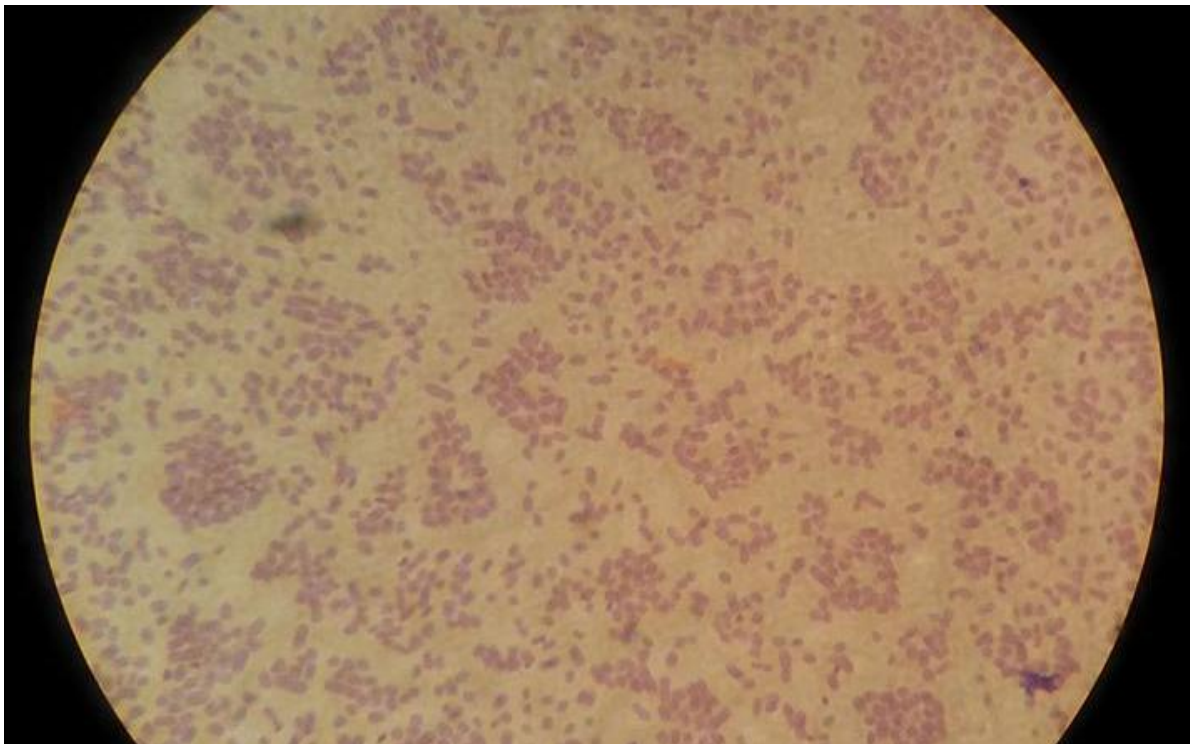


Figura 31. Bacilos Gram negativos del género *Azotobacter*.

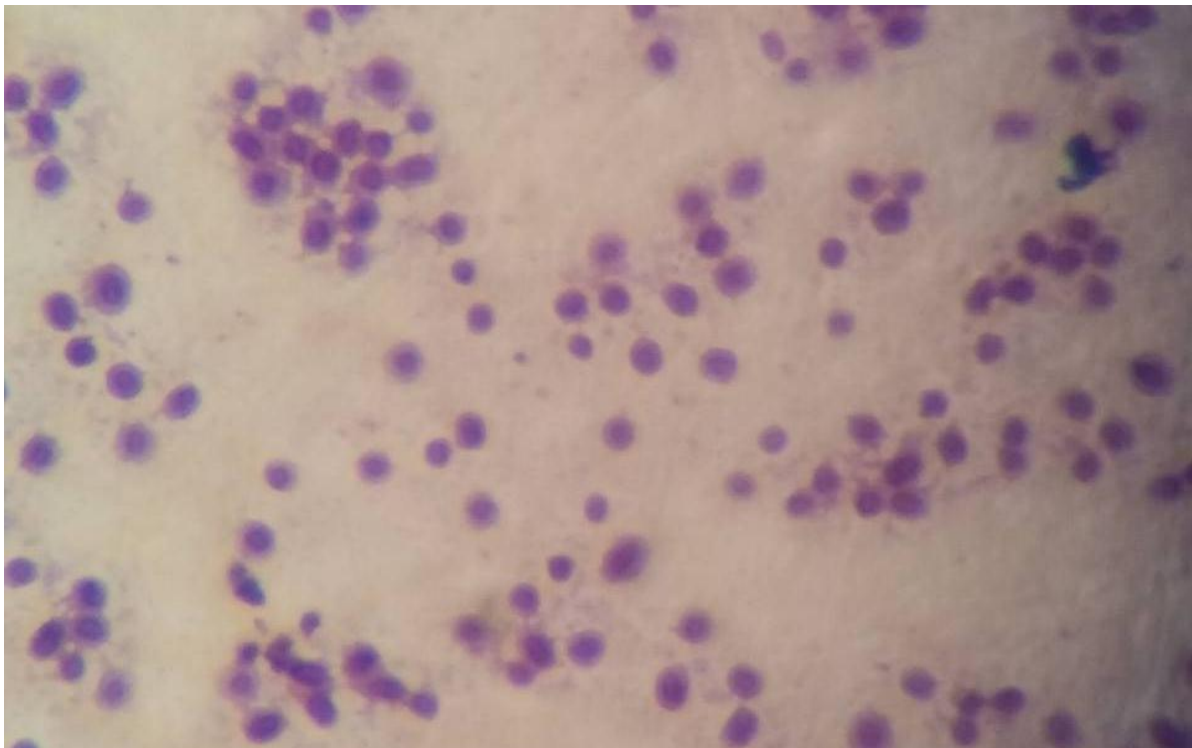


Figura 32. Bacterias enquistadas del género *Azotobacter*.

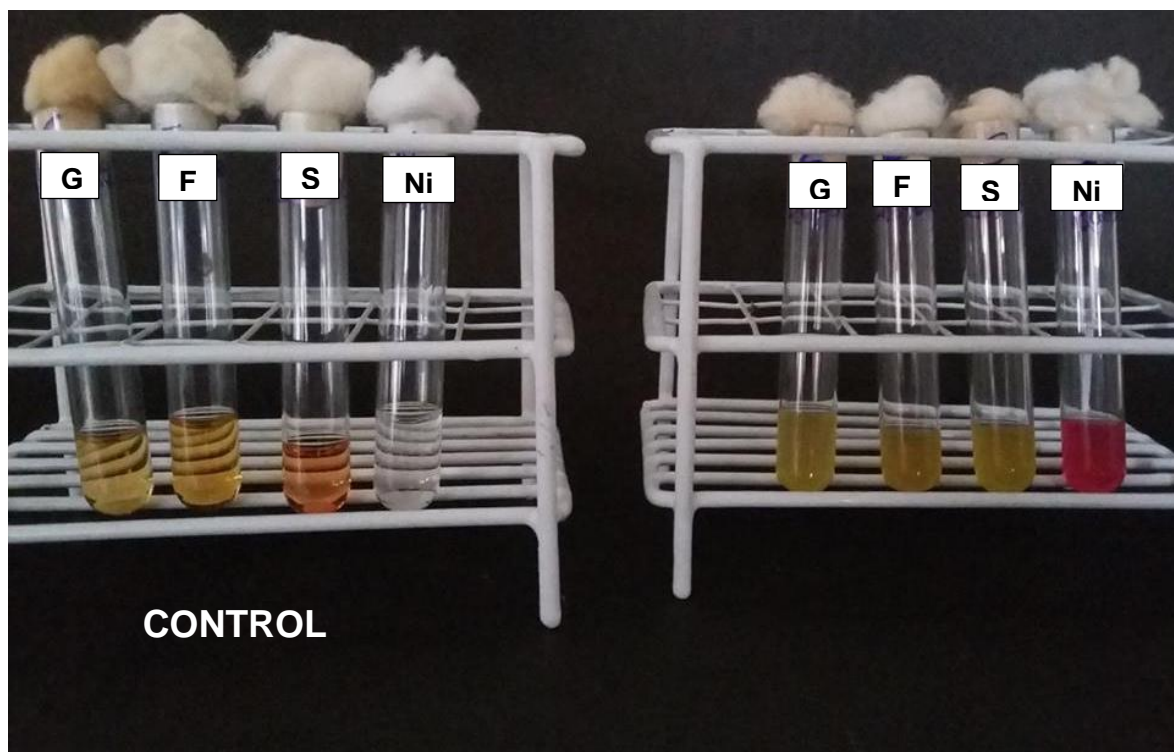


Figura 33. Acidificación de glucosa, sacarosa, fructosa y reducción de nitratos.

El 87,87%(123) y 64,52%(75) de los cultivos de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aerobias aisladas en medio Ashby Sacarosa y en LG, respectivamente, se identificaron fenotípicamente como *Azotobacter* spp. (Figuras 34, 35), tal que el 43,75%(42) y 34,38%(33) de las muestras de rizoplaneo y rizosfera de espárrago fueron positivas (Figuras 36, 37) para el aislamiento de *Azotobacter* spp. En este contexto, independientemente del medio de aislamiento se obtuvieron 198 cultivos de *Azotobacter* spp, procedentes del 70,83%(68) de muestras de rizoplaneo y rizosfera de espárrago.

4.2 Nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos por *Azotobacter* spp.

Todos los cultivos de *Azotobacter* spp. aislados en medio Ashby Sacarosa (123) y LG (75), fijaron nitrógeno *in vitro* y como producto de la fijación se detectó amonio, evidenciado por una coloración azul (Figura 38). La concentración de amonio osciló entre 3,406-34,527ppm para *Azotobacter* spp. aisladas en medio Ashby Sacarosa (Tabla 4) y entre 5,630-32,340ppm para *Azotobacter* spp. aislados en medio LG (Tabla 5).

Todos los cultivos de *Azotobacter* spp. aislados en medio Ashby Sacarosa (123) y el 97,33% (73) aislado en medio LG (Figura 39), solubilizaron fosfato *in vitro* y como producto de la solubilización se detectó fósforo soluble, evidenciado por una coloración azul (Figura 40). La concentración de fósforo soluble osciló entre 1,188-5,050ppm para *Azotobacter* spp. aisladas en medio Ashby Sacarosa (Tabla 6) y entre 0,275-5,391ppm para *Azotobacter* spp. aisladas en medio LG (Tabla 7).

El 95,93% (118) de cultivos de *Azotobacter* spp. aisladas en medio Ashby Sacarosa y el 85,33% (64) aislado en medio LG produjeron indoles *in vitro* (Figuras 41, 42), evidenciados por una coloración grosella (Figura 43). La concentración de indoles producidos osciló entre 0,244-62,022ppm para *Azotobacter* spp. aisladas en medio Ashby Sacarosa (Tabla 8) y entre 0,244-59,577ppm para *Azotobacter* spp. aisladas en medio LG (Tabla 9).

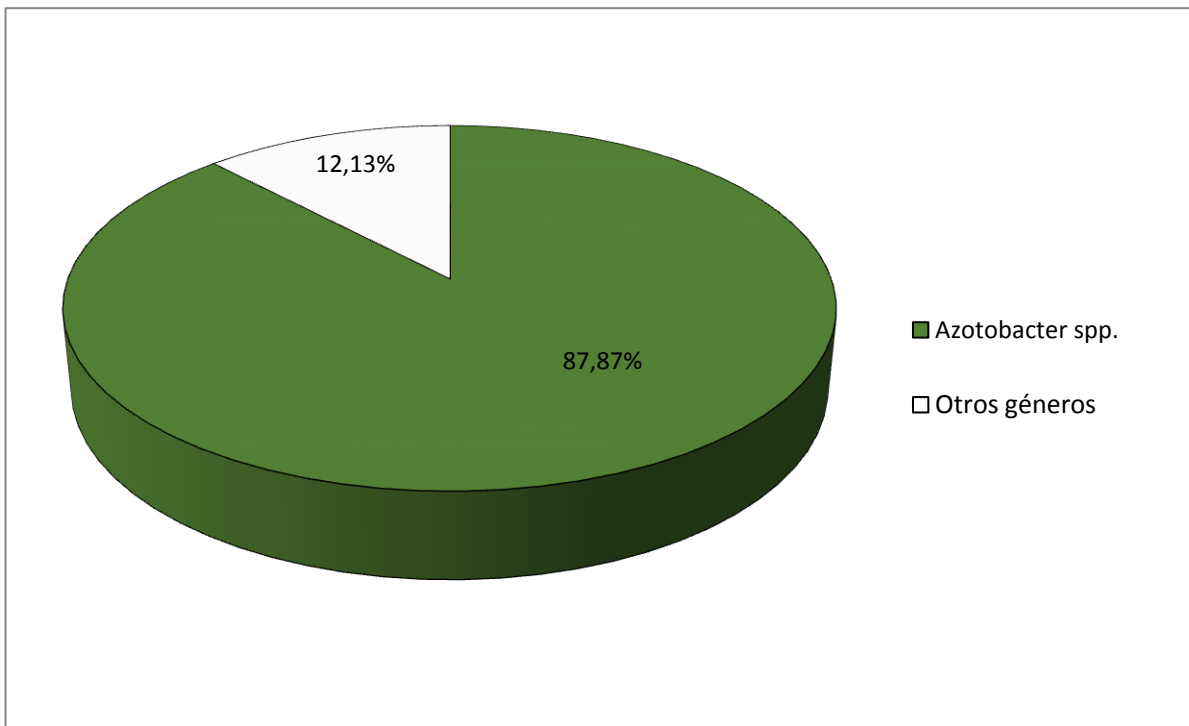


Figura 34. Frecuencia de *Azotobacter* spp. en bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias aisladas en medio Ashby Sacarosa.

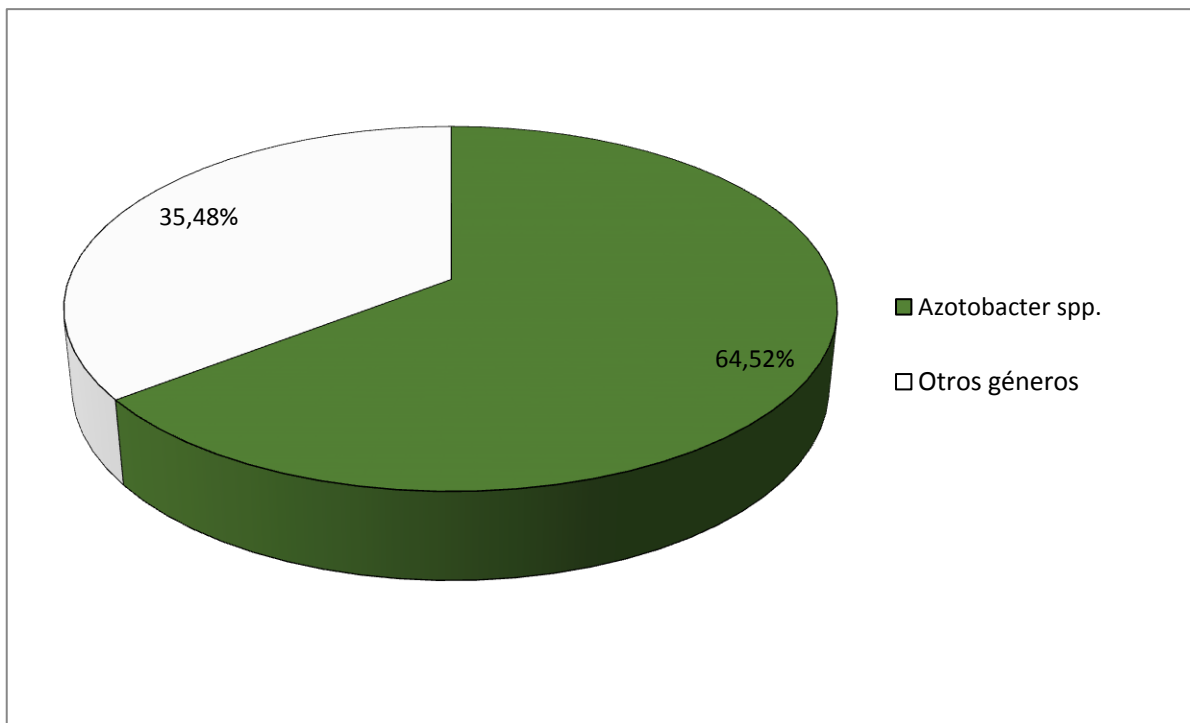


Figura 35. Frecuencia de *Azotobacter* spp. en bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias aisladas en medio LG.

