



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



**Bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de
Asparagus officinalis L. y su efecto en el desarrollo
vegetativo de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate”**

TESIS

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

PRESENTADA POR:

Br. Liz Bettina Silva Vilcabana

Br. Gabriel Esteban Zuñiga Valdera

LAMBAYEQUE, PERÚ

2017

**Bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de
Asparagus officinalis L. y su efecto en el desarrollo
vegetativo de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate”**

TESIS

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

APROBADA POR:

MSc. Clara Cueva Castillo

PRESIDENTE

Dr. Eduardo Tejada Sánchez

SECRETARIO

Dra. Gianina Llontop Barandiarán

VOCAL

Dra. Carmen Carreño Farfán

PATROCINADORA

LAMBAYEQUE, PERÚ

2017

AGRADECIMIENTOS

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

Un agradecimiento muy especial a nuestra asesora la Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán quien se comprometió con nosotros desde el inicio transmitiéndonos su conocimiento y sobre todo por su paciencia y dedicación, por ser la gran persona y amiga, por forjarnos para dar por terminado nuestros objetivos.

Especial reconocimiento merecen nuestros Padres que sin la ayuda y apoyo incondicional de cada uno de ellos no hubiera sido esto posible.

DEDICATORIA

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

*A mis padres María Antonieta Vilcabana Sánchez y
Fernando Núñez Idrogo
por haberme brindado la mejor educación y lecciones
de la vida e impulsándome a ser mejor cada día los amo
infinitamente.*

*A mis hermanos Manuel y María Fernanda por su
apoyo moral y su cariño brindado constantemente.*

A mi gran compañero de tesis Gabriel.

LIZ BETTINA SILVA VILCABANA

DEDICATORIA

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

*A mi madre Angelica Valdera Chero por su infinito
amor y comprensión, por haberme proporcionado la mejor
educación y lecciones de la vida e impulsarme a ser mejor
persona cada día la amo infinitamente.*

*A mi hermana querida Ana Elizabeth, Zuñiga
Valdera por su apoyo moral y su cariño brindado
constantemente, es la mejor hermana que puedo tener.*

*A mi gran amor que encontré en la
universidad Liz Bettina Silva Vilcabana con la cual
inicié este proyecto y a mis amigos de mi código
2012-II son los mejores.*

GABRIEL ESTEBAN ZUÑIGA VALDERA

Índice

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II.MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. Antecedentes de la investigación.....	4
2.2. Base teórica.....	7
2.2.1. <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. “tomate”.....	9
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1. Materiales.....	11
3.1.1. Material biológico.....	11
3.1.2. Población y muestra.....	11
3.2. Métodos.....	11
3.2.1. Variable de la fase descriptiva.....	11
3.2.2. Variables de la fase explicativa.....	12
3.2.3. Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis.....	12
3.2.4. Reactivación de cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno.....	12
3.2.5. Primera fase: Cuantificación de nitrógeno, fosfato solubilizado e indoles producidos.....	16
3.2.6. Segunda fase: Efecto de bacterias fijadoras de nitrógeno en el desarrollo de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.....	17
3.2.7. Análisis estadístico de los datos.....	27
IV. RESULTADOS.....	30
4.1. Nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos.....	30
4.2. Efecto de 24 cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno en desarrollo vegetativo de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.....	30
4.3. Cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionados.....	37
4.4. Efecto de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas en el desarrollo vegetativo y reproductivo de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.....	46
V. DISCUSIÓN.....	68
VI. CONCLUSIONES.....	72
VII.RECOMENDACIONES.....	73
VIII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
ANEXOS.....	85

Índice de tablas

Tabla 1.	Cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno.....	13
Tabla 2.	Nitrógeno fijado como amonio, fósforo soluble e indoles producidos por bacterias fijadoras de nitrógeno.....	31
Tabla 3.	Índices de efectividad en la altura de plantas de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., 15, 30, 45 y 60 después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno.....	34
Tabla 4.	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la altura de plantas de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. 15, 30, 45 y 60 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno.....	35
Tabla 5.	Índices de efectividad (%) y prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la longitud de raíces de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., 60 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno.....	43
Tabla 6.	Índices de efectividad (%) en la altura de planta y longitud de raíces de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. por bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas.....	45
Tabla 7.	Índices de efectividad (%) en la emergencia y altura de plantas de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. por bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas.....	48
Tabla 8.	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la altura de plantas de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., 15 y 30 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas.....	50
Tabla 9.	Índices de efectividad (%) en la altura de plantas de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. por bacterias fijadoras de nitrógeno inoculadas a la siembra y trasplante.....	53
Tabla 10.	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la altura de plantas de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., 45, 60, 75 y 90 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno a la siembra y trasplante.....	54

Tabla 11.	Índices de efectividad (%) al 50% de la floración en <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., por bacterias fijadoras de nitrógeno inoculadas a la siembra y trasplante.....	61
Tabla 12.	Índices de efectividad (%) al 50% de la fructificación en <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., por bacterias fijadoras de nitrógeno inoculadas a la siembra y trasplante.....	63
Tabla 13.	Número y peso de frutos comerciales por planta de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.....	66
Tabla 14.	Índices de efectividad (%) en el número y peso de frutos de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill por bacterias fijadoras de nitrógeno a la siembra y trasplante.....	67
Tabla 15.	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (%) del número y peso de frutos de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. inoculado con bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas.....	67

Índice de figuras

Figura 1.	Análisis físico-químico de suelo agrícola experimental, 2017.....	20
Figura 2.	Diseño completamente aleatorio para determinar el efecto de 24 cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno en la altura de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.....	14
Figura 3.	Diseño completamente aleatorio para determinar el efecto de diez cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno y dos testigos en el desarrollo de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill."tomate".....	15
Figura 4.	Suelo agrícola, arena de río y humus.....	19
Figura 5.	Suelo experimental contenido en macetas de arcilla.....	19
Figura 6.	Semillas de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. en placas de Petri.....	22
Figura 7.	Semillas de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. germinadas.....	22
Figura 8.	Semillas de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. inoculadas con bacterias fijadoras de nitrógeno.....	23
Figura 9.	Medición de altura de planta de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.....	23
Figura 10.	Suelo experimental contenido en vasos de tecnopor.....	25
Figura 11.	Plántulas de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. cultivadas durante 10 días en condiciones de invernadero.....	25
Figura 12.	Inmersión de raíces de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. en inóculo de bacteria fijadora de nitrógeno.....	26
Figura 13.	Tomates de primera, segunda y tercera calidad.....	28
Figura 14.	Plantas de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. cultivadas 15 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno.....	32
Figura 15.	Altura (cm) de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. 15 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno, 2017.....	33
Figura 16.	Altura (cm) de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. 30 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno, 2017.....	36
Figura 17.	Altura (cm) de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. 45 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno, 2017.....	38
Figura 18.	Plantas de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. 60 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno, (a) <i>Azospirillum</i> sp.6, (b) <i>Herbaspirillum</i> sp.77, (c) <i>Herbaspirillum</i> sp.15.....	39

Figura 19.	Altura (cm) de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. 60 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno, 2017.....	40
Figura 20.	Plantas de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. 60 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno, (a) <i>Azotobacter</i> sp.44.55, (b) <i>Azospirillum</i> sp.3, (c) <i>Herbaspirillum</i> sp.19.....	41
Figura 21.	Longitud (cm) de raíces de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. 60 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno, 2017.....	42
Figura 22.	Cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas.....	44
Figura 23.	Emergencia de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., 7 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas, 2017.....	47
Figura 24.	Emergencia de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., 7 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas, 2017.....	48
Figura 25.	Altura de plantas de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., 15 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas, 2017.....	49
Figura 26.	Altura (cm) de plantas de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., 15 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas, 2017.....	50
Figura 27.	Altura de plantas de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., 30 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas, 2017.....	51
Figura 28.	Altura (cm) de plantas de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., 30 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas, 2017.....	51
Figura 29.	Altura de plantas de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., 45 días después de la inoculación de <i>Azotobacter</i> sp.33.36, 2017.....	52
Figura 30.	Altura de plantas de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., 45 días después de la inoculación de <i>Gluconacetobacter</i> sp.49, 2017.....	52

Figura 31.	Altura (cm) de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., 45 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas, 2017.....	53
Figura 32.	Altura de plantas de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., 60 días después de la inoculación de <i>Azotobacter</i> sp.28.6, 2017.....	56
Figura 33.	Altura de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. 60 días después de la inoculación de <i>Gluconacetobacter</i> sp.49, 2017.....	56
Figura 34.	Altura (cm) de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. 60 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas, 2017.....	57
Figura 35.	Altura de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. 75 días después de la inoculación de <i>Azotobacter</i> sp.28.6, 2017.....	57
Figura 36.	Altura (cm) de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. 75 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas, 2017.....	58
Figura 37.	Altura de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. 90 días después de la inoculación de <i>Herbaspirillum</i> sp.19 (a) y <i>Azotobacter</i> sp.28.6 (b).....	58
Figura 38.	Altura (cm) de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. 90 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas, 2017.....	59
Figura 39.	Flores de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.....	60
Figura 40.	Plantas de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. en floración, 2017.....	60
Figura 41.	Días al 50% de la floración en <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., inoculado con bacterias fijadoras de nitrógeno a la siembra y al trasplante.....	61
Figura 42.	Fructificación de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., (a) Testigo absoluto, (b) Testigo químico, (c) <i>Herbaspirillum</i> sp.19.....	62
Figura 43.	Fructificación de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., (a) Testigo absoluto, (b) Testigo químico, (c) <i>Azospirillum</i> sp.19.....	62
Figura 44.	Días al 50% de la fructificación en <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., inoculado con bacterias fijadoras de nitrógeno a la siembra y trasplante.....	63

Figura 45.	Fructificación de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. 127 días después de la inoculación de <i>Azospirillum</i> sp.18.....	64
Figura 46.	Fructificación de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. 128 días después de la inoculación de <i>Gluconacetobacter</i> sp.49 (a), <i>Azotobacter</i> sp.28.6 (b), <i>Azospirillum</i> sp.13 (c).....	64
Figura 47.	Frutos comerciales de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., inoculado con bacterias fijadoras de nitrógeno a la siembra y trasplante.....	65

RESUMEN

La presente investigación se realizó con el objetivo de investigar la solubilización de fosfato y producción de indoles por bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de *Asparagus officinalis* L. y determinar el efecto de su inoculación en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill. "tomate". Mediante técnicas colorimétricas se cuantificó el nitrógeno fijado como amonio, fósforo soluble producto de la solubilización de fosfato tricálcico e indoles producidos *in vitro* por las bacterias. En el invernadero se realizaron dos ensayos, el primero con 24 cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno en inoculación simple a las semillas antes de la siembra y el segundo con diez cultivos de bacterias con inoculación doble en las semillas y las raíces al momento del trasplante. El diseño experimental fue completamente aleatorio incluyendo los testigos químicos (NPK) y absoluto. Las bacterias fijadoras de nitrógeno solubilizaron fosfato tricálcico (10,39 a 33,55ppm de fósforo soluble) y produjeron indoles (22,47 a 195,80ppm). Estas bacterias incrementaron el desarrollo de las plantas de tomate, destacando *Herbaspirillum* spp.15 y 19 con índices de efectividad de 25% en la emergencia; 1,74 a 14,26 de altura; 15,39 a 16,92% en el número de frutos y 20,71 a 22,54% en el peso de frutos. Se demostró el incremento en el desarrollo vegetativo y reproductivo del tomate por las bacterias fijadoras de nitrógeno.

Palabras clave: Bacteria diazotróficas, *Lycopersicon esculentum*, desarrollo.

ABSTRACT

The present investigation was carried out with the objective of investigating the solubilization of phosphate and production of indoles by nitrogen fixing bacteria isolated from *Asparagus officinalis* L. and to determine the effect of their inoculation on the development of *Lycopersicon esculentum* Mill. "Tomato". By means of colorimetric techniques, the nitrogen fixed as ammonium, soluble phosphorus product of the solubilization of tricalcium phosphate and indoles produced in vitro by the bacteria was quantified. In the greenhouse two tests were carried out, the first with 24 cultures of nitrogen-fixing bacteria in simple inoculation to the seeds before planting and the second with ten bacterial cultures with double inoculation in the seeds and roots at the time of transplant. The experimental design was completely randomized including the chemical (NPK) and absolute controls. The nitrogen-fixing bacteria solubilized tricalcium phosphate (10.39 to 33.55 ppm of soluble phosphorus) and produced indoles (22.47 to 195.80 ppm). These bacteria increased the development of tomato plants, highlighting *Herbaspirillum* spp. 15 and 19 with effectiveness rates of 25% in the emergency; 1.74 to 14.26 in height; 15.39 to 16.92% in the number of fruits and 20.71 to 22.54% in the weight of fruits. The increase in the vegetative and reproductive development of the tomato was demonstrated by the nitrogen-fixing bacteria.

Key words: Diazotrophic bacteria, *Lycopersicon esculentum*, development.

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate” es una de las principales hortalizas en el mundo, además de ser una de las de mayor valor económico (Escobar et al., 2011). En el Perú, la producción asciende a 235 700 TM por año y en la región Lambayeque se estima en 12 000 TM (Ministerio de Agricultura, 2016). La rentabilidad del cultivo requiere la aplicación de insumos químicos como los fertilizantes (Loredo et al., 2004), que correctamente aplicados incrementan la rentabilidad (Altamirano et al., 2014); sin embargo, la eficiencia de recuperación o porcentaje del nutriente aplicado que es absorbido por la planta, es en promedio 50, 30 y 60% para el nitrógeno, fósforo y potasio, NPK, respectivamente (SAGARPA, 2010). En el caso de los fertilizantes nitrogenados, el nitrógeno se pierde por volatilización, desnitrificación, lixiviación y erosión (Pedraza et al., 2010; Salhia, 2010; Aguado, 2012).

Las rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPR, Plant Growth Promoting Rhizobacteria) constituyen una alternativa, para disminuir el uso de fertilizantes químicos (Dibut, 2009; Germán, 2015). Estas bacterias benefician a los cultivos agrícolas mediante mecanismos directos, incrementando la disponibilidad de nutrientes y mecanismos indirectos o de control biológico de fitopatógenos (Camelo et al., 2011). Entre los mecanismos directos de las PGPR, destaca la fijación de nitrógeno, proceso en el cual el nitrógeno molecular es reducido a dos moléculas de amoníaco que rápidamente es asimilado por las plantas (Garrido, 2007; Ji et al., 2013).

El efecto positivo de las bacterias fijadoras de nitrógeno o diazotróficas se ha reportado en el cultivo de tomate (Dibut, 2009; Germán, 2015) y en otros como *Coffea arabica* L. “café” (Fernández, 2015), *Capsicum annuum* “pimentón” (Reyes et al., 2008), *Zea mays* “maíz” (Moreno y Galvis, 2013) y *Oryza sativa* “arroz” (Ji et al.,

2013); no obstante, también se informó que estas bacterias no presentaron el efecto positivo esperado en maíz (Reyes et al., 2008), *Brassica napus* L. “canola” (Yasari et al., 2008) y tomate (García, 2012a). El patrón no definido del efecto de las PGPR se asocia a metabolitos volátiles (Rico, 2009), alta concentración de auxinas (Camelo et al., 2011), variabilidad en la colonización, concentración de inóculo, competencia por nutrientes entre bacterias y especificidad bacteria-planta (García, 2012a).

Respecto a la especificidad, se ha determinado que las bacterias fijadoras de nitrógeno incrementan el desarrollo de plantas muy diferentes a las de su procedencia (Germán, 2015), pero también se han reportado resultados negativos (García, 2012a). En el laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas se aislaron bacterias fijadoras de nitrógeno en el suelo rizosférico y raíces de plantas de *Asparagus officinalis* L. “espárrago” (Delgado y Suyón, 2017) y se determinó en condiciones de laboratorio que tienen potencial como promotoras de crecimiento; sin embargo, no se ha investigado el efecto de estas bacterias en el desarrollo vegetativo de otros cultivos como el tomate en condiciones de invernadero, requisito indispensable para su aplicación en campo.

La presente investigación permitirá identificar bacterias propias de la región La Libertad con potencial para la biofertilización, generando valor agregado a la biodiversidad regional, a la vez que se disminuye el riesgo de la salud de los seres vivos y el efecto negativo de los insumos químicos en el ambiente. Por lo expuesto, se planteó el siguiente problema ¿Cuáles son las características de las bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de espárrago y como es su efecto en el desarrollo vegetativo y reproductivo de tomate en condiciones de invernadero? El objetivo general, fue caracterizar bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de espárrago y determinar su efecto en el desarrollo del tomate.

Los objetivos específicos fueron: Cuantificar el nitrógeno fijado, fósforo solubilizado e indoles producidos *in vitro* por 24 cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno, determinar el efecto de 24 cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno en la altura y longitud de raíces de plantas de tomate durante 60 días, seleccionar diez cultivos de bacterias con las que se alcanzaron los mayores valores en la altura y longitud de raíces y determinar el efecto de las bacterias seleccionadas en el

desarrollo vegetativo y reproductivo de plantas de tomate en condiciones de invernadero.

La hipótesis planteada fue: Las bacterias fijadoras de nitrógeno, solubilizan fosfatos, producen indoles e incrementan el desarrollo del cultivo de tomate en condiciones de invernadero.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

En una agricultura sostenible, las bacterias fijadoras de nitrógeno constituyen biofertilizantes de uso comercial para los cultivos agrícolas. El efecto de *Azotobacter* spp. se investigó en plantas de tomate, en condiciones de almácigo y campo definitivo. Las bacterias se aplicaron en las semillas antes de la siembra y en la rizósfera al momento del trasplante. En almácigo se incrementó 30-40% la población de plántulas, 30% la altura, 20% el número de hojas, 40% el diámetro de tallos y 52% la biomasa aérea y radicular. En campo definitivo se incrementó en 25% el número de flores y 40% el rendimiento, así como también se disminuyó en 40% el fertilizante químico nitrogenado. Los resultados evidenciaron que la aplicación de *Azotobacter* spp. posibilita disminuir en 5 días el periodo de almácigo, con incremento del rendimiento del cultivo de tomate (Dibut, 2009).

El efecto de cepas nativas de *Azotobacter* spp. se investigó en el cultivo de tomate. Las bacterias se aislaron de raíces y suelo rizosférico de tomate, *Lactuca sativa* L. “lechuga”, *Allium cepa* L. “cebolla”, *Spinacia oleracea* L. “espinaca”, *Daucus carota* L. “zanahoria” y *Beta vulgaris* L. “betarraga” y se identificaron fenotípicamente. Con base al ácido indolacético (AIA) producido y nitrógeno fijado, se seleccionaron las cepas TC30, ZC26, TC06 y TC20, bacterias que se inocularon en la rizósfera de plántulas de tomate de 20 días desarrolladas en invernadero. En el 82% de las muestras se aisló e identificó *Azotobacter* spp., cuantificándose 7 a 57ppm de AIA y 0,13 a 1,64ppm de amonio. Todas las bacterias influenciaron positivamente en el desarrollo vegetativo de tomate cv Rio Grande; observándose disminución en el número de días a la floración (1 a 7 días) e incremento en la altura, volumen radicular y peso de la biomasa total, aérea y radicular, con índices de efectividad de hasta 28,41; 27,58; 104,58; 101,20 y 191,74%, respectivamente. Se demostró el efecto positivo de *Azotobacter* spp. en el cultivo de tomate (Escobar et al., 2011).

El efecto de bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Azospirillum* se determinó en plantas de tomate. Las bacterias se aislaron de raíces previamente desinfectadas y sembradas en medio NFb semisólido y sólido sin nitrógeno, se identificaron fenotípicamente y se investigó la fijación de nitrógeno en caldo extracto de suelo y producción de ácido indolacético en caldo tripticasa soya suplementado con triptófano. Los tres cultivos de *Azospirillum* spp. con los mayores valores se inocularon en la rizósfera de plántulas de tomate, considerándose un testigo absoluto y un testigo químico. En el 33% de las muestras se aisló e identificó *Azospirillum* spp, cuantificándose 0,23 a 21,15ppm de nitrógeno fijado como amonio y 4,47 a 15,80ppm de ácido indolacético. En invernadero, las bacterias incrementaron la altura y biomasa aérea y radicular de las plantas de tomate, con índices de efectividad (IE) de hasta 145,84 y 20%, respectivamente. *Azospirillum* sp. BS14 con el mayor valor de amonio (21,15ppm) alcanzó los mayores IE, superando inclusive al testigo químico (Baiocchi y Saavedra, 2011).

El potencial biológico de bacterias de los géneros *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp. se investigó en condiciones de laboratorio. Las bacterias se aislaron de suelo rizosférico de tomate, se identificaron fenotípicamente y se cuantificó el ácido indolacético producido, nitrógeno fijado, fosfato solubilizado y antagonismo a hongos causantes de chupadera fungosa. Los ocho cultivos de bacterias con los mayores valores se inocularon en semillas de tomate cv Río Grande, en bandejas de germinación y después de 7 días se cuantificaron las plántulas normales, anormales, semillas no germinadas y se calculó el poder germinativo. En el 35% de las muestras se aisló e identificó *Burkholderia* y *Pseudomonas* spp., cuantificándose 0,75 a 2625ppm de AIA; 0,42 a 26,78ppm de amonio; 1,53 a 7,31 de fósforo soluble y se detectó antagonismo a *Fusarium* sp. y *Rhizoctonia solani*. El 37,5% de las bacterias incrementó el poder germinativo de las semillas, el 50% lo disminuyó y el 12,5% no lo afectó. Como promotoras de crecimiento se identificaron *P. putida* CT7 y CT54, *P. fluorescens* CT37 y *B. cepacia* CT30, demostrándose el potencial benéfico de estas bacterias en tomate (León, 2014).

Se realizó una investigación para determinar el efecto de la concentración de *Azotobacter* sp. sobre el crecimiento de plantas de tomate. La bacteria fue aislada de la rizósfera de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar” en agar Ashby-sacarosa

previo enriquecimiento en caldo. El ensayo se realizó bajo un diseño clásico con cuatro grupos: G1 plántulas con agua destilada y G2–G4: *Azotobacter* spp. en las concentraciones 3×10^8 ; 6×10^8 y 9×10^8 UFCmL⁻¹. Se preparó un semillero en tierra de almácigo, lombriabono y 160 semillas de tomate. Se seleccionaron 80 plántulas para trasplantarlas en macetas con suelo franco–arenoso y aplicar 1mL del tratamiento correspondiente. A los 20 días se registró incremento en la longitud, peso radicular, peso del tallo y peso total, alcanzándose los mayores valores con 9×10^8 UFC mL⁻¹ de *Azotobacter* spp. Se determinó el potencial de esta bacteria para promover el crecimiento de las plantas de tomate (Germán, 2015).

El efecto de bacterias de vida libre endófitas del género *Azospirillum*. se investigó en tomate. Las bacterias se aislaron de raíces de espárrago silvestre, previamente desinfectadas y se identificaron con la coloración de Gram, motilidad y las pruebas de oxidasa, catalasa, reducción de nitratos e hidrólisis de almidón. Se realizaron dos ensayos, en el primero las bacterias se inocularon en las semillas (inoculación simple) y en el segundo ensayo en las semillas y 15 días después de la siembra (inoculación doble) en el sistema radicular al momento del trasplante, considerando un testigo positivo (200ppm N, P y K) y negativo (250ppm P y K). Con la inoculación simple no existieron diferencias significativas y con la inoculación doble el testigo positivo superó significativamente a las plantas inoculadas en lo correspondiente a la altura y peso fresco de plántulas. Se evidenció el requerimiento de más investigación para obtener resultados fiables y reproducibles (García, 2012a).

El efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal se investigó en el cultivo de café. Las bacterias se aislaron de la rizósfera en medio mineral sin nitrógeno y en agar Cetrimide, se identificaron fenotípicamente y se seleccionaron *in vitro* según el ácido indolacético AIA, producido, fosfato solubilizado y efecto en la germinación de semillas de café. Las bacterias seleccionadas se inocularon en plántulas de los estados “fósforo” y “mariposa” y se monitoreó el desarrollo vegetativo durante 6 meses. Se obtuvieron 57 aislados bacterianos, identificándose *Azotobacter* y *Pseudomonas* spp. El 38% de estas bacterias produjeron 20 a 60ug mL⁻¹ de AIA; el 88 y 93% solubilizaron fosfato bicálcico y tricálcio, respectivamente y el porcentaje de germinación de las semillas se incrementó hasta 34%. Se seleccionaron las cepas FN 205 y PS 118 y 6 meses después de la inoculación incrementaron significativamente la longitud de la

parte aérea, radicular y peso de la parte aérea. Se demostró que *Azotobacter* FN 205 y *Pseudomonas* PS 118 representan una alternativa para promover el crecimiento de las plantas de café (Fernández, 2015).

Se realizó una investigación de *Raphanus sativus* L. “rabanito”, como modelo para evaluar la fijación de nitrógeno por bacterias endófitas. En raíces de caña de azúcar previamente desinfectadas se aislaron bacterias endófitas en medio sin nitrógeno LGI y se identificaron fenotípicamente. El ensayo se realizó bajo un diseño unifactorial completamente aleatorizado: 16 semillas x 5 tratamientos x 3 repeticiones, para un total de 300 unidades experimentales. Los tratamientos fueron: Testigo absoluto (T1), testigo químico (T2), bacterias inoculadas en las semillas (T3), bacterias inoculadas en las raíces + riego por gravedad (T4) y bacterias inoculadas en las raíces + riego tecnificado (T5). A la cosecha, después de 28 días se determinaron la altura, peso y diámetro de raíces y área foliar. Se aislaron bacterias fijadoras de nitrógeno y se identificó *Gluconacetobacter* sp. Esta bacteria incrementó significativamente el área foliar y la altura de las plantas de rabanito, alcanzándose los mayores valores con T5. Se demostró que la planta de rabanito constituye un modelo para evaluar a las bacterias diazotróficas (García, 2012b).

2.2 Base teórica

En los últimos años se busca desarrollar alternativas para disminuir el efecto residual nocivo de los agroquímicos, restablecer el equilibrio biológico y la fertilidad del suelo. En este contexto, la agricultura ecológica incluye el uso de biofertilizantes: una mezcla de microorganismos benéficos que al ser aplicados restauran nutricional y biológicamente los suelos degradados (Otero, 2011). Los biofertilizantes, bioinoculantes, inoculantes microbianos o inoculantes del suelo son productos agrotecnológicos que contienen microorganismos (bacterias, hongos, solos o combinados), vivos o latentes y que son aplicados a los cultivos agrícolas para estimular sus crecimiento y productividad. Se diferencian de los abonos orgánicos como el estiércol, composta y residuos de cosecha, porque éstos también tienen microorganismos vivos, pero no cultivados de manera controlada y axénica para la formulación del producto y por lo tanto la composición exacta de los microorganismos es desconocida y variable (Aguado, 2012).

El ciclo de desarrollo de una planta es el conjunto de fases que va desde la germinación de la semilla hasta la floración y germinación del fruto. Este ciclo comprende dos etapas bien definidas: desarrollo vegetativo y desarrollo reproductivo (Fassio et al., 1998). Desarrollo vegetativo es el crecimiento ordenado de las plantas, con la consiguiente diferenciación de tejidos y órganos. Comprende dos procesos: el crecimiento, que se evidencia en los cambios de tamaño y la diferenciación que corresponde a los cambios estructurales y fisiológicos (Fuentes, 2001). El crecimiento se refiere al aumento de algún órgano, órganos específicos o a las partes consideradas en su conjunto y está relacionado con la longitud, altura, diámetro y peso de la biomasa, todos en función al tiempo (Sopplin et al., 1993).

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

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

La fijación de nitrógeno es realizada por Eubacterias y Archaeas en una reacción catalizada por el complejo enzimático nitrogenasa, compuesto por dos metaloproteínas y tres grupos prostéticos. La proteína I es la dinitrogenasa o “hierro-molibdeno-proteína”. La proteína II es la dinitrogenasa reductasa “hierro-proteína”. Para su funcionamiento, el complejo enzimático requiere un donador de

electrones de bajo potencial, de la hidrólisis de ATP y de un ambiente anaerobio. La proteína II, codificada por el gen *nifH* transporta los electrones del donador (ferrodoxina o flavodoxina) hacia la proteína I, que reduce la molécula de N_2 (Altamirano et al., 2014).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno pueden ser de vida libre o vivir en asociaciones. Los de vida libre pueden ser aerobias (*Azotobacter*, *Beijerinckia*), anaerobias obligadas o facultativas (*Clostridium pasteurianum*, *Klebsiella* spp.) y fotosintéticas (bacterias púrpuras sulfurosas y no sulfurosas y bacterias verdes sulfurosas). A su vez las bacterias mantienen asociaciones simbióticas y no simbióticas en la filósfera o en la rizósfera de la planta (Mayz, 2004). Las bacterias diazotróficas agrupadas según su relación con el oxígeno pueden ser aerobias (*Azotobacter*, *Azoarcus*, *Azomonas*, *Beijerinckia* y *Derxia*), anaerobias facultativas (*Klebsiella*, *Bacillus* y *Enterobacter*), microaerófilas (*Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Azospirillum*, *Rhizobium* y *Frankia*) y anaerobias estrictas (*Clostridium* y *Desulfovibrio*). Las anaerobias facultativas y estrictas se comportan como anaerobias cuando no fijan nitrógeno molecular (Menezes, 2009).

Las bacterias diazotróficas asociativas contribuyen al crecimiento vegetal no solo por la fijación de nitrógeno sino también por la producción de fitohormonas, solubilización de fosfatos y antagonismo a fitopatógenos, habiéndose identificado en este grupo de bacterias a especies de *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Alcaligenes*, *Azoarcus*, *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia* y *Sphingomonas* (Altamirano et al., 2014).

2.2.1 *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate”

El tomate es una planta autógama, muy ramificada, rastrera y perenne, aunque se cultiva como anual. La raíz es pivotante, pero tiende a ser fasciculada en las plantas tratadas. El tallo es grueso y anguloso (Matas, 2005). La hoja es compuesta e imparipinnada, con foliolos peciolados, lobulados, con bordes dentados y recubiertos de pelos glandulares. La flor es perfecta, regular e hipógina con cinco o más sépalos, pétalos amarillos, estambres soldados y ovario bi o plurilocular. Las flores (3-10) se agrupan en inflorescencias racimosas. El fruto es una baya, bi o plurilocular, comestible (Reina et al., 1998, mencionados por Escobar y Horna, 2011).

La clasificación taxonómica del tomate según Armen L. Takhtajan (Mostacero et al., 2002) es:

Reino : Plantae
División : Magnoliophyta
Clase : Magnoliopsida
Subclase : Asteridae
Orden : Solanales
Familia : Solanaceae
Género : *Lycopersicon*
Especie : *L. esculentum* Mill
(Sin. *Solanum lycopersicum* L.).

El cultivo de tomate con riego por surco requiere 180 a 300Kgh⁻¹ de fertilizante nitrogenado, con una absorción lenta desde el trasplante hasta el crecimiento vegetativo temprano, aceleración de la absorción durante el cuajado y llenado del fruto y disminución acentuada en la madurez del cultivo (Hartz, 2004). Para producir 1 tonelada de frutos, la planta requiere absorber en promedio 2,5 a 3,0kg de nitrógeno. En función de los requerimientos, para 60tha⁻¹ se necesitan 150 a 180 unidades Nha⁻¹, estimándose que por cada 100 unidades de nitrógeno aplicadas se aprovechan 50. De esta manera, si se aplica urea con 46%N, de cada 100kg aplicados, el cultivo utiliza 25 unidades (Gaspar, 2000).

El cultivo de tomate se recomienda en suelos francos o franco-arcillosos, con un rango de temperatura de 12 a 16°C en el suelo, 21 a 24°C en el ambiente y un óptimo de 22°C. El tomate puede crecer en condiciones climáticas variables, altura de 400 a 2000msnm y 70 a 80% de humedad relativa. Las necesidades nutricionales son de 400 a 700kgNha⁻¹, 100 a 200kgPha⁻¹, 1000 a 1200kgKha⁻¹ y 100 a 200kgMgha⁻¹. El periodo más crítico para el riego ocurre antes y después del trasplante (4 días) y después del inicio de la floración hasta el inicio de la maduración de los primeros frutos. La cosecha se realiza de forma manual independientemente que el producto sea para la industria o para el consumo local (Rodríguez y Morales, 2007).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Material biológico

El material biológico estuvo constituido por semillas de tomate y 24 cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de suelo rizosférico y raíces de espárrago durante febrero a marzo de 2016, caracterizadas *in vitro* como rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas PGPR (Delgado y Suyón, 2017) y proporcionadas por el laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencia Biológicas en la Universidad Pedro Ruiz Gallo.

3.1.2 Población y muestra

Población universal: Bacterias fijadoras de nitrógeno

Población muestral: Bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de suelo rizosférico y raíces de espárrago en Trujillo, durante febrero a marzo de 2016.

Unidad muestral: 24 cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno: *Azospirillum* spp. 3, 6, 8, 9, 13, 17, 18, 19, 23; *Burkholderia* spp. 6, 8, 9; *Azotobacter* spp. 28.6, 33.36, 38.19, 44.55; *Gluconacetobacter* sp. 49 y *Herbaspirillum* spp. 3, 13, 15, 16, 19, 23, 77.

3.2 Métodos

3.2.1 Variable de la fase descriptiva

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

3.2.2 Variables de la fase explicativa

Variable independiente: Cultivos (24) de bacterias fijadoras de nitrógeno.

Variable dependiente: Desarrollo vegetativo (altura radicular y aérea). Desarrollo reproductivo (Días a la floración, días a la fructificación, rendimiento).

3.2.3 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

El trabajo de investigación se realizó en dos fases. En la primera fase descriptiva con el diseño de “Sólo Después” (Vásquez et al., 2012) se cuantificó el nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos por 24 cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno (Figura 1). En la segunda fase explicativa, se realizaron dos ensayos en condiciones de invernadero, el primero para determinar el efecto de los 24 cultivos de bacterias investigados en la altura y longitud de raíces de plantas de tomate durante 60 días y seleccionar los diez cultivos bacterianos con los que se alcanzaron los mayores valores. En el segundo ensayo se determinó el efecto de las bacterias seleccionadas en el desarrollo vegetativo y reproductivo de las plantas de tomate durante 160 días.

En la fase explicativa se utilizó, el diseño experimental completamente aleatorio, DCA (Hernández et al., 2014) con 25 tratamientos en el primer ensayo (24 cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno y un testigo: con agua destilada) y 12 tratamientos en el segundo ensayo (10 cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno y dos testigos: absoluto con agua destilada y químico con fertilizante: 180N:100P:120K. A cada tratamiento le correspondieron tres repeticiones, totalizando 75 y 36 unidades experimentales, respectivamente (Figuras 2, 3).

3.2.4 Reactivación de cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno

Las bacterias fueron cultivadas en caldo nutritivo a 30°C, en agitador a 150rpm, durante 24 horas. A continuación, se sembraron mediante la técnica de estría en agar nutritivo, se seleccionaron cinco colonias características y se cultivaron en agar nutritivo, durante 24 horas, constituyendo las bacterias reactivadas o cultivos de trabajo.



Figura 1. Cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno.

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

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

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

T1 : Testigo absoluto

T2 a T25 : Bacterias fijadoras de nitrógeno

Figura 2. Diseño completamente aleatorio para determinar el efecto de 24 cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno en la altura de *Lycopersicon esculentum* Mill.

4	6	1	10	5	2	7	3	12	9	11	8
---	---	---	----	---	---	---	---	----	---	----	---

8	11	9	4	3	7	1	5	10	12	6	2
---	----	---	---	---	---	---	---	----	----	---	---

8	2	11	10	7	4	6	3	12	9	1	5
---	---	----	----	---	---	---	---	----	---	---	---

T1 : Testigo absoluto

T2 : Testigo químico

T3 a T12 : Bacterias fijadoras de nitrógeno

Figura 3. Diseño completamente aleatorio para determinar el efecto de diez cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno y dos testigos en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill. "tomate"

3.2.5 Primera fase: Cuantificación de nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos

Con las bacterias fijadoras de nitrógeno 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, las bacterias se cultivaron 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 (Model Tenso Med NV-203) 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: Técnica de Berthelot o fenol hipoclorito (Cadena y Martinez, 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% (Anexo 1) y se incubaron a 30°C, por 72 horas, con agitación constante (150rpm). A continuación, se agregaron 9mL de KCl 2M, se agitaron a 150rpm durante 1 hora y se dejaron en reposo 1 hora adicional, para después tomar 10mL de sobrenadante y centrifugarlos (3000rpm) durante 5 minutos.

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 (Model Tenso Med NV-203) a 632,9nm. Las concentraciones de amonio se calcularon con la ecuación de la curva de calibración, obtenida previamente con diluciones sucesivas de una solución de 100ppm de cloruro de amonio (Anexo 1).

b. Cuantificación de fosfato solubilizado *in vitro*

La cuantificación de fosfato solubilizado *in vitro* por las bacterias investigadas se realizó con el método colorimétrico: Técnica del molibdato (Alvarado y 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 (Anexo 2) 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 y Rodi, 2005), considerándose una coloración azul positiva a la solubilización del fosfato. La absorbancia se leyó en espectrofotómetro de luz visible (Model Tenso Med NV-203) 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 2).

c. Cuantificación de indoles producidos *in vitro*

La cuantificación de indoles producidos *in vitro* se realizó según el método colorimétrico: Técnica de Salkowski (García y Muñoz, 2010). El inóculo (5%:0,25mL) de cada cultivo bacteriano fue sembrado por triplicado en 5mL de caldo tripticasa soya suplementado con triptófano (Anexo 3). Después de la incubación a 30°C, por 72 horas, en agitación constante (150rpm), los cultivos se centrifugaron a 3000rpm, durante 5 minutos. A continuación, 0,4mL de cada sobrenadante se depositaron en tubos, se agregaron 1,6mL de reactivo de Salkowski modificado, se mezclaron y se dejaron en reposo durante 30 minutos en oscuridad. La reacción se consideró positiva a la producción de indoles por la aparición de una coloración grosella, leyéndose la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible (Model Tenso Med NV-203) a 530nm. Las concentraciones de indoles se calcularon con la ecuación de la curva de calibración obtenida previamente con diluciones sucesivas de una solución de 100ppm de ácido indolacético (Anexo 3).

3.2.6 Segunda fase: Efecto de bacterias fijadoras de nitrógeno en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill.

El efecto de las bacterias fijadoras de nitrógeno en el cultivo de tomate se determinó en dos ensayos, ambos bajo condiciones de invernadero.

a. Primer ensayo

En el primer ensayo se determinó el efecto de 24 cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno en el desarrollo vegetativo de plantas de tomate, durante 60 días, seleccionándose para el siguiente ensayo, los diez cultivos bacterianos con los que se alcanzaron los mayores valores en los parámetros investigados.

El suelo experimental estuvo constituido por 225kg de una mezcla de suelo agrícola, arena de río y humus en la proporción 2:1:1 (Figura 4), que fue distribuido en macetas de arcilla de 3,5kg, a razón de 3kg por maceta (Figura 5). El análisis físico-químico del suelo se realizó en el Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agrícola, Estación Experimental Vista Florida de Chiclayo (Tabla 1), determinándose, una textura franco-arenosa, pH ligeramente alcalino (7,2), moderada salinidad (7,9 dSm⁻¹), contenido medio de materia orgánica (2,55%) y contenido alto de fósforo disponible (20,4ppm) y potasio (278ppm).

El cultivo de tomate y la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno se realizó entre el 7 de marzo al 5 de mayo de 2017, registrándose las temperaturas máximas (31°C), mínima (24°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 4).

En el ensayo se sembraron semillas de tomate cv Río Grande que se comercializan luego de ser tratadas con el fungicida Tiofanate metil-Tiram (Homai W.P) en la dosis de 2gkg⁻¹ de semillas. El cultivar precoz de tomate Río Grande fue obtenido por la compañía californiana Petoseed. Las plantas son de crecimiento determinado, con resistencia a *Verticillium*, *Fusarium* y *Alternaria alternata*. Requiere 78 días para la madurez fisiológica y 105-140 días (128 días) para el inicio de la cosecha, con un promedio de 4 a 5kg de frutos ovalados por planta, un peso de 150 a 180g por fruto y un rendimiento de hasta 30tha⁻¹. El consumo de los frutos es para el mercado y para la industria, siendo preferidos por su resistencia al transporte y almacenamiento de hasta 10 días, dependiendo del punto de maduración en el que se hayan cosechado (Soplopucó y Navarro, 2005).



Figura 4. Suelo agrícola, arena de río y humus.



Figura 5. Suelo experimental contenido en macetas de arcilla.

Tabla 1. Análisis físico-químico de suelo agrícola experimental, 2017

Clase textual	pH	CE (dSm ⁻¹)	MO (%)	N (%)	P (ppm)	K (ppm)
Franco-arenosa	7,2	7,9	2,55	0,103	20,4	278

El porcentaje de germinación de las semillas de tomate se determinó en cinco placas de Petri, en cuyo fondo se colocó papel filtro, humedecido con agua destilada esterilizada y con ayuda de pinzas esterilizadas se depositaron 20 semillas de tomate por placa. Las placas de Petri se taparon y se incubaron a una temperatura de 30°C, humedeciéndolas diariamente hasta observar el máximo de germinación (Figuras 6, 7).

El inóculo fue obtenido con bacterias 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, cuya concentración se estandarizó a $9 \times 10^8 \text{ cel mL}^{-1}$ por turbidimetría (tubo 3 del nefelómetro de Mc Farland).

Las semillas de tomate (12) se depositaron en 25 bolsas de polietileno transparentes de 2,5x8,0cm y sobre ellas se depositó 0,1mL del inóculo correspondiente por bolsa, equivalente a 173 mL Kg^{-1} de semilla (Figura 8). Se incluyó un testigo al que se le aplicó agua destilada. El contenido de las bolsas se homogenizó para que las bacterias se distribuyan uniformemente en las semillas y después las bolsas se llevaron hacia la estufa a 30°C, durante 30 minutos, para disminuir el exceso de humedad (Delgado y Suyón, 2017). A continuación, las semillas se sembraron en el suelo experimental, a razón de tres semillas por maceta a una profundidad de 2cm. A los 15 días de la siembra se eliminó la plántula menos vigorosa y se realizaron los riegos correspondientes, con agua de clorada (24 horas), según los requerimientos de las plantas.

Transcurridos 15, 30, 45 y 60 días después de la siembra se midió la altura de las plantas (Figura 9), considerándose desde la base del tallo hasta el ápice vegetativo del tallo principal (Carreño, 2009). A los 60 días se midió la longitud de la raíz. Con los valores de la altura y longitud de raíces, se calcularon los índices de efectividad de la inoculación (IEI) en porcentaje, mediante la fórmula (Carreño, 2009) siguiente:

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

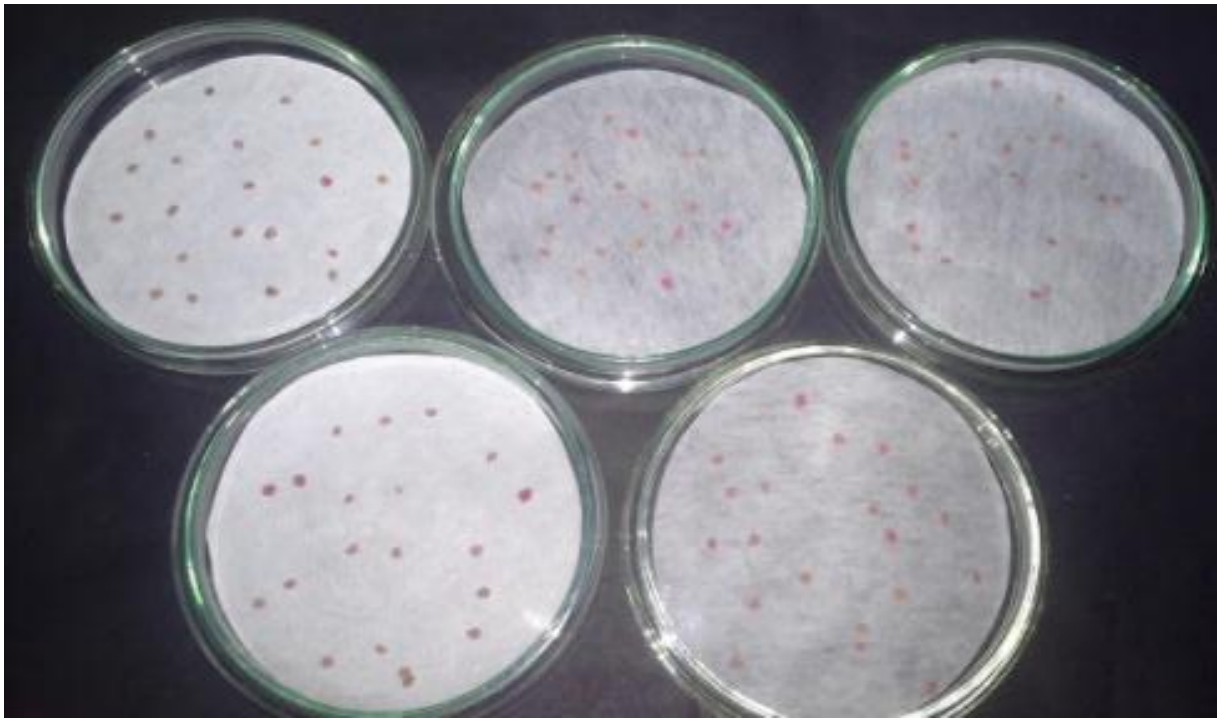


Figura 6. Semillas de *Lycopersicon esculentum* Mill. en placas de Petri.



Figura 7. Semillas de *Lycopersicon esculentum* Mill. germinadas.



Figura 8. Semillas de *Lycopersicon esculentum* Mill. inoculadas con bacterias fijadoras de nitrógeno.



Figura 9. Medición de altura de planta de *Lycopersicon esculentum* Mill.

b. Segundo ensayo

En el segundo ensayo se determinó el efecto de diez cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno en el desarrollo vegetativo y reproductivo de plantas de tomate, en condiciones de invernadero. Las bacterias se aplicaron en inoculación doble: en las semillas, antes de la siembra y en las raíces al momento del trasplante.

El suelo experimental estuvo constituido por 15,300kg de una mezcla de arena de río y humus (1:1) distribuido en vasos de tecnopor de 16 onzas de capacidad, a razón de 425g por vaso (Figura 10), para la siembra de las semillas y 144kg de una mezcla de suelo agrícola, arena de río y humus (2:1:1), distribuido en macetas de 5kg de capacidad, a razón de 4kg por maceta. El cultivo de tomate y la inoculación de las bacterias se realizó entre 12 de mayo al 18 de octubre de 2017, registrándose las temperatura máxima (26°C), mínima (17°C) y media (21°C), valores obtenidos por la Estación Meteorológica de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, ubicado en el fundo “El Cienago” de Lambayeque (Anexo 4).

