



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



**Enterobacterias aisladas de rizoplasma y rizósfera y
su potencial como promotoras de crecimiento de
Asparagus officinalis L.**

TESIS

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

PRESENTADA POR:

Br. Juan Virgilio Cornetero Bonilla

Br. Joan Joseph Segura Caro

LAMBAYEQUE, PERÚ

2017

**Enterobacterias aisladas de rizoplano y rizósfera y
su potencial como promotoras de crecimiento de
Asparagus officinalis L.**

TESIS

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

APROBADA POR:

Dr. Cesar Estela Campos

PRESIDENTE

MSc. Clara Cueva Castillo

SECRETARIA

Dra. Gianina Llontop Barandiaran

VOCAL

Dra. Carmen Carreño Farfán

PATROCINADORA

LAMBAYEQUE, PERÚ

2017

AGRADECIMIENTOS

Que estas cortas líneas sirvan para expresar el más profundo agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda desinteresada han colaborado en la elaboración del presente trabajo.

A nuestra asesora la Dr. Carmen Rosa Carreño Farfán expresarle nuestro mas sincero y profundo agradecimiento por hacer posible la realización de este estudio, transmitiendonos su conocimiento, brindándonos su paciencia, tiempo y dedicación para que esto saliera de manera exitosa.

Y un merecido reconocimiento al grupo de amigos, por confiar y creer en nosotros, por ser parte de esta etapa universitaria y haber hecho de este trayecto, una vivencia que nunca se olvidara

A nuestra amiga Marleny del Socorro Mija Huaman que con ese incondicional apoyo, estuvo presente en la realización de la presente tesis.

DEDICATORIA

*A Dios por siempre acompañarme en cada paso que doy y
nunca abandonarme.*

*A mi mamá Rosana Caro por apoyarme en todo, por haberme
dado la fuerza para nunca rendirme, por ser la mejor mamá
del mundo, te amo!, a mi papá José Segura por sus palabras
de aliento en cada momento.*

*A mi abuelo Serrano por qué donde estés siempre estás allí
conmigo, a mis hermanos José y Juan Segura por alentarme a
seguir mis sueños.*

*A Jassmin Allende por su amor incondicional, por alentarme
en cada paso que doy, gracias amor!.*

*A mis mejores amigos Juan Virgilio, Jorge Anibal, Junior
Alexander, Percy Omar, Lucho y Dolmy Gianfranco, gracias
por todos los momentos de aventura universitaria gracias por
su apoyo muchachos.*

Que la fuerza nos acompañe siempre!!

JOAN JOSEPH SEGURA CARO

DEDICATORIA

En primera instancia a Dios, por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera y brindarme una vida de aprendizaje y experiencias.

A mi madre Martha Yolanda Bonilla Quevedo por ser mi fortaleza en los momentos difíciles; a mi padre Juan José Cornetero Huamán por ser el apoyo durante mi educación universitaria y por enseñarme a seguir aprendiendo todos los días sin importar las circunstancias y el tiempo.

A mis hermanos Jahir, Quesia y Tirza por brindarme su apoyo, cariño y fortaleza para seguir adelante.

A mis familiares por ser parte de este sueño que hoy se hace realidad, gracias.

A mis grandes amigos, Joseph Segura, Alexander Calvay, Jose Chugna, Armando, Lucho, Dolmy, Javier, a Belgica y entre otros, que hicieron que esta etapa universitaria sea un camino de experiencias que nunca olvidaré. Gracias por todo.

Que la amistad perdure siempre, en el infinito y más allá.

JUAN VIRGILIO CORNETERO BONILLA

RESUMEN

En el rizoplasma y rizósfera de *Asparagus officinalis* L. “espárrago” se aislaron enterobacterias, con el objetivo de determinar su potencial como promotoras de crecimiento en plantas. Las bacterias se aislaron en agar Mac Conkey y las colonias desarrolladas se identificaron fenotípicamente. Se cuantificó el nitrógeno fijado como amonio, fósforo soluble producto de la solubilización de fosfato tricálcico e indoles producidos por las bacterias *in vitro*. Los ocho cultivos de enterobacterias 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 aislaron e identificaron enterobacterias, identificándose *Enterobacter* (76,96%), *Serratia* (9,95%), *Klebsiella* (6,81%) y *Citrobacter* (6,28%). Las enterobacterias fijaron nitrógeno, solubilizaron fosfato tricálcico y produjeron indoles *in vitro*, cuantificándose 5,152 a 27,542 ppm de amonio; 1,293 a 17,189 ppm de fósforo soluble y 0,244 a 41,802 ppm de indoles. Los ocho cultivos con los mayores valores demostraron su potencial como promotores de crecimiento en plantas, incrementando la altura (IE= 3,9 a 55,4%) y el número de tallos (IE= 16,5 a 300%) de plantas de espárrago, en condiciones de invernadero.

Palabras clave: *Asparagus officinalis*, enterobacterias, promotores de crecimiento.

ABSTRACT

In the rhizosphere and rhizosphere of *Asparagus officinalis* L. "asparagus", enterobacteria were isolated, in order to determine their potential as growth promoters in plants. Bacteria were isolated in MacConkey agar and the colonies were phenotypically identified. The nitrogen fixed as ammonium, soluble phosphorus product of the solubilization of tricalcium phosphate and indole produced by the bacteria in vitro was quantified. The eight cultures of enterobacteria that reached the highest values were inoculated by spraying on crowns of asparagus UC-157 F2 and the effect on height and number of stems for 60 days in a greenhouse was determined. Enterobacteria (76.96%), *Serratia* (9.95%), *Klebsiella* (6.81%) and *Citrobacter* (6.28%) were identified and identified. Enterobacteria fixed nitrogen, solubilized tricalcium phosphate and produced indium in vitro, quantifying 5,152 to 27,542 ppm of ammonia; 1.293 to 17.189 ppm of soluble phosphorus and 0.244 to 41.802 ppm of indoles. The eight crops with the highest values demonstrated their potential as growth promoters in plants, increasing the height (IE = 3.9 to 55.4%) and the number of stems (IE = 16.5 to 300%) of asparagus plants, under greenhouse conditions.

Key words: *Asparagus officinalis*, enterobacteria, growth promoters.

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.....	10
III. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1 Material.....	12
3.1.1 Muestra biológica.....	12
3.1.2 Población y muestra	12
3.2 Métodos.....	12
3.2.1 Variable de la fase descriptiva.....	12
3.2.2 Variables de la fase experimental	12
3.2.3 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis	13
3.2.4 Lugar de muestreo	13
3.2.5 Obtención de muestras	16
3.2.6 Aislamiento e identificación fenotípica de enterobacterias	16
3.2.7 Mantenimiento de cultivos de enterobacterias.....	20
3.2.8 Cuantificación de nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos	20
3.2.9 Selección de enterobacterias	24
3.2.10 Efecto de enterobacterias en plantas de espárrago	24
3.2.11 Análisis estadísticos de los datos	30
IV RESULTADOS.....	31
4.1 Enterobacterias aisladas e identificadas en el rizoplaneo y rizósfera de <i>Asparagus officinalis</i> L.	31
4.2 Nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos por enterobacterias	35
4.3 Cultivos de enterobacterias seleccionados.....	35
4.4 Efecto de enterobacterias en la altura y número de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L.	35
V. DISCUSIÓN	63

VI. CONCLUSIONES	68
VII. RECOMENDACIONES	69
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
X. ANEXOS	79

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.....	15
Tabla 2.	Análisis físico – químico de suelo rizosferico de <i>Asparagus officinalis</i> L. en Viru, La Libetad, 2016	17
Tabla 3.	Características diferenciales de enterobacterias.....	33
Tabla 4.	Frecuencia de géneros identificados en enterobacterias aisladas de rizoplano y rizosféra de <i>Asparagus officinalis</i> L.....	34
Tabla 5.	Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por enterobacterias aisladas de rizoplano y rizosféra de <i>Asparagus officinalis</i> L.	37
Tabla 6.	Fósforo cuantificado (ppm) en la solubilización por enterobacterias aisladas de rizoplano y rizosféra de <i>Asparagus officinalis</i> L.....	41
Tabla 7.	Indoles producidos (ppm) por enterobacterias aisladas de rizoplano y rizosféra de <i>Asparagus officinalis</i> L.	44
Tabla 8.	Valores (ppm) de amonio, fósforo soluble e indoles correspondientes a cultivos de enterobacterias seleccionadas	46
Tabla 9.	Índices de efectividad (%) de las enterobacterias en la altura de <i>Asparagus officinalis</i> L. a los 30, 45 y 60 días	50
Tabla 10.	Prueba de Tukey de la altura de plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. a los 30, 45 y 60 días después de la inoculación de enterobacterias.....	50
Tabla 11.	Índices de efectividad (%) de enterobacterias en el número de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L. a los 30, 45 y 60 días	51
Tabla 12	Prueba de Tukey del número de tallos de plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. a los 30, 45 y 60 días después de la inoculación de enterobacterias.....	52

Índice de figuras

Figura 1.	Diseño completamente aleatorio para determinar el efecto de enterobacterias en <i>Asparagus officinalis</i> L.....	14
Figura 2.	Ubicación de la provincia de Virú, región La Libertad, abril 2016 (https://www.google.com.pe/maps/place/Vir%C3%BA/@-8.5664616,78.794859,10z/data=!4m5!3m4!1s0x91ac59407c7b0391:0x6c172095672753ce!8m2!3d-8.5528417!4d-78.6254767).....	15
Figura 3.	Raíces con suelo rizosférico de <i>Asparagus officinalis</i> L. deshidratadas.....	17
Figura 4.	Suspensión de raíces con suelo rizosférico de <i>Asparagus officinalis</i> L. en solución salina esterilizada.....	18
Figura 5.	Placas Petri con agar Mac Conkey para el aislamiento de enterobacterias	18
Figura 6.	Siembra en agar Mac Conkey mediante la técnica de agotamiento y estría.	19
Figura 7.	Enterobacterias desarrolladas en agar Mac Conkey.....	19
Figura 8.	Caldo extracto de suelo cultivado con enterobacterias.....	21
Figura 9.	Caldo National Botanical Research Institute's phosphate cultivado con enterobacterias.	23
Figura 10.	Caldo tripticasa soya suplementado con triptófano cultivado con enterobacterias	23
Figura 11.	Coronas de <i>Asparagus officinalis</i> L.	25
Figura 12.	Inmersión de coronas de <i>Asparagus officinalis</i> L. en solución de fungicida.	27
Figura 13.	Inoculo de enterobacterias solución salina esterilizada	27
Figura 14.	Inoculo bacteriano asperjado en coronas de <i>Asparagus officinalis</i> L.	28
Figura 15.	Medición de altura de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L	28

Figura 16.	Conteo del número de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L.	29
Figura 17.	Colonias de bacterias desarrolladas en agar Mac Conkey	32
Figura 18.	Cultivos puros de enterobacterias en agar tripticasa soya.....	32
Figura 19.	Frecuencia de muestras de rizoplano y rizósfera de <i>Asparagus officinalis</i> L. positivas al aislamiento de enterobacterias en agar Mac Conkey	33
Figura 20.	Porcentaje de enterobacterias aisladas de <i>Asparagus officinalis</i> L. que fijaron nitrógeno <i>in vitro</i>	36
Figura 21.	Coloración observada en la cuantificación de amonio	36
Figura 22.	Porcentaje de enterobacterias aisladas de <i>Asparagus officinalis</i> L. que solubilizaron fosfato <i>in vitro</i>	40
Figura 23.	Coloración observada en la cuantificación de fósforo soluble.....	40
Figura 24.	Porcentaje de enterobacterias aisladas de <i>Asparagus officinalis</i> L. que produjeron indoles <i>in vitro</i>	43
Figura 25.	Coloración observada en la cuantificación de indoles	43
Figura 26.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 30 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>Serratia</i> sp.5.14, d) <i>Enterobacter</i> sp.71.159	48
Figura 27.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 30 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>Serratia</i> sp.24.59, d) <i>Enterobacter</i> sp.35.88	48
Figura 28.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 30 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>Enterobacter</i> sp.33.84, d) <i>Klebsiella</i> sp.34.86	49
Figura 29.	Altura (cm) de <i>Asparagus officinalis</i> L., 30 días después de la inoculación de enterobacterias.....	49

Figura 30.	Número de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L., 30 días después de la inoculación de enterobacterias.....	51
Figura 31.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>Serratia</i> sp.24.59.	52
Figura 32.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>Enterobacter</i> sp.33.84.....	53
Figura 33.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>Serratia</i> sp.5.14.....	53
Figura 34.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>Enterobacter</i> sp.35.88.....	54
Figura 35.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>Enterobacter</i> sp.71.159.....	54
Figura 36.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>Enterobacter</i> sp.26.67.....	55
Figura 37.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>Klebsiella</i> sp.34.86.....	55
Figura 38.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>Klebsiella</i> sp.30.74.....	56
Figura 39.	Altura (cm) de <i>Asparagus officinalis</i> L., 45 días después de la inoculación de enterobacterias	56
Figura 40.	Número de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L., 45 días después de la inoculación de enterobacterias	57

Figura 41.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 60 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>Serratia</i> sp.24.59.....	59
Figura 42.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 60 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>Enterobacter</i> sp.33.84.....	59
Figura 43.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 60 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>Serratia</i> sp.5.14.....	60
Figura 44.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 60 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>Enterobacter</i> sp.35.88.....	60
Figura 45.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 60 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>Enterobacter</i> sp.30.74.....	61
Figura 46.	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>Enterobacter</i> sp.26.67.....	61
Figura 47.	Altura (cm) de <i>Asparagus officinalis</i> L., 60 días después de la inoculación de <i>Azotobacter</i> spp	62
Figura 48.	Número de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L., 60 días después de la inoculación de <i>Azotobacter</i> sp.....	62

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de *Asparagus officinalis* L “espárrago” es económicamente muy importante (Borrego, 2014), destacando como productores las regiones La Libertad, Ica, Ancash, Lima y Lambayeque (MINAGRI, 2014). Al igual que en otros países, el rendimiento del espárrago está muy relacionado con la aplicación de insumos químicos como los fertilizantes químicos que reponen los nutrientes removidos del suelo a través de la cosecha de los cultivos, posibilitan el uso de variedades de alto rendimiento y contribuyen significativamente a la productividad agrícola (Pelletier et al., 2011; Ramírez & Ugaz, 2014); sin embargo, la necesidad por los fertilizantes se incrementa día a día, proyectándose para el 2020 un requerimiento de 208 millones de toneladas, de las que 115,3 millones corresponderán a la urea (Aguado, 2012).

Los precios de los fertilizantes químicos se incrementan constantemente debido a la reducción de la oferta de petróleo, por el agotamiento de los yacimientos. Asimismo, la eficiencia de recuperación o porcentaje del nutriente aplicado que es absorbido por la planta es en promedio 50, 30 y 60% por el N, P, K (SAGARPA, 2010), evidenciándose pérdidas significativas, que incrementan los costos de producción agrícola y contaminan el ambiente (Pedraza et al., 2010; Salhia, 2010; Aguado, 2012).

Las rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas (Plant growth promoting rhizobacteria, PGPR), entre las que se encuentran las enterobacterias

(Morales et al., 2011; Sánchez et al., 2012), constituyen una alternativa para la fertilización de los cultivos como el espárrago, porque sintetizan reguladores del crecimiento auxinas, giberelinas, citoquininas (Koo & Cho, 2009; Schoebitz et al., 2009) solubilizan fosfatos (Cordero et al., 2008; Farro & Graus, 2013; Sánchez et al., 2012) y fijan nitrógeno (Sánchez et al., 2012; Schoebitz et al., 2009; Rani et al., 2011), además de reducir el ataque de microorganismos patógenos (Farro & Graus, 2013).

Las enterobacterias son bacilos Gram negativos presentes en la mayoría de suelos y aguas, crecen rápidamente en los medios de cultivo, en diferentes sustratos de bajo costo (Farro & Graus, 2013) y tienen la capacidad de promover el crecimiento de las plantas, incrementando el rendimiento agrícola (Morales et al., 2011), por lo que pueden constituir biofertilizantes para el cultivo de espárrago; no obstante, en la zona esparraguera de Trujillo, estas bacterias no se han aislado para caracterizarlas y determinar su potencial.

La presente investigación permitirá identificar enterobacterias, 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. En este, contexto, se planteó la siguiente investigación, cuyo problema fue: ¿Cuáles son las características de las enterobacterias aisladas del rizoplaneo y rizósfera de espárrago y cuál es su potencial como promotoras de crecimiento en plantas?

El objetivo general fue: Aislar e identificar enterobacterias en el rizoplaneo y rizósfera de espárrago y determinar su potencial como promotoras de crecimiento en plantas. Los objetivos específicos fueron: Aislar enterobacterias en el rizoplaneo y rizósfera de plantas de espárrago, identificar fenotípicamente el género de las enterobacterias, cuantificar el nitrógeno fijado, fosfato solubilizado y los indoles producidos *in vitro* por las bacterias, seleccionar los ocho cultivos de enterobacterias con los mayores valores en el nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos y determinar el efecto de las enterobacterias seleccionadas en la altura y número de tallos de plantas de espárrago. La hipótesis planteada

fue: Las enterobacterias aisladas de rizoplaneo y rizósfera de espárrago fijan nitrógeno, solubilizan fosfato, producen indoles e incrementan la altura y número de tallos de las plantas de espárrago.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

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

La inoculación de enterobacterias en los diferentes cultivos agrícolas se relaciona con incremento en la germinación (Ogho & Okonkwo, 2012; Rani et al., 2011; Torres et al., 2003), número de pelos absorbentes, (Schoebitz et al., 2009), número de raíces laterales (Torres et al., 2003), altura (Rani et al., 2011; Schoebitz, 2006; Schoebitz et al., 2009), biomasa radical (Koo & Cho, 2009; Criollo et al., 2012; Ogho & Okonkwo, 2012; Sánchez et al., 2012), biomasa aérea (Schoebitz et al., 2009; Criollo et al., 2012; Sánchez et al., 2012) y rendimiento (Morales et al., 2011; Sánchez et al., 2012), así como también, aumento en la concentración de fósforo (Cordero et al., 2008) y nitrógeno (Beracochea, 2011) en los tejidos vegetales. En maíz, se ha reportado incremento en el desarrollo vegetativo y rendimiento (Beracochea, 2011; Morales et al., 2011; Ogho & Okonkwo, 2012), en condiciones de campo.

Con el objetivo de obtener PGPR se colectaron muestras de suelo rizosférico de *Oryza sativa* L. “arroz”, aislándose 69 bacterias, entre las que 51 % fue identificado como *Pseudomonas*, con las especies *P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y *P. citchori*; 26 % se identificó como perteneciente al género *Azotobacter*, especies *vinelandii*, *chroococcum* y *nigrificans*. A su vez, 21 % correspondió a las enterobacterias *Klebsiella*, *Serratia* y *Enterobacter* sp., las cuales sintetizaron ácido indolacético, destacando *Klebsiella* sp. con 15,2 mg L⁻¹, después de 60 horas. También, se detectó la producción de sideróforos por *Pseudomonas* sp. y se observó la inhibición de hasta 100 % del crecimiento de *Phytophthora infestans* con *P. putida* y hasta 78 % con *P. fluorescens*. Las enterobacterias investigadas presentaron potencial como PGPR (Torres et al., 2000).

En condiciones de laboratorio se investigó el efecto de 30 aislados de bacterias en la germinación y crecimiento de *Lactuca sativa* L. “lechuga” variedad Longifolia. En la germinación se encontraron diferencias altamente significativas en los tratamientos, alcanzándose el mayor valor con *Hafnia alvei* P-3, correspondiente a 36,5 % de incremento respecto al testigo. Por su parte, el crecimiento de las plantas fue promovido por todas las bacterias investigadas, con excepción de *H. alvei* P-25, cuyo efecto fue similar al testigo. En cuanto a la concentración de fósforo en el follaje, se alcanzaron valores de 0,25 - 0,44 %, sin diferencias significativas entre los tratamientos, no obstante numéricamente los mayores valores correspondieron a *H. alvei* P-25, *Enterobacter cloacae* S6 y *Azospirillum* sp. 187 (Díaz et al., 2001).

Las bacterias de los géneros *Azospirillum* y *Klebsiella* son fijadoras de nitrógeno de vida libre, por lo que se realizaron aislamientos de la rizósfera, rizoplaneo, raíz, tallo y semillas de maíz híbrido H-30, maíz criollo Chalqueño y maíz silvestre (teocintle) raza Chalco. En los medios de cultivo Nfb semigelificado-Rojo Congo y Mac Conkey se obtuvieron 43 aislados de *Azospirillum* spp. y 50 de *Klebsiella* spp. Todas las bacterias sintetizaron ácido indolacético y presentaron actividad de la enzima nitrogenasa mayor de

10 nanomoles de etileno por hora por mililitro. A su vez, *Azospirillum* spp. AT3 y AT6 y *Klebsiella* spp. KT2, 10-2 y 12b presentaron antibiosis intragenérica. Por su parte, el 20 y 90 % de *Azospirillum* y *Klebsiella* spp., respectivamente sintetizaron sideróforos. La presencia de *Azospirillum* y *Klebsiella* en el suelo y en el tejido interno de las plantas, sugiere que estas bacterias diazótrofes endófitas son colonizadoras, por lo que son potencialmente importantes para especies anuales como el maíz y teocintle (Carcaño et al., 2006).

Los sistemas pastoriles en su mayoría se basan en la utilización de *Lolium perenne* “gras”, importante planta forrajera para la alimentación animal. Para incrementar su calidad nutricional se debe aumentar el contenido del nitrógeno, para lo cual las PGPR son una alternativa. Con este fin se aislaron bacterias de la rizósfera, con las que se investigó la fijación de nitrógeno y se seleccionaron los aislados C1 y C2 porque alcanzaron 2506,73 y 2538,86 nmol C₂H₄mL⁻¹ a las 24 horas, respectivamente. Estas bacterias también sintetizaron hasta 30 ppm de ácido indolacético, siendo identificadas con el sistema Api 20E como *Serratia liquefaciens*, con 82,5 % de similitud y mediante la secuenciación del ADNr 16S como *Pantoea agglomerans*, con 98,5 % de semejanza. A continuación, fueron inoculadas en semillas pre-germinadas de *L. perenne* y después de 50 días incrementaron en 30% el peso seco de los brotes, demostrándose que las enterobacterias pueden incrementar el desarrollo vegetativo del gras (Schoebitz et al., 2009).

