







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



**“Caracterización de bacterias endófitas diazotróficas  
aisladas de raíces de *Oryza sativa* L., arroz, en  
Lambayeque, 2014”**

**TESIS**

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

**PRESENTADO POR:**

**Br. Esther Magaly De La Cruz Lucero**

**Br. Anna Derly Mestanza Espinal**

**LAMBAYEQUE, PERÚ**

**2014**

**“Caracterización de bacterias endófitas diazotróficas  
aisladas de raíces de *Oryza sativa* L., arroz, en  
Lambayeque, 2014”**

**TESIS**

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

**APROBADO POR:**

Dr. César Estela Campos

**PRESIDENTE**

\_\_\_\_\_

Dr. Luis Chicoma Chaqui

**SECRETARIO**

\_\_\_\_\_

Lic. Julio Silva Estela

**VOCAL**

\_\_\_\_\_

Dra. Carmen Carreño Farfán

**PATROCINADORA**

\_\_\_\_\_

**LAMBAYEQUE, PERU**

**2014**

## Índice

I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS .....	4
2.1 Antecedentes de la investigación.....	4
2.2 Fijación biológica del nitrógeno, FBN.....	9
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
3.1 Material .....	12
3.1.1 Material biológico.....	12
3.1.2 Población y muestra de estudio .....	12
3.2 Métodos .....	12
3.2.1 Variables de estudio .....	12
3.2.2 Tipo de estudio y diseño de la contrastación de hipótesis .....	12
3.2.3 Lugar de muestreo .....	13
3.2.4 Obtención de muestras de raíces .....	13
3.2.5 Aislamiento de bacterias endófitas diazotróficas .....	21
3.2.6 Identificación fenotípica de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno .....	31
3.2.7 Mantenimiento de los cultivos de bacterias .....	40
3.2.8 Cuantificación de nitrógeno fijado <i>in vitro</i> .....	40
3.2.9 Selección de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno .....	47
3.2.10 Identificación del gen <i>nifH</i> en bacterias endófitas diazotróficas aisladas de raíces de arroz.....	47
3.2.11 Análisis de los datos .....	47
IV. RESULTADOS.....	51
4.1 Bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno aisladas de raíces de arroz.....	51
4.2 Características fenotípicas de bacterias endófitas diazótrofes .....	63
4.3 Nitrógeno fijado como amonio por bacterias endófitas nativas. ....	63
4.4 Gen <i>nifH</i> identificado en bacterias endófitas diazótrofes aisladas de raíces de arroz.....	76
V. DISCUSIÓN .....	79
VI. CONCLUSIONES .....	86

VII. RECOMENDACIONES.....	87
VIII. RESUMEN .....	88
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
X. ANEXOS .....	98

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b>	Lote de procedencia de muestras de raíces de <i>Oryza sativa</i> L., en la Estación Experimental Agraria Vista Florida, INIA, Lambayeque.....	15
<b>Tabla 2.</b>	Posición de los campos de cultivo de <i>Oryza sativa</i> L., donde se realizó el muestreo de raíces, durante febrero–marzo de 2014.....	16
<b>Tabla 3.</b>	Análisis físico – químico de muestras de suelo rizosférico de cultivos de <i>Oryza sativa</i> L., en Lambayeque, 2014.....	20
<b>Tabla 4.</b>	Características diferenciales de <i>Azospirillum</i> spp.....	39
<b>Tabla 5.</b>	Características diferenciales de <i>Herbaspirillum</i> spp.....	41
<b>Tabla 6.</b>	Características diferenciales de <i>Gluconacetobacter</i> spp .....	41
<b>Tabla 7.</b>	Características diferenciales de <i>Burkholderia</i> spp. ....	42
<b>Tabla 8.</b>	Características macroscópicas de colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de <i>Oryza sativa</i> L., en Lambayeque, 2014. ....	64
<b>Tabla 9.</b>	Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por <i>Azospirillum</i> spp. nativas en caldo extracto de suelo durante 7 días .....	73
<b>Tabla 10.</b>	Prueba de Kruskal- Wallis del nitrógeno fijado como amonio por <i>Azospirillum</i> spp. aisladas de raíces de <i>Oryza sativa</i> L. ....	74
<b>Tabla 11.</b>	Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por <i>Herbaspirillum</i> spp. nativas en caldo extracto de suelo durante 7 días .....	77
<b>Tabla 12.</b>	Prueba de Kruskal- Wallis del nitrógeno fijado como amonio por <i>Herbaspirillum</i> spp. aisladas de raíces de <i>Oryza sativa</i> L. ....	77

<b>Tabla 13.</b>	Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por <i>Burkholderia</i> spp. nativas en caldo extracto de suelo durante 7 días. ....	78
<b>Tabla 14.</b>	Prueba de Kruskal- Wallis del nitrógeno fijado como amonio por <i>Burkholderia</i> spp. aisladas de raíces de <i>Oryza sativa</i> L. ....	78



## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b>	Ubicación del lugar de muestreo correspondiente a la Estación Experimental Agraria Vista Florida, INIA en Lambayeque, 2014.....	14
<b>Figura 2.</b>	Ubicación de los campos comerciales de <i>Oryza sativa</i> L. en Estación Experimental Agraria Vista Florida, INIA, donde se realizó el muestreo de raíces durante febrero - marzo de 2014.....	17
<b>Figura 3.</b>	Cultivos de <i>Oryza sativa</i> L., “arroz” en macollamiento.....	18
<b>Figura 4.</b>	Plantas de <i>Oryza sativa</i> L., para el aislamiento de bacterias endófitas .....	18
<b>Figura 5.</b>	Extracción de raíces de <i>Oryza sativa</i> L. ....	19
<b>Figura 6.</b>	Lavado de raíces de <i>Oryza sativa</i> L., con agua potable.....	22
<b>Figura 7.</b>	Raíces de <i>Oryza sativa</i> L., seleccionadas para el aislamiento de bacterias endófitas. ....	22
<b>Figura 8.</b>	Pesado de raíces de <i>Oryza sativa</i> L. ....	23
<b>Figura 9.</b>	Corte de raíces de <i>Oryza sativa</i> L. ....	23
<b>Figura 10.</b>	Frascos con fragmentos de raíces de <i>Oryza sativa</i> L. ....	24
<b>Figura 11.</b>	Lavado de raíces de <i>Oryza sativa</i> L., con agua destilada más detergente neutro.....	24
<b>Figura 12.</b>	Enjuague de raíces de <i>Oryza sativa</i> L., con agua destilada esterilizada .....	25
<b>Figura 13.</b>	Lavado de raíces de <i>Oryza sativa</i> L., en solución tampón fosfato de potasio .....	25

<b>Figura 14.</b>	Inmersión de fragmentos de raíces de <i>Oryza sativa</i> L., en alcohol.....	26
<b>Figura 15.</b>	Inmersión de fragmentos de raíces de <i>Oryza sativa</i> L., en solución de hipoclorito de sodio-Tween 80.....	26
<b>Figura 16.</b>	Fragmentos de raíces de <i>Oryza sativa</i> L., en frasco de vidrio esterilizado.....	27
<b>Figura 17.</b>	Siembra del agua de enjuague en agar nutritivo para verificar la desinfección .....	27
<b>Figura 18.</b>	Fragmentos de raíces de <i>Oryza sativa</i> L., en papel secante esterilizado .....	28
<b>Figura 19.</b>	Fragmentos de raíces de <i>Oryza sativa</i> L., desinfectados.....	28
<b>Figura 20.</b>	Macerado de fragmentos de raíces de <i>Oryza sativa</i> L. ....	29
<b>Figura 21.</b>	Separación del macerado de raíces de <i>Oryza sativa</i> L. ....	29
<b>Figura 22.</b>	Toma de muestra de macerado de raíces de <i>Oryza sativa</i> L. ....	30
<b>Figura 23.</b>	Siembra de macerado de raíces en medio semisólido sin nitrógeno .....	30
<b>Figura 24.</b>	Medios semisólidos sin nitrógeno para el aislamiento de bacterias endófitas.....	32
<b>Figura 25.</b>	Aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno.....	33
<b>Figura 26.</b>	Película blanquecina y viraje del indicador por bacterias fijadoras de nitrógeno en medio semisólido.....	34
<b>Figura 27.</b>	Primer y segundo subcultivo de bacterias fijadoras de nitrógeno en medio semisólido .....	34

<b>Figura 28.</b>	Suspensión de bacterias fijadoras de nitrógeno en solución salina esterilizada.....	35
<b>Figura 29.</b>	Siembra de bacterias fijadoras de nitrógeno en medio sólido....	35
<b>Figura 30.</b>	Colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno en medio NFb.....	36
<b>Figura 31.</b>	Bacterias fijadoras de nitrógeno en medios sólidos.....	36
<b>Figura 32.</b>	Medio LGI semisólido con ácido málico para la identificación de <i>Azospirillum</i> spp. ....	37
<b>Figura 33.</b>	Medio LGI semisólido con glucosa para la identificación de <i>Azospirillum</i> spp. ....	37
<b>Figura 34.</b>	Medio LGI semisólido con manitol para la identificación de <i>Azospirillum</i> spp. ....	38
<b>Figura 35.</b>	Medio LGI semisólido con sacarosa para la identificación de <i>Azospirillum</i> spp. ....	38
<b>Figura 36.</b>	Cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno en agar nutritivo.....	42
<b>Figura 37.</b>	Procedimiento para la cuantificación de nitrógeno fijado <i>in vitro</i> por bacterias .....	43
<b>Figura 38.</b>	Caldo extracto de suelo con cloruro de potasio. ....	44
<b>Figura 39.</b>	Centrifugación del caldo extracto de suelo mezclado con cloruro de potasio.....	44
<b>Figura 40.</b>	Adición de solución alcohólica de fenol al caldo extracto de suelo.....	45
<b>Figura 41.</b>	Caldo extracto de suelo con nitroprusiato de sodio.....	45

<b>Figura 42.</b>	Adición de solución oxidante al caldo extracto de suelo.....	46
<b>Figura 43.</b>	Lectura de la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible.....	46
<b>Figura 44.</b>	Bacterias endófitas diazotróficas representativas de cada género identificado para la extracción de ADN.....	48
<b>Figura 45.</b>	Selección de una colonia bacteria bacteriana representativa.....	48
<b>Figura 46.</b>	Suspensión de colonia bacteriana en un Eppendorf con agua bidestilada .....	49
<b>Figura 47.</b>	Calentamiento de bacterias en baño maría.....	49
<b>Figura 48.</b>	Eppendorf con material genético de bacteria fijadora de nitrógeno.....	50
<b>Figura 49.</b>	Película blanquecina y viraje del indicador por bacterias fijadoras de nitrógeno en cinco medios semisólidos, NFb (a), LGI (b), JNFb (c), LGI-P (d) y JMV (e).....	52
<b>Figura 50.</b>	Película bacteriana y viraje del indicador por bacterias fijadoras de nitrógeno en medio NFb.....	53
<b>Figura 51.</b>	Frecuencia de raíces de <i>Oryza sativa</i> L., con bacterias fijadoras de nitrógeno, observadas en NFb después de la siembra y tres subcultivos, 2014.....	53
<b>Figura 52.</b>	Película bacteriana y viraje del indicador por bacterias fijadoras de nitrógeno en medio LGI.....	54
<b>Figura 53.</b>	Frecuencia de raíces de <i>Oryza sativa</i> L., con bacterias fijadoras de nitrógeno, observadas en LGI después de la siembra y tres subcultivos, 2014. ....	54

<b>Figura 54.</b>	Película bacteriana y viraje del indicador por bacterias fijadoras de nitrógeno en medio JNFb.....	55
<b>Figura 55.</b>	Frecuencia de raíces de <i>Oryza sativa</i> L., con bacterias fijadoras de nitrógeno, observadas en JNFb después de la siembra y tres subcultivos, 2014.....	55
<b>Figura 56.</b>	Película bacteriana y viraje del indicador por bacterias fijadoras de nitrógeno en medio LGI-P.....	57
<b>Figura 57.</b>	Frecuencia de raíces de <i>Oryza sativa</i> L., con bacterias fijadoras de nitrógeno, en LGI-P después de la siembra y tres subcultivos, 2014.....	57
<b>Figura 58.</b>	Película bacteriana formada por bacterias fijadoras de nitrógeno en medio JMV.....	58
<b>Figura 59.</b>	Frecuencia de raíces de <i>Oryza sativa</i> L., con bacterias fijadoras de nitrógeno, en JMV después de la siembra y tres subcultivos, 2014.....	58
<b>Figura 60.</b>	Frecuencia de raíces de <i>Oryza sativa</i> L., con bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en cinco medios semisólidos después de tres subcultivos .....	59
<b>Figura 61.</b>	Frecuencia de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en medios NFB, LGI, JNFb, JMV, LGI-P.....	59
<b>Figura 62.</b>	Frecuencia de <i>Azospirillum</i> spp. en bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en medio NFB.....	60
<b>Figura 63.</b>	Frecuencia de <i>Azospirillum</i> spp. en bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en medio LGI.....	60
<b>Figura 64.</b>	Frecuencia de <i>Herbaspirillum</i> spp. en bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en medio JNFb .....	61

<b>Figura 65.</b>	Frecuencia de <i>Burkholderia</i> spp. en bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en medio JMV. ....	61
<b>Figura 66.</b>	Frecuencia de <i>Azospirillum</i> , <i>Herbaspirillum</i> y <i>Burkholderia</i> en raíces de <i>Oryza sativa</i> L., en Lambayeque, 2014.....	62
<b>Figura 67.</b>	Frecuencia de bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas en tres variedades de <i>Oryza sativa</i> L., en Lambayeque 2014.....	62
<b>Figura 68.</b>	Observación macroscópica de colonias de <i>Azospirillum</i> spp. en medio NFB sólido .....	65
<b>Figura 69.</b>	Observación macroscópica de colonias de <i>Azospirillum</i> spp. en medio LGI sólido .....	65
<b>Figura 70.</b>	Observación macroscópica de colonias de <i>Herbaspirillum</i> spp. en medio JNFb sólido.....	66
<b>Figura 71.</b>	Observación macroscópica de colonias de <i>Burkholderia</i> spp. en medio JMV sólido. ....	66
<b>Figura 72.</b>	Frecuencia de especies de <i>Azospirillum</i> identificadas en raíces de <i>Oryza sativa</i> L., en Lambayeque, 2014.....	67
<b>Figura 73.</b>	Película blanquecina y viraje del indicador por <i>Azospirillum brasilense</i> fijadoras de nitrógeno en medio NFb semisólido con ácido málico, glucosa, manitol y sacarosa.....	67
<b>Figura 74.</b>	Película blanquecina y viraje del indicador por <i>Azospirillum lipoferum</i> fijadoras de nitrógeno en medio NFb semisólido con ácido málico, glucosa, manitol y sacarosa.....	68
<b>Figura 75.</b>	Película blanquecina y viraje del indicador por <i>Azospirillum irakense</i> fijadoras de nitrógeno en medio NFb semisólido con ácido málico (a), glucosa (b), manitol (c), sacarosa (d)..... ..	68

<b>Figura 76.</b>	Película blanquecina y viraje del indicador por <i>Azospirillum halopraeferens</i> fijadoras de nitrógeno en medio LGI semisólido con ácido málico (a), glucosa (b), manitol (c) y sacarosa (d). ....	69
<b>Figura 77.</b>	Crecimiento de <i>Azospirillum</i> spp. nativas en caldo con cloruro de sodio.....	69
<b>Figura 78.</b>	Prueba de hidrólisis de la urea por <i>Herbaspirillum</i> sp. ....	70
<b>Figura 79.</b>	Prueba de descarboxilación de lisina por <i>Burkholderia</i> sp. ....	70
<b>Figura 80.</b>	Resistencia de <i>Burkholderia</i> sp. a la polimixina B. ....	71
<b>Figura 81.</b>	Coloración observada en la cuantificación del nitrógeno fijado como amonio. ....	71
<b>Figura 82.</b>	Valores máximos (ppm) de nitrógeno fijado como amonio por bacterias endófitas diazotróficas aisladas de raíces de <i>Oryza sativa</i> L., en Lambayeque, 2014. ....	72

## I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de *Oryza sativa* L. “arroz” constituye uno de los alimentos básicos en Asia, América Latina y el Caribe, donde el consumo va en aumento en los diferentes niveles socioeconómicos. En el Perú el rendimiento promedio es  $7\,292\text{kg ha}^{-1}$  (MINAG, 2012); sin embargo, como en otros países, depende fundamentalmente de la aplicación de insumos químicos, principalmente fertilizantes nitrogenados. La necesidad por estos insumos se incrementa día a día, proyectándose para el 2020 un requerimiento de 208 millones de toneladas, de las que 115,3 millones corresponderán a la urea. Desafortunadamente, la producción de fertilizantes nitrogenados es dependiente de la energía obtenida de combustibles de origen fósil. Actualmente la reducción de la oferta de petróleo, por el agotamiento de los yacimientos y los mayores costos para la extracción, ha traído consigo el incremento de los precios de los fertilizantes químicos (Aguado, 2012).

Además de la disminución de la rentabilidad, la aplicación excesiva de fertilizantes químicos tiene efectos detrimentales en el ambiente. La eficiencia de recuperación o porcentaje del nutriente aplicado que es absorbido por la planta, es



en promedio 50% para el nitrógeno (SAGARPA, 2010). Los fertilizantes nitrogenados se pierden por volatilización, desnitrificación, lixiviación y erosión (Pedraza *et al.*, 2010; Salhia, 2010). Las emisiones liberadas hacia la atmósfera en formas de amoníaco, óxidos nítrico y nitroso causan lluvia ácida y destruyen la capa de ozono. A su vez, los nitratos lixiviados originan eutrofización de aguas superficiales y contaminan los mantos freáticos, generando enfermedades en los seres vivos (Aguado, 2012).

En la atmósfera terrestre se encuentra nitrógeno molecular en abundancia; no obstante, los eucariotas no lo pueden utilizar. Solo un grupo de procariotas reducen enzimáticamente el nitrógeno atmosférico a amonio, que puede ser incorporado para el crecimiento y mantenimiento de las células. Estos organismos son denominados diazótrofos y el proceso responsable de la incorporación de nitrógeno a la biomasa es la fijación de nitrógeno.

Las bacterias diazotróficas son rizosféricas y endófitas. Las bacterias endófitas son aquellas que colonizan los tejidos vivos de las plantas, principalmente espacios intercelulares y dentro de los tejidos vasculares, sin causar algún efecto negativo inmediato o daño aparente (Pérez *et al.*, 2009). Diversas investigaciones en el cultivo de arroz, han revelado una significativa riqueza de bacterias endófitas que además de fijar nitrógeno, solubilizan fosfatos, producen ácido indolacético, remueven contaminantes, suprimen fitopatógenos y promueven el crecimiento de las plantas (Loaces, 2011; Ji *et al.*, 2013; Mbai *et al.*, 2013); sin embargo, en Lambayeque no se han realizado estudios para aislar y caracterizar bacterias endófitas a partir de raíces, como punto de partida para futuras investigaciones, en la obtención de un inoculante comercial.

Las bacterias endófitas diazotróficas presentan ventajas competitivas frente a las rizosféricas, debido a que la disponibilidad de nutrientes es mayor en el interior de la planta y se encuentran protegidas de condiciones ambientales desfavorables. En Lambayeque, el arroz es un cultivo muy importante, habiéndose aprobado 30207,26ha para la campaña 2013 – 2014 (MINAGRI, 2014). Los cultivos de arroz serán favorecidos con la obtención de un inoculante constituido por bacterias

diazotróficas debidamente caracterizadas. Este biofertilizante incrementará el desarrollo vegetativo y rendimiento como parte de la agricultura respetuosa con el ambiente.

Por lo expuesto, se planteó el siguiente problema ¿Cuáles son las características de las bacterias endófitas diazotróficas aisladas de raíces de *Oryza sativa* L. “arroz” en Lambayeque?. Para resolver este problema se planteó como objetivo general determinar las características de bacterias endófitas diazotróficas aisladas de raíces de arroz. Los objetivos específicos fueron aislar bacterias endófitas diazotróficas, caracterizar fenotípicamente las bacterias, cuantificar el nitrógeno e identificar el gen *nifH*. La hipótesis planteada fue: Las bacterias endófitas de arroz son microaerófilas, fijan nitrógeno *in vitro* y presentan el gen *nifH*.

## II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

### 2.1 Antecedentes de la investigación

Con el objetivo de aislar y caracterizar bacterias endófitas de la parte aérea de doce cultivos de arroz nativos y comerciales, tallos, hojas y semillas fueron lavados y esterilizados superficialmente con etanol 70% e hipoclorito de sodio 2% y luego fueron sembrados en agar papa dextrosa. En las colonias desarrolladas se determinó que las bacterias Gram negativas predominaron (71%) frente a las Gram positivas. El análisis filogenético demostró que las Gram negativas más frecuentes correspondieron a *Methylobacterium* sp., *Azospirillum amazonense*, *Sphingomonas adheasiva*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Pantoea ananas*, *Klebsiella oxytoca*, *Cytophagales* sp. y *Flavobacterium gleum*. Solo se detectó fijación de nitrógeno con *A. amazonense* y *R. palustris*; sin embargo, la mayoría de aislados fueron móviles, crecieron en sucrosa 0,6M, el 85% presentó actividad pectinolítica y el 50% celulolítica, características que son involucradas con la condición endofítica (Elbeltagy *et al.*, 2000).

La fijación biológica es una alternativa para disminuir el fertilizante sintético nitrogenado. Se realizó un estudio de la colonización endofítica y fijación de nitrógeno por *Herbaspirillum* sp. Las bacterias fueron aisladas de tallos de plantas

de arroz cultivadas en invernadero. Éstos fueron esterilizados superficialmente con etanol 70% y luego fueron sembrados en medio semisólido Rennie suplementado con extracto de arroz y malato (RMR). Después, los cultivos fueron reinoculados en medio semisólido y las películas desarrolladas se estriaron en agar sólido RMR. Las colonias obtenidas, nuevamente se sembraron en medio semisólido y a los 7 días se cuantificó la actividad N<sup>asa</sup>. Con base a la secuencia del ADN<sup>r</sup> 16S, las bacterias diazotróficas se relacionaron con *Herbaspirillum*, *Ideonella*, *Enterobacter* y *Azospirillum*. A continuación, utilizando el gen gfp, que codifica para una proteína verde fluorescente, se determinó que *Herbaspirillum* sp. B501 colonizó los tallos, semillas y principalmente los espacios intercelulares de las hojas, así como también se detectó fijación de nitrógeno en hojas y tallos de plántulas de *O. officinalis* (Elbeltagy *et al.*, 2001).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno son las que reciben mayor atención en el cultivo de arroz, debido a la importancia del nutriente para el cultivo. Por tanto, se estudió la composición de la comunidad de bacterias endófitas heterótrofas cultivables de hojas y tallos de plantas de arroz en los 2 meses previos a la cosecha. Los tejidos previamente desinfectados se maceraron, se diluyeron y se sembraron en la superficie de agar nutriente y agar R2A. El número de bacterias endófitas detectadas en tallo fue diez veces superior al de hoja. El análisis fenotípico de las bacterias aisladas mostró que los perfiles de restricción del gen ARN<sup>r</sup> 16S eran diferentes. A su vez, el análisis de doce colonias aisladas de hojas y 16 de tallo permitió discriminar seis y siete perfiles de restricción diferentes, respectivamente. Se concluyó que la comunidad de bacterias endófitas cultivables es muy compleja y se distribuye heterogéneamente en hojas y tallos (Fernández *et al.*, 2005).

Los microorganismos de los géneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* y *Burkholderia* presentan potencial para la fijación biológica del nitrógeno (FBN) y producción de reguladores del crecimiento en diferentes cultivos agrícolas. En este contexto, se cuantificaron y aislaron bacterias diazotróficas de nueve cultivares de arroz irrigado, utilizando los medios NFb (*Azospirillum brasilense/lipoferum*), JNFb (*Herbaspirillum*), JMV (*Burkholderia*), LGI

(*Azospirillum amazonense*) y LGI-P (*Gluconacetobacter*). Se obtuvieron 58 aislados, de los que diez obtenidos en el medio NFb (I-02, I-08, I-14, I-20, I-26, I-31, I-36, I-42, I-48 e I-54), *A. brasilense* y *A. lipoferum* fueron evaluados *in vitro*. En la FBN, *A. brasilense* y *A. lipoferum* presentaron los mayores valores (41,08 y 46,82  $\mu\text{g N mL}^{-1}$ , respectivamente). Respecto a la producción de ácido indolacético, el aislado I-31 fue el mayor productor (13,47  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Se concluyó que bacterias diazotróficas endofíticas aisladas de cultivares de la región tienen potencial como inoculantes, para el cultivo de arroz (Vicentini, 2006).

La necesidad apremiante de estrategias sostenibles para la agricultura requiere del desarrollo de preparados microbianos que mejoren la nutrición de las plantas. Se realizó una investigación para aislar bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos de la rizósfera y semillas de *Lactuca sativa* L. “lechuga”. Con el suelo rizosférico se realizaron diluciones y se sembraron alícuotas en medio extracto de levadura – manitol – agar rojo congo (EL-MARC), obteniéndose nueve cultivos de rizobios que fueron investigados en la prueba de nodulación en *Phaseolus vulgaris*, tolerancia de NaCl, crecimiento en G´PA y producción de acidez o alcalinidad en el medio extracto de levadura – manitol – agar azul de bromotimol. Se obtuvieron tres grupos de rizobios: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y un tercer grupo no definido. De los potenciales rizobios, cinco disolvieron hidroxiapatita. Por su parte, en los macerados de las semillas se observaron bacterias endófitas caracterizadas por su comportamiento microaerófilico y producción de ácido detectado por el viraje del indicador en el medio NFb (Peña y Reyes, 2007).

Las bacterias del género *Herbaspirillum* endófitas fijan nitrógeno, producen fitohormonas y promueven el crecimiento vegetal, por lo que se realizó una investigación para caracterizar y seleccionar estas bacterias en el cultivo de arroz. Se colectaron 20 plantas en estado vegetativo y al inicio de floración. Las hojas y tallos se desinfectaron, se maceraron y posteriormente se realizaron diluciones seriadas. A continuación, se inocularon frascos con medios de cultivo JNFb semisólido, se incubaron a 35°C por 4 - 7 días y se investigó la formación de una película bajo la superficie. Después de un subcultivo en este mismo medio, las

bacterias se aislaron en medio sólido JNFb con extracto de levadura y en medio Batata. Se obtuvieron 113 aislados, de los que once se identificaron preliminarmente como *Herbaspirillum* spp. La cepa 4.2 incrementó significativamente la biomasa aérea de plantas de arroz en invernadero. La secuenciación del gen ARNr 16S confirmó esta bacteria como *Herbaspirillum*, concluyéndose que tiene potencial como biofertilizante (Punschke y Mayans, 2011).

Con el objetivo de mejorar la competitividad del arroz, se propone la utilización de biofertilizantes, por lo que se realizó una investigación para caracterizar las bacterias endófitas productoras de sideróforos. Con este propósito se tomaron muestras de raíces y hojas de plantas de arroz en macollaje, inundación, embarrugado y llenado de grano, así como granos luego de la cosecha, determinando que el número de heterótrofos totales fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en suelo respecto a raíces, hojas y granos. A su vez, los productores de sideróforos, predominaron en las raíces. Con el análisis de restricción del gen ADNr 16S (ARDRA) se obtuvieron 64 perfiles diferentes. Los mayoritarios se identificaron como *Pantoea*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Chromobacter* y *Sphingomonas*. Después, se investigaron 27 cepas, determinando que el 100% sintetizó ácido indolacético; pero solo tres (*Pseudomonas* sp. *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter* sp.) demostraron actividad de la enzima nitrogenasa en la prueba de reducción del acetileno (Loaces, 2011).