El inóculo bacteriano y su aplicación en las semillas de tomate se realizó de manera similar a lo explicado en el ítem 3.2.6 a. Las semillas previamente inoculadas se sembraron en los vasos de tecnopor con el suelo experimental a razón de cinco semillas por vaso, realizándose los riegos correspondientes con agua declorada (24 horas) según los requerimientos de las plantas. A los 7 días se determinó el porcentaje de emergencia y a los 15 y 30 días se midió la altura de las plántulas (Figura 11).

A los 30 días, en cada tratamiento se seleccionaron las dos plántulas con la mayor altura, cuidadosamente se extrajeron, se retiró el suelo radicular y las raíces se sumergieron (Figura 12) en un depósito conteniendo 300mL del inóculo bacteriano previamente obtenido y estandarizado a una concentración de $9 \times 10^8 \text{ cel mL}^{-1}$. Después de 10 minutos las plántulas se trasplantaron en las macetas conteniendo al suelo experimental. En el testigo absoluto, las raíces se sumergieron en agua declorada y en el testigo químico se aplicó fertilizante químico 180N:100P:120K. El nitrógeno se aplicó como urea (46%N), el fósforo como fosfato diamónico (18%N, 46%P) y el potasio como sulfato de potasio (50%K), correspondiendo 0,7g de urea; 0,8g de fosfato diamónico y 0,8g sulfato de potasio por maceta (Anexo 5).



Figura 10. Suelo experimental contenido en vasos de tecnopor.



Figura 11. Plántulas de *Lycopersicon esculentum* Mill. cultivadas durante 10 días en condiciones de invernadero.



Figura 12. Inmersión de raíces de *Lycopersicon esculentum* Mill. en inóculo de bacteria fijadora de nitrógeno.

La aplicación de nitrógeno en forma de urea (46%N), en la dosis de 391kg ha^{-1} , se realizó fraccionada, 1/3 después de 15 días del trasplante y los 2/3 restantes 15 días después. El fósforo y el potasio se aplicaron junto con la primera dosis de nitrógeno, al momento del trasplante. Cada 15 días después del trasplante hasta los 60 días (90 días después de la siembra) se midió la altura de las plantas. Asimismo, se registró el número de días transcurridos desde la siembra hasta la aparición de por lo menos una flor en el 50% de las plantas de cada tratamiento.

Durante el cultivo se controló *Tuta absoluta* “polilla de tomate” y *Prodidiplosis longifila* “caracha” con cinco aplicaciones de Tracer 120 SC (*Bacillus thuringiensis*) a la dosis de 120g L^{-1} y Regent SC (fipronil) a la dosis de $210,5\text{g L}^{-1}$, con intervalos de 7 a 15 días.

La cosecha fue escalonada, recogiendo los frutos en estado “pintón” y realizando dos recolecciones, a los 140 y 160 días después de la siembra. Para determinar el rendimiento, en cada recolección se pesaron los frutos, obteniéndose el peso de los frutos de valor comercial (Figura 13), que según los estándares del mercado local (Carreño, 2009), incluyeron tomates de primera calidad (sanos y de tamaño grande), segunda calidad (sanos de tamaño pequeños) y de tercera calidad (tomates grandes o pequeños, pero con daño de insectos o magulladuras).

3.2.7 Análisis estadístico de los datos

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

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

Dónde:

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

u = media general de la variable respuesta.

t_i = efecto I-ésimo tratamiento, siendo $i = 1, 2, 3, \dots, 25$ (Primer ensayo)

t_i = efecto I-ésimo tratamiento, siendo $i = 1, 2, 3, \dots, 12$ (Segundo ensayo)

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

$H_0 = u_1 = u_2 = u_3, \dots = u_{25}$ (Primer ensayo)

$H_0 = u_1 = u_2 = u_3, \dots = u_{12}$ (Segundo ensayo)

H_a = Al menos una media es diferente

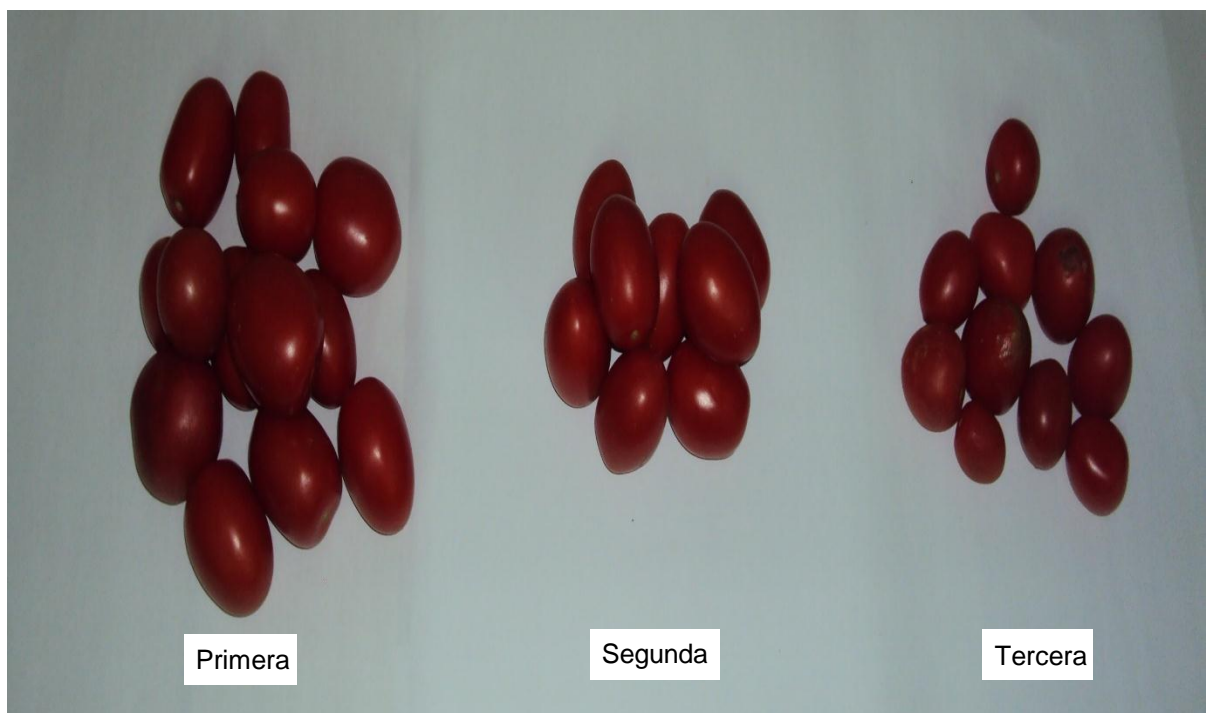


Figura 13. Tomates de primera, segunda y tercera calidad.

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

IV. RESULTADOS

4.1 Nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos

Las bacterias investigadas fijaron nitrógeno, solubilizaron fosfato y produjeron indoles *in vitro*, cuantificándose 12,52 a 37,52ppm de amonio; 10,39 a 33,55ppm de fósforo soluble y 22,47 a 195,80ppm de indoles (Tabla 2).

4.2 Efecto de 24 cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno en el desarrollo vegetativo de *Lycopersicon esculentum* Mill.

El 100% (24) de cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno incrementaron la altura de las plantas de tomate, a los 15 días después de la siembra (Figuras 14, 15), alcanzándose índices de efectividad (Tabla 3) de 17,30% (*Azospirillum* sp.3) a 46,14% (*Herbaspirillum* sp.15). La prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia (Anexo 7) y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey los mayores valores se alcanzaron con *Herbaspirillum* spp.15, 19 y 77; *Azotobacter* spp.28.6 y 33.36; *Gluconacetobacter* sp.49 y *Azospirillum* spp.6, 8, 9, 13, 17 y 23, no diferenciándose significativamente entre ellos, pero si de los demás tratamientos (Tabla 4).

El 100% (24) de cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno incrementaron la altura de las plantas de tomate, a los 30 días después de la siembra (Figura 16), alcanzándose índices de efectividad (Tabla 3) de 19,83% (*Herbaspirillum* sp.19) a 56,00% (*Gluconacetobacter* sp.49). La prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia (Anexo 8) y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey los mayores valores se alcanzaron con *Gluconacetobacter* sp.49; *Azospirillum* sp.17; *Azotobacter* spp.28.6 y 44.55, no diferenciándose significativamente entre ellos, pero si de los demás tratamientos (Tabla 4).

Tabla 2. Nitrógeno fijado como amonio, fósforo soluble e indoles producidos por bacterias fijadoras de nitrógeno

Bacterias fijadoras de nitrógeno	Amonio (ppm)	Fósforo soluble (ppm)	Indoles (ppm)
<i>Azospirillum</i> sp.3	19,51	29,75	35,10
<i>Azospirillum</i> sp.6	22,82	28,31	35,80
<i>Azospirillum</i> sp.8	25,02	27,59	40,24
<i>Azospirillum</i> sp.9	22,45	18,05	42,47
<i>Azospirillum</i> sp.13	24,10	26,50	38,02
<i>Azospirillum</i> sp.17	26,68	10,39	29,13
<i>Azospirillum</i> sp.18	24,66	21,95	31,36
<i>Azospirillum</i> sp.19	25,76	16,60	24,69
<i>Azospirillum</i> sp.23	29,25	20,65	195,80
<i>Burkholderia</i> sp.6	24,30	11,55	31,36
<i>Burkholderia</i> sp.8	22,63	15,59	29,13
<i>Burkholderia</i> sp.9	20,06	13,86	31,36
<i>Azotobacter</i> sp.28.6	23,27	26,86	53,58
<i>Azotobacter</i> sp.33.36	20,61	28,41	26,91
<i>Azotobacter</i> sp.38.19	24,29	24,54	31,36
<i>Azotobacter</i> sp.44.55	21,35	25,56	35,58
<i>Gluconacetobacter</i> sp.49	12,52	18,19	22,47
<i>Herbaspirillum</i> sp.3	19,33	33,55	42,47
<i>Herbaspirillum</i> sp.13	19,88	24,99	44,69
<i>Herbaspirillum</i> sp.15	35,50	27,88	33,58
<i>Herbaspirillum</i> sp.16	20,61	27,01	40,24
<i>Herbaspirillum</i> sp.19	37,52	29,90	46,91
<i>Herbaspirillum</i> sp.23	25,94	25,94	43,69
<i>Herbaspirillum</i> sp.77	32,01	29,70	45,20



Figura 14. Plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill. cultivadas 15 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno.

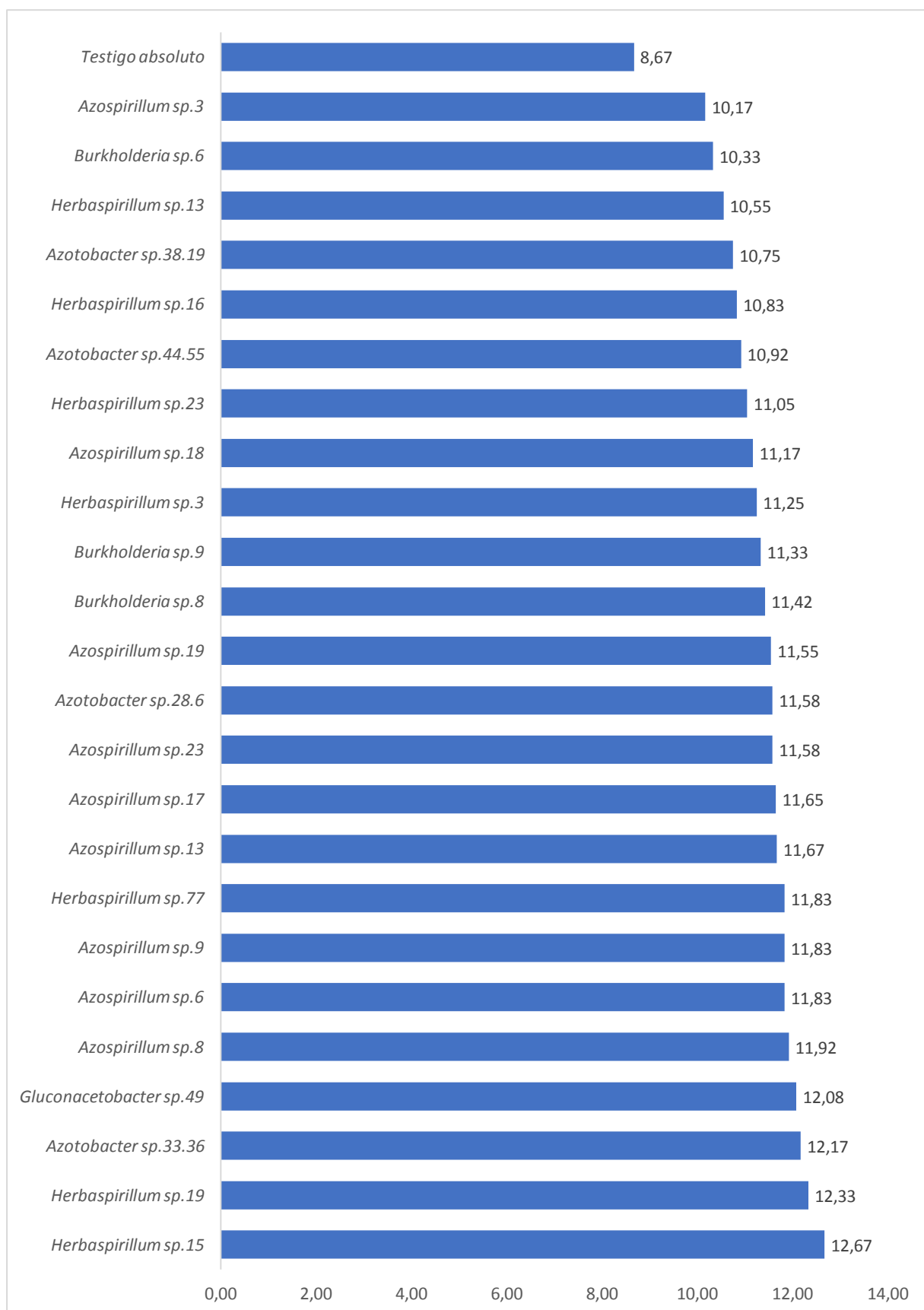


Figura 15. Altura (cm) de *Lycopersicon esculentum* Mill. 15 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno, 2017.

Tabla 3. Índices de efectividad en la altura de plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill., 15, 30, 45 y 60 después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno

Bacterias fijadoras de nitrógeno	IE%			
	15 días	30 días	45 días	60 días
<i>Azospirillum</i> sp.3	17,30	26,21	30,73	29,93
<i>Azospirillum</i> sp.6	36,45	38,98	37,29	34,75
<i>Azospirillum</i> sp.8	37,49	30,47	25,38	26,00
<i>Azospirillum</i> sp.9	36,45	46,13	29,99	29,39
<i>Azospirillum</i> sp.13	34,60	28,34	43,84	36,17
<i>Azospirillum</i> sp.17	34,37	54,64	49,19	42,37
<i>Azospirillum</i> sp.18	28,84	45,36	77,67	61,02
<i>Azospirillum</i> sp.19	34,37	47,49	76,14	63,29
<i>Azospirillum</i> sp.23	33,56	48,26	83,06	72,88
<i>Burkholderia</i> sp.6	19,15	32,43	65,34	21,46
<i>Burkholderia</i> sp.8	31,72	42,55	64,61	15,25
<i>Burkholderia</i> sp.9	30,68	33,36	34,61	32,78
<i>Azotobacter</i> sp.28.6	33,56	49,62	86,11	103,39
<i>Azotobacter</i> sp.33.36	40,37	34,04	83,43	92,10
<i>Azotobacter</i> sp.38.19	23,99	34,72	36,92	33,32
<i>Azotobacter</i> sp.44.55	25,95	50,38	33,83	34,48
<i>Gluconacetobacter</i> sp.49	39,33	56,00	95,34	97,19
<i>Herbaspirillum</i> sp.3	29,76	38,30	34,61	26,00
<i>Herbaspirillum</i> sp.13	21,68	23,66	27,69	26,54
<i>Herbaspirillum</i> sp.15	46,14	21,96	22,29	24,31
<i>Herbaspirillum</i> sp.17	24,91	41,53	32,67	29,93
<i>Herbaspirillum</i> sp.19	42,21	19,83	21,50	24,85
<i>Herbaspirillum</i> sp.23	27,45	38,98	32,21	29,39
<i>Herbaspirillum</i> sp.77	36,45	41,87	31,15	30,24

*Promedio de tres repeticiones

Tabla 4. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la altura de plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill. 15, 30, 45 y 60 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno

Tratamientos	Altura (cm)*							
	15días	Sign.	30días	Sign.	45días	Sign.	60días	Sign.
Testigo absoluto	8,67	j	11,75	ñ	21,67	l	29,50	n
<i>Azospirillum</i> sp.3	10,17	i	14,83	k l m n	28,33	f g h	38,33	j
<i>Azospirillum</i> sp.6	11,83	a b c d e f	16,33	f g h i	29,75	f	39,75	g h
<i>Azospirillum</i> sp.8	11,92	a b c d e	15,33	j k l	27,17	i j k	37,17	k
<i>Azospirillum</i> sp.9	11,83	a b c d e f	17,17	c d f	28,17	g h i	38,17	j
<i>Azospirillum</i> sp.13	11,67	a b c d e f	15,08	j k l m	31,17	e	40,17	g
<i>Azospirillum</i> sp.17	11,65	a b c d e f g	18,17	a b	32,33	e	42,00	f
<i>Azospirillum</i> sp.18	11,17	c d e f g h i	17,08	c d e f g	38,50	b c	47,50	e
<i>Azospirillum</i> sp.19	11,55	b c d e f g	17,33	b c d e	38,17	c	48,17	e
<i>Azospirillum</i> sp.23	11,58	a b c d e f g	17,42	b c d e	39,67	b	51,00	d
<i>Burkholderia</i> sp.6	10,33	h i	15,56	i j k	35,83	d	35,83	l
<i>Burkholderia</i> sp.8	11,42	b c d e f h	16,75	d e f g	26,00	k	34,00	m
<i>Burkholderia</i> sp.9	11,33	b c d e f g h	15,67	i j k	29,17	f g	39,17	h i
<i>Azotobacter</i> sp.28.6	11,58	a b c d e f g	17,58	a b c d	40,33	b	60,00	a
<i>Azotobacter</i> sp.33.36	12,17	a b c	15,75	i j	39,75	b	56,67	c
<i>Azotobacter</i> sp.38.19	10,75	f g h i	15,83	h i j	29,67	f	39,33	h
<i>Azotobacter</i> sp.44.55	10,92	e f g h i	17,67	a b c	29,00	f g	39,67	g h
<i>Gluconacetobacter</i> sp.49	12,08	a b c d	18,33	a	42,33	a	58,17	b
<i>Herbaspirillum</i> sp.3	11,25	c d e f g h i	16,25	g h	29,17	f g	37,17	k
<i>Herbaspirillum</i> sp.13	10,55	g h i	14,53	l m n	27,67	h i j	37,33	k
<i>Herbaspirillum</i> sp.15	12,67	a	14,33	m n	26,50	j k	36,67	k
<i>Herbaspirillum</i> sp.16	10,83	e f g h i	16,67	e f g h	28,75	f g h	38,33	j
<i>Herbaspirillum</i> sp.19	12,33	a b	14,08	n	26,33	k	36,83	k
<i>Herbaspirillum</i> sp.23	11,05	d e f g h i	16,33	f g h i	28,65	g i	38,17	j
<i>Herbaspirillum</i> sp.77	11,83	a b c d e f	16,67	e f g h	28,42	f g h i	38,42	i j

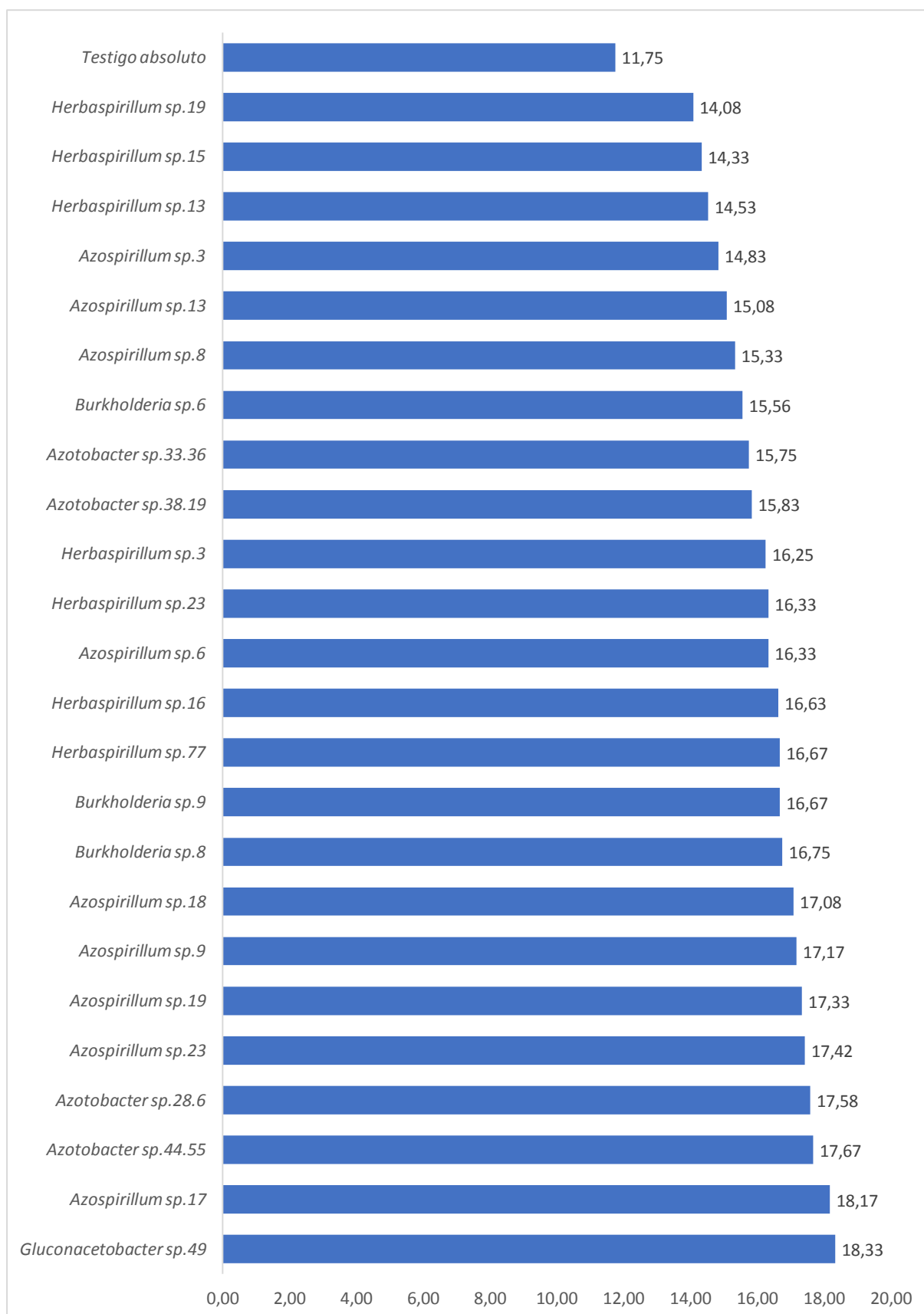


Figura 16. Altura (cm) de *Lycopersicon esculentum* Mill. 30 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno, 2017.

El 100% (24) de cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno incrementaron la altura de las plantas de tomate, a los 45 días después de la siembra (Figura 17), alcanzándose índices de efectividad (Tabla 3) de 21,50% (*Herbaspirillum* sp.19) a 95,34% (*Gluconacetobacter* sp.49). La prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia (Anexo 9) y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey el mayor valor se alcanzó con *Gluconacetobacter* sp.49, diferenciándose significativamente de los demás tratamientos (Tabla 4).