La producción de sideróforos por las bacterias posibilita el control de fitopatógenos. Con el objetivo de obtener bacterias productoras de sideróforos se realizaron aislamientos de muestras de rizósfera de alfalfa, identificándose *Enterobacter* sp. tanto por sus características morfológicas como bioquímicas, así como también por el análisis del ADNr 16S. En estudios posteriores la producción de sideróforos se realizó en medio ácido succínico modificado, alcanzando el valor máximo a las 72 horas, en la fase estacionaria. La absorbancia máxima del sobrenadante libre de células se alcanzó a 210 nanómetros, detectándose sideróforos del tipo catecol en la prueba de

Arnow y en el análisis de cromatografía en capa. Se concluyó que, *Enterobacter* sp., es una bacteria promisorio para el control biológico de fitopatógenos (Bharucha et al., 2011).

Con el objetivo de obtener rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas, se recolectaron muestras de suelo rizosférico de *Cajanus cajan* “frijol de palo”, compost y vermicompost. Se seleccionaron 35 aislados para su caracterización, determinando que 16 sintetizaron ácido indolacético, la enzima 1-aminociclo propano-1-carboxilato desaminasa (ACC) y solubilizaron fosfatos. Las diez bacterias más eficientes se inocularon en semillas de frijol de palo previamente esterilizadas con bicloruro de mercurio. Las plántulas se trasplantaron a suelo esterilizado y después de 21 días con las bacterias se alcanzó hasta 92,59% de germinación; 13,80 cm en la altura de plántula; 5,59 cm en la longitud de la raíz y 6,80 mg en el peso promedio de las plantas secas, frente a 82,10%; 10,30 cm; 4,10 cm y 5,60 mg, respectivamente en el testigo. Con base a la secuencia del ARN 16S, las dos bacterias con los mayores valores se identificaron como *Enterobacter cancerogenus* y *Bacillus cereus*, capaces de promover el crecimiento de frijol de palo (Rani et al., 2011).

El potencial como promotor de crecimiento en plantas se investigó en enterobacterias aisladas de la rizósfera de malezas asociadas a *Zea mays* L. “maíz”. Las muestras de suelo se diluyeron en solución salina esterilizada, NaCl 0,87% p/v, se sembraron en agar Mac Conkey y se incubaron a 30°C por 48 horas. Se obtuvieron 338 cultivos puros de bacterias, entre los cuales el 66% fue identificado como enterobacterias de los géneros *Pantoea* (66%) *Serratia* (18%), *Hafnia* (5%), *Klebsiella* (5%), *Citrobacter* (2%) y *Enterobacter* (1%). Se cuantificó hasta 57,5 ppm de ácido indolacético; 31,7 ppm de nitrógeno fijado como amonio; 5,52 ppm de fósforo soluble y el 71% de las enterobacterias incrementó la emergencia de maíz amarillo. Se demostró la posibilidad de utilizar enterobacterias como promotoras de crecimiento en maíz (Farro & Graus, 2013).

Los microorganismos asociados a la rizósfera de plantas de *Vanilla planifolia* “vainilla” se identificaron molecularmente, con la perspectiva de utilizarlos como

biofertilizantes. Se colectaron muestras de rizósfera y se sembraron en medios de cultivo selectivos para aislar microorganismos celulíticos (CEL), proteolíticos-amonificantes (PROT), fijadores de nitrógeno (FBN) y solubilizadores de fosfato inorgánico (PSM). Se obtuvieron 109 aislados: 25 FBN, 6 FIT, 20 PSM, 30 PROT y 28 CEL. Se seleccionaron 54 morfotipos para su identificación molecular. El análisis filogenético con secuencias de referencia identificó las bacterias Gram positivas *Bacillus*, *Streptomyces*, *Curtobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*. También se identificaron las Gram negativas *Pseudomonas*, *Chromobacterium*, *Burkholderia* y las enterobacterias *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*. Se demostró la variabilidad de bacterias que potencialmente podrían investigarse como PGPR (Álvarez et al., 2013).

Las bacterias solubilizadoras de fosfatos aisladas de la rizósfera de pasturas, maní y pimienta se caracterizaron y se investigó su efecto como promotoras de crecimiento en maíz. Las bacterias se aislaron por la técnica de dilución en placas de Petri con medio de cultivo NBRIP y se determinó la eficiencia de solubilización de fosfato (ES) expresada por la relación entre el diámetro total y el diámetro de la colonia. La caracterización morfológica y bioquímica de las bacterias aisladas identificó los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y las enterobacterias *Serratia* y *Proteus*. Las bacterias aisladas que presentaron mayor eficiencia de solubilización fueron *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*, las mismas que en el ensayo de promoción del crecimiento, incrementaron la altura y biomasa aérea y radicular, por lo que podrían ser utilizadas como estimuladoras del crecimiento vegetal (García et al., 2015).

2.2 Base teórica

La agricultura intensiva moderna se caracteriza por los sistemas tecnológicos que utilizan plantas muy especializadas y una alta concentración de insumos como fertilizantes, fungicidas, herbicidas, antibióticos, riego, maquinaria agrícola y energía fósil. La destructiva mecanización, el monocultivo, la concentración de la tierra en grandes empresas y la producción para la explotación también son características de la "Agricultura moderna"; sin embargo, desde una visión

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

La agricultura orgánica propone para el crecimiento y desarrollo de los cultivos la utilización de opciones tecnológicas con las que se puedan 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 este contexto, se propone la utilización de las bacterias promotoras de crecimiento en plantas (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR). En la actualidad, este concepto se usa para las bacterias que cumplen con dos de los tres criterios establecidos, como son colonización agresiva, estimulación del crecimiento vegetal y biocontrol (Bhattacharyya & Jha, 2012).

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

Bacterias como *Azospirillum*, *Herbasprillum*, *Enterobacter* y *Azotobacter* promueven el crecimiento de las plantas, mayoritariamente a través de mecanismos directos, así como *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Streptomyces* lo hacen a través de mecanismos indirectos; no obstante, todas las PGPR presentan un

mayor o menor grado de efectividad en ambos mecanismos (Doubou et al., 2002; Kloepper, 2003; Idriss et al., 2004; 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 "hipótesis aditiva", según la cual más de un mecanismo están involucrados en la asociación planta-rizobacteria, los mismos que operan simultáneamente o en asociación. La suma de los diferentes mecanismos refleja los cambios observados en el crecimiento de las plantas, cuando son cultivadas bajo condiciones ambientales propicias (Bashan et al., 1996).

2.2.1 *Asparagus officinalis* L.

El espárrago es originario de la región oriental del Mediterráneo y Asia menor y crece en climas templados y subtropicales, siendo la única especie de su género cultivada como hortaliza (Asprelli et al., 2005). El espárrago es una planta herbácea perenne, formada por tallos aéreos ramificados y una parte subterránea denominada comúnmente "garra" constituida por un tallo subterráneo, corona o rizoma a partir de la cual emergen yemas que originarán los turiones y las raíces principales o de almacenamiento (Borrego, 2014). Éstas son cilíndricas, gruesas y carnosas y acumulan reserva para la producción de turiones. Los turiones son la parte comestible y comercializable y cuando se dejan vegetar son los futuros tallos ramificados. Las plantas son dioicas. Las masculinas son más productivas en turiones y más precoces y longevas que las femeninas (Kirschenbilder et al., 2015).

El ciclo vital de las plantas de espárrago verde se divide en cuatro fases: de crecimiento temprano, los primeros 2 años desde la plantación, caracterizados por un fuerte desarrollo vegetativo; de productividad creciente (3-4 años) que corresponde a los 2 primeros años de cosecha; de productividad estable (4-10 años) y finalmente la de productividad decreciente (más de 10 años) fase de la plantación más crítica (Kirschenbilder et al., 2015). El aumento de temperatura propicia la emergencia de brotes jóvenes llamados turiones a partir del rizoma. Después de la cosecha, los turiones se desarrollan y forman el follaje o helecho (Asprelli et al., 2005).

La producción de espárrago constituye una alternativa de alto valor agregado. Es un cultivo perenne que tiene un periodo promedio de cosecha de 10 años y llega al máximo de producción a los 4-5 años, tiempo en el que es necesario considerar todos los aspectos tendientes al logro de un óptimo rendimiento productivo y turiones de elevada calidad. Para este cultivo se han difundido dos sistemas: el tradicional de arañas (STA) y el moderno de plántulas con cepellón (SMP). En el primer caso se requiere 1 año para la producción de las coronas. El segundo sistema permite optimizar el empleo del espacio disponible para el almácigo y realizar una mejor planificación de las plantaciones definitivas (Castagnino et al., 2011).

La producción nacional de espárrago está centralizada en la costa, siendo La Libertad la región con mayores rendimientos y producción. Desde enero a abril existe una alta productividad, pero con una baja calidad del cultivo, incrementándose el porcentaje de descarte. Por el contrario, de mayo a setiembre la calidad es mayor, pero con menor productividad. Los mejores meses para cosechar son octubre y diciembre. Casi la totalidad del volumen de producción, a diferencia de China, está casi destinada al mercado externo porque el consumo local es menor a 1Kg per cápita anual, evidenciándose que este producto no es habitualmente consumido por el poblador peruano (Agrobanco, 2007).

En el mundo solo Perú y Tailandia producen espárrago todo el año en el resto de países es estacional, concentrándose entre abril y junio. Durante setiembre a febrero muy pocos países producen espárrago. En el Perú la producción se incrementa notablemente en agosto y marzo, teniendo dos campañas para el espárrago verde, una iniciada de enero a julio y la principal de setiembre a diciembre. En el Perú el cultivo se rige bajo la Norma Técnica Peruana 011.109:2001, elaborada con la Norma Internacional de la Comisión de Codex Alimentarius creada en 1963 por la FAO y OMS para desarrollar normas alimentarias, reglamentos y otros textos seleccionados bajo el Programa Conjunto FAO/OMS de Normas Alimentarias (Reyes, 2006)

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 enterobacterias y coronas de espárrago cultivar UC-157 F2.

3.1.2 Población y muestra

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

3.2 Métodos

3.2.1 Variable de la fase descriptiva

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

3.2.2 Variables de la fase experimental

Variable independiente: Cultivos (8) de enterobacterias.

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

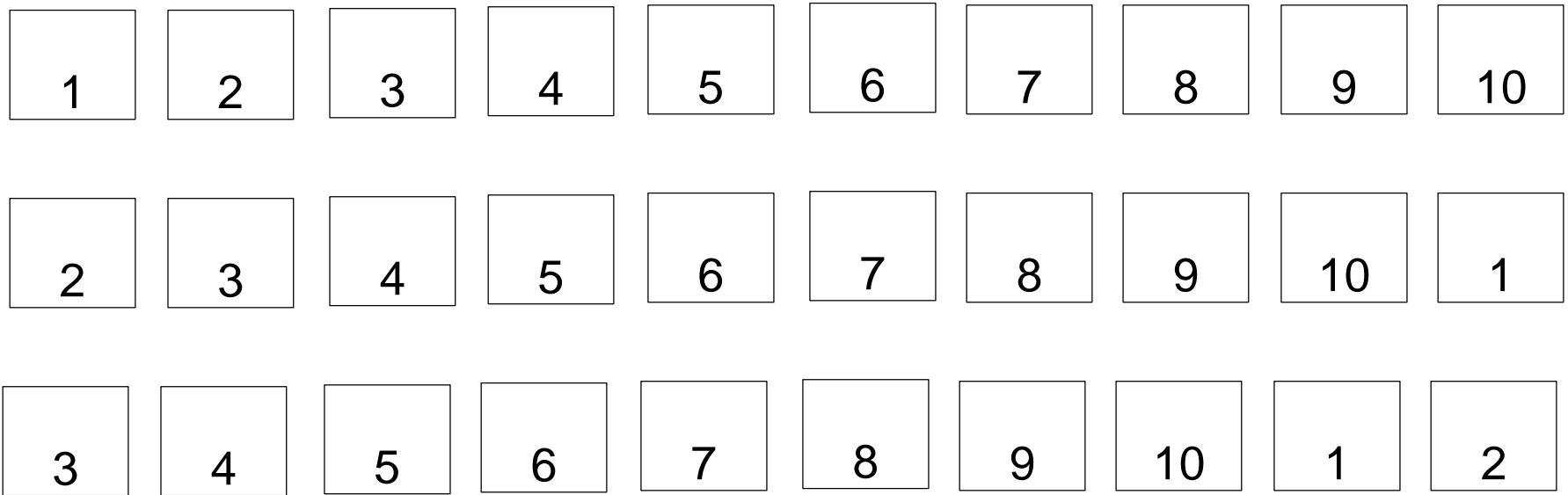
3.2.3 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

La investigación se realizó en dos fases. La primera fase descriptiva correspondió al aislamiento e identificación de enterobacterias, cuantificación del nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos. En la segunda fase explicativa se determinó el efecto de ocho cultivos de enterobacterias 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., 2014a). Los tratamientos fueron diez correspondientes a T1: Testigo absoluto (agua destilada), T2: Testigo químico (urea 46% N) y T3 a T10 enterobacterias. En cada tratamiento se consideraron tres repeticiones, totalizando 30 unidades experimentales (Figura 1).

3.2.4 Lugar de muestreo

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



T1: Testigo absoluto

T2: Testigo químico

T3 – T10: Enterobacterias

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



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

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

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

3.2.5 Obtención de muestras

En el campo de cultivo de espárrago, cada cinco surcos se seleccionó la planta más vigorosa y se extrajeron aproximadamente 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 enterobacterias, 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 enterobacterias

Para el aislamiento de enterobacterias (Cadena & Martínez, 2011), cada muestra de raíces y suelo rizosférico fue deshidratada bajo sombra durante 72 horas (Figura 3) y después las raíces se fragmentaron (5 cm). Del material obtenido se tomaron 10g para realizar una dilución en 90mL de solución salina esterilizada (NaCl 0,85%, p/v). De esta dilución 10^{-1} (Figura 4) se extrajo una alícuota, se sembró mediante la técnica del agotamiento y estría en placas de Petri, con agar Mac Conkey (Figura 5 y 6) y se incubó a 30°C , por 48 horas. A continuación, se diferenciaron las colonias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa (Figura 7) y se cultivaron en agar tripticasa soya (TSA), a 30°C , por 24 horas, para realizar las pruebas de oxidasa, catalasa y tinción de Gram. Las colonias constituidas por bacilos Gram negativos, oxidasa negativos y catalasa positivos se guardaron en refrigeración a 8°C , constituyendo los cultivos puros de enterobacterias.

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

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



Figura 3. Raíces con suelo rizosférico de *Asparagus officinalis* L. deshidratadas.



Figura 4. Suspensión de raíces y suelo rizosférico de *Asparagus officinalis* L. en solución salina esterilizada.

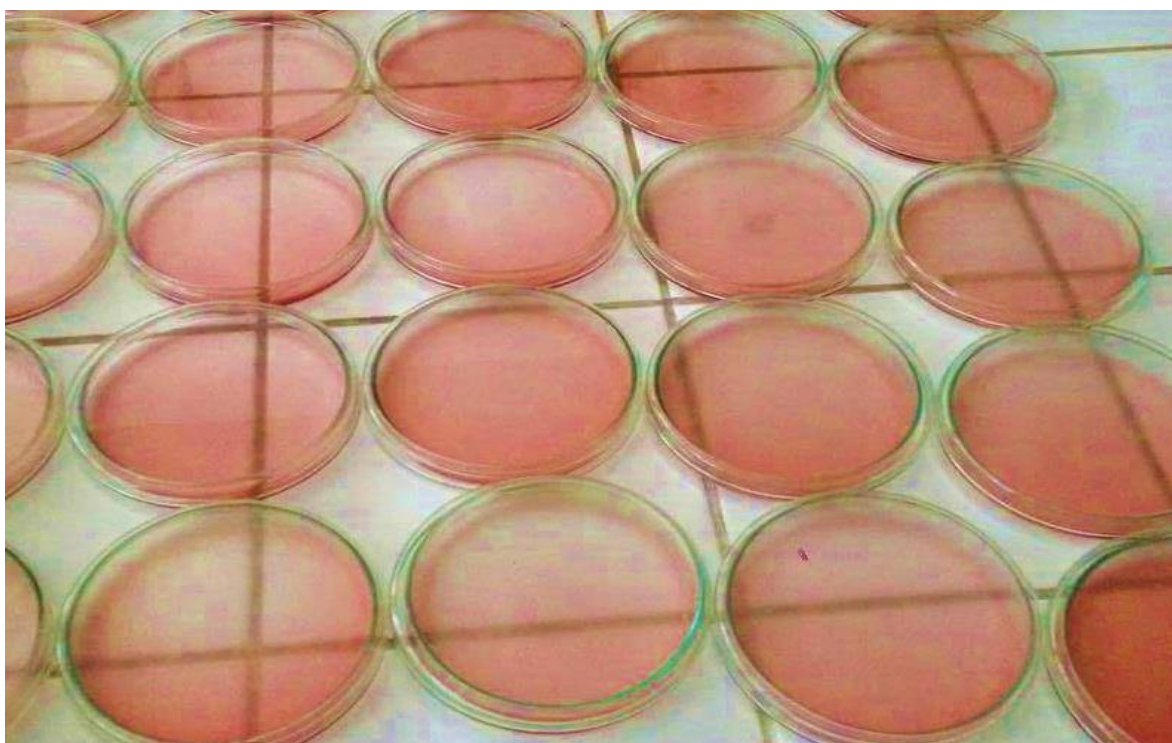


Figura 5. Placas Petri con agar Mac Conkey para el aislamiento de enterobacterias.



Figura 6. Siembra en agar Mac Conkey mediante la técnica de agotamiento y estría.

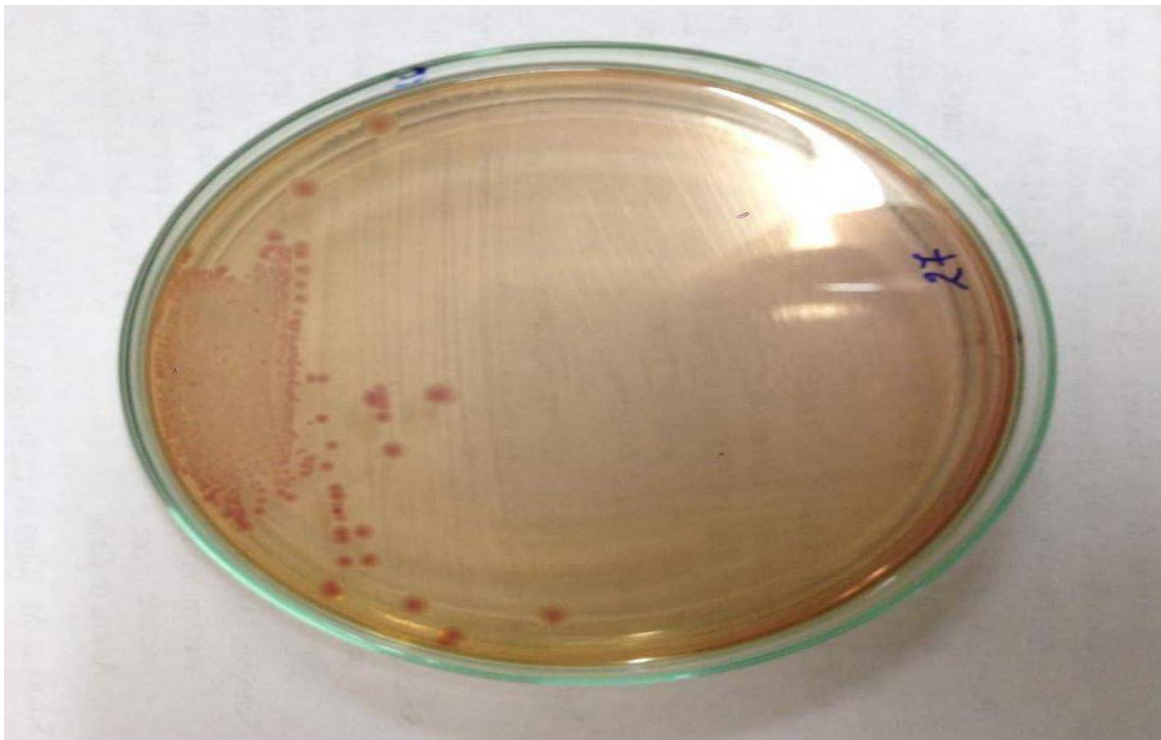


Figura 7. Enterobacterias desarrolladas en agar Mac Conkey.

El género de las enterobacterias se identificó fenotípicamente (Holt et al., 1994; Farro & Graus, 2013), investigando la fermentación de la glucosa, sacarosa y lactosa, así como la formación de gas y sulfuro de hidrógeno en agar Hierro Triple Azúcar (TSI), descarboxilación de la lisina y producción de sulfuro de hidrógeno en agar Hierro Lisina (LIA), utilización del citrato como fuente de carbono y energía en agar Citrato de Simons, producción de indol en caldo peptonado, producción de acidez y acetoina en caldo rojo de metilo Voges-Proskauer y reducción de nitratos en caldo nitrato.

3.2.7 Mantenimiento de cultivos de enterobacterias

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

3.2.8 Cuantificación de nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos

Con las enterobacterias 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 enterobacteria se cultivó en 5mL de caldo nutritivo a 30°C, durante 24 horas (Córdova, 2016). Posteriormente, el caldo se centrifugó (3500rpm) durante 5 minutos, el sobrenadante se eliminó, el sedimento se lavó con solución salina esterilizada (NaCl 0,85% p/v) y su concentración se estandarizó a 9×10^8 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 8, anexo 3) y se incubaron a 30°C, por 72 horas, con agitación constante (150rpm).