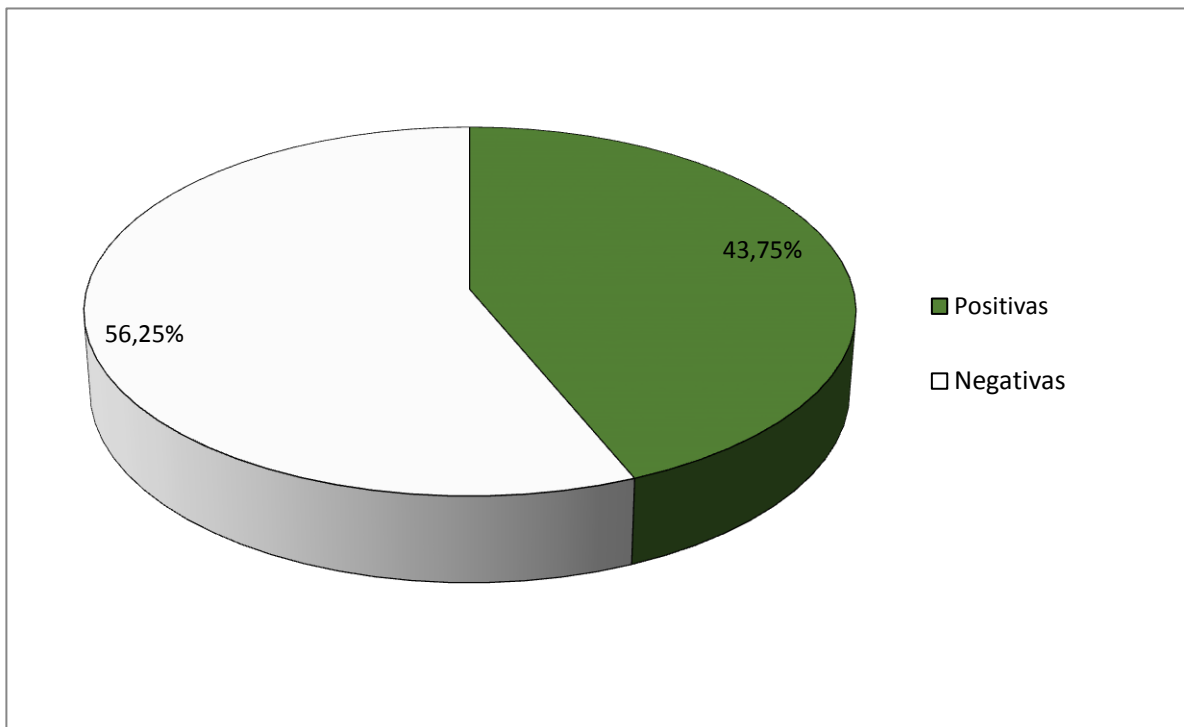


Figura 36. Frecuencia de muestras de rizoplano y rizósfera de *Asparagus officinalis* L. positivas al aislamiento de *Azotobacter* spp. en medio Ashby Sacarosa.

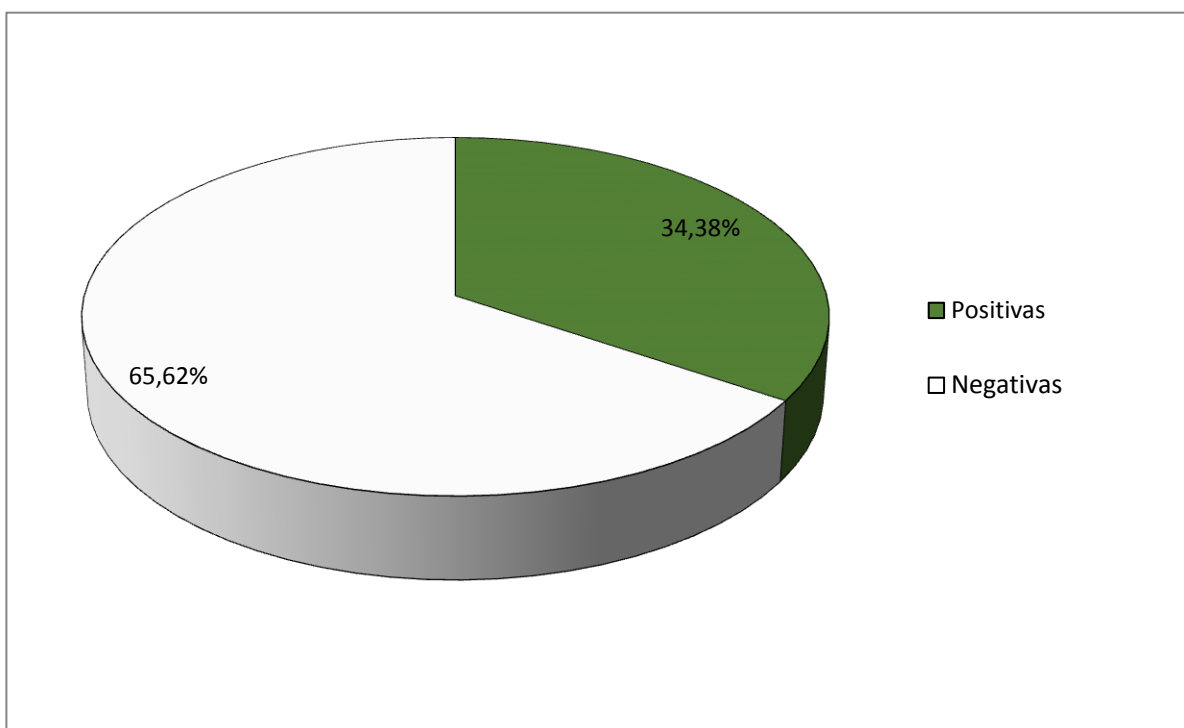


Figura 37. Frecuencia de muestras de rizoplano y rizósfera de *Asparagus officinalis* L. positivas al aislamiento de *Azotobacter* spp. en medio LG.

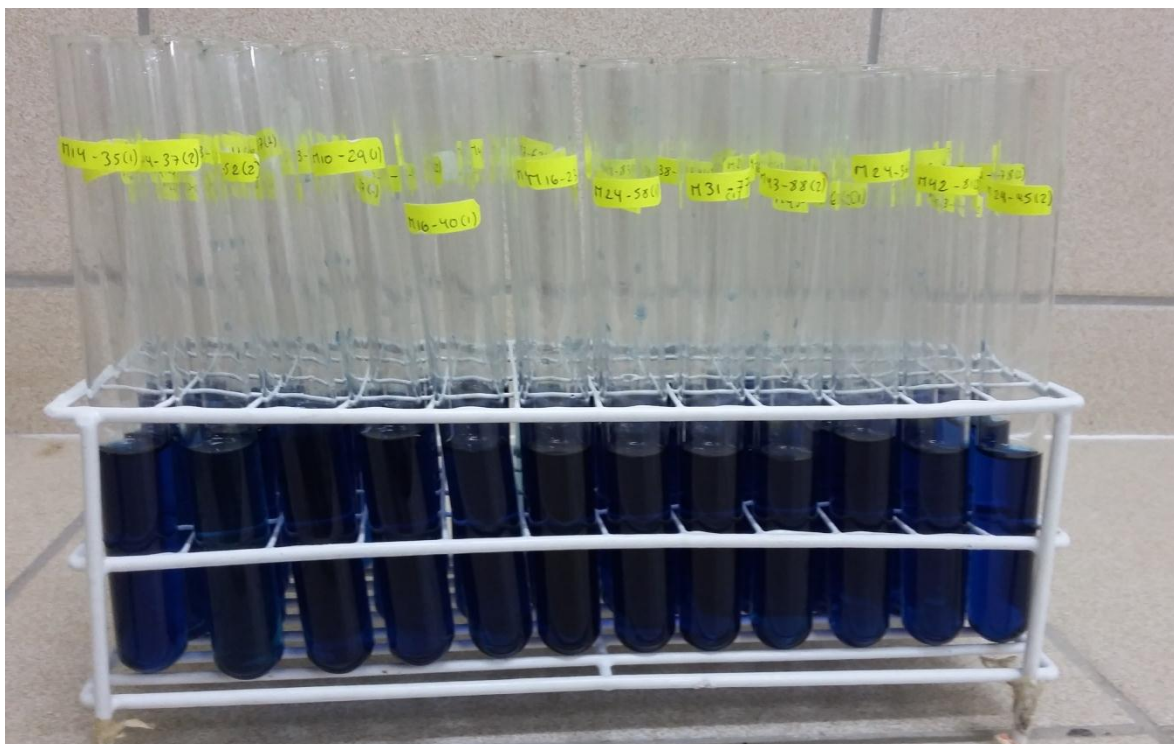


Figura 38. Coloración observada en la cuantificación de amonio.

Tabla 4. Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por *Azotobacter* spp. aisladas de *Asparagus officinalis* L. en medio Ashby Sacarosa

<i>Azotobacter</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)	<i>Azotobacter</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)	<i>Azotobacter</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)
16 - 28 ASHBY	34,527	83 - 189 ASHBY	22,027	16 - 27 ASHBY	18,204
12 - 17 ASHBY	33,553	34 - 76 ASHBY	21,972	33 - 73 ASHBY	17,909
95 - 215 ASHBY	32,597	26 - 53 ASHBY	21,954	65 - 136 ASHBY	17,909
66 - 144 ASHBY	32,542	25 - 48 ASHBY	21,898	86 - 202 ASHBY	17,597
80 - 182 ASHBY	32,395	3 - 7 ASHBY	21,806	53 - 115 ASHBY	17,560
82 - 184 ASHBY	31,347	26 - 55 ASHBY	21,715	33 - 74 ASHBY	17,505
44 - 104 ASHBY	30,299	16 - 25 ASHBY	21,678	76 - 163 ASHBY	17,487
95 - 222 ASHBY	29,251	24 - 47 ASHBY	21,420	6 - 11 ASHBY	17,431
84 - 194 ASHBY	28,406	89 - 206 ASHBY	21,255	95 - 228 ASHBY	17,321
65 - 140 ASHBY	26,696	20 - 37 ASHBY	21,090	68 - 147 ASHBY	17,101
63 - 132ASHBY	26,604	44 - 102 ASHBY	21,017	83 - 192 ASHBY	17,032
72 - 153 ASHBY	26,476	74 - 154 ASHBY	20,832	26 - 54 ASHBY	17,009
83 - 191 ASHBY	26,071	26 - 56 ASHBY	20,814	96 - 237 ASHBY	17,009
80 - 173 ASHBY	25,979	76 - 161 ASHBY	20,814	66 - 145 ASHBY	16,972
63 - 133 ASHBY	25,777	12 - 20 ASHBY	20,685	17 - 32 ASHBY	16,806
24 - 46 ASHBY	25,759	5 - 9 ASHBY	20,262	33 - 75 ASHBY	16,365
11 - 15 ASHBY	25,170	21 - 42 ASHBY	20,207	24 - 44 ASHBY	16,311
89 - 207 ASHBY	24,766	75 - 157 ASHBY	20,005	84 - 195 ASHBY	16,200
15 - 24 ASHBY	24,656	12 - 19 ASHBY	19,748	21 - 39 ASHBY	16,181
95 - 216 ASHBY	24,656	53 - 120 ASHBY	19,711	1 - 2 ASHBY	15,814
28 - 59 ASHBY	24,490	55 - 125 ASHBY	19,656	11 - 16 ASHBY	15,814
43- 101 ASHBY	24,104	95 - 219 ASHBY	19,656	59 - 126 ASHBY	15,777
89 - 205 ASHBY	23,902	68 - 146 ASHBY	19,637	76 - 166 ASHBY	15,593
80 - 178 ASHBY	23,884	95 - 226 ASHBY	19,601	35 - 78 ASHBY	15,428

Continuación...

<i>Azotobacter</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)	<i>Azotobacter</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)	<i>Azotobacter</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)
65 – 138 ASHBY	23,865	86 - 204 ASHBY	19,545	32 - 71 ASHBY	15,318
32 – 70 ASHBY	23,608	96 - 235 ASHBY	19,459	42 - 100 ASHBY	14,968
83 - 193 ASHBY	23,443	80 - 175 ASHBY	19,362	80 - 180 ASHBY	14,821
86 - 198 ASHBY	23,406	39 - 92 ASHBY	19,325	25 - 50 ASHBY	14,619
39 - 93 ASHBY	23,332	95 - 217 ASHBY	19,325	80 - 174 ASHBY	14,435
45 - 110 ASHBY	23,277	17 – 30 ASHBY	19,306	68 – 148 ASHBY	13,994
51 - 113 ASHBY	23,056	75 – 158 ASHBY	19,288	16 - 29 ASHBY	13,737
80 - 183 ASHBY	23,038	53 - 118 ASHBY	19,233	49 - 111 ASHBY	13,204
86 - 201 ASHBY	23,038	95 - 221 ASHBY	19,031	74 - 155 ASHBY	13,167
28 -60 ASHBY	22,965	9 -13 ASHBY	18,939	95 -220 ASHBY	13,001
36 - 82 ASHBY	22,597	9 - 14 ASHBY	18,884	19 - 36 ASHBY	12,909
76 - 165 ASHBY	22,542	83 - 190 ASHBY	18,695	27 - 58 ASHBY	8,075
83 - 188 ASHBY	22,413	35 - 80 ASHBY	18,534	95 - 214 ASHBY	7,670
95 - 218 ASHBY	22,413	63 - 130 ASHBY	18,479	93 - 210 ASHBY	4,748
45 - 107 ASHBY	22,284	53 - 117 ASHBY	18,369	21- 40 ASHBY	3,406
65 - 135 ASHBY	22,211	95 - 227 ASHBY	18,351		
80 - 181 ASHBY	22,174	45 - 108 ASHBY	18,332		
76 - 164 ASHBY	22,064	80 - 179 ASHBY	18,222		

Tabla 5. Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por *Azotobacter* spp. aisladas de *Asparagus officinalis* L. en medio LG

<i>Azotobacter</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)	<i>Azotobacter</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)	<i>Azotobacter</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)
21 - 48 LG	32,340	87 - 188 LG	24,012	6 - 17 LG	20,648
88 - 192 LG	32,330	64 - 134 LG	23,773	39 - 99 LG	20,593
2 - 7 LG	31,531	51 - 120 LG	23,424	69 - 145	20,575
76 - 164 LG	31,770	90 - 206 LG	23,424	74 - 154 LG	20,575
83 - 177 LG	30,270	88 - 200 LG	23,222	2 - 9 LG	20,465
71 - 152 LG	29,810	75 - 156 LG	23,093	35 - 87 LG	20,244
88 - 195 LG	29,020	47 - 110 LG	22,946	20 - 46 LG	20,185
12 - 30 LG	28,340	7 - 19 LG	22,873	83 - 178 LG	20,097
87 - 190 LG	28,310	40 - 102 LG	22,799	68 - 140 LG	20,055
13 - 33 LG	28,152	36 - 88 LG	22,211	75 - 160 LG	19,601
78 - 170 LG	27,847	3 - 10 LG	22,193	68 - 142 LG	19,435
95 - 209 LG	27,523	59 - 129 LG	22,156	2 - 4 LG	19,325
8 - 25 LG	27,457	6 - 15 LG	22,082	15 - 38 LG	19,288
68 - 144 LG	26,943	44 - 109 LG	21,880	90 - 202 LG	19,288
68 - 139 LG	26,722	82 - 175 LG	21,678	65 - 138 LG	18,590
55 - 123 LG	25,939	60 - 130 LG	21,623	88 - 191 LG	17,799
27 - 63 LG	25,927	31 - 77 LG	21,457	76 - 165 LG	17,229
68 - 143 LG	25,744	69 - 147 LG	21,439	87 - 190 LG	16,806
88 - 194 LG	25,537	61 - 132 LG	21,090	25 - 59 LG	16,806
88 - 196 LG	25,101	61 - 131 LG	21,016	89 - 201 LG	16,512
82 - 173 LG	24,531	75 - 155 LG	20,924	86 - 186 LG	14,821
90 - 204 LG	24,347	50 - 117 LG	20,869	1 - 2 LG	14,527
76 - 166 LG	24,310	28 - 67 LG	20,851	16 - 40 LG	14,196
40 - 101 LG	24,196	27 - 66 LG	20,832	25 - 60 LG	13,001
90 - 205 LG	24,086	96 - 211 LG	20,722	3 - 11 LG	5,630

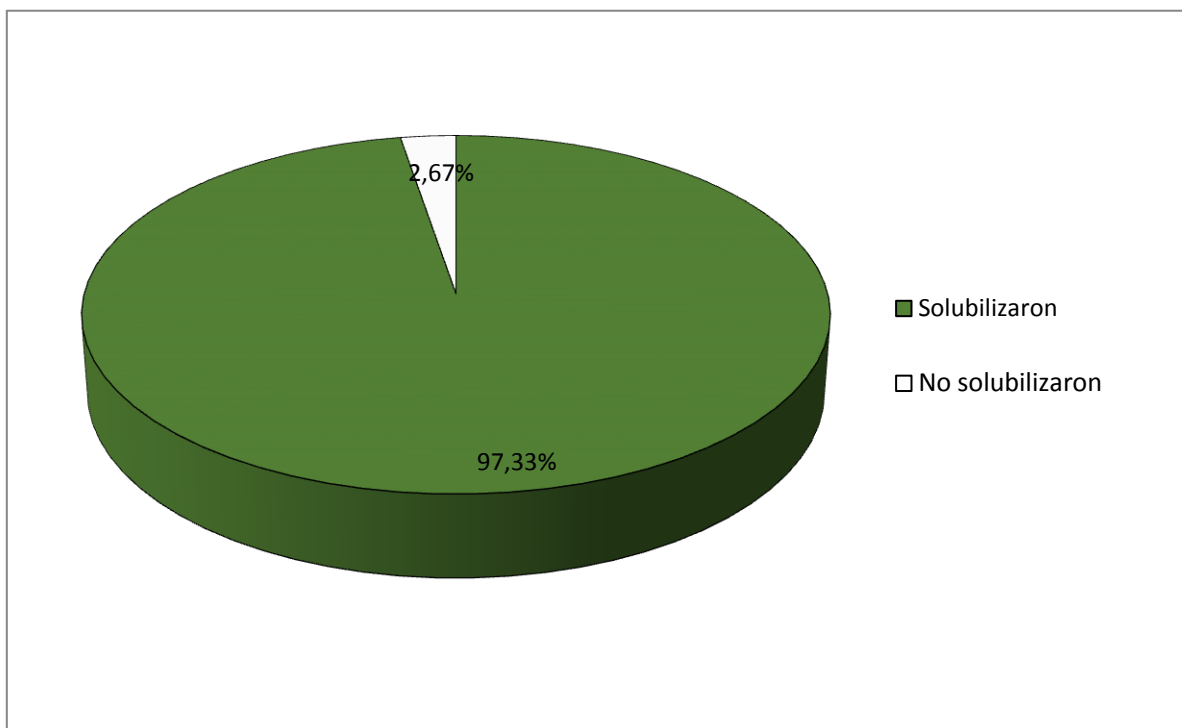


Figura 39. Porcentaje de *Azotobacter* spp. aisladas en medio LG que solubilizaron fosfato *in vitro*.