El 100% (24) de cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno incrementaron la altura de las plantas de tomate, a los 60 días después de la siembra (Figuras 18, 19), alcanzándose índices de efectividad (Tabla 3) de 24,31% (*Herbaspirillum* sp.15) a 103,39% (*Azotobacter* sp.28.6). La prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia (Anexo 10) y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey el mayor valor se alcanzó con *Azotobacter* sp.28.6, diferenciándose significativamente de los demás tratamientos (Tabla 4).

El 79% (19) de cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno incrementaron la longitud de la raíz de las plantas de tomate, a los 60 días después de la siembra (Figuras 20, 21), alcanzándose índices de efectividad (Tabla 5) de 4,48% (*Azospirillum* sp.6) a 103,14% (*Herbaspirillum* sp.15). La prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia (Anexo 11) y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey el mayor valor se alcanzó con, *Azospirillum* spp.18, 17,19 y *Herbaspirillum* sp.15, no diferenciándose significativamente entre ellos, pero si de los demás tratamientos (Tabla 5).

4.3 Cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionados

Las bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas (Figura 22, tabla 6), fueron las que alcanzaron los mayores índices de efectividad en la altura (siete cultivos bacterianos) y en la longitud de las raíces de tomate (tres cultivos bacterianos).

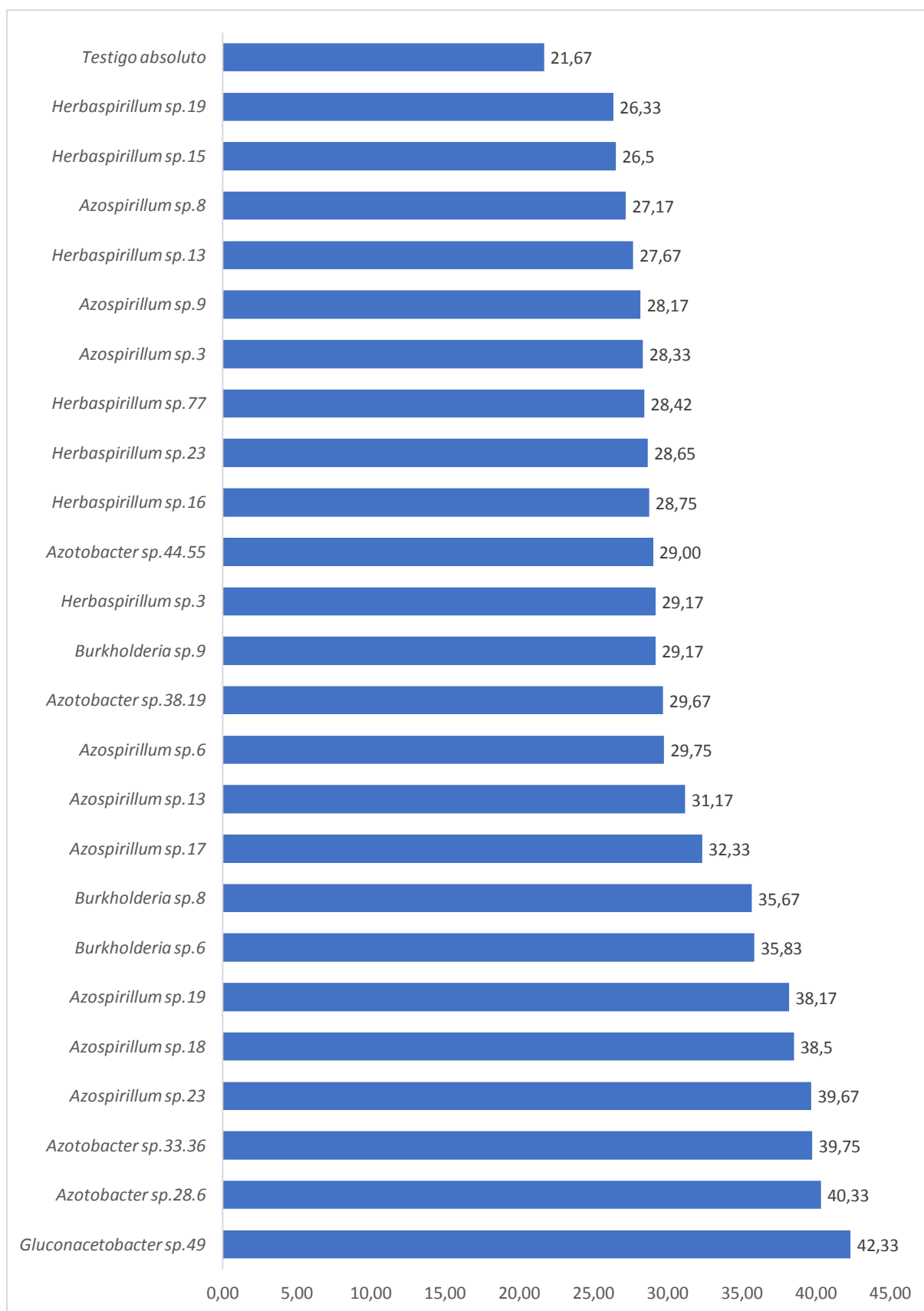


Figura 17. Altura (cm) de *Lycopersicon esculentum* Mill. 45 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno, 2017.



Figura 18. Plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill. 60 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno, (a) *Azospirillum* sp.6, (b) *Herbaspirillum* sp.77, (c) *Herbaspirillum* sp.15.

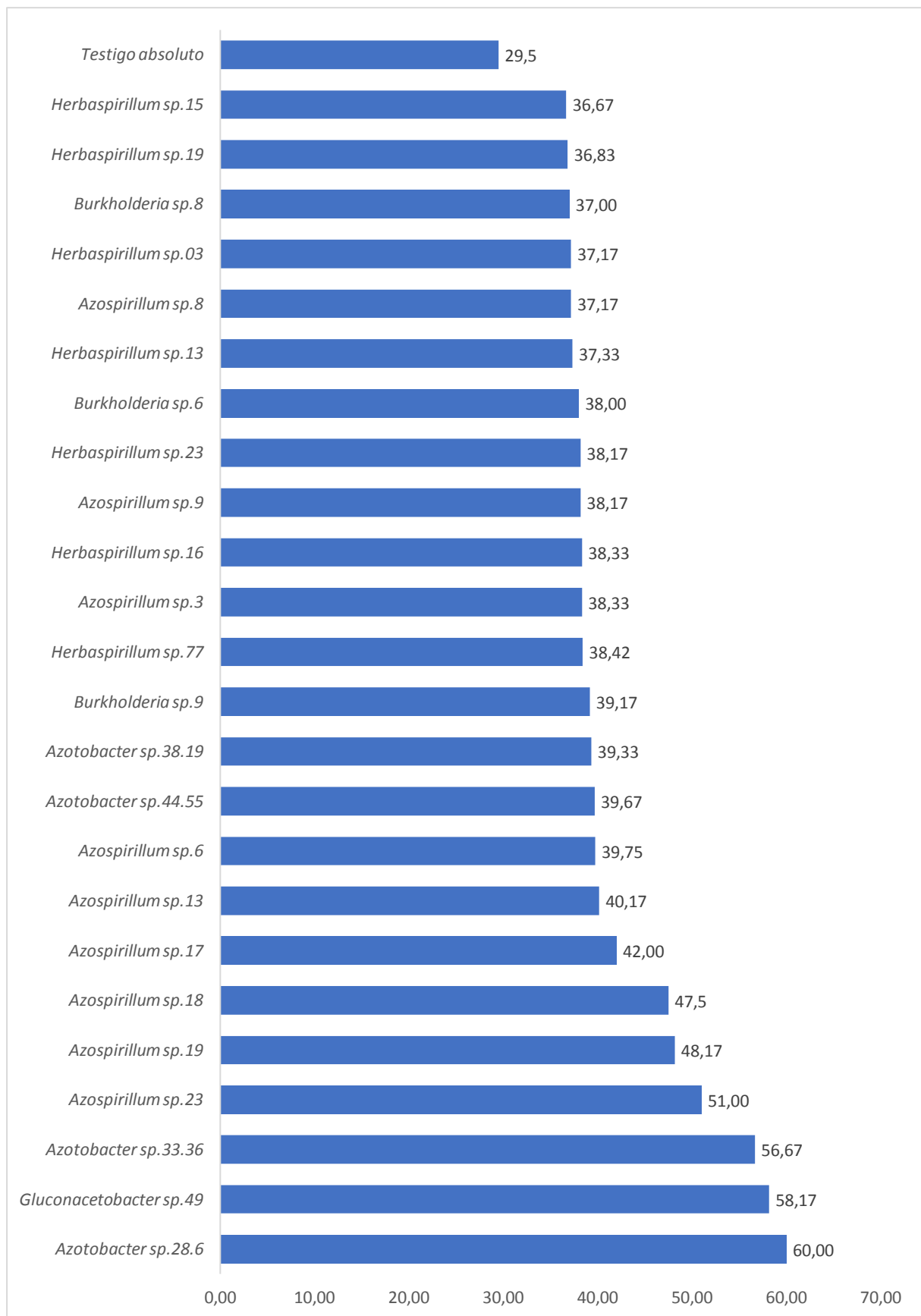


Figura 19. Altura (cm) de *Lycopersicon esculentum* Mill. 60 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno, 2017.



Figura 20. Plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill. 60 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno, (a) *Azotobacter* sp.44.55, (b) *Azospirillum* sp.3, (c) *Herbaspirillum* sp.19.

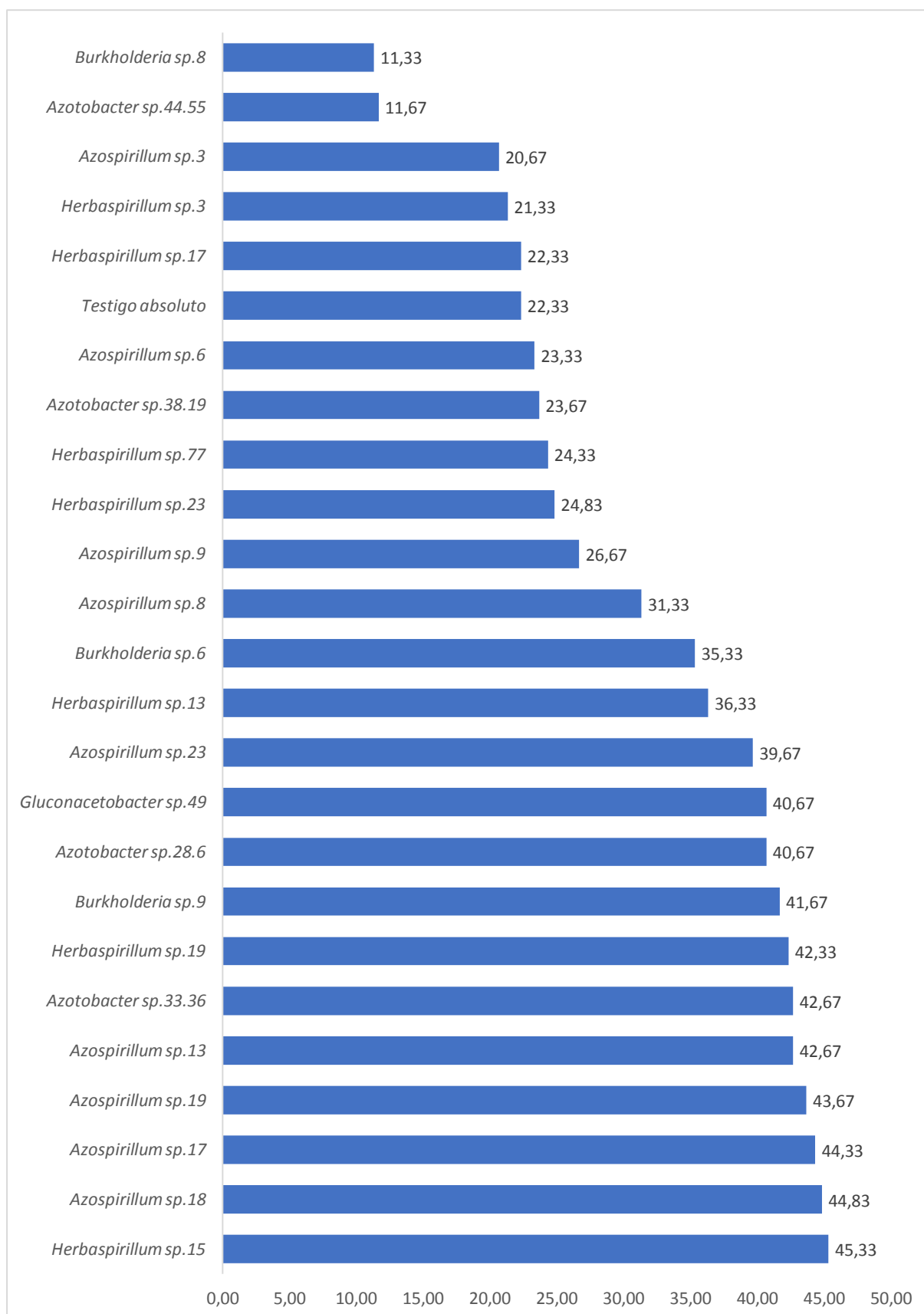


Figura 21. Longitud (cm) de raíces de *Lycopersicon esculentum* Mill. 60 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno, 2017.

Tabla 5. Índices de efectividad (%) y prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la longitud de raíces de *Lycopersicon esculentum* Mill., 60 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno

Tratamientos	Longitud (cm)	IE (%)	Sign. ($\alpha=0,05$)
Testigo absoluto	22,33	-	k l
<i>Azospirillum</i> sp.3	20,67	-	l
<i>Azospirillum</i> sp.6	23,33	4,48	j k
<i>Azospirillum</i> sp.8	31,33	40,31	h
<i>Azospirillum</i> sp.9	26,67	19,44	i
<i>Azospirillum</i> sp.13	42,67	91,09	b c d
<i>Azospirillum</i> sp.17	44,33	98,52	a b
<i>Azospirillum</i> sp.18	44,83	100,76	a
<i>Azospirillum</i> sp.19	43,67	95,57	a b c
<i>Azospirillum</i> sp.23	39,67	77,65	f
<i>Burkholderia</i> sp.6	35,33	58,22	g
<i>Burkholderia</i> sp.8	11,33	-	m
<i>Burkholderia</i> sp.9	41,67	86,61	d e
<i>Azotobacter</i> sp.28.6	40,67	82,13	e f
<i>Azotobacter</i> sp.33.36	42,67	91,09	b c d
<i>Azotobacter</i> sp.38.19	23,67	6,00	j k
<i>Azotobacter</i> sp.44.55	11,67	-	m
<i>Gluconacetobacter</i> sp.49	40,67	82,13	e f
<i>Herbaspirillum</i> sp.3	21,33	-	l
<i>Herbaspirillum</i> sp.13	36,33	62,70	g
<i>Herbaspirillum</i> sp.15	45,33	103,14	a b c
<i>Herbaspirillum</i> sp.16	22,33	-	k l
<i>Herbaspirillum</i> sp.19	42,33	89,57	c d e
<i>Herbaspirillum</i> sp.23	24,83	11,20	d e f
<i>Herbaspirillum</i> sp.77	24,33	8,96	j

*Promedio de tres repeticiones



Figura 22. Cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas.

Tabla 6. Índices de efectividad (%) en la altura de planta y longitud de raíces de *Lycopersicon esculentum* Mill. por bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas

Bacterias fijadoras de nitrógeno	IE (%)				
	Altura de planta/días				Longitud de raíces/días
	15	30	45	60	60
<i>Azospirillum</i> sp.13	34,60	28,34	43,84	36,17	93,94
<i>Azospirillum</i> sp.17	34,37	54,64	49,19	42,37	101,52
<i>Azospirillum</i> sp.18	28,84	45,36	77,67	61,02	103,79
<i>Azospirillum</i> sp.19	34,37	47,49	76,14	63,29	95,45
<i>Azospirillum</i> sp.23	33,56	48,26	83,06	72,88	80,30
<i>Azotobacter</i> sp.28.6	33,56	49,62	86,11	103,39	84,84
<i>Azotobacter</i> sp.33.36	40,37	34,04	83,43	92,10	93,94
<i>Gluconacetobacter</i> sp.49	39,33	56,00	95,34	97,19	84,85
<i>Herbaspirillum</i> sp.15	46,14	21,96	22,29	24,31	106,06
<i>Herbaspirillum</i> sp.19	42,21	19,83	21,50	24,85	92,42

*Promedio de tres repeticiones

4.4 Efecto de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas en el desarrollo vegetativo y reproductivo de *Lycopersicon esculentum* Mill.

El 70% (7) de cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno incrementaron la emergencia de las plántulas de tomate, a los 7 días después de la siembra (Figuras 23, 24), alcanzándose índices de efectividad (Tabla 7) de 12,5% (*Azospirillum* sp.17, *Azospirillum* sp.19, *Azotobacter* sp.28.6) a 25,0% (*Azospirillum* sp.13, *Gluconacetobacter* sp.49, *Herbaspirillum* spp.15 y 19).

El 80% (8) de cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno incrementaron la altura de las plantas de tomate, a los 15 días después de la siembra (Figuras 25, 26), alcanzándose índices de efectividad (Tabla 7) de 2,70% (*Azospirillum* sp.18 y *Herbaspirillum* sp.15) a 14,41% (*Herbaspirillum* sp.19). La prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia (Anexo 12) y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey los mayores valores se alcanzaron con *Azospirillum* sp.23, 17, 18; *Gluconacetobacter* sp.49 y *Herbaspirillum* spp.19 y 15, *Azotobacter* spp.28.6 y 33.36, no diferenciándose significativamente entre ellos, pero si de los demás tratamientos (Tabla 8).

El 100% (10) de cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno incrementaron la altura de las plantas de tomate, a los 30 días después de la siembra (Figuras 27, 28), alcanzándose índices de efectividad (Tabla 7) de 1,74% (*Herbaspirillum* sp.15) a 34,70% (*Gluconacetobacter* sp.49). La prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia (Anexo 13) y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey el mayor valor se alcanzó con *Gluconacetobacter* sp.49 y *Azotobacter* sp.28.6, no diferenciándose significativamente entre ellos, pero si de los demás tratamientos (Tabla 8).

El 100% (10) de cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno incrementaron la altura de las plantas de tomate, a los 45 días después de la siembra (Figuras 29, 30, 31), alcanzándose índices de efectividad (Tabla 9) de 1,74% (*Herbaspirillum* sp.15) a 38,58% (*Azotobacter* sp.33.36). La prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia (Anexo 14) y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey los mayores valores se alcanzaron con *Azotobacter* sp.33.36, *Gluconacetobacter* sp.49 y *Azospirillum* sp.17, no diferenciándose significativamente entre ellos, pero si de los demás tratamientos (Tabla 10).



Figura 23. Emergencia de *Lycopersicon esculentum* Mill., 7 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas, 2017.

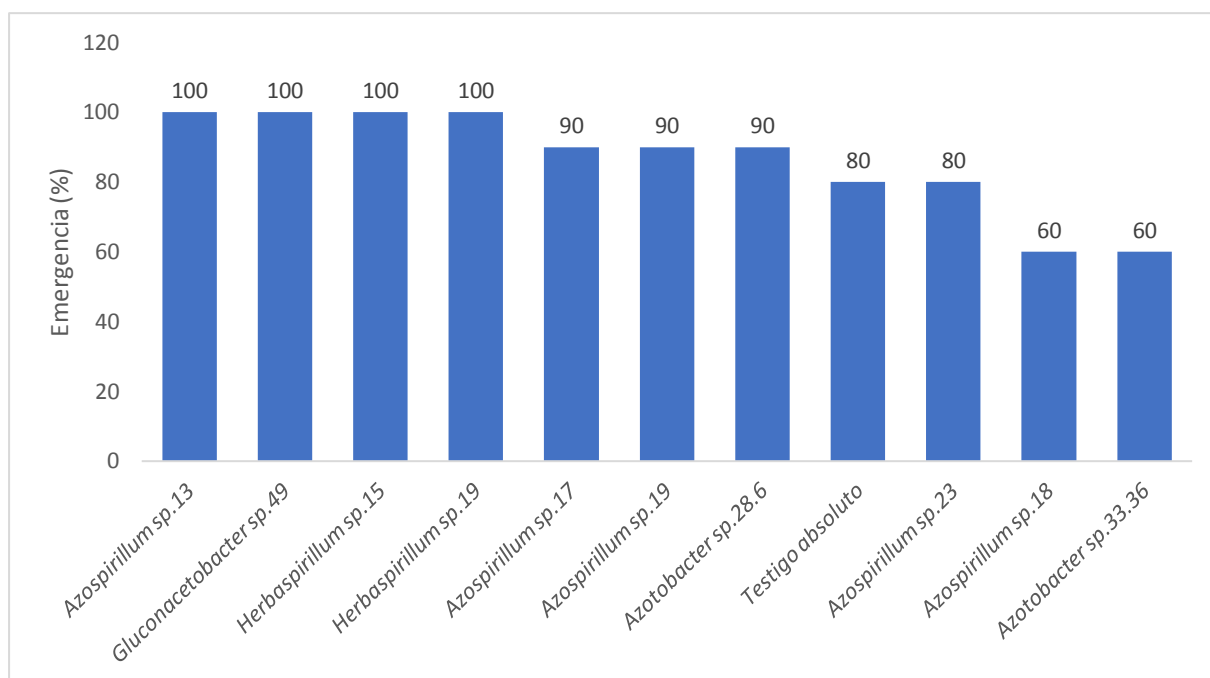


Figura 24. Emergencia de *Lycopersicon esculentum* Mill., 7 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas, 2017.

Tabla 7. Índices de efectividad (%) en la emergencia y altura de plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill. por bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas

Tratamientos	IE (%)		
	Emergencia	Altura (15 días)	Altura (30 días)
<i>Azospirillum</i> sp.13	25,0	-	4,18
<i>Azospirillum</i> sp.17	12,5	7,21	22,30
<i>Azospirillum</i> sp.18	-	2,70	17,07
<i>Azospirillum</i> sp.19	12,5	-	23,69
<i>Azospirillum</i> sp.23	-	13,51	22,99
<i>Azotobacter</i> sp.28.6	12,5	6,31	28,22
<i>Azotobacter</i> sp.33.36	-	13,96	10,11
<i>Gluconacetobacter</i> sp.49	25,0	12,16	34,70
<i>Herbaspirillum</i> sp.15	25,0	2,70	1,74
<i>Herbaspirillum</i> sp.19	25,0	14,41	4,53

*Promedio de tres repeticiones



Figura 25. Altura de plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill., 15 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas, 2017.