Figura 8. Caldo extracto de suelo cultivado con enterobacterias.

Después de la incubación, se agregaron 9mL de KCl 2M, se agitaron a 150rpm durante 1 hora y se dejaron en reposo 1 hora adicional, para después tomar 10mL de sobrenadante y centrifugarlos (3000rpm) durante 5 minutos. Los sobrenadantes se vertieron en tubos de dilución y se añadieron 0,4mL de solución alcohólica de fenol al 10%; 0,4mL de nitroprusiato de sodio al 0,5% y 1mL de solución oxidante. Los tubos se agitaron manualmente por 2 minutos y se dejaron en reposo durante 1 hora adicional. La reacción se consideró positiva a la fijación de nitrógeno por la aparición de una coloración azul, leyéndose la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible a 632,9nm. Las concentraciones de amonio se calcularon con la ecuación de la curva de calibración, obtenida previamente con diluciones sucesivas de una solución de 100ppm de cloruro de amonio (Anexo 3).

b. Cuantificación de fosfato solubilizado *in vitro*

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

c. Cuantificación de indoles producidos *in vitro*

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



Figura 9. Caldo National Botanical Research Institute's phosphate cultivado con enterobacterias.

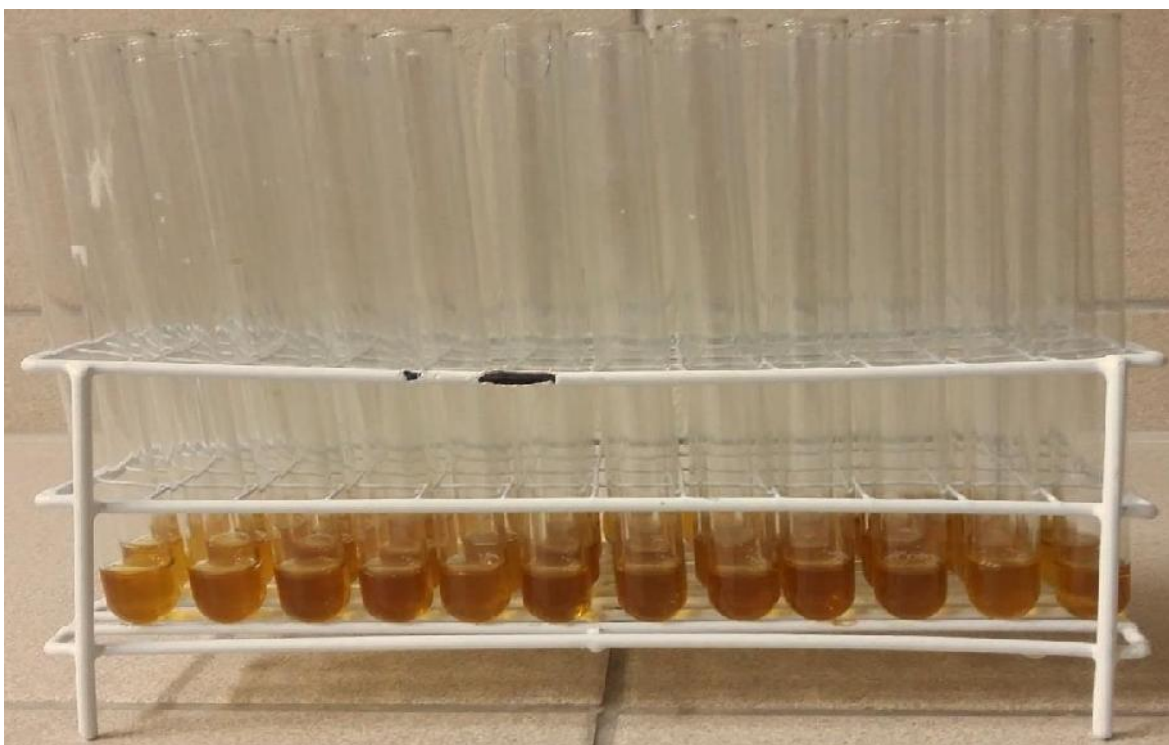


Figura 10. Caldo tripticasa soya suplementado con triptofano cultivado con enterobacterias.

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).

3.2.9 Selección de enterobacterias

Los cultivos de enterobacterias 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), indoles producidos (dos cultivos), concentración de amonio y fósforo soluble (un cultivo) y concentración de amonio e indoles producidos (un cultivo).

3.2.10 Efecto de enterobacterias en plantas de espárrago

Los ocho cultivos de enterobacterias seleccionados se inocularon en coronas de espárrago (Figura 11), determinándose, durante 60 días el efecto en el desarrollo vegetativo de las plantas, en condiciones de invernadero. El suelo experimental estuvo constituido por 120kg de una mezcla de suelo agrícola, arena de río y humus en la proporción 2:1:1, que fue distribuido en macetas de arcilla de 4,5kg de capacidad, a razón de 4kg por maceta. El cultivo de espárrago y la inoculación de enterobacterias se realizó entre el 19 de agosto al 17 de octubre de 2016, registrándose las temperaturas máxima (29°C), mínima (23°C) y media (26°C), valores obtenidos por la Estación Meteorológica de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, ubicado en el fundo “El Cienago” de Lambayeque (Anexo 6).



Figura 11. Coronas de *Asparagus officinalis* L.

En el ensayo se sembraron coronas de espárrago cultivar UC-157 F2, luego de ser tratadas por inmersión durante 5 minutos (Figura 12), 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 (Farías et al., 2004). Es específico para la producción de turiones verdes. Se comercializan los híbridos F1 y F2 y son los más precoces y productivos del mercado (Delgado, 2007).

El inóculo fue obtenido con las enterobacterias cultivadas en caldo nutritivo, a 30°C, durante 24 horas y después de la centrifugación se obtuvieron 500mL de cada cultivo bacteriano en solución salina esterilizada, NaCl 0,85% p/v (Figura 13), cuya concentración se estandarizó a 9x10⁸ cel mL⁻¹ por turbidimetría (tubo 3 del nefelómetro de Mc Farland). Transcurridos 30 minutos del tratamiento con fungicida, las coronas de espárrago se asperjaron con el inóculo bacteriano (100mL por corona), con ayuda de un pulverizador de plástico de 500mL (Figura 14) de capacidad. Después de 30 minutos de reposo a temperatura ambiental (25°C), se sembraron en el suelo experimental, a razón de una corona por maceta.

Los riegos se realizaron cada 3 días con agua potable declorada, tomando en cuenta los requerimientos hídricos de las plantas. Después de 15 días de la siembra, en el testigo químico se aplicaron 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 15) y se contaron los tallos (Figura 16). La altura se expresó en cm, considerando desde la base del tallo más alto hasta la yema terminal (Puicón, 2014). Con los valores de altura y número de tallos se calculó el índice de efectividad de la inoculación (IEI) en porcentaje, mediante la fórmula (Carreño, 2009) siguiente:

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

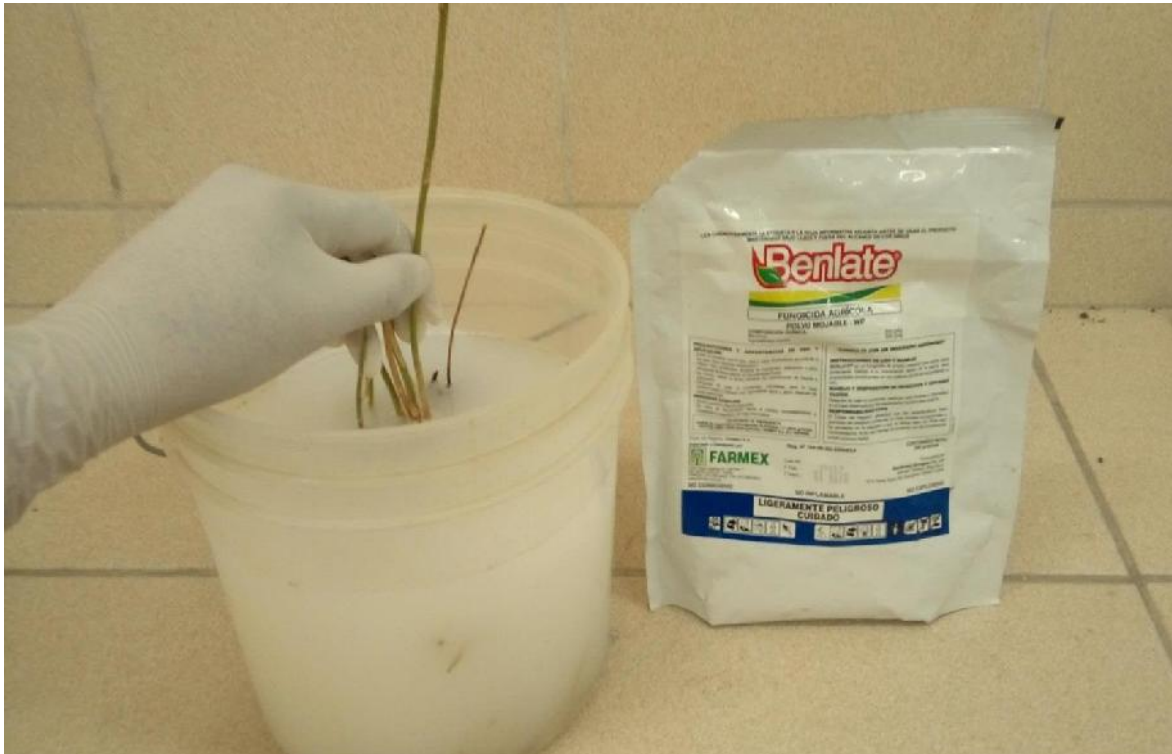


Figura 12. Inmersión de coronas de *Asparagus officinalis* L. en solución de fungicida.



Figura 13. Inóculo de enterobacterias en solución salina esterilizada.



Figura 14. Inóculo bacteriano asperjado en corona de *Asparagus officinalis* L



Figura 15. Medición de altura de tallo de *Asparagus officinalis* L.



Figura 16. Conteo del número de tallos de *Asparagus officinalis* L.

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 -énésima 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

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., 2014a). 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 Enterobacterias aisladas e identificadas en el rizoplasma y rizósfera de *Asparagus officinalis* L.

En el 96,88% (93) de las muestras de rizoplasma y suelo rizosférico de espárrago se aislaron bacterias que desarrollaron en agar Mac Conkey (Figura 17), fermentando (84,14%) y no fermentando (15,86%) la lactosa. Se obtuvieron 320 cultivos puros entre los que 25,94% (83) resultó oxidasa positivo y el 74,06% (237) oxidasa negativo.

El 80,59% (191) de las bacterias oxidasa negativas fermentó la glucosa en TSI, siendo considerado como enterobacterias, con un total de 191 cultivos puros (Figura 18). Éstas se observaron como bacilos Gram negativos, positivos en la prueba catalasa. Estas pruebas junto a la acidificación de glucosa, sacarosa, lactosa, reducción de nitratos, así como la formación de gas y sulfuro de hidrógeno en agar Hierro Triple Azúcar (TSI), descarboxilación de la lisina y producción de sulfuro de hidrógeno en agar Hierro Lisina (LIA), utilización del citrato como fuente de carbono y energía en agar Citrato de Simons, producción de indol en caldo peptonado, producción de acidez y acetoina en caldo rojo de metilo Voges-Proskauer, identificaron a las enterobacterias (Tabla 3).

La frecuencia de muestras de rizoplasma y rizósfera de espárrago positivas al aislamiento de enterobacterias (Figura 19) fue de 84,95% (79). Entre las enterobacterias se identificaron (Tabla 4) *Enterobacter* (76,96%), *Serratia* (9,95%), *Klebsiella* (6,81%) y *Citrobacter* (6,28%).

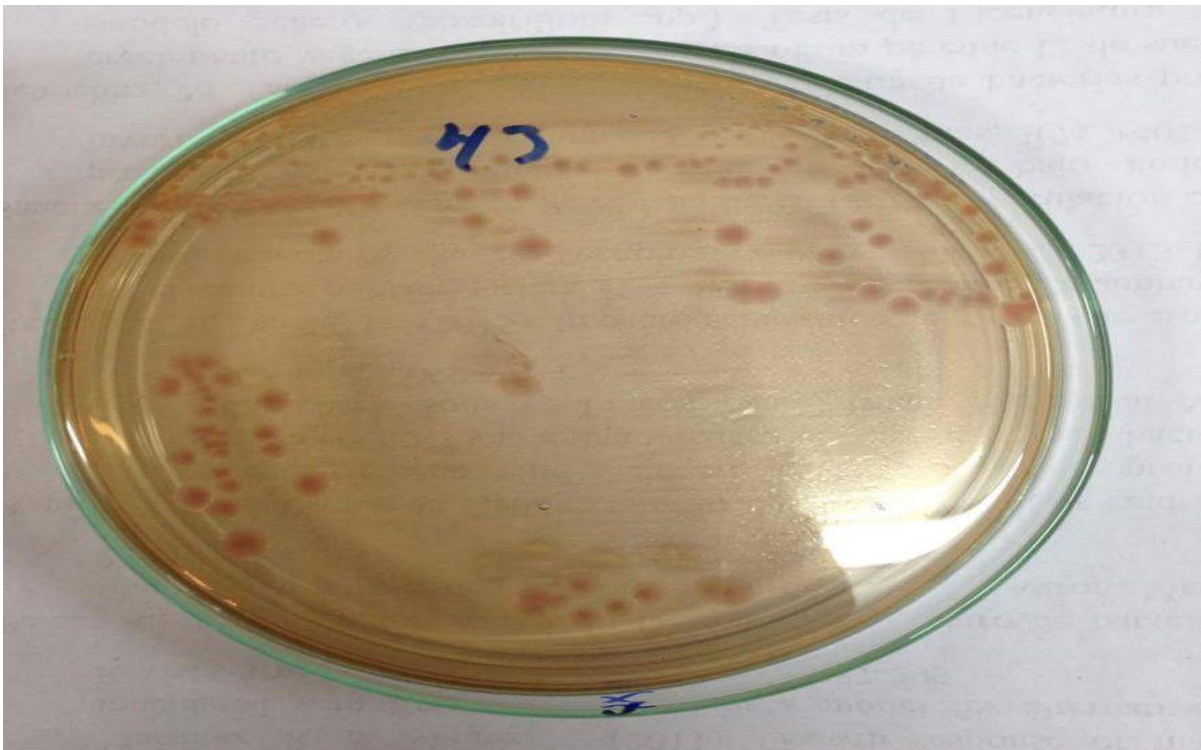


Figura 17. Colonias de bacterias desarrolladas en agar Mac Conkey.



Figura 18. Cultivos puros de enterobacterias en agar tripticasa soya.

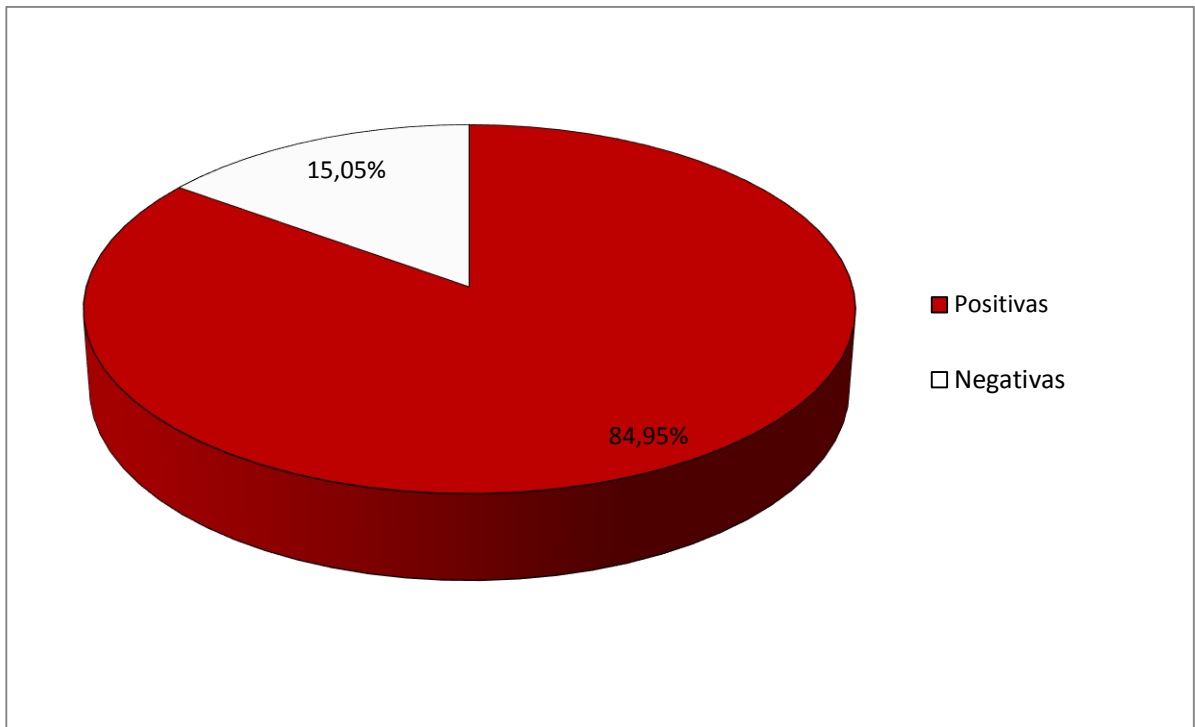


Figura 19. Frecuencia de muestras de rizoplaneo y rizósfera de *Asparagus officinalis* L. positivas al aislamiento de enterobacterias en agar Mac Conkey.

Tabla 3. Características diferenciales de enterobacterias

Características	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Serratia</i> sp.	<i>Citrobacter</i> sp.
Coloración de Gram	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	-
Acidificación de:				
-Glucosa (con gas)	+	+	+	+
-Lactosa	+	+	-	+
-Sacarosa	+	+	+	+
Reducción de nitratos	+	+	+	+
Lisina (LIA)	+	+	+	-
Indol	-	-	-	-
Rojo de Metilo	-	+	-	+
V-Proskauer	+	+	+	-
Citrato	+	+	+	+

Tabla 4. Frecuencia de géneros identificados en enterobacterias aisladas de rizoplano y rizosféra de *Asparagus officinalis* L.

Género	Cultivo puros	
	Número	%
<i>Enterobacter</i>	147	76,96
<i>Serratia</i>	19	9,95
<i>Klebsiella</i>	13	6,81
<i>Citrobacter</i>	12	6,28

4.2 Nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e índoles producidos por enterobacterias

El 92,15% (176) de los cultivos de enterobacterias fijaron nitrógeno *in vitro* (Figura 20) y como producto de la fijación se detectó amonio, evidenciado por una coloración azul (Figura 21). La concentración de amonio osciló entre 5,152 a 27,542 ppm con *Enterobacter* sp.37.95 y *Serratia* sp.5.14, respectivamente (Tabla 5).

El 76,96% (147) de los cultivos de enterobacterias solubilizaron fosfato *in vitro* (Figura 22) y como producto de la solubilización se detectó fósforo soluble, evidenciado por una coloración azul (Figura 23). La concentración de fósforo soluble osciló entre 1,293 a 17,189 ppm con *Enterobacter* sp.44.113 y *Enterobacter* sp.71.159, respectivamente (Tabla 6).

El 76,44% (146) de los cultivos de enterobacterias produjeron índoles *in vitro* (Figuras 24), evidenciados por una coloración grosella (Figura 25). La concentración de índoles producidos osciló entre 0,244 a 41,802 ppm con *Enterobacter* sp.70.154 y *Serratia* sp.24.59 (Tabla 7).

4.3 Cultivos de enterobacterias seleccionados

Los ocho cultivos de enterobacterias seleccionados correspondieron a *Serratia* sp.5.14 y *Enterobacter* sp.33.84 con 27,542 y 27,413 ppm de amonio; *Enterobacter* sp.71.159 y *Klebsiella* sp.30.74 con 17,189 y 8,605 ppm de fósforo soluble; *Serratia* sp.24.59 y *Enterobacter* sp.26.67 con 41,802 y 39,135 ppm de índoles; *Enterobacter* sp.35.88 con 21,972 ppm de amonio y 4,082 ppm de fósforo soluble y *Klebsiella* sp.34.86 con 24,619 ppm de amonio y 19,577 ppm de índoles (Tabla 8).

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

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

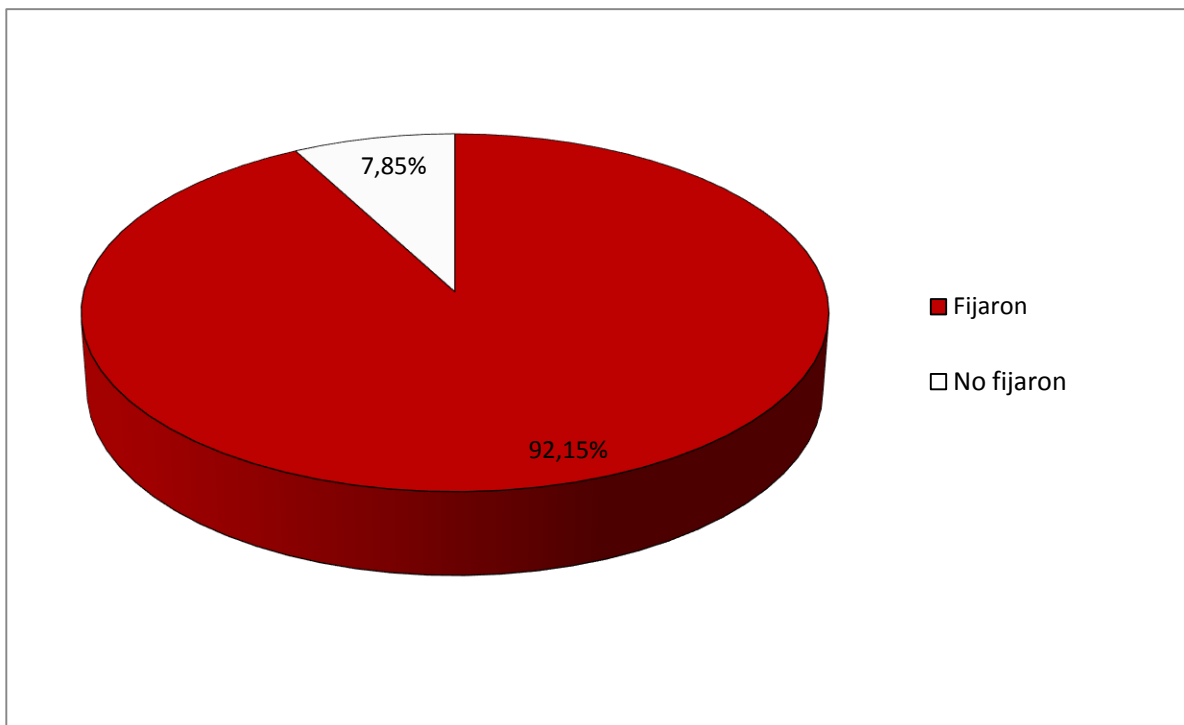


Figura 20. Porcentaje de enterobacterias aisladas de *Asparagus officinalis* L. que fijaron nitrógeno *in vitro*.