Los inoculantes biológicos pueden ser utilizados como parte de una estrategia que disminuya el impacto ambiental causado por los agroquímicos. Se aislaron bacterias endófitas diazotróficas de plantas de arroz cultivadas en diferentes suelos. Las raíces y parte aérea se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) 2% y se enjuagaron con agua destilada. A continuación, las muestras se maceraron, se realizaron diluciones decimales hasta  $10^{-4}$  y se sembraron en medio base carente de nitrógeno. En la prueba de reducción de acetileno 80 aislados demostraron positividad; no obstante, solo en el 25% se amplificó el gen *nifH*. La diversidad de los aislados se determinó por análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) y la identificación por

secuenciación del gen ARNr 16S, confirmándose *Azospirillum lipoferum*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Enterobacter cloacae* y *Paenibacillus graminis* que podrían usarse en un futuro como inoculantes para la producción del crecimiento de plantas de arroz (Mollo *et al.*, 2012).

La producción de arroz es limitada por diversos factores, el más significativo es la aplicación de fertilizantes químicos, por lo que se realizó una investigación con el objetivo de caracterizar bacterias endófitas con potencial para disminuir el uso de los insumos químicos. Muestras de raíces de dos variedades de arroz, se lavaron para eliminar el suelo adherido, se esterilizaron superficialmente, se maceraron en buffer fosfato dihidrogenado de potasio (pH 6,8) y se sembraron en agar manitol levadura, medio libre de nitrógeno y agar nutritivo. Se obtuvieron 73 aislados, 63% Gram negativos y 37% Gram positivos. El 92% solubilizó fosfato, 14% sintetizó ácido indolacético y 100% demostró fijación de nitrógeno en la prueba de reducción de acetileno. El análisis filogenético de 28 aislados seleccionados los agrupó en cuatro géneros: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* y *Micrococcus*. En un ensayo preliminar en invernadero se determinó que dos aislados promovieron el cultivo de arroz, por lo que deberían ser investigados para la inoculación de un biofertilizante (Mbai *et al.*, 2013).

Las bacterias endófitas viven en el interior de las plantas, sin causar daño y su presencia está relacionada con el aumento de la productividad de los cultivos agrícolas. En este contexto, se estudió la composición de comunidades de bacterias endófitas cultivables asociadas a cuatro variedades de arroz. Se tomaron muestras de plantas en etapa de inflorescencia y las bacterias se aislaron de raíces, tallos, hojas y panículas previamente desinfectadas y maceradas en nitrógeno líquido. Se obtuvieron 89 aislados de bacterias endófitas, cuya abundancia estuvo relacionada con el tejido y la variedad de arroz. La mayor densidad correspondió a la variedad F733 ( $1,77 \times 10^{10}$  ufc g<sup>-1</sup> de tejido) y al tejido de raíces ( $3,2 \times 10^{10}$  ufc g<sup>-1</sup> de tejido). La información obtenida de las comunidades bacterianas permitirá investigar su funcionalidad en el cultivo de arroz (Pérez *et al.*, 2013).

## 2.2 Fijación biológica de nitrógeno, FBN

La disponibilidad del carbono y nitrógeno en los organismos vivos a partir del gas carbónico y nitrógeno molecular del aire se da a través de la fotosíntesis y fijación biológica de nitrógeno. La fijación biológica del nitrógeno (FBN) funciona en bacterias adaptadas en ambientes ecológicos y estilos de vida muy diversos sin embargo, no todas poseen el sistema enzimático responsable de la reducción del nitrógeno: la nitrogenasa. El nitrógeno es un constituyente fundamental de los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y vitaminas, entre otros. Para que el nitrógeno pueda ser asimilado, es necesario que sea reducido. Los únicos seres vivos fijadores de nitrógeno o diazótrofos son Eubacterias y Archaeas. La atmósfera contienen en promedio  $10^{15}$  toneladas de gas  $N_2$ , y el ciclo del nitrógeno involucra la transformación de unas  $3 \times 10^9$  toneladas de  $N_2$  por año (Baldani *et al.*, 2000).

Todos los microorganismos reductores de  $N_2$  presentan actividad del complejo enzimático N-asa, constituida por dos metaloproteínas: proteínas I y II. El complejo de N-asa requiere de un donador de electrones de bajo potencial, de la hidrólisis del ATP y de un ambiente estrictamente anaerobio. La proteína I es un tetrámero, formado por dos subunidades  $\alpha_2\beta_2$  codificadas por los genes *nifDK*. Esta proteína tiene los cofactores hierro y molibdeno (FeMo-Co). Además, a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  están ligadas los grupos FeMoCo unidos a la subunidad  $\alpha$ , llevándose a cabo el transporte de electrones para la reducción de  $N_2$ . La proteína II es un dímero, formado por dos subunidades idénticas unidas por un grupo prostético de 4Fe-4S. Es codificada por el gen *nifH* y su función es transportar los electrones del donador fisiológico de electrones (ferrodoxina o flavodoxina), hacia la proteína I para llevar a cabo la reducción del  $N_2$  (Elmerich, 2012).

Según su localización las bacterias diazotróficas son rizosféricas y endófitas. Las bacterias rizosféricas son de vida libre y ejercen su efecto desde afuera de la planta, habitando la superficie de las raíces o el suelo rizosférico; aunque bajo ciertas circunstancias, pueden ocupar espacios intracelulares superficiales de la planta. A su vez, el término endófito según Kloepper *et al.* (1912) hace referencia a los microorganismos que viven dentro de los tejidos de las plantas. En Agronomía,



este concepto involucra todos los microorganismos que pueden ser aislados de plantas, cuyos tejidos fueron esterilizados superficialmente y que no causan una enfermedad visible en su planta hospedadora (Loaces, 2011). Según su estrategia de vida, las bacterias endófitas pueden ser obligadas y facultativas. Las obligadas dependen del hospedero para su crecimiento, sobrevivencia y dispersión, mientras que las facultativas cumplen una etapa de su ciclo fuera del hospedero, generalmente en el suelo (Beracochea, 2011).

Los endófitos pueden ser pasajeros, oportunistas y competentes. En el primer caso, pueden llegar a ser endófitos por casualidad, por ejemplo, a través, de la colonización de heridas o después de la invasión de las raíces por nemátodos. Con frecuencia se limitan al tejido cortical de la raíz. Los endófitos oportunistas, muestran características particulares en la colonización de la raíz, por ejemplo, una respuesta quimiotáctica, que les permite colonizar el rizoplasma y después de invadir los tejidos vegetales, a través de grietas formadas en los lugares de emergencia de las laterales vegetales. Al igual que las endófitas pasajeras, se limitan al córtex radicular, poseen todas las propiedades de los endófitos oportunistas y además la maquinaria genética necesaria para colonizar, por lo que invaden los tejidos vasculares, extendiéndose por toda la planta y por manipulación del metabolismo de la planta, mantienen equilibrio armonioso con el hospedero, incluso cuando están presentes en alta densidad (Loaces, 2011).

En el suelo rizosférico se encuentran la mayor fuente de bacterias endófitas y generalmente es donde comienza el proceso de colonización. Es posible que sea pasiva, cuando las bacterias se encuentran en las semillas y en las plantas que se propagan vegetativamente, pasan de un lugar a otro con las yemas. La transmisión de las bacterias endófitas obligadas es vertical o vía vectores. La colonización activa involucra tres pasos. El primero es el acercamiento espacial de la bacteria de la superficie de la raíz, a través del movimiento quimiotaxis. Luego que la bacteria entra en contacto con la raíz se adhiere y se ancla en la superficie, multiplicándose y formando microcolonias. Desde este lugar comienza el segundo paso o invasión de los tejidos internos, penetrando las aberturas naturales o por liberación de

enzimas hidrolíticas. Una vez dentro, los endófitos se multiplican, colonizando los espacios intracelulares y pueden permanecer en un determinado sitio o realizar una colonización sistémica por el sistema vascular o el apoplasto (Beracochea, 2011).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Material biológico**

El material biológico estuvo constituido por muestras de raíces de *Oryza sativa* L., “arroz” y bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno.

##### **3.1.2 Población y muestra de estudio**

Se consideró como población las bacterias endófitas diazotróficas de las raíces de los cultivos de arroz en la Estación Experimental Agraria Vista Florida y se trabajó con las bacterias aisladas de 54 unidades de muestreo, colectadas durante febrero- marzo de 2014. El número de muestras fue calculado según la fórmula mencionada por Alvitres (2000), tomando en cuenta una prevalencia de 90% (Anexo 1), determinada por los autores en un muestreo piloto.

#### **3.2 Métodos**

##### **3.2.1 Variables de estudio**

Las variables cuantitativas fueron las bacterias nativas endófitas diazotróficas.

##### **3.2.2 Tipo de estudio y diseño de la contrastación de hipótesis**

El trabajo de investigación fue descriptivo y transeccional (Hernández *et al.*, 2010) y para contrastar la hipótesis se utilizó el diseño de una sola casilla de Goode y Hatt (Alvitres, 2000).

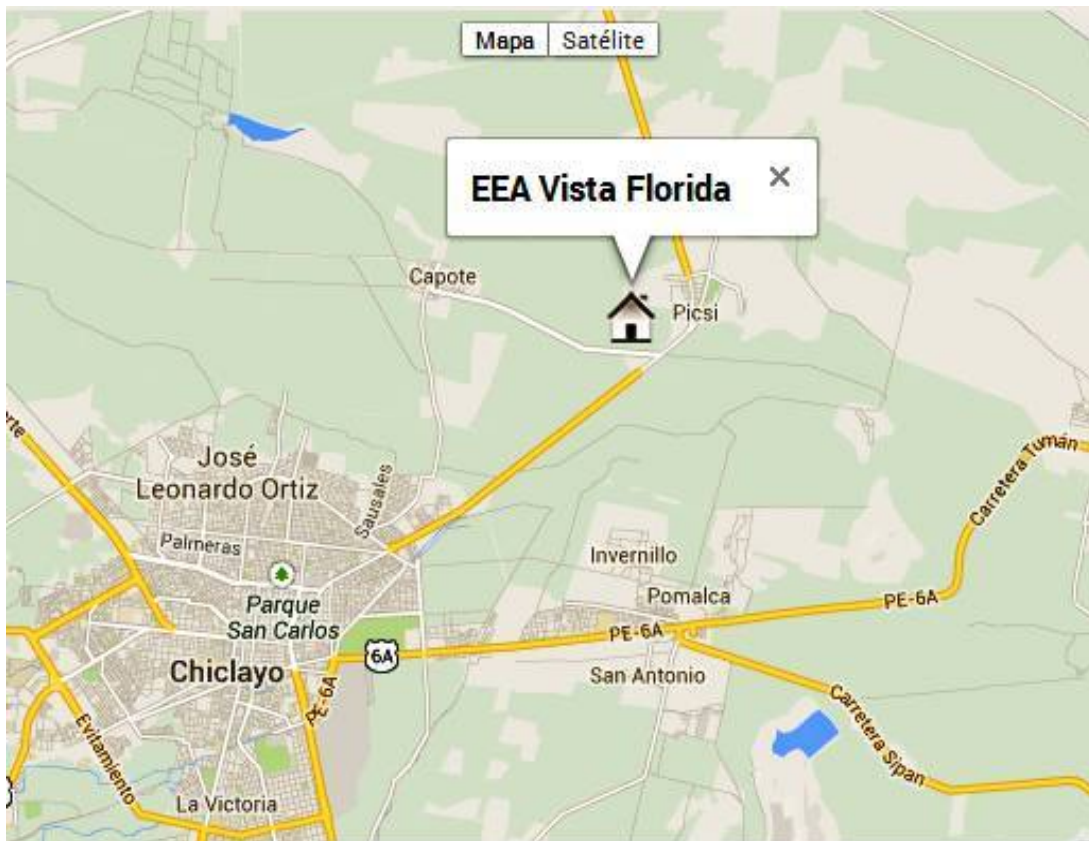
### **3.2.3 Lugar de muestreo**

Para el aislamiento de bacterias endófitas diazotróficas se colectaron 54 muestras de raíces, en tres lotes de arroz en la Estación Experimental Agraria, Vista Florida del Instituto Nacional de Innovación Agraria, distrito Picsi, provincia Chiclayo, Región Lambayeque (Figura 1, tabla 1), determinando la posición de los puntos de muestreo (Tabla 2), con un GPS GARMIN E Trex Vista HCx (Figura 2). La Estación Experimental Agraria, Vista Florida del Instituto Nacional de Innovación Agraria, se ubica entre los paralelos 06°43'34" latitud sur y 79°46'49" longitud oeste, 30msnm (MINAGRI, 2014). Los lotes correspondieron a las variedades de arroz Tinajones (lote 52), IR-43 (lote 53) y Mallares (lote 54).

### **3.2.4 Obtención de muestras de raíces**

En campos cultivados con arroz en fase de macollamiento (Figura 3), se colectaron aleatoriamente dos golpes, cada uno con un promedio de 10 a 15 plantas se depositaron en bolsas de polietileno (Figura 4), debidamente identificadas e inmediatamente después, se transportaron en una caja térmica ( $10 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) para su procesamiento (Figura 5) en el laboratorio de Microbiología y Parasitología, sección de Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas, en la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

En simultáneo al muestreo de raíces para el aislamiento de bacterias se colectó una muestra representativa de 1Kg, de los lotes 52, 53 y 54, para realizar el análisis físico-químico en el Instituto Nacional de Innovación y Extensión Agraria, Estación Experimental Agraria Vista Florida de Chiclayo. Según los resultados (Tabla 3), el suelo es medianamente alcalino ( $\text{pH } 7,4$ ) y ligeramente salino ( $\text{CE}=2,50 \text{ dSm}^{-1}$ ), con textura franco arenoso-arcilloso, con niveles bajos de materia orgánica (1,32%), nitrógeno (0,123%), fósforo disponible (7,0ppm) y contenido medio de potasio (327,0ppm).



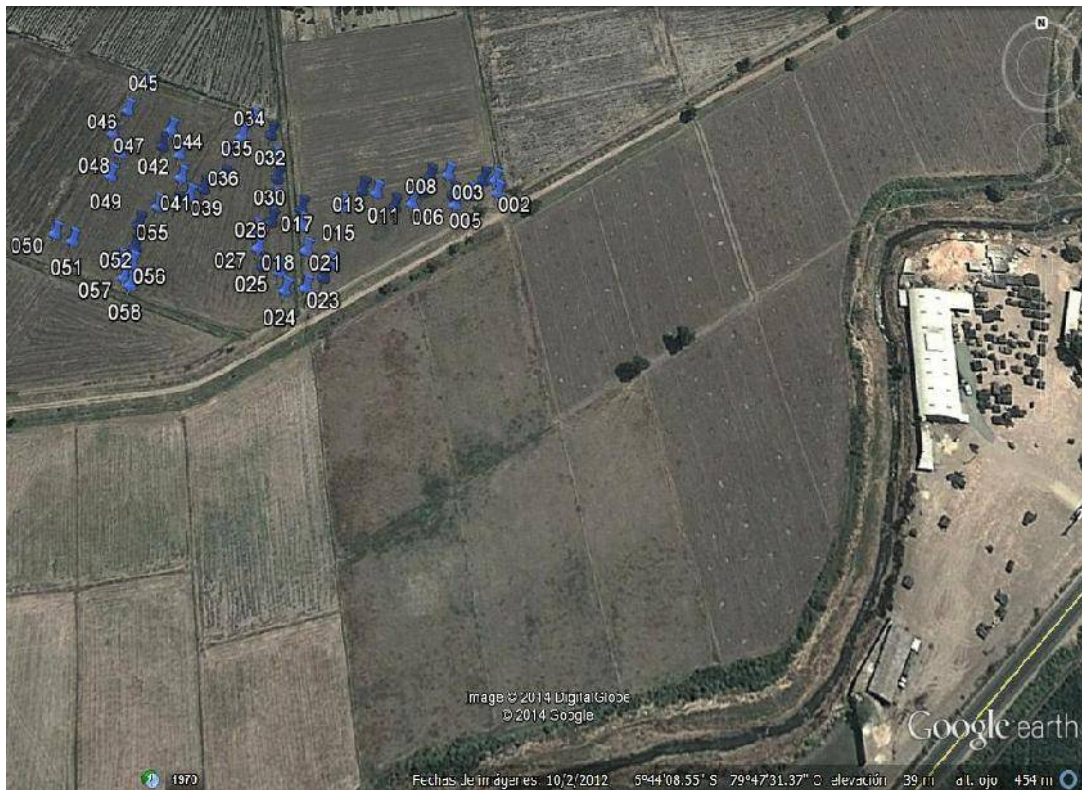
**Figura 1.** Ubicación del lugar de muestreo correspondiente a la Estación Experimental Agraria Vista Florida, INIA en Lambayeque, 2014(<http://www.inia.gob.pe/vista-florida/ubicacion-geografica>).

**Tabla 1.** Lote de procedencia de muestras de raíces de *Oryza sativa* L. en la Estación Experimental Agraria Vista Florida, INIA, Lambayeque

<b>Lote</b>	<b>Muestras</b>
Lote 52	8, 9,14
Lote 52	1, 2, 3, 4, 5, 10, 11, 15, 16,17
Lote 52	6, 7, 12, 13
Lote 52	18, 19, 20
Lote 53	22, 30, 32,33,36,37
Lote 53	21,23,24,25,26,27,28,29,31,34,35,38
Lote 53	39, 40
Lote 54	45, 46, 49
Lote 54	41, 42, 43, 44, 47, 51, 52,54
Lote 54	48, 50, 53

**Tabla 2.** Posición de los campos de cultivo de *Oryza sativa* L, donde se realizó el muestreo de raíces, durante febrero – marzo de 2014

Punto	Posición	Punto	Posición
1	17 M 633481 9255412	28	17 M 633360 9255427
2	17 M 633480 9255419	29	17 M 633357 9255439
3	17 M 633473 9255420	30	17 M 633354 9255455
4	17 M 633466 9255411	31	17 M 633344 9255464
5	17 M 633458 9255406	32	17 M 633337 9255454
6	17 M 633457 9255412	33	17 M 633331 9255444
7	17 M 633454 9255424	34	17 M 633330 9255428
8	17 M 633444 9255424	35	17 M 633320 9255422
9	17 M 633440 9255415	36	17 M 633313 9255418
10	17 M 633434 9255408	37	17 M 633306 9255414
11	17 M 633425 9255407	38	17 M 633307 9255430
12	17 M 633414 9255416	39	17 M 633304 9255444
13	17 M 633407 9255418	40	17 M 633294 9255450
14	17 M 633397 9255408	41	17 M 633297 9255460
15	17 M 633374 9255408	42	17 M 633280 9255490
16	17 M 633376 9255398	43	17 M 633271 9255473
17	17 M 633379 9255384	44	17 M 633265 9255459
18	17 M 633392 9255375	45	17 M 633271 9255446
19	17 M 633389 9255368	46	17 M 633268 9255432
20	17 M 633380 9255363	47	17 M 633244 9255399
21	17 M 633369 9255362	48	17 M 633254 9255395
22	17 M 633366 9255372	49	17 M 633281 9255382
23	17 M 633356 9255376	50	17 M 633288 9255389
24	17 M 633353 9255386	51	17 M 633288 9255402
25	17 M 633351 9255396	52	17 M 633296 9255413
26	17 M 633359 9255401	53	17 M 633287 9255380
27	17 M 633359 9255414	54	17 M 633284 9255373



**Figura 2.** Ubicación de los campos comerciales de *Oryza sativa* L. en Estación Experimental Agraria Vista Florida, INIA, donde se realizó el muestreo de raíces durante febrero - marzo de 2014.





**Figura 3.** Cultivos de *Oryza sativa* L. “arroz” en macollamiento.



**Figura 4.** Plantas de *Oryza sativa* L. para el aislamiento de bacterias endófitas.





**Figura 5.** Extracción de raíces de *Oryza sativa* L.

**Tabla 3.** Análisis físico – químico de muestras de suelo rizosférico de cultivos de *Oryza sativa* L. en Lambayeque, 2014\*

Procedencia de la muestra	pH	CE (dSm <sup>-1</sup> )	MO (%)	N	P	K	Calcáreo	Textura			Tipo de suelo	
								Ao	Lo	Ar		
Lotes 52,53,54	7,40	2,50	1,32	0,123	7,00	327	3,45	60	18	22	Fo	Ao

\*Laboratorio de Suelos, Centro experimental Vista Florida  
Instituto Nacional de Innovación y Extensión Agraria,  
Lambayeque.

### **3.2.5 Aislamiento de bacterias endófitas diazotróficas**

Las raíces de arroz fueron lavadas con agua potable (Figura 6) y desinfectadas superficialmente, previo al aislamiento de las bacterias endófitas, según la metodología descrita por Pérez *et al.* (2010). Para la desinfección superficial, por muestra se seleccionaron 30 raíces (Figura 7), se pesaron 5g (Figura 8), se cortaron en fragmentos de aproximadamente 5cm (Figura 9) y se depositaron en frascos de vidrio de 500mL de capacidad (Figura 10), previamente esterilizados.

Las raíces fueron lavadas con 50mL de agua destilada más 0,005% detergente neutro por 1 minuto (Figura 11), enjuagadas por cuatro veces consecutivas con agua destilada esterilizada, a razón de 1 minuto por enjuague, (Figura 12), seguida de agitación (Figura 13) por 15 minutos en solución tampón fosfato de potasio  $0,05\text{molL}^{-1}$  (Anexo 2), inmersión por 1 minuto en alcohol 70% (Figura 14) y agitación por 5 minutos en solución de hipoclorito de sodio (NaClO) 5% más tween 80 (Figura 15). Después, el tejido vegetal fue llevado a nuevos frascos de vidrio (Figura 16) previamente esterilizados, para la inmersión por 1 minuto en alcohol 70%, seguido por agitación por 15 minutos en solución tampón y finalmente lavado por cuatro veces con agua destilada esterilizada.

#### **a. Verificación de la desinfección**

Para verificar la desinfección (Figura 17) superficial de las raíces (Pérez *et al.*, 2010), alícuotas del último lavado fueron sembradas en agar nutritivo e incubadas a 30°C, por 48 horas.

#### **b. Siembra y aislamiento**

El tejido vegetal previamente desinfectado fue depositado en papel secante, para eliminar el exceso de humedad (Figura 18) y luego fue llevado a bolsas de polietileno de 16X15cm (Figura 19). A continuación, se agregó 1mL de solución salina esterilizada (NaCl 0,85%, p/v), con ayuda de un pilón el tejido vegetal se maceró cuidadosamente (Figura 20, 21) y con una jeringa se extrajo 1mL (Figura 22), sembrándose inmediatamente una alícuota ( $10^{-1}$ ) en medios semisólidos sin nitrógeno (Figura 23).