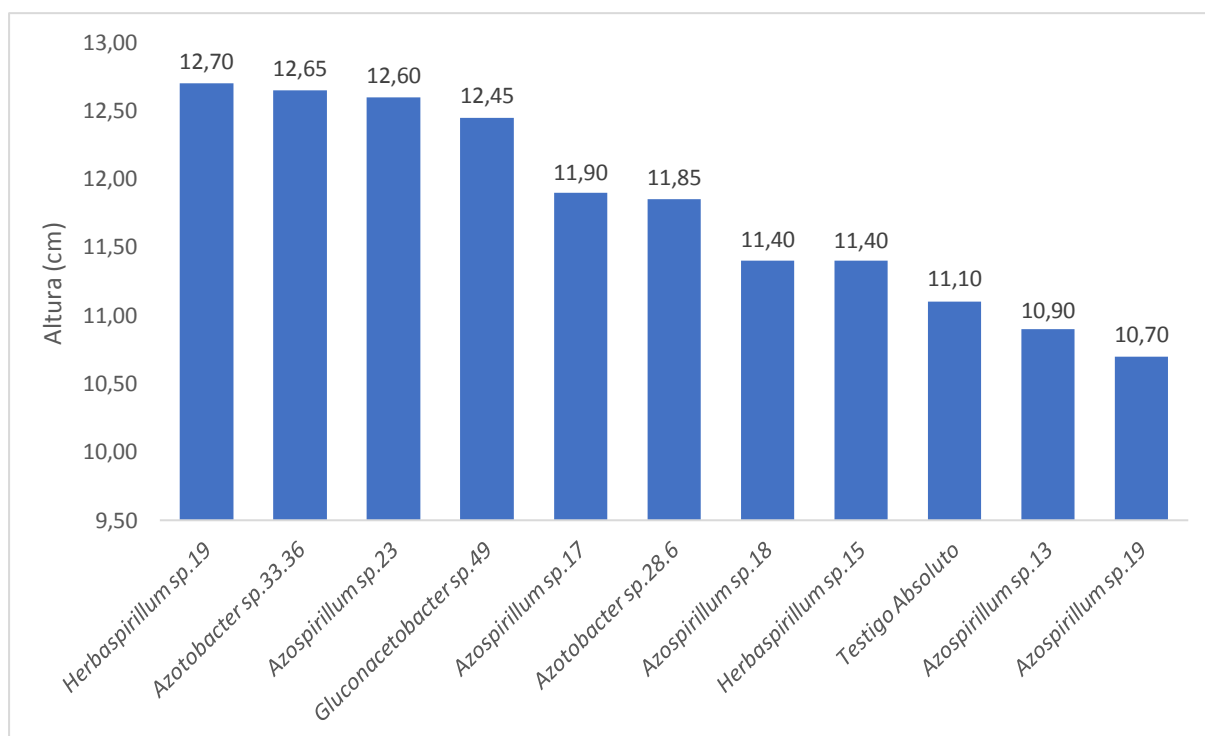


Figura 26. Altura (cm) de plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill., 15 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas, 2017.

Tabla 8. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la altura de plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill., 15 y 30 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas

Tratamientos	Altura (cm)			
	15 días	Sign.	30 días	Sign.
Testigo absoluto	11,10	b c	14,35	e
<i>Azospirillum</i> sp.13	10,90	c	14,95	d e
<i>Azospirillum</i> sp.17	11,90	a b c	17,55	c
<i>Azospirillum</i> sp.18	11,40	a b c	16,80	c
<i>Azospirillum</i> sp.19	10,70	c	17,65	b c
<i>Azospirillum</i> sp.23	12,60	a	17,65	b c
<i>Azotobacter</i> sp.28.6	11,85	a b c	18,40	a b
<i>Azotobacter</i> sp.33.36	12,65	a b	15,80	d
<i>Gluconacetobacter</i> sp.49	12,45	a	19,33	a
<i>Herbaspirillum</i> sp.15	11,40	a b c	14,60	e
<i>Herbaspirillum</i> sp.19	12,70	a	15,00	d e



Figura 27. Altura de plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill., 30 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas, 2017.

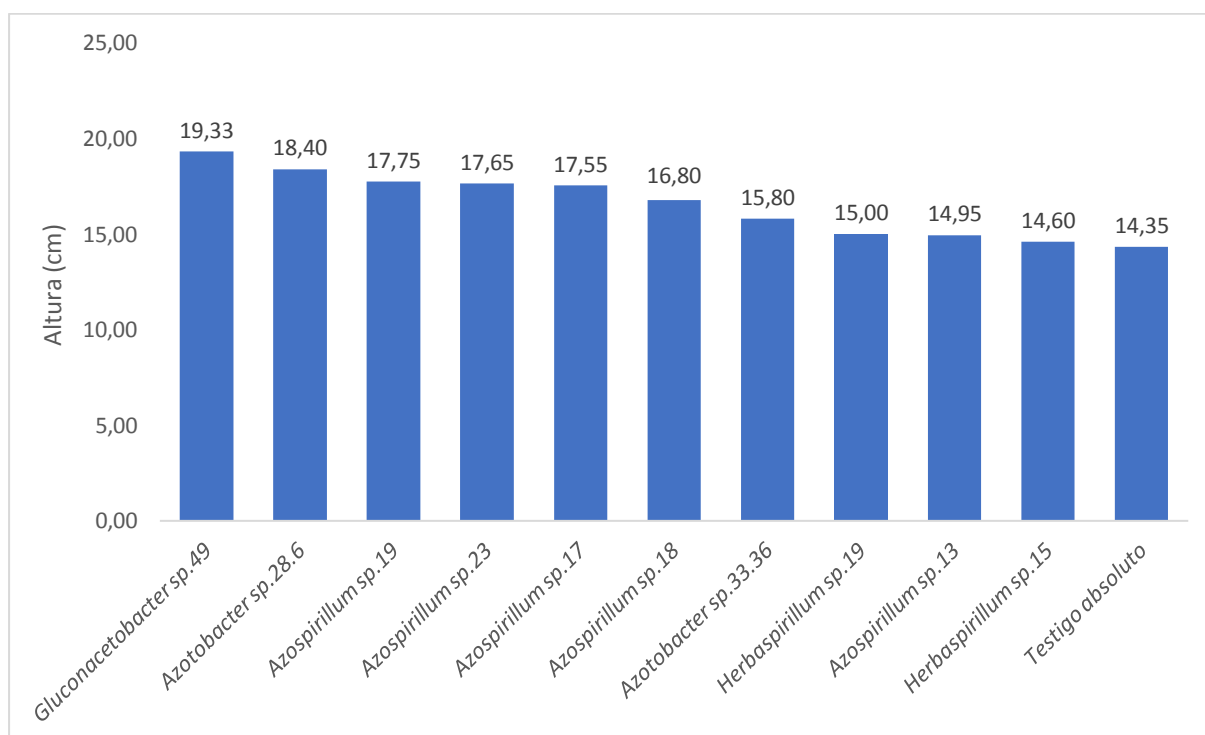


Figura 28. Altura (cm) de plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill., 30 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas, 2017.



Figura 29. Altura de plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill., 45 días después de la inoculación de *Azotobacter* sp.33.36.



Figura 30. Altura de plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill., 45 días después de la inoculación de *Gluconacetobacter* sp.49.

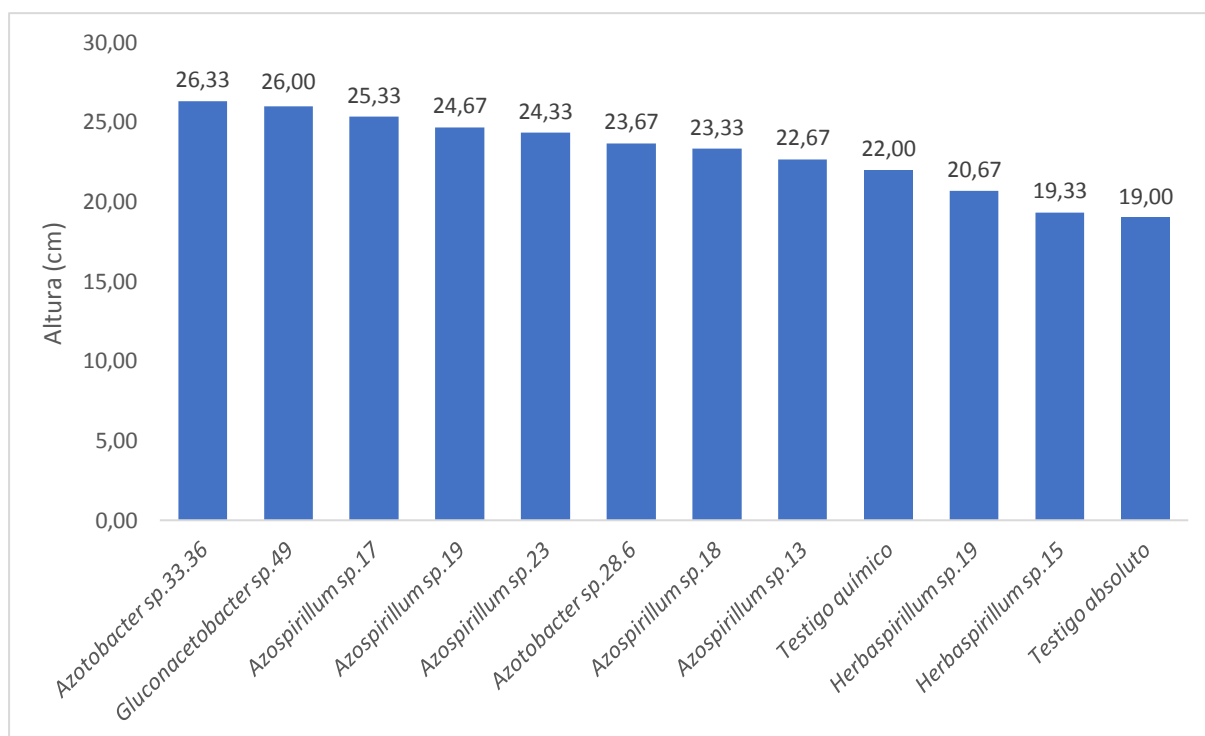


Figura 31. Altura (cm) de *Lycopersicon esculentum* Mill., 45 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas, 2017.

Tabla 9. Índices de efectividad (%) en la altura de plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill. por bacterias fijadoras de nitrógeno inoculadas a la siembra y trasplante

Tratamientos	IE (%)			
	Altura (45 días)	Altura (60 días)	Altura (75 días)	Altura (90 días)
Testigo químico	15,78	7,13	15,74	10,20
<i>Azospirillum</i> sp.13	19,32	11,20	17,79	11,47
<i>Azospirillum</i> sp.17	33,32	24,49	20,54	13,38
<i>Azospirillum</i> sp.18	22,79	45,91	28,07	21,67
<i>Azospirillum</i> sp.19	29,84	47,93	33,55	29,31
<i>Azospirillum</i> sp.23	28,05	61,22	32,87	24,84
<i>Azotobacter</i> sp.28.6	24,58	91,83	36,29	30,58
<i>Azotobacter</i> sp.33.36	38,58	73,95	34,23	25,80
<i>Gluconacetobacter</i> sp.49	36,84	78,54	32,18	25,49
<i>Herbaspirillum</i> sp.15	1,74	14,26	9,57	6,38
<i>Herbaspirillum</i> sp.19	8,79	8,14	3,41	4,47

*Promedio de tres repeticiones

Tabla 10. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de la altura de plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill., 45, 60, 75 y 90 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno a la siembra y trasplante

Tratamientos	Altura (cm)							
	45 días	Sign.	60 días	Sign.	75 días	Sign.	90 días	Sign.
Testigo absoluto	19,00	h	32,67	j	48,67	h	52,33	g
Testigo químico	22,00	f	35,00	i	56,33	e	57,67	e
<i>Azospirillum</i> sp.13	22,67	e f	36,33	h	57,33	e	58,33	d
<i>Azospirillum</i> sp.17	25,33	a b	40,67	f	58,67	d	59,33	d
<i>Azospirillum</i> sp.18	23,33	d e	47,67	e	62,33	c	63,67	c
<i>Azospirillum</i> sp.19	24,67	b c	48,33	e	65,00	b	67,67	a
<i>Azospirillum</i> sp.23	24,33	b c d	52,67	d	64,67	b	65,33	b
<i>Azotobacter</i> sp.28.6	23,67	c d	62,67	a	66,33	a	68,33	a
<i>Azotobacter</i> sp.33.36	26,33	a	56,83	c	65,33	a b	65,83	b
<i>Gluconacetobacter</i> sp.49	26,00	a	58,33	b	64,33	b	65,67	b
<i>Herbaspirillum</i> sp.15	19,33	h	37,33	g	53,33	f	53,67	f
<i>Herbaspirillum</i> sp.19	20,67	g	35,33	i	50,33	g	54,67	f

El 100% (10) de cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno incrementaron la altura de las plantas de tomate, a los 60 días después de la siembra (Figuras 32, 33, 34), alcanzándose índices de efectividad (Tabla 9) de 7,13% (Testigo químico) a 91,83% (*Azotobacter* sp.28.6). La prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia (Anexo 15) y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey el mayor valor se alcanzó con *Azotobacter* sp.28.6, diferenciándose significativamente de los demás tratamientos (Tabla 10).

El 100% (10) de cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno incrementaron la altura de las plantas de tomate, a los 75 días después de la siembra (Figuras 35, 36), alcanzándose índices de efectividad (Tabla 9) de 3,41% (*Herbaspirillum* sp.19) a 36,29% (*Azotobacter* sp.28.6). La prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia (Anexo 16) y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey los mayores valores se alcanzaron con *Azotobacter* spp.28.6 y 33.36, no diferenciándose significativamente entre ellos, pero si de los demás tratamientos (Tabla 10).

El 100% (10) de cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno incrementaron la altura de las plantas de tomate, a los 90 días después de la siembra (Figuras 37, 38), alcanzándose índices de efectividad (Tabla 9) de 4,47% (*Herbaspirillum* sp.15) a 30,58% (*Azotobacter* sp.28.6). La prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia (Anexo 17) y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey los mayores valores se alcanzaron con *Azotobacter* sp.28.6 y *Azospirillum* sp.19, no diferenciándose significativamente entre ellos, pero si de los demás tratamientos (Tabla 10).

El 90% (9) de cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno disminuyeron los días requeridos para la floración, siendo de 95 días con *Herbaspirillum* spp.15 y 19 y 99 días con *Azospirillum* sp.19 (Figuras 39, 40, 41), valores correspondientes a índices de efectividad de 5,0 y 1,0%, respectivamente (Tabla 11).



Figura 32. Altura de plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill., 60 días después de la inoculación de *Azotobacter* sp.28.6.

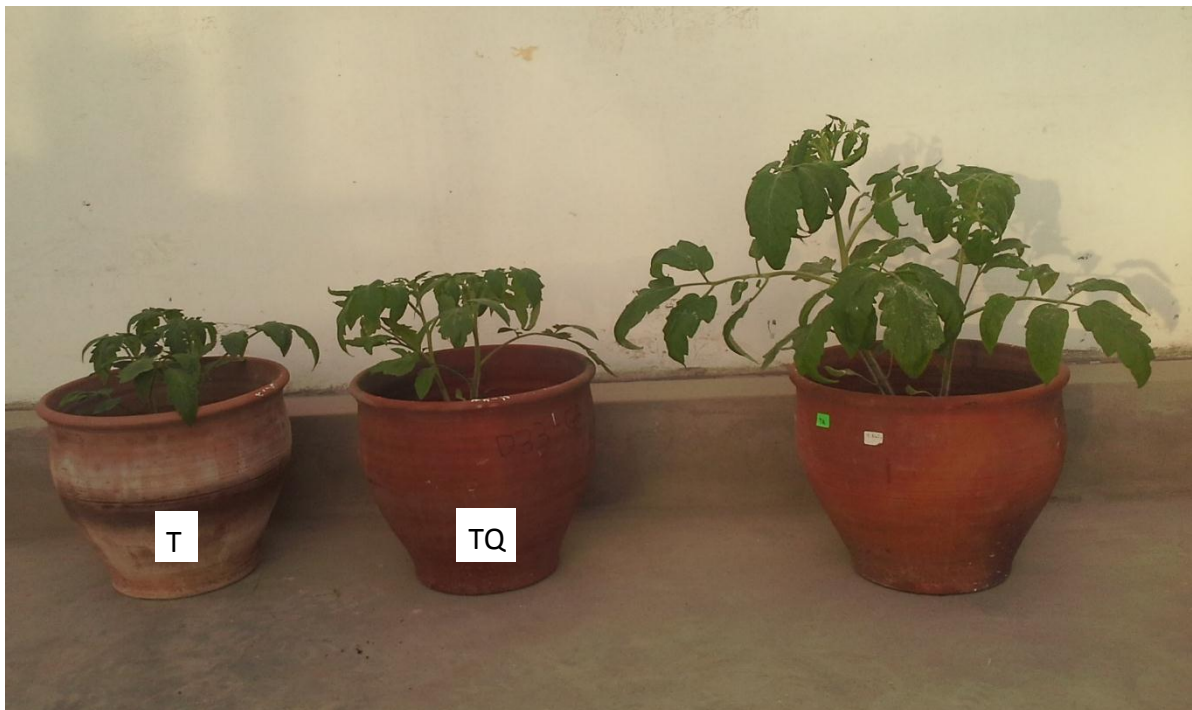


Figura 33. Altura de *Lycopersicon esculentum* Mill. 60 días después de la inoculación de *Gluconacetobacter* sp.49.

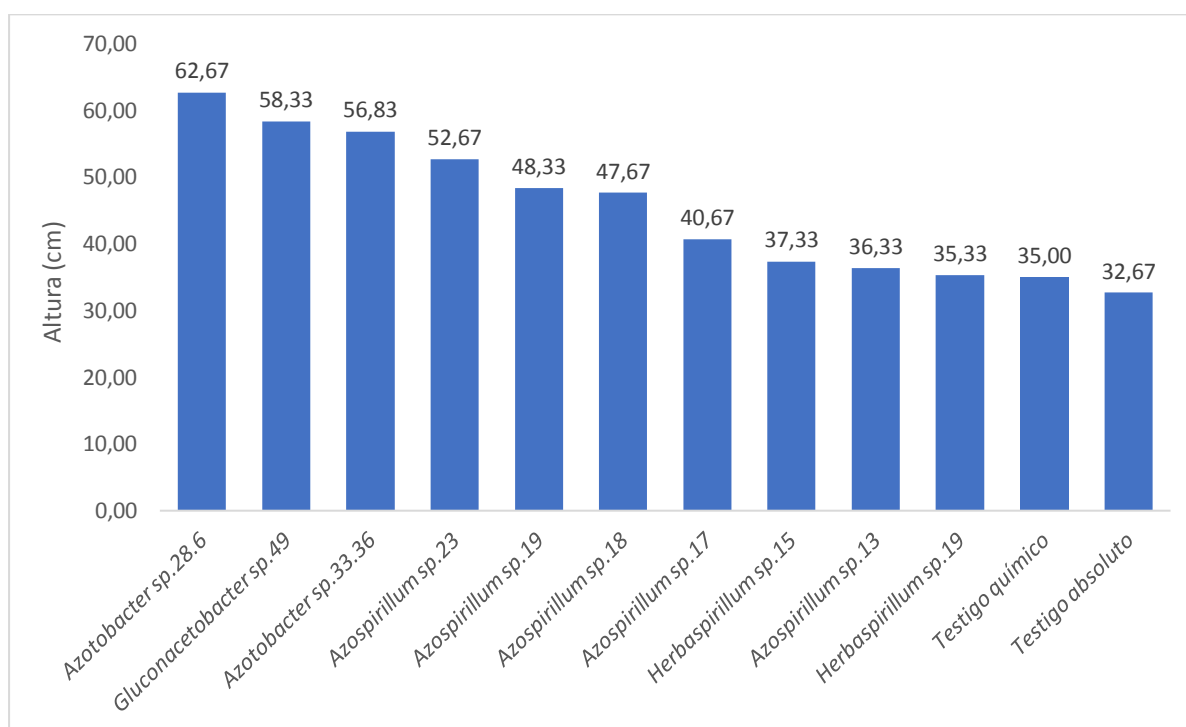


Figura 34. Altura (cm) de *Lycopersicon esculentum* Mill. 60 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas, 2017.

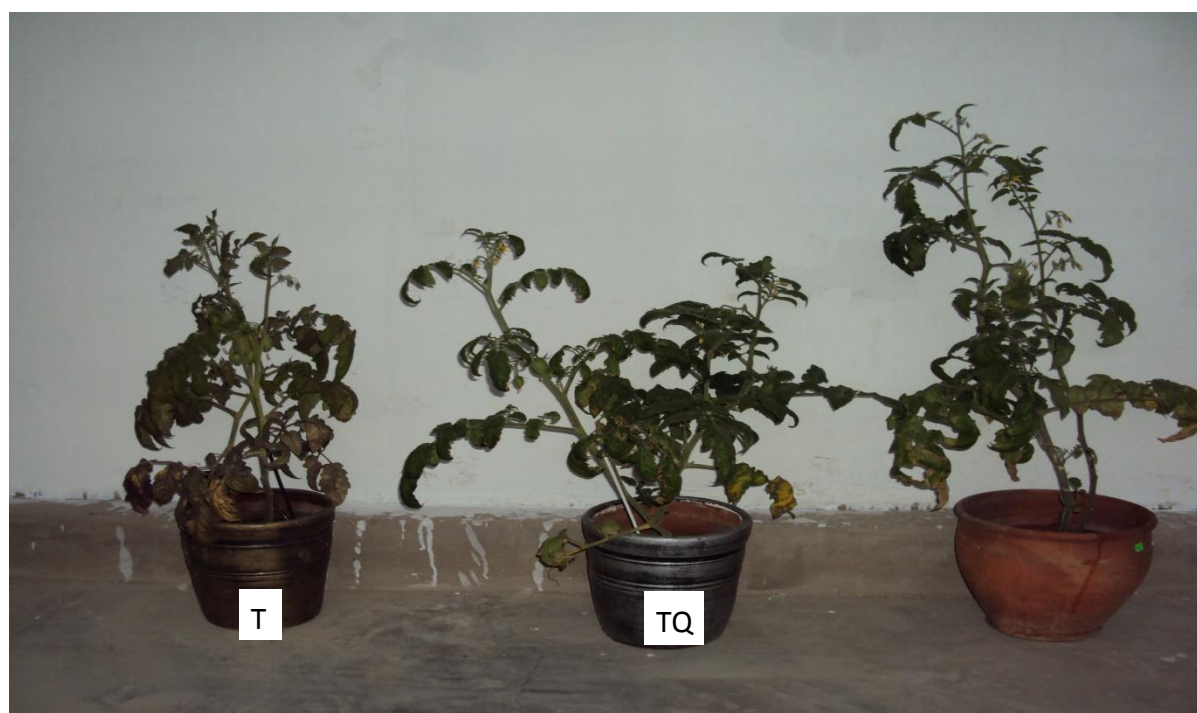


Figura 35. Altura de *Lycopersicon esculentum* Mill. 75 días después de la inoculación de *Azotobacter* sp.28.6.