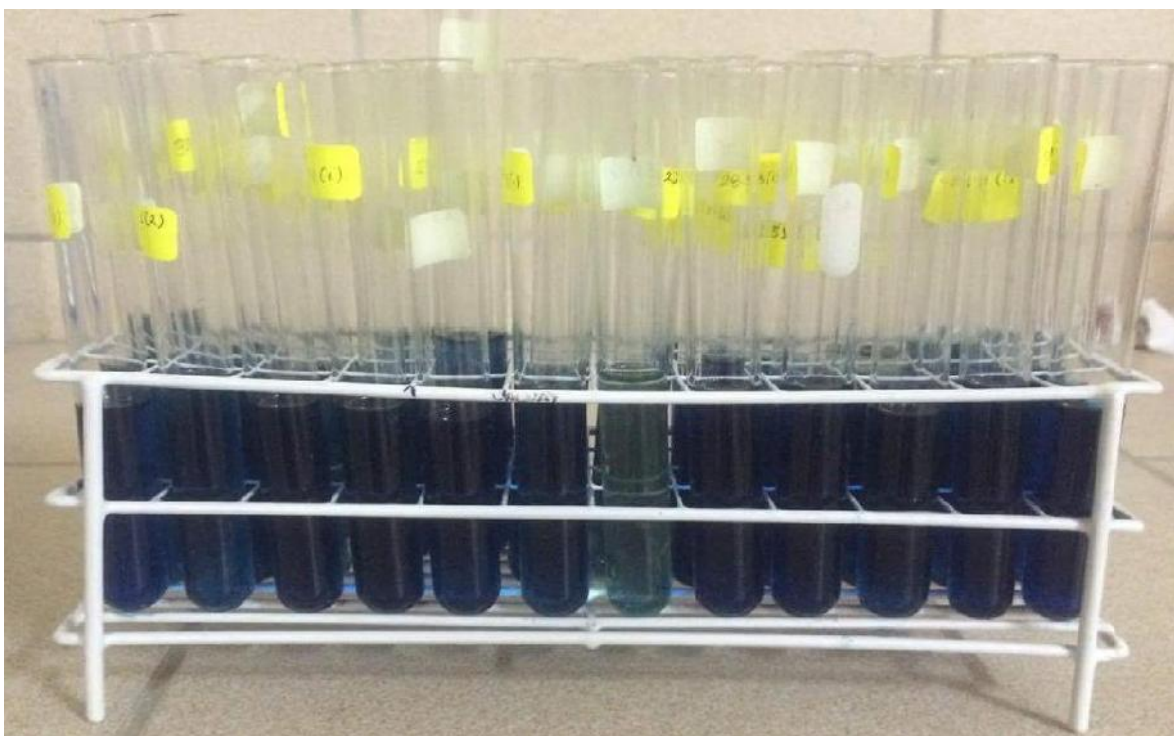


Figura 21. Coloración observada en la cuantificación de amonio.

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

Enterobacterias código UNPRG	Amonio (ppm)	Enterobacterias código UNPRG	Amonio (ppm)	Enterobacterias código UNPRG	Amonio (ppm)
<i>Serratia</i> sp.5.14	27,542	<i>Enterobacter</i> sp.69.150	17,505	<i>Enterobacter</i> sp.82.178	13,369
<i>Enterobacter</i> sp.33.84	27,413	<i>Enterobacter</i> sp.4.10	17,487	<i>Enterobacter</i> sp.44.111	13,295
<i>Serratia</i> sp.46.117	27,376	<i>Enterobacter</i> sp.71.157	17,431	<i>Enterobacter</i> sp.38.100	13,277
<i>Citrobacter</i> sp.8.17	27,303	<i>Enterobacter</i> sp.40.107	17,284	<i>Enterobacter</i> sp.13.32	13,075
<i>Klebsiella</i> sp.80.173	27,303	<i>Klebsiella</i> sp.27.68	17,137	<i>Serratia</i> sp.24.59	13,056
<i>Serratia</i> sp.48.124	26,825	<i>Serratia</i> sp.92.187	17,101	<i>Enterobacter</i> sp.70.156	12,873
<i>Enterobacter</i> sp.81.175	25,446	<i>Enterobacter</i> sp.51.126	17,045	<i>Enterobacter</i> sp.6.15	12,597
<i>Enterobacter</i> sp.65.145	24,895	<i>Serratia</i> sp.16.39	16,935	<i>Enterobacter</i> sp.17.41	12,579
<i>Klebsiella</i> sp.34.86	24,619	<i>Enterobacter</i> sp.51.128	16,917	<i>Enterobacter</i> sp.12.29	12,542
<i>Enterobacter</i> sp.70.155	23,920	<i>Enterobacter</i> sp.47.119	16,788	<i>Serratia</i> sp.8.20	12,505
<i>Enterobacter</i> sp.10.24	23,829	<i>Enterobacter</i> sp.17.42	16,733	<i>Citrobacter</i> sp.94.189	12,431
<i>Serratia</i> sp.31.78	23,240	<i>Klebsiella</i> sp.15.34	16,696	<i>Enterobacter</i> sp.5.12	12,431
<i>Enterobacter</i> sp.75.167	22,174	<i>Citrobacter</i> sp.35.89	16,512	<i>Enterobacter</i> sp.52.131	12,284
<i>Serratia</i> sp.80.174	21,972	<i>Enterobacter</i> sp.57.138	16,494	<i>Enterobacter</i> sp.33.78	12,027
<i>Enterobacter</i> sp.35.88	21,972	<i>Enterobacter</i> sp.69.152	16,457	<i>Enterobacter</i> sp.26.64	11,990
<i>Enterobacter</i> sp.70.154	21,788	<i>Enterobacter</i> sp.18.47	16,329	<i>Enterobacter</i> sp.17.43	11,954
<i>Enterobacter</i> sp.94.190	21,145	<i>Enterobacter</i> sp.30.75	16,200	<i>Klebsiella</i> sp.36.91	11,862
<i>Enterobacter</i> sp.84.181	20,977	<i>Enterobacter</i> sp.71.158	15,943	<i>Citrobacter</i> sp.12.30	11,604
<i>Enterobacter</i> sp.29.73	20,961	<i>Enterobacter</i> sp.23.57	15,906	<i>Enterobacter</i> sp.55.135	11,568
<i>Enterobacter</i> sp.11.26	20,501	<i>Enterobacter</i> sp.29.71	15,906	<i>Enterobacter</i> sp.36.94	11,347
<i>Enterobacter</i> sp.76.168	20,409	<i>Enterobacter</i> sp.91.185	15,887	<i>Enterobacter</i> sp.48.122	11,071
<i>Enterobacter</i> sp.48.123	20,262	<i>Citrobacter</i> sp.20.50	15,869	<i>Enterobacter</i> sp.13.31	10,906
<i>Klebsiella</i> sp.15.35	20,244	<i>Citrobacter</i> sp.77.170	15,814	<i>Enterobacter</i> sp.48.121	10,869
<i>Enterobacter</i> sp.40.105	19,766	<i>Enterobacter</i> sp.9.21	15,814	<i>Serratia</i> sp.92.186	10,575
<i>Enterobacter</i> sp.25.62	19,564	<i>Enterobacter</i> sp.17.44	15,556	<i>Enterobacter</i> sp.26.66	10,581

Continuación...

Enterobacterias código UNPRG	Amonio (ppm)	Enterobacterias código UNPRG	Amonio (ppm)	Enterobacterias código UNPRG	Amonio (ppm)
<i>Enterobacter</i> sp.88.183	19,417	<i>Enterobacter</i> sp.56.136	15,520	<i>Klebsiella</i> sp.30.74	10,336
<i>Serratia</i> sp.47.120	19,380	<i>Enterobacter</i> sp.4.11	15,520	<i>Enterobacter</i> sp.44.114	10,336
<i>Klebsiella</i> sp.2.4	19,325	<i>Citrobacter</i> sp.39.101	15,501	<i>Enterobacter</i> sp.69.153	10,318
<i>Enterobacter</i> sp.74.164	19,306	<i>Enterobacter</i> sp.15.36	15,465	<i>Enterobacter</i> sp.72.161	10,299
<i>Enterobacter</i> sp.71.159	19,251	<i>Enterobacter</i> sp.51.129	15,354	<i>Citrobacter</i> sp.20.51	10,226
<i>Enterobacter</i> sp.93.188	19,215	<i>Serratia</i> sp.95.191	15,354	<i>Klebsiella</i> sp.18.45	10,115
<i>Enterobacter</i> sp.13.33	19,031	<i>Serratia</i> sp.78.172	15,318	<i>Enterobacter</i> sp.32.80	9,858
<i>Enterobacter</i> sp.27.69	18,994	<i>Enterobacter</i> sp.65.144	15,318	<i>Enterobacter</i> sp.21.53	9,803
<i>Enterobacter</i> sp.40.106	18,957	<i>Enterobacter</i> sp.41.108	15,318	<i>Enterobacter</i> sp.24.60	9,748
<i>Enterobacter</i> sp.30.77	18,957	<i>Enterobacter</i> sp.39.102	15,318	<i>Enterobacter</i> sp.25.63	9,509
<i>Enterobacter</i> sp.74.166	18,939	<i>Enterobacter</i> sp.61.142	15,281	<i>Citrobacter</i> sp.73.163	9,490
<i>Serratia</i> sp.31.79	18,884	<i>Enterobacter</i> sp.2.6	15,262	<i>Citrobacter</i> sp.12.28	9,490
<i>Enterobacter</i> sp.1.2	18,829	<i>Enterobacter</i> sp.76.169	15,097	<i>Enterobacter</i> sp.30.76	9,417
<i>Serratia</i> sp.57.139	18,773	<i>Klebsiella</i> sp.2.5	15,042	<i>Enterobacter</i> sp.8.18	9,398
<i>Enterobacter</i> sp.69.151	18,755	<i>Enterobacter</i> sp.43.110	14,821	<i>Enterobacter</i> sp.11.25	9,325
<i>Enterobacter</i> sp.32.81	18,718	<i>Enterobacter</i> sp.40.104	14,821	<i>Enterobacter</i> sp.46.116	9,288
<i>Enterobacter</i> sp.55.134	18,626	<i>Enterobacter</i> sp.16.40	14,693	<i>Klebsiella</i> sp.3.7	9,141
<i>Enterobacter</i> sp.11.27	18,534	<i>Enterobacter</i> sp.37.96	14,527	<i>Enterobacter</i> sp.1.1	9,049
<i>Enterobacter</i> sp.24.61	18,443	<i>Enterobacter</i> sp.77.171	14,490	<i>Enterobacter</i> sp.82.177	8,976
<i>Enterobacter</i> sp.36.93	18,332	<i>Enterobacter</i> sp.10.23	14,435	<i>Enterobacter</i> sp.26.65	8,939
<i>Enterobacter</i> sp.72.162	18,204	<i>Enterobacter</i> sp.27.70	14,196	<i>Enterobacter</i> sp.38.99	8,920
<i>Enterobacter</i> sp.47.118	18,204	<i>Enterobacter</i> sp.19.49	14,086	<i>Enterobacter</i> sp.26.67	8,865
<i>Enterobacter</i> sp.61.143	18,185	<i>Enterobacter</i> sp.32.82	14,086	<i>Enterobacter</i> sp.9.22	8,737
<i>Serratia</i> sp.72.160	18,167	<i>Enterobacter</i> sp.4.9	14,031	<i>Enterobacter</i> sp.42.109	8,533
<i>Enterobacter</i> sp.7.16	17,965	<i>Enterobacter</i> sp.36.92	14,031	<i>Enterobacter</i> sp.39.103	8,093

Continuacion...

Enterobacterias código UNPRG	Amonio (ppm)	Enterobacterias código UNPRG	Amonio (ppm)	Enterobacterias código UNPRG	Amonio (ppm)
<i>Enterobacter</i> sp.23.56	17,909	<i>Enterobacter</i> sp.67.147	13,920	<i>Citrobacter</i> sp.45.115	7,983
<i>Citrobacter</i> sp.91.184	17,818	<i>Enterobacter</i> sp.24.58	13,884	<i>Enterobacter</i> sp.16.38	7,854
<i>Serratia</i> sp.21.52	17,781	<i>Enterobacter</i> sp.16.37	13,829	<i>Enterobacter</i> sp.37.97	6,806
<i>Enterobacter</i> sp.52.130	17,744	<i>Enterobacter</i> sp.51.127	13,737	<i>Enterobacter</i> sp.61.141	6,806
<i>Enterobacter</i> sp.8.19	17,707	<i>Enterobacter</i> sp.37.98	13,700	<i>Enterobacter</i> sp.44.112	6,678
<i>Enterobacter</i> sp.5.13	17,652	<i>Enterobacter</i> sp.16.40	13,571	<i>Serratia</i> sp.21.54	5,648
<i>Enterobacter</i> sp.3.8	17,615	<i>Enterobacter</i> sp.18.46	13,571	<i>Serratia</i> sp.21.55	5,538
<i>Enterobacter</i> sp.44.113	17,579	<i>Enterobacter</i> sp.68.149	13,443	<i>Enterobacter</i> sp.37.95	5,152
<i>Enterobacter</i> sp.34.85	17,542	<i>Enterobacter</i> sp.83.179	13,424		

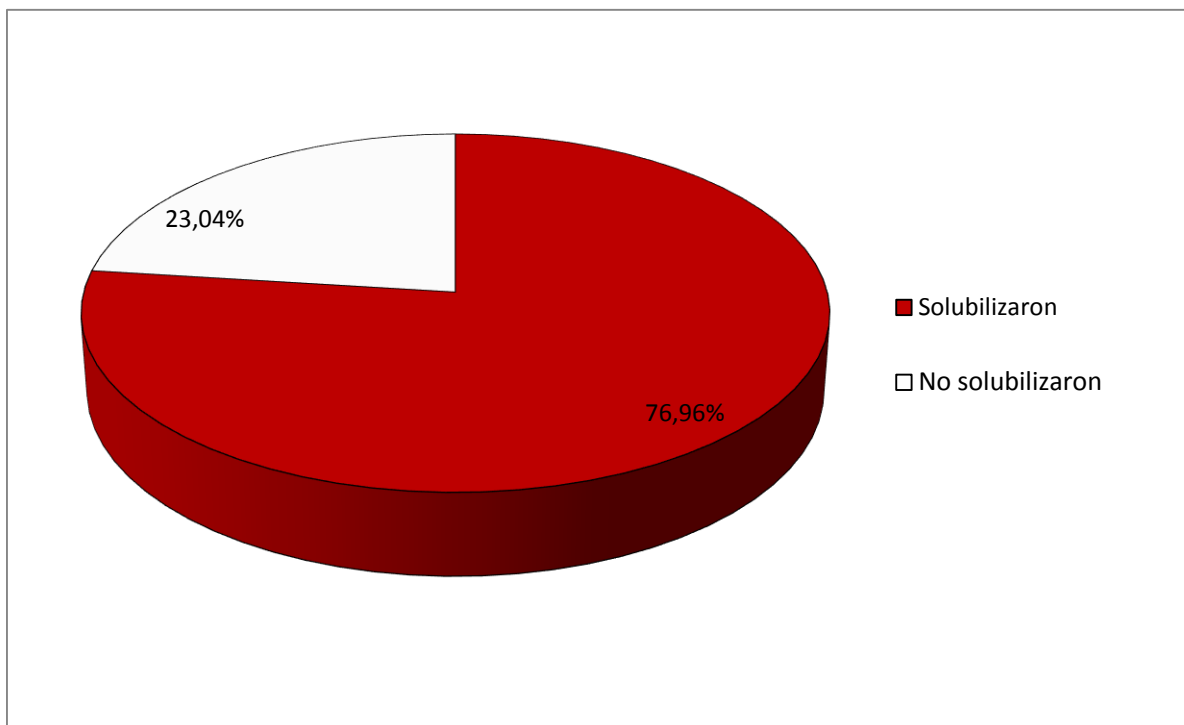


Figura 22. Porcentaje de enterobacterias aisladas de *Asparagus officinalis* L. que solubilizaron fosfato *in vitro*.



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

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

Enterobacterias código UNPRG	P soluble (ppm)	Enterobacterias código UNPRG	P soluble (ppm)	Enterobacterias código UNPRG	P soluble (ppm)
<i>Enterobacter</i> sp.71.159	17,189	<i>Enterobacter</i> sp.37.95	4,877	<i>Enterobacter</i> sp.44.111	3,302
<i>Klebsiella</i> sp.30.74	8,605	<i>Enterobacter</i> sp.11.27	4,761	<i>Enterobacter</i> sp.26.66	3,302
<i>Enterobacter</i> sp.32.80	8,504	<i>Enterobacter</i> sp.67.148	4,674	<i>Enterobacter</i> sp.44.114	3,287
<i>Enterobacter</i> sp.51.127	8,489	<i>Enterobacter</i> sp.93.188	4,664	<i>Enterobacter</i> sp.27.70	3,244
<i>Enterobacter</i> sp.4.10	8,489	<i>Enterobacter</i> sp.29.72	4,660	<i>Citrobacter</i> sp.73.163	3,244
<i>Enterobacter</i> sp.48.121	8,374	<i>Enterobacter</i> sp.67.147	4,617	<i>Enterobacter</i> sp.69.150	3,179
<i>Enterobacter</i> sp.36.92	8,374	<i>Enterobacter</i> sp.72.162	4,544	<i>Enterobacter</i> sp.34.87	3,171
<i>Enterobacter</i> sp.8.19	8,374	<i>Enterobacter</i> sp.82.177	4,544	<i>Serratia</i> sp.95.191	3,157
<i>Enterobacter</i> sp.37.96	8,374	<i>Enterobacter</i> sp.32.81	4,501	<i>Enterobacter</i> sp.47.118	3,056
<i>Serratia</i> sp.16.39	8,374	<i>Enterobacter</i> sp.17.41	4,472	<i>Enterobacter</i> sp.43.110	3,041
<i>Enterobacter</i> sp.69.151	8,273	<i>Enterobacter</i> sp.48.123	4,429	<i>Citrobacter</i> sp.20.51	3,027
<i>Enterobacter</i> sp.15.36	8,273	<i>Enterobacter</i> sp.44.112	4,429	<i>Enterobacter</i> sp.42.109	3,013
<i>Citrobacter</i> sp.39.101	8,171	<i>Enterobacter</i> sp.39.102	4,328	<i>Enterobacter</i> sp.23.57	3,013
<i>Enterobacter</i> sp.82.178	7,434	<i>Enterobacter</i> sp.38.100	4,270	<i>Enterobacter</i> sp.19.49	2,984
<i>Enterobacter</i> sp.70.156	7,261	<i>Enterobacter</i> sp.37.98	4,270	<i>Klebsiella</i> sp.2.5	2,825
<i>Citrobacter</i> sp.20.50	7,261	<i>Enterobacter</i> sp.47.119	4,255	<i>Enterobacter</i> sp.24.60	2,825
<i>Enterobacter</i> sp.16.40	6,986	<i>Enterobacter</i> sp.37.97	4,212	<i>Enterobacter</i> sp.26.65	2,825
<i>Enterobacter</i> sp.33.84	6,972	<i>Enterobacter</i> sp.35.88	4,082	<i>Enterobacter</i> sp.40.105	2,810
<i>Enterobacter</i> sp.70.155	6,380	<i>Enterobacter</i> sp.29.73	4,039	<i>Enterobacter</i> sp.16.38	2,781
<i>Enterobacter</i> sp.51.129	6,309	<i>Serratia</i> sp.31.79	4,024	<i>Enterobacter</i> sp.70.154	2,680
<i>Enterobacter</i> sp.30.77	6,307	<i>Citrobacter</i> sp.35.89	4,024	<i>Enterobacter</i> sp.18.48	2,680
<i>Enterobacter</i> sp.57.138	6,221	<i>Enterobacter</i> sp.23.56	3,981	<i>Enterobacter</i> sp.56.136	2,637
<i>Enterobacter</i> sp.76.169	6,134	<i>Enterobacter</i> sp.39.103	3,953	<i>Citrobacter</i> sp.94.189	2,637
<i>Citrobacter</i> sp.91.184	6,062	<i>Enterobacter</i> sp.74.166	3,937	<i>Enterobacter</i> sp.6.15	2,593

Continuación...