Figura 40. Coloración observada en la cuantificación de fósforo soluble.

Tabla 6. Fósforo cuantificado (ppm) en la solubilización por *Azotobacter* spp. aisladas de *Asparagus officinalis* L. en medio Ashby Sacarosa.

<i>Azotobacter</i> spp. código UNPRG	P soluble (ppm)	<i>Azotobacter</i> spp. código UNPRG	P soluble (ppm)	<i>Azotobacter</i> spp. código UNPRG	P soluble (ppm)
95 - 221 ASHBY	5,050	83 - 191 ASHBY	4,010	74 - 154 ASHBY	3,273
86 - 202 ASHBY	4,848	16 - 25 ASHBY	3,971	72 - 153 ASHBY	3,128
68 - 146 ASHBY	4,819	21 - 39 ASHBY	3,942	83 - 190 ASHBY	3,114
95 - 215 ASHBY	4,768	95 - 220 ASHBY	3,937	63 - 130 ASHBY	3,114
28 - 60 ASHBY	4,761	51 - 113 ASHBY	3,937	19 - 36 ASHBY	3,057
96 - 237 ASHBY	4,761	80 - 181 ASHBY	3,923	24 - 46 ASHBY	3,043
39 - 93 ASHBY	4,753	86 - 201 ASHBY	3,923	3 - 7 ASHBY	3,014
89 - 207 ASHBY	4,674	28 - 59 ASHBY	3,855	9 - 14 ASHBY	2,971
45 - 107 ASHBY	4,660	43 - 101 ASHBY	3,768	75 - 158 ASHBY	2,969
17 - 32 ASHBY	4,660	74 - 155 ASHBY	3,764	80 - 178 ASHBY	2,969
36 - 82 ASHBY	4,660	76 - 165 ASHBY	3,764	17 - 30 ASHBY	2,898
80 - 174 ASHBY	4,559	53 - 120 ASHBY	3,764	33 - 73 ASHBY	2,898
80 - 182 ASHBY	4,559	53 - 119 ASHBY	3,764	76 - 163 ASHBY	2,897
76 - 166 ASHBY	4,472	75 - 157 ASHBY	3,764	45 - 108 ASHBY	2,753
45 - 110 ASHBY	4,463	95 - 216 ASHBY	3,677	80 - 183 ASHBY	2,752
95 - 226 ASHBY	4,385	80 - 180 ASHBY	3,663	16 - 29 ASHBY	2,608
66 - 145 ASHBY	4,371	25 - 50 ASHBY	3,608	27 - 58 ASHBY	2,550
21 - 42 ASHBY	4,356	11 - 16 ASHBY	3,533	53 - 117 ASHBY	2,550
65 - 140 ASHBY	4,284	6 - 11 ASHBY	3,518	95 - 227 ASHBY	2,550
63 - 132 ASHBY	4,284	76 - 161 ASHBY	3,518	44 - 102 ASHBY	2,536
95 - 214 ASHBY	4,284	15 - 24 ASHBY	3,504	89 - 206 ASHBY	2,536
83 - 192 ASHBY	4,284	49 - 111 ASHBY	3,504	65 - 135 ASHBY	2,478
65 - 138 ASHBY	4,284	68 - 147 ASHBY	3,504	59 - 126 ASHBY	2,406
26 - 54 ASHBY	4,270	84 - 195 ASHBY	3,491	80 - 173 ASHBY	2,348

Continuación...

<i>Azotobacter</i> spp. código UNPRG	P soluble (ppm)	<i>Azotobacter</i> spp. código UNPRG	P soluble (ppm)	<i>Azotobacter</i> spp. código UNPRG	P soluble (ppm)
89 - 205 ASHBY	4,270	53 - 118 ASHBY	3,475	26 - 56 ASHBY	2,333
37 - 74 ASHBY	4,260	84 - 195 ASHBY	3,491	80 - 179 ASHBY	2,088
9 - 13 ASHBY	4,202	53 - 118 ASHBY	3,475	35 - 78 ASHBY	2,086
21 - 40 ASHBY	4,197	86 - 204 ASHBY	3,446	16 - 28 ASHBY	2,072
95 - 217 ASHBY	4,197	93 - 210 ASHBY	3,446	16 - 27 ASHBY	2,028
96 - 235 ASHBY	4,197	20 - 37 ASHBY	3,434	26 - 53 ASHBY	2,014
86 - 198 ASHBY	4,197	32 - 71 ASHBY	3,434	25 - 48 ASHBY	2,014
32 - 70 ASHBY	4,173	24 - 47 ASHBY	3,434	95 - 228 ASHBY	1,958
11 - 15 ASHBY	4,111	95 - 219 ASHBY	3,432	84 - 194 ASHBY	1,885
82 - 184 ASHBY	4,111	24 - 44 ASHBY	3,420	26 - 55 ASHBY	1,884
63 - 133 ASHBY	4,110	42 - 100 ASHBY	3,362	80 - 175 ASHBY	1,828
95 - 218 ASHBY	4,096	39 - 92 ASHBY	3,362	83 - 188 ASHBY	1,640
34 - 76 ASHBY	4,043	5 - 9 ASHBY	3,359	83 - 189 ASHBY	1,582
12 - 20 ASHBY	4,043	55 - 125 ASHBY	3,359	65 - 136 ASHBY	1,408
1 - 2 ASHBY	4,024	66 - 144 ASHBY	3,345	35 - 80 ASHBY	1,188
12 - 17 ASHBY	4,024	95 - 222 ASHBY	3,287		
53 - 115 ASHBY	4,024	33 - 75 ASHBY	3,275		
44 - 104 ASHBY	4,014	12 - 19 ASHBY	3,275		
83 - 193 ASHBY	4,010	76 - 164 ASHBY	3,273		

Tabla 7. Fósforo cuantificado (ppm) en la solubilización por *Azotobacter* spp. aisladas de *Asparagus officinalis* L. en medio LG

<i>Azotobacter</i> spp. código UNPRG	P soluble (pmm)	<i>Azotobacter</i> spp. código UNPRG	P soluble (pmm)	<i>Azotobacter</i> spp. código UNPRG	P soluble (pmm)
25 - 60 LG	5,391	68 - 139 LG	2,608	88 - 200 LG	1,507
87 - 190 LG	4,202	7 - 19 LG	2,579	16 - 40 LG	1,492
8 - 25 LG	4,130	2 - 8 LG	2,565	75 - 156 LG	1,492
30 - 46 LG	4,014	36 - 88 LG	2,550	70 - 149 LG	1,492
68 - 143 LG	3,782	78 - 170 LG	2,507	90 - 206 LG	1,449
68 - 144 LG	3,710	82 - 173 LG	2,434	26 - 61 LG	1,391
6 - 17 LG	3,666	27 - 63 LG	2,231	88 - 199 LG	1,391
44 - 109 LG	3,594	35 - 87 LG	2,173	64 - 136 LG	1,347
61 - 132 LG	3,507	75 - 160 LG	2,115	21 - 48 LG	1,333
69 - 145 LG	3,507	90 - 204 LG	2,028	86 - 186 LG	1,333
64 - 134 LG	3,434	88 - 194 LG	2,014	39 - 99 LG	1,275
69 - 147 LG	3,362	13 - 33 LG	2,000	88 - 192 LG	1,217
51 - 120 LG	3,362	74 - 154 LG	1,985	88 - 191 LG	1,173
6 - 15 LG	3,202	87 - 188 LG	1,971	95 - 209 LG	1,115
71 - 152 LG	3,202	28 - 67 LG	1,855	90 - 205 LG	1,057
15 - 38 LG	3,188	47 - 110 LG	1,855	40 - 102 LG	0,985
13 - 32 LG	3,130	68 - 140 LG	1,855	2 - 4 LG	0,840
76 - 166 LG	3,043	83 - 177 LG	1,855	61 - 131 LG	0,681
76 - 165 LG	2,985	37 - 92 LG	1,782	27 - 52 LG	0,652
88 - 196 LG	2,985	59 - 129 LG	1,739	68 - 142 LG	0,478
31 - 77 LG	2,942	50 - 117 LG	1,739	83 - 177 LG	0,405
25 - 59 LG	2,927	50 - 119 LG	1,652	76 - 164 LG	0,391
60 - 130 LG	2,797	27 - 66 LG	1,608	3 - 10 LG	0,275
83 - 178 LG	2,710	2 - 7 LG	1,608		
1 - 2 LG	2,695	96 - 211 LG	1,521		

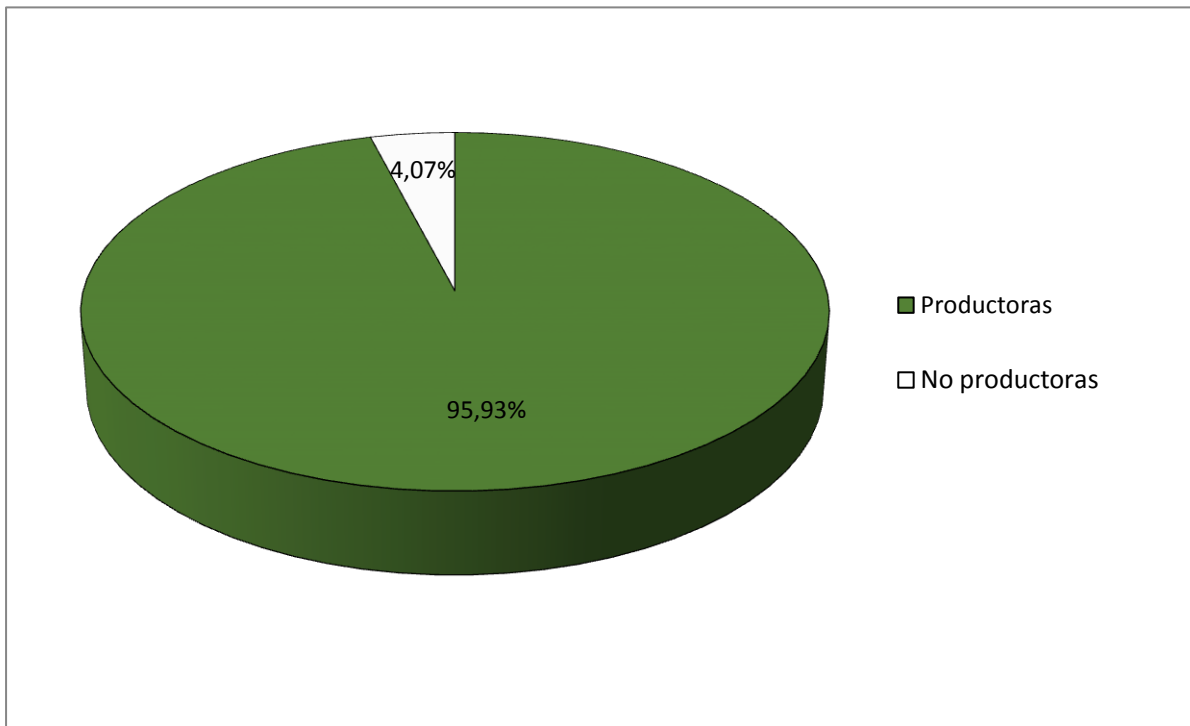


Figura 41. Porcentaje de *Azotobacter* spp. aisladas en medio Ashby Sacarosa que produjeron indoles *in vitro*.

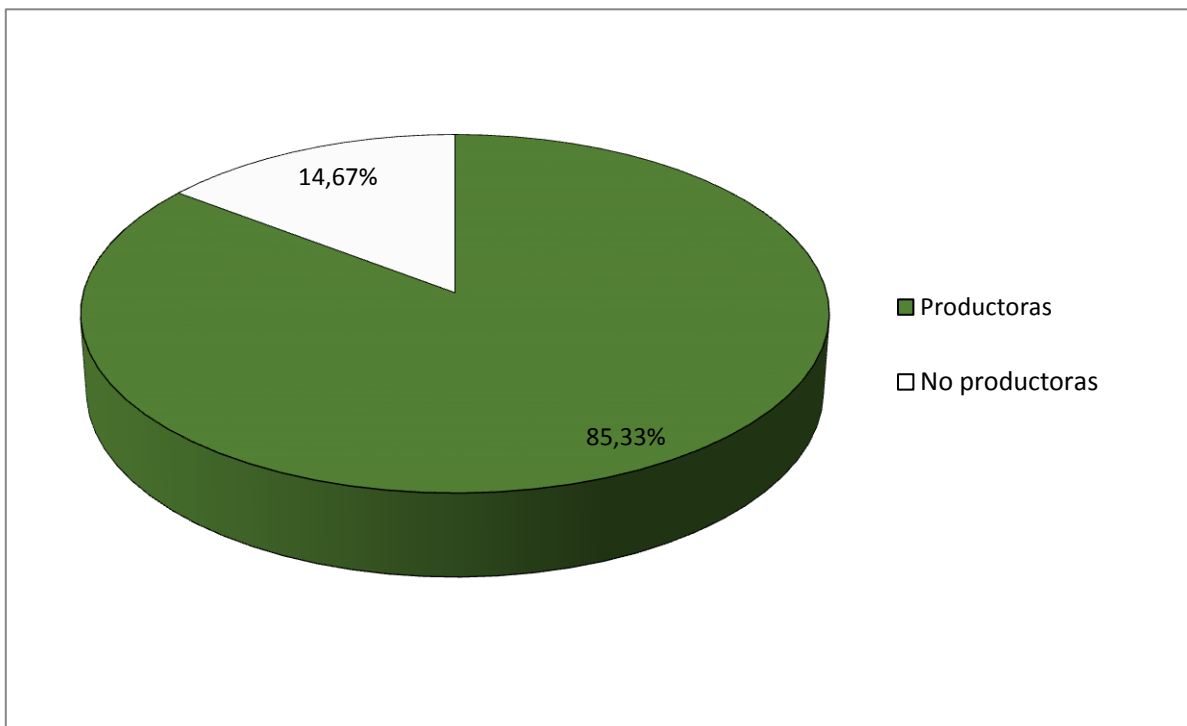


Figura 42. Porcentaje de *Azotobacter* spp. aisladas en medio LG que produjeron indoles *in vitro*.