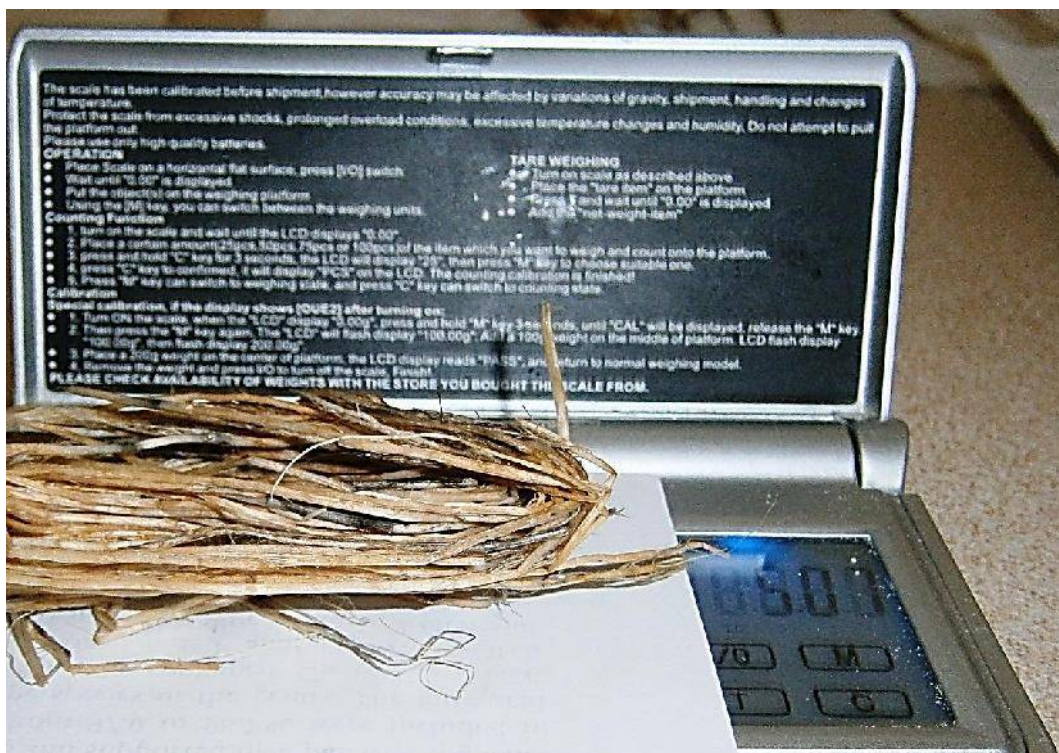


**Figura 6.** Lavado de raíces de *Oryza sativa* L. con agua potable.



**Figura 7.** Raíces de *Oryza sativa* L. seleccionadas para el aislamiento de bacterias endófitas.





**Figura 8.** Pesado de raíces de *Oryza sativa* L.



**Figura 9.** Corte de raíces de *Oryza sativa* L.





**Figura 10.** Frascos con fragmentos de raíces de *Oryza sativa* L.



**Figura 11.** Lavado de raíces de *Oryza sativa* L. con agua destilada más detergente neutro.



**Figura 12.** Enjuague de raíces de *Oryza sativa* L. con agua destilada esterilizada.

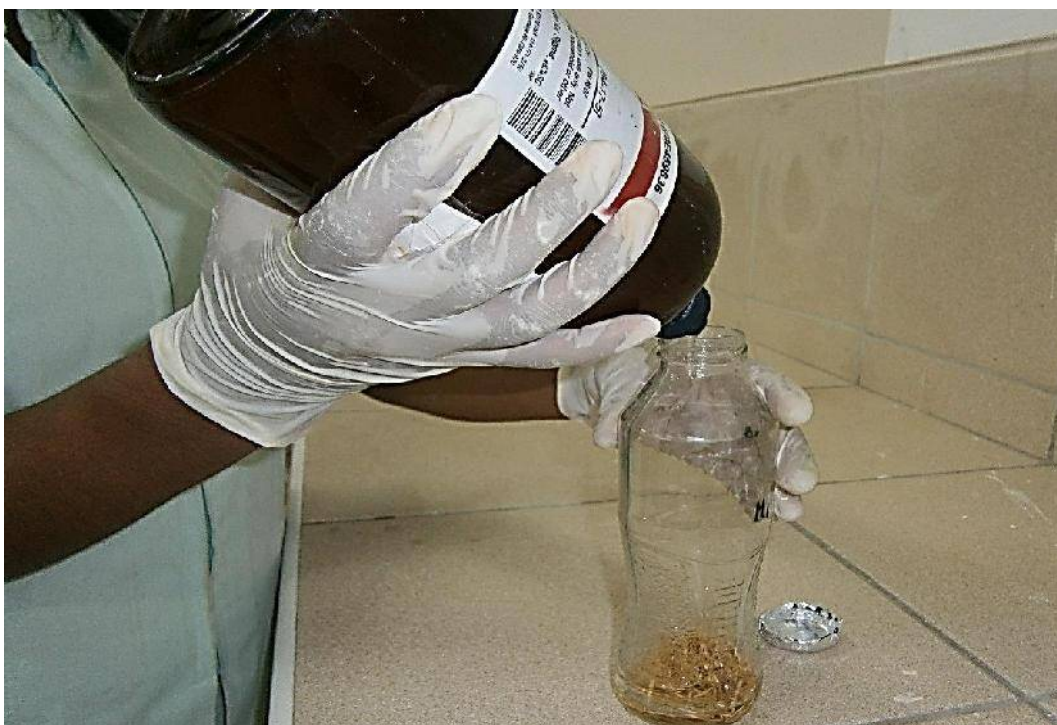


**Figura 13.** Lavado de raíces de *Oryza sativa* L. en solución tampón fosfato de potasio.





**Figura 14.** Inmersión de fragmentos de raíces de *Oryza sativa* L. en alcohol.



**Figura 15.** Inmersión de fragmentos de raíces de *Oryza sativa* L. en solución de hipoclorito de sodio-Tween 80.



**Figura 16.** Fragmentos de raíces de *Oryza sativa* L. en frasco de vidrio esterilizado.



**Figura 17.** Siembra del agua de enjuague en agar nutritivo para verificar la desinfección.





**Figura 18.** Fragmentos de raíces de *Oryza sativa* L. en papel secante esterilizado.



**Figura 19.** Fragmentos de raíces de *Oryza sativa* L. desinfectados.



**Figura 20.** Macerado de fragmentos de raíces de *Oryza sativa* L.

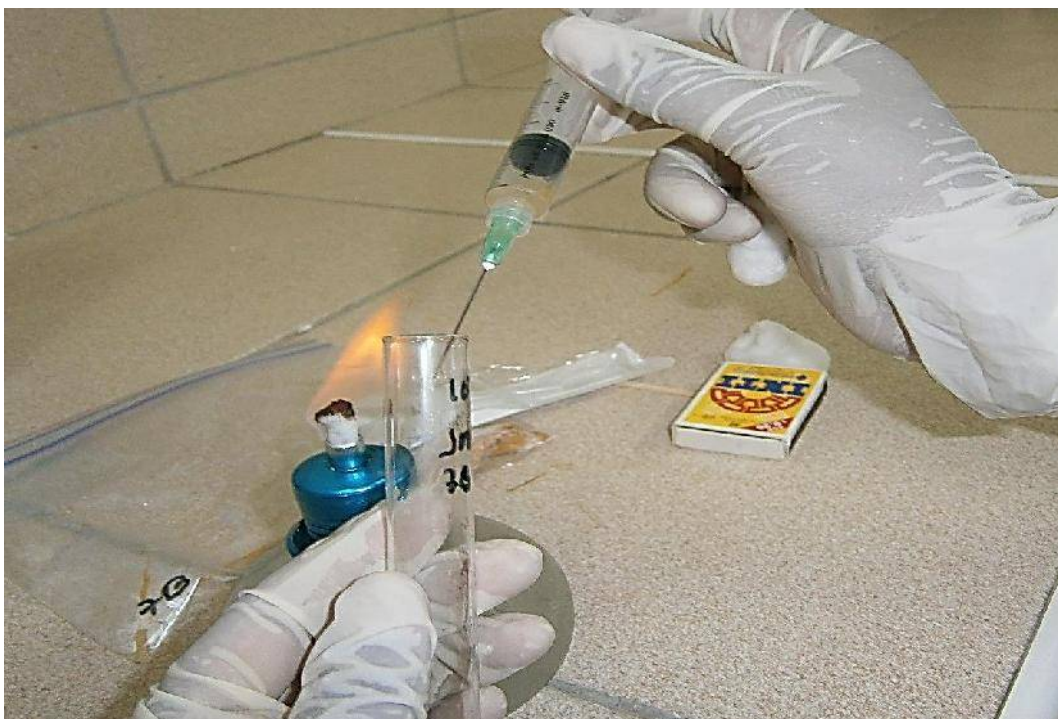


**Figura 21.** Separación del macerado de raíces de *Oryza sativa* L.





**Figura 22.** Toma de muestra de macerado de raíces de *Oryza sativa* L.



**Figura 23.** Siembra de macerado de raíces en medio semisólido sin nitrógeno.

Adicionalmente, se extrajo 1mL del macerado, se diluyó en solución salina esterilizada ( $10^{-1}$ ), se tomó una alícuota y se sembró. Los medios de cultivo semisólidos (Figuras 24,25) fueron NFb y LGI para *Azospirillum* spp., JNFb para *Herbaspirillum* spp., LGI-P para *Gluconacetobacter* spp. y JMV para *Burkholderia* spp. (Garrido, 2007; Jha *et al.*, 2009). Después de la incubación a  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ , por 7 días, se seleccionaron los medios semisólidos donde se observó con mayor nitidez una película blanquecina de 3-5mm bajo la superficie y el viraje del indicador (Figura 26) y se realizaron subcultivos en los mismos medios, por dos veces consecutivas (Figura 27).

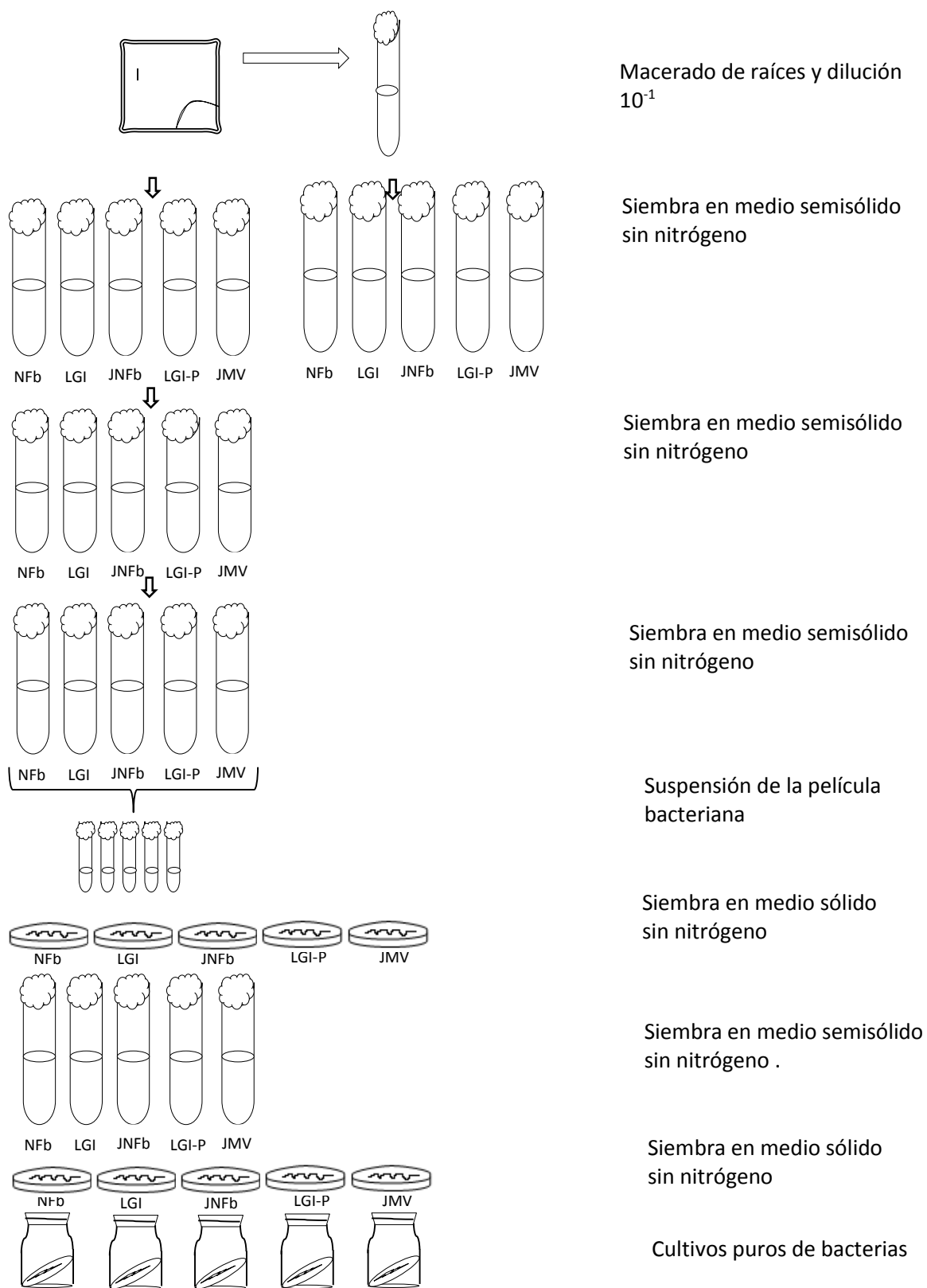
Para el aislamiento, con la película bacteriana se obtuvo una suspensión en solución salina esterilizada (Figura 28) y se sembró en los medios sólidos respectivos (Figura 29), incubando a  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 7 días. Con las colonias características (Figura 30), se realizaron tinciones de Gram, se cultivaron nuevamente en el medio semisólido libre de nitrógeno (Tercer subcultivo) y posteriormente en el medio sólido respectivo, para la obtención de los cultivos puros de bacterias fijadoras de nitrógeno. Para su mantenimiento, éstos se sembraron por duplicado en agar nutritivo y medio semisólido libre de nitrógeno (Figura 31), siendo guardados en refrigeración ( $8^{\circ}\text{C}$ ).

### **3.2.6 Identificación fenotípica de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno**

La identificación del género de las bacterias endófitas nativas fijadoras de nitrógeno se realizó en función de las características morfológicas y fisiológicas según el Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática (Brenner *et al.*, 2005), Schoebitz, (2006) y Garrido (2007). Con todas las bacterias se realizaron pruebas de catalasa, oxidasa y motilidad. Para el género *Azospirillum*, las pruebas fueron de crecimiento en NaCl 3%, utilización de sacarosa, glucosa, manitol y ácido málico como fuentes de carbono para la fijación de nitrógeno (Figuras 32, 33, 34,35), requerimiento de biotina (Tabla 4).

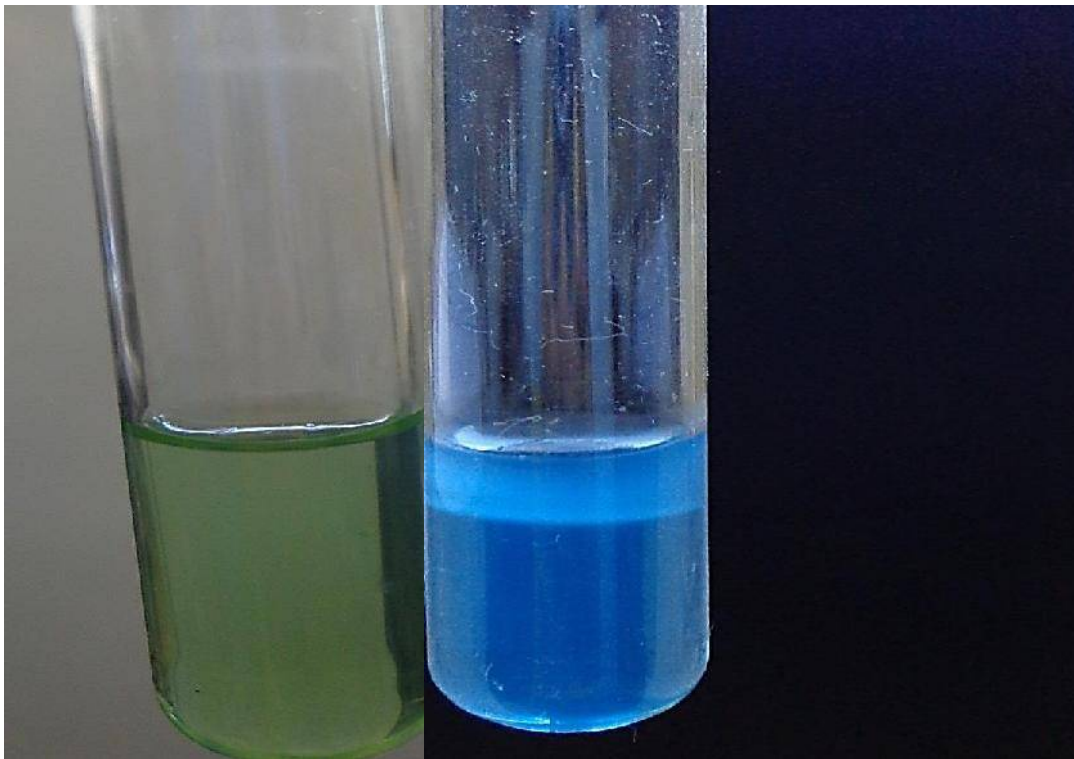


**Figura 24.** Medios semisólidos sin nitrógeno para el aislamiento de bacterias endófitas.

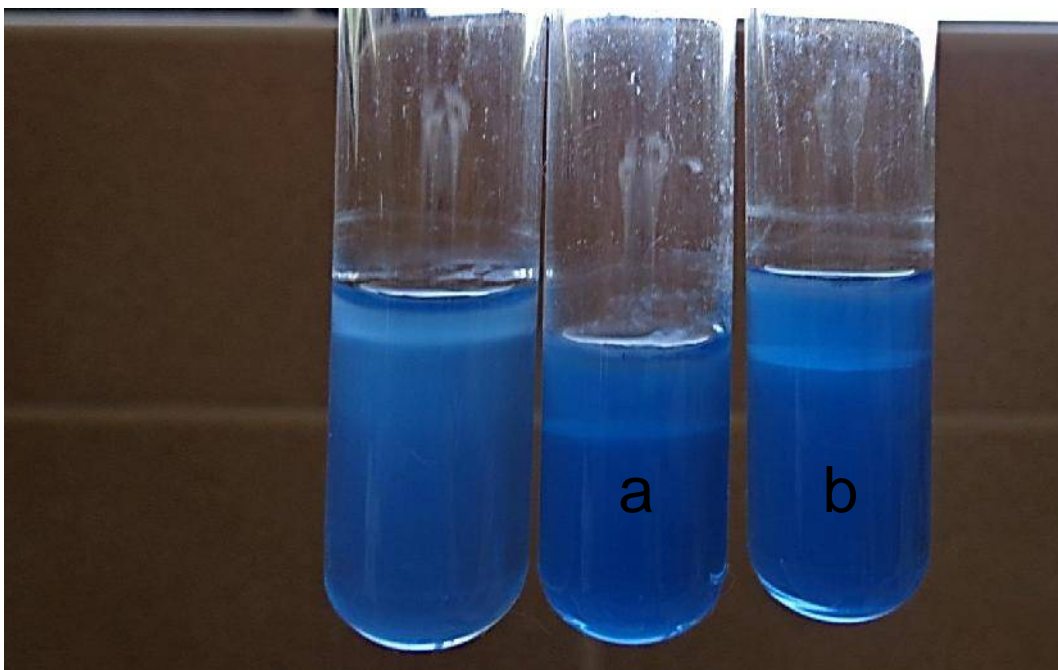


**Figura 25.** Aislamiento de bacterias fijadores de nitrógeno.





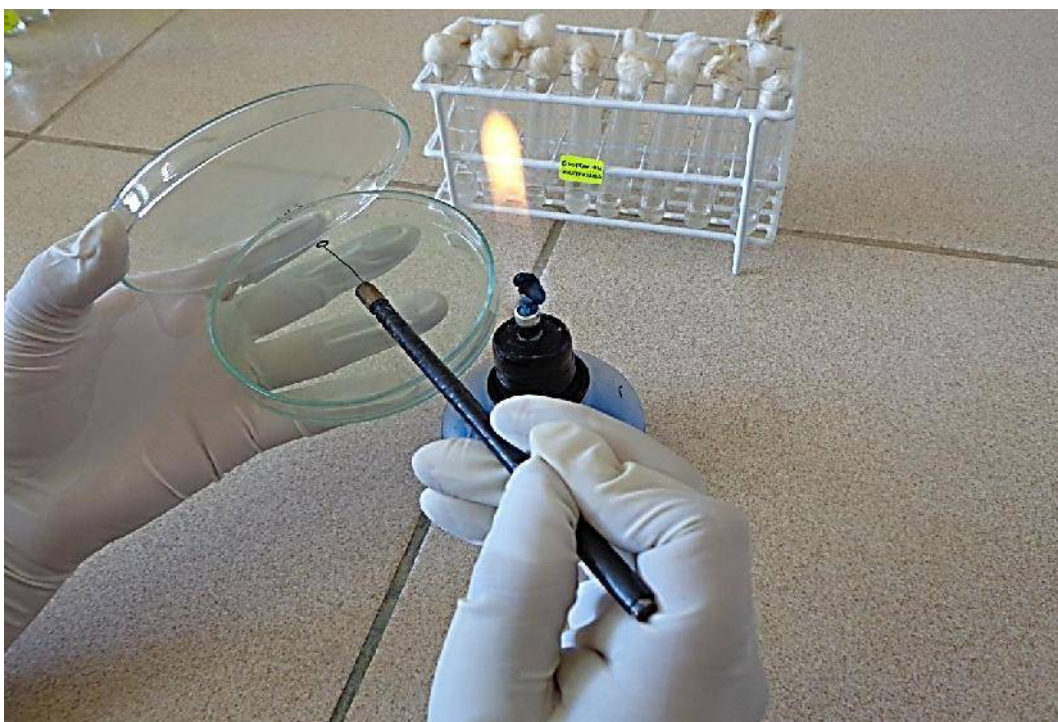
**Figura 26.** Película blanquecina y viraje del indicador por bacterias fijadoras de nitrógeno en medio semisólido.



**Figura 27.** Primer y segundo subcultivo de bacterias fijadoras de nitrógeno en medio semisólido.



**Figura 28.** Suspensión de bacterias fijadoras de nitrógeno en solución salina esterilizada.

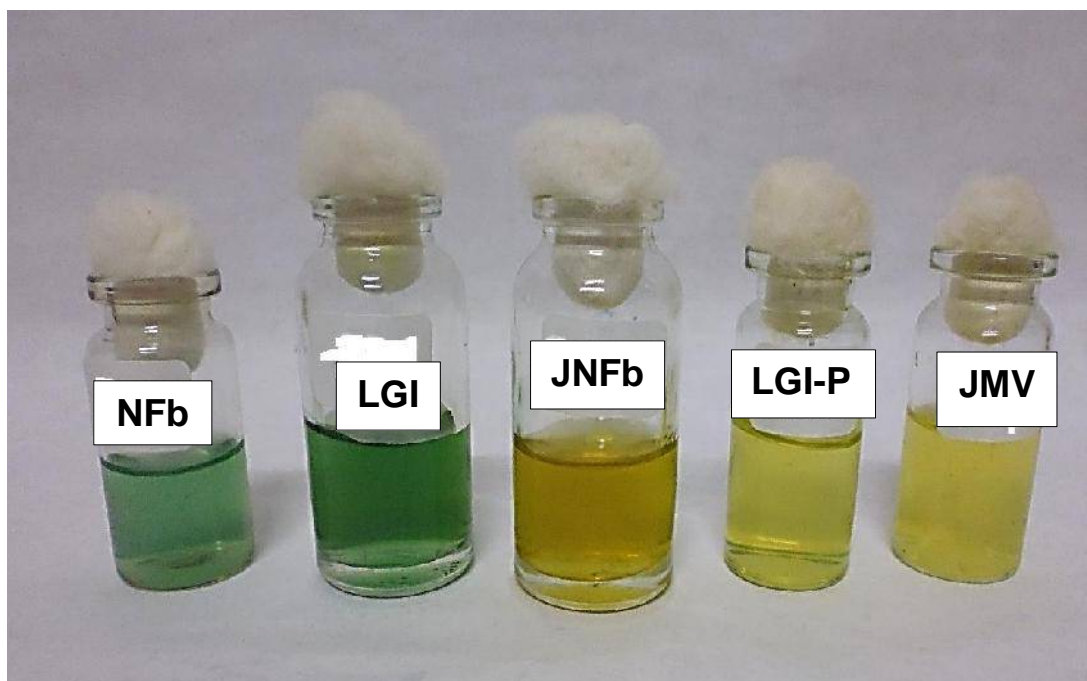


**Figura 29.** Siembra de bacterias fijadoras de nitrógeno en medio sólido.





**Figura 30.** Colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno en medio NFb.



**Figura 31.** Bacterias fijadoras de nitrógeno en medios sólidos.

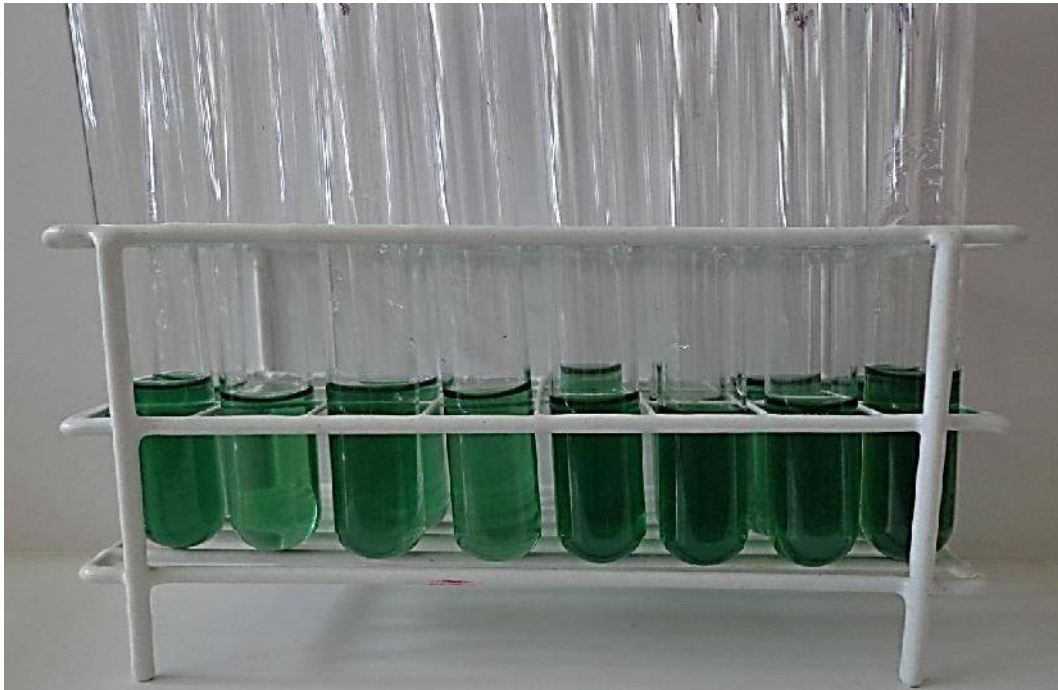


**Figura 32.** Medio LGI semisólido con ácido málico para la identificación de *Azospirillum* spp.

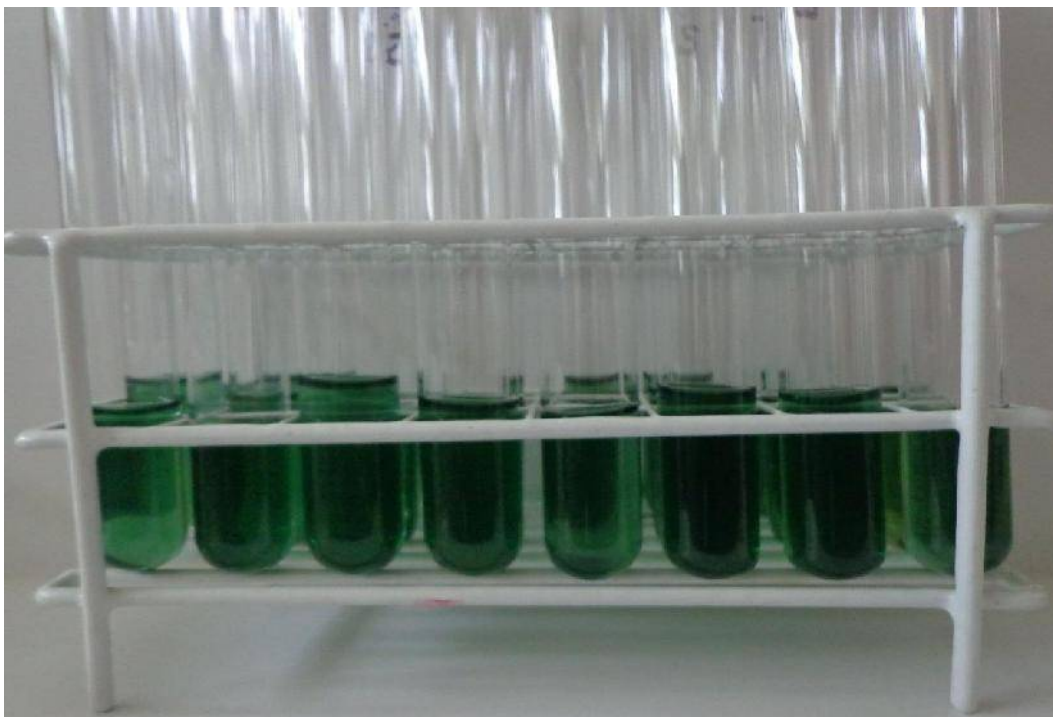


**Figura 33.** Medio LGI semisólido con glucosa para la identificación de *Azospirillum* spp.





**Figura 34.** Medio LGI semisólido con manitol para la identificación de *Azospirillum* spp.



**Figura 35.** Medio LGI semisólido con sacarosa para la identificación de *Azospirillum* spp.

**Tabla 4.** Características diferenciales de *Azospirillum* spp.

<b>Características</b>	<b><i>A. brasilense</i></b>	<b><i>A. lipoferum</i></b>	<b><i>A. halopraeferens</i></b>	<b><i>A. irakense</i></b>	<b><i>A. amazonense</i></b>
Células pleomórficas	-	+	+	+	+
Tinción de Gram	-	-	-	-	-
Motilidad	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+
Requerimiento biotina	-	+	+	-	-
Tolerancia NaCl 3%	+/-	-	+	+	-
Ureasa	+	+	+	+	+
Gelatinasa	-	-	+	+	-
Reducción de nitratos	+	+	+	+	+
Gránulos de PHA	+	+	+	+	+
Fuente de carbono					
• Ácido Máfico	+	+	+	+	+
• Glucosa	-	+	-	-	-
• Manitol	-	+	+	-	-
• Sacarosa	-	+/-	-	+	+

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

\* Brenner *et al.* (2005); Schoebitz, (2006); Garrido, (2007); Mehnaz *et al.* (2007); Carrera, (2012)

Para el género *Herbaspirillum* se investigó el crecimiento en caldo NFb, hidrólisis de la urea y reducción de nitratos (Tabla 5). Para el género *Gluconacetobacter* se investigó el crecimiento en Agar Batata, hidrólisis de la gelatina, almidón, citrato, glucosa y sacarosa al 30% (Tabla 6). Para el género *Burkholderia*, se realizaron pruebas de resistencia a la polimixina-B (300ug), descarboxilación de la lisina y prueba de hidrólisis de la urea (Tabla 7).

### **3.2.7 Mantenimiento de los cultivos de bacterias**

Las bacterias endófitas diazotróficas identificadas (Figura 36) se sembraron en el medio semisólido respectivo y en agar nutritivo y se mantuvieron a temperatura ambiente (28°C) y refrigeración (8°C), respectivamente, realizándose subcultivos cada 30 días.

### **3.2.8 Cuantificación de nitrógeno fijado *in vitro***

Para la cuantificación del nitrógeno fijado *in vitro* por las bacterias endófitas, se utilizó el método colorimétrico del fenolhipoclorito (Figura 37) descrito por Lara *et al.* (2007) y Cadena & Martínez (2011). Cada bacteria cultivada en el medio sólido sin nitrógeno correspondiente, por 48 horas, fue inoculada por triplicado en tubos de 16 x 150mL conteniendo 3mL de caldo extracto de suelo 10% (Anexo 3) y se incubaron a 30°C, por 72 horas, en agitación constante (150rpm). A continuación, se agregaron 9mL de KCl 2M, se agitaron a 150rpm durante 1 hora y se dejaron en reposo por 1 hora adicional, para después tomar 10mL del sobrenadante y centrifugarlos (5000rpm) durante 5 minutos (Figuras 38,39).