Enterobacterias código UNPRG	P soluble (ppm)	Enterobacterias código UNPRG	P soluble (ppm)	Enterobacterias código UNPRG	P soluble (ppm)
<i>Enterobacter</i> sp.5.13	5,989	<i>Enterobacter</i> sp.17.44	3,923	<i>Serratia</i> sp.92.187	2,579
<i>Enterobacter</i> sp.13.33	5,989	<i>Enterobacter</i> sp.30.76	3,880	<i>Enterobacter</i> sp.25.63	2,550
<i>Klebsiella</i> sp.53.132	5,903	<i>Serratia</i> sp.46.117	3,878	<i>Enterobacter</i> sp.30.75	2,319
<i>Serratia</i> sp.92.186	5,845	<i>Enterobacter</i> sp.36.94	3,822	<i>Enterobacter</i> sp.17.42	2,304
<i>Enterobacter</i> sp.48.122	5,830	<i>Enterobacter</i> sp.60.140	3,807	<i>Enterobacter</i> sp.10.23	2,290
<i>Enterobacter</i> sp.27.69	5,686	<i>Enterobacter</i> sp.26.67	3,764	<i>Serratia</i> sp.21.54	2,290
<i>Enterobacter</i> sp.4.11	5,686	<i>Enterobacter</i> sp.55.134	3,750	<i>Enterobacter</i> sp.76.168	2,276
<i>Enterobacter</i> sp.71.157	5,628	<i>Enterobacter</i> sp.61.141	3,750	<i>Enterobacter</i> sp.68.149	2,261
<i>Citrobacter</i> sp.8.17	5,556	<i>Enterobacter</i> sp.51.126	3,721	<i>Serratia</i> sp.48.124	2,218
<i>Enterobacter</i> sp.13.31	5,556	<i>Enterobacter</i> sp.46.116	3,706	<i>Enterobacter</i> sp.5.12	2,203
<i>Enterobacter</i> sp.1.1	5,469	<i>Enterobacter</i> sp.11.25	3,706	<i>Enterobacter</i> sp.55.135	2,145
<i>Enterobacter</i> sp.40.104	5,411	<i>Enterobacter</i> sp.9.21	3,648	<i>Klebsiella</i> sp.80.173	2,044
<i>Enterobacter</i> sp.2.6	5,325	<i>Enterobacter</i> sp.25.62	3,634	<i>Enterobacter</i> sp.51.128	2,044
<i>Serratia</i> sp.72.160	5,209	<i>Serratia</i> sp.5.14	3,619	<i>Enterobacter</i> sp.81.175	2,015
<i>Enterobacter</i> sp.9.22	5,137	<i>Enterobacter</i> sp.88.183	3,562	<i>Enterobacter</i> sp.35.90	1,986
<i>Enterobacter</i> sp.24.61	5,137	<i>Enterobacter</i> sp.65.145	3,562	<i>Enterobacter</i> sp.71.158	1,958
<i>Enterobacter</i> sp.52.130	5,137	<i>Enterobacter</i> sp.26.64	3,547	<i>Klebsiella</i> sp.18.45	1,914
<i>Enterobacter</i> sp.11.26	5,122	<i>Enterobacter</i> sp.61.143	3,547	<i>Enterobacter</i> sp.32.82	1,885
<i>Enterobacter</i> sp.17.42	5,079	<i>Enterobacter</i> sp.69.152	3,504	<i>Klebsiella</i> sp.2.4	1,775
<i>Enterobacter</i> sp.7.16	5,065	<i>Klebsiella</i> sp.34.86	3,489	<i>Serratia</i> sp.31.78	1,654
<i>Enterobacter</i> sp.74.164	5,065	<i>Enterobacter</i> sp.10.24	3,489	<i>Serratia</i> sp.80.174	1,466
<i>Enterobacter</i> sp.91.185	5,065	<i>Klebsiella</i> sp.3.7	3,432	<i>Klebsiella</i> sp.15.35	1,394
<i>Enterobacter</i> sp.40.107	4,992	<i>Enterobacter</i> sp.24.58	3,417	<i>Citrobacter</i> sp.12.28	1,380
<i>Enterobacter</i> sp.40.106	4,920	<i>Enterobacter</i> sp.50.125	3,403	<i>Klebsiella</i> sp.15.34	1,365
<i>Serratia</i> sp.24.59	4,877	<i>Enterobacter</i> sp.52.131	3,345	<i>Enterobacter</i> sp.44.113	1,293

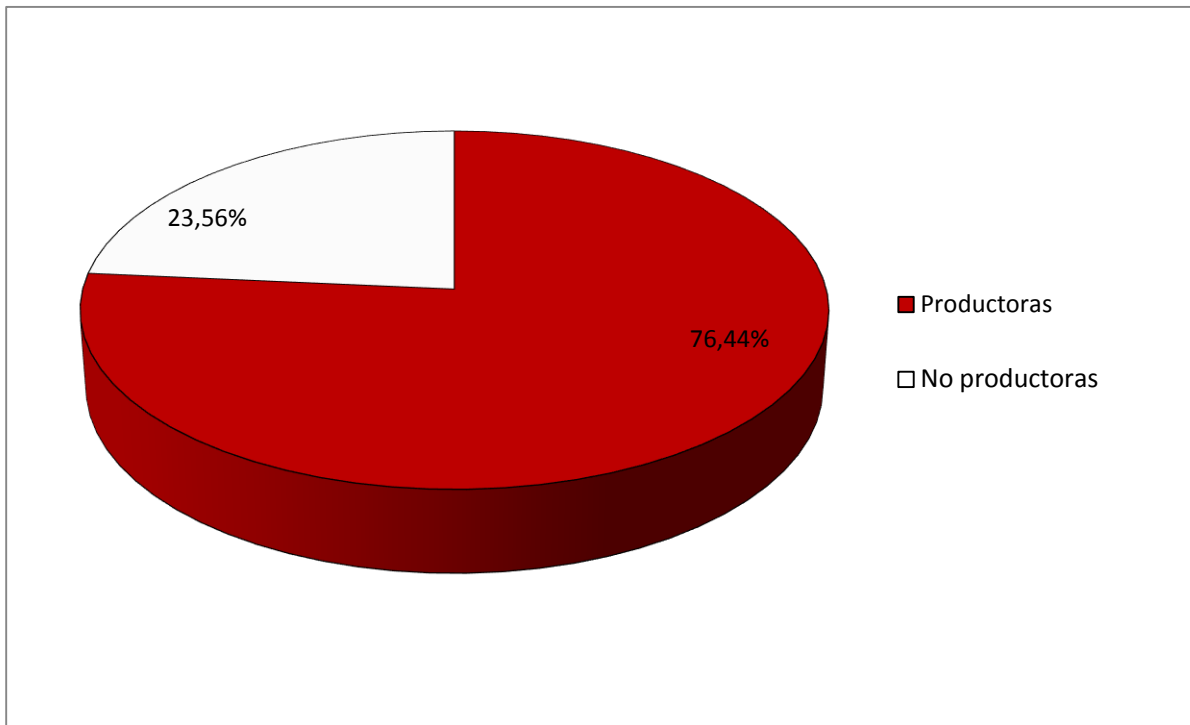


Figura 24. Porcentaje de enterobacterias aisladas de *Asparagus officinalis* L. que produjeron indoles *in vitro*.



Figura 25. Coloración observada en la cuantificación de indoles.

Tabla 7. Indoles producidos (ppm) por enterobacterias aisladas de rizoplasma y rizosfera de *Asparagus officinalis* L.

Enterobacterias código UNPRG	Indoles (ppm)	Enterobacterias código UNPRG	Indoles (ppm)	Enterobacterias código UNPRG	Indoles (ppm)
<i>Serratia</i> sp.24.59	41,802	<i>Enterobacter</i> sp.33.83	13,133	<i>Serratia</i> sp.21.52	7,133
<i>Enterobacter</i> sp.26.67	39,135	<i>Klebsiella</i> sp.80.173	12,911	<i>Enterobacter</i> sp.10.24	6,911
<i>Citrobacter</i> sp.94.189	37,577	<i>Enterobacter</i> sp.69.152	12,688	<i>Enterobacter</i> sp.44.114	6,688
<i>Enterobacter</i> sp.26.66	37,133	<i>Enterobacter</i> sp.77.171	12,688	<i>Enterobacter</i> sp.44.113	6,688
<i>Klebsiella</i> sp.18.45	37,133	<i>Citrobacter</i> sp.73.163	12,466	<i>Klebsiella</i> sp.30.74	6,688
<i>Enterobacter</i> sp.9.21	36,911	<i>Enterobacter</i> sp.18.46	12,466	<i>Citrobacter</i> sp.8.17	6,688
<i>Enterobacter</i> sp.26.64	34,466	<i>Citrobacter</i> sp.20.50	12,466	<i>Enterobacter</i> sp.37.98	6,466
<i>Enterobacter</i> sp.13.31	32,991	<i>Enterobacter</i> sp.48.122	12,244	<i>Enterobacter</i> sp.15.36	6,244
<i>Enterobacter</i> sp.26.65	30,244	<i>Enterobacter</i> sp.23.56	12,244	<i>Klebsiella</i> sp.2.4	6,022
<i>Enterobacter</i> sp.13.32	28,911	<i>Enterobacter</i> sp.8.19	12,022	<i>Enterobacter</i> sp.67.148	6,022
<i>Enterobacter</i> sp.41.108	24,244	<i>Citrobacter</i> sp.35.89	11,800	<i>Enterobacter</i> sp.34.87	5,577
<i>Enterobacter</i> sp.25.63	22,022	<i>Enterobacter</i> sp.65.145	11,800	<i>Enterobacter</i> sp.83.179	5,577
<i>Enterobacter</i> sp.23.57	20,911	<i>Enterobacter</i> sp.76.168	11,577	<i>Enterobacter</i> sp.72.161	5,577
<i>Enterobacter</i> sp.48.121	20,688	<i>Serratia</i> sp.92.187	11,355	<i>Enterobacter</i> sp.36.93	5,577
<i>Enterobacter</i> sp.19.49	20,244	<i>Enterobacter</i> sp.27.69	11,355	<i>Enterobacter</i> sp.51.127	5,355
<i>Citrobacter</i> sp.91.184	19,800	<i>Enterobacter</i> sp.40.107	11,133	<i>Enterobacter</i> sp.17.41	5,133
<i>Klebsiella</i> sp.34.86	19,577	<i>Enterobacter</i> sp.2.6	11,133	<i>Enterobacter</i> sp.10.23	5,133
<i>Enterobacter</i> sp.36.94	19,577	<i>Serratia</i> sp.5.14	11,133	<i>Citrobacter</i> sp.12.30	4,911
<i>Citrobacter</i> sp.77.170	19,133	<i>Enterobacter</i> sp.55.134	11,133	<i>Enterobacter</i> sp.48.123	4,911
<i>Enterobacter</i> sp.35.90	18,688	<i>Citrobacter</i> sp.39.101	11,133	<i>Enterobacter</i> sp.32.82	4,911
<i>Enterobacter</i> sp.16.38	18,244	<i>Enterobacter</i> sp.65.144	11,133	<i>Enterobacter</i> sp.30.76	4,911
<i>Enterobacter</i> sp.47.119	18,022	<i>Enterobacter</i> sp.29.71	10,911	<i>Enterobacter</i> sp.30.75	4,688
<i>Enterobacter</i> sp.6.15	18,022	<i>Klebsiella</i> sp.3.7	10,911	<i>Enterobacter</i> sp.27.70	4,688
<i>Enterobacter</i> sp.39.102	18,022	<i>Enterobacter</i> sp.29.72	10,688	<i>Enterobacter</i> sp.51.129	4,688

Continuación...

Enterobacterias código UNPRG	Indoles (ppm)	Enterobacterias código UNPRG	Indoles (ppm)	Enterobacterias código UNPRG	Indoles (ppm)
<i>Enterobacter</i> sp.17.42	18,022	<i>Enterobacter</i> sp.9.22	10,688	<i>Enterobacter</i> sp.52.130	4,022
<i>Klebsiella</i> sp.27.68	17,800	<i>Enterobacter</i> sp.76.169	10,688	<i>Enterobacter</i> sp.37.95	4,022
<i>Enterobacter</i> sp. 74.166	17,800	<i>Enterobacter</i> sp.36.92	10,466	<i>Serratia</i> sp.31.78	4,022
<i>Enterobacter</i> sp.11.26	16,911	<i>Enterobacter</i> sp.1.3	10,466	<i>Enterobacter</i> sp.94.190	4,022
<i>Enterobacter</i> sp.61.141	16,911	<i>Serratia</i> sp.48.124	10,244	<i>Klebsiella</i> sp.36.91	3,800
<i>Serratia</i> sp.57.139	16,688	<i>Enterobacter</i> sp.51.126	10,244	<i>Enterobacter</i> sp.71.157	3,577
<i>Enterobacter</i> sp.24.60	16,688	<i>Enterobacter</i> sp.1.2	10,244	<i>Enterobacter</i> sp.55.135	3,577
<i>Enterobacter</i> sp.24.58	16,244	<i>Enterobacter</i> sp.67.147	10,244	<i>Enterobacter</i> sp.7.16	3,355
<i>Enterobacter</i> sp.16.37	16,244	<i>Enterobacter</i> sp.91.185	10,244	<i>Serratia</i> sp.47.120	3,133
<i>Enterobacter</i> sp.16.39	15,800	<i>Enterobacter</i> sp.4.9	10,022	<i>Enterobacter</i> sp.61.143	3,133
<i>Enterobacter</i> sp.42.109	15,577	<i>Klebsiella</i> sp.15.34	9,577	<i>Enterobacter</i> sp.84.181	2,911
<i>Enterobacter</i> sp.47.118	15,133	<i>Enterobacter</i> sp.88.183	9,355	<i>Enterobacter</i> sp.30.77	2,911
<i>Enterobacter</i> sp.11.27	14,911	<i>Enterobacter</i> sp.38.99	9,355	<i>Enterobacter</i> sp.18.47	2,688
<i>Enterobacter</i> sp.5.13	14,911	<i>Enterobacter</i> sp.44.111	9,133	<i>Serratia</i> sp.21.54	2,688
<i>Enterobacter</i> sp.17.43	14,466	<i>Enterobacter</i> sp.93.188	9,133	<i>Enterobacter</i> sp.44.112	2,244
<i>Enterobacter</i> sp.51.128	14,244	<i>Enterobacter</i> sp.13.33	8,911	<i>Serratia</i> sp.92.186	2,022
<i>Enterobacter</i> sp.34.85	14,244	<i>Enterobacter</i> sp.4.10	8,911	<i>Enterobacter</i> sp.33.84	1,133
<i>Enterobacter</i> sp.40.106	14,244	<i>Enterobacter</i> sp.25.62	8,466	<i>Enterobacter</i> sp.60.140	1,133
<i>Enterobacter</i> sp.3.8	14,146	<i>Enterobacter</i> sp.71.158	8,244	<i>Enterobacter</i> sp.37.97	1,133
<i>Enterobacter</i> sp.52.131	14,022	<i>Enterobacter</i> sp.17.44	8,022	<i>Serratia</i> sp.31.79	0,911
<i>Enterobacter</i> sp.69.153	13,577	<i>Serratia</i> sp.95.191	7,800	<i>Enterobacter</i> sp.57.138	0,688
<i>Enterobacter</i> sp.24.61	13,577	<i>Enterobacter</i> sp.82.178	7,800	<i>Enterobacter</i> sp.40.104	0,688
<i>Serratia</i> sp.8.20	13,577	<i>Serratia</i> sp.72.160	7,800	<i>Enterobacter</i> sp.1.1	0,466
<i>Enterobacter</i> sp.8.18	13,577	<i>Citrobacter</i> sp.12.28	7,577	<i>Enterobacter</i> sp.70.154	0,244
<i>Enterobacter</i> sp.69.150	13,133	<i>Enterobacter</i> sp.69.151	7,355		

Tabla 8. Valores (ppm) de amonio, fósforo soluble e indoles correspondientes a cultivos de enterobacterias seleccionadas

Enterobacterias código UNPRG	Amonio (ppm)	Fósforo soluble (ppm)	Indoles (ppm)
<i>Serratia</i> sp.5.14	27,542	3,619	11,133
<i>Enterobacter</i> sp.33.84	27,413	6,972	1,135
<i>Enterobacter</i> sp.71.159	19,251	17,189	0
<i>Klebsiella</i> sp.30.74	10,336	8,605	6,688
<i>Serratia</i> sp.24.59	13,056	4,877	41,802
<i>Enterobacter</i> sp.26.67	8,865	3,764	39,135
<i>Enterobacter</i> sp.35.88	21,972	4,082	0
<i>Klebsiella</i> sp.34.86	24,619	3,489	19,577

La altura de las plantas de espárrago a los 30 días fue de 36,00 a 67,33 cm con las enterobacterias; 43,33 cm en el testigo absoluto y 46,67 cm en el testigo químico (Figuras 26 a 29), registrándose índices de efectividad de 3,1% con *Enterobacter* sp.71.159 y 55,4% con *Enterobacter* sp.33.84 (Tabla 9). El análisis de varianza de los valores de altura demostró alta significancia y según la prueba múltiple de Tukey (Tabla 10) el mayor valor se alcanzó con *Enterobacter* sp.33.84, no diferenciándose significativamente de *Serratia* spp.5.14 y 24.59, *Klebsiella* sp.30.74, *Enterobacter* sp.26.67 y del testigo químico, pero si de los demás tratamientos.

El número de tallos de las plantas de espárrago a los 30 días fue de 2,33 a 8,00 con las enterobacterias, 2,00 tallos en el testigo absoluto y 4,00 en el testigo químico (Figura 30), registrándose índices de efectividad de 16,5% con *Serratia* sp.24.59 y 300,0% con *Enterobacter* sp.33.84 (Tabla 11). El análisis de varianza de los valores del número de tallos demostró alta significancia y según la prueba múltiple de Tukey (Tabla 12) los mayores valores se alcanzaron con las enterobacterias, a excepción de *Serratia* sp.24.59 y no se diferenciaron entre ellas, pero si del testigo absoluto.

La altura de las plantas de espárrago a los 45 días fue de 45,00 a 73,00 cm con las enterobacterias; 46,83 cm en el testigo absoluto y 48,17 cm en el testigo químico (Figuras 31 a 39), registrándose índices de efectividad de 0,4% con *Enterobacter* sp.71.159 y 55,9% con *Enterobacter* sp.33.84 (Tabla 9). El análisis de varianza de los valores de altura demostró alta significancia y según la prueba múltiple de Tukey (Tabla 10) el mayor valor se alcanzó con *Enterobacter* sp.33.84, no diferenciándose significativamente de *Serratia* spp.5.14 y 24.59, *Klebsiella* spp.30.74 y 34.86 y *Enterobacter* sp.26.67, pero si de *Enterobacter* spp.71.159 y 35.88 y los testigos químico y absoluto.

El número de tallos de las plantas de espárrago a los 45 días fue de 4,33 a 9,67 con las enterobacterias, 2,33 tallos en el testigo absoluto y 6,67 tallos en el testigo químico (Figura 40), registrándose índices de efectividad de 85,8% con *Serratia* sp.24.59 y 315,0% con *Enterobacter* sp.33.84 (Tabla 11).

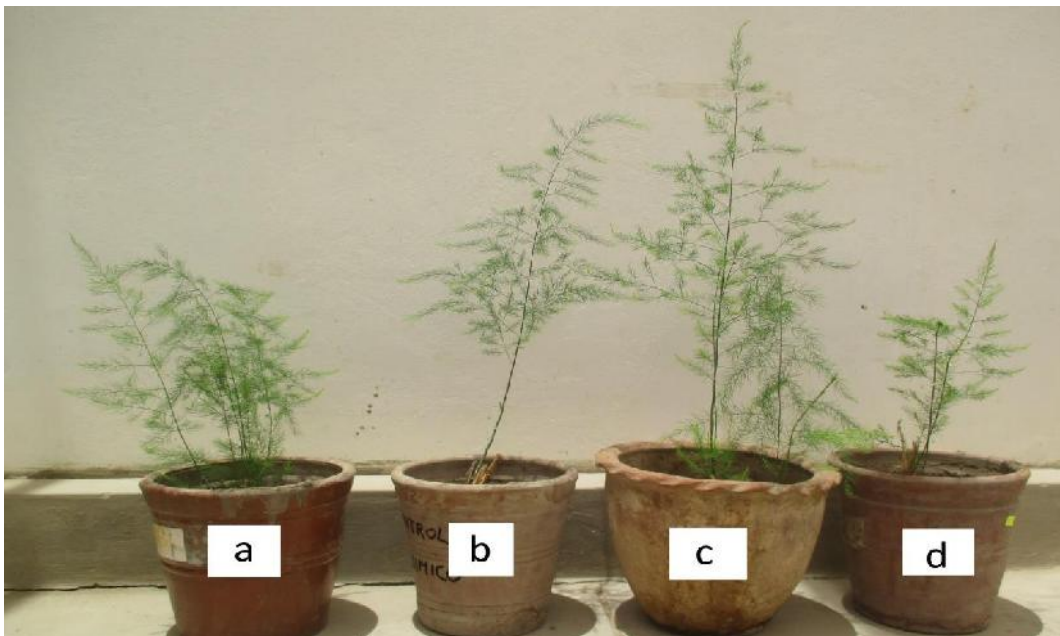


Figura 26. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 30 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Serratia* sp.5.14, d) *Enterobacter* sp.71.159.