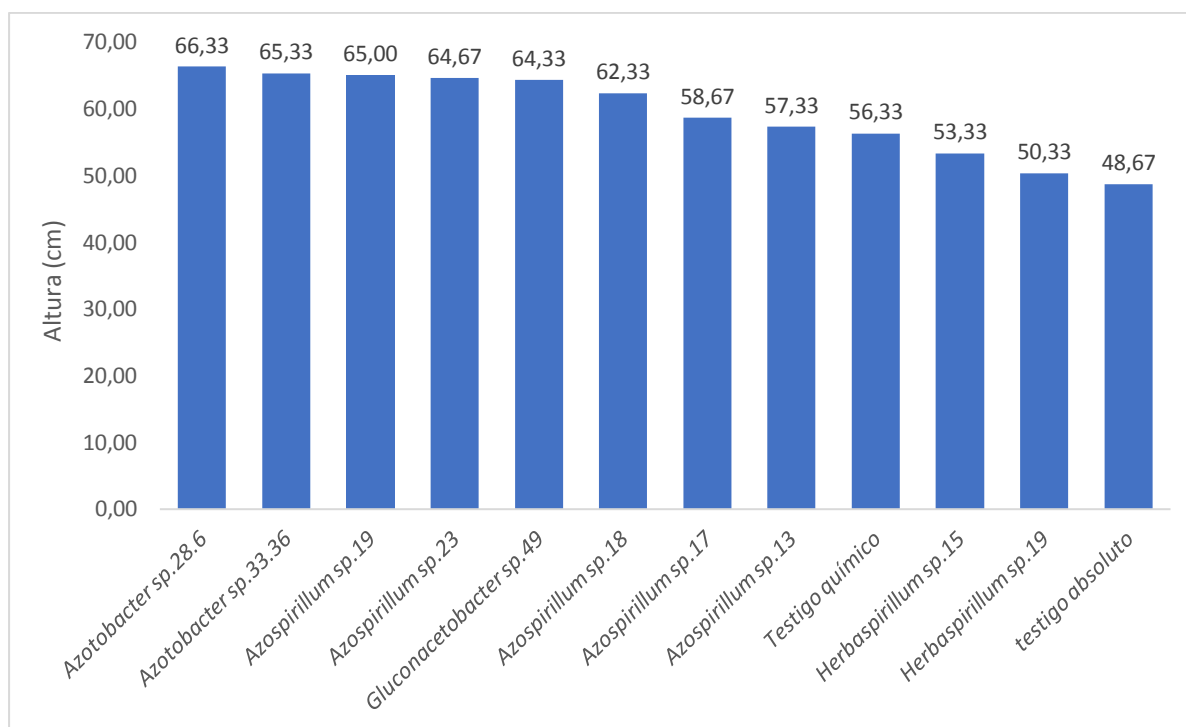


Figura 36. Altura (cm) de *Lycopersicon esculentum* Mill. 75 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas, 2017.



Figura 37. Altura de *Lycopersicon esculentum* Mill. 90 días después de la inoculación de *Herbaspirillum* sp.19 (a) y *Azotobacter* sp.28.6 (b).

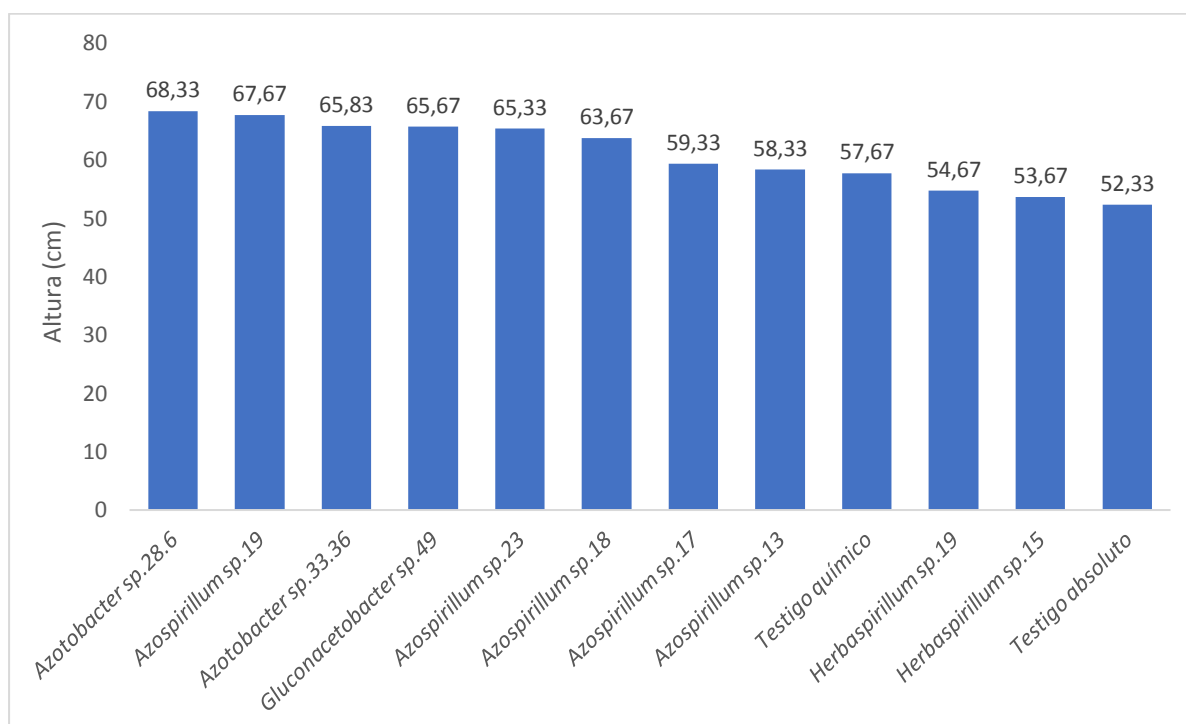


Figura 38. Altura (cm) de *Lycopersicon esculentum* Mill. 90 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas, 2017.



Figura 39. Flores de *Lycopersicon esculentum* Mill.



Figura 40. Plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill. en floración, 2017.

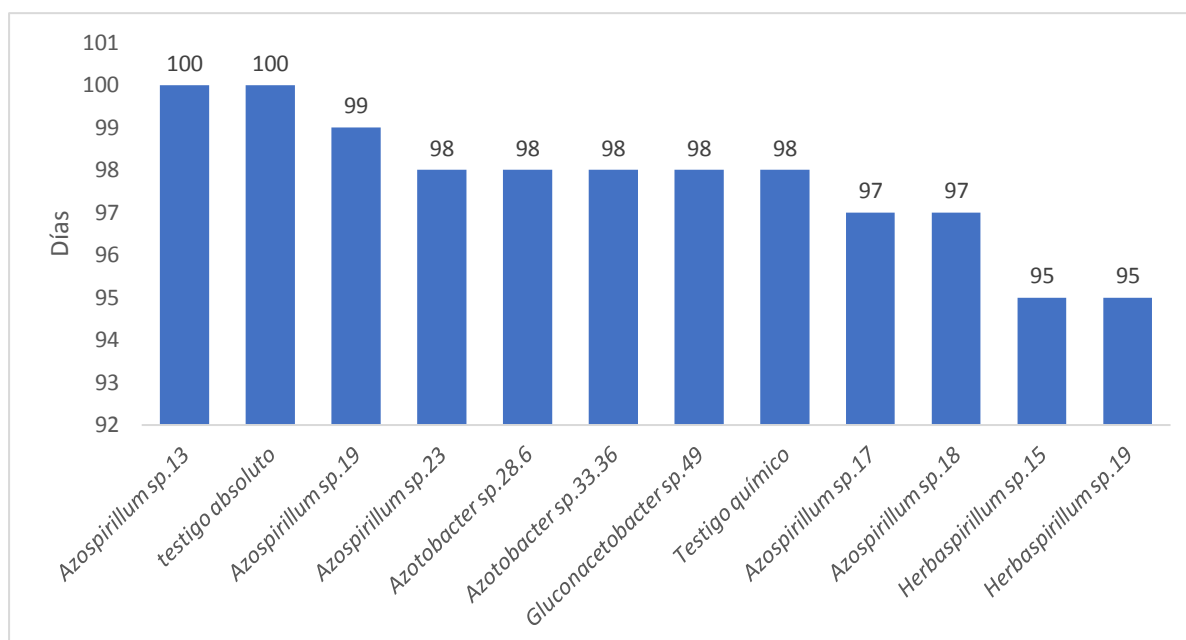


Figura 41. Días al 50% de la floración en *Lycopersicon esculentum* Mill., inoculado con bacterias fijadoras de nitrógeno a la siembra y al trasplante.

Tabla 11. Índices de efectividad (%) al 50% de la floración en *Lycopersicon esculentum* Mill., por bacterias fijadoras de nitrógeno inoculadas a la siembra y trasplante

Tratamientos	Tiempo requerido para la floración	
	Días	IE (%)
Testigo absoluto	100	-
Testigo químico	98	2,0
<i>Azospirillum</i> sp.13	100	0
<i>Azospirillum</i> sp.17	97	3,0
<i>Azospirillum</i> sp.18	97	3,0
<i>Azospirillum</i> sp.19	99	1,0
<i>Azospirillum</i> sp.23	98	2,0
<i>Azotobacter</i> sp.28.6	98	2,0
<i>Azotobacter</i> sp.33.36	98	2,0
<i>Gluconacetobacter</i> sp.49	98	2,0
<i>Herbaspirillum</i> sp.15	95	5,0
<i>Herbaspirillum</i> sp.19	95	5,0

El 100% (10) de cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno disminuyeron los días requeridos para la fructificación, siendo de 125 días con *Herbaspirillum* spp.15 y 19 y 128 días con *Azospirillum* sp.23, *Azotobacter* sp.28.6 y *Gluconacetobacter* sp.49 (Figuras 42 a 46), valores correspondientes a índices de efectividad de 3,10 y 0,78%, respectivamente (Tabla 12).

El 90% (9) de cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno aumentaron el número y peso de frutos comerciales de tomate (Figura 47), siendo de 68 frutos por planta con *Azospirillum* sp.18 y 76 frutos con *Herbaspirillum* sp.19 (Tabla 13, anexo 6), valores correspondientes a índices de efectividad de 4,62 y 16,92%, respectivamente (Tabla 14). La prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey los mayores valores se alcanzaron con *Gluconacetobacter* sp.49; *Herbaspirillum* spp.15 y 19, *Azospirillum* spp.19, 23; *Azotobacter* sp.33.36 y el Testigo químico, no diferenciándose significativamente entre ellos, pero si de los demás tratamientos (Tabla 15, anexo 18). El peso fue de 4,125kg con *Azotobacter* sp.28.6 y 4,865kg con *Herbaspirillum* sp.15, (Tabla 13, anexo 6), valores correspondientes a índices de efectividad de 3,9 y 22,54% respectivamente (Tabla 14). La prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia y según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey los mayores valores se alcanzaron con *Herbaspirillum* spp.15 y 19, diferenciándose significativamente de los demás tratamientos (Tabla 15, anexo 19).



Figura 42. Fructificación de *Lycopersicon esculentum* Mill., (a) Testigo absoluto, (b) Testigo químico, (c) *Herbaspirillum* sp.19.



Figura 43. Fructificación de *Lycopersicon esculentum* Mill., (a) Testigo absoluto, (b) Testigo químico, (c) *Azospirillum* sp.19.

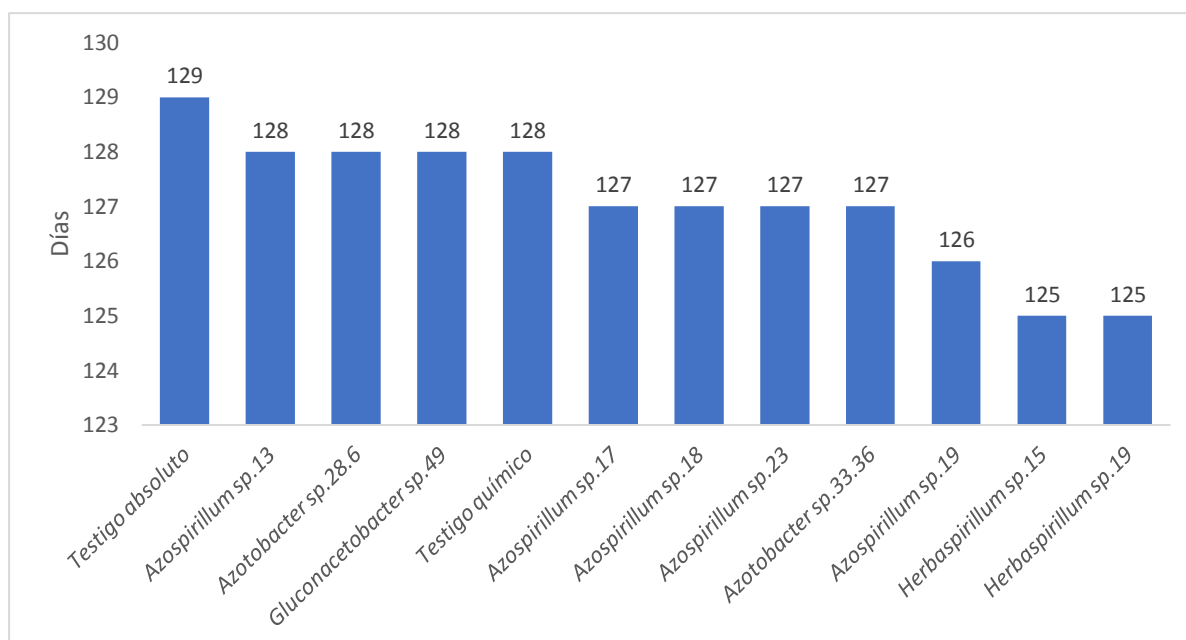


Figura 44. Días al 50% de la fructificación en *Lycopersicon esculentum* Mill., inoculado con bacterias fijadoras de nitrógeno a la siembra y trasplante.

Tabla 12. Índices de efectividad (%) al 50% de la fructificación en *Lycopersicon esculentum* Mill., por bacterias fijadoras de nitrógeno inoculadas a la siembra y trasplante

Tratamientos	Tiempo requerido para la fructificación	
	Días	IE (%)
Testigo absoluto	129	-
Testigo químico	128	0,78
<i>Azospirillum</i> sp.13	128	0,78
<i>Azospirillum</i> sp.17	127	1,55
<i>Azospirillum</i> sp.18	127	1,55
<i>Azospirillum</i> sp.19	126	2,33
<i>Azospirillum</i> sp.23	127	1,55
<i>Azotobacter</i> sp.28.6	128	0,78
<i>Azotobacter</i> sp.33.36	127	1,55
<i>Gluconacetobacter</i> sp.49	128	0,78
<i>Herbaspirillum</i> sp.15	125	3,10
<i>Herbaspirillum</i> sp.19	125	3,10



Figura 45. Fructificación de *Lycopersicon esculentum* Mill. 127 días después de la inoculación de *Azospirillum* sp.18.

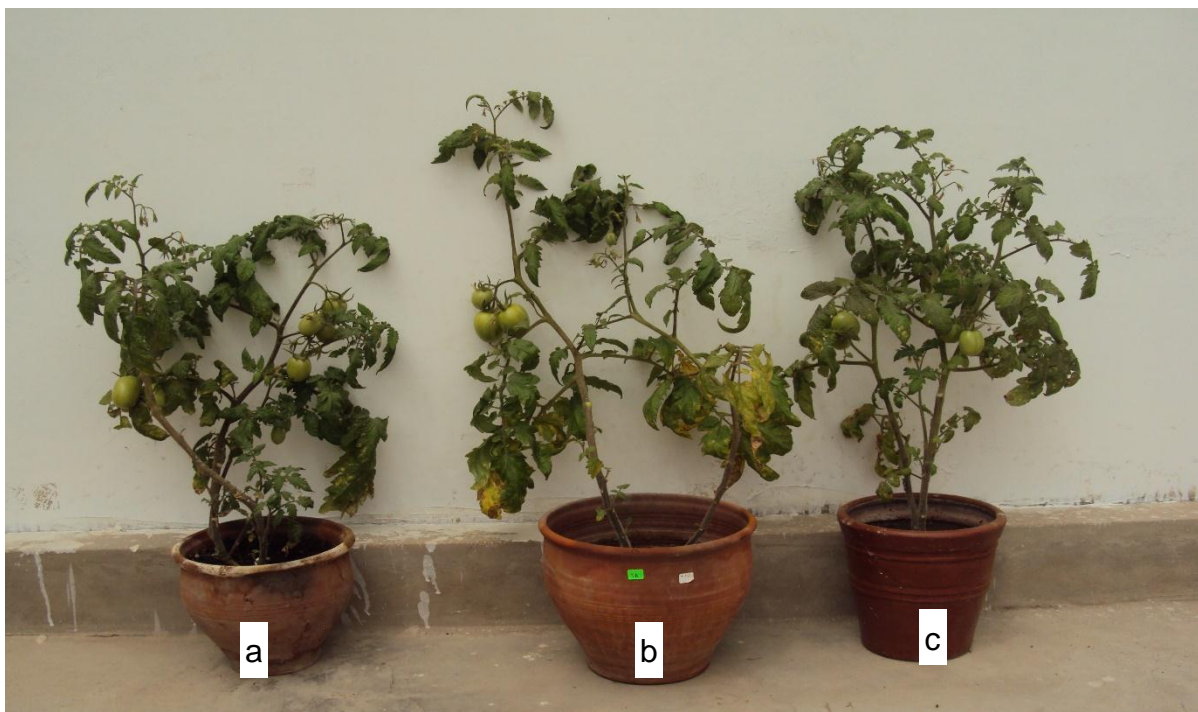


Figura 46. Fructificación de *Lycopersicon esculentum* Mill. 128 días después de la inoculación de *Gluconacetobacter* sp.49 (a), *Azotobacter* sp.28.6 (b), *Azospirillum* sp.13 (c)



Figura 47. Frutos comerciales de *Lycopersicon esculentum* Mill., inoculado con bacterias fijadoras de nitrógeno a la siembra y trasplante.

Tabla 13. Número y peso de frutos comerciales por planta de *Lycopersicon esculentum* Mill.

Tratamientos	Frutos	
	Número	Peso (kg)
Testigo absoluto	65	3,970
Testigo químico	73	4,230
<i>Azospirillum</i> sp.13	64	3,469
<i>Azospirillum</i> sp.17	70	4,435
<i>Azospirillum</i> sp.18	68	4,230
<i>Azospirillum</i> sp.19	72	4,365
<i>Azospirillum</i> sp.23	73	4,416
<i>Azotobacter</i> sp.28.6	71	4,125
<i>Azotobacter</i> sp.33.36	74	4,515
<i>Gluconacetobacter</i> sp.49	75	4,538
<i>Herbaspirillum</i> sp.15	75	4,865
<i>Herbaspirillum</i> sp.19	76	4,792

Tabla 14. Índices de efectividad (%) en el número y peso de frutos de *Lycopersicon esculentum* Mill por bacterias fijadoras de nitrógeno a la siembra y trasplante

Tratamientos	IE (%)	
	Número	Peso
Testigo químico	12,31	6,55
<i>Azospirillum</i> sp.13	-	-
<i>Azospirillum</i> sp.17	7,69	11,71
<i>Azospirillum</i> sp.18	4,62	6,55
<i>Azospirillum</i> sp.19	10,77	9,95
<i>Azospirillum</i> sp.23	12,31	11,23
<i>Azotobacter</i> sp.28.6	9,23	3,90
<i>Azotobacter</i> sp.33.36	13,85	13,73
<i>Gluconacetobacter</i> sp.49	15,39	14,31
<i>Herbaspirillum</i> sp.15	15,39	22,54
<i>Herbaspirillum</i> sp.19	16,92	20,71

Tabla 15. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey del número y peso de frutos de *Lycopersicon esculentum* Mill. inoculado con bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas

Tratamientos	Frutos			
	Número (Nº)	Sign.	Peso (g)	Sign.
Testigo absoluto	65	e	3,970	e
Testigo químico	73	a b c	4,230	d
<i>Azospirillum</i> sp.13	64	e	3,469	f
<i>Azospirillum</i> sp.17	70	c d	4,435	b c
<i>Azospirillum</i> sp.18	68	d e	4,230	d
<i>Azospirillum</i> sp.19	72	a b c d	4,365	c
<i>Azospirillum</i> sp.23	73	a b c	4,416	b c
<i>Azotobacter</i> sp.28.6	71	b c d	4,125	d
<i>Azotobacter</i> sp.33.36	74	a b c	4,515	b
<i>Gluconacetobacter</i> sp.49	75	a b	4,538	b
<i>Herbaspirillum</i> sp.15	75	a b	4,865	a
<i>Herbaspirillum</i> sp.19	76	a	4,792	a

V. DISCUSIÓN

Las bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas previamente de la monocotiledónea espárrago incrementaron el desarrollo de la dicotiledónea tomate, demostrándose que la especificidad planta-bacteria no es determinante en el éxito de la inoculación de estas bacterias. De igual manera, García (2012b) y Germán (2015) aislaron *Gluconacetobacter diazotrophicus* y *Azotobacter* sp. de la rizósfera de caña de azúcar y demostraron el efecto promotor de estas bacterias en el crecimiento de plantas de tomate. Por el contrario, García (2012a) inoculó en las semillas y raíces de tomate cultivos de *Azospirillum* spp. aisladas de raíces de espárrago silvestre y después de 30 días, determinó que no existieron diferencias significativas en los parámetros de crecimiento de las plantas inoculadas y no inoculadas.

La especificidad, afinidad u homología entre bacterias y genotipo vegetal ha sido demostrada en especies de *Azospirillum*, bacterias que tienen movilidad y quimiotaxis con algún genotipo particular (dos Santos et al., 2005). La especificidad de la asociación diazotrófica con las poáceas se atribuye a la presencia de proteínas tipo lectinas en la superficie radicular (Karpati et al., 1999). La interacción entre *Azospirillum* y las lectinas contribuye a la adhesión de la bacteria a la superficie radicular y al establecimiento de una asociación fijadora de nitrógeno incrementada en el hospedero (Huauya et al., 2001). El xilema es el principal sitio de fijación de nitrógeno en la asociación maíz-*Azospirillum*, donde, la baja presión parcial de oxígeno requerida para la actividad de la nitrogenasa y la presencia de malato constituyen factores que favorecen el establecimiento y actividad de *Azospirillum* spp. (Malik et al., 1997 mencionados por Huauya et al., 2001).

Rangel et al. (2011) investigaron la afinidad y efecto de *Azospirillum* sp. en maíz y según el número de estas bacterias y su actividad nitrogenasa existió algún grado de afinidad entre *Azospirillum* obtenido de maíz H-28 y Chalqueño y su reinoculación en estas mismas variedades. La afinidad de cepas bacterianas y plantas de maíz también fue reportada por Pecina et al. (2005) y según Bashan et al. (1996) esta condición limita la posibilidad de obtener con *Azospirillum* spp. un inoculante comercial confiable.

La fijación de nitrógeno o diazotrofia fue la primera característica estudiada en las bacterias beneficiosas de la rizósfera de las plantas o PGPR (Kloepper, 2003). En una reacción catalizada por el complejo enzimático nitrogenasa, las bacterias reducen el nitrógeno molecular hasta amoníaco, que puede ser asimilado por los vegetales (Mayz, 2004). La diazotrofia fue demostrada previamente en *Azospirillum* (Rangel et al., 2011; Guzmán et al., 2012), *Herbaspirillum* (You et al., 2005; Koomnok et al., 2007), *Gluconacetobacter* (Jha et al., 2009) y *Azotobacter* (Delgado y Suyón, 2017). Además de la fijación de nitrógeno, estas bacterias producen reguladores de crecimiento, solubilizan fosfatos y presentan antagonismo a fitopatógenos (Moreira et al., 2010).

La producción de indoles explica en parte el efecto promotor del crecimiento vegetal por las bacterias diazotróficas (Aguilar et al., 2008; Moreira et al., 2010). Estos reguladores del crecimiento son producidos por *Azospirillum* spp. (Guzmán et al., 2012), *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* y *Azotobacter* spp. (Delgado y Suyón, 2017). Las auxinas, entre la que destaca el ácido indolacético están vinculadas a los procesos de orientación del crecimiento de tallos y raíces, en respuesta a la luz y gravedad, diferenciación de tejidos vasculares, dominancia apical, iniciación de las raíces laterales y adventicias, estimulación de la división celular y elongación de tallo y raíces (Cassan et al., 2009).

La solubilización de fosfatos no es una característica distintiva de las bacterias fijadoras de nitrógeno; sin embargo, se ha demostrado su capacidad para solubilizar fosfato tricálcico (Clavijo et al., 2012) e hidroxapatitas (Reyes y Valery, 2007), con liberación de fósforo soluble y aumento en su disponibilidad para las plantas (Carreño, 2009).