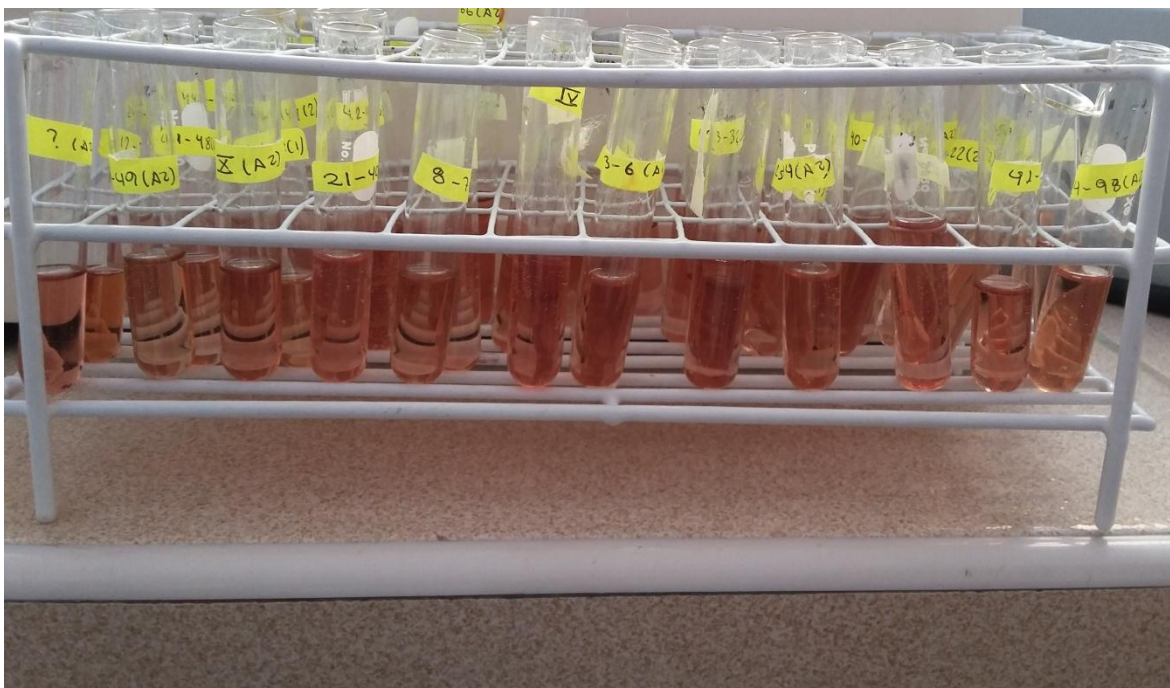


Figura 43. Coloración observada en la cuantificación de indoles.

Tabla 8. Indoles producidos (ppm) por *Azotobacter* spp. aisladas de *Asparagus officinalis* L. en medio Ashby Sacarosa

<i>Azotobacter</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)	<i>Azotobacter</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)	<i>Azotobacter</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)
21 - 42 ASHBY	62,022	95 - 216 ASHBY	18,688	86 - 202 ASHBY	8,022
27 - 58 ASHBY	42,244	53 - 118 ASHBY	18,466	55 - 125 ASHBY	7,800
83 - 189 ASHBY	41,355	33 - 74 ASHBY	18,244	80 - 181 ASHBY	7,577
26 - 54 ASHBY	36,022	95 - 217 ASHBY	18,022	66 - 145 ASHBY	7,577
16 - 29 ASHBY	35,133	35 - 80 ASHBY	17,800	76 - 165 ASHBY	7,355
21 - 39 ASHBY	33,577	76 - 164 ASHBY	17,800	12 - 17ASHBY	6,688
83 - 190 ASHBY	32,911	84 - 194 ASHBY	17,800	74 - 155 ASHBY	6,688
83 - 191 ASHBY	31,577	63 - 133 ASHBY	17,577	95 - 228 ASHBY	5,800
26 - 55 ASHBY	31,355	86 - 201 ASHBY	17,577	39 - 92 ASHBY	5,577
83 - 188 ASHBY	30,688	5 - 9 ASHBY	17,355	17 - 30 ASHBY	5,133
80 - 173 ASHBY	30,688	9 - 13 ASHBY	17,133	42 - 100 ASHBY	5,133
21 - 40 ASHBY	30,466	95 - 219 ASHBY	17,133	74 - 154 ASHBY	5,133
83 - 193 ASHBY	29,355	95 - 226 ASHBY	17,133	9 - 14 ASHBY	4,911
76 - 163 ASHBY	28,911	95 - 222 ASHBY	16,688	89 - 205 ASHBY	4,911
80 - 175 ASHBY	28,688	15 - 24 ASHBY	16,022	1 - 2 ASHBY	4,466
24 - 44 ASHBY	28,022	45 - 107 ASHBY	15,355	75 - 158 ASHBY	4,466
39 - 93 ASHBY	28,022	68 - 147 ASHBY	15,355	32 - 70 ASHBY	4,022
76 - 161 ASHBY	27,800	86 - 204 ASHBY	15,355	26 - 53 ASHBY	3,577
80 - 174 ASHBY	27,577	11 - 15 ASHBY	14,911	95 - 218 ASHBY	3,577
95 - 214 ASHBY	25,800	93 - 210 ASHBY	14,466	65 - 140 ASHBY	3,355
16 - 27 ASHBY	24,688	80 - 183 ASHBY	14,466	59 - 126 ASHBY	3,133
24 - 47 ASHBY	24,466	80 - 180 ASHBY	14,244	68 - 146 ASHBY	2,911
75 - 157 ASHBY	24,466	49 - 111 ASHBY	14,022	6 - 11 ASHBY	2,688
20 - 37 ASHBY	23,800	34 - 76 ASHBY	13,800	12 - 19 ASHBY	2,688

Continuación...

<i>Azotobacter</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)	<i>Azotobacter</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)	<i>Azotobacter</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)
89 - 206 ASHBY	23,800	96 - 235 ASHBY	13,800	76 - 166 ASHBY	2,688
95 - 227 ASHBY	23,577	26 - 56 ASHBY	12,911	95 - 221 ASHBY	2,688
16 - 28 ASHBY	23,355	65 - 135 ASHBY	12,688	72 - 153 ASHBY	2,466
44 - 104 ASHBY	23,133	36 - 82 ASHBY	12,022	63 - 130 ASHBY	2,022
95 - 224 ASHBY	22,911	12 - 20 ASHBY	12,022	82 - 184 ASHBY	2,022
80 - 179 ASHBY	22,911	53 - 120 ASHBY	11,577	3 - 7 ASHBY	1,355
80 - 182 ASHBY	21,800	28 - 60 ASHBY	10,688	28 - 59 ASHBY	0,911
83 - 192 ASHBY	21,133	25 - 48 ASHBY	10,688	53 - 117 ASHBY	0,911
96 - 237 ASHBY	21,133	33 - 73 ASHBY	10,466	53 - 115 ASHBY	0,911
80 - 178 ASHBY	20,911	16 - 25 ASHBY	9,577	45 - 108 ASHBY	0,688
24 - 46 ASHBY	20,466	44 - 102 ASHBY	9,355	84 - 195 ASHBY	0,466
25 - 50 ASHBY	20,466	95 - 220 ASHBY	9,133	51 - 113 ASHBY	0,244
33 - 75 ASHBY	20,466	19 - 36 ASHBY	8,911	66 - 144 ASHBY	0,244
11 - 16 ASHBY	20,244	86 - 198 ASHBY	8,244	89 - 207 ASHBY	0,244
43 - 101 ASHBY	20,022	65 - 136 ASHBY	8,022		
95 - 215 ASHBY	19,133	63 - 132 ASHBY	8,022		

Tabla 9. Indoles producidos (ppm) por *Azotobacter* spp. aisladas de *Asparagus officinalis* L. en medio LG

<i>Azotobacter</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)	<i>Azotobacter</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)	<i>Azotobacter</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)
76 - 165 LG	59,577	44 - 109 LG	11,577	96 - 211 LG	5,355
12 - 30 LG	58,688	82 - 175 LG	10,688	27 - 52 LG	4,911
13 - 32 LG	43,133	50 - 117 LG	10,688	27 - 63 LG	4,911
25 - 60 LG	38,244	39 -99 LG	10,466	27 - 66 LG	4,244
76 - 164 LG	36,022	31 - 77 LG	10,244	89 - 201 LG	4,244
7 - 19 LG	33,355	2 - 4 LG	9,800	47 - 110 LG	4,022
87 - 190 LG	31,800	28 - 67 LG	9,800	8 -25 LG	3,355
13 - 33 LG	30,022	88 - 200 LG	9,800	86 - 186 LG	3,355
88 - 194 LG	29,355	86 - 187 LG	9,577	48 - 112 LG	2,911
76 - 166 LG	28,688	21 - 48 LG	9,355	40 - 102 LG	2,688
1 - 2 LG	26,022	65 - 138 LG	9,355	69 - 145 LG	2,466
69 - 147 LG	19,577	88 -192 LG	9,133	55 - 123 LG	2,466
51 120 LG	17,577	88 - 195 LG	8,688	68 - 143 LG	1,577
83 - 177 LG	15,355	35 - 87 LG	8,244	37 - 92 LG	1,133
90 - 206 LG	14,911	78 - 170 LG	7,133	6 - 15 LG	1,133
16 - 40 LG	13,355	3 - 11 LG	6,688	83 - 178 LG	1,133
30 - 46 LG	13,355	88 - 191 LG	6,688	95 - 209 LG	0,466
75 - 160 LG	13,133	87 - 188 LG	6,688	68 - 139 LG	0,244
74 - 154 LG	12,911	36 - 88 LG	6,466	68 - 144 LG	0,244
17 - 34 LG	12,688	90 - 204 LG	6,466	61 - 131 LG	0,244
88- 196 LG	12,466	82 - 173 LG	6,244		
3 -10 LG	11,577	15 - 38 LG	5,355		

4.3 Cultivos de *Azotobacter* spp. seleccionados

Los ocho cultivos de *Azotobacter* spp. seleccionados correspondieron a *Azotobacter* spp.12-17ASHBY y 16-28ASHBY con 34,527 y 33,553ppm de amonio; *Azotobacter* spp.95-221ASHBY y 25-60LG con 5,050 y 5,391ppm de fósforo soluble; *Azotobacter* spp.21-42ASHBY y 76-165LG con 62,022 y 59,577ppm de indoles; *Azotobacter* sp.95-215ASHBY con 32,597ppm de amonio y 4,768ppm de fósforo soluble y *Azotobacter* spp.76-164LG con 21,650ppm de amonio y 36,022ppm de indoles (Tabla 10).

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

Los valores de altura y número de tallos de las plantas de espárrago presentaron distribución normal ($p>0,05$) y homogeneidad de varianza ($p>0,05$), por lo que se realizó el análisis de varianza de un solo factor y la prueba múltiple de Tukey (Anexos 7 a 12). La altura de las plantas de espárrago a los 30 días fue de 41,07-51,40cm con *Azotobacter* spp., 38,00cm en el testigo absoluto y 45,67cm en el testigo químico (Figuras 44 a 47), registrándose índices de efectividad de 8,072% con *Azotobacter* sp.21-42ASHBY y 35,264% con *Azotobacter* sp. 16-28ASHBY (Tabla 11). El número de tallos de las plantas de espárrago a los 30 días fue de 4,00-6,33 con *Azotobacter* spp., 4,00 tallos en el testigo absoluto y 3,00 en el testigo químico (Figura 48), registrándose índices de efectividad de 8,259% con *Azotobacter* sp.16-28ASHBY y 58,252% con *Azotobacter* sp. 76-164LG (Tabla 12). El análisis de varianza de los valores de altura y número de tallos no demostró significancia (Anexos 7, 8).

La altura de las plantas de espárrago a los 45 días fue de 44,00-58,00cm con *Azotobacter* spp., 42,00cm en el testigo absoluto y 49,33cm en el testigo químico (Figuras 49 a 57), registrándose índices de efectividad de 4,762% con *Azotobacter* sp.25-60LG y 38,094% con *Azotobacter* sp.16-28ASHBY (Tabla 11).

Tabla 10. Valores (ppm) de amonio, fósforo soluble e indoles correspondientes a cultivos de *Azotobacter* spp. seleccionados

<i>Azotobacter</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)	Fósforo soluble (ppm)	Indoles (ppm)
12-17ASHBY	33,553	4,024	6,688
16-28ASHBY	34,527	2,072	23,355
95-221ASHBY	19,031	5,050	2,688
25-60LG	13,001	5,391	38,244
21-42ASHBY	20,207	4,356	62,022
76-165LG	17,229	2,985	59,577
95-215ASHBY	32,597	4,768	19,133
76-164LG	21,770	0,391	36,022



Figura 44. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 30 días después de la siembra de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) *Azotobacter* sp. 12-17ASHBY, d) *Azotobacter* sp. 16-28ASHBY.



Figura 45. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 30 días después de la siembra de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) *Azotobacter* sp. 25-60LG, d) *Azotobacter* sp. 95-221ASHBY.



Figura 46. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 30 días después de la siembra de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) *Azotobacter* sp. 76-165LG, d) *Azotobacter* sp. 21-42ASHBY.

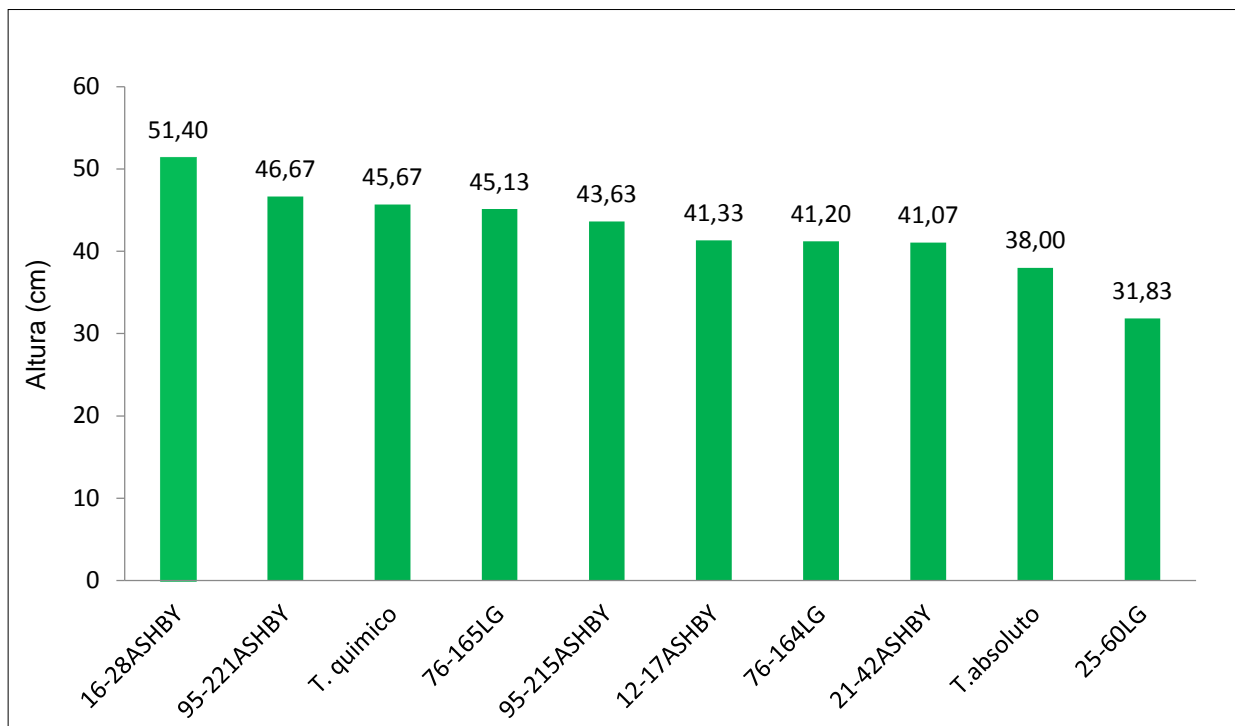


Figura 47. Altura (cm) de *Asparagus officinalis* L., 30 días después de la inoculación de *Azotobacter* spp.