Los sobrenadantes se llevaron a tubos de dilución y se añadieron 0,4mL de solución alcohólica de fenol al 10% (Figura 40); 0,4mL de nitroprusiato de sodio al 0,5% (Figura 41) y 1mL de solución oxidante (Figura 42). Los tubos se agitaron para mezclar y se dejaron en reposo durante una hora adicional. La positividad a la fijación de nitrógeno estuvo dada por una coloración azul, y se leyó la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible a 632,9nm (Figura 43). Las concentraciones se calcularon en una recta patrón obtenida con diluciones sucesivas de una solución de 100ppm de cloruro de amonio (Anexo 3).

**Tabla 5.** Características diferenciales de *Herbaspirillum* spp.

<b>Características</b>	<b><i>Herbaspirillum</i> spp.</b>
Células	Bacilos curvos
Tinción de Gram	-
Motilidad	+
Catalasa	+/-
Oxidasa	+
Crecimiento en caldo NFb	-
Ureasa	+/-
Fuente de carbono	
• Ácido málico	+
• Glucosa	+
• Manitol	+
• Sacarosa	+

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

\* Eckert *et al.* (2001); Brenner *et al.* (2005); Schoebitz, (2006); Garrido, (2007).

**Tabla 6.** Características diferenciales de *Gluconacetobacter* spp.

<b>Características</b>	<b><i>Gluconacetobacter</i> spp.</b>
Células	Bacilos pequeños
Tinción de Gram	-
Motilidad	+
Catalasa	+
Oxidasa	+
Hidrólisis de urea	+
Hidrólisis de gelatina	+
Hidrólisis de almidón	-
Reducción de nitratos	+
Gránulos de PHA	+
Fuente de carbono	
• Ácido málico	+
• Glucosa	+
• Manitol	+
• Sacarosa	+

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

\* Eckert *et al.* (2001); Brenner *et al.* (2005); Schoebitz, (2006); Garrido, (2007).



**Tabla 7.** Características diferenciales de *Burkholderia* spp.

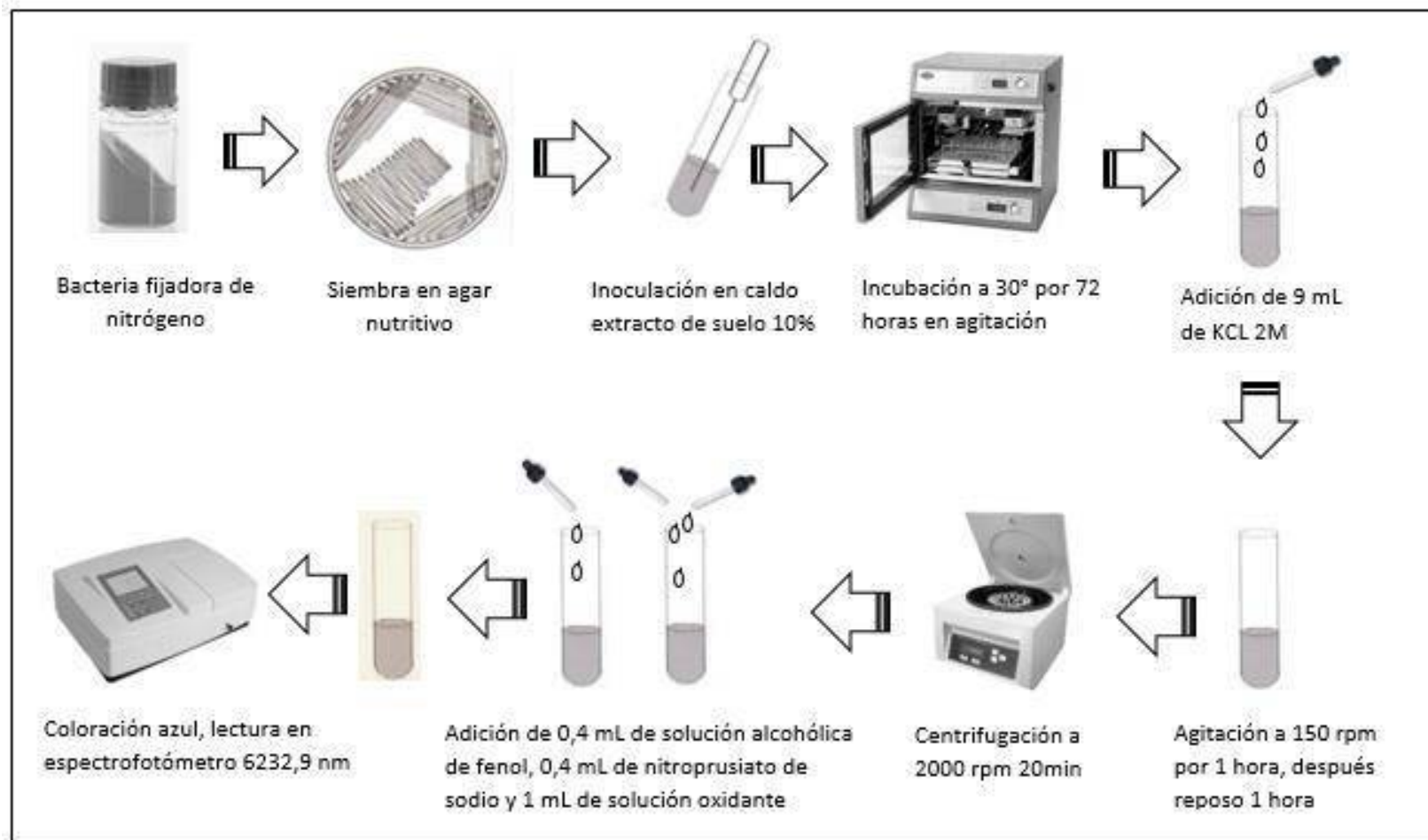
<b>Características</b>	<b><i>Burkholderia</i> spp.</b>
Células	Bacilos rectos
Tinción de Gram	-
Motilidad	+
Catalasa	+
Oxidasa	+
Hidrólisis de gelatina	+
Descarboxilación de lisina	+
Resistencia a Polimixina B (3000I)	+
Fuente de carbono	
• Ácido málico	+
• Glucosa	+
• Manitol	+
• Sacarosa	+

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

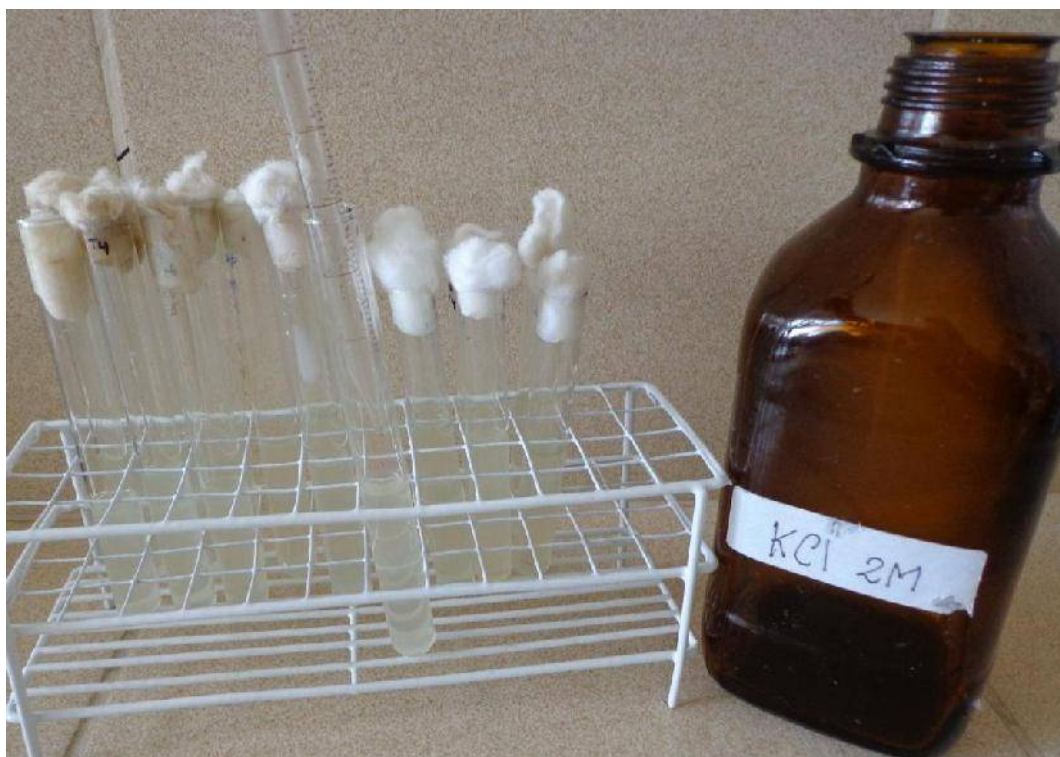
\* Eckert *et al.* (2001); Brenner *et al.* (2005); Schoebitz, (2006); Garrido, (2007).



**Figura 36.** Cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno en agar nutritivo.



**Figura 37.** Procedimiento para la cuantificación de nitrógeno fijado *in vitro* por bacterias.

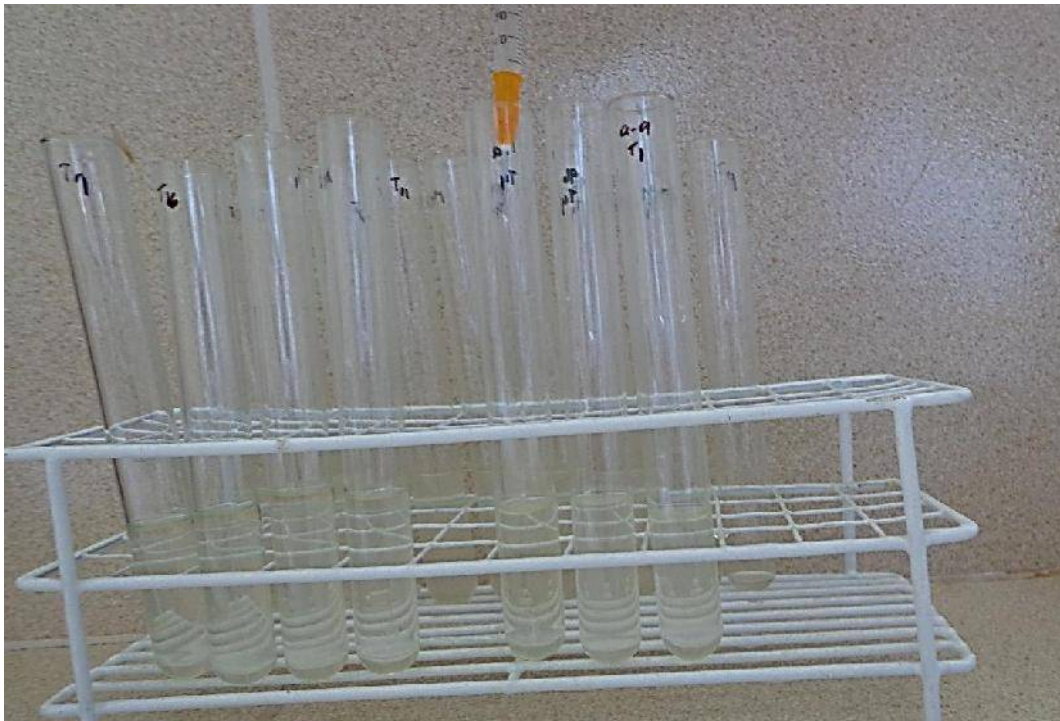


**Figura 38.** Caldo extracto de suelo con cloruro de potasio.



**Figura 39.** Centrifugación del caldo extracto de suelo mezclado con cloruro de potasio.





**Figura 40.** Adición de solución alcohólica de fenol al caldo extracto de suelo.



**Figura 41.** Caldo extracto de suelo con nitroprusiato de sodio.



**Figura 42.** Adición de solución oxidante al caldo extracto de suelo.



**Figura 43.** Lectura de la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible.

### **3.2.9 Selección de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno**

Las bacterias de cada uno de los géneros investigados, que alcanzaron los mayores valores de nitrógeno fijado como amonio, fueron seleccionadas para su análisis molecular.

#### **3.2.10 Identificación del gen *nifH* en bacterias endófitas diazotróficas aisladas de raíces de arroz**

Las bacterias seleccionadas fueron cultivadas en sus respectivos medios sólidos sin nitrógeno, durante 24 horas, para obtener colonias representativas, extraer el ADN e identificar el gen *nifH*.

##### **a. Extracción de ADN**

Se tomó una colonia representativa de cada género bacteriano, se depositó en un Eppendorf con 20uL de buffer y se calentó en baño maría a 85°C durante 5 minutos. Luego, se mezcló con 225uL de agua bidestilada y se centrifugó a 12000rpm durante 5 minutos (Menezes, 2009). Los lisados fueron conservados a -20°C y el sobrenadante se utilizó para la amplificación del ADN (Figuras 44 a 48).

##### **b. Identificación del gen *nifH***

Los Eppendorf conteniendo el material genético, sellados herméticamente (Figura 48), junto a un cultivo puro en agar nutritivo de cada bacteria seleccionada fueron enviados al laboratorio del Grupo de Cristalografía, Instituto de Física de Sao Carlos-Universidad de Sao Paulo, Brasil, donde se realizó la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y corrida electroforética en gel de agarosa al 1,5%, para la observación de una banda con similar peso molecular al gen *nifH*.

#### **3.2.11 Análisis de los datos**

Los datos obtenidos fueron ordenados en tablas y figuras para analizar las características de las bacterias endófitas diazotróficas. Se realizó el análisis de varianza de los valores de nitrógeno fijado y la superioridad entre las bacterias, se determinó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, con un nivel de significancia de 0,05 (Hernández *et al.*, 2010). Se utilizaron los programas Microsoft Office y Excel versión 2013.





**Figura 44.** Bacterias endófitas diazotróficas representativas de cada género identificado para la extracción de ADN.



**Figura 45.** Selección de una colonia bacteria bacteriana representativa.



**Figura 46.** Suspensión de colonia bacteriana en un Eppendorf con agua bidestilada.



**Figura 47.** Calentamiento de bacterias en baño maría.





**Figura 48.** Eppendorf con material genético de bacteria fijadora de nitrógeno.

## **IV. RESULTADOS**

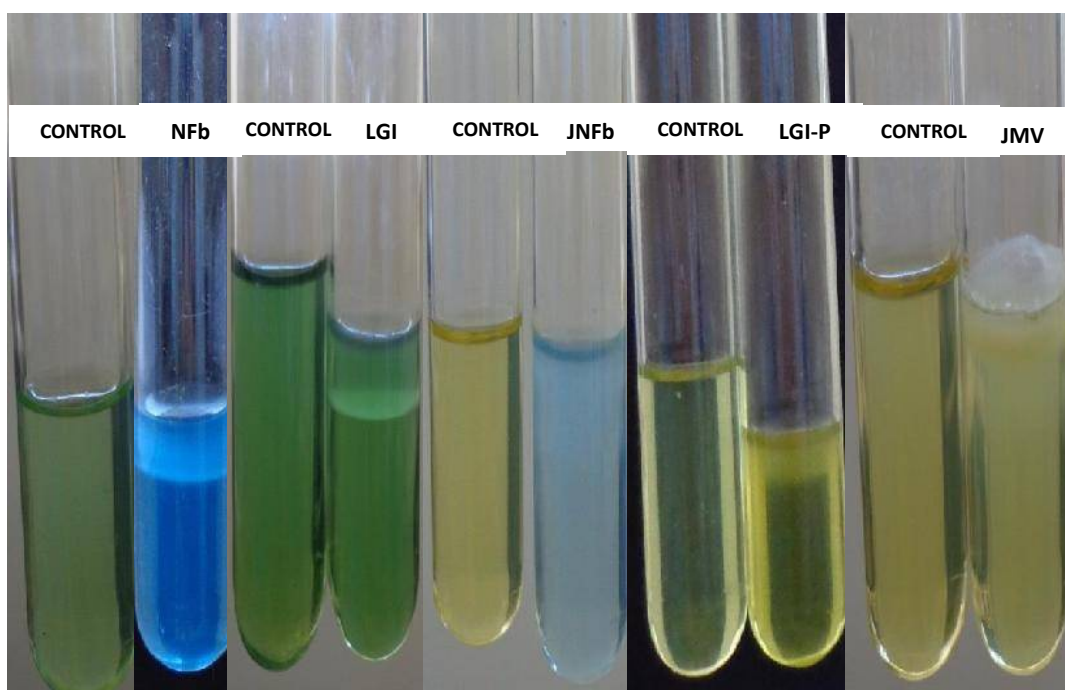
### **4.1 Bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno aisladas de raíces de arroz**

En cinco medios semisólidos se aislaron bacterias fijadoras de nitrógeno, cuya presencia se evidenció por una película blanquecina formada bajo la superficie del medio y el viraje del indicador (Figura 49).

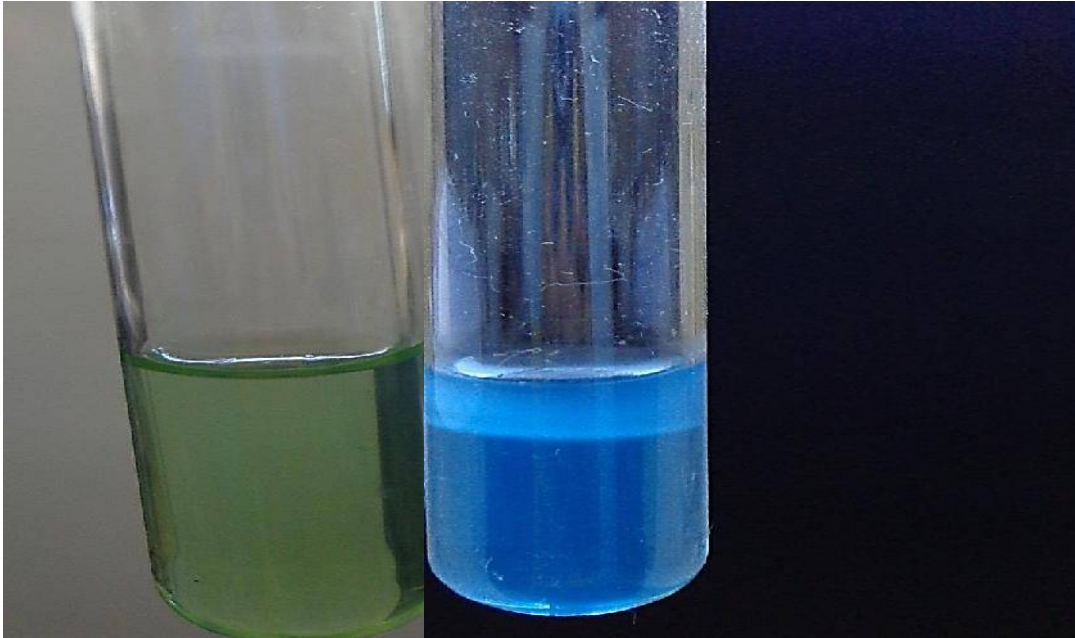
En el medio NFb con un color inicial celeste-verdoso, se observó viraje del indicador al celeste-azulado (Figura 50). La frecuencia de muestras de raíces de arroz positivas para bacterias fijadoras de nitrógeno fue 70,4% después de la siembra, así como 85,2; 83,3 y 51,9% después de tres subcultivos, respectivamente (Figura 51).

En el medio LGI con un color inicial verde se observó viraje del indicador al verde azulado y verde amarillento (Figura 52). La frecuencia de muestras de raíces de arroz positivas para bacterias fijadoras de nitrógeno fue 38,9% después de la siembra así como 55,0; 55,6 y 42,6% después de tres subcultivos, respectivamente (Figura 53).

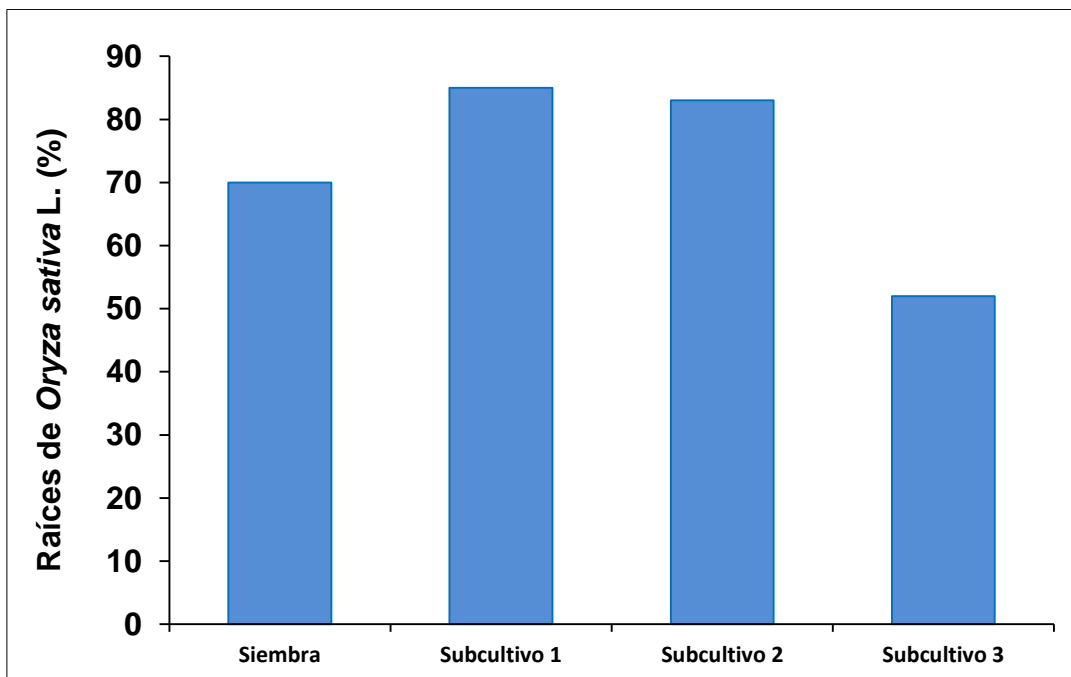
En el medio JNFb con un color inicial amarillo se observó viraje del indicador al celeste azulado (Figura 54). La frecuencia de muestras de raíces de arroz positivas para bacterias fijadoras de nitrógeno fue 31,48 % después de la siembra así como 33,3; 37,0; y 37,0% después de tres subcultivos, respectivamente (Figura 55).



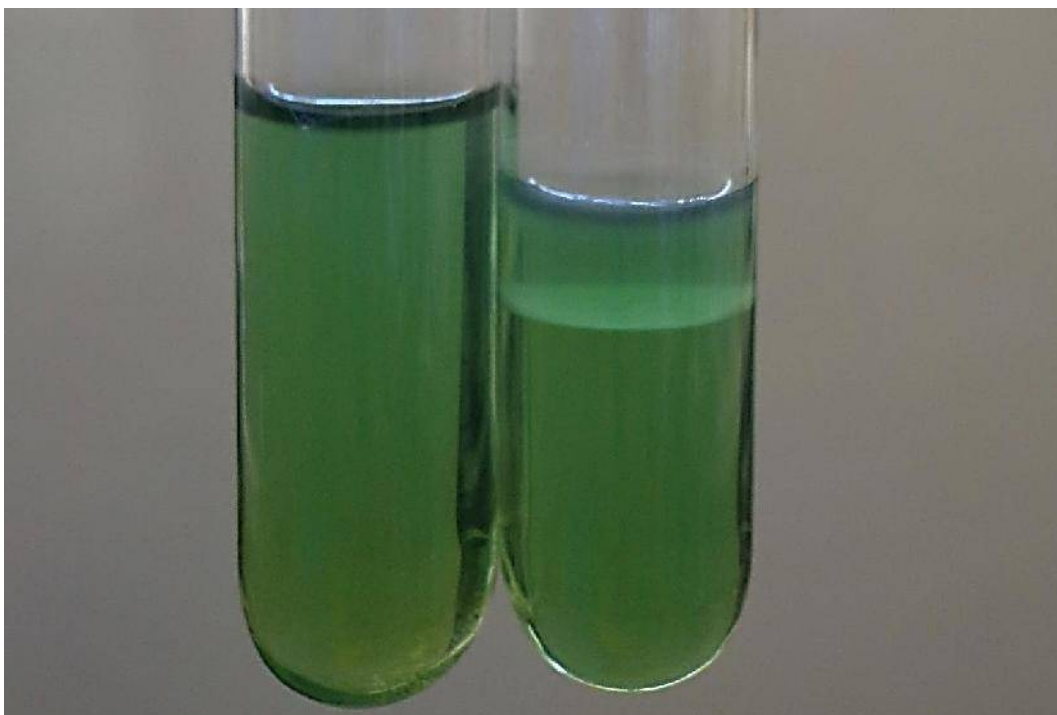
**Figura 49.** Película blanquecina y viraje del indicador por bacterias fijadoras de nitrógeno en cinco medios semisólidos, NFb (a), LGI (b), JNFb (c), LGI-P (d) y JMV (e).



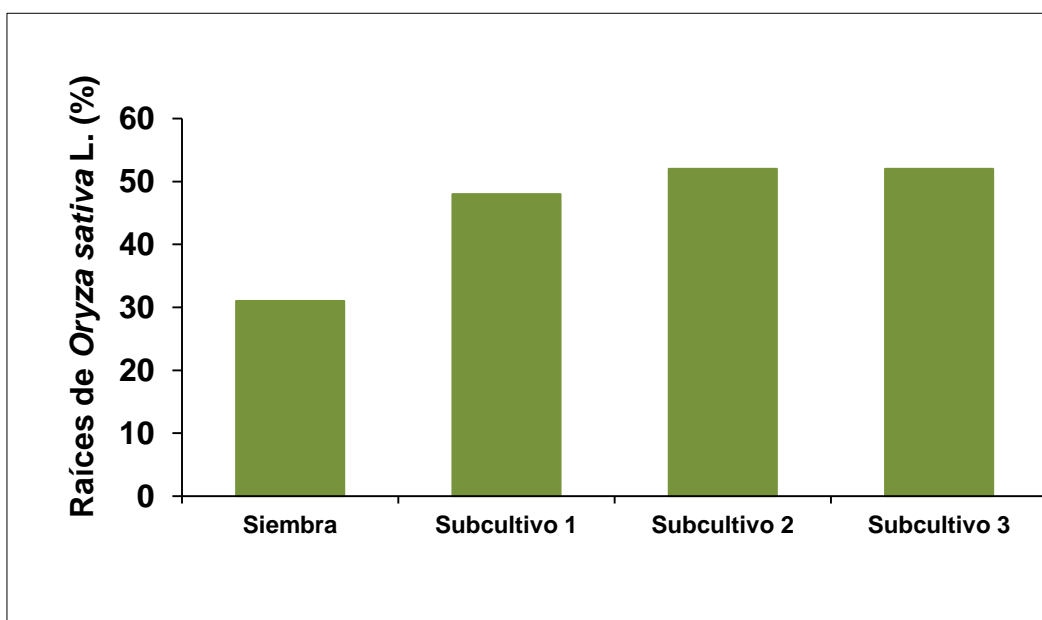
**Figura 50.** Película bacteriana y viraje del indicador por bacterias fijadoras de nitrógeno en medio NFb.



**Figura 51.** Frecuencia de raíces de *Oryza sativa* L. con bacterias fijadoras de nitrógeno, observadas en NFb después de la siembra y tres subcultivos, 2014.