El efecto promotor de las bacterias fijadoras de nitrógeno se evidenció con el incremento en la germinación, altura, longitud de raíces y rendimiento, así como también en la disminución de los días requeridos para la floración de las plantas de tomate; no obstante, también existen reportes de incremento en la materia seca (Sharifi et al., 2011), nitrógeno disponible en el suelo (Balemi et al., 2007), biomasa y concentración de glucósidos (Borda et al., 2009), nitrógeno y fósforo en el tejido foliar (Reyes et al., 2008), precocidad a la floración (González et al., 2011), aumento en el rendimiento (Balemi et al., 2007; Ashrafi & Naser, 2011) y reducción del fertilizante químico en 20% (Dalla et al., 2004), 25% (Balemi et al., 2007), 33% (González et al., 2011) y 50% (Lozada y Rivas et al., 2010) en cultivos de cebada, cebolla, maíz y *Capsicum frutescens* “chile”, respectivamente.

El incremento en la altura de las plantas inoculadas con bacterias fijadoras de nitrógeno se ha reportado en cultivos agrícolas como tomate (Escobar et al., 2011), pimiento pimentonero (Di Barbaro et al., 2005), maíz (Ashrafi & Naser, 2011; Sharifi et al., 2011), cebolla (Balemi et al., 2007) y algodón (Aly et al., 2012).

La morfología de la raíz cambia por efecto de las bacterias fijadoras de nitrógeno, observándose proliferación de pelos absorbentes de las raíces de plántulas en *Setaria lachnea* (Toniutti y Fornasero, 2008), incremento en la longitud (Aly et al., 2012), peso de la biomasa radicular en tomate (Germán, 2015) y rabanito (García, 2012b). Las diazotróficas como *Azospirillum* spp. modifican el sistema radicular debido, al menos en parte, a la producción de reguladores del crecimiento que incrementan el número de raíces laterales y pelos radicales, aumentando la superficie disponible para la absorción de nutrientes y el flujo de protones en la membrana de la raíz, lo que promueve la captación de agua y minerales (Aguilar et al., 2008).

La magnitud del efecto positivo de las bacterias fijadoras de nitrógeno en condiciones de invernadero, no siempre está relacionada con los resultados previamente obtenidos en condiciones de laboratorio. Fernández (2015) determinó que la germinación de café aumentó con la inoculación de bacterias productoras de indoles y solubilizadoras de fosfatos; no obstante, el incremento fue mayor con *Azotobacter* FN205 (63,3ppm indoles), en contraste con *Azotobacter* FN111 (81,4ppm), cuantificándose 66,7 y 45% de semillas germinadas, respectivamente. De igual manera, este investigador reportó que los índices de efectividad fueron

significativamente mayores con *Pseudomonas* 118 (58,8ppm indoles) en comparación con *Azotobacter* FN205 (63,3ppm indoles), registrándose incrementos de 181 y 80% en la biomasa aérea y 53 y 31% en la biomasa radicular de plantas de café, respectivamente. En este contexto, las bacterias fijadoras de nitrógeno investigadas se seleccionaron con base a la efectividad en la altura y longitud de las raíces de las plantas de tomate.

La disminución de los días requeridos para la floración por efecto de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno se observó previamente en cultivos de maíz con *Azospirillum* sp. (Uribe et al., 2007; González et al., 2011) y tomate con *Azotobacter* sp. (Escobar et al., 2011).

Incrementos en el rendimiento de los cultivos agrícolas por efecto de la inoculación de bacterias diazotróficas fueron reportados previamente por García et al. (2006) con *A. brasilense* en sorgo (13 a 27%), Punschke y Mayans (2011) con *Herbaspirillum* sp. en arroz (15%) y García et al. (2012) con *A. brasilense* en maíz (15%). Según Martínez et al. (1999) mencionados por Carrera (2012) incrementos de por lo menos 20% en el rendimiento de los cultivos se consideran comercialmente muy valiosos para la agricultura, siempre y cuando estos resultados sean consistentes. En este contexto, *Herbaspirillum* spp.15 y 19 tienen potencial para incrementar el rendimiento del cultivo de tomate.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno son de vida libre, asociativas y simbióticas (Moreira et al., 2010). *Azospirillum* spp. y *Herbaspirillum* spp. son diazotróficas asociativas, pudiendo ser endófitas facultativas y obligadas (Altamirano et al., 2014). Las facultativas como *Azospirillum* spp. colonizan el suelo rizosférico y el interior de la raíz (Beracochea, 2011). Las endófitas obligadas como *Herbaspirillum* y *Gluconacetobacter* colonizan el interior de los tejidos del hospedero (Altamirano et al., 2014). En la presente investigación, en su mayoría, las bacterias asociativas superaron en los índices de efectividad a las de vida libre como *Azotobacter* sp. De igual manera, Delgado y Suyón (2017) registraron los mayores índices de efectividad en la altura de plantas de espárrago con *Azospirillum* y *Herbaspirillum* spp. Según Moreno (2012), considerándose que se encuentran en contacto íntimo con las plantas, se espera que las bacterias endófitas brinden beneficios más directos a su hospedero que las rizosféricas de vida libre.

VI. CONCLUSIONES

- ✓ Las bacterias cuantificaron nitrógeno (12,52 a 35,50ppm de amonio), solubilizaron fosfato tricálcico (10,39 a 33,55ppm de fósforo soluble) y produjeron indoles (22,47 a 195,80ppm).
- ✓ Los 24 cultivos de las bacterias fijadoras de nitrógeno incrementaron la altura con índices de efectividad de 4,47% (*Herbaspirillum* sp.15) a 30,58% (*Azotobacter* sp.28.6) y longitud de las raíces de plantas de tomate con índices de efectividad de 4,48% (*Azospirillum* sp.6) a 103,14% (*Herbaspirillum* sp.15)
- ✓ Los 10 cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas fueron las que alcanzaron los mayores índice de efectividad a la altura y longitud de las raíces de tomate.
- ✓ Las bacterias fijadoras de nitrógeno incrementaron el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill. destacando *Herbaspirillum* spp.15 y 19 con índices de efectividad de 25% en la emergencia; 1,74 a 14,26% en la altura; 15,39 a 16,92% en el número de frutos y 20,71 a 22,54% en el peso de los frutos.

VII. RECOMENDACIONES

- ✓ Identificar a nivel molecular *Herbaspirillum* spp.15 y 19.
- ✓ Determinar el efecto de *Herbaspirillum* spp.15 y 19 en el desarrollo de tomate en condiciones de campo, con y sin la aplicación de fertilizante químico.
- ✓ Investigas sustratos orgánicos de bajo costo para el incremento masivo de *Herbaspirillum* spp.15 y 19.
- ✓ Investigar el efecto de bacterias fijadoras de nitrógeno en el desarrollo de otros cultivos agrícolas en condiciones de invernadero y campo.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguado, S. (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.
- Aguilar, J., Xiqui, M., Garcías, S. y Baca, B. (2008). Producción del ácido indol-3-acético en *Azospirillum*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50(1-2), 29 – 37.
- Altamirano, C., Carreño, C., Plasencia, V., Ramírez, L., Silva, J. y Ugaz, F. (2014). *Bacterias rizosféricas y endófitas fijadoras de nitrógeno*. Lambayeque, Perú: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- Alvarado, P. y Valderrama, M. (2014). *Caracterización de los géneros Bukholderia y Pseudomonas solubilizadoras de fosfato aisladas de Zea mays L. en el distrito de Reque en Lambayeque, marzo-mayo, 2014*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Aly, M., El-Sayed, H. & Jastaniah, S. (2012). Synergistic effect between *Azotobacter vinelandii* and *Streptomyces* sp. isolated from saline soil on seed germination and growth of wheat plant. *Journal of American Science*, 8(5), 667-676.
- Ashrafi, V. & Naser, M. (2011). Influence of diferent plant densities and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and yield attributes of corn (*Zea maize* L.). *Recent Research in Science and Technology*, 3(1), 63-66.
- Baiocchi, A y Saavedra, A. (2011). *Caracterización de cepas nativas de Azosporillum spp. y su efecto como promotoras del desarrollo vegetativo del tomate (Lycopersicon esculentun Mill.). en invernadero* (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Balemi, T., Pal, N. & Saxena, A. (2007). Responce of onion (*Allium cepa* L.) to combined application of biological and chemical nitrogenous fertilizers. *Acta Agriculturae Slovenica*, 89(1), 107-114.

- Bashan, Y., Holguin, G. y Ferrera, R. (1996). Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos I. *Azospirillum*. *Terra*, 14(2), 159-194.
- Beracochea, M. (2011). *Respuesta de variedades comerciales de maíz (Zea mays L.) a la inoculación con bacterias endófitas–diazótrofas nativas*. (Tesis de Pregrado). Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- Bhattacharyya, P. & Jha, D. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 28, 1327-1350.
- Borda, D., Pardo, J., Martínez, M. & Montaña, J. (2009). Producción de un biofertilizante a partir de un aislamiento de *Azotobacter nigricans* obtenido en un cultivo de *Stevia rebaudiana* Bert. *Universitas Scientiarum*, 14(1), 71-78.
- Cadena, S. y Martinez, B. (2011). *Caracterización de cepas de Pseudomonas spp. Y su efecto en la germinación y emergencia de Zea mays L. “maíz” en Lambayeque*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Camelo, M., Vera, S. & Bonilla, R. (2011). Mecanismos de acción de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 12(2), 159-166.
- Carreño, C. (2009). *Efecto de la inoculación de bacterias nativas solubilizadoras de fósforo en el desarrollo y rendimiento de tres cultivos agrícolas en Mochumí, Lambayeque, Perú*. (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional de Trujillo, La Libertad, Perú.
- Carrera, A. (2012). Caracterización bioquímica, molecular y funcional del banco de cepas de *Azospirillum* spp. del INIAP aisladas de la rizósfera del cultivo de maíz (*Zea mayz* L.) de la sierra ecuatoriana. (Tesis de Pregrado). Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador.
- Cassan, F., Maiale, S. Masciarelli, O., Vidal, A., Luna, V. & Ruiz, O. (2009). Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its posible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. *European Journal of Soil Biology*, 45(1), 12-19.

- Clavijo, C., Chipana, V., Centeno, J., Zúñiga, D. y 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.
- 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, La Libertad, Perú.
- Dalla, O., Fernández, R., Michelena, G., Ronzelli, P. & Socol, C. (2004). *Azospirillum* sp. inoculation in wheat, barley and oats under greenhouse experiments. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47(6), 843-850.
- Delgado, J. y Suyón, L. (2017). *Bacterias endófitas y rizosféricas fijadoras de nitrógeno aisladas de Asparagus officinalis L. en Virú, región La Libertad y su potencial como promotoras de crecimiento en plantas*. (Tesis de Pregrado). Universidad Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Delgado, Y., Cupull, R., Pérez, C., Sánchez, A. & Vélchez, M. (2003). Efecto de *Azotobacter* spp. en la estimulación de la germinación y el desarrollo de posturas de *Coffea arabica* L. *Centro Agrícola*, 30(1), 26-32.
- Di Barbaro, G., Pernasetti, S. y Stegmayer, A. (2005). Evaluación del efecto de *Azospirillum brasilensis* en la germinación y emergencia del pimiento pimentonero (*Capsicum annuum* L. var. trompa de elefante). *Revista del CIZAS*, 6(1-2), 74 – 85.
- dos Santos, A., dos Santos, T., Kirchhof, G., Hartmann, A. & Baldani, J. (2005). Influence of soil and host plant crop on the genetic diversity of *Azospirillum amazonense* isolates. *Pedobiología*, 49(6), 565-576.
- Dibut, B. (2009). *Biofertilizantes como insumos en agricultura sostenible*. La Habana, Cuba: Editorial Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical.
- Escobar, C. y Horna, G. (2011). *Caracterización de cepas nativas de Azotobacter spp. y su potencial como promotoras del desarrollo vegetativo del tomate (Lycopersicon esculentum Mill)*.

- (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Escobar, C., Horna, Y., Carreño, C. y Mendoza, G. (2011). Caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* spp. y su efecto en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill. "tomate" en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 2(1), 39-49.
- Fassio, A., Carriquiry, A., Tojo, C. y Romero, R. (1998). *Maíz: Aspecto sobre Fenología*. Montevideo: Unidad de Difusión e Información Tecnológica del Instituto Nacional de Investigación Agraria, INIA.
- Fernández, C. (2015). *Efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal en el cultivo de café (Coffea arabica L. var. "Típica") en sus primeros estadios de su desarrollo*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Agraria la Molina, Lima, Perú.
- Fuentes, J. (2001). *Iniciación a la Botánica*. Madrid, España: Paraninfo S.A.
- García, M. (2012a). *Efecto de inoculación con bacterias diazotróficas de vida libre endófitas sobre el crecimiento de Lycopersicum esculentum "tomate"*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional de Trujillo, La Libertad, Perú.
- García, M. (2012b). *Raphanus sativus L. "rabanito" como modelo para evaluar la capacidad fijadora de nitrógeno de bacterias diazotróficas endófitas. Trujillo, La Libertad. Marzo-Agosto 2012*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional de Trujillo, La Libertad, Perú.
- García, F. y Muñoz, H. (2010). *Caracterización de cepas nativas de Azospirillum spp. y su efecto como promotoras del desarrollo vegetativo de arroz (Oryza sativa)*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- García, J., Mendoza, A. y Mayek, N. (2012). Efecto de *Azospirillum brasilense* en el rendimiento del maíz en el norte de Tamaulipas, México. *Universidad y ciencia trópico Húmedo*, 28(1), 79-84.
- García, J., Moreno, V., Rodríguez, J., Mendoza, A. y Mayek, N. (2006). Biofertilización con *Azospirillum brasilense* en sorgo, en el norte de México. *Agricultura Técnica en México*, 32(2), 135-141.

- Garrido, M. (2007). *Aislamiento e identificación de bacterias diazotróficas rizosféricas y endófitas asociadas a suelos y pastos del valle y sabana del Cesar en dos épocas climáticas*. (Tesis de Maestría). Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, Colombia.
- Gaspar, L. (2000). Nutrición del cultivo de tomate para industria. Recuperado de <http://agroestrategias.com/pdf/cultivos%20%20fertiyeccion%20de%20tomate%20para%20Lobesto.pdf>.
- Germán, J. (2015). *Efecto de las concentraciones de Azotobacter sp. aislado de rizósfera de suelos de Saccharum officinarum sobre el crecimiento de Lycopersicum esculentum "tomate"*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional de Trujillo, La Libertad, Perú.
- González, A., Pérez, D., Franco, O., Balbuena, A., Gutierrez, F. y Romero, H. (2011). Respuesta de tres cultivares de maíz a la inoculación con *Azospirillum brasilense* bajo cuatro diferentes dosis de nitrógeno. *CIENCIA Ergo Sum*, 28(1), 51-58.
- Guzmán, A., Obando, M., Rivera, D. y Bonilla, R. (2012). Selección y caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 182-190.
- Hartz, T. (2004). *Drip irrigation and fertigation management of processing tomato*. California, Estados Unidos: Vegetable Research and Information Center, University of California.
- Hernández, A., Heydrich, M., Velázquez, M. y Hernández, A. (2006). Perspectivas del empleo de rizobacterias como agentes de control biológico en cultivos de importancia económica. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24 (1), 42-49.
- Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, P. (2014). *Metodología de la Investigación* (6^{ta} ed). México: Mc Graw, Hill Interamericana Editores S.A.

- Huauya, M., Juscamaita, J. y Calderón, C. (2001). Evaluación de diazótrofos asociados al cultivo de maíz (*Zea mays* L.) en condiciones de agricultura natural. *Anales Científicos UNALM*, 12(1), 215-230.
- Jha, B., Thakur, M., Gontia, I., Albrecht, V., Stoffels, M., Schmid, M. & Hartmann, A. (2009). Isolation, partial identification and application of diazotrophic rhizobacteria from traditional Indian rice cultivars. *European Journal of Soil Biology*, 45, 62-72.
- Ji, S., Gururani, A., & Chun, S. (2013). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiological Research*, 169(1), 83-98.
- Karpati, E., Kiss, P., Ponyi, T., Fendrik, I. & Orosz, L. (1999). Interaction of *Azospirillum lipoferum* with wheat germ agglutinin stimulates nitrogen fixation. *Journal of Bacteriology*, 181, 3949-3955.
- Kloepper, J. (2003). A review of mechanisms for plant growth promotion by PGPR. *6th International PGPR Workshop*, 5-10 october, Calicut, India.
- Koomnok, Ch., Teaumroong, N., Rerkasem, B. & Lumyong, S. (2007). Diazotroph endophytic bacteria in cultivated and wild rice in Thailand. *ScienceAsia*, 33, 429-435.
- Lara, C., Villalba, M. y Oviedo, L. (2007). Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, IX (2), 6-14.
- León, C. (2014). *Pseudomonas spp. aisladas de la rizósfera de Lycopersicon esculentum Mill. "tomate" y su potencial como promotoras del crecimiento de plantas en Lambayeque, 2012*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Lambayeque, Perú
- Loredo, C., López, L. y Espinoza, D. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana*, 22(2), 225 – 239.
- Lozada, L. y Rivas, C. (2010). *Evaluación del efecto de la inoculación con Azotobacter spp. en plantas de ají dulce (Capsicum frutescens)*. (Tesis de Pregrado). Universidad de los Andes, Trujillo, Argentina.

- Mantilla, M. (2007). *Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (Chrysanthemum morifolium var. Yoko ono) en periodo de enraizamiento*. (Tesis de Pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Matas, A. (2005). *Estudio de los factores incidentes en el agrietado del fruto de tomate (Lycopersicon esculentum Mill.) tipo cereza: El papel de la cutícula del fruto*. (Tesis de Doctorado). Universidad de Málaga, Málaga, España.
- Mayz, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista UDO Agrícola*, 4(1), 1-20.
- Menezes, A. (2009). *Aislamiento y caracterización de bacterias diazótroficas asociadas a maíz (Zea mays L.) variedad PAU 871*. (Tesis de Pregrado) Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- Ministerio de Agricultura y Riego, MINAGRI. (2016). Producción de espárragos en el Perú. Recuperado de: <http://larepublica.pe/imprensa/economia/701334-la-libertad-ocupa-el-primer-lugar-en-produccion-de-esparragos>.
- Moreira, F., da Silva, K., Nóbrega, R. y de Carvalho, F. (2010). Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, 1(2), 74-99.
- Moreno, B. (2012). *La rizósfera y las relaciones entre plantas y los microorganismos*. En: G. Aguado (Ed). Introducción al uso y manejo de los biofertilizantes en la Agricultura, (pp. 23-33.). México: Instituto Nacional de Investigaciones, Forestales, Agrícolas y Pecuarias, INIFAP/Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA.
- Moreno, L. y Galvis, F. (2013). Potencial biofertilizante de bacterias diazótroficas aisladas de nuestras de suelo rizosférico. *Pastos y Forrajes*, 36(1), 33-37.
- Mostacero, J., Mejía, F. y Gamarra, O. (2002). *Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú*. Trujillo, Perú: Consejo de Ciencia y Tecnología, CONCYTEC.
- Otero, V. (2011). *Aislamiento, selección e identificación de actinomicetos, bacterias, fotosintéticas no sulfurosas y bacterias ácido lácticas con potencial biofertilizante, a partir de suelos asociados al cultivo de plátano en la*

Costa Atlántica Colombiana. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Pecina, V., Díaz, A. Williams, H. Rosales, E. y Garza, I. (2005). Influencia de fecha de siembra y biofertilizante en sorgo. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 28(4), 389-392.

Pedraza, R., Teixeira, K., Fernández, A., García, I., Baca, B., Azcón, R., Baldani, V. y 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.

Punschke, K., y Mayans, M. (2011). Selección de cepas de *Herbaspirillum* spp. promotoras del crecimiento de arroz. *Agrociencia Uruguay*, 15(1), 19-26.

Rangel, J., Rodríguez, M., Ferrera, R., Castellanos, J., Ramírez, R. y Alvarado, E. (2011). Afinidad y efecto de *Azospirillum* sp. en maíz. *Agronomía Mesoamericana*, 22(2), 269-279.

Reyes, I., Álvarez, L., El-Ayoubi, H. y Valery, A. (2008). Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro*, 20(1), 37-48

Reyes, I. y Valery, A. (2007). Efecto de la fertilidad del suelo sobre la microbiota y la promoción del crecimiento del maíz (*Zea mays* L.) con *Azotobacter* spp. *Bioagro*, 19(3), 117-126.

Rico, M. (2009). *Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género Azotobacter y Actinomicetos aislados de cultivos de Solanum tuberosum Linnaeus, 1753 (Papa) cultivados en zonas altoandinas del Perú*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Rodier, J. y Rodi, L. (2005). *Análisis de Aguas*. España: Ediciones Omega.

Rodríguez, C. (2013). *Evaluación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal en tomate (Solanum lycopersicum) variedad Santa Clara, aislados de residuos lignocelulósicos de higuera (Ricinus communis)*. (Tesis de Pregrado). Universidad Católica de Manizales, Caldas, Colombia.

- Rodríguez, V. y Morales, J. (2007). *Evaluación de alternativas de protección física y química de semilleros de tomate (Lycopersicum esculentum Mill) contra el ataque del complejo mosca blanca (Bemisia tabaci, Genadius)-Geminivirus y su efecto en el rendimiento, en el municipio de Tisma, Masaya.* (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua.
- 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.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA. (2010). *Uso de Fertilizantes.* Recuperado de <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrollorural/documens/fichasaap/uso%20de%20fertilizantes>.
- Sharifi, R., Khavazi, K. & Gholipouri, A. (2011). Effect of seed priming with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on dry matter accumulation and yield of maize (*Zea mays* L.) hybrids. *International Research Journal of Biochemistry and Bioinformatics*, 1(3), 76-83.
- Sopplin, J., Rengifo, A. & Chumbe, J. (1993). Análisis en el crecimiento en *Zea mays* L. y *Arachis hipogaea* L. *Folia Amazonica*, 5(1-2), 171-189.
- Soplopuco, L. y Navarro, C. (2005). *Efecto de cinco fuentes y dosis de abono orgánico sobre el rendimiento y calidad de tomate (Lycopersicon esculentum Mill.) en Lambayeque.* (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Toniutti, M. y Fornasero, L. (2008). Efecto de la inoculación de *Azospirillum brasilense* sobre el crecimiento y desarrollo de *Setaria lachnea* (Nees) Kunth. *Revista FAVE- Ciencias Agrarias*, 7(1-2), 33-41.
- Uribe, G., Petit, J. y Dzib, E. (2007). Respuesta del cultivo de maíz a la aplicación de biofertilizantes en el sistema Roza, Tumba y Quema en suelo Alfisol (Chac-Lu'um, Nomenclatura Maya), en Yucatán, México. *Agricultura Andina*, 13, 3-18.

- Vásquez, A., Díaz, N., Vásquez, O. & Vásquez, W. (2012). *Metodología de la Investigación Científica*. Lambayeque, Perú: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- Vicentini, A. (2006). *Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado*. (Tesis de Doutorado). Universidade Federal de Santa Maria, Río Grande do Sul, Brasil.
- Yasari, E., Azadgoleh, E., Pirdashti, H. & Mozafari, S. (2008). *Azotobacter* and *Azospirillum* inoculants as biofertilizers in Canola (*Brasica napus* L.) cultivation. *Asian Journal of Plant Sciences*, 7(5), 490-494.
- You, M., Nishiguchi, T., Saito, A., Isawa, T., Mitsui, H. & Minamisawa, K. (2005). Expression of the *nifH* gene of a *Herbaspirillum* endophyte in wild rice species: Daily rhythm during the light-dark cycle. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8183-8190.