Tabla 11. Índices de efectividad (%) de *Azotobacter* spp. en la altura de *Asparagus officinalis* L. a los 30, 45 y 60 días

<i>Azotobacter</i> spp. código UNPRG	IE%		
	30 días	45 días	60 días
12-17ASHBY	8,767	9,528	3,519
16-28ASHBY	35,264	38,094	28,985
95-221ASHBY	22,823	17,457	7,660
21-42ASHBY	8,072	4,762	0
25-60LG	0	0	0
76-165LG	18,762	24,591	17,184
95-215ASHBY	14,820	19,453	26,915
76-164LG	8,422	14,693	10,351
T. químico	20,184	17,452	6,911

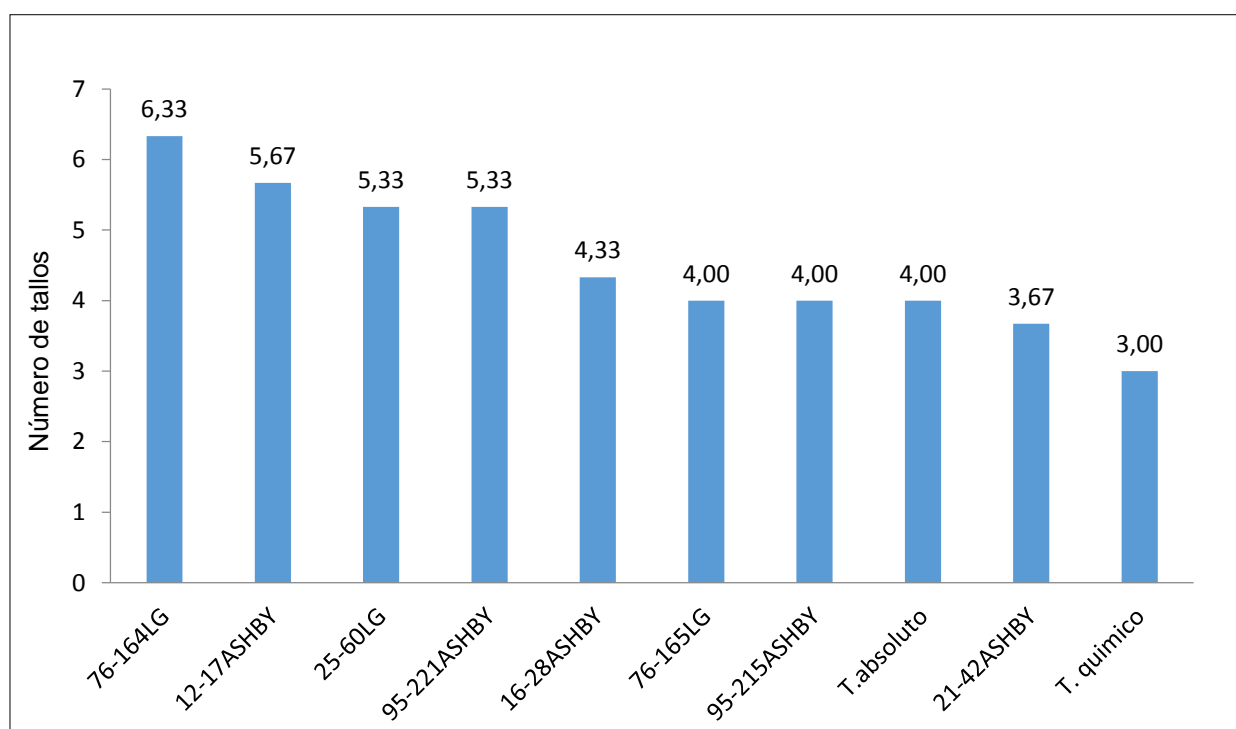


Figura 48. Número de tallos de *Asparagus officinalis* L., 30 días después de la inoculación de *Azotobacter* spp.

Tabla 12. Índices de efectividad (%) de *Azotobacter* spp. en el número de tallos de *Asparagus officinalis* L. a los 30, 45 y 60 días

Azotobacter spp. código UNPRG	IE%		
	30 días	45 días	60 días
12-17ASHBY	41,753	77,133	86,046
16-28ASHBY	8,259	18,250	39,534
95-221ASHBY	33,256	38,576	46,511
21-42ASHBY	33,257	38,574	86,046
25-60LG	0	0	6,976
76-165LG	0	7,856	39,534
95-215ASHBY	0	23,093	62,790
76-164LG	58,252	54,045	86,046
T. químico	0	16,750	30,947



Figura 49. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) *Azotobacter* sp. 16-28ASHBY.



Figura 50. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) *Azotobacter* sp. 12-17ASHBY.



Figura 51. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) *Azotobacter* sp. 95-215ASHBY.



Figura 52. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) *Azotobacter* sp. 76-164LG.



Figura 53. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) *Azotobacter* sp. 76-165LG.



Figura 54. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) *Azotobacter* sp. 21-42LG.



Figura 55. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) *Azotobacter* sp. 95-221ASHBY.



Figura 56. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) *Azotobacter* sp. 25-60LG.

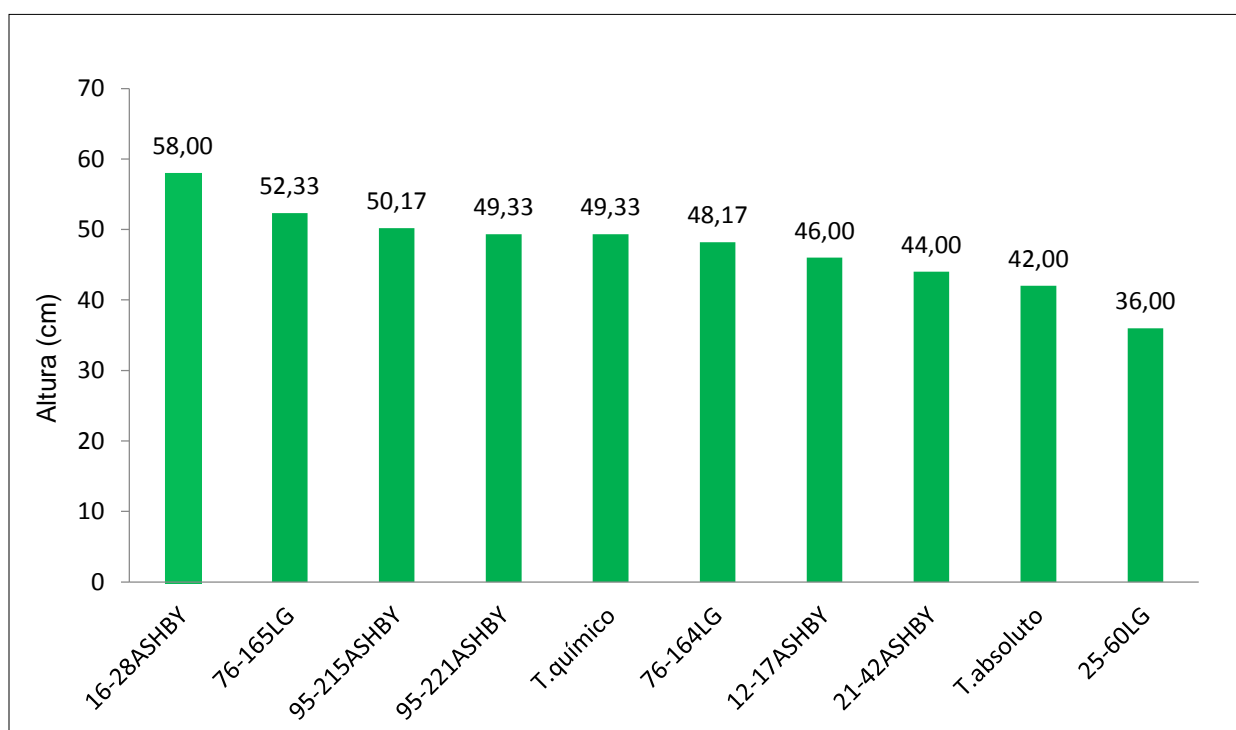


Figura 57. Altura (cm) de *Asparagus officinalis* L., 45 días después de la inoculación de *Azotobacter* spp.

El número de tallos de las plantas de espárrago a los 45 días fue de 4,00-7,67 con *Azotobacter* spp., 4,00 tallos en el testigo absoluto y 4,67 tallos en el testigo químico (Figura 58), registrándose índices de efectividad de 7,856% con *Azotobacter* sp.76-165LG y 77,133% con *Azotobacter* sp.12-17ASHBY (Tabla 12). El análisis de varianza de los valores de altura y número de tallos no demostró significancia (Anexos 9, 10).

La altura de las plantas de espárrago a los 60 días fue de 50,00-62,33cm con *Azotobacter* spp., 48,33cm en el testigo absoluto y 51,67cm en el testigo químico (Figuras 59 a 67), registrándose índices de efectividad de 3,519% con *Azotobacter* sp.12-17ASHBY y 28,985% con *Azotobacter* sp.16-28ASHBY (Tabla 13). El análisis de varianza de los valores de altura demostró alta significancia (Anexo 11) y según la prueba múltiple de Tukey el mayor valor se alcanzó con *Azotobacter* sp.16-28ASHBY, no diferenciándose significativamente de *Azotobacter* sp.95-215ASHBY, pero si de los demás tratamientos (Tabla 13). El número de tallos de las plantas de espárrago a los 60 días fue de 4,67-8,00 con *Azotobacter* spp., 4,33 tallos en el testigo absoluto y 5,67 tallos en el testigo químico (Figura 68), registrándose índices de efectividad de 6,976% con *Azotobacter* sp.25-60LG y 86,046% con *Azotobacter* sp.12-17ASHBY (Tabla 13). El análisis de varianza de los valores de número de tallos no demostró significancia (Anexo 12).

Azotobacter sp.25-60LG no incrementó la altura de las plantas de espárrago a los 30, 45 y 60 días (Tabla 11), ni tampoco el número de tallos a los 30 y 45 días (Tabla 12). A su vez, *Azotobacter* spp.16-28ASHBY y 95-221ASHBY superaron al testigo químico en los índices de efectividad en la altura y número de tallos a los 30, 45 y 60 días, respectivamente (Tabla 11, 12).

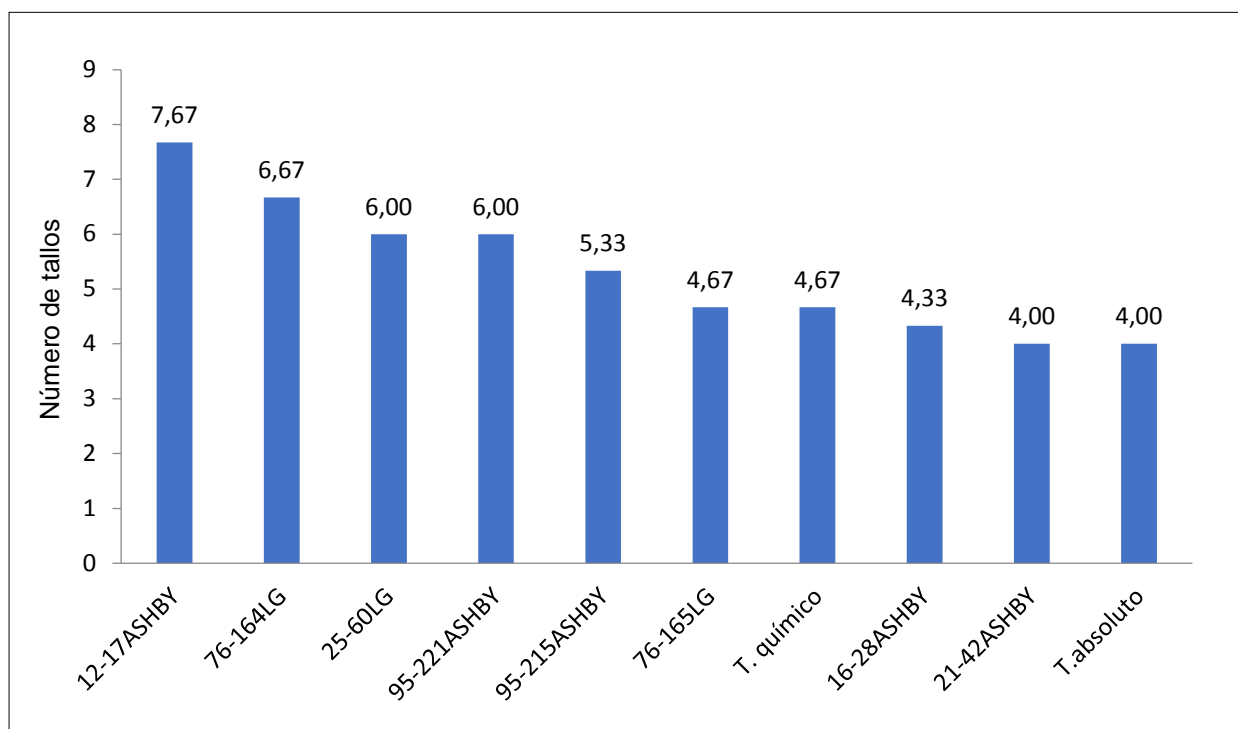


Figura 58. Número de tallos de *Asparagus officinalis* L., 45 días después de la inoculación de *Azotobacter* spp.



Figura 59. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 60 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Azotobacter* sp. 76-164LG.



Figura 60. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 60 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Azotobacter* sp. 95-221ASHBY.



Figura 61. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 60 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Azotobacter* sp. 12-17ASHBY.



Figura 62. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 60 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Azotobacter* sp. 21-42LG.



Figura 63. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 60 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Azotobacter* sp. 95-215ASHBY.



Figura 64. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 60 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Azotobacter* sp. 76-165LG.



Figura 65. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 60 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Azotobacter* sp. 16-28ASHBY.



Figura 66. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 60 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Azotobacter* sp. 25-60LG.

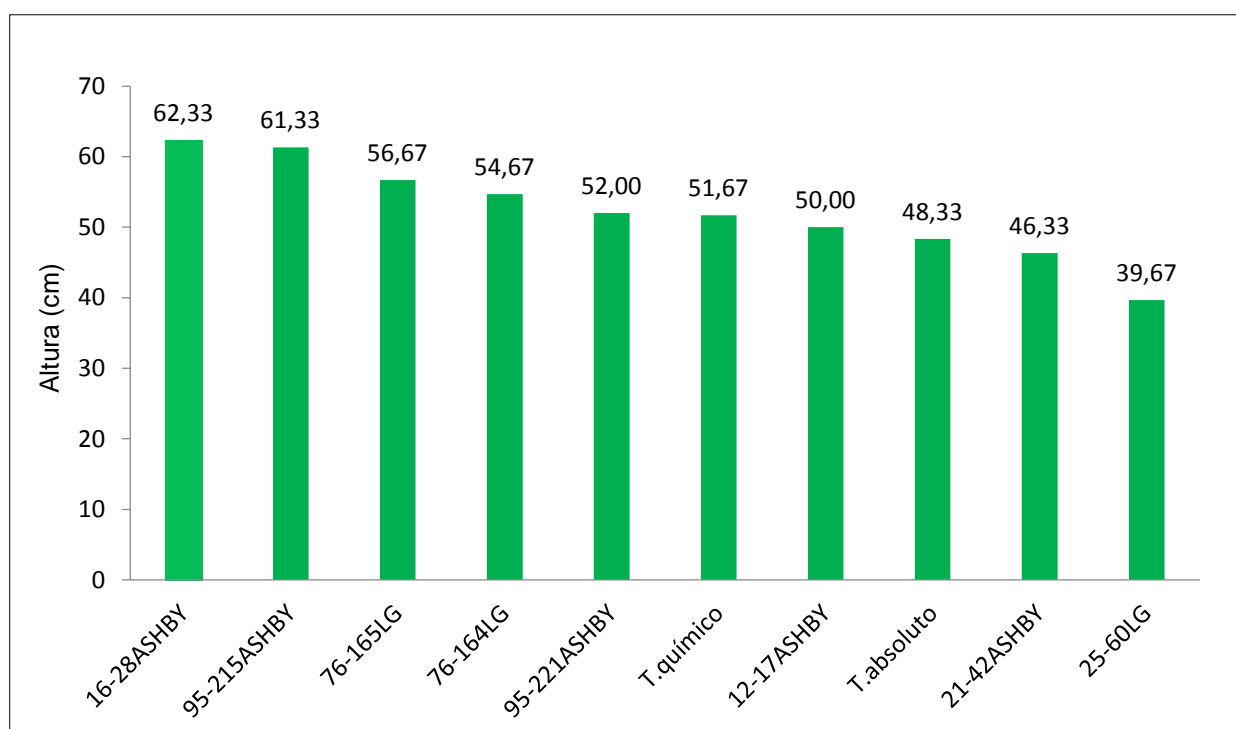


Figura 67. Altura (cm) de *Asparagus officinalis* L., 60 días después de la inoculación de *Azotobacter* spp.

Tabla 13. Prueba de Tukey de la altura de plantas de *Asparagus officinalis* L. a los 30, 45 y 60 días después de la inoculación de *Azotobacter* spp.