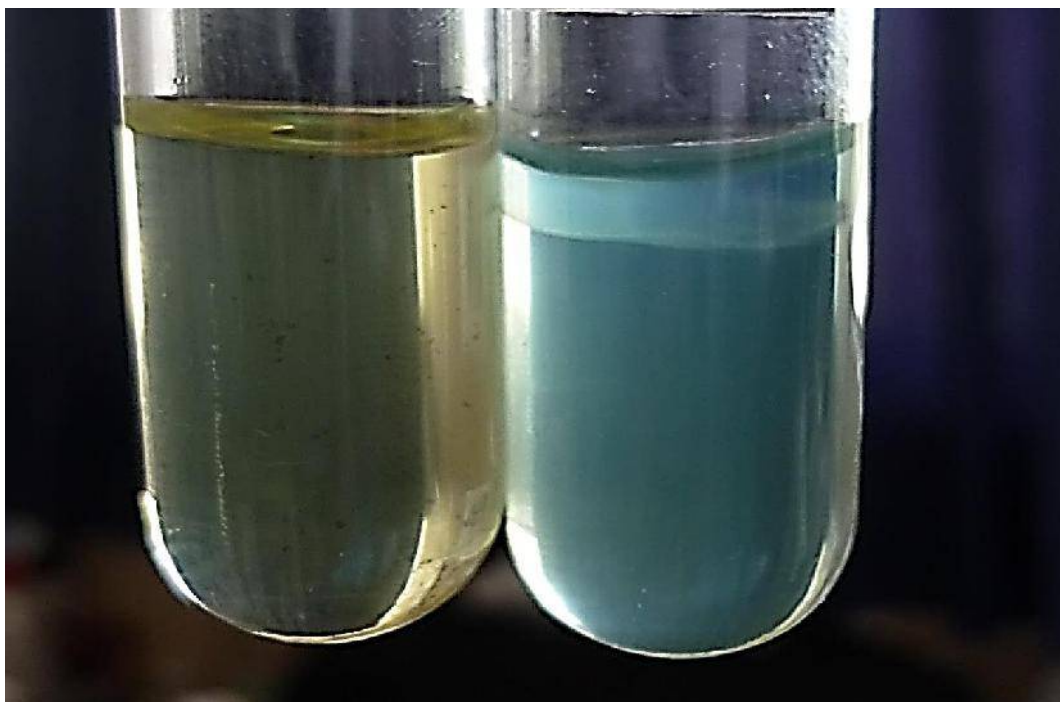


**Figura 52.** Película bacteriana y viraje del indicador por bacterias fijadoras de nitrógeno en medio LGI.

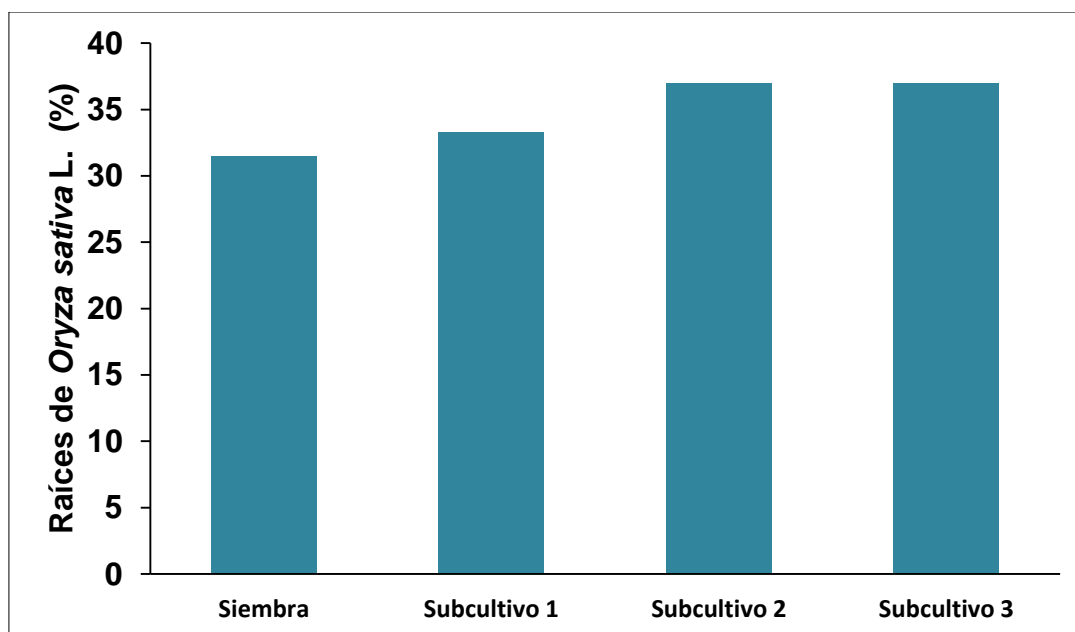


**Figura 53.** Frecuencia de raíces de *Oryza sativa* L. con bacterias fijadoras de nitrógeno, observadas en LGI después de la siembra y tres subcultivos, 2014.





**Figura 54.** Película bacteriana y viraje del indicador por bacterias fijadoras de nitrógeno en medio JNFb.



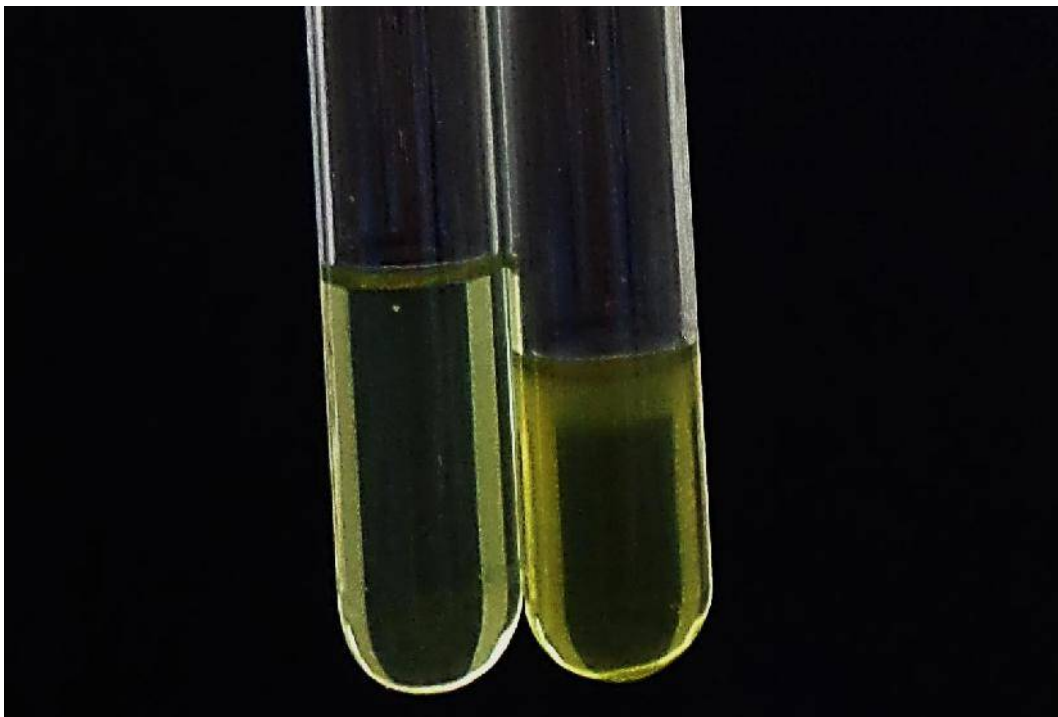
**Figura 55.** Frecuencia de raíces de *Oryza sativa* L. con bacterias fijadoras de nitrógeno, observadas en JNFb después de la siembra y tres subcultivos, 2014.

En el medio LGI-P con un color inicial verde-amarillento se observó viraje del indicador al amarillo y verde (Figura 56). La frecuencia de muestras de raíces de arroz positivas para bacterias fijadoras de nitrógeno fue 24,07% después de la siembra, así como 42,6; 22,2 y 14,81% después de tres subcultivos, respectivamente (Figura 57).

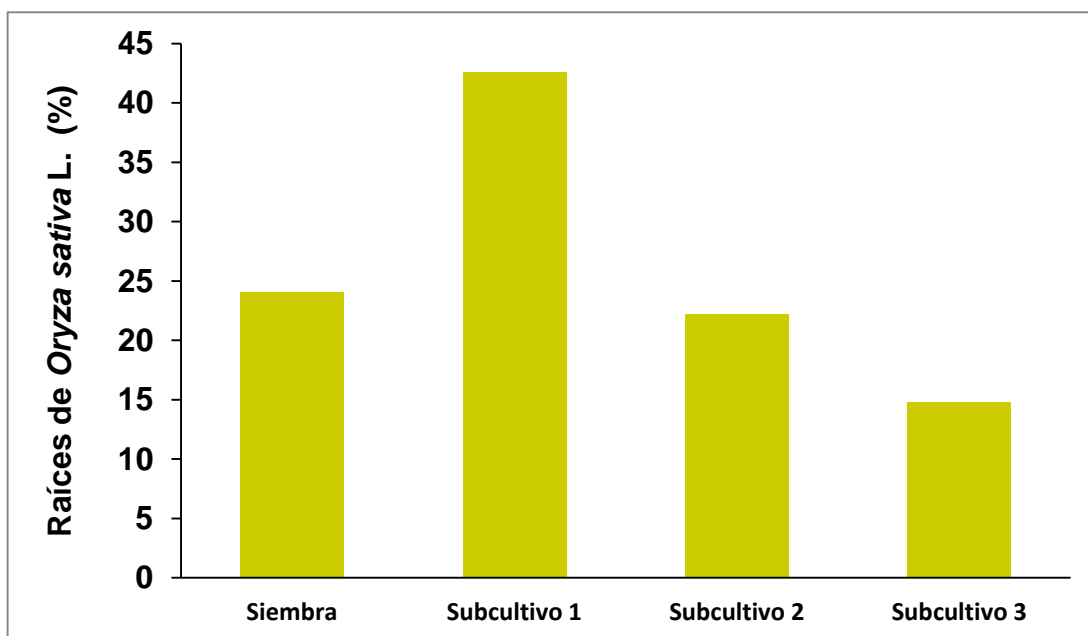
En el medio JMV con un color inicial amarillo-opaco, no se observó viraje del indicador, pero si formación de película (Figura 58). La frecuencia de muestras de raíces de arroz positivas para bacterias fijadoras de nitrógeno fue 18,5% después de la siembra así como 31,5; 24,1 y 22,2% después de tres subcultivos, respectivamente (Figura 59).

La frecuencia de raíces de arroz con bacterias fijadoras de nitrógeno después de tres subcultivos fue de 51,9% en NFb; 42,6% en LGI; 37,0% en JNFb; 14,8% en LGI-P y 22,2% en JMV (Figura 60). En el aislamiento se obtuvieron 91 cultivos puros de bacterias fijadoras de nitrógeno, cuya procedencia correspondió al 30,8% en NFb; 25,3% en LGI; 21,9% en JNFb; 13,2 en JMV y 8,8% en LGI-P (Figura 61).

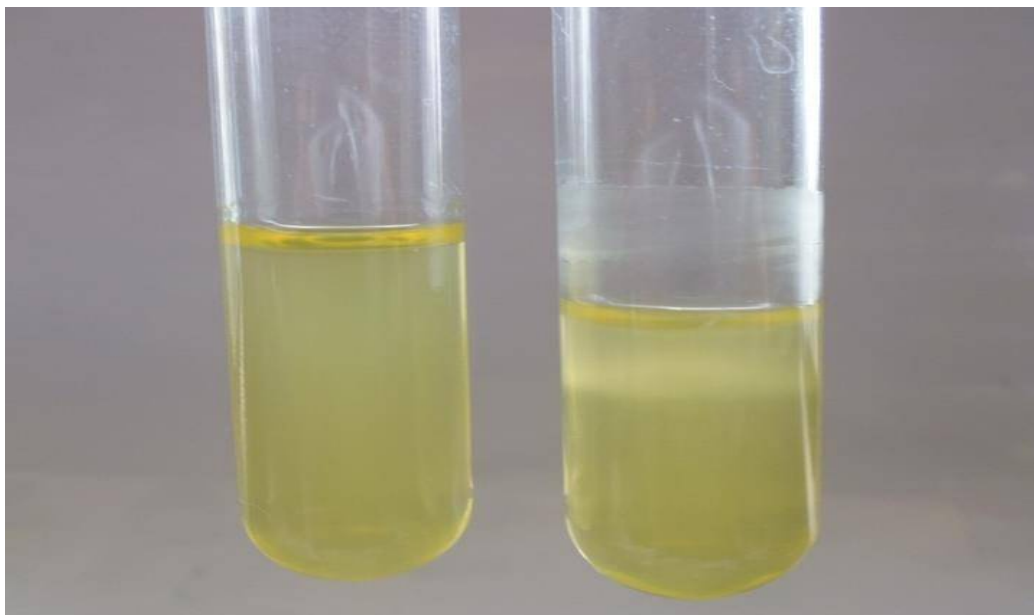
El género *Azospirillum* fue identificado en el 85,7% de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en NFb y en el 56,5% de LGI (Figuras 62,63). *Herbaspirillum* se identificó en el 25,0% de bacterias aisladas en JNFb (Figura 64) y *Burkholderia* en el 25,0% de bacterias aisladas en JMV (Figura 65). *Gluconacetobacter* no se identificó en el medio LGI-P. De esta manera, la frecuencia de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en las muestras de raíces de arroz fue 82,20% para *Azospirillum*; 11,1% para *Herbaspirillum* y 6,7% para *Burkholderia* spp. (Figura 66). A su vez, la frecuencia de las bacterias diazotróficas en las diferentes variedades de arroz fue, para *Azospirillum* 39,22% en Tinajones, 39,22% en IR-43 y 21,56% en Mollares; *Herbaspirillum* 80,0% en Tinajones y 20,0% en Mollares y para *Burkholderia* 100,0% en IR-43 (Figura 67).



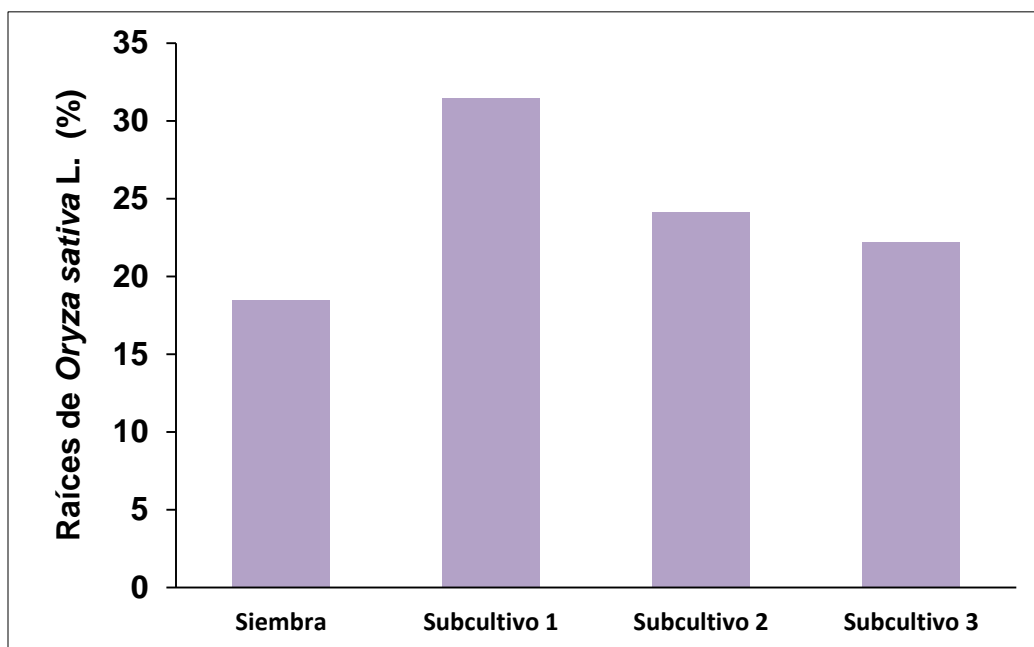
**Figura 56.** Película bacteriana y viraje del indicador por bacterias fijadoras de nitrógeno en medio LGI-P.



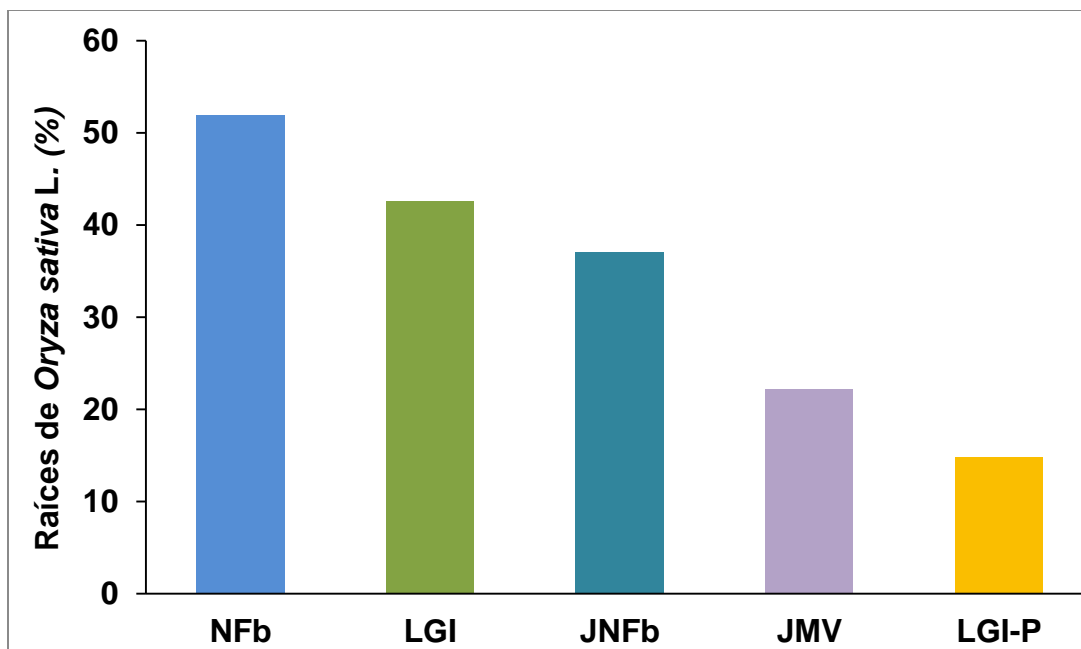
**Figura 57.** Frecuencia de raíces de *Oryza sativa* L. con bacterias fijadoras de nitrógeno, en LGI-P después de la siembra y tres subcultivos, 2014.



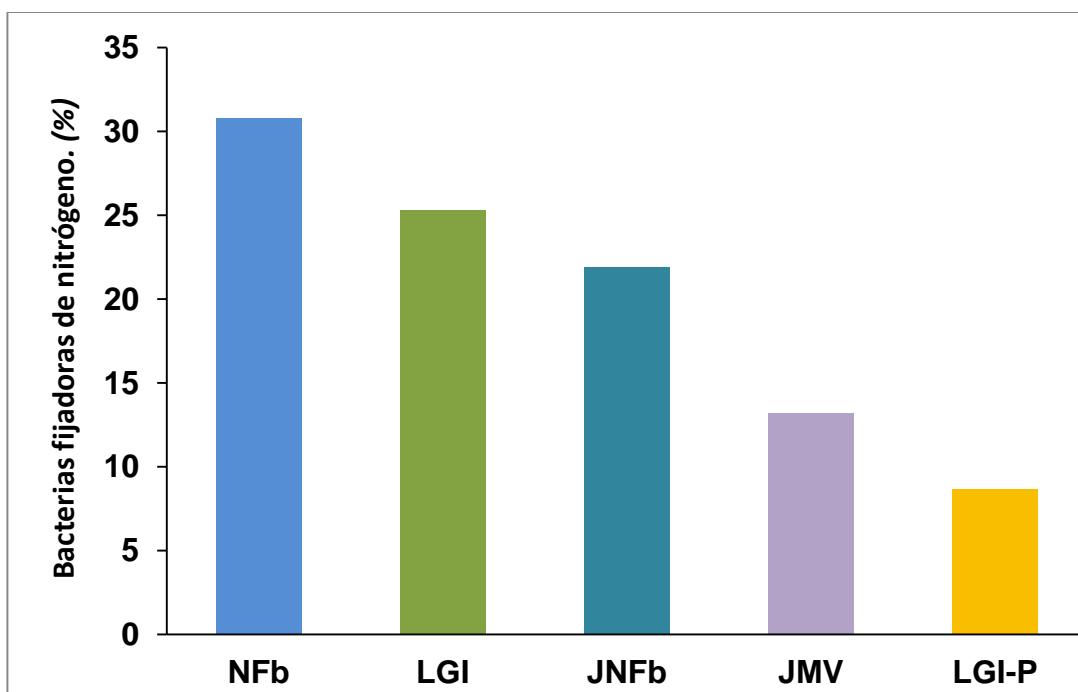
**Figura 58.** Película bacteriana formada por bacterias fijadoras de nitrógeno en medio JMV.



**Figura 59.** Frecuencia de raíces de *Oryza sativa* L. con bacterias fijadoras de nitrógeno, en JMV después de la siembra y tres subcultivos, 2014.

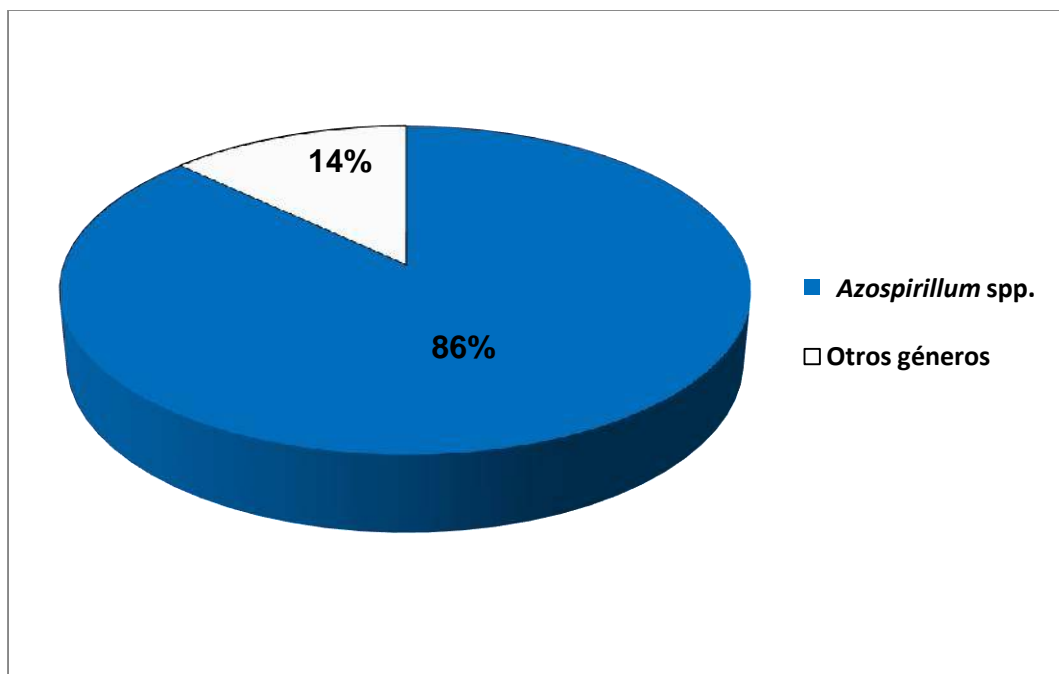


**Figura 60.** Frecuencia de raíces de *Oryza sativa* L. con bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en cinco medios semisólidos después de tres subcultivos.

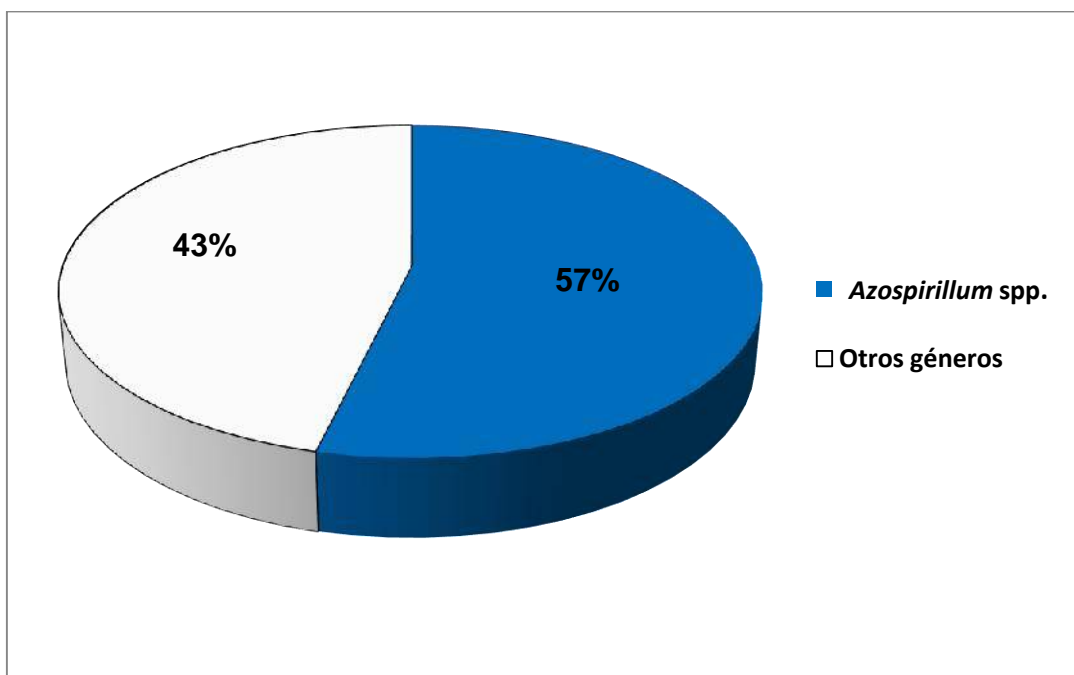


**Figura 61.** Frecuencia de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en medios NFB, LGI, JNFb, JMV, LGI-P.

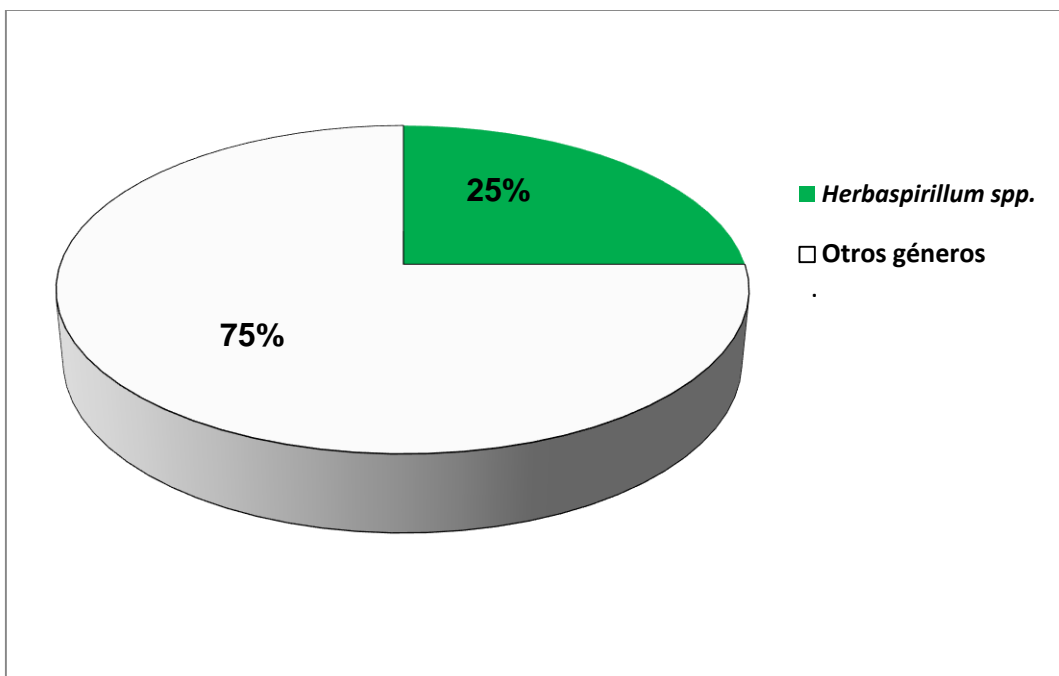




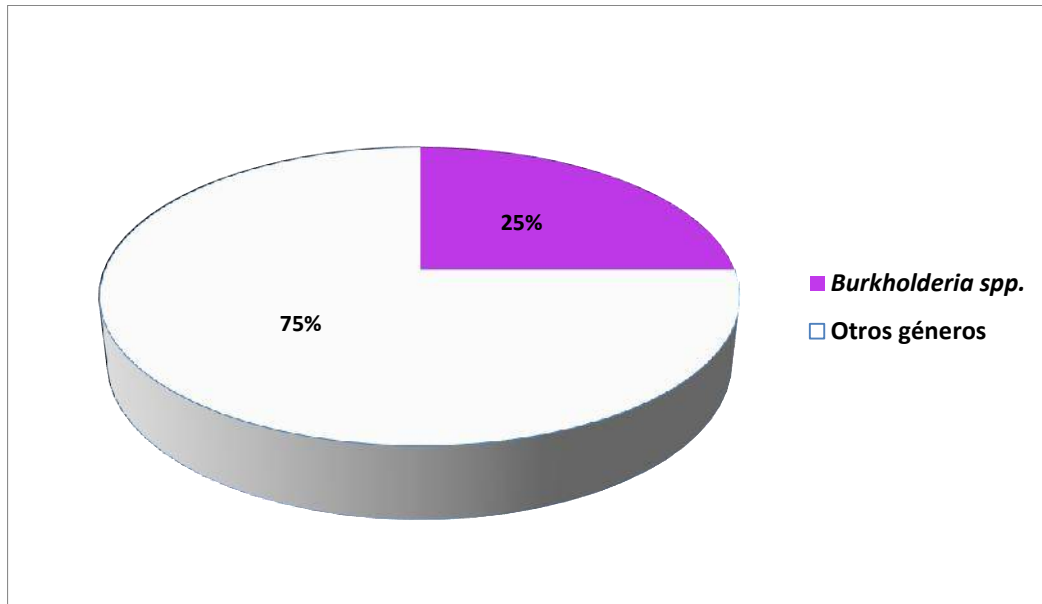
**Figura 62.** Frecuencia de *Azospirillum* spp. en bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en medio NFb.