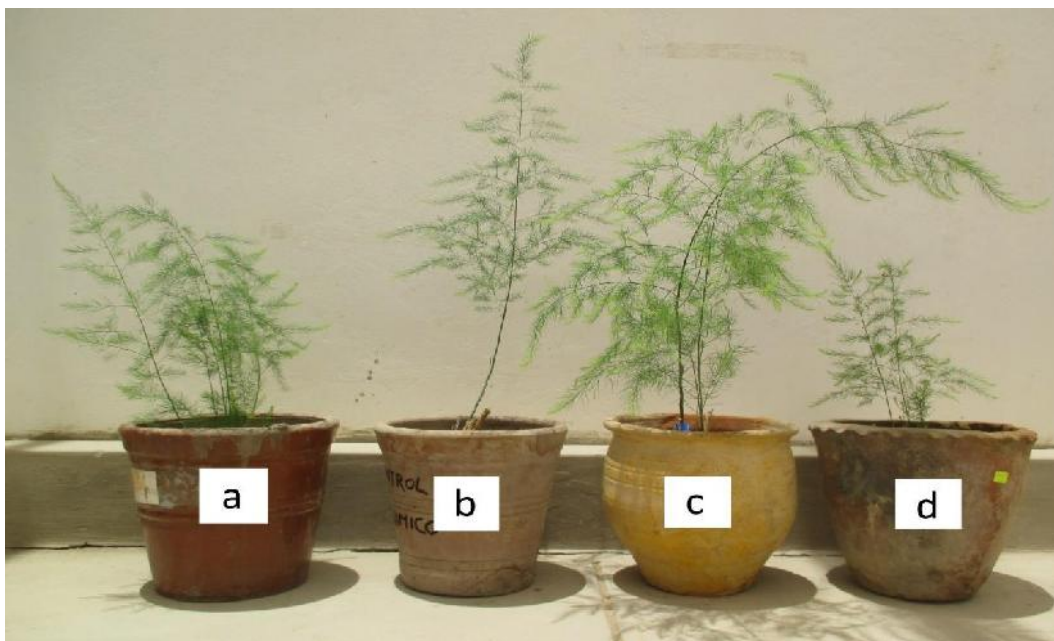


Figura 27. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 30 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Serratia* sp.24.59, d) *Enterobacter* sp.35.88.



Figura 28. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 30 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Enterobacter* sp.33.84, d) *Klebsiella* sp.34.86.

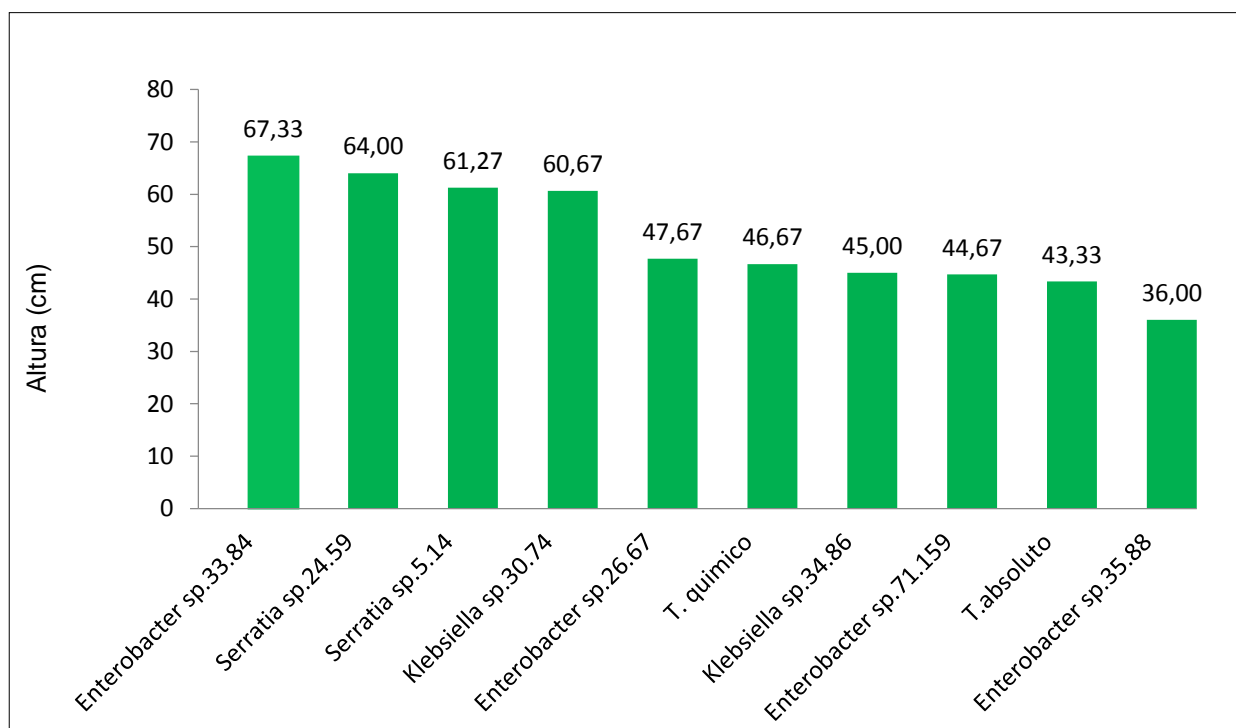


Figura 29. Altura (cm) de *Asparagus officinalis* L., 30 días después de la inoculación de enterobacterias.

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

Enterobacterias código UNPRG	IE%		
	30 días	45 días	60 días
<i>Serratia</i> sp.5.14	41,4	40,2	22,2
<i>Enterobacter</i> sp.33.84	55,4	55,9	35,0
<i>Enterobacter</i> sp.71.159	3,1	0,4	0,9
<i>Klebsiella</i> sp.30.74	40,0	50,2	27,3
<i>Serratia</i> sp.24.59	47,7	44,5	32,8
<i>Enterobacter</i> sp.26.67	10,0	18,2	33,6
<i>Enterobacter</i> sp.35.88	0	0	0
<i>Klebsiella</i> sp.34.86	3,9	20,3	23,1
Testigo químico	10,0	2,9	0,6

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

Enterobacterias código UNPRG	Altura (cm)					
	30 días	Sign.	45 días	Sign.	60 días	Sign.
<i>Serratia</i> sp.5.14	61,27	ab	65,67	abcd	71,50	abcd
<i>Enterobacter</i> sp.33.84	67,33	a	73,00	a	79,00	a
<i>Enterobacter</i> sp.71.159	44,67	bc	47,00	cd	59,00	bcd
<i>Klebsiella</i> sp.30.74	60,67	ab	70,33	ab	74,47	abc
<i>Serratia</i> sp.24.59	64,00	ab	67,67	abc	77,70	abc
<i>Enterobacter</i> sp.26.67	47,67	abc	55,33	abcd	78,17	ab
<i>Enterobacter</i> sp.35.88	36,00	c	45,00	d	53,83	d
<i>Klebsiella</i> sp.34.86	45,00	bc	56,33	abcd	73,00	abcd
Testigo absoluto	43,33	bc	46,83	d	58,50	cd
Testigo químico	46,67	abc	51,33	bcd	58,83	bcd

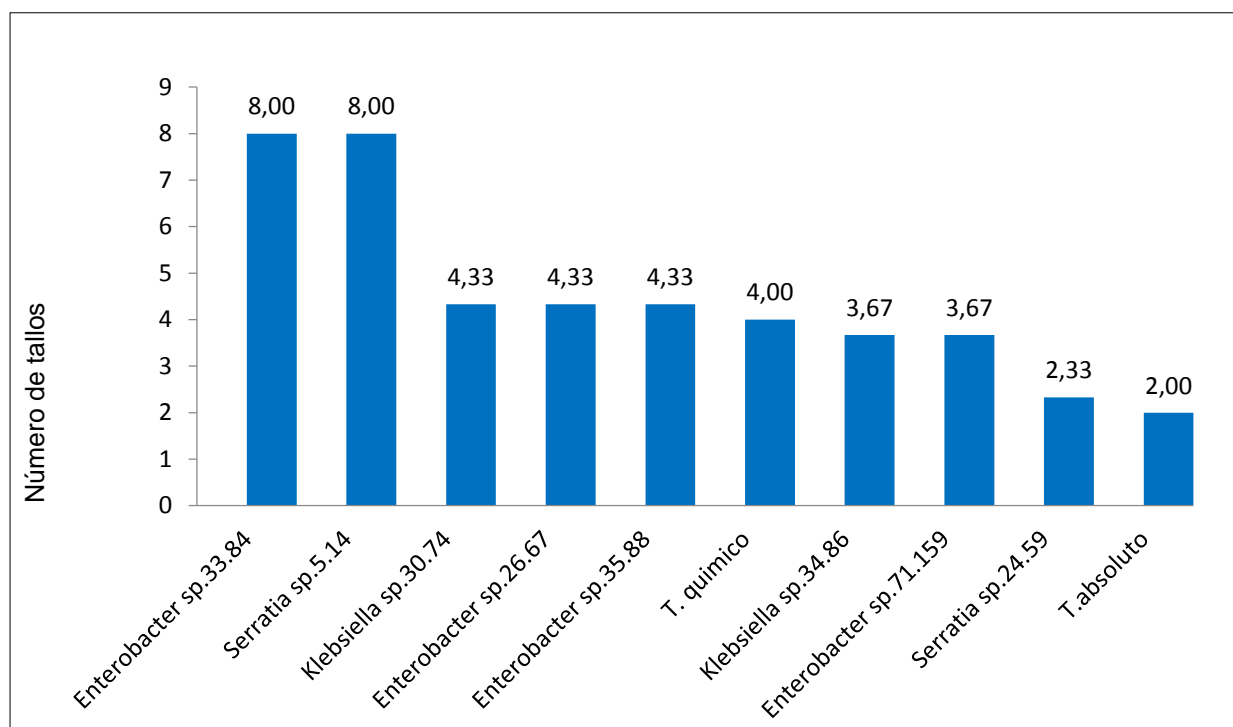


Figura 30. Número de tallos de *Asparagus officinalis* L., 30 días después de la inoculación de enterobacterias.

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

Enterobacterias código UNPRG	IE%		
	30 días	45 días	60 días
<i>Serratia</i> sp.5.14	300,0	257,5	324,3
<i>Enterobacter</i> sp.33.84	300,0	315,0	349,4
<i>Enterobacter</i> sp.71.159	83,5	114,6	149,8
<i>Klebsiella</i> sp.30.74	116,5	100,4	162,2
<i>Serratia</i> sp.24.59	16,5	85,8	112,4
<i>Enterobacter</i> sp.26.67	116,5	157,5	199,6
<i>Enterobacter</i> sp.35.88	116,5	128,8	174,5
<i>Klebsiella</i> sp.34.86	83,5	114,6	137,1
Testigo químico	100,0	186,3	24,7

Tabla 12. Prueba de Tukey del número de tallos de plantas de *Asparagus officinalis* L. a los 30, 45 y 60 días después de la inoculación de enterobacterias

Enterobacterias código UNPRG	Altura (cm)					
	30 días	Sign.	45 días	Sign.	60 días	Sign.
<i>Serratia</i> sp.5.14	8,00	a	8,33	ab	11,33	ab
<i>Enterobacter</i> sp.33.84	8,00	a	9,67	a	12,00	a
<i>Enterobacter</i> sp.71.159	3,67	ab	5,00	abc	6,67	abc
<i>Klebsiella</i> sp.30.74	4,33	ab	4,67	bc	7,00	abc
<i>Serratia</i> sp.24.59	2,33	b	4,33	bc	5,67	bc
<i>Enterobacter</i> sp.26.67	4,33	ab	6,00	abc	8,00	abc
<i>Enterobacter</i> sp.35.88	4,33	ab	5,33	abc	7,33	abc
<i>Klebsiella</i> sp.34.86	3,67	ab	5,00	abc	6,33	abc
Testigo absoluto	2,00	b	2,33	c	2,67	c
Testigo químico	4,00	ab	6,67	abc	3,33	c



Figura 31. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Serratia* sp. 24.59.



Figura 32. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Enterobacter* sp.33.84.



Figura 33. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Serratia* sp.5.14.



Figura 34. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Enterobacter* sp.35.88.



Figura 35. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Enterobacter* sp.71.159.



Figura 36. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Enterobacter* sp.26.67.



Figura 37. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Klebsiella* sp.34.86.



Figura 38. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 45 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Klebsiella* sp.30.74.

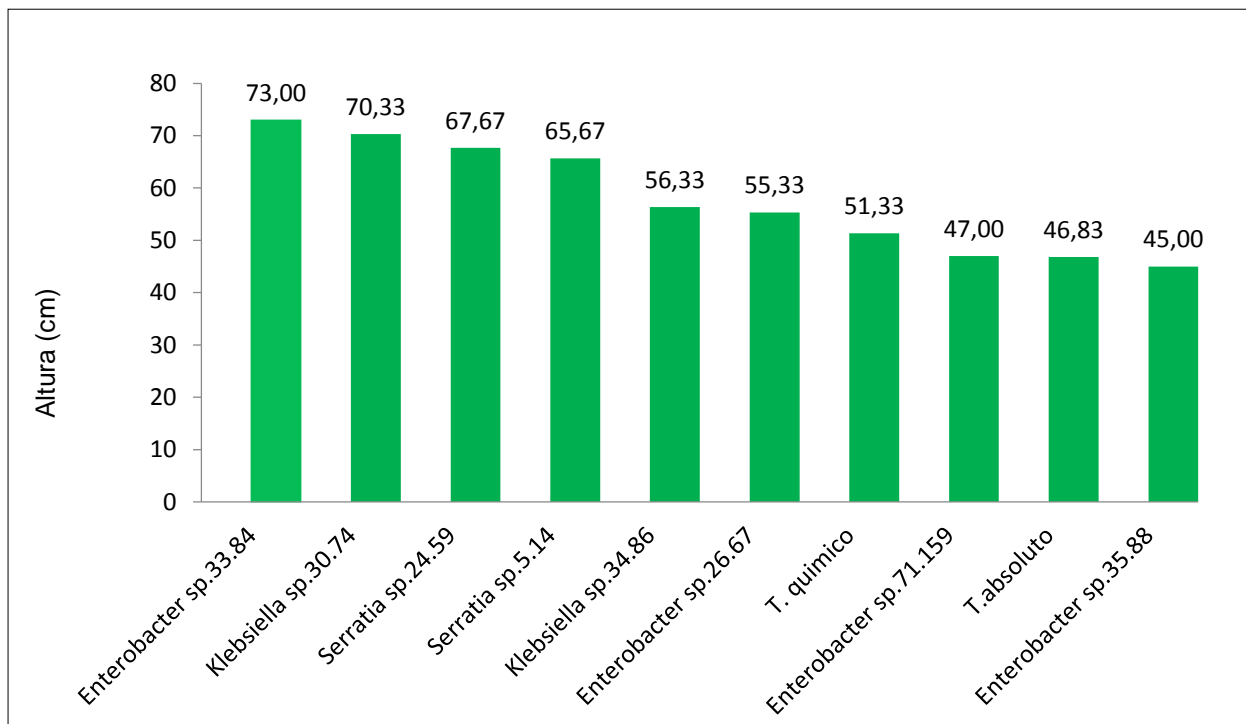


Figura 39. Altura (cm) de *Asparagus officinalis* L., 45 días después de la inoculación de enterobacterias.

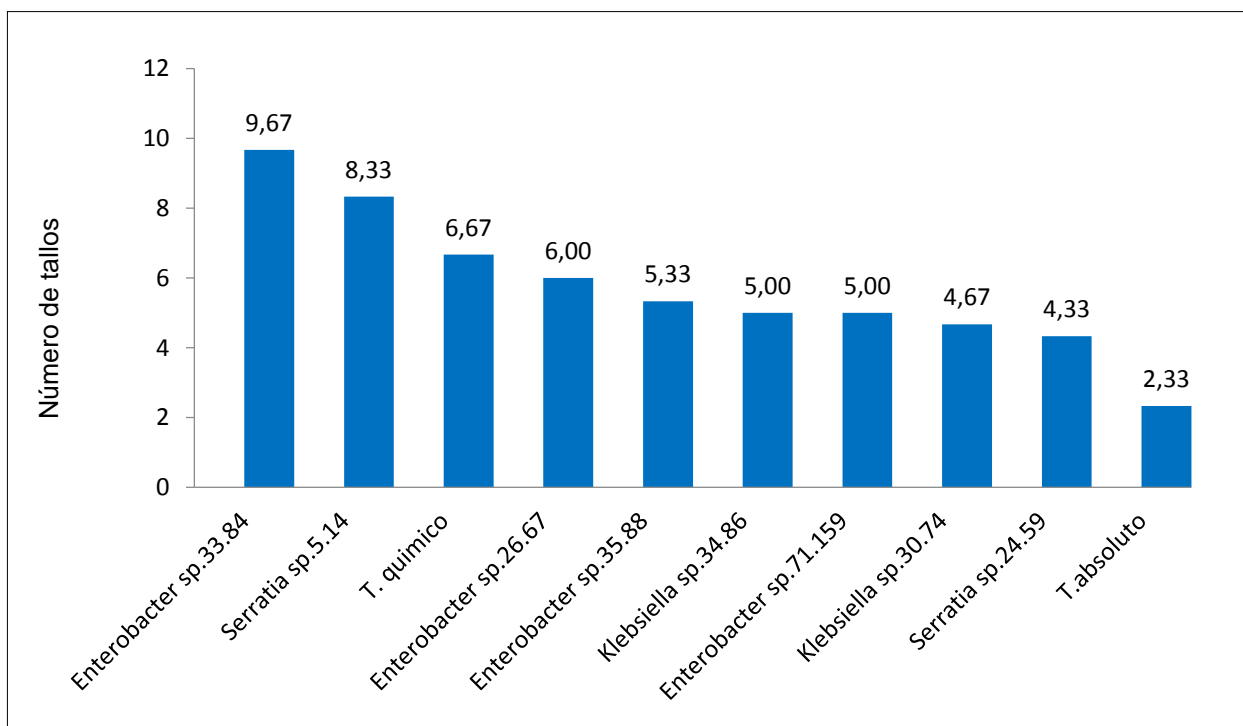


Figura 40. Número de tallos de *Asparagus officinalis* L., 45 días después de la inoculación de enterobacterias.

El análisis de varianza de los valores de número de tallos demostró alta significancia y según la prueba múltiple de Tukey (Tabla 12) el mayor valor se alcanzó con *Enterobacter* sp.33.84, no diferenciándose significativamente de *Enterobacter* spp.71.159, 26.67 y 35.88; *Klebsiella* sp.34.86 y el testigo químico, pero si de los demás tratamientos.

La altura de las plantas de espárrago a los 60 días fue de 53,83 a 79,00 cm con las enterobacterias; 58,50 cm en el testigo absoluto y 58,33 cm en el testigo químico (Figuras 41 a 47), registrándose índices de efectividad de 0,9% con *Enterobacter* sp.71.159 y 35,0% con *Enterobacter* sp.33.84 (Tabla 9). 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 *Enterobacter* sp.33.84, no diferenciándose significativamente de *Enterobacter* sp.26.67, *Klebsiella* spp. 30.74 y 34.86, *Serratia* spp.24.59 y 5.14, pero si de los demás tratamientos (Tabla 10).

El número de tallos de las plantas de espárrago a los 60 días fue de 5,67 a 12,00 con las enterobacterias, 2,67 tallos en el testigo absoluto y 3,33 tallos en el testigo químico (Figura 48), registrándose índices de efectividad de 112,4% con *Serratia* sp.24.59 y 349,4% con *Enterobacter* sp.33.84. (Tabla 11). El análisis de varianza de los valores de número de tallos demostró alta significancia (Anexo 12) y según la prueba múltiple de Tukey el mayor valor se alcanzó con *Enterobacter* sp.33.84, no diferenciándose significativamente de *Serratia* sp.5.14, *Enterobacter* spp.71.159, 26.67 y 35.88, *Klebsiella* spp. 30.74 y 34.86, pero si de los demás tratamientos (Tabla 12).

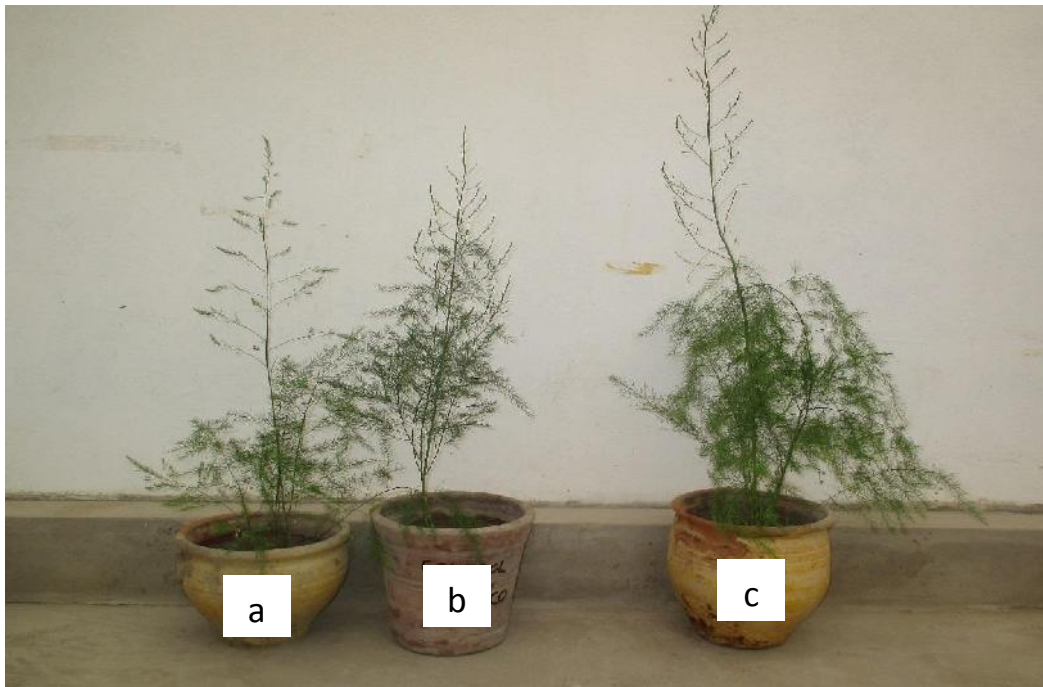


Figura 41. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 60 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Serratia* sp.24.59.