<i>Azotobacter</i> spp. código UNPRG	Altura (cm)					
	30 días	Sign	45 días	Sing	60 días	Sign.
12-17ASHBY	41,33	a	46,00	a	50,00	ab
16-28ASHBY	51,40	a	58,00	a	62,33	a
95-221ASHBY	46,67	a	49,33	a	52,00	ab
21-42ASHBY	41,07	a	44,00	a	46,33	ab
25-60LG	31,83	a	36,00	a	39,67	b
76-165LG	45,13	a	52,33	a	56,67	ab
95-215ASHBY	43,63	a	50,17	a	61,33	a
76-164LG	41,20	a	48,17	a	54,67	ab
T. absoluto	38,00	a	42,00	a	48,33	ab
T. químico	45,67	a	49,33	a	51,67	ab

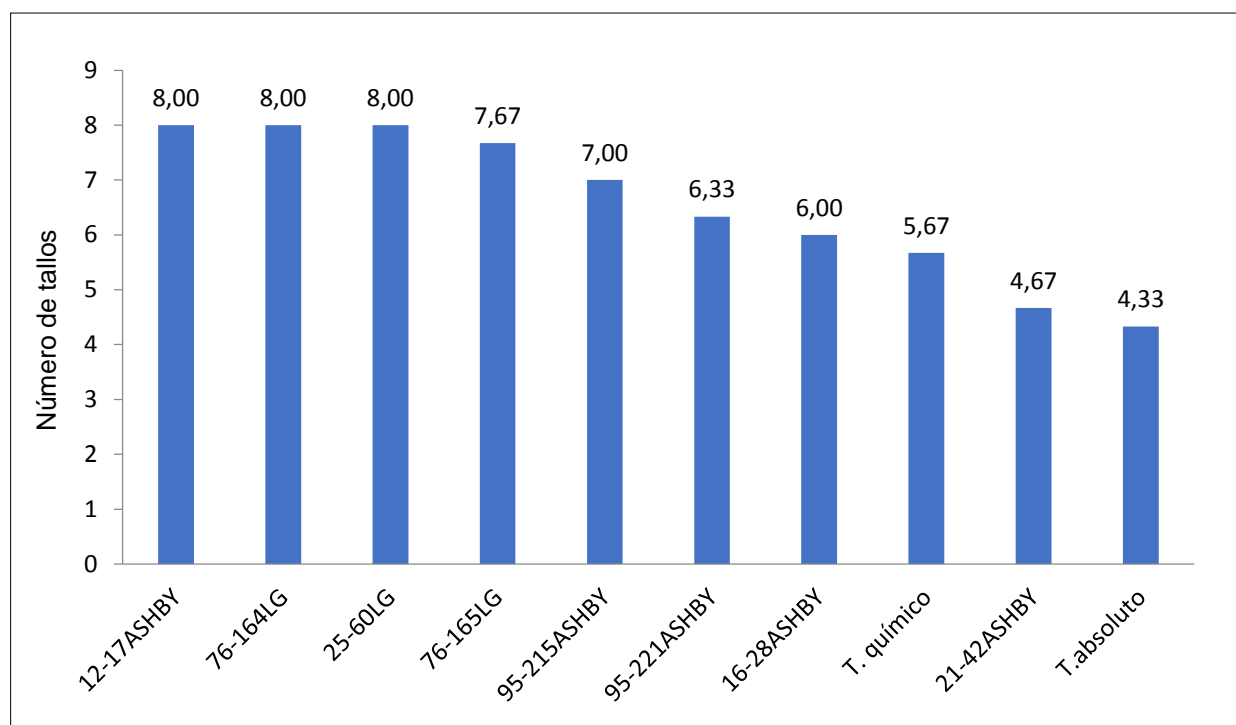


Figura 68. Número de tallos de *Asparagus officinalis* L., 60 días después de la inoculación de *Azotobacter* spp.

V. DISCUSIÓN

En muestras de rizoplasma y rizósfera de espárrago se aislaron bacterias fijadoras de nitrógeno o diazotróficas aerobias, coincidiendo con Escobar et al., 2011 (hortalizas), Ramírez & Ugaz, 2014 (arroz) y Jara & Tafur, 2015 (maíz). La rizósfera es el volumen de suelo adherido al rizoplasma o superficie de las raíces (Aguado, 2012), en el que los compuestos exudados por los vegetales y presentes en la materia orgánica están disponibles para el crecimiento microbiano (Zahar et al., 2008).

Las bacterias diazotróficas se aislaron en los medios sólidos sin nitrógeno agar Ashby y LG, con y sin previo enriquecimiento, respectivamente. El enriquecimiento permite incrementar los microorganismos investigados y disminuir los contaminantes de una muestra biológica (Madigan et al., 2004), aseveración confirmada por Escobar et al. (2011) y Germán (2015) en bacterias diazotróficas de raíces y rizósfera de hortalizas y *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar”.

Las colonias de consistencia mucosa se seleccionaron para identificar *Azotobacter* spp., coincidiendo con Rojas (2013), Rojas & Vásquez (2014) y Jara & Tafur (2015). El aspecto mucoso indica la producción de exopolisacáridos (Luque et al., 2010), característica de las especies de *Azotobacter* (Escobar et al., 2011) que favorece la fijación de nitrógeno en aerobiosis (Coyne, 2000). Asimismo, el viraje del indicador en medios líquidos y sólidos también fue una característica diferencial del género *Azotobacter*, que agrupa bacterias productoras de acidez a partir de la sacarosa, componente de los medios Ashby y LG, con la consecuente disminución del pH (Escobar et al., 2011).

El número de cultivos de bacterias diazotróficas disminuyó después del subcultivo en medio sólido sin nitrógeno porque se eliminaron aquellas que no fijaron el nitrógeno molecular (Ramírez & Ugaz, 2014). Con la técnica de subcultivo se purifican las bacterias, se evita el crecimiento de saprófitos y se minimizan los falsos positivos (Rico, 2009; Rojas, 2013; Jara & Tafur, 2015).

En el 87,87% (Ashby) y 64,52% (LG) de las bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias se identificó el género *Azotobacter* resultado que denota la presencia de otros géneros en el rizoplaneo y rizósfera de espárrago. Las bacterias fijadoras de nitrógeno pueden ser rizosféricas, que habitan en el suelo rizosférico o la superficie de las raíces (Aguado, 2012) como *Azotobacter*, *Beijerinckia* y *Azomonas* (Mayz, 2004) y pueden ser endófitas, que viven dentro de los tejidos, pero en algún momento de su ciclo de vida se encuentran fuera (Bandera, 2013). Estas bacterias son aisladas del interior de los tejidos vegetales, pero también del suelo rizosférico (Beracochea, 2011).

En el medio Ashby se obtuvo el mayor número de bacterias fijadoras de nitrógeno y cultivos de *Azotobacter* spp., resultado atribuido al enriquecimiento previo de las bacterias (Escobar et al., 2011). Este medio también fue utilizado para aislar *Azotobacter* spp. sin previo enriquecimiento, mediante la técnica de siembra de gránulos de suelo (Kizilkaya, 2009; Obando, 2012). Asimismo, el medio LG también fue utilizado por Garrido (2007), Guzmán et al. (2012) y Ramírez & Ugaz (2014).

El género *Azotobacter* se identificó fenotípicamente, coincidiendo con Reyes et al. (2008), Orozco & Martínez (2009), Obando et al. (2010), Guzmán et al. (2012) y Jara & Tafur (2015); no obstante, las técnicas convencionales de identificación fenotípica deben ser complementadas con técnicas moleculares como el Análisis de Restricción del DNA ribosomal 16S Amplificado: ARDRA (Jiménez, 2007; Obando, 2012).

En las muestras de raíces con suelo rizosférico de espárrago se aisló e identificó *Azotobacter* spp., bacterias que también fueron reportados en hortalizas (Jiménez, 2007), bambú (Sachin & Misra, 2009), arroz (Vallejo et al., 2008), pino (Orozco & Martínez, 2009), maíz (Salhia, 2010), eucalipto (Obando et al., 2010),

tomate (Escobar et al., 2011), algodón (Guzmán et al., 2012), frijol caupí (Obando, 2012) e incluso malezas (Rojas, 2013).

Los cultivos de *Azotobacter* spp. fijaron nitrógeno *in vitro*, cuantificándose hasta 34,527ppm de amonio, valor similar a 35ppm reportadas por Rojas & Vásquez (2014) para aislados de maíz. Asimismo, se superó el rango 1,62-12,08ppm registrado por Lara et al. (2007), Escobar et al. (2011) y Ramírez & Ugaz (2014) para *Azotobacter* spp. de rastros, hortalizas y arroz, respectivamente. En la presente investigación mediante la técnica de Berthelot o fenol-hipoclorito se realizó una medición indirecta del nitrógeno fijado como amonio (Lara et al., 2007); no obstante, también se puede realizar una medición directa con la técnica de reducción de acetileno, ARA (Orozco & Martínez, 2009; Obando, 2012).

Los cultivos de *Azotobacter* spp. solubilizaron fosfato tricálcico, cuantificándose hasta 5,391ppm de fósforo soluble, valor inferior a 6,06ppm reportadas por Rojas (2013), para aislados de la rizósfera de malezas. La capacidad de estas bacterias para solubilizar fosfatos insolubles ha sido demostrada previamente por Rojas & Moreno (2008), Obando (2012), Exebio (2013) y Rojas & Vásquez (2014), liberándose fósforo soluble que puede ser aprovechado por las plantas (Becerra et al., 2011; Álvarez, 2012).

Los cultivos de *Azotobacter* spp. produjeron indoles, cuantificándose hasta 62,022 ppm, valor superior al rango 27-60ppm reportado por Obando et al. (2010), Obando (2012) y Rojas (2013) para aislados de eucalipto, frijol caupí y malezas, respectivamente. Los indoles se cuantificaron mediante la reacción de colorimétrica de Salkowsky, específica para estos compuestos, que agrupan el ácido indolacético (Celis & Gallardo, 2008).

El potencial de *Azotobacter* spp. como promotoras de crecimiento en plantas se atribuye a mecanismos directos como la fijación de nitrógeno (Obando et al., 2010), solubilización de fosfatos (Obando, 2012) y producción de indoles (Lara et al., 2011). En este contexto, se seleccionaron los cultivos de *Azotobacter* spp. que alcanzaron los mayores valores en la concentración de amonio, fósforo soluble e indoles, coincidiendo con Obando (2012), Rojas (2013) y Rojas &

Vásquez (2014); no obstante, también se pueden seleccionar solo por los índoles producidos (Lara et al., 2011), nitrógeno fijado y fosfatos solubilizados (Reyes et al., 2008), fosfato solubilizado, índoles producidos y efecto en la germinación (Clavijo et al., 2012).

Las bacterias del género *Azotobacter*, fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fosfato y productoras de índoles, a excepción de *Azotobacter* sp.25-60LG, influyeron positivamente el desarrollo vegetativo de las plantas de espárrago, observándose incremento en la altura y número de tallos. De manera similar, el efecto positivo de *Azotobacter* spp. ha sido demostrado en café (Delgado et al., 2003), hortalizas (Jiménez, 2007), pimiento (Reyes et al., 2008), papa (Rico, 2009), pino (Orozco & Martínez, 2009), eucalipto (Obando et al., 2010), pepinillo (Salhia, 2010), frijol caupí (Obando, 2012) y maíz (Sánchez et al., 2014).

El efecto positivo de las PGPR como *Azotobacter* spp. se atribuye a mecanismos directos e indirectos. Los directos incluyen la síntesis de reguladores del crecimiento (auxinas, giberelinas y citoquinas), solubilización de fosfatos y fijación de nitrógeno (Loredo et al., 2004; Lara et al., 2007). Los mecanismos indirectos son responsables del biocontrol de plagas (Bhattacharyya & Jha, 2012). Según la “Hipótesis Aditiva” el efecto de las PGPR se atribuye a más de un mecanismo involucrado en la asociación planta-bacteria, los mismos que operan simultáneamente, reflejándose en los cambios observados en el crecimiento de las plantas (Bashan & Levnony, 1990, mencionados por Kloepper, 2003).

El incremento de la altura de las plantas por *Azotobacter* spp. también fue reportado en pimentón (Reyes et al., 2008), maíz (Sánchez et al., 2014), pino (Orozco & Martínez, 2009), tomate (González, 2000), café (Delgado et al., 2003), trigo (García et al., 2005), pepinillo (Salhia, 2010) y pasto (Mantilla et al., 2011). El incremento en el número de tallos por *Azotobacter* spp. también fue reportado por Salhia (2010) en pepinillo.

Respecto al efecto positivo *Azotobacter* spp., se ha reportado incremento en la germinación (Aly et al., 2012), longitud radicular (Sachin & Mirsa, 2009), biomasa aérea y radicular (Escobar et al., 2011), número de botones florales

(Reyes et al., 2008), contenido de nitrógeno en raíces (Salhia, 2010) hojas y suelo (Orozco & Martínez, 2009) número de ramas y hojas (Salhia, 2010), clorofila en hojas (Obando, 2012), contenido de nitrógeno, fósforo y potasio en frutos (González et al., 2003) y rendimiento (Jarak et al., 2012).

Azotobacter sp.25-60LG seleccionada por alcanzar el mayor valor de fósforo soluble y uno los mayores valores en indoles afectó negativamente la altura de las plantas de espárrago, coincidiendo con Constantino et al. (2011), quienes observaron disminución en la altura de plántulas de papaya inoculadas con *A. chroococcum*. Este resultado contradictorio con la definición de una PGPR también fue reportado como disminución de la germinación de maíz (Rojas, 2013), biomasa fresca de lechuga (Rico, 2009), altura, biomasa redicular y aérea de maíz (Córdova & Manayay, 2013).

Respecto al efecto negativo de las PGPR existen diversas explicaciones; no obstante, no se pueden uniformizar a todos los géneros. Rico (2009) demostró que los metabolitos volátiles de *Azotobacter* spp. disminuyeron el peso fresco de plantas de lechuga; sin embargo, estos compuestos sintetizados por un actinomiceto incrementaron hasta 35% en peso. Por su parte, Salhia (2010) observó que *A. chroococcum* fijadora de nitrógeno incrementó el desarrollo vegetativo en los primeros estadíos de plántulas de pepinillo; no obstante, posteriormente el peso de la biomasa fue menor que en las plantas fijadas fertilizados con químico. También se ha sugerido que altas concentraciones de auxinas en los tejidos inducen la síntesis de etileno, que a su vez inhibe la elongación de las raíces (Camelo et al., 2011; Loredó et al., 2004).

Los índices de efectividad de *Azotobacter* spp.16-28ASHBY y 95-221ASHBY superaron inclusive al testigo químico, coincidiendo con Piscoya & Ugaz (2016). Por el contrario, Yasari et al. (2008) observaron que un biofertilizante constituido por *Azotobacter* sp. y *Azospirillum* sp. no afectó significativamente el rendimiento de *Brassica napus* L., pero cuando se aplicó junto a fertilizante químico nitrogenado o fosfatado o con ambos, el aumento en el rendimiento fue significativo. También se ha reportado que con *Azotobacter* spp. se disminuyó el fertilizante químico en 25% en cebolla (Balemi et al., 2007) y 50% en trigo (García

et al., 2005) y maíz (Sánchez et al., 2014; Piscoya & Ugaz, 2016). En este contexto, el efecto de *Azotobacter* spp. 12-17, 16-28, 95-221, 21-42, 76-165, 95-215 y 76-164 en el desarrollo vegetativo y rendimiento de espárrago debe ser investigado en condiciones de campo (Carreño, 2009), para constituir biofertilizantes que puedan ser aplicados solos o en conjunto con dosis disminuidas de fertilizante químico.

VI. CONCLUSIONES

- ✓ En el rizoplasma y rizósfera de espárrago se aislaron e identificaron fenotípicamente 198 cultivos de *Azotobacter* spp.
- ✓ Los cultivos de *Azotobacter* spp. fijaron nitrógeno, solubilizaron fosfato y produjeron indoles, cuantificándose 3,406 a 34,527ppm de amonio; 0,275 a 5,391ppm de fosfato y 0,244 a 62,022ppm de indoles.
- ✓ Los cultivos de *Azotobacter* spp. seleccionados correspondieron a *Azotobacter* spp.12-17ASHBY y 16-28ASHBY con 33,553 y 34,527ppm de amonio; *Azotobacter* spp.95-221ASHBY y 25-60LG con 5,050 y 5,391ppm de fósforo soluble; *Azotobacter* spp. 21-42ASHBY y 76-165LG con 62,022 y 59,577ppm de indoles; *Azotobacter* sp.95-215ASHBY con 32,597ppm de amonio y 4,768ppm de fósforo soluble y *Azotobacter* spp.76-164LG con 21,650ppm de amonio y 36,022ppm de indoles.
- ✓ Las bacterias seleccionadas a excepción de *Azotobacter* sp. 25-60LG, incrementaron la altura y número de tallos de las plantas de espárrago con índices de efectividad de 3,519 a 38,094% y 8,259 a 86,046% respectivamente.

VII. RECOMENDACIONES

- ✓ Identificar a nivel molecular *Azotobacter* spp.12-17, 16-28, 95-221, 21-42, 76-165, 95-215 y 76-164.
- ✓ Determinar el efecto de *Azotobacter* spp.12-17, 16-28, 95-221, 21-42, 76-165, 95-215 y 76-164 en el desarrollo vegetativo y rendimiento en condiciones de campo, con y sin dosis de fertilizante químico.
- ✓ Investigar sustratos orgánicos de bajo costo para el incremento masivo de *Azotobacter* spp. 12-17, 16-28, 95-221, 21-42, 76-165, 95-215 y 76-164.