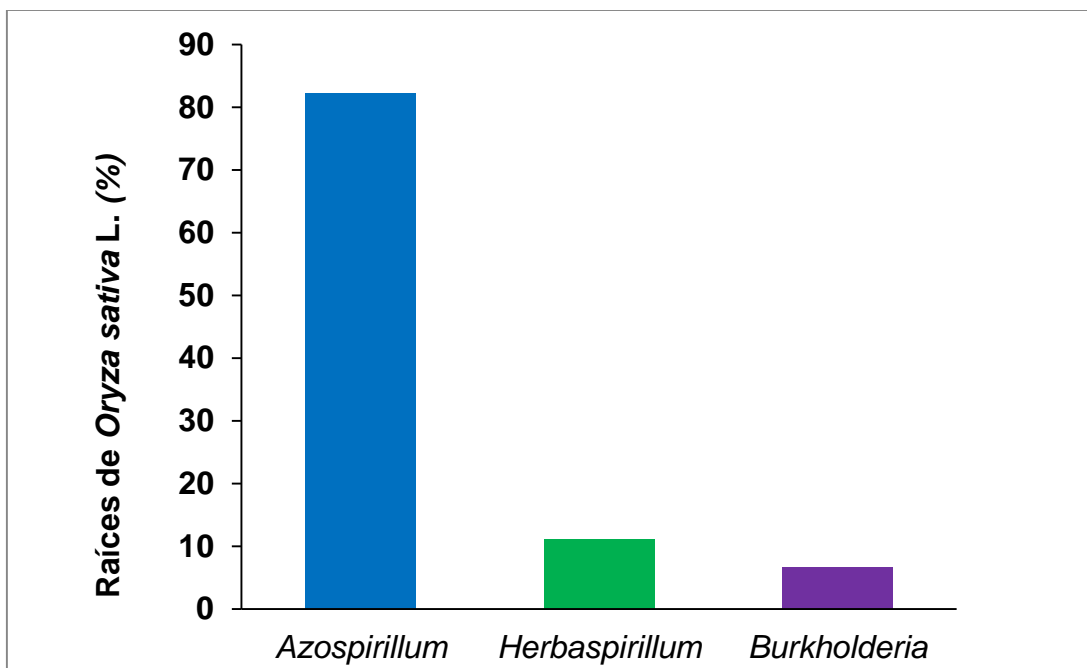
**Figura 63.** Frecuencia de *Azospirillum* spp. en bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en medio LGI.



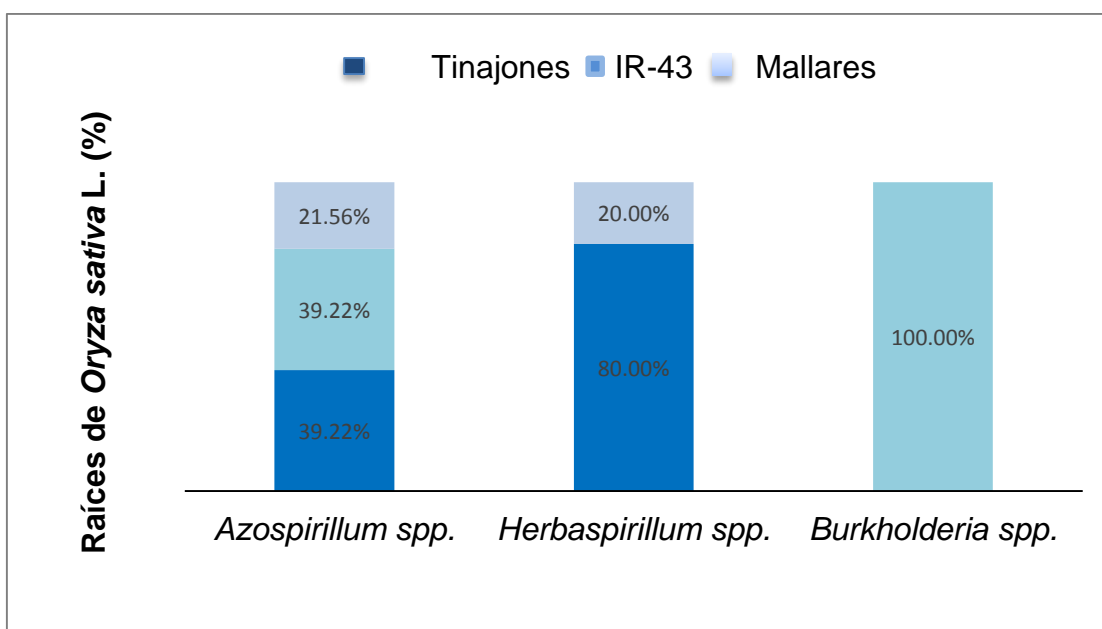
**Figura 64.** Frecuencia de *Herbaspirillum* spp. en bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en medio JNFb.



**Figura 65.** Frecuencia de *Burkholderia* spp. en bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en medio JMV.



**Figura 66.** Frecuencia de *Azospirillum*, *Herbaspirillum* y *Burkholderia* en raíces de *Oryza sativa* L., en Lambayeque, 2014.



**Figura 67.** Frecuencia de bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas en tres variedades de *Oryza sativa* L. en Lambayeque 2014.

## 4.2 Características fenotípicas de bacterias endófitas diazotróficas

Las bacterias de los géneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, y *Burkholderia* se observaron como bacilos pleomórficos, Gram negativos, positivos en las pruebas de catalasa, oxidasa, utilización del ácido málico como fuente de carbono para la fijación de nitrógeno y presencia de gránulos de PHA (Tabla 8, figuras 68 a 71).

Las pruebas mencionadas, junto al requerimiento de biotina, tolerancia a 3% NaCl, hidrólisis de urea y gelatina, reducción de nitratos y utilización de glucosa, manitol y sacarosa como fuentes de carbono para la fijación de nitrógeno, identificaron las especies de *Azospirillum* (Figuras 72 a 77), obteniéndose cinco grupos, correspondientes a *A. brasilense* (37,2%), *A. lipoferum* (21,6%), *A. irakense* (19,6%), *A. halopraeferens* (5,9%), En un grupo no se identificó la especie y se designó *Azospirillum* sp.1 con 15,7%. Los géneros restantes de las bacterias fijadoras de nitrógeno se identificaron por la utilización de la glucosa, manitol y sacarosa como fuentes de carbono para la fijación de nitrógeno, así como por el crecimiento en caldo NFb, hidrólisis de la urea para *Herbaspirillum* (Figura 78); hidrólisis de la urea, gelatina, almidón y reducción de nitratos para *Gluconacetobacter*, hidrólisis de la urea y gelatina, descarboxilación de la lisina y resistencia a 300ug de polimixina B para *Burkholderia* spp. (Figuras 79, 80).

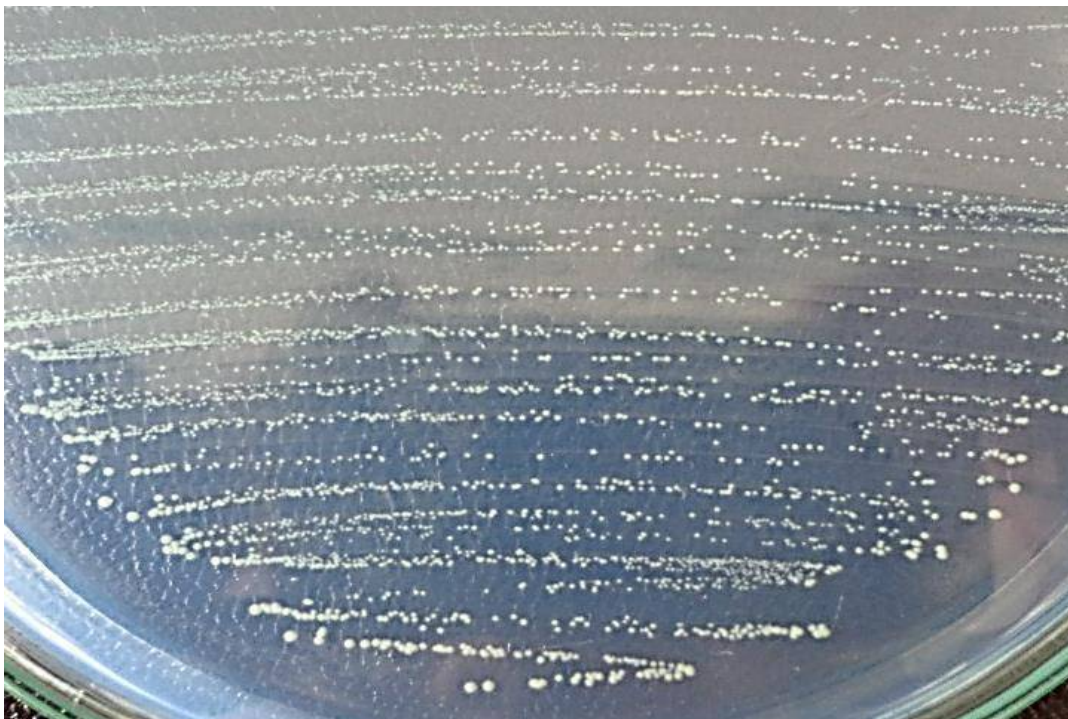
## 4.3 Nitrógeno fijado como amonio por bacterias endófitas nativas

Todas las bacterias endófitas, fijaron nitrógeno *in vitro*, observándose una coloración azul en la cuantificación (Figura 81). Los valores de la concentración de amonio de las bacterias endófitas diazotróficas (Figura 82) no presentaron distribución normal, por lo que se analizaron con la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis (Anexo 5). La concentración de amonio de *Azospirillum* spp. fue 10,39-32,44ppm, correspondiendo el mayor valor a *A. irakense* NT5 (Tablas 9, 10).

**Tabla 8.** Características macroscópicas de colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de *Oryza sativa* L., en Lambayeque, 2014

Características	<i>Azospirillum</i> NFB	<i>Azospirillum</i> LGI	<i>Herbaspirillum</i> JNFb	<i>Gluconacetobacter</i> LGI-P	<i>Burkholderia</i> JMV
Tamaño	Mediano	Mediano	Mediano	Mediano	Grande
Forma	Circular, irregular	Circular, irregular	Circular	Circular	Irregular
Bordes	Enteros	Enteros	Enteros	Enteros	Enteros
Elevación	Convexas	Convexas	Convexas	Convexas	Convexas
Centro	No diferenciado	No diferenciado	Diferenciado, celeste	Diferenciado, anaranjado	Diferenciado, amarillo intenso
Aspecto	Opacas, brillantes	Opacas, brillantes	Brillantes	Brillantes	Brillantes mucosas
Color	Blancas, azules	Blancas, cremosas	Celestes	Amarillas, anaranjadas	Amarillas



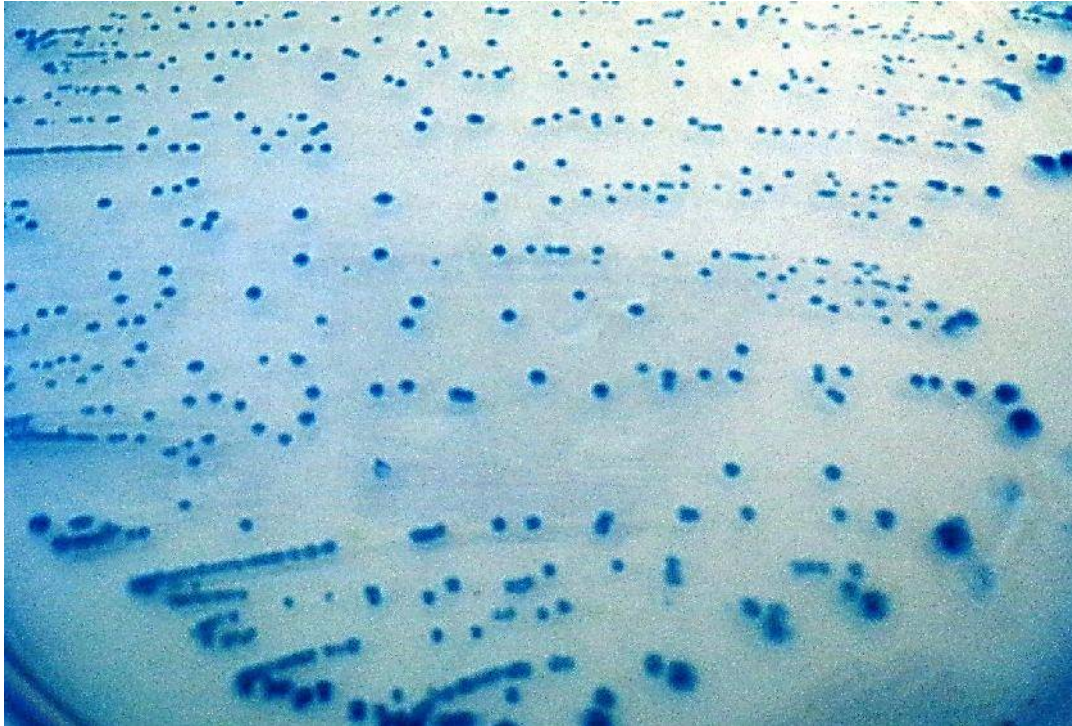


**Figura 68.** Observación macroscópica de colonias de *Azospirillum* spp. en medio NFB sólido.

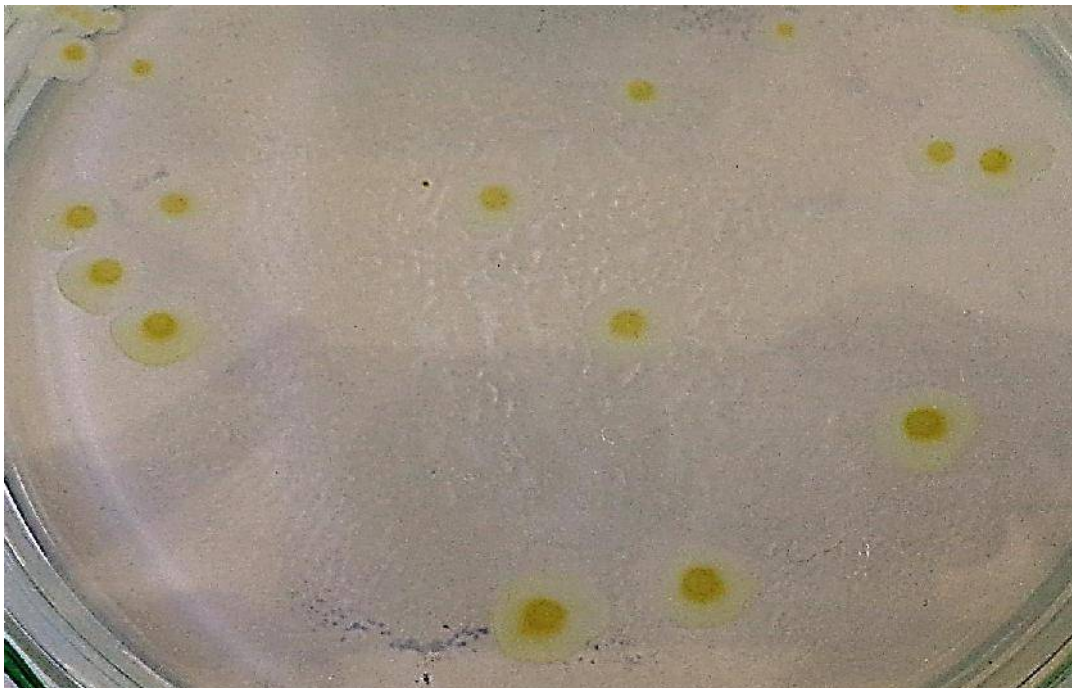


**Figura 69.** Observación macroscópica de colonias de *Azospirillum* spp. en medio LGI sólido.

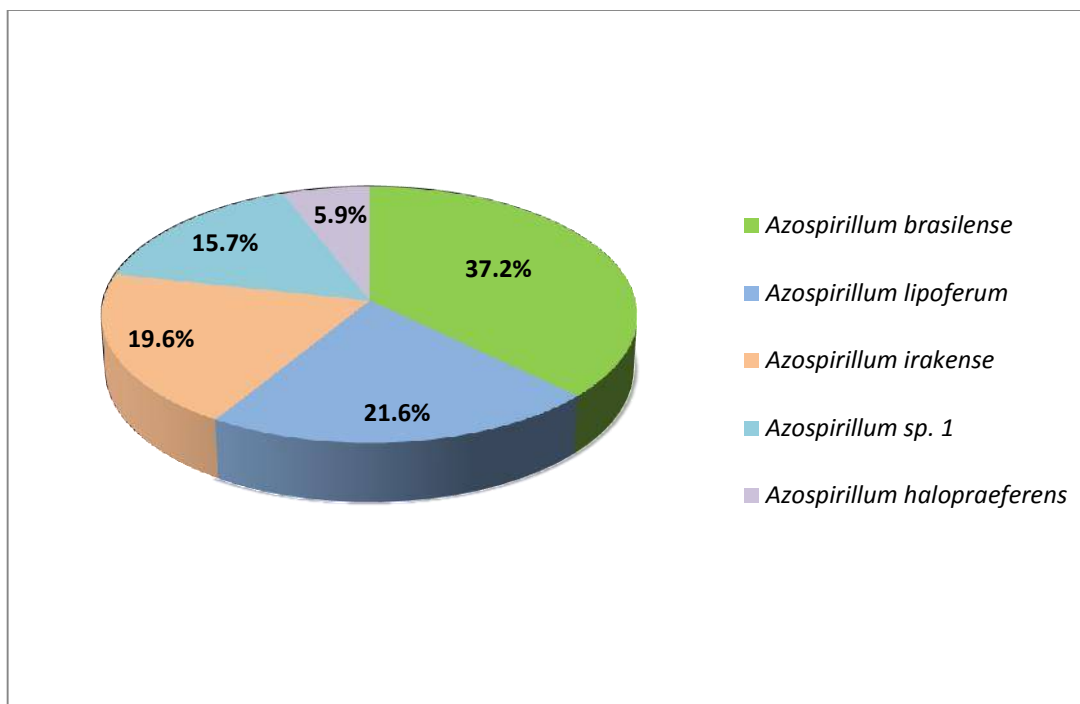




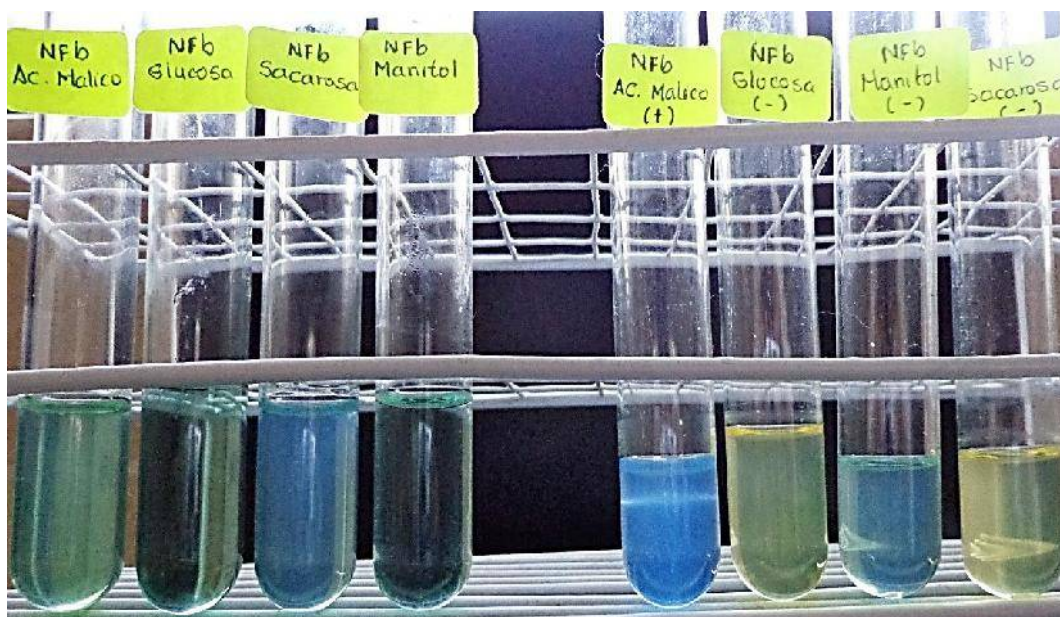
**Figura 70.** Observación macroscópica de colonias de *Herbaspirillum* spp. en medio JNFb sólido.



**Figura 71.** Observación macroscópica de colonias de *Burkholderia* spp. en medio JMV sólido.

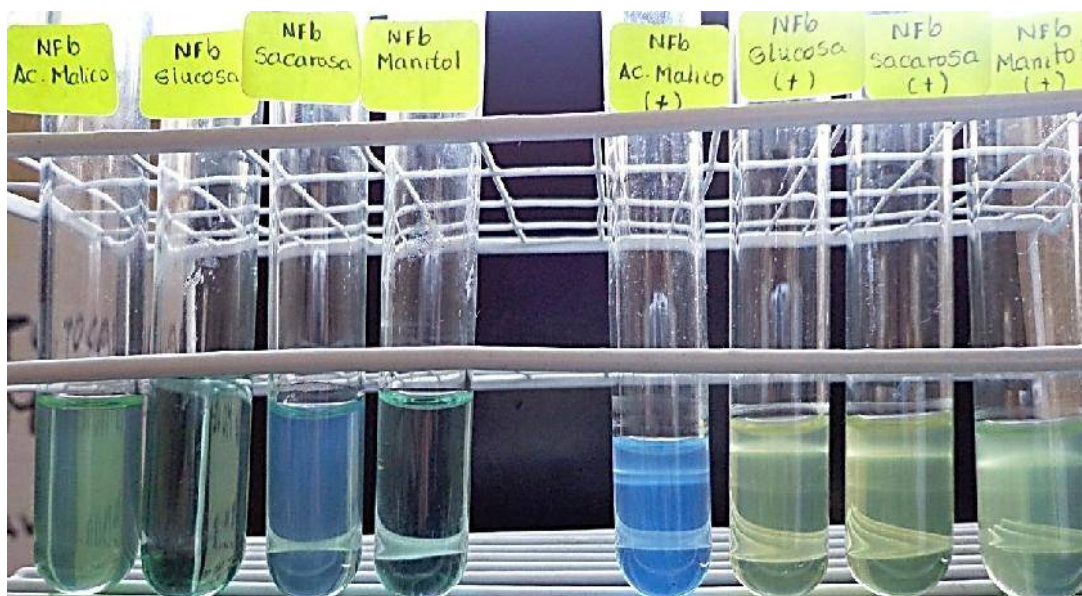


**Figura 72.** Frecuencia de especies de *Azospirillum* identificadas en raíces de *Oryza sativa* L., en Lambayeque, 2014.

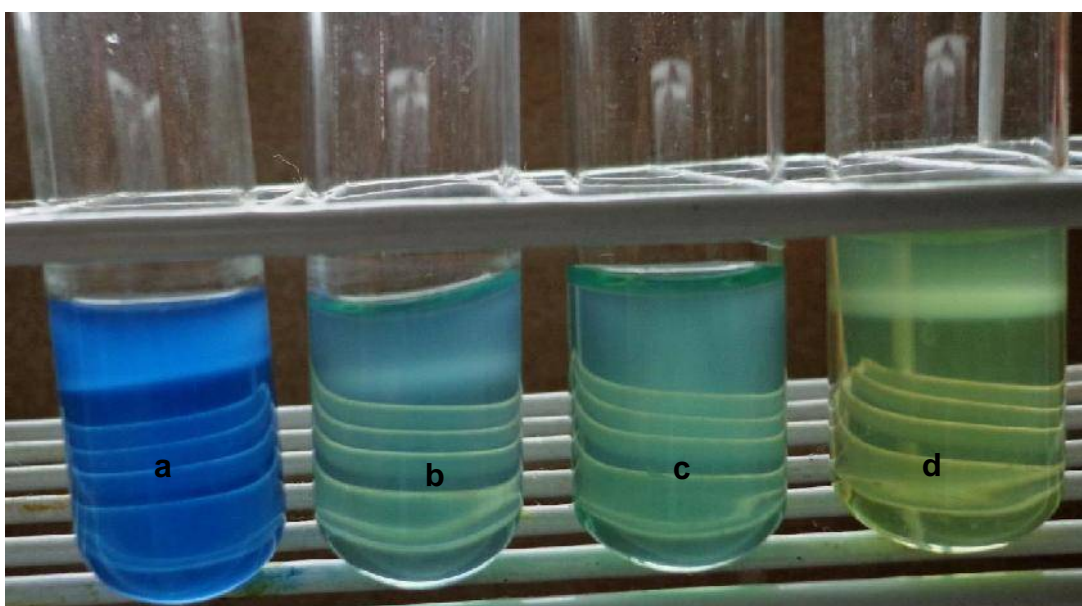


**Figura 73.** Película blanquecina y viraje del indicador por *Azospirillum brasilense* fijadoras de nitrógeno en medio NFb semisólido con ácido málico, glucosa, manitol y sacarosa.