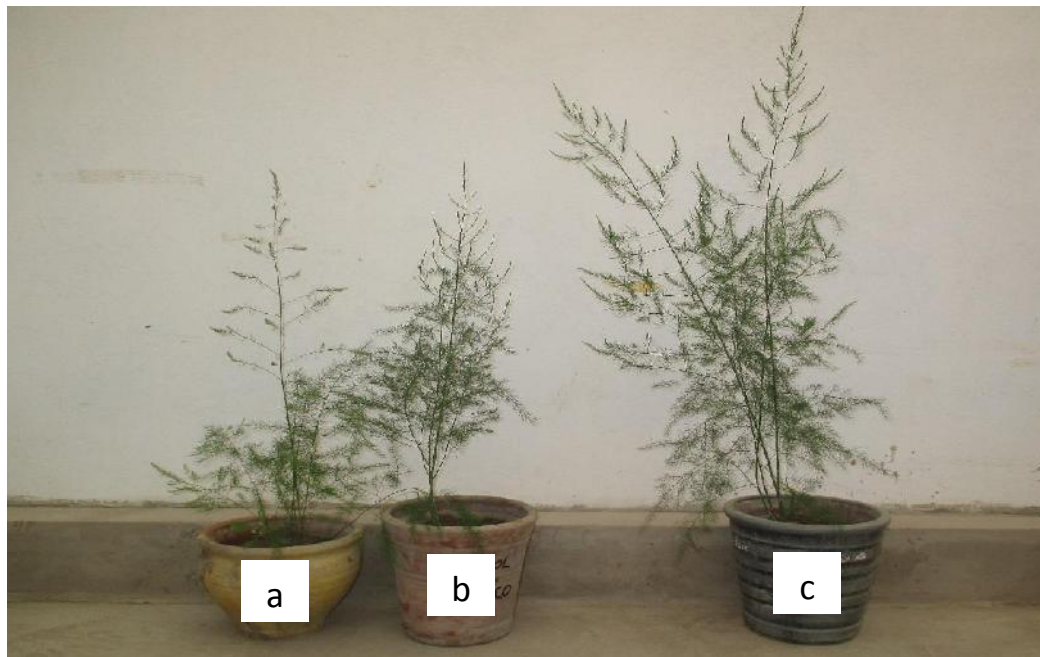


Figura 42. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 60 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Enterobacter* sp.33.84.



Figura 43. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 60 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Serratia* sp.5.14



Figura 44. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 60 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Enterobacter* sp.35.88.



Figura 45. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 60 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Enterobacter* sp. 30.74.

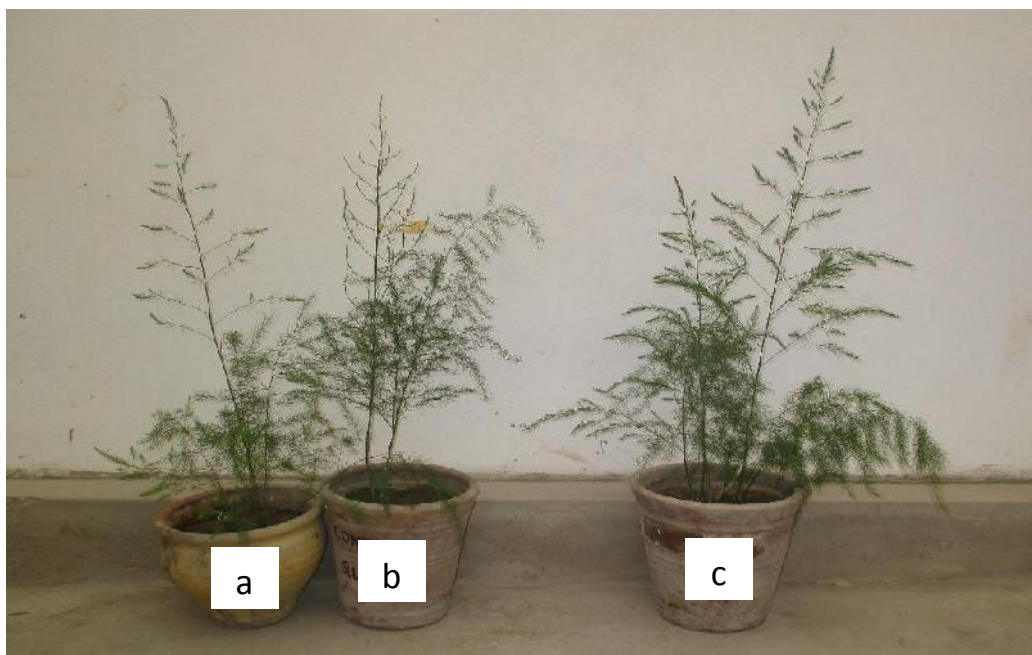


Figura 46. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 60 días después de la siembra de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *Enterobacter* sp.26.67.

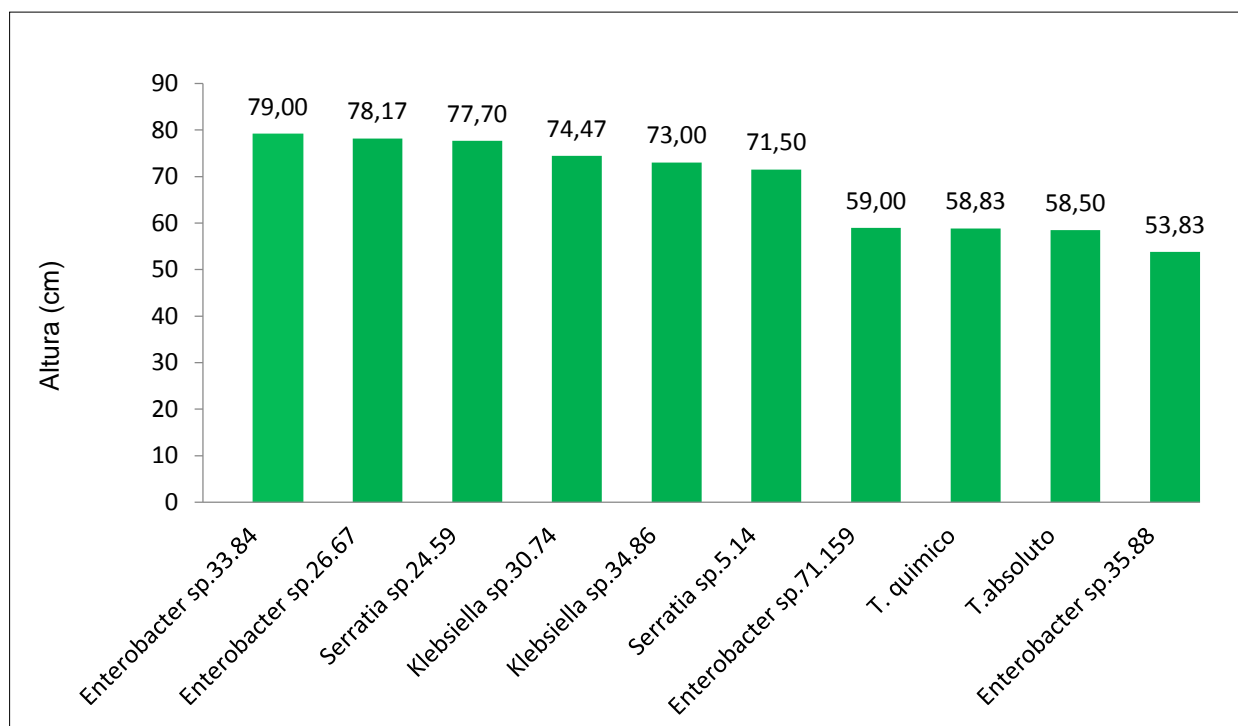


Figura 47. Altura (cm) de *Asparagus officinalis* L., 60 días después de la inoculación de enterobacterias.

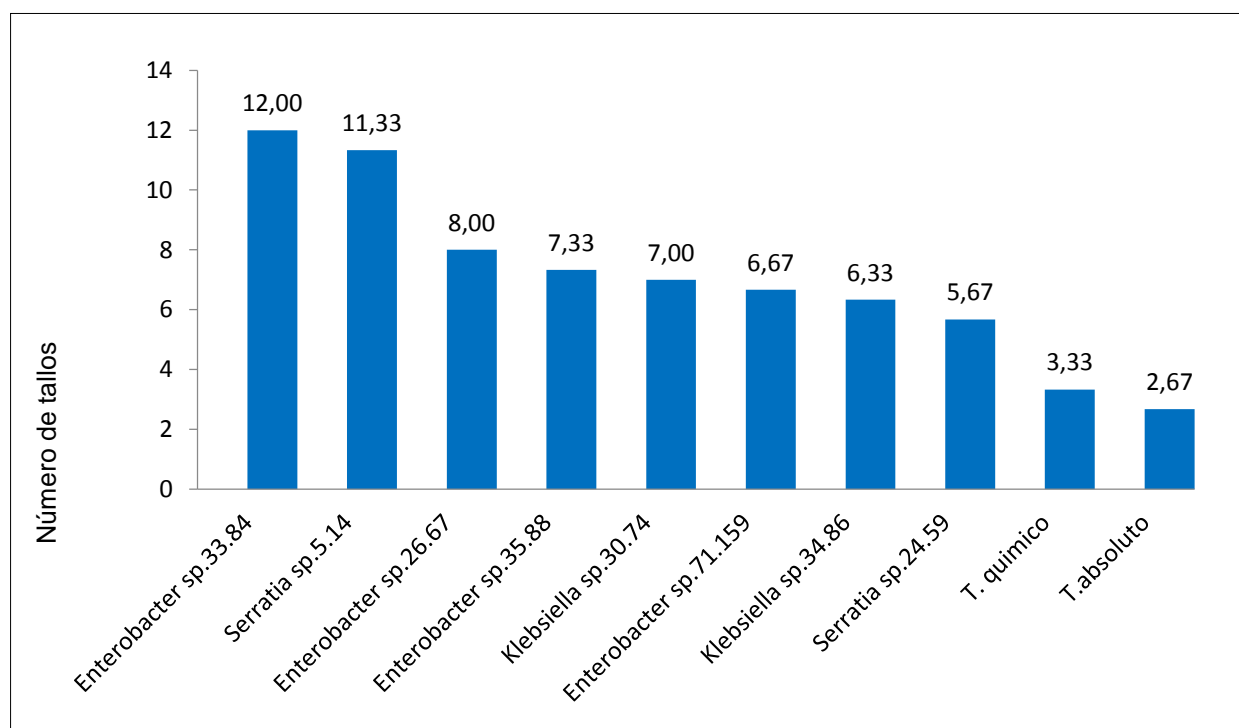


Figura 48. Número de tallos de *Asparagus officinalis* L., 60 días después de la inoculación de enterobacterias.

V. DISCUSIÓN

En el 96,8% de las muestras de rizoplaneo y suelo rizosférico de espárrago se aislaron bacterias que desarrollaron en agar Mac Conkey, medio selectivo diferencial, en el que el cristal violeta y las sales biliares inhibieron a las bacterias Gram positivas y otras Gram negativas no entéricas, a excepción de *Burkholderia* y *Pseudomonas* (Dávila & Linares, 2013), *Cupriavidus necator* (Lisboa & Segura, 2010), *Acinetobacter* y *Stenotrophomonas* (Salazar & Nieves, 2011).

Las bacterias desarrolladas en agar Mac Conkey, negativas en la prueba de oxidasa y fermentadoras de la glucosa se identificaron como enterobacterias, descartando las especies de *Acinetobacter* que son oxidasa negativas pero no fermentadoras (Salazar & Nieves, 2011). La familia Enterobacteriaceae está constituida por bacilos Gram negativos, no esporulados, que oxidan y fermentan la glucosa, carecen de indofenol oxidasa y reducen los nitratos a nitritos (Puerta & Mateos, 2010), incluyéndose los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Pantoea* y *Serratia*, entre otros (Holt et al., 1994)

En las muestras de rizoplaneo y rizósfera de espárrago se aislaron enterobacterias, microorganismos de importancia clínica (Córdova et al., 2012; Dossi et al., 2002), que también fueron reportados en aguas (Barrera et al., 2013) y en la rizósfera de *Zea mays* L. “maíz” (Carcaño et al., 2006; Morales et al., 2011), *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar” (Cordero et al., 2008), *Medicago sativa* “alfalfa” (Bharucha et al., 2011), pasturas (García et al., 2015), *Vanilla planifolia* “vainilla” (Álvarez et al., 2013) e inclusive malezas (Carcaño et al., 2006; Farro & Graus, 2013).

En las enterobacterias aisladas de espárrago se identificaron los géneros *Enterobacter*, *Serratia*, *Klebsiella* y *Citrobacter*, coincidiendo con los reportes de Morales et al., 2011 en maíz (*Enterobacter* sp.); Koo & Cho, 2009 y García et al., 2015 en malezas y pasturas (*Serratia* spp.); Carcaño et al., 2006 y Álvarez, 2012 en maíz y vainilla (*Klebsiella* spp.) y Farro & Graus, 2013 en malezas (*Citrobacter* spp.).

Las enterobacterias se identificaron fenotípicamente, así como también lo reportaron Morales et al. (2011) y García et al. (2015) con aislados de maíz y pasturas, respectivamente. Otros investigadores como Álvarez (2012) y Criollo et al. (2012) identificaron las enterobacterias a nivel molecular, técnicas que se deben aplicar para verificar la identificación fenotípica (García et al., 2015).

La utilización biotecnológica de los microorganismos benéficos requiere de su caracterización fisiológica previa, con la finalidad de seleccionar aquellas cepas con mayor potencial (Carcaño et al., 2006). En este contexto, se investigó la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato y producción de indoles. De igual manera, Criollo et al. (2009) y Farro & Graus (2013) seleccionaron aislados de pasturas y malezas, considerando estas características como indicadores del potencial para promover el crecimiento en plantas.

El 92,15% de las enterobacterias fijaron nitrógeno, capacidad por la que se consideran diazótrofos o bacterias que mediante el complejo enzimático nitrogenasa reducen una molécula de nitrógeno (N_2) en dos de amoníaco (NH_3) que rápidamente es ionizado hasta amonio (NH_4^+) en el ambiente ácido de la rizósfera y posteriormente es asimilado, formándose glutamina para la síntesis de aminoácidos ureidos, amidas y otros compuestos nitrogenados (Myrold, 2004, mencionado por Álvarez, 2012; Altamirano et al., 2014). Las bacterias de los géneros *Enterobacter*, *Serratia*, *Klebsiella* y *Citrobacter*, fijaron nitrógeno, capacidad demostrada previamente por Madjaiyan et al., 2010 (*Enterobacter*) Álvarez, 2012 (*Enterobacter*, *Klebsiella*), Farro & Graus, 2013 (*Citrobacter*) y Gyaneshwar et al, 2001 (*Serratia* sp.).

El amonio producto de la fijación de nitrógeno cuantificado por el método de Berthelot o fenol hipoclorito, se evidenció por la aparición de un color azul intenso

de indofenol, por la reacción del ion amonio en los compuestos fenólicos, en presencia del agente oxidante hipoclorito de sodio y el catalizador nitroprusiato de sodio (Lara et al., 2007; García et al., 2010). La concentración máxima de amonio fue de 27,542 ppm, inferior al rango 30-32 ppm reportado por Farro & Graus (2013) y Hernández et al. (2014) con enterobacterias aisladas de malezas.

El 76,96% de las enterobacterias solubilizaron fosfato tricálcico, actividad por la cual son consideradas solubilizadoras de fósforo (Carreño, 2009). El principal mecanismo involucrado en la solubilización de fosfatos es la síntesis de ácidos orgánicos (Kaviyarasi & Ambikapaty, 2011); no obstante, también se consideran la liberación de protones, producción de sustancias quelantes y ácidos sulfúrico, nítrico y carbónico (Kaviyarasi & Ambikapaty, 2011; Balakrishna et al., 2012). Las bacterias de los géneros *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Serratia* solubilizaron fosfato, actividad reportada previamente por Sánchez et al, 2012 (*Enterobacter*), Farro & Graus, 2013 (*Citrobacter*), Clavijo et al., 2012 (*Klebsiella*), Álvarez, 2013 y García et al., 2015 (*Serratia* spp.)

El fósforo soluble o iones ortofosfatos producto de la solubilización del fosfato tricálcico, en la reacción colorimétrica del molibdato, reaccionaron con los iones molibdato, formando ácido molibdofósforico. Éste reducido en presencia de ácido ascórbico formó el azul de fosfomolibdico, con una coloración azul característica, cuya aparición fue acelerada por el catalizador emético tartrato doble de antimonio y potasio (Rodier & Rodi, 2005; Bobadilla & Rincón, 2008). La concentración máxima de fósforo soluble fue de 17,189 ppm superando ampliamente 5,52 ppm reportadas por Farro & Graus (2013) para enterobacterias aisladas de malezas.

El 76,44% de las enterobacterias produjeron indoles, reguladores del crecimiento asociados al efecto benéfico de las PGPR (Loredo et al., 2004; Camelo et al., 2011). Según Soler et al. (2012) la capacidad de síntesis de indoles se atribuye a las bacterias del suelo asociadas a las plantas y se ha estimado que 80% de las bacterias aisladas de la rizósfera producen ácido indolacético. Las bacterias de los géneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Serratia* produjeron indoles, capacidad demostrada previamente por Farro & Graus (2013) en

Citrobacter y *Klebsiella* spp., Carcaño et al. (2006) en *Enterobacter* spp. y Koo & Cho (2008) en *Serratia* spp.

En la reacción colorimétrica de Salkowski utilizada para la cuantificación, la concentración de indoles es directamente proporcional a la intensidad del color grosella observado, como resultado de una reacción oxidativa de acidez, en la que por una transaminación un grupo amino del indol es sustituido por el cloro del cloruro férrico (Mantilla, 2007). La máxima concentración de amonio fue de 41,802 ppm, valor que se encuentra en el rango 9-52 ppm registrado por Carcaño et al. (2006), Koo & Cho (2008) y Hernández et al. (2014b) para aislados de maíz y malezas.

Ocho cultivos de enterobacterias se seleccionaron por alcanzar independientemente los mayores valores en la concentración de amonio, fósforo soluble e indoles producidos, porque no necesariamente un solo cultivo alcanzó las máximas concentraciones en las tres características investigadas. Asimismo, Carcaño et al. (2006), demostraron que especies de *Klebsiella* presentaron alta actividad de la enzima nitrogenasa, pero mínima producción de indoles o viceversa.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno, solubilizadores de fosfato y productoras de indoles de los géneros *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Serratia* demostraron su potencial como promotoras de crecimiento en plantas de espárrago, incrementando la altura y número de tallos. El efecto positivo de estos géneros bacterianos también fue reportado en maíz (Morales et al., 2011; Hernández et al., 2014), *Lolium perenne* (Schoebitz et al., 2009), *Cajanus cajan* (Rani et al., 2011), *Lycopersicon esculentum* “tomate” (Sánchez et al., 2009) y *Salicornia bigelovii* (Rueda et al., 2009).

La altura de las plantas de espárrago se incrementó hasta 55,9%, superando 25% reportado por Hernández et al. (2015) en maíz inoculado con *Serratia* sp. El número de tallos se incrementó hasta 349,4%, observándose plantas con vigor y biomasa aérea abundante en comparación con el testigo, mayoritariamente con *Serratia* sp.5.14 y *Enterobacter* sp.33.84 seleccionados por alcanzar el mayor valor en la concentración de nitrógeno fijado como amonio. Este

resultado se atribuye al nitrógeno fijado y fosfato solubilizado por las bacterias (Carreño, 2009; Hernández et al., 2015) y según la hipótesis aditiva a la interacción de los mecanismos directos e indirectos de las PGPR, que ejercen un efecto benéfico multiparamétrico en las plantas, incrementado el desarrollo vegetativo y rendimiento de los cultivos agrícolas (Kloepper, 2003; Carreño, 2009).

VI. CONCLUSIONES

- ✓ En el rizoplano y rizósfera de espárrago se aislaron enterobacterias, identificándose fenotípicamente *Enterobacter* (76,96%), *Serratia* (9,95%), *Klebsiella* (6,81%) y *Citrobacter* (6,28%).
- ✓ Las enterobacterias fijaron *in vitro* nitrógeno, solubilizaron fosfato tricálcico y produjeron indoles, cuantificándose 5,152 a 27,542 ppm de amonio; 1,293 a 17,189 ppm de fósforo soluble y 0,244 a 41,802 ppm de indoles.
- ✓ Los ocho cultivos de enterobacterias seleccionados correspondieron a *Serratia* sp.5.14 y *Enterobacter* sp.33.84 con 27,542 y 27,413 ppm de amonio; *Enterobacter* sp.71.159 y *Klebsiella* sp.30.74 con 17,189 y 8,605 ppm de fósforo soluble; *Serratia* sp.24.59 y *Enterobacter* sp.26.67 con 41,802 y 39,135 ppm de indoles; *Enterobacter* sp.35.88 con 21,972 ppm de amonio y 4,082 ppm de fósforo soluble y *Klebsiella* sp.34.86 con 24,619 ppm de amonio y 19,577 ppm de indoles.
- ✓ Las enterobacterias demostraron su potencial como promotoras de crecimiento en plantas, incrementando la altura (IE= 3,9 a 55,4%) y el número de tallos (IE= 16,5 a 300%) de plantas de espárrago, en condiciones de invernadero.

VII. RECOMENDACIONES

- ✓ Identificar a nivel molecular *Enterobacter* spp.33.84; 71.159; 26.67; 35.88; *Serratia* spp.5.14; 24.59, *Klebsiella* spp.30.74 y 34.86.
- ✓ Determinar el efecto de *Enterobacter* spp.33.84; 71.159; 26.67; 35.88; *Serratia* spp.5.14; 24.59 y *Klebsiella* spp.30.74 y 34.86 en el desarrollo vegetativo y rendimiento de espárrago en condiciones de campo, con y sin fertilizante químico.
- ✓ Investigar sustratos orgánicos de bajo costo para el incremento masivo de *Enterobacter* spp.33.84; 71.159; 26.67; 35.88; *Serratia* spp.5.14; 24.59, *Klebsiella* spp.30.74 y 34.86.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Agrobanco (2007). Área de desarrollo. Cultivo de espárrago. Lima, Perú. Recuperado de http://www.agrobanco.com.pe/pdfs/publicacionagroinforma/2_cultivo_del_esparago.pdf
- Altamirano, C., Carreño, C., Plasencia, V., Ramírez, L., Silva, J., & Ugaz, F. (2014). *Bacterias rizosféricas y endófitas fijadoras de nitrógeno*. Perú: Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Alvarado, P. & Valderrama, M. (2014). *Caracterización de los géneros Burkholderia y Pseudomonas solubilizadoras de fosfato aisladas de Zea mays L. en el distrito de Reque en Lambayeque, marzo-mayo de 2014*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Álvarez, C., Osorio, N., & Marlin, M. (2013). Identificación molecular de microorganismos asociados a la rizósfera de plantas de vainilla en Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 18(2), 293-306.
- Álvarez, C. (2012). *Identificación y caracterización bioquímica, morfológica y molecular de microorganismos cultivables asociados a la rizósfera y el sustrato de plantas de vainilla*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Asprelli P., López F. & Cointry E. (2005). Caracteres agronómicos en el cultivo de espárrago de diferentes edades y manejos. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 40(1), 47-52.