VIII. RESUMEN

En el rizoplasma y rizósfera de *Asparagus officinalis* L. “espárrago” se aislaron bacterias de género *Azotobacter*, con el objetivo de determinar su potencial como promotoras de crecimiento en plantas. Las bacterias con y sin enriquecimiento se aislaron en los medios sólidos sin nitrógeno Ashby sacarosa y LG y se identificaron fenotípicamente. Se cuantificó el nitrógeno fijado como amonio, fósforo soluble producto de la solubilización de fosfato tricálcico e indoles producidos por las bacterias *in vitro*. Los ocho cultivos de bacterias (9×10^8 cel mL⁻¹) que alcanzaron los mayores valores se inocularon por aspersión en coronas de espárrago cultivar UC-157 F2 y se determinó el efecto en la altura y número de tallos, durante 60 días en invernadero. Se aisló e identificó *Azotobacter* spp., obteniéndose 198 cultivos puros, con los que se cuantificaron 3,406 a 34,527ppm de amonio; 0,275 a 5,391ppm de fósforo soluble y 0,244 a 62,022ppm de indoles. Los cultivos de bacterias seleccionados, a excepción de *Azotobacter* sp.25-60LG incrementaron la altura y número de tallos de las plantas de espárrago, con índices de efectividad de 3,519 a 38,094% y 8,259 a 86,046%, respectivamente. Se demostró la promoción de crecimiento de las plantas de espárrago por *Azotobacter* spp.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrobanco (2007). Área de desarrollo. Cultivo del espárrago. Lima, Perú.
Recuperado de
http://www.agrobanco.com.pe/pdfs/publicacionagroinforma/2_cultivo_de_l_esparrago.pdf
- 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.
- Agüero, A. (2009). *Producción de bacterias fijadoras de nitrógeno (Azotobacter, Bacillus y Pseudomonas); en medio líquido a base de maleza, para su aplicación en el cultivo de caña de azúcar (Saccharum spp.) en azucarera el Viejo*. (Tesis de Biología). Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica.
- Albuquerque, M. (2014). *Factores que determinan la demanda internacional del espárrago fresco del Perú, periodo 1992-2013*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Privada Antenor Orrego, Perú.
- Altamirano, C., Carreño, C., Plasencia, V., Ramírez, L., Silva, J. & Ugaz, F. (2014). *Bacterias rizosféricas y endófitas fijadoras de nitrógeno*. Lambayeque, Perú: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- 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.
- Álvarez, P. (2012). *Selección y evaluación de microorganismos solubilizadores de fosfatos en suelos calcáreos del valle del Mantaro*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú.

- Aly, M., 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), 667-676.
- Ashrafi, V. & Seiedi, M. (2011). Influence of different plant densities and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and yield attributes of corn (*Zea mays* L.). *Recent Research in Science and Technology*, 3(1), 63-66.
- Balemi, T., Pal, N. & Saxena, A. (2007). Responce of onion (*Allium cepa* L.) to combined application of biological and chemical nitrogenous fertilizers. *Acta Agriculturae Slovenica*, 89(1), 107-114.
- Bandera, R. (2013). *Rehabilitación de suelos salino-sódicos: Evaluación de enmiendas y de especies forrajeras*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de la Plata, Argentina.
- Becerra, J., Quintero, D., Martínez, M. & Matiz, A. (2011). Caracterización de microorganismos solubilizadores de fosfatos 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 maiz (Zea mays L.) a la inoculacion con bacterias endófitas diazotrofas nativas*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de la República, Uruguay.
- Bernabé, S. (2011). *Análisis económico del empleo de dos híbridos (UC-157 y Italo) de espárrago verde con destino a diferentes mercados*. (Tesis de Ingeniería). Pontificia Universidad Católica Argentina, Argentina.
- Bhattacharyya, P. & Jha, D. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 28, 1327-1350.
- Borda, D., Pardo, J., Martinez, M. & Montaña, J. (2009). Producción de un biofertilizante a partir de un aislamiento de *Azotobacter nigricans* obtenido en un cultivo de *Stevia rebaudiana* Bert. *Revista Universitas Scientiarum*, 14(1), 71-78.
- Borrego, A. (2014). *Las enmiendas orgánicas del suelo en el control de las Fusariosis del espárrago y del tomate* (Tesis de Doctorado). Universidad de Córdoba, España.

- 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.
- Canto, B., Hurtado, E., Ma W., Wang, C. & Wang, N. (2008). *Proyecto de importación de espárragos verdes frescos*. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid.
- Camelo, M., Vera, S. & Bonilla, R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 12 (2), 159-166.
- 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.
- Celis, L. & Gallardo, I. (2008) *Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indolacético y giberelinas) en cultivos microbianos*. (Tesis de Microbiólogo Agrícola y Veterinario). Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Clavijo, C., Chipana, V., Centeno, J., Zúñiga, D., & Guillén, C. (2012) Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias diazotróficas de la rizósfera del cultivo de *Olea europea* "olivo" en Tacna Perú. *Ecología Aplicada*, 11(2), 89-102.
- Constantino, M., Gómez, R., Alvarez, J., Pat, J. & Espin, E. (2011). Efecto de la inoculación de *Azotobacter chroococcum* y *Glomus intraradices* en el crecimiento y nutrición de plántulas de papaya en fase de vivero. *Agronomía Costarricense*, 35(1), 15-31.
- Córdova, R. & Manayay, C. (2013). *Efecto de rizobacterias aisladas de malezas en el desarrollo vegetativo de Zea mays L. maíz, en condiciones de invernadero, en Lambayeque 2013*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Córdova, L. (2016). *Efecto de Azospirillum spp. nativas en el desarrollo vegetativo de Zea mays L. "maíz" en invernadero*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Coyne, M. (2000) *Microbiología del Suelo: Un enfoque exploratorio*. España: Editorial Paraninfo.
- 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.

- Delgado, A. (2007). *Producción y comercialización de espárrago en el valle de Virú*. (Tesis de Maestría). Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, Perú.
- Delgado, Y., Cupull, R., Pérez, C., Sánchez, A. & Vélchez, M. (2003). Efecto de *Azotobacter* spp. en la estimulación de la germinación y el desarrollo de posturas de *Coffea arabica* L. *Centro Agrícola*, 30(1), 26-32.
- Doumbou, C., Hamby, M., Crawford, D. & Beaulieu, C. (2002). Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection*, 82, 85-102.
- 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.
- Exebio, J. (2013). *Efecto de Azotobacter spp. nativas en el desarrollo vegetativo de Zea mays L. maíz, en condiciones de invernadero, en Lambayeque 2013*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Farías, V., Krarup, C. & Contreras, S. (2004). Efectos de población sobre rendimiento y calidad de turiones de cuatro cultivares de espárrago. *Scientia Agropecuaria* 31, 119-127.
- Franco, M. (2008). *Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas* (Tesis de Doctorado). Universidad de Granada, España.
- García, F. & Muñoz, H. (2010). *Caracterización de cepas nativas de Azospirillum spp. y su efecto como promotoras del desarrollo vegetativo de arroz (Oryza sativa)*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- García, M., Farías, R., Peña, J. & Sánchez J. (2005). Inoculación del trigo var. Pavón con *Azospirillum* spp. y *Azotobacter beijerinckii*. *Terra Latinoamericana*, 23(1), 65-72.
- 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.

- Germán, J. (2015). *Efecto de las concentraciones de Azotobacter sp. aislado de rizosféra de suelo de Saccharum officinarum sobre el crecimiento de Lycopersicum esculentum "tomate"*. (Tesis de Biólogo–Microbiólogo). Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- González, M. (2000). *Efecto de un inoculante microbiano a partir de cepas nativas de Azotobacter chroococcum sobre el rendimiento en secuencias de cultivos hortícolas*. (Tesis Maestría). Universidad de Camaguey, Cuba.
- González, M., Martínez, R., Corrales, I., Pérez, D., Gandarilla, J., Alonso, R., Curbelo, R. & Méndez, V. (2003). Efectividad de un bioestimulador en la calidad de las hortalizas como sostenibilidad de las producciones en la agricultura urbana. *Centro Agrícola*, 4(30), 10-15.
- Guillén, R., Hernández, F., Gallegos, G., Rodríguez, R., Aguilar, C., Padrón, E. & Reyes, M. (2006). *Bacillus spp.*, como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium spp.*, *Rhizoctonia solani Kuhn* y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(2), 105-114.
- Guzmán, A., Obando, M., Rivera, D. & Bonilla, R. (2012). Selección y caracterización de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 182-190.
- Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, P. (2003). *Metodología de la Investigación*. (5^{ta} ed.). Mexico: Mc Grow, Hill Interamericana Editores S.A.
- 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.
- Idris, E., Iglesias, D., Talon, M. & Borriss, R. (2007). Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular Plant-Microbe Interactions (MPMI)*, 20(6), 619-626.
- Jara, I. & Tafur, J. (2015). *Rendimiento de polihidroxicanoatos de Azotobacter spp. aisladas de suelo rizosférico de Zea mays L. en Lambayeque, agosto-octubre, 2014*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.

- Jarak, M., Mrkovacki, N., Bjelic, D., Josic, D., Hajnal- Jafari, T. & Stamenov, D. (2012). Effects of plant growth promoting rhizobacteria on maize in greenhouse and field trial. *African Journal of Microbiology Research*, 6(27), 5683-5690.
- Jiménez, D. (2007) *Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de Azotobacter spp. mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal 16S*. (Tesis de Microbiólogo Industrial). Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Karnwal, A. (2009). Production of indole acetic acid by fluorescent *Pseudomonas* in the presence of L-tryptophan and rice root exudates. *Journal of plant Pathology*, 91(1), 61-63.
- Kizilkaya, R. (2009). Nitrogen fixation capacity of *Azotobacter* spp. strains isolated from soils in different ecosystems and relationship between them and the microbiological properties of soils. *Journal of Environmental Biology*, 30(1), 73-82.
- Kirschenbilder, E., Castagnino, A., Díaz, K., Rosini M. & Falavigna A. (2015). Cadena espárrago: producción de diferentes genotipos en su quinto año y comportamiento en poscosecha. *Agronomía Mesoamericana*, 26(1), 99-109.
- Kloepper, J. (2003). A review of mechanisms for plant growth promotion by PGPR. 6 th International PGPR workshop 5-10 october, Calicut, India.
- Kumar, G., Yadav, S., Thawale, P., Singh, S. & Juwarkar, A. (2008). Growth of *Jatropha curcas* on heavy metal contaminated soil amended with industrial wastes and *Azotobacter* – A greenhouse study. *Bioresource Technology* 99, 2078-2082.
- Lara, C., Villalba, M. & Oviedo, L. (2007). Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdova, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, IX (2), 6-14.
- Lara, C., Oviedo, L. & Alemán, A. (2011a). Aislados nativos con potencial en la producción de ácido indol acético para mejorar la agricultura. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 9 (1), 17-23.
- Lara, C., Oviedo, L. & Betancur, C. (2011b). Bacterias nativas con potencial en la producción de ácido indolacético para mejorar los pastos. *Zootecnia Tropical*, 29 (2), 187-194.
- Loredo, C., López, L. & Espinosa, D. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana*, 22 (2), 225-239.

- Luque, R., Quesada, E., Bejar, V. & Llamas, I. (2010). Aislamiento de cepas del genero *Halomonas* con interés biotecnológico en Rambla Salada (Murcia). *Ars Pharmaceutica*, 51 (3), 453-462.
- Madigan, M.; Martinko, J. & Parker, J. (2004) *Brock, Biología de los microorganismos*. Décima edición. España, Editorial Pearson Educación S.A.
- Mantilla, M. (2007). *Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (Chrysanthemum morifolium var. Yoko ono) en periodo de enraizamiento*. (Tesis de Microbiólogo Agrícola y Veterinario). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Mantilla, C., Oviedo, L. & Betancur, C. (2011). Bacterias nativas con potencial en la producción de ácido indolacético para mejorar los pastos. *Zootecnia Tropica*, 29 (2), 187–194.
- Martínez, O., Jorquera, M., Crowley, D., Gajardo, G. & Mora, M. (2010). Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rizobacteria. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10 (3), 293-319.
- Mayz, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista UDO Agrícola*, 4 (1), 1-20.
- Naz, L. Bano, A., Rehman, B., Pervaiz, S., Iqbal, M., Sarwar, A. & Yasmin, F. (2012). Potencial of *Azotobacter vinelandii* Khsrl as bio-inoculant. *African Journal of Biotechnology*, 11(45), 10368 – 10372.
- 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.
- Obando, D., Burgos, L., Rivera, D., Rubiano, M., Divan, V. & Bonilla, R. (2010). Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, Cesar (Colombia). *Acta Biología Colombiana*, 15(3), 107-120.
- Obando, D. (2012). *Respuesta fisiológica de frijol caupí (Vigna unguiculata L.) Walp a la coinoculación de bacterias diazotróficas de los géneros Azotobacter y Rhizobium en suelos del departamento del Cesar*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Orozco, C. & Martínez, P. (2009). Evaluación de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno simbióticos aislados de la rizósfera de *Pinus patula* en Colombia. *Bosque*, 30(2), 70 - 77.

- Pedraza, R., Bellone, C., & de Bellone, C. (2010). *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. *European Journal of Soil Biology*, 45, 36-43.
- Piscocya, E. & Ugaz, Z. (2016). *Efecto de Azospirillum, Azotobacter y Enterobacter spp. nativas con 50% de fertilizante químico en el desarrollo vegetativo y rendimiento de Zea mays L. "maíz" amarillo duro en Lambayeque, 2013*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- 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.
- Ramírez, L. & Ugaz, J. (2014). *Bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno en Oryza sativa L. "arroz", 2014*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Reyes, N. (2006). *Factibilidad de empresas productora y procesadora-exportadora de Espárrago verde*. (Tesis de Ingeniería). Pontificia Universidad Católica del Perú, Perú.
- Reyes, I., Álvarez, L., El-Ayoubi, H. & Valery, A. (2008). Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro*, 20 (1), 37-48.
- Rico, M. (2009). *Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género Azotobacter y Actinomicetos aislados de cultivos de Solanum tuberosum Linnaeus, 1753 (Papa) cultivados en zonas altoandinas del Perú*. (Tesis de Biología). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.
- Rodier, J. & Rodi, L. (2005). *Análisis de Aguas*. España: Ediciones Omega.
- Rodríguez, C. (2013). *Evaluación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal en tomate (Solanum lycopersicum) variedad Santa Clara, aislados de residuos lignocelulósicos de higuera (Ricinus communis)* (Tesis de Especialidad). Universidad Católica de Manizales, Colombia
- Rojas, L. (2013) *Potencial como promotoras del crecimiento de plantas de las especies de Azotobacter aisladas de rizósfera de malezas asociadas a Zea mays L. "maíz", en Lambayeque, 2013*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.

- Rojas, J., & Moreno, N. (2008). Producción y formulación de prototipos de un biofertilizante a partir de bacterias nativas asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa*). *Revista Colombiana de Biotecnología*, X (2), 50-62.
- Rojas, J. & Vásquez, J. (2014). *Determinación del potencial como promotoras del crecimiento de plantas de las especies de Azotobacter aisladas de las rizósfera de Zea mays L. "maíz" en Lambayeque, 2013*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Sachin, D. & Misra, P. (2009). Effect of *Azotobacter chroococcum* (PGPR) on the growth of Bamboo (*Bambusa bamboo*) and maize (*Zea mays*) plants. *Biofrontiers*, 1(1), 24 - 31.
- 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.
- Salhia, B. (2010). *The effect of Azotobacter chroococcum as nitrogen biofertilizer on the growth and yield of Cucumis sativus*. (Degree of Master). The Islamic University, Gaza.
- Sánchez, J., Lopez, I., Villegas, J. & Montaña, N. (2014). Respuesta del maíz (*Zea mays* L.) a la inoculación con *Azotobacter* sp. y *Burkholderia* sp. a dosis reducida de fertilizante nitrogenado. *Scientia Agropecuaria* 5, 17-23.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA. (2010). Uso de Fertilizantes. Recuperado de <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/fichasaapt/Uso%20de%20Fertilizantes.pdf>
- Valdivia, C. (2015). *Prueba de tetrazolio en semillas de espárrago (Asparagus officinalis L.)*. (Tesis de Ingeniería). Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú.
- Vallejo, M., Bonilla, C. & Castilla, L. (2008). Evaluación de la asociación bacterias fijadoras de nitrógeno-líneas interespecíficas de arroz-nitrógeno, en Typic haplustalf. Ibagué, Colombia. *Acta Agronomica*, 57 (1), 52-57.
- Vallejo, J., Peral, D., & Carrasco, M., (2009). Anotaciones al conocimiento etnobotánico y medicinal de los espárragos extremeños (Género *Asparagus* L.). *Medicina Naturista*, 3(1), 41 – 46.