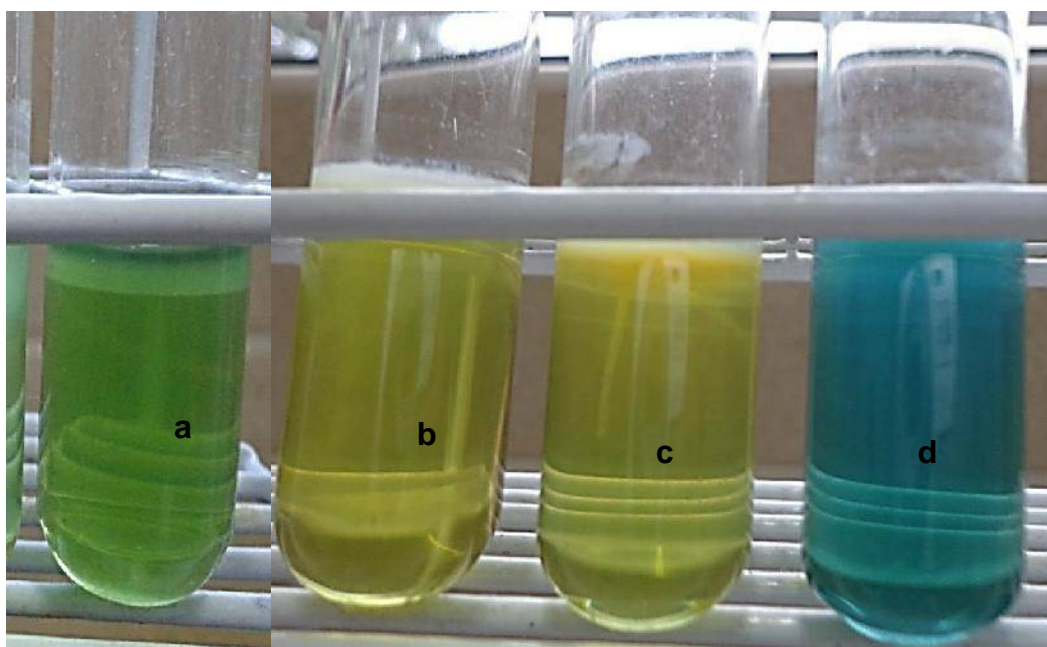




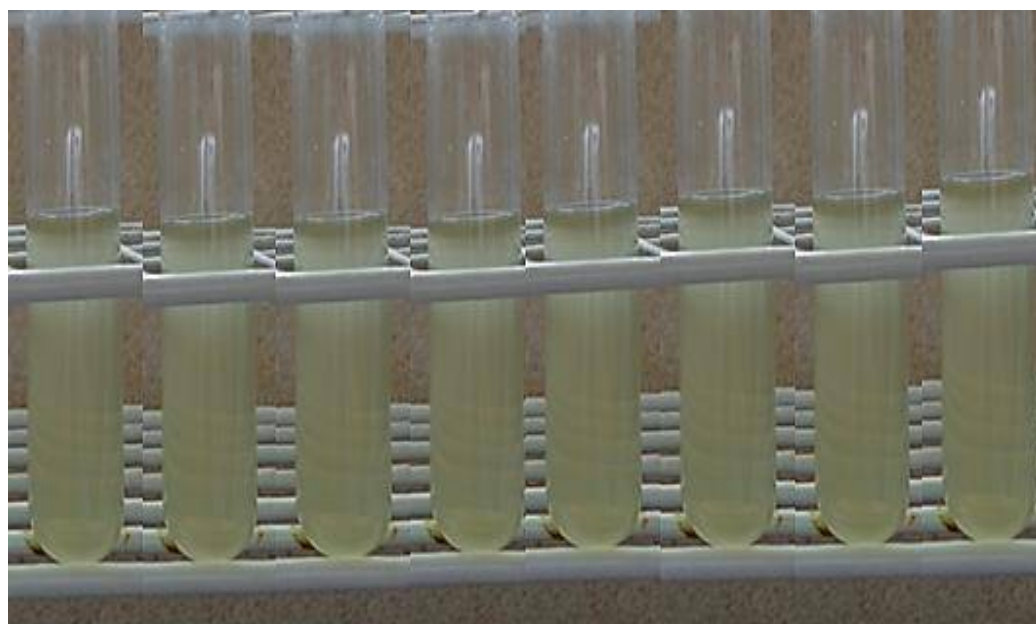
**Figura 74.** Película blanquecina y viraje del indicador por *Azospirillum lipoferum* fijadoras de nitrógeno en medio Nfb semisólido con ácido málico, glucosa, manitol y sacarosa.



**Figura 75.** Película blanquecina y viraje del indicador por *Azospirillum irakense* fijadoras de nitrógeno en medio Nfb semisólido con ácido málico (a), glucosa (b), manitol (c), sacarosa (d).



**Figura 76.** Película blanquecina y viraje del indicador por *Azospirillum halopraeferens* fijadoras de nitrógeno en medio LGI semisólido con ácido málico (a), glucosa (b), manitol (c) y sacarosa (d).

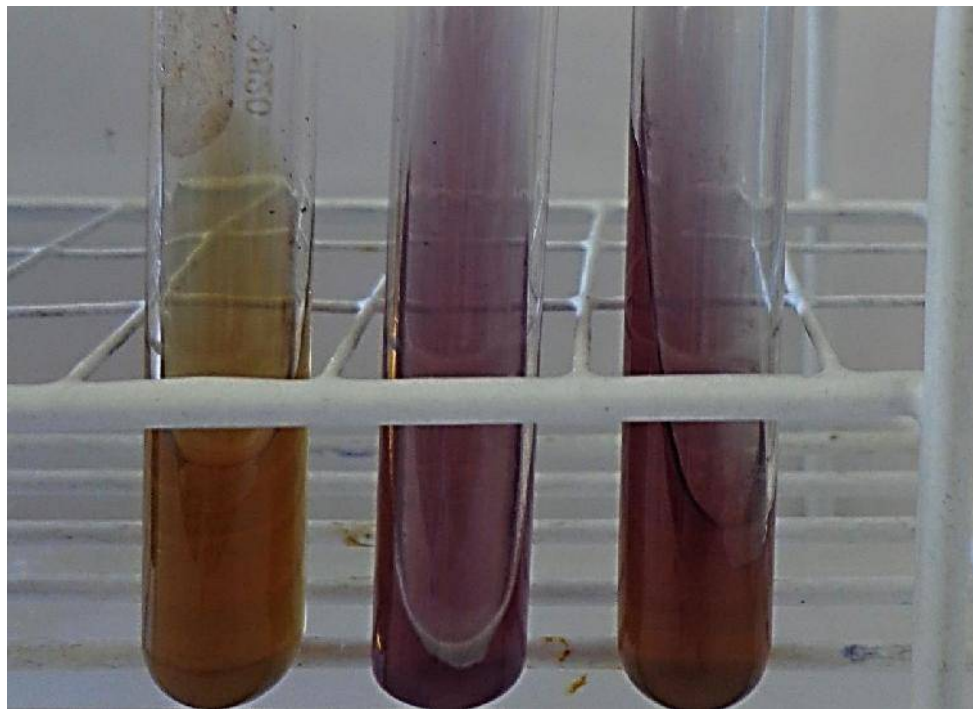


**Figura 77.** Crecimiento de *Azospirillum* spp. nativas en caldo con cloruro de sodio.

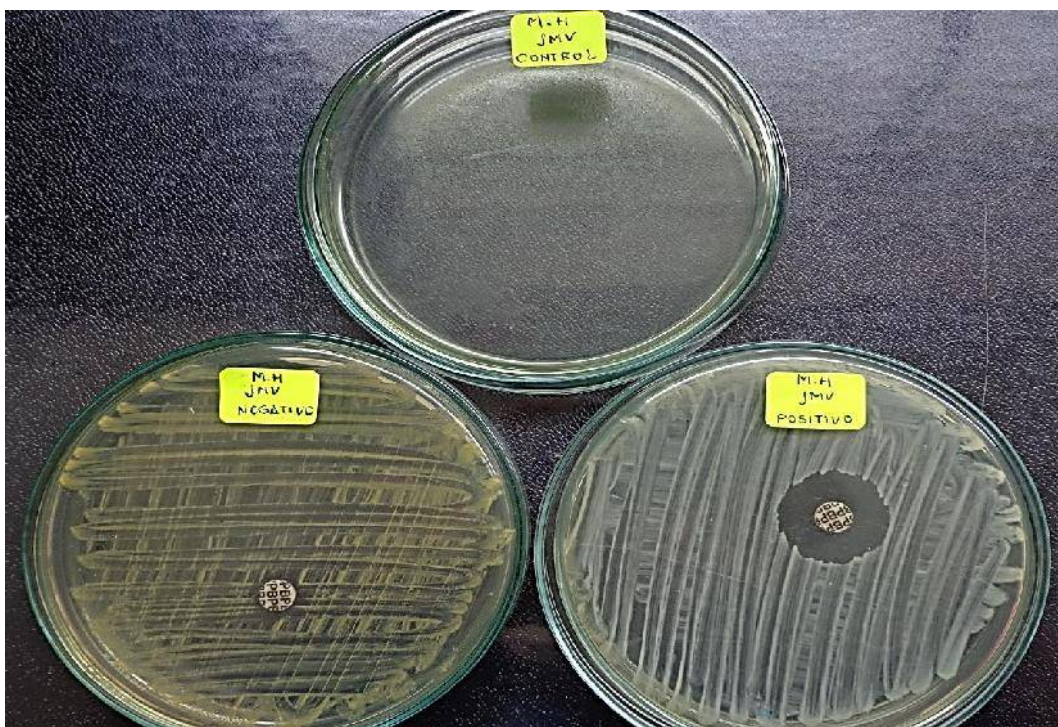




**Figura 78.** Prueba de hidrólisis de la urea por *Herbaspirillum* sp.



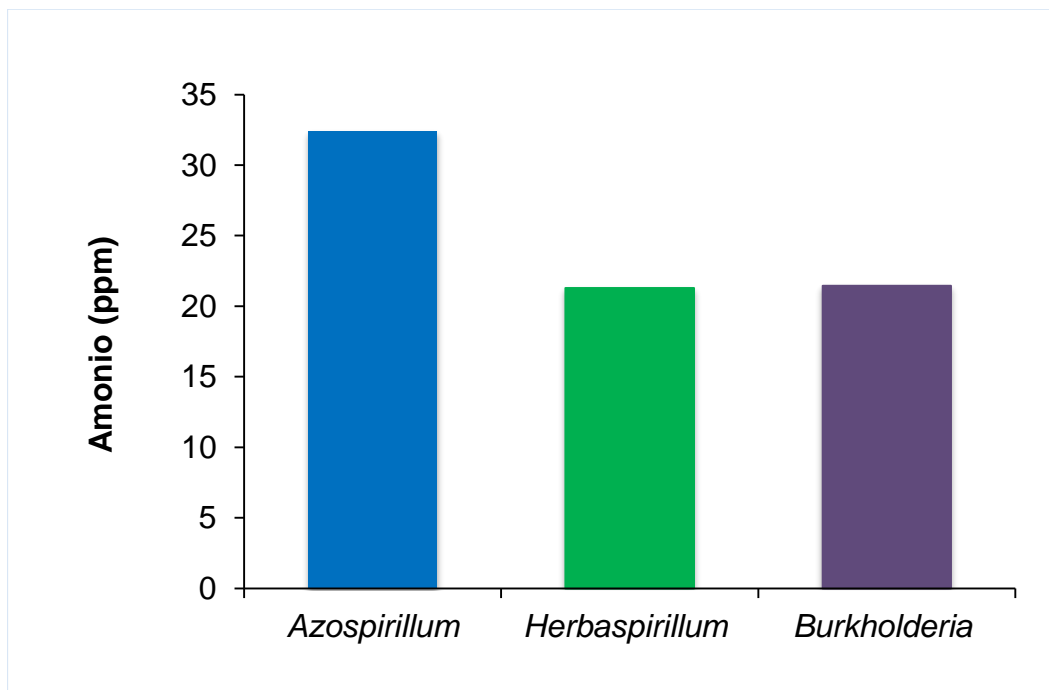
**Figura 79.** Prueba de descarboxilación de lisina por *Burkholderia* sp.



**Figura 80.** Resistencia de *Burkholderia* sp. a la polimixina B.



**Figura 81.** Coloración observada en la cuantificación del nitrógeno fijado como amonio.



**Figura 82.** Valores máximos (ppm) de nitrógeno fijado como amonio por bacterias endófitas diazotróficas aisladas de raíces de *Oryza sativa* L., en Lambayeque, 2014.

**Tabla 9.** Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por *Azospirillum* spp. nativas en caldo extracto de suelo durante 7 días

<i>Azospirillum</i> spp.	Absorbancia corregida *	N (ppm)	<i>Azospirillum</i> spp.	Absorbancia corregida *	N (ppm)
<i>A. irakense</i> NT5	1,803	32,44	<i>Azospirillum</i> sp.1 LT20	0,979	17,30
<i>A. lipoferum</i> NI43	1,779	31,99	<i>A. brasilense</i> LI43	0,965	17,02
<i>A. irakense</i> NT3	1,703	30,59	<i>A. brasilense</i> LT1	0,934	16,46
<i>A. brasilense</i> NT16	1,686	30,29	<i>A. brasilense</i> NM32	0,915	16,11
<i>A. brasilense</i> NM21	1,625	29,16	<i>A. brasilense</i> NI36	0,913	16,07
<i>A. brasilense</i> NM25	1,570	28,16	<i>A. brasilense</i> NI37	0,910	16,02
<i>A. brasilense</i> NI47	1,555	27,88	<i>A. brasilense</i> NI40	0,909	16,00
<i>A. irakense</i> NT7	1,486	26,60	<i>A. brasilense</i> LT2	0,905	15,92
<i>A. halopraeferens</i> LI37	1,478	26,45	<i>A. brasilense</i> NI49	0,903	15,89
<i>A. brasilense</i> NI41	1,445	25,85	<i>A. brasilense</i> LM29	0,889	15,63
<i>A. halopraeferens</i> LM30	1,416	25,31	<i>A. brasilense</i> NI50	0,886	15,57
<i>A. lipoferum</i> NM27	1,401	25,04	<i>A. brasilense</i> LI38	0,871	15,31
<i>A. halopraeferens</i> LM32	1,175	20,89	<i>Azospirillum</i> sp.1 LT16	0,843	14,79
<i>A. lipoferum</i> NT9	1,144	20,32	<i>Azospirillum</i> sp.1 LI48	0,775	13,54
<i>A. brasilense</i> LI39	1,142	20,28	<i>A. brasilense</i> NT11	0,763	13,31
<i>A. brasilense</i> LI42	1,128	20,03	<i>A. brasilense</i> NI42	0,745	12,98
<i>A. brasilense</i> LI46	1,117	19,82	<i>A. irakense</i> NT4	0,740	12,89
<i>A. brasilense</i> LT13	1,101	19,53	<i>A. lipoferum</i> NI39	0,715	12,43
<i>A. irakense</i> LT9	1,087	19,26	<i>A. lipoferum</i> NT2	0,709	12,33
<i>A. irakense</i> LT19	1,078	19,11	<i>A. irakense</i> NT8	0,706	12,26
<i>A. irakense</i> LT8	1,055	18,69	<i>A. lipoferum</i> NI51	0,705	12,25
<i>A. lipoferum</i> NM23	1,047	18,54	<i>A. lipoferum</i> NM30	0,705	12,25
<i>A. lipoferum</i> LM27	1,036	18,33	<i>A. irakense</i> NT15	0,687	11,92
<i>A. lipoferum</i> LI47	1,017	17,98	<i>Azospirillum</i> sp.1 LI53	0,652	11,27
<i>A. lipoferum</i> LM31	1,002	17,71	<i>A. irakense</i> NT17	0,604	10,39
<i>A. brasilense</i> LT6	0,988	17,46			

\*Absorbancia control=0,214

Promedio de tres repeticiones

**Tabla 10.** Prueba de Kruskal- Wallis del nitrógeno fijado como amonio por *Azospirillum* spp. aisladas de raíces de *Oryza sativa* L.

<i>Azospirillum</i> sp.	Amonio (ppm)	Significancia ( $\alpha=0,05$ )
<i>A. irakense</i> NT5	32,44	a
<i>A. lipoferum</i> NI43	31,99	a b
<i>A. irakense</i> NT3	30,59	a b c
<i>A. brasilense</i> NT16	30,29	a b c d
<i>A. brasilense</i> NM21	29,16	a b c d
<i>A. brasilense</i> NM25	28,16	a b c d
<i>A. brasilense</i> NI47	27,88	a b c d
<i>A. irakense</i> NT7	26,60	a b c d e
<i>A. halopraeferens</i> LI37	26,45	a b c d e f
<i>A. brasilense</i> NI41	25,85	a b c d e f g
<i>A. halopraeferens</i> LM30	25,31	a b c d e f g h
<i>A. lipoferum</i> NM27	25,04	a b c d e f g h i
<i>A. halopraeferens</i> LM32	20,89	a b c d e f g h i j
<i>A. lipoferum</i> NT9	20,32	a b c d e f g h i j
<i>A. brasilense</i> LI39	20,28	a b c d e f g h i j k
<i>A. brasilense</i> LI42	20,03	a b c d e f g h i j k
<i>A. brasien</i> LI46	19,82	a b c d e f g h i j k l
<i>A. brasilense</i> LT13	19,53	a b c d e f g h i j k l m
<i>A. irakense</i> LT9	19,26	a b c d e f g h i j k l m n
<i>A. irakense</i> LT19	19,11	a b c d e f g h i j k l m n
<i>A. irakense</i> LT8	18,69	a b c d e f g h i j k l m n o
<i>A. lipoferum</i> NM23	18,54	a b c d e f g h i j k l m n o
<i>A. lipoferum</i> LM27	18,33	a b c d e f g h i j k l m n o p
<i>A. lipoferum</i> LI47	17,98	a b c d e f g h i j k l m n o p q
<i>A. lipoferum</i> LM31	17,71	b c d e f g h i j k l m n o p q
<i>Azospirillum</i> sp.1 LT20	17,30	c d e f g h i j k l m n o p q r s
<i>A. brasilense</i> LI43	17,02	d e f g h i j k l m n o p q r s t
<i>A. brasilense</i> LT1	16,46	e f g h i j k l m n o p q r s t
<i>A. brasilense</i> NM32	16,11	e f g h i j k l m n o p q r s t
<i>A. brasilense</i> NI36	16,07	f g h i j k l m n o p q r s t
<i>A. brasilense</i> NI37	16,02	f g h i j k l m n o p q r s t
<i>A. brasilense</i> NI40	15,99	f g h i j k l m n o p q r s t
<i>A. brasilense</i> LT2	15,92	g h i j k l m n o p q r s t
<i>A. brasilense</i> NI49	15,89	h i j k l m n o p q r s t
<i>A. brasilense</i> LM29	15,63	i j k l m n o p q r s t



<b><i>Azospirillum</i> spp.</b>	<b>Amonio (ppm)</b>	<b>significancia (<math>\alpha=0,05</math>)</b>
<i>A. brasilense</i> NI50	15,57	j k l m n o p q r s t
<i>A. brasilense</i> LI38	15,31	k l m n o p q r s t
<i>Azospirillum</i> sp.1 LT16	14,79	k l m n o p q r s t
<i>Azospirillum</i> sp.1 LI48	13,54	l m n o p q r s t
<i>A. brasilense</i> NT11	13,31	m n o p q r s t
<i>A. brasilense</i> NI42	12,98	n o p q r s t
<i>A. irakense</i> NT4	12,89	n o p q r s t
<i>A. lipoferum</i> NI39	12,43	o p q r s t
<i>A. lipoferum</i> NT2	12,33	p q r s t
<i>A. irakense</i> NT8	12,26	q r s t
<i>A. lipoferum</i> NM30	12,25	q r s t
<i>A. lipoferum</i> NI51	12,25	q r s t
<i>A. irakense</i> NT15	11,92	r s t
<i>Azospirillum</i> sp.1 LI53	11,27	s t
<i>A. irakense</i> NT17	10,39	t

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

La concentración de amonio de *Herbaspirillum* spp. fue 9,38 - 21,29ppm. El mayor valor fue de *Herbaspirillum* sp.JNM29, no diferenciándose significativamente de *Herbaspirillum* sp. JNT9 y JNT6 (Tablas 11,12). Por su parte *Burkholderia* spp. alcanzó 13,53-21,46ppm de amonio, siendo el mayor valor de *Burkholderia* sp.VI46, sin diferencias significativas con *Burkholderia* sp. VI43 y VI48 (Tablas 13,14).

#### **4.4 Gen *nifH* identificado en bacterias endófitas diazotróficas aisladas de arroz**

En *Azospirillum irakense* NT5, *Herbaspirillum* sp.JNM29 y *Burkholderia* sp.VI46, se identificó el gen *nifH*, obteniéndose un producto de 360 pares de bases en la corrida electroforética en gel de agarosa.

**Tabla 11.** Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por *Herbaspirillum* spp. nativas en caldo extracto de suelo durante 7 días

<i>Herbaspirillum</i> sp.	Absorbancia corregida*	N (ppm)
JNM29	1,197	21,292
JNT9	1,090	19,325
JNT6	0,709	12,316
JNT4	0,609	10,483
JNT16	0,549	9,374

Absorbancia control=0.214

\*Promedio de tres repeticiones

**Tabla 12.** Prueba de Kruskal- Wallis del nitrógeno fijado como amonio por *Herbaspirillum* spp. aisladas de raíces de *Oryza sativa* L.

<i>Herbaspirillum</i> sp.	Amonio (ppm)	Significancia ( $\alpha= 0,05$ )
JNM29	21,292	a
JNT9	19,325	a b
JNT6	12,316	a b c
JNT4	10,483	b c
JNT16	9,374	c

**Tabla 13.** Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por *Burkholderia* spp. nativas en caldo extracto de suelo durante 7 días

<i>Burkholderia</i> sp.	Absorbancia corregida	N (ppm)
VI46	1,206	21,458
VI43	0,824	14,442
VI48	0,775	13,535

**Tabla 14.** Prueba de Kruskal- Wallis del nitrógeno fijado como amonio por *Burkholderia* spp. aisladas de raíces de *Oryza sativa* L.

<i>Burkholderia</i> sp.	N (ppm)	Significancia ( $\alpha= 0,05$ )
VI46	21,458	a
VI43	14,442	a
VI48	13,535	a

## V. DISCUSIÓN

Las bacterias fijadoras de nitrógeno o diazotróficas pueden ser de vida libre, asociativa y simbiótica. Las asociativas colonizan la parte externa e interna de la raíz, como endófitas facultativas y obligadas. Las endófitas facultativas colonizan tanto el suelo rizosférico como el interior de la raíz, siendo el género *Azospirillum* el representante de este grupo. A su vez, las endófitas obligadas colonizan el interior de las raíces, incluyendo especies de *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* y *Burkholderia* (Garrido, 2007). En este contexto, para aislar bacterias diazotróficas asociativas se colectaron muestras de raíces de cultivos de arroz, por cuanto estas bacterias se asocian frecuentemente con las Poaceas incluyendo pastos de zonas tropicales, templadas, áridas y gramíneas cultivados (Loredo *et al.*, 2004)

Para el aislamiento de bacterias endófitas, las raíces fueron desinfectadas superficialmente para descartar los microorganismos rizosféricos y otros que se encuentran en el rizoplaneo (Rives *et al.*, 2007), coincidiendo con Pérez *et al.* (2009) y Mollo *et al.* (2012). El término endófito hace referencia a los microorganismos que pueden ser aislados de plantas, cuyos tejidos fueron esterilizados superficialmente y que no causan enfermedad visible en la planta hospedera (Hallmann *et al.*, 1997, mencionados por Mano & Morisaki, 2008). La desinfección de los tejidos posibilita el aislamiento y la determinación de la densidad de las bacterias endófitas cultivables (Pérez *et al.*, 2010; Marra *et al.*, 2012).



El macerado de raíces de arroz previamente desinfectados fue sembrado en medios semisólidos sin nitrógeno para visualizar bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas. De igual manera Koomnok *et al.* (2007), Jha *et al.* (2009), Punschke & Mayans (2011) y Ramírez & Ugaz (2014) utilizaron los medios NFb, LGI, JMV, LGI-P y JNFb para enriquecer bacterias diazotróficas. Entre los compuestos de estos medios se encuentran el hierro y el molibdeno; cofactores del complejo enzimático nitrogenasa, que consiste de dos metaloproteínas denominadas dinitrogenasa o compuesto I y dinitrogenasa reductasa o compuesto II. Ambas tienen hierro y la dinitrogenasa tiene también molibdeno. En la dinitrogenasa, el hierro y molibdeno forman parte del centro FeMoCo, donde ocurre la reducción de nitrógeno (Lara *et al.*, 2007).

Los medios semisólidos sin nitrógeno presentaron como fuentes de carbono ácido málico (NFb, JNFb), sacarosa (LGI, LGI-P) y manitol (JMV), tomando en cuenta que la fijación de nitrógeno es un proceso reductivo y el carbono es utilizado directamente por las bacterias como fuente de carbono y donadores de electrones (Coyne, 2000).

Las bacterias diazotróficas microaerófilas fueron reconocidas por una película blanquecina, formada bajo la superficie del medio semisólido, donde la consistencia semisólida favorece el crecimiento y desplazamiento de las bacterias hacia el lugar, en el que la tasa de respiración está en equilibrio con la tasa de difusión del oxígeno y se mantiene la microaerofilia, requerida para la actividad de la nitrogenasa (Garrido 2007; Franco, 2008). Al respecto, Komnok *et al.* (2007) informaron que en muestras de arroz, la película bacteriana se observó varios mm bajo la superficie del medio, después de 4-10 días de incubación y en la superficie después de 10 o más días, evidenciándose la condición de las bacterias de microaerófilas facultativas.

El movimiento de bacterias aerobias como *Azospirillum* es una respuesta a una gradiente de oxígeno, formando una banda nítida en una gradiente de 3-5uM de oxígeno. La concentración de oxígeno preferida por la aerotaxis es similar a la concentración que favorece la diazotrofia. En este sentido, la aerotaxis representa

una respuesta ambiental adaptativa importante que sirve de guía a las bacterias diazotróficas no simbióticas hacia las condiciones de microaerofilia (Loredo *et al.*, 2004).

En los medios semisólidos, además de la película bacteriana se observó viraje del indicador. Mantilla (2007) y García & Muñoz (2010) explican el viraje del indicador en el medio NFb como consecuencia de la actividad metabólica de la película bacteriana, con utilización del ácido málico. A su vez, Sánchez (2008) observó viraje del indicador al azul, cuando el medio semisólido era verde y a verde, cuando era amarillo, lo que indicó un cambio de pH por actividad de las bacterias fijadoras de nitrógeno.

Para tener la certeza de obtener bacterias fijadoras de nitrógeno se realizaron tres subcultivos en medios semisólidos sin nitrógeno, por cuanto estos medios son semiselectivos y contienen trazas de nitrógeno que posibilitan el crecimiento de organismos que utilizan el nitrógeno combinado. Los subcultivos sucesivos evitan el crecimiento de saprófitos, minimizando los falsos positivos (Menezes, 2009), es decir bacterias que son aisladas de películas superficiales, pero que no demuestran la diazotrofia en pruebas como la reducción de acetileno (Komnok *et al.*, 2007). De esta manera, la frecuencia de muestras de raíces de arroz positivas para bacterias fijadoras de nitrógeno fue disminuyendo desde 70,4% en NFb a la siembra, hasta 51,9% después del tercer subcultivo.