ANEXOS

ANEXO 1

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

a. Reactivos (en Lara et al., 2007; Cadena y Martinez, 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**

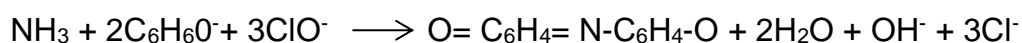
Citrato de sodio	20g
Hidróxido de sodio	1g
Hipoclorito de sodio 5% (lejía comercial)	2mL
Agua destilada	100mL

b. Método indirecto de valoración del ión amonio, utilizando la técnica colorimétrica de Berthelot (fenol-hipoclorito, en Lara et al., 2007)

b.1 Fundamento del método colorimétrico de Berthelot (fenol-hipoclorito)

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:

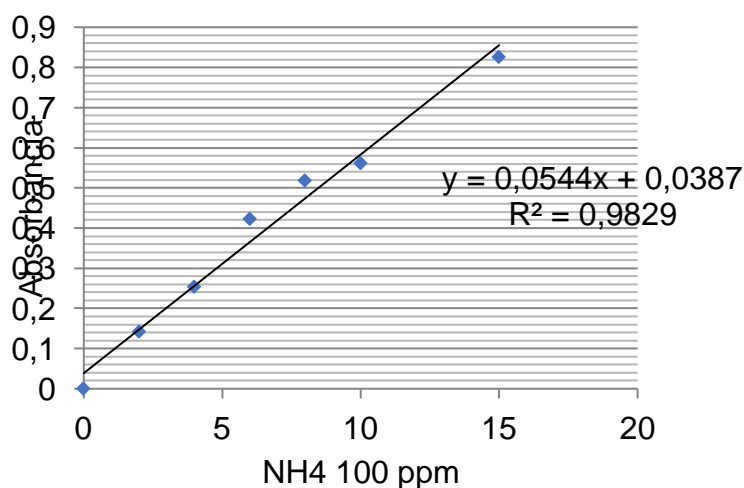
N° de tubo	Solución patrón [mL]	H_2O bidestilada [mL]	NH_4Cl (Ug/mL = ppm)
			NH_4Cl [μg /mL= ppm]
1	0	1	0
2	0	9	2
3	0	9	4
4	0	9,4	6
5	0	9	8
6	1	9	10
7	1	8	15
8	2	8	20

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.

Nº 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 2

Cuantificación de fósforo solubilizado *in vitro*

a. Reactivos (en Rodier y Rodi, 2005)

- **Solución de ácido sulfúrico 5N**

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

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

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

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

Fosfato monopotásico previamente desecado en estufa a 100 °C	877g
Agua destilada hasta enrase	100mL
- **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 y 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 25mL:

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

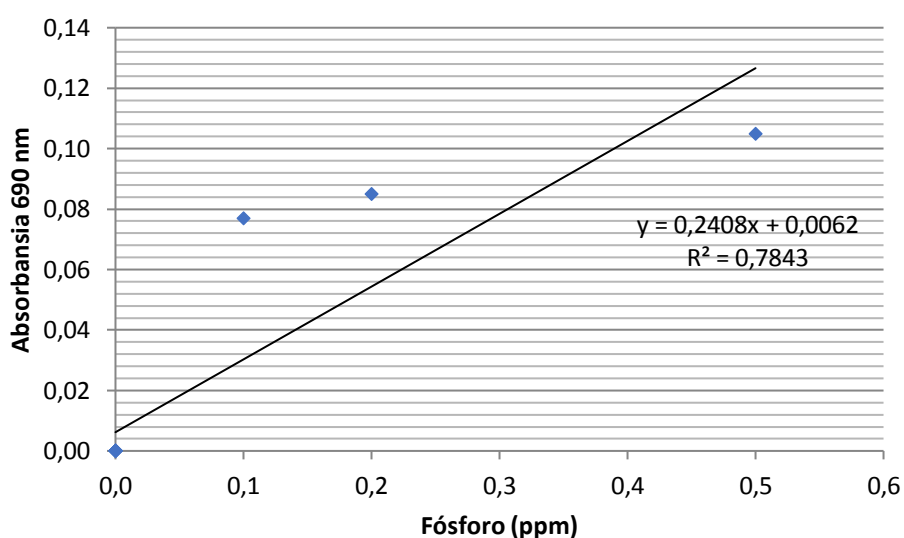
Esperar 20 minutos y efectuar las lecturas en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 690nm en cubetas de 10cm. Construir la curva de calibración. Los datos de la absorbancia corregida se analizan mediante regresión lineal con el programa Microsoft Excel 2007 para obtener la ecuación de la recta 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 3

Procedimiento para elaborar la curva de calibración para cuantificar indoles

a. Reactivos

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

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

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 0,5M. 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 indol acético. Otras coloraciones indican la presencia de productos intermedios de la síntesis del ácido indol acético, 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 indol acético y se disuelven con unas gotas de NaOH en un matraz aforado a 100mL. A continuación, enrasar con agua bidestilada y agitar hasta homogenizar. Posteriormente se realizan las siguientes diluciones:

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

*1000 µL = 1 mL

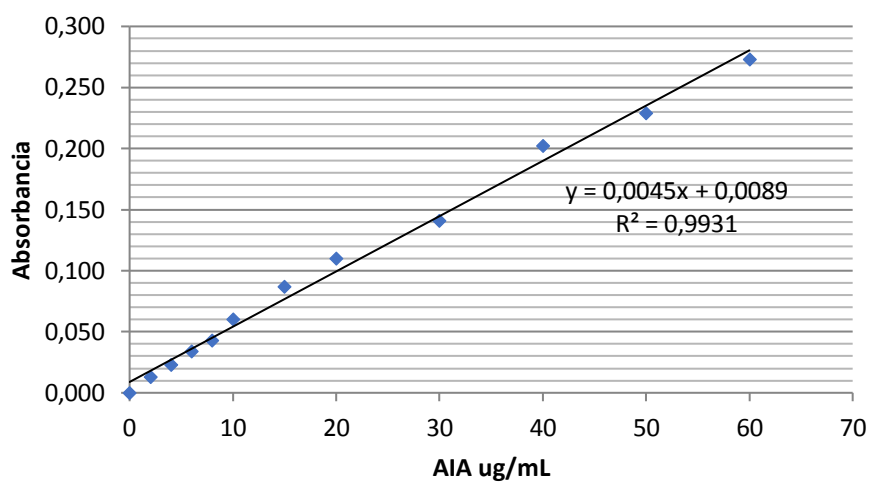
b.3. Procedimiento para la cuantificación de AIA por colorimetría

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

Una vez obtenida la absorbancia en todas las concentraciones de ácido indol acético, 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 indolacético, introducir los datos en el programa Microsoft Office Excel 2007 y construir la curva patrón de calibración:



En la ecuación obtenida:

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

Donde:

y: representa la absorbancia captada (variable dependiente)

x: ácido indol acético en ppm (variable independiente)

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

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

ANEXO 4

Temperaturas mínima, media y máxima durante el cultivo de
Lycopersicon esculentum Mill.

Fecha	Temperatura mínima (°C)	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)
07/03/2017	27	27	33
08/03/2017	24	25	32
09/03/2017	24	26	32
10/03/2017	24	23	31
11/03/2017	24	25	32
12/03/2017	24	27	31
13/03/2017	23	24	32
14/03/2017	23	25	31
15/03/2017	23	25	30
16/03/2017	24	27	31
17/03/2017	24	25	31
18/03/2017	24	25	32
19/03/2017	24	27	31
20/03/2017	24	27	29
21/03/2017	24	26	31
22/03/2017	25	27	31
23/03/2017	25	27	34
24/03/2017	25	27	32
25/03/2017	24	27	32
26/03/2017	25	27	31
27/03/2017	24	26	31
28/03/2017	24	27	32
29/03/2017	25	29	31

Continuación...

Fecha	Temperatura mínima (°C)	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)
30/03/2017	21	26	31
31/03/2017	23	25	29
01/04/2017	23	26	30
02/04/2017	22	25	30
03/04/2017	22	25	30
04/04/2017	20	24	30
05/04/2017	22	24	28
06/04/2017	21	24	30
07/04/2017	21	26	31
08/04/2017	23	25	30
09/04/2017	20	25	30
10/04/2017	23	25	30
11/04/2017	23	26	31
12/04/2017	22	25	30
13/04/2017	22	26	30
14/04/2017	21	27	39
15/04/2017	21	25	28
16/04/2017	21	25	30
17/04/2017	21	26	28
18/04/2017	22	26	30
19/04/2017	22	26	30
20/04/2017	21	25	30
21/04/2017	21	26	29

ANEXO 4

Temperaturas mínima, media y máxima durante el cultivo de *Lycopersicon esculentum* Mill.

Fecha	Temperatura mínima (°C)	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)
12/05/2017	21	25	30
13/05/2017	21	24	29
14/05/2017	19	24	27
15/05/2017	20	24	27
16/05/2017	20	25	28
17/05/2017	21	24	28
18/05/2017	20	24	26
19/05/2017	21	25	27
20/05/2017	20	25	27
21/05/2017	20	25	27
22/05/2017	20	25	28
23/05/2017	20	25	27
24/05/2017	18	23	27
25/05/2017	19	23	25
26/05/2017	20	26	27
27/05/2017	20	24	26
28/05/2017	20	24	26
29/05/2017	19	24	26
30/05/2017	20	23	25
31/05/2017	20	23	25
01/06/2017	20	23	26
02/06/2017	19	24	26
03/06/2017	17	23	25
04/06/2017	18	23	25
05/06/2017	19	23	25
06/06/2017	19	24	27
07/06/2017	19	24	27
08/06/2017	16	23	26
09/06/2017	18	23	25
10/06/2017	18	23	25

Continuación...

Fecha	Temperatura mínima (°C)	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)
11/06/2017	19	22	24
12/06/2017	18	23	25
13/06/2017	17	23	26
14/06/2017	18	23	25
15/06/2017	18	23	25
16/06/2017	19	22	24
17/06/2017	18	21	23
18/06/2017	19	21	22
19/06/2017	17	23	26
20/06/2017	19	23	26
21/06/2017	18	23	25
22/06/2017	19	21	24
23/06/2017	18	20	23
24/06/2017	18	22	24
25/06/2017	19	23	25
26/06/2017	18	20	21
27/06/2017	18	21	24
28/06/2017	18	20	23
29/06/2017	18	21	24
30/06/2017	18	21	24
01/07/2017	17	22	24
02/07/2017	17	23	25
03/07/2017	16	23	25
04/07/2017	17	21	22
05/07/2017	18	21	24
06/07/2017	17	22	24
07/07/2017	17	19	21
08/07/2017	17	22	24
09/07/2017	17	22	24
10/07/2017	18	20	21
11/07/2017	18	20	21
12/07/2017	19	21	22
13/07/2017	17	20	22

Continuación...

Fecha	Temperatura mínima (°C)	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)
14/07/2017	17	21	24
15/07/2017	17	21	24
16/07/2017	16	21	24
17/07/2017	17	22	24
18/07/2017	15	21	24
19/07/2017	17	22	24
20/07/2017	17	21	23
21/07/2017	18	21	24
22/07/2017	17	22	24
23/07/2017	17	21	22
24/07/2017	17	19	21
25/07/2017	18	21	24
26/07/2017	16	21	24
27/07/2017	16	20	23
28/07/2017	17	20	23
29/07/2017	17	21	24
30/07/2017	17	21	24
31/07/2017	22	26	30
01/08/2017	18	21	24
02/08/2017	17	21	24
03/08/2017	17	19	20
04/08/2017	17	20	22
05/08/2017	17	21	23
06/08/2017	16	21	23
07/08/2017	16	20	21
08/08/2017	16	21	23
09/08/2017	17	22	24
10/08/2017	18	22	25
11/08/2017	17	21	24
12/08/2017	16	22	24
13/08/2017	16	18	22
14/08/2017	17	19	22
15/08/2017	16	20	23

Continuación...

Fecha	Temperatura mínima (°C)	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)
16/08/2017	16	21	23
17/08/2017	16	21	22
18/08/2017	16	20	21
19/08/2017	16	21	23
20/08/2017	16	20	21
21/08/2017	17	20	21
22/08/2017	17	22	24
23/08/2017	17	20	21
24/08/2017	17	21	23
25/08/2017	17	21	23
26/08/2017	17	22	24
27/08/2017	16	21	23
28/08/2017	16	21	23
29/08/2017	16	21	24
30/08/2017	16	20	23
31/08/2017	16	22	24
01/09/2017	16	21	23
02/09/2017	16	22	24
03/09/2017	16	22	24
04/09/2017	16	21	23
05/09/2017	16	21	23
06/09/2017	16	21	23
07/09/2017	16	22	24
08/09/2017	17	22	24
09/09/2017	17	22	24
10/09/2017	16	21	23
11/09/2017	17	22	23
12/09/2017	16	21	23
13/09/2017	16	21	23
14/09/2017	16	22	24
15/09/2017	16	20	23
16/09/2017	16	20	23
17/09/2017	16	21	24

Continuación...

Fecha	Temperatura mínima (°C)	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)
18/09/2017	16	23	25
19/09/2017	16	21	23
20/09/2017	16	18	20
21/09/2017	15	18	22
22/09/2017	15	18	22
23/09/2017	16	19	22
24/09/2017	16	21	23
25/09/2017	16	21	24
26/09/2017	16	21	23
27/09/2017	16	22	24
28/09/2017	16	21	23
29/09/2017	16	20	22
30/09/2017	16	20	22
01/10/2017	15	20	22
02/10/2017	16	20	22
03/10/2017	16	21	23
04/10/2017	16	20	21
05/10/2017	16	21	23
06/10/2017	16	21	23
07/10/2017	16	21	23
08/10/2017	16	20	22
09/10/2017	15	19	21
10/10/2017	15	19	21
11/10/2017	15	20	22
12/10/2017	16	21	23
13/10/2017	16	22	24
14/10/2017	16	21	23
15/10/2017	16	22	24
16/10/2017	15	22	24
17/10/2017	16	21	23
18/10/2017	15	19	22

ANEXO 5

Fertilizante N:P:K = 180:100:120 = urea : fosfato diamónico : sulfato de potasio

1. Fosfato diamónico FDA: 18%N; 46%P (P_1O_5)

100Kg FDA \rightarrow 46 UP

X \rightarrow 100 UP

$$X = \frac{100 \times 100}{46} = 217,3 \text{Kg FDA ha}^{-1}$$

2. Urea 180 – 39,111 = 140,889 UN

Urea: 46% N

100Kg urea \rightarrow 46 UN

X \rightarrow 140,889 UN

$$X = \frac{100 \times 140,889}{46} = 306,2 \text{Kg urea ha}^{-1}$$

3. Sulfato de potasio: 50% K

100Kg sulfato de potasio \rightarrow 50 UK

X \rightarrow 120 UK

$$X = \frac{100 \times 120}{50} = 240 \text{Kg sulfato de potasio ha}^{-1}$$

Radio de la maceta = 8,6cm

Área circunferencia = $\pi \cdot r^2$

$$A = (3.14) (8.6)^2$$

$$A = 232 \text{cm}^2 \rightarrow 0,0232 \text{ m}^2$$

Fosfato diamónico: 217,3Kg FDA ha⁻¹

217,3Kg \rightarrow 10 000 m²

X \rightarrow 0,0232m²

$$X = 0,000504136 \text{Kg} = 0,504136 \text{g}$$

Urea: 306,2Kg urea ha⁻¹

$$306,2\text{Kg} \rightarrow 10\,000\text{ m}^2$$

$$X \rightarrow 0,0232\text{m}^2$$

$$X = 0,000710384\text{Kg} = \boxed{0,710384\text{g}}$$

Sulfato de potasio: 240Kg sulfato de potasio ha⁻¹

$$240\text{Kg} \rightarrow 10\,000\text{ m}^2$$

$$X \rightarrow 0,0232\text{m}^2$$

$$X = 0,0005568\text{Kg} = \boxed{0,5568\text{g}}$$

ANEXO 6

Número y peso de frutos de *Lycopersicon esculentum* Mill. por calidad comercial

Número de frutos comerciales por calidad

Tratamientos	Número de frutos/calidad		
	Primera	Segunda	Tercera
Testigo absoluto	13	22	30
Testigo químico	15	26	32
<i>Azospirillum</i> sp.13	13	21	30
<i>Azospirillum</i> sp.17	16	25	29
<i>Azospirillum</i> sp.18	15	24	29
<i>Azospirillum</i> sp.19	17	26	29
<i>Azospirillum</i> sp.23	16	27	30
<i>Azotobacter</i> sp.28.6	16	25	30
<i>Azotobacter</i> sp.33.36	17	27	30
<i>Gluconacetobacter</i> sp.49	17	26	32
<i>Herbaspirillum</i> sp.15	19	25	31
<i>Herbaspirillum</i> sp.19	19	26	31

Peso de frutos comerciales por calidad

Tratamientos	Peso de frutos/calidad		
	Primera	Segunda	Tercera
Testigo absoluto	1,630	1,330	1,010
Testigo químico	1,720	1,410	1,100
<i>Azospirillum</i> sp.13	1,511	1,255	0,703
<i>Azospirillum</i> sp.17	1,879	1,378	1,178
<i>Azospirillum</i> sp.18	1,710	1,410	1,110
<i>Azospirillum</i> sp.19	1,855	1,355	1,155
<i>Azospirillum</i> sp.23	1,870	1,372	1,174
<i>Azotobacter</i> sp.28.6	1,775	1,275	1,075
<i>Azotobacter</i> sp.33.36	1,905	1,405	1,205
<i>Gluconacetobacter</i> sp.49	1,913	1,413	1,212
<i>Herbaspirillum</i> sp.15	2,322	1,322	1,221
<i>Herbaspirillum</i> sp.19	2,197	1,297	1,298

ANEXO 7

Prueba de homogeneidad de varianza y análisis de varianza de la altura de *Lycopersicon esculentum* Mill. a los 15 días después de la inoculación de 24 cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno

Prueba de homogeneidad de varianzas

ALTURA A LOS 15 DÍAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2,153	24	125	0,053

Anova de un Factor

ALTURA A LOS 15 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	98,228	24	4,093	15,785	0,000
Intra-grupos	32,410	125	0,259		
Total	130,638	149			

ANEXO 8

Prueba de homogeneidad de varianza y análisis de varianza de la altura de *Lycopersicon esculentum* Mill. a los 30 días después de la inoculación de 24 cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno

Prueba de homogeneidad de varianzas

ALTURA A LOS 30 DÍAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2,193	24	125	0,058

Anova de un Factor

ALTURA A LOS 30 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	317,555	24	13,231	76,236	0,000
Intra-grupos	21,695	125	0,174		
Total	339,250	149			

ANEXO 9

Prueba de homogeneidad de varianza y análisis de varianza de la altura de *Lycopersicon esculentum* Mill. a los 45 días después de la inoculación de 24 cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno

Prueba de homogeneidad de varianzas

ALTURA A LOS 45 DÍAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
3,986	24	125	0,051

Anova de un Factor

ALTURA A LOS 45 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	4261,192	24	177,550	473,197	0,000
Intra-grupos	46,902	125	0,375		
Total	4308,094	149			

ANEXO 10

Prueba de homogeneidad de varianza y análisis de varianza de la altura de *Lycopersicon esculentum* Mill. a los 60 días después de la inoculación de 24 cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno

Prueba de homogeneidad de varianzas

ALTURA A LOS 60 DÍAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
0,887	24	125	0,619

Anova de un Factor

ALTURA A LOS 60 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	8528,663	24	355,361	2456,865	0,000
Intra-grupos	18,080	125	0,145		
Total	8546,743	149			

ANEXO 11

Prueba de homogeneidad de varianza y análisis de varianza de la longitud de raíces de *Lycopersicon esculentum* Mill. a los 60 días después de la inoculación de 24 cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno

Prueba de homogeneidad de varianzas

LONGITUD DE RAÍCES A LOS 60 DÍAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
3,378	24	125	0,052

Anova de un Factor

LONGITUD DE RAÍCES A LOS 60 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	17064,328	24	711,014	977,724	0,000
Intra-grupos	90,902	125	0,727		
Total	17155,230	149			

ANEXO 12

Prueba de homogeneidad de varianza y análisis de varianza de la altura de *Lycopersicon esculentum* Mill. a los 15 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas

Prueba de homogeneidad de varianzas

ALTURA A LOS 15 DÍAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
0,341	10	55	0,966

Anova de un Factor

ALTURA A LOS 15 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	27,461	10	2,746	6,583	0,000
Intra-grupos	22,945	55	0,417		
Total	50,406	65			

ANEXO 13

Prueba de homogeneidad de varianza y análisis de varianza de la altura de *Lycopersicon esculentum* Mill. a los 30 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas

Prueba de homogeneidad de varianzas

ALTURA A LOS 30 DÍAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,475	10	55	0,174

Anova de un Factor

ALTURA A LOS 30 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	176,369	10	17,637	73,767	0,000
Intra-grupos	13,150	55	0,239		
Total	189,519	65			

ANEXO 14

Prueba de homogeneidad de varianza y análisis de varianza de la altura de *Lycopersicon esculentum* Mill. a los 45 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas

Prueba de homogeneidad de varianzas

ALTURA A LOS 45 DÍAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,809	11	60	0,093

Anova de un Factor

ALTURA A LOS 45 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	417,111	11	37,919	100,730	0,000
Intra-grupos	22,587	60	0,376		
Total	439,698	71			

ANEXO 15

Prueba de homogeneidad de varianza y análisis de varianza de la altura de *Lycopersicon esculentum* Mill. a los 60 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas

Prueba de homogeneidad de varianzas

ALTURA A LOS 60 DÍAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,709	11	60	0,093

Anova de un Factor

ALTURA A LOS 60 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	7242,708	11	658,428	3163,829	0,000
Intra-grupos	12,487	60	0,208		
Total	7255,195	71			

ANEXO 16

Prueba de homogeneidad de varianza y análisis de varianza de la altura de *Lycopersicon esculentum* Mill. a los 75 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas

Prueba de homogeneidad de varianzas

ALTURA A LOS 75 DÍAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,142	11	60	0,346

Anova de un Factor

ALTURA A LOS 75 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2440,290	11	221,845	819,202	0,000
Intra-grupos	16,248	60	0,271		
Total	2456,539	71			

ANEXO 17

Prueba de homogeneidad de varianza y análisis de varianza de la altura de *Lycopersicon esculentum* Mill. a los 90 días después de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas

Prueba de homogeneidad de varianzas

ALTURA A LOS 90 DÍAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,555	11	60	0,136

Anova de un Factor

ALTURA A LOS 90 DÍAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2158,806	11	196,255	965,717	0,000
Intra-grupos	12,193	60	0,203		
Total	2170,999	71			

ANEXO 18

Prueba de homogeneidad de varianza y análisis de varianza del número de frutos de *Lycopersicon esculentum* Mill. inoculado con bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas

Prueba de homogeneidad de varianzas

NÚMERO DE FRUTOS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,297	11	24	0,285

Anova de un Factor

NÚMERO DE FRUTOS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	56,222	11	5,111	18,418	0,000
Intra-grupos	6,660	24	0,277		
Total	62,882	35			

ANEXO 19

Prueba de homogeneidad de varianza y análisis de varianza del peso de frutos de *Lycopersicon esculentum* Mill. inoculado con bacterias fijadoras de nitrógeno seleccionadas

Prueba de homogeneidad de varianzas

PESO DE FRUTOS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,197	11	24	0,058

Anova de un Factor

PESO DE FRUTOS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	4,589	11	0,417	4,589	0,000
Intra-grupos	0,000	24	0,116		
Total	4,589	35			