- Vásquez, A., Díaz, N., Vásquez, O. & Vásquez, W. (2012). *Metodología de la Investigación Científica*. Lambayeque, Perú: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- Vásquez, P., Holguin, G., Puente, M., Lopez, A. & Bashan, Y. (2000). Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils*, 30(1), 460-468.
- Vélez, L. & Orellana, H. (2010). *Evaluación de cepas de Azotobacter spp. en el cultivo de lechuga (Lactuca sativa var. Green Salad Bowl)*. Tumbaco, Pichincha. (Tesis de Ingeniería). Universidad Central del Ecuador, Ecuador.
- Yasari, E., Azadgoleh, E., Pirdashti, H. & Mosafari, S. (2008). *Azotobacter* and *Azospirillum* inoculants and biofertilizers in Canola (*Brassica napus* L.) cultivation. *Asian Journal of Plant Sciences*, 7 (5), 490-494.
- Zahar, F., Marol, C., Berge, O., Rangel, J., Prosser, J., Balesdent, J., Heulin, T. & Achouak, W. (2008). Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 2, 1221 – 1230.

X. ANEXOS

ANEXO 1

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

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

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

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

Dónde:

n = Tamaño de la muestra

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

p = Prevalencia del género *Azotobacter* promotoras del crecimiento en plantas (0,90).

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

T = Error estimado (6%).

ANEXO 2

Medios de cultivo y soluciones para el aislamiento, identificación y mantenimiento de *Azotobacter* spp.

a. Medio de cultivo Ashby Sacarosa (en Escobar & Horna, 2011)

Componentes	gL ⁻¹
Sacarosa/Manitol/Benzoato	5,0
KH ₂ PO ₄	1,0
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,005
NaCl	0,2
CaCl ₂ . 7H ₂ O	0,2
Agar	15
Agua destilada	1000 mL

pH 7,0 (+/- 0,2). Adicionar el indicador azul de bromotimol al 0,5% en medio líquido.

b. Medio de cultivo LG (en Escobar & Horna, 2011)

El medio LG fue elaborado por Lipman (1904)

Componentes	gL ⁻¹
K ₂ HPO ₄	0,05
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,20
CaCl ₂	0,02
Fe Cl ₃ . 2H ₂ O	0,01
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,002
KH ₂ PO ₄	0,15
CaCO ₃	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.

c. Agar Nutritivo (en Escobar & Horna, 2011)

Componentes	gL ⁻¹
Peptona	5,0
Extracto de carne	3,0
Agar agar	15,0
Agua destilada csp	1000 mL

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

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

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

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

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

Solución de antimicótico (en Alvarado & Valderrama, 2014)

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

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

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

Disolver por calentamiento y ajustar a pH 7,3

ANEXO 3

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

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

- **Cloruro de potasio 2M**

Cloruro de potasio	149,12g
Agua destilada	1000mL

- **Solución alcohólica de fenol 10%**

Fenol concentrado	10mL
Alcohol 97°	90mL

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

Nitroprusiato de sodio	0,5g
Agua destilada	100mL

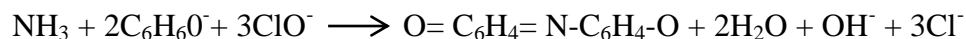
- **Solución oxidante**

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

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

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

Se basa en la formación de un color azul intenso de indofenol, que resulta de la reacción del ión amonio (NH_4) con los compuestos fenólicos, en presencia de un agente oxidante como el hipoclorito de sodio u o-fenol y un catalizador, principalmente nitroprusiato de sodio o de potasio. El mecanismo de la reacción depende de la luz presente, la temperatura ambiente, catalizadores y pH alcalino. Cuando se utiliza fenol o sodio la reacción puede ser representada de la siguiente manera:



b.2 Preparación de diluciones a partir de una solución madre de NH_4Cl

Para obtener la curva patrón se prepara una solución madre de 100ppm de NH_4Cl , para lo cual se pesa 0,1g de NH_4Cl y se disuelve en 1L de agua

bidestilada. Posteriormente, a partir de la solución madre se efectúan las siguientes diluciones:

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

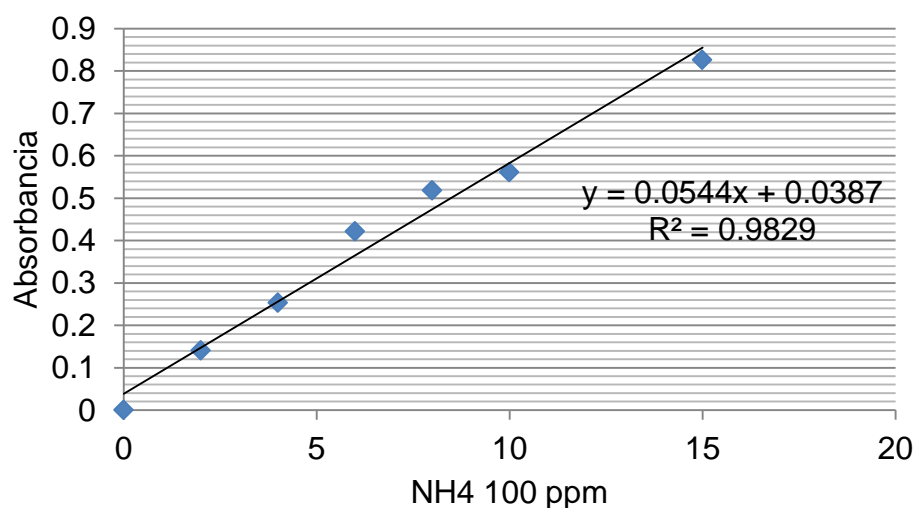
b.3 Procedimiento para la cuantificación de amonio por colorimetría

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

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

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

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



En la ecuación obtenida:

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

Donde:

y: representa la absorbancia captada (variable dependiente).

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

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

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

ANEXO 4

Cuantificación de fósforo solubilizado *in vitro*

a. Reactivos (en Rodier & Rodi, 2005)

- **Solución de ácido sulfúrico 5N**

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

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

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

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

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

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

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

b.1. Fundamento

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

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

b.2. Limpieza de los recipientes de vidrio

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

b.3. Preparación de la curva de calibración

Colocar en una serie de matraces aforados de 25 mL:

Número de matraces	T	I	II	III
Solución salina de fósforo de 2 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 mgL ⁻¹	0	0,1	0,2	0,5

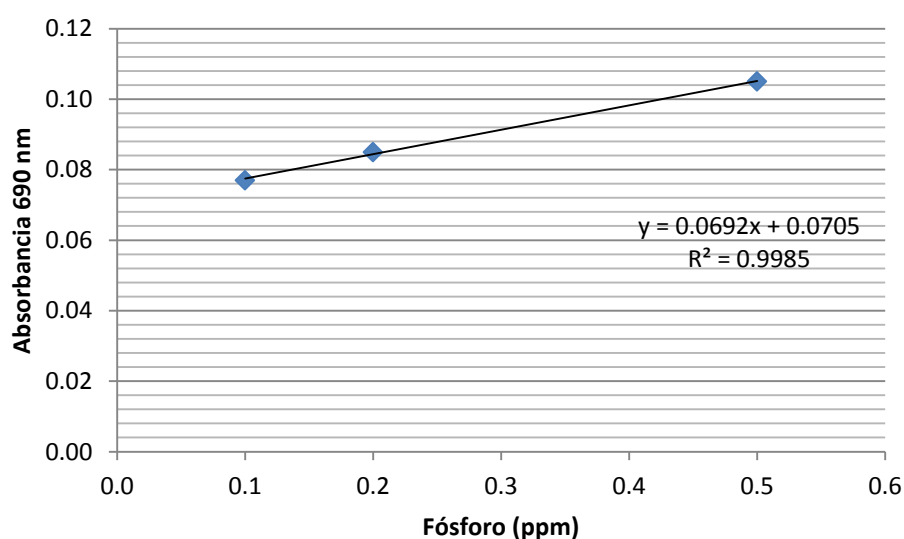
Esperar 20 minutos y efectuar las lecturas en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 690nm en cubetas de 10cm. Construir la curva de calibración. Los datos de la absorbancia corregida se analizan mediante regresión lineal con el programa Microsoft Excel 2007 para obtener la ecuación de la recta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

b.4. Procedimiento para cuantificar fosfatos en la muestra

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

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

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



En la ecuación obtenida:

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

Donde:

y: representa la absorbancia captada (variable dependiente)

x: cantidad de fósforo en ppm (variable independiente)

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

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

ANEXO 5

Procedimiento para elaborar la curva de calibración para cuantificar indoles

a. Rectivos

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

Componentes	g ^L ⁻¹
H ₂ SO ₄ concentrado	150 mL
Agua destilada	250 mL
FeCl ₃ 0,5M en Agua destilada	7,5 mL

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

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

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

b.1. Fundamento de la reacción de Salkowski

Mediante la reacción de Salkowski se detectan grupos indol presentes en el medio de cultivo y la concentración de indol es directamente proporcional a la intensidad de color rojo producido. A su vez, el cambio de color es el resultado de una reacción oxidativa con el ácido sulfúrico, donde por medio de una transaminación un grupo amino es sustituido por el cloro proveniente del FeCl₃, originando un compuesto visible de color rosado a rojo en el caso del indolacético. Otras coloraciones indican la presencia de productos intermedios de la síntesis del ácido indolacético, que pueden ser generados a partir del triptófano.

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

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

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

*1000 µL = 1 mL

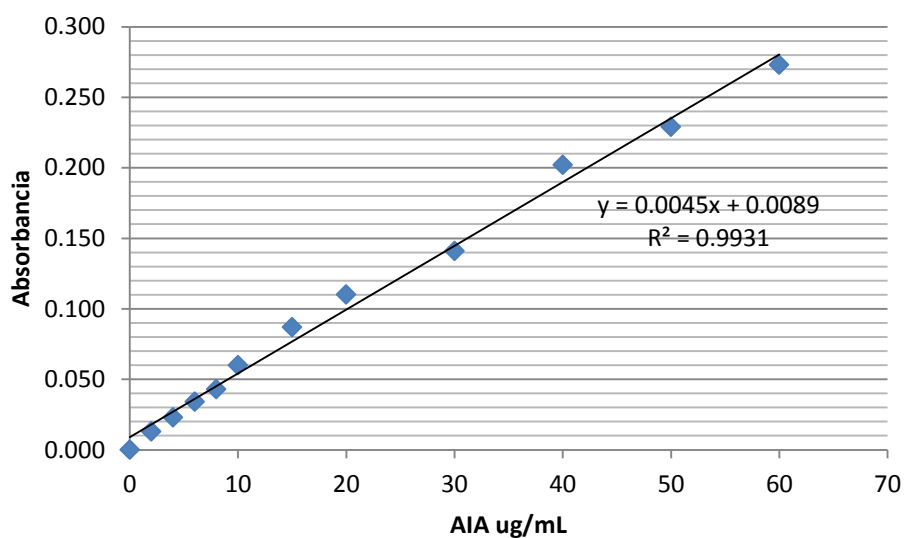
b.3. Procedimiento para la cuantificación de AIA por colorimetría

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

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

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

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



En la ecuación obtenida:

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

Donde:

y: representa la absorbancia captada (variable dependiente)

x: ácido indol acético en ppm (variable independiente)

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

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

ANEXO 6

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

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

Continuación...

Fecha	Temperatura mínima (°C)	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)
18/09/16	23	26	29
19/09/16	22	25	28
20/09/16	22	24	28
21/09/16	23	25	29
22/09/16	22	25	28
23/09/16	23	26	29
24/09/16	22	25	28
25/09/16	22	26	28
26/09/16	22	26	29
27/09/16	23	27	31
28/09/16	24	26	29
29/09/16	22	26	28
30/09/16	22	24	29
01/10/16	25	28	32
02/10/16	24	27	30
03/10/16	23	26	29
04/10/16	22	25	29
05/10/16	23	26	28
06/10/16	24	28	32
07/10/16	23	26	29
08/10/16	23	27	30
09/10/16	23	26	29
10/10/16	22	27	29
11/10/16	22	25	29
12/10/16	23	27	29
13/10/16	24	27	30
14/10/16	24	28	32
15/10/16	22	25	29
16/10/16	23	26	29
17/10/16	22	25	30

Anexo 7

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

Tests of Normality a los 30 días

Tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a		
	Statistic	df	Sig.
1	,276	3	,976
2	,328	3	,904
3	,232	3	,997
4	,219	3	,999
5	,219	3	,999
6	,242	3	,995
7	,257	3	,989
8	,236	3	,996
9	,338	3	,882
10	,232	3	,997

Prueba de homogeneidad de varianzas

ALTURA A LOS 30 DÍAS

Estadístico de Levene	g/1	g/2	Sig.
1,804	9	20	,130

Anova de un Factor

ALTURA A LOS 30 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	220,672	9	24,519	,369	,937
Intra-grupos	1330,027	20	66,501		
Total	1555,699	29			

Anexo 8

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

Tests of Normality a los 30 días

Tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a		
	Statistic	df	Sig.
1	,175	3	1,000
2	,175	3	1,000
3	,219	3	,999
4	,253	3	,991
5	,219	3	,999
6	,337	3	,886
7	,328	3	,904
8	,328	3	,904
9	,175	3	1,000
10	,253	3	,991

Prueba de homogeneidad de varianzas

NÚMERO DE TALLOS A LOS 30 DÍAS

Estadístico de Levene	g/1	g/2	Sig.
1,887	9	20	,114

Anova de un Factor

NÚMERO DE TALLOS A LOS 30 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	29,367	9	3,263	,616	,770
Intra-grupos	106,000	20	5,300		
Total	135,367	29			

Anexo 9

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

Tests of Normality a los 45 días

Tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a		
	Statistic	df	Sig.
1	,314	3	,929
2	,232	3	,997
3	,299	3	,952
4	,175	3	1,000
5	,253	3	,991
6	,204	3	1,000
7	,231	3	,997
8	,343	3	,871
9	,178	3	1,000
10	,321	3	,916

Prueba de homogeneidad de varianzas

ALTURA A LOS 45 DÍAS

Estadístico de Levene	g/1	g/2	Sig.
,912	9	20	,534

Anova de un Factor

ALTURA A LOS 45 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	587,967	9	65,630	,939	,514
Intra-grupos	1391,000	20	69,550		
Total	1978,967	29			

Anexo 10

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

Tests of Normality a los 45 días

Tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a		
	Statistic	df	Sig.
1	,175	3	1,000
2	,253	3	,991
3	,292	3	,960
4	,175	3	1,000
5	,314	3	,929
6	,276	3	,976
7	,385	3	,766
8	,328	3	,904
9	,253	3	,991
10	,385	3	,766

Prueba de homogeneidad de varianzas

NÚMERO DE TALLOS A LOS 45 DÍAS

Estadístico de Levene	g/1	g/2	Sig.
,993	9	20	,253

Anova de un Factor

NÚMERO DE TALLOS A LOS 45 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	40,667	9	4,519	,717	,688
Intra-grupos	126,000	20	6,300		
Total	166,667	29			

Anexo 11

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

Tests of Normality a los 60 días

Tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a		
	Statistic	df	Sig.
1	,191	3	1,000
2	,253	3	,991
3	,343	3	,871
4	,253	3	,991
5	,175	3	1,000
6	,229	3	,997
7	,191	3	1,000
8	,200	3	1,000
9	,269	3	,982
10	,253	3	,991

Prueba de homogeneidad de varianzas

ALTURA A LOS 60 DÍAS

Estadístico de Levene	g/1	g/2	Sig.
1,189	9	20	,354

Anova de un Factor

ALTURA A LOS 60 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1270,967	9	141,219	3,915	,005
Intra-grupos	721,333	20	36,067		
Total	1992,300	29			

Anexo 12

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

Tests of Normality a los 60 días

Tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a		
	Statistic	df	Sig.
1	,385	3	,766
2	,253	3	,991
3	,276	3	,976
4	,175	3	1,000
5	,292	3	,960
6	,337	3	,886
7	,314	3	,929
8	,385	3	,766
9	,175	3	1,000
10	,292	3	,960

Prueba de homogeneidad de varianzas

NÚMERO DE TALLOS A LOS 60 DÍAS

Estadístico de Levene	g/1	g/2	Sig.
,884	9	20	,337

Anova de un Factor

NÚMERO DE TALLOS A LOS 60 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	52,033	9	5,781	1,141	,381
Intra-grupos	101,333	20	5,067		
Total	153,366	29			