- Balakrishna, G., Shiva, A. & Kumar, P. (2012). Isolation of phosphate solubilizing actinomycetes from forest soils of Mahabubnagar district. *IOSR Journal of Pharmacy*, 2 (2), 271-275.
- Bashan, Y., Holguin, G. & Ferrera, R. (1996). Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos I. *Azospirillum*. *Terra*, 14(2), 159-194.
- Barrera G., Fernández, C., Wong I. & Ramírez, P. (2013). La sensibilidad del grupo coliforme como indicador de la presencia de enterobacterias patógenas en cuatro cuerpos acuáticos de Mexico. *Hidrobiológica*, 23 (1), 227-298.
- Beracochea, M. (2011). *Respuesta de variedades comerciales de maíz (Zea mays L.) a la inoculación con bacterias endófitas diazótrofes nativas*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de la República, Uruguay.
- Bharucha, U., Prajapati, V., Patel, K. & Trivedi, V. (2011) Catecholate type of siderophore production by *Enterobacter* sp. UB4 isolated from rhizospheric soil of alfalfa plant. *Journal of Cell and Tissue Research*, 11(3) 2967-2971.
- Bhattacharyya, P. & Jha, D. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 28, 1327-1350.
- Bobadilla, C. & Rincón, C. (2008). *Aislamiento y evaluación de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenidos de residuos de plaza*. (Tesis de Microbiología Industrial). Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- 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 Ruiz Gallo, Perú.
- Camelo, M., Vera, S. & Bonilla, R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 12 (2), 159-166.
- Carcaño, M., Ferrera, R., Pérez, J., Molina, J. & Bashan, Y. (2006). Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle. *Terra Latinoamericana*, 24 (4), 493-502.
- 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.

- Castagnino A.; Díaz K.; Sastre P.; Rosini M. & Sasale S. (2011). La densidad y tamaño de plántulas con cepellón en la producción de espárrago verde. *Agronomía Mesoamericana*, 22 (1), 63-70.
- Cordero, J., Ortega, P. & Ortega, E. (2008). La inoculación de plantas con *Pantoea* sp., bacteria solubilizadora de fosfatos, incrementa la concentración de P en los tejidos foliares. *Revista Colombiana de Biotecnología*, (1), 111-121.
- Córdova E., Lespada M., Gomez N., Pasteran, F., Oviedo, V. & Rodriguez C. (2013). Descripción clínica y epidemiológica de un brote nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC en Buenos Aires, Argentina. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30 (7), 376-379.
- 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.
- 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.
- Criollo, P., Obando M., Sánchez, L. & Bonilla, R. (2012). Efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) asociadas a *Pennisetum clandestinum* en el altiplano cundiboyacense. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 13(2), 189-195.
- Dávila, J. (2004). *Elementos para una agricultura orgánica e introducción de cultivos alternativos para suelos con problemas de salinidad*. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Dávila, J. & Linares, V. (2013). *Especies de Burkholderia y Pseudomonas aislados de la rizósfera de Jatropha curcas L. "piñón blanco" y su potencial como promotores del crecimiento de plantas en Lambayeque, 2012*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Delgado, A. (2007). *Producción y comercialización de espárrago en el valle de Virú*. (Tesis de Maestría). Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, Perú.
- Delgado, Y., Cupull, R., Pérez, C., Sánchez, A. & Vílchez, M. (2003). Efecto de *Azotobacter* spp. en la estimulación de la germinación y el desarrollo de posturas de *Coffea arabica* L. *Centro Agrícola*, 30(1), 26-32.
- Díaz, P., Ferrera, R., Almaraz, J. & Alcántara, J. (2001). Inoculación de bacterias promotoras del crecimiento en lechuga. *Terra*, 19(4), 327-335.
- Dossi, M., Escalona, M., Serrano, C., Silva, M., Juliet, C., Fernández, A., Leiva, V. & Fernández, J. (2002). *Serratia marcescens*: Descripción de un brote de infección intrahospitalaria. *Revista Chilena de Infectología*, 19 (4), 262-266.

- 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.
- 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.
- Farro, O., & Graus, A. (2013). *Potencial como promotoras del crecimiento de plantas de las enterobacterias aisladas de la rizósfera de malezas asociadas a Zea mays L. "maíz", en Lambayeque, 2013.* (Tesis De Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Escobar, C. & Horna, Y. (2011). *Caracterización de cepas nativas de Azotobacter spp. y su efecto en el desarrollo de "tomate" (Lycopersicon esculentum Mill.).* (Tesis de Licenciatura) Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- 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.
- Garcia, F., Muñoz, H., Carreño, C. & Mendoza, G. (2010). Caracterización de cepas nativas de *Azospirillum* spp. y su efecto en el desarrollo de *Oryza sativa* L. "arroz" en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 1, 107-116.
- García, R.; Lovaisa, N. & Ulla E. (2015). Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfatos del Noroeste Argentino y su efecto en la promoción de crecimiento en maíz (*Zea mays* L.). *Revista Agronómica Noroeste Argentino*, 35 (1), 19-28.
- Guillén, R., Hernández, F., Gallegos, G., Rogriguez, R., Aguilar, C., Padron, E. & Reyes, M. (2006). *Bacillus* sp., como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* sp., *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.
- Gyaneshwar, P., James, E., Mathan, N., Reddy, P., Reinhold, B. & Ladha, J. (2001). Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 183(8), 2634-2645.

- Hernández, A., Heydrich, M., Velázquez, M. & Hernández, A. (2006). Perspectivas del empleo de rizobacterias como agentes de control biológico en cultivos de importancia económica. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24 (1), 42-49.
- Hernández, E. (2015). *Caracterización de bacterias endófitas diazotróficas aisladas de tallos y hojas de Oryza sativa L. "arroz", Lambayeque, marzo-mayo de 2014*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Hernández, F., Velásquez, K., Carreño, C., Lloclla, H., Estela, C. & Altamirano, C. (2014b). Efecto de enterobacterias en el desarrollo vegetativo de *Zea mays* en invernadero. *UCV-Hacer*, 4 (1), 10-19
- Hernández, R., Fernández, C. & Baptista, P. (2014a). *Metodología de la Investigación (6^{ta} ed)*. México: Mc Graw, Hill Interamericana Editores S.A.
- Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Stanley, J. & Williams, S. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. (9thed.) Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins
- Idriss, E., Iglesias, D., Talon, M. & Borris, R. (2004). Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular Plant-Microbe Interactions (MPMI)*, 20(6), 619-626.
- 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.
- Kaviyasari, A. & Ambikapaty, V. (2011). Insolation, identification and molecular chracterization of phosphate solubilizing actinomycetes isolated from the coostal region of Manora, Thanjavur (Dt). *Asian Journal of Pharmecy and Technology*, 1 (40), 119-122.
- 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.
- Koo, S. & Cho, S. (2009). Isolation and characterization of a plant growth- promoting rhizobacterium, *Serratia* sp.SY5. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(11), 1431–1438.
- 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.

- Lisboa, C. & Segura, A. (2010). Rendimiento de polihidroxialcanoatos de cepas de *Cupriavidus necator* aisladas de rizósfera de *Zea mayz* “maíz”, en Reque, Lambayeque, 2010 (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Loredo, C., López, L. & Espinosa, D. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana*, 22 (2), 225-239.
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Lee J., Saravanan, V., Lee K. & Santhanotrishnan, P. (2010). *Enterobacter arachidis* sp. nov, a plant-growth-promoting diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of groundnut. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 1559-1564.
- Mantilla, M. (2007). *Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (Chrysanthemum morifolium var. Yoko ono) en periodo de enraizamiento*. (Tesis Microbiólogo Agrícola Veterinario). Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- 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.
- Ministerio de Agricultura y Riego, MINAGRI, 2014. Producción de espárragos en el Perú. Recuperado de <http://larepublica.pe/impresaeconomia/701334-la-libertad-ocupa-el-primer-lugar-en-produccion-de-esparragos>
- Morales, Y., Juárez, D., Aragón, C., Mascarua, M., Bustillos, M., Fuentes, L., Martínez, R. & Muñoz, J. (2011). Growth response of maize plantlets inoculated with *Enterobacter* sp., as a model for alternative agriculture. *Revista Argentina de Microbiología*, 43, 287-293.
- Municipalidad Distritos de Guadalupe (2016). Plan de Desarrollo concertado Distrito de Guadalupe. 2016-2021. Recuperado de http://www.mdg.gob.pe/Transparencia/Gestion/PDC_2016_2021.pdf
- Ogho, F. & Okonkwo, J. (2012). Some characteristics of a plant growth promoting *Enterobacter* sp. isolated from roots of maize. *Advances in Microbiology*, (2), 368-374.
- Orozco, C. & Martínez, P. (2009). Evaluación de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno asimbióticos aislados de la rizósfera de *Pinus patula* en Colombia. *Bosque*, 30 (2), 70-77.

- Pedraza, R., Teixeira, K., Fernández, A., García, I., Baca, B., Azcón, R., Baldani, V. & Bonilla, R. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. *Revisión. Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 11 (2), 155-164.
- Pelletier, N., Andsley, E., Brodt, S., Garnett, T., Henriksson, P., Kendall, A. (...) & Troell, M. (2011) Energy intensity of agriculture and food systems. *Annual Review of Environment and Resources*, 36(1), 223-246.
- Puerta, A. & Mateos, F. (2010). Enterobacterias. Recuperado de:
<http://www.farmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias-Medicine 2010.pdf>
- 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"*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Perú.
- Rani, M., Arundhathi, & Reddy, G. (2011). *Bacillus cereus* and *Enterobacter cancerogenus* screened for their efficient plant growth promoting traits rhizobacteria (PGPR) and antagonistic traits among sixteen bacterial isolates from rhizospheric soils of Pigeon pea. *African Journal of Microbiology Research*, 5 (15), 2090-2094.
- Reyes, N. (2006). *Factibilidad de empresas productora y procesadora - exportadora de espárrago verde*. (Tesis de Ingeniería). Pontificia Universidad Católica del Perú, 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 lignocelulosicos de higuera (Ricinus communis)*. (Tesis de Especialidad). Universidad Católica de Manizales, Colombia.
- Rueda, E., Villegas, J., Gerlach L., Tarazón, M., Murillo, B., García, J., Troyo, E. & Preciado, P. (2009). Efecto de la inoculación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal sobre la germinación de *Salicornia bigelovii*. *Terra Latinoamericana*, 27, 345-354.
- Sánchez D., Gómez R., Garrido M. & Bonilla R. (2012). Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(7), 1401-1415.

- Salaheddin, K., Valluvaparidasan, V., Ladhakshmi, D. & Velazhahan, R. (2010). Management of bacterial blight of cotton using a mixture of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *Plant Protection Science*, 46 (2), 41 – 50.
- Salhia, B. (2010). *The effect of Azotobacter chroococcum as nitrogen biofertilizer on the growth and yield of Cucumis sativus*. (Degree of Master). The Islamic University, Gaza.
- Salazar, E. & Nieves, B. (2011). Acinetobacter spp: Aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25 (2), 64-71.
- Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA, (2010). Uso de fertilizantes. Recuperado de <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrollorural/documens/fichasaapt/uso%20de%20fertilizantes>
- Schoebitz, M. (2006). *Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de Lolium perenne L. de suelo volcánico (modelo género Azospirillum sp.)*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Austral de Chile, Chile.
- Schoebitz, M., Ribaud, C., Pardo, M., Cantore, M., Ciampi, L. & Curá, J. (2009). Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, (41), 1768- 1774.
- Soler, J., Posada, L. & Perez, J. (2012). Distribucion diferencial de bacterias con potencial biocontrolador de *Spongospora subterranea* en plantas de papa (*Solanum tuberosum* cv. Diacol Capiro). *Revista Facultad Nacional Agonomía Medellin*, 65(1), 6337-6348.
- Torres, M.; Valencia, S.; Bernal, J. & Martinez, P. (2000). Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., producers of indole-3- acid and siderophores, from Colombian rice rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42, 171-176.
- Torres, R., Pérez, C. & Suárez, N. (2003). Influencia de la inoculación de rizobacterias sobre la germinación de semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Centro Agrícola*, 30; 56-60.
- Vásquez, A., Díaz, N., Vásquez, O. & Vásquez, W. (2012). *Metodología de la Investigación Científica*. Lambayeque, Perú: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- Vázquez, P., Holguin, G., Puente, M., López, A. & Bashan, Y. (2000). Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils*, 30: 460-468.

Zeinat, K., Nagwa, M., El Sayed, S. & Abd, G. (2010). Optimization of microbial biomass production as biocontrol agent against root knot nematode on faba plants. (2010). *Journal of American Science*, 6(6), 245-255.

IX. ANEXOS

ANEXO 1

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

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

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

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

Dónde:

n = Tamaño de la muestra

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

p = Prevalencia de enterobacterias 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 enterobacterias

a. Agar Mac Conkey (en Cadena & Martínez, 2011)

Componentes	gL ⁻¹
Peptona	17,0
Pluripeptona	3,0
Lactosa	10,0
Mezcla de sales biliares	1,5
NaCl	5,0
Rojo neutro	0,03
Cristal violeta	0,001
Agar	13,5
Agua destilada	1000 mL

b. 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

c. 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
Tryptona	1,0
Extracto de levadura	1,0
Extracto de suelo al 10 %	250mL
Agua destilada	750mL

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

d. 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.

e. 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

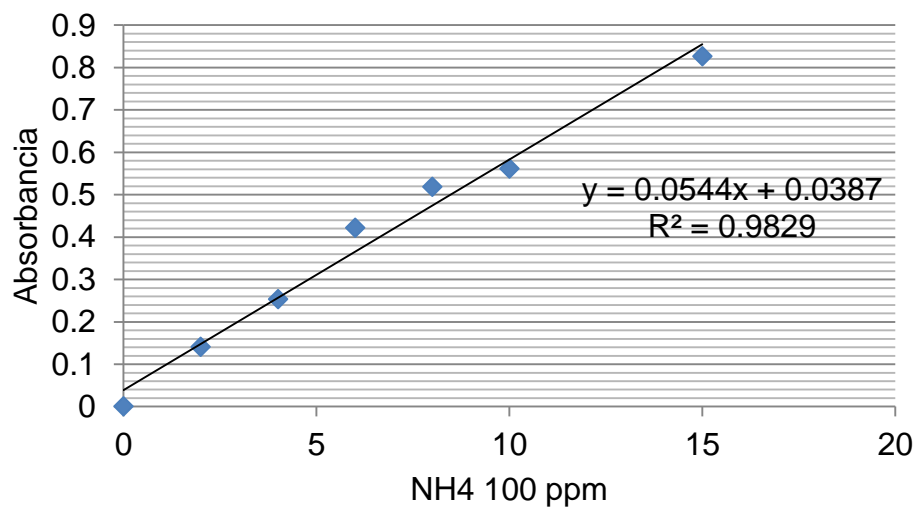
b.3 Procedimiento para la cuantificación de amonio por colorimetría

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

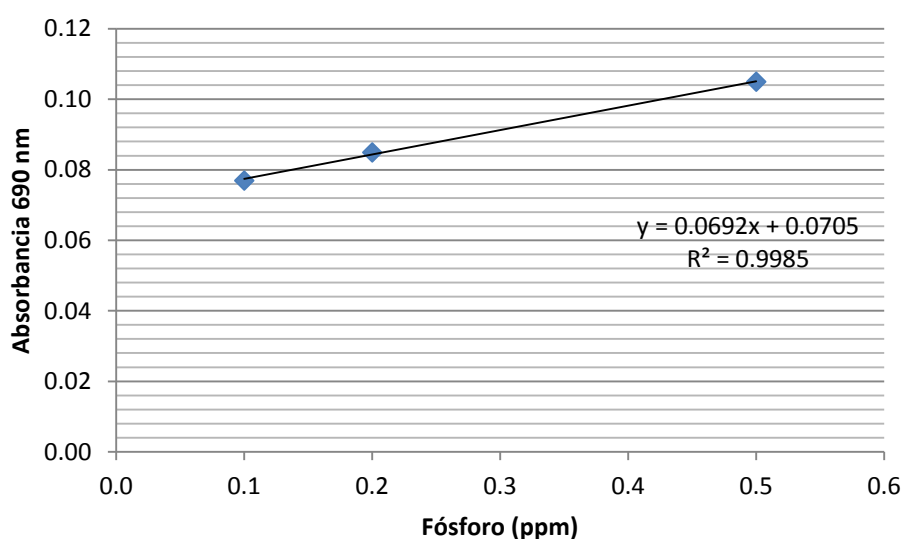
Esperar 20 minutos y efectuar las lecturas en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 690nm en cubetas de 10cm. Construir la curva de calibración. Los datos de la absorbancia corregida se analizan mediante regresión lineal con el programa Microsoft Excel 2007 para obtener la ecuación de la recta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

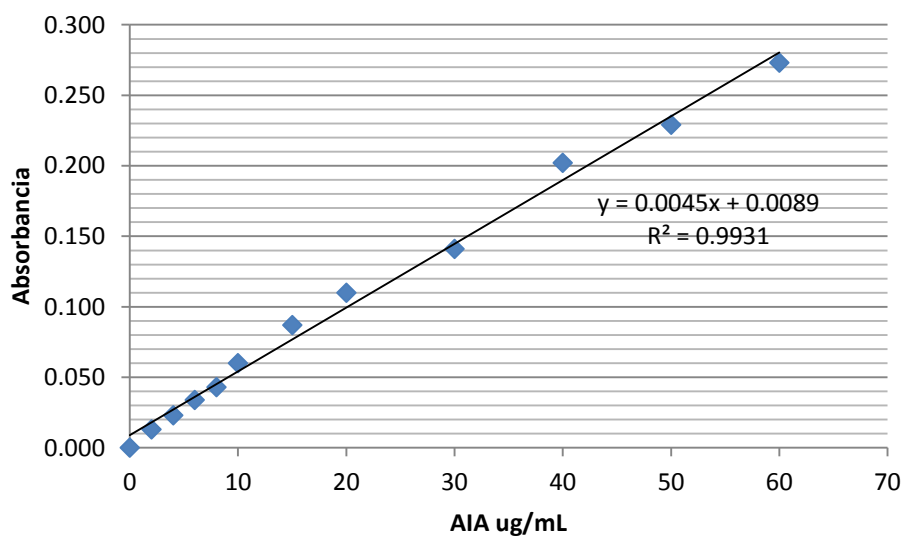
b.3. Procedimiento para la cuantificación de AIA por colorimetría

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	,467	3	,981
2	,525	3	,946
3	,593	3	,873
4	,378	3	,999
5	,551	3	,922
6	,494	3	,967
7	,563	3	,909
8	,361	3	,999
9	,455	3	,986
10	,520	3	,950

Prueba de homogeneidad de varianzas

ALTURA A LOS 30 DÍAS

Estadístico de Levene	g/1	g/2	Sig.
2,357	9	20	,053

Anova de un Factor

ALTURA A LOS 30 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter- grupos	3060,145	9	340,016	6,457	,000
Intra- grupos	1053,227	20	52,661		
Total	4113,372	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	,999
2	,175	3	,998
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	,992
10	,253	3	,991

Prueba de homogeneidad de varianzas

NÚMERO DE TALLOS A LOS 30 DÍAS

Estadístico de Levene	g/1	g/2	Sig.
2,207	9	20	,067

Anova de un Factor

NÚMERO DE TALLOS A LOS 30 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	111,467	9	12,385	4,954	,001
Intra-grupos	50,000	20	2,500		
Total	161,467	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	,540	3	,932
2	,552	3	,921
3	,750	3	,626
4	,554	3	,919
5	,500	3	,964
6	,557	3	,916
7	,550	3	,923
8	,588	3	,880
9	,815	3	,520
10	,467	3	,981

Prueba de homogeneidad de varianzas

ALTURA A LOS 45 DÍAS

Estadístico de Levene	g/1	g/2	Sig.
,955	9	20	,503

Anova de un Factor

ALTURA A LOS 45 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2994,408	9	332,712	6,491	,000
Intra-grupos	1025,167	20	51,258		
Total	4019,575	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	,999
2	,253	3	,991
3	,292	3	,960
4	,175	3	,998
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.
2,657	9	20	,033

Anova de un Factor

NÚMERO DE TALLOS A LOS 45 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	117,200	9	13,022	4,439	,003
Intra-grupos	58,667	20	2,933		
Total	175,867	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	,991
2	,253	3	,991
3	,343	3	,871
4	,253	3	,991
5	,175	3	,998
6	,229	3	,997
7	,191	3	,999
8	,200	3	,960
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.
3,093	9	20	,017

Anova de un Factor

ALTURA A LOS 60 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2555,673	9	283,964	6,332	,000
Intra-grupos	896,947	20	44,847		
Total	3452,620	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	,998
10	,292	3	,960

Prueba de homogeneidad de varianzas

NÚMERO DE TALLOS A LOS 60 DÍAS

Estadístico de Levene	g/1	g/2	Sig.
2,006	9	20	,094

Anova de un Factor

NÚMERO DE TALLOS A LOS 60 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	235,633	9	26,181	6,600	,000
Intra-grupos	79,333	20	3,967		
Total	314,967	29			