El género *Azospirillum* fue identificado en el 82% de raíces de arroz sembradas en NFb y LGI, superando 55,7% reportado por García & Muñoz (2010) para raíces de arroz sembradas en NFb. En Lambayeque, estas bacterias fueron reportadas en 43,48% de muestras de raíces de maíz (Muñoz & Vásquez, 2012) y 33% de muestras de tomate (Baiocchi & Saavedra, 2011). La superioridad es explicada porque en el presente estudio las bacterias se aislaron de raíces desinfectadas en un proceso de aproximadamente 45 minutos, a diferencia de los 5 minutos de desinfección en hipoclorito de sodio correspondiente a García & Muñoz (2010), Baiocchi & Saavedra (2011) y Muñoz & Vásquez (2012).

En la presente investigación, *Azospirillum* fue aislado de raíces de arroz en los medios NFb y LGI. El NFb con ácido málico como fuente de carbono se usa para *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. irakense* y *A. halopraeferens*. A su vez, el medio LGI es similar al NFb, con la diferencia que la fuente de carbono sacarosa y el pH más ácido (6,0-6,2) son factores selectivos para aislar *A. amazonense*. Las especies de *Azospirillum* también han sido reportadas en pastos (Garrido, 2007), maíz (Mehnaz *et al.*, 2007), cereales forrajeros (Moreira, 2010), tomate (Baiocchi & Saavedra, 2011) y sorgo (Díaz *et al.*, 2012).

El género *Herbaspirillum* fue identificado en el 11% de raíces de arroz sembradas en JNFb, coincidiendo con Baldani *et al.* (2000). El ácido málico como fuente de carbono, el pH 5,8 y una concentración de azul de bromotimol tres veces mayor favorecen el desarrollo de colonias características, con la región central azul (Punschke & Mayans, 2011). *Herbaspirillum* también ha sido reportado en *Musa* spp. (Weber *et al.*, 2000), *Pennisetum purpureum* (Kirchof *et al.*, 2001), *Phaseolus vulgaris* (Valverde *et al.*, 2003), *Triticum* sp. (Rothballer *et al.*, 2006) y *Allium victorialis* (Jung *et al.*, 2007). Según Moreira *et al.* (2010). Las especies de *Herbaspirillum* son menos frecuentes que las demás diazotróficas conocidas, porque son endófitas obligadas y su sobrevivencia es mínima sin el hospedero.

El género *Burkholderia* fue aislado e identificado en el 6,7% de raíces de arroz sembradas en JMV, coincidiendo con Muthukumarasamy *et al.* (2005). El manitol como fuente de carbono y un pH de 4,2-4,5 favorecen el aislamiento de *Burkholderia* spp. (Jha *et al.*, 2009; Marra *et al.*, 2012). *Burkholderia* spp. también han sido reportadas en banano (Weber *et al.*, 2000), café (Caballero *et al.*, 2004), maíz y caña de azúcar (Reis *et al.*, 2004), forestales (Jang *et al.*, 2006) y tomate (Caballero *et al.*, 2007).

El género *Gluconacetobacter* no se aisló en raíces de arroz sembradas en LGI-P; sin embargo, Loganathan & Nair (2003) si aislaron estas bacterias. La sacarosa como fuente de carbono y el pH 5,5 favorecen el aislamiento de *Gluconacetobacter* spp. (Jha *et al.*, 2000; Marra *et al.*, 2012), habiendo sido reportadas también en asociación con *Coffea arabica* L. “café” (Fuentes *et al.*,

2000), *Ananas comosus* “piña” (Tapia *et al.*, 2000), maíz (Dibut *et al.*, 2005; Menhaz *et al.*, 2006), *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar” (Massena *et al.*, 2006) y *Citrullus lanatus* “melón”, entre otros cultivos (Menhaz *et al.*, 2006).

La mayor frecuencia de raíces de arroz con bacterias fijadoras de nitrógeno se alcanzó en medio NFb, seguido de LGI y JNFb. Un valor inferior correspondió a JMV y LGI-P. Se coincide con Marra *et al.* (2012), quienes informaron que el mayor porcentaje de bacterias diazotróficas rizosféricas y endófitas caracterizadas en *Syngonanthus elegans* correspondió a NFb, seguido de LGI y JNFb.

Entre las bacterias endófitas diazotróficas aisladas de raíces de arroz predominaron (56,5-85,7%) las especies de *Azospirillum* spp. frente a *Herbaspirillum* spp. (25%) y *Burkholderia* spp. (25%). Estas bacterias establecen asociación con monocotiledóneas y dicotiledóneas (Baiocchi & Saavedra, 2011; Muñoz & Vásquez, 2012) y tienen una amplia distribución ecológica, debido a su baja especificidad en relación con la planta hospedadora y las diversas rutas metabólicas alternativas que les permiten utilizar ácidos orgánicos, azúcares y aminoácidos disponibles en la rizósfera (Carreño *et al.*, 2010). Se les puede encontrar en el mucílago de la rizósfera de las plantas, al colonizar externamente la raíz, pero también pueden ingresar a los tejidos como endófitos facultativos. Asimismo, en condiciones disponibles producen melanina, polihidroxibutiratos, polisacáridos, forman agregados celulares o “quistes” y presentan pleomorfismo (Cholula, 2005; Baca & Sánchez, 2010), mecanismos que explican su predominancia entre las bacterias aisladas. Por el contrario, *Herbaspirillum* y *Burkholderia* son endófitas obligadas y su sobrevivencia es mínima sin el hospedero (Garrido, 2007; Menezes, 2009; Moreira *et al.*, 2010).

El 14,3-75% de las bacterias fijadoras de nitrógeno no correspondieron a los géneros de bacterias investigados. Según Baldani (2004) los medios NFb, JNFb y JMV son semiselectivos para *Azospirillum*, *Herbaspirillum* y *Burkholderia* respectivamente; sin embargo, pueden crecer otros diazótrofos. De esta manera, Menezes (2009), utilizó LGI, JNFb y JMV para aislar *Azospirillum*, *Herbaspirillum* y *Burkholderia* de raíces de maíz; sin embargo, identificó *Enterobacter*,

*Ochrobacterium*, *Pantoea* y *Pseudomonas* como endófitos. Corroborando lo expuesto, Sánchez (2008) investigó el crecimiento de ocho morfotipos de bacterias diazotróficas, determinando que solo cuatro mostraron especificidad por su medio de aislamiento, por lo que se concluyó que no era posible la determinación del género, aun cuando la bacteria solo desarrolle en uno de los medios semisólidos.

En el presente estudio se realizó la caracterización fenotípica de las bacterias, confirmándose los géneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* y *Burkholderia*. De igual manera, se ha identificado *Azospirillum* y *Herbaspirillum* en arroz (Elbeltagy *et al.*, 2000; Koomnok *et al.*, 2007; Baca & Sánchez, 2010) *Azospirillum* en malezas de maíz (Casos & Santiago, 2013), *Herbaspirillum* en arroz (Elbeltagy *et al.*, 2001; Koomnok *et al.*, 2007) y *Burkholderia* en maíz, pastos, caña de azúcar, café y frutales (Moreno & Galvis, 2013).

Todas las bacterias endófitas diazotróficas fijaron nitrógeno *in vitro*, cuyo producto amonio fue cuantificado por el método colorimétrico de Berthelot. Se coincide con García & Muñoz (2010), Muñoz & Vásquez (2012) y Casos & Santiago (2013), quienes cuantificaron el amonio producto de la fijación de nitrógeno por *Azospirillum* spp. aisladas de arroz, maíz y malezas de maíz, respectivamente. De igual manera, Barba & Bravo (2013) y Ramírez & Ugaz (2014) cuantificaron el amonio obtenido con *Burkholderia* spp. aisladas de maíz y arroz.

El amonio producto de la fijación de nitrógeno *in vitro* se cuantificó por el método de Berthelot, basado en la aparición del azul de indofenol, producto de la reacción del ion amonio con los compuestos fenólicos, en presencia del agente hipoclorito de sodio y el catalizador ferrocianato de potasio (Lara *et al.*, 2007). Con las bacterias diazotróficas aisladas de arroz se cuantificó hasta 32,44ppm con *Azospirillum irakense* NT5, superando las concentraciones de 32,13ppm (Casos & Santiago, 2013); 29,09ppm (García & Muñoz, 2010); 21,09ppm (Baiocchi & Saavedra, 2011) y 20,48ppm (Muñoz & Vásquez, 2012) reportados para *Azospirillum* spp. aisladas de malezas asociadas a maíz, arroz, tomate y maíz, respectivamente.



Con las bacterias endófitas que alcanzaron las mayores concentraciones de amonio en cada uno de los géneros identificados, se confirmó la diazotrofia con la presencia del gen *nifH* en el ADN bacteriano. Se coincide con Jha *et al.* (2009), quienes verificaron el potencial de fijación de nitrógeno en siete aislados de proteobacterias representativas de los grupos  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , aisladas de arroz, obteniendo un producto de 360 pares de bases, correspondiente a un fragmento del gen *nifH* en *Azospirillum*, *Herbaspirillum* y *Burkholderia*. El gen *nifH* codifica la ferroproteína dinitrogenasa reductasa y es uno de los genes estructurales (*nifHDK*) de la nitrogenasa (Jou *et al.*, 2005) o complejo que cataliza la conversión del nitrógeno gaseoso a amoníaco en la fijación biológica del nitrógeno (Mayz, 2004).

## VI. CONCLUSIONES

- ✓ Se aislaron y caracterizaron 91 cultivos de bacterias endófitas diazotróficas en raíces de cultivos de arroz, en Lambayeque.
- ✓ La caracterización fenotípica de las bacterias endófitas diazotróficas identificó *Azospirillum*, *Herbaspirillum* y *Burkholderia* en raíces de arroz.
- ✓ Las bacterias endófitas aisladas de arroz fijaron nitrógeno *in vitro* alcanzando 10,39–32,44ppm de amonio con *Azospirillum* spp.; 9,38–21,29ppm con *Herbaspirillum* spp. y 13,54 – 21,46ppm con *Burkholderia* spp.
- ✓ En el Instituto de Física de Sao Carlos- Universidad de Sao Paulo, Brasil, se identificó el gen *nifH* en *Azospirillum irakense* NT5, *Herbaspirillum* sp. JNM29 y *Burkholderia* sp. VI46.

## VII. RECOMENDACIONES

- ✓ Determinar el efecto de las bacterias endófitas diazotróficas en el desarrollo vegetativo de arroz en condiciones de invernadero.
- ✓ Investigar la producción de ácido indol acético y solubilización de fosfato por las bacterias endófitas diazotróficas aisladas de arroz.
- ✓ Determinar el efecto de *Azospirillum irakense* NT5, *Herbaspirillum* sp. JNM29 y *Burkholderia* sp. VI46, en el desarrollo vegetativo y rendimiento de arroz, en condiciones de campo.

## VIII. RESUMEN

El presente trabajo de investigación se desarrolló con el objetivo de determinar las características de bacterias endófitas diazotróficas aisladas de raíces de *Oryza sativa* L. “arroz”, como una alternativa para disminuir el uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos, que contaminan el ambiente. Las raíces se lavaron con detergente neutro, se desinfectaron con alcohol e hipoclorito de sodio y se enjuagaron con solución tampón y agua destilada esterilizada. Después, se obtuvo el macerado que se sembró en los medios semisólidos sin nitrógeno NFb y LGI para *Azospirillum* spp., JNFb para *Herbaspirillum*, LGI-P para *Gluconacetobacter* y JMV para *Burkholderia* spp. Las bacterias fijadoras de nitrógeno se reconocieron por una película blanquecina formada bajo la superficie del medio y por el viraje del indicador, siendo aisladas en sus respectivos medios sólidos. Se obtuvieron 91 cultivos bacterianos entre los que se indentificó *Azospirillum* (82,20%), *Herbaspirillum* (11,1%) y *Burkholderia* (6,7%). Las bacterias fijaron nitrógeno *in vitro*, alcanzando 10,39–32,44ppm de amonio con *Azospirillum* spp.; 9,38–21,29ppm con *Herbaspirillum* spp. y 13,54–21,46ppm con *Burkholderia* spp. Se identificó el gen *nifH* en *Azospirillum irakense* NT5, *Herbaspirillum* sp.JNM29 y *Burkholderia* sp. VI46, demostrándose el potencial de las bacterias endófitas aisladas de maíz como fijadoras de nitrógeno.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguado, S. (Ed.). (2012). *Introducción al Uso y Manejo de los Biofertilizantes en la Agricultura*. México. Recuperado de [www.inifap.gob.mx](http://www.inifap.gob.mx).
- Alvitres, V. (2000). *Método Científico. Planificación de la Investigación*. 2da ed. Lambayeque: Editorial Ciencia.
- Baca, L. & Sánchez, M. (2010). *Concentración de polihidroxialcanoatos de cepas nativas de Azospirillum spp. aisladas de raíces de Lycopersicon esculentum Mill. "tomate" y Oryza sativa L. "arroz"*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Baiocchi, A. & Saavedra, P. (2011). *Caracterización de cepas nativas Azospirillum spp. y su efecto como promotoras del desarrollo vegetativo del tomate (Lycopersicon esculentum Mill.) en invernadero*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Baldani, V., Baldani, J. & Dobereiner, J. (2000). Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biology and Fertility Soils*, 30, 485-491.
- Baldani, J. (2004). Isolation and characterization of diazotrophic from banana and pine apple plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 549–579.
- Barba, H. & Bravo, R. (2013). *Especies de Burkholderia y Pseudomonas aisladas de las rizosféra de malezas y su potencial como promotoras del crecimiento de plantas en Lambayeque 2012*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Beracochea, M. (2011). *Respuesta de variedades comerciales de maíz (Zea mays L.) a la inoculación con bacterias endófitas-diazótrofas nativas*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.



- Brenner, D., Krieg, N. & Staley, J. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Proteobacteria, Part B, the Gammaproteobacteria*. 2(2) USA: Springer.
- Caballero, I., Martinez, L. & Paredes, G., Estrada, P. (2004). *Burkholderia unamae* sp. nov., an N<sub>2</sub> – fixing rhizospheric and endophytic species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1165-1172.
- Caballero, J., Onofre, J., Estrada, P. & Martinez, L. (2007). The tomato rhizosphere and environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediations. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5308-5319.
- Cadena, S. & Martínez, B. (2011). *Caracterización de cepas de Pseudomonas spp. y su efecto en la germinación y emergencia de Zea mays L. "maíz" en Lambayeque*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Carreño, C., Escobar, C., García, F., Horna, Y., Mendoza, G. & Muñoz, H. (2010). *Rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPRs)*. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Carrera, A. (2012). *Caracterización bioquímica, molecular y funcional del banco de cepas de Azospirillum spp. del cultivo de maíz (Zea mays L.) de la sierra ecuatoriana*. (Tesis de Licenciatura). Escuela Politécnica del Ejército, Sangolqui, Ecuador.
- Cholula, L. (2005). *Estudio de la producción de poli B - hidroxibutirato (PHB) en Azospirillum brasilense Sp.7*. (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional, México.
- Casos, I. & Santiago, P. (2013). *Potencial promotor del crecimiento de plantas de las especies de Azospirillum aisladas de raíces de malezas asociadas a Zea mays L. "maíz" en Lambayeque, 2013*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Coyne, M. (2000). *Microbiología del Suelo: Un enfoque exploratorio*. España: Editorial Paraninfo.

- Díaz, B., Cupull, R., Alvarado, J., Torres, R., Suárez, A. & Hernández, P. (2012). Caracterización de bacterias endófitas y rizosféricas aisladas de sorgo con potencialidades en la estimulación del crecimiento vegetal. *Centro Agrícola*, 39(4), 45-48.
- Dibut, B., Ortega, M., Martínez, R., Fery, L. & Ríos, Y. (2005). Nuevos aislados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en cultivos de importancia económica para Cuba. *Cultivos Tropicales*, 26(2), 5-10.
- Elbeltagy, A., Nishioka, K., Suzuki, H., Sato, T., Sato, Y., Morisaki, H., (...). & Minamisawa, K. (2000). Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. *Soil Science and Plant Nutrition*, 46(3), 617-629.
- Elbeltagy, A., Nishioka, K., Sato, T., Suzuki, H., Ye, B., Hamada, T., (...). & Minamisawa, K. (2001). Endophytic colonization and in plant nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11), 5285-5293.
- Eckert, B., Weber, O., Kirchhof, G., Halbritter, A., Stoffels, M. & Hartmann, A. (2001). *Azospirillum doebereineriae* sp. nov. a nitrogen-fixing bacterium associate with the C<sub>4</sub>-grass Miscanthus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 17-26.
- Elmerich, C. (2012). Investigating biological nitrogen fixation, towards poverty alleviation through sustainable agriculture. *Netherlands, Springer*, 145 – 147.
- Fernández, J., Ferrando, L., Macazaga, V., & Fernández, A. (2005). Diversidad de bacterias endófitas en cultivos de arroz en Uruguay. *Agrociencia*, 9(1,2), 285-290.
- Fuentes, L., Bustillos, R., Tapia, A., Jimenez, T., Wang, E., Martinez, E. & Caballero, J. (2000). Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Washington, 51, 1305-1314.

- Franco, M. (2008). *Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas*. (Tesis de Doctorado). Universidad de Granada, España.
- Garrido, R. (2007). *Aislamiento e identificación de bacterias diazotróficas rizosféricas y endófitas asociadas a suelos y pastos del valle y sabana del César en dos épocas climáticas*. (Tesis de Maestría). Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, Colombia.
- García, F. & Muñoz, H. (2010). *Caracterización de cepas nativas de Azospirillum spp. y su efecto como promotoras del desarrollo vegetativo de arroz (Oryza sativa)*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Hallman, J., Quadts-Hallman, A., Mahaffee, W., Kloepper, J. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(10), 895-914.
- Hernández, R., Fernández, C. & Batista, P. (2010). *Metodología de la Investigación*. Colombia: Mc Graw Hill Interamericana Editores S.A.
- 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., Gurunani, A. & Chun, S. (2013). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiological Research*. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.06.003>
- Jung, S., Lee, M., Oh, T. & Yoon, J. (2007). *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 2284-2288.

- Kirchhof, G., Eckert, B., Stoffels, M., Baldani, J., Reis, V. & Hartman, A. (2001). *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 157-168.
- Koomnok, CH., Teaumroong, N., Rerkasem, B. & Lumyong, S. (2007). Diazotroph endophytic bacteria in cultivated and wild rice in Thailand. *Science Asia*, 33, 429-435.
- Kloepper, J., Tuzun, S. & Kuc, J. (1992). Proposed definitions related to induced disease resistance. *Biocontrol Science and Technology*, 2, 349–351.
- Lara, C., Villalba, M. & Oviedo, L. (2007). Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno en la zona agrícola de San Carlos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(2), 6-14.
- Loaces, I. (2011). *Caracterización de bacterias endófitas productoras de sideróforos en arroz (Oryza sativa)*. (Tesis de Maestría). Universidad De La República, Uruguay.
- Loganathan, P. & Nair, S. (2003). Crop Specific endophytic colonization by a novel, salt-tolerant, N<sub>2</sub>-fixing and phosphate-solubilizing *Gluconacetobacter* sp. From wild rice. *Biotechnology Letters*, 25, 497 - 501.
- Loredo, C., López, L. & Espinoza, D. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *TERRA Latinoamericana*, 22(2), 225-539.
- Mantilla, M. (2007). *Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (Chrysanthemum morifolium var. Yoko ono) en período de enraizamiento*. (Tesis Microbiólogo Agrícola Veterinario). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Mano, H. & Morisaki, H. (2008). Endophytic bacteria in the rice plant. *Microbes Environmental*, 23(2), 109-117.
- Marra, L., Graziotti, P., Nunes, U. & de Souza, F. (2012). Bacterias Diazotróficas Em Sempre-Viva. *Bioscience. Journal. Uberlandia*, 28 (1), 17 - 24.

- Massena, V., Baldani, V. & Baldani, J. (2006). Ecología, Isolamento e identificacao de bactérias diazotróficas. Recuperado de [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-204X2006000200012&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2006000200012&lng=es&nrm=iso&tlng=es).
- Mayz, I. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista UDO Agrícola*, 4(1), 1-20.
- Mbai, F., Magiri, E., Matiru, V., Ng'ang'a, J., & Nyambati V. (2013). Isolation and characterization of bacterial root endophytes with potential to enhance plant growth from Kenyan basmati rice. *American International Journal of Comtemporary Research*, 3(4), 25-40.
- Mehnaz, S., Weselowski, B. & Lazarovits, G. (2007). *Azospirillum zeae* sp. Nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 2805-2809.
- Menezes, A. (2009). *Aislamiento y caracterización de bacterias diazótrofes asociadas a maíz (Zea mays) variedad PAU 871*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de La República, Montevideo, Uruguay.
- Ministerio de Agricultura, MINAG. (2012). *Estadística Agraria Mensual. Sistema Integrado de Estadística Agraria, SIEA*, Perú: Dirección de Información Agraria. Recuperado de <http://www.minag.gob.pe/>
- Ministerio de Agricultura y Riego, MINAGRI. (2014). *Estadística Agraria Mensual. Sistema Integrado de Estadística Agraria, SIEA*, Perú: Dirección de Información Agraria. Recuperado de <http://www.minag.gob.pe/portal/>
- Mollo, G., Ferrando, L. & Fernández, S. (2012). Aislamiento de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en plantas de arroz cultivadas en diferentes suelos. Acta 7mo Congreso de Medio Ambiente AUGM. La Plata Argentina. Recuperado de <http://www.congresos.unlp.edu.ar/index.php/CCMA/7CCMA/paper/download/909/208>.



- Moreno, L. & Galvis, F. (2013). Potencial biofertilizante de bacterias diazótrofes aisladas de muestras de suelo rizosférico. *Pastos y Forrajes*, 36(1), 33-37.
- Moreira, F., da Silva, K., Abrahao, R. & Carvalho, F. (2010). Bacterias diazotróficas asociativas: diversidad, ecología e potencial de aplicaciones. *Comunicata Scientiae*, 1(2), 74-99.
- Muñoz, V. & Vásquez, R. (2012). *Caracterización de Azospirillum spp. nativas y su efecto en el desarrollo vegetativo y rendimiento de Zea mays L. "maíz" en Lambayeque*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Muthukumarasamy, R., Revathi, G., Seshadri, S. & Lakshminarasimhan, C. (2002). *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Syn. *Acetobacter diazotrophicus*) a promising diazotrophic endophyte in tropics. *Current Science*, 83, 137-145.
- Pedraza, R., Bellone, C. & de Bellone, C. (2010). *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. *European Journal of Soil Biology*, 45, 36-43.
- Peña, H. & Reyes, I. (2007). Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Revista Venezolana Interciencia*, 32(8), 23-32.
- Pérez, A., Rojas, J. & Valle, H. (2009). Biología y perspectiva de microorganismos endófitos asociados a plantas. *Revista Colombiana*, 1(2), 286-302.
- Pérez, A., Rojas, J. & Fuentes, J. (2010). Diversidad de bacterias endófitas asociadas a raíces de pasto colosuana (*Bothriochloa pertusa*) en tres localidades del departamento de Sucre, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 15(2), 219-228.

- Pérez, A., Pérez, C. & Chamorro, L. (2013). Diversidad de bacterias endófitas asociadas al cultivo de arroz en el Departamento de Córdoba-Colombia. *Revista Colombiana*, 5(1), 83- 92.
- Poly, F., Ranjard, L., Gourbière, F. & Jocteur, L. (2001). Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. *Microbiological Research*, 67(5), 2262-3355.
- Punschke, K. & Mayans, M. (2011). Selección de cepas de *Herbaspirillum* spp. promotoras del crecimiento de arroz. *Agrociencia Uruguay*, 15(1), 19-26.
- Ramírez, L. & Ugaz, J. (2014). *Bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno en Oryza sativa L. "arroz"*, Lambayeque, 2014. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Reis, V., Estrada, P., Tenorio, S., Vogel, J., Stoffels, M., Guyon, S. (...). & Caballero, J. (2004). *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 2155-2162.
- Rives, N., Acebo, Y. & Hernández, A. (2007). Bacterias Promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). Perspectivas de su uso en Cuba. *Cultivos Tropicales*, 28(2), 29-38.
- Rothballer, M., Schmid, M., Klein, I., Gattinger, A., Grundmann, S. & Hartmann, A. (2006). *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1341-1348.
- Salhia, B. (2010). *The effect of Azotobacter chroococcum as nitrogen biofertilizer on the growth and yield of Cucumis sativus*. (Degree of Master). The Islamic University, Gaza.
- Sánchez, S. (2008). *Especies vegetales y microorganismos rizosféricos tolerantes a metales pesados de un ecosistema contaminado*. (Tesis de Maestría). Universidad Agraria la Habana, Cuba.
- Schoebitz, M. (2006). *Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de Lolium perenne L. de suelo*

- volcánico (modelo género *Azospirillum* spp. (Tesis de Licenciatura). Universidad Austral de Chile, Chile.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SARGARPA (2010). Uso de fertilizantes. Recuperado de: <http://www.sagarpa.gob.mx/>
- Tapia, A., Bustellos, M., Jiménez, T., Caballero, J. & Fuentes, L. (2000). Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pine apple plants. *Microbial Ecology*, 39, 49-55.
- United States Department of Agriculture, USDA. (2009). *Journal Department of Agriculture of the United States*, 32(9), 506-524.
- Valverde, A., Velazquez, E., Gutierrez, C., Cervantes, E., Ventosa, A. & Igual, J. (2003). *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1979-1983.
- Vicentini, K. (2006). *Fijación de nitrógeno por bacterias diazotróficas en cultivos de arroz irrigado*. (Tesis de Doctorado). Universidad Federal de Santa María, Brasil.
- Weber, O., Baldani, I. & Dobereiner, I. (2000). Bactérias diazotróficos em mudas de bananeira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35, 2277-2285.
- Yang, H., Im, W., Kim, K., An, D. & Lee, S. (2006). *Burkholderia terrae* sp. nov., isolated from a forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 453-457.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1

### **Cálculo del número de muestras para el aislamiento de bacterias endófitas diazotróficas (en Alvitres, 2000)**

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

$$n = \frac{(1,96)^2 (0,90)(0,10)}{(0,08)^2}$$

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

Dónde:

N = Tamaño de la muestra

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

p = Prevalencia o presencia de bacterias endófitas diazotróficas en raíces (0,90)

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

T = Error estimado (0,08)

## ANEXO 2

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

**a. Solución tampón fosfato de potasio 0,05 molL<sup>-1</sup>, pH 7,0**

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

Verificar el pH 7,0 y autoclavar.

**b. Agar nutritivo (AN)**

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



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

Componentes	gL <sup>-1</sup>
Ácido málico	5,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,2
NaCl	0,1
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,02
Solución de Micronutrientes	2mL
Azul de bromotimol (0,5% en KOH 0.2N )	2mL
FeEDTA (Solución 1,64%)	4mL
Solución de Vitaminas (Biotinol)	1mL
KOH	4,5

Pesar los compuestos en el orden indicado, posteriormente completar el volumen a 1000mL con agua destilada y ajustar el pH a 6,5-6,8. Para el medio semisólido se agrega entre 1,75-1,8g de agar agar L<sup>-1</sup>, para el medio sólido 15g de agar agarL<sup>-1</sup> y 20mgL<sup>-1</sup> de extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

**Solución de micronutrientes I**

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

Completar el volumen para 1000mL de agua destilada.

### FeEDTA (Solución 1,64%)

Preparar una solución madre con 7,0g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 12g de EDTA dipotásico en 1L de agua destilada. Luego, tomar 1,17mL de la solución madre y completar a 1 L con agua desmineralizada, para obtener la solución 1,64% de Fe deseada.

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

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

Componentes	g $\text{L}^{-1}$
Cristales de azúcar	5
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,2
$\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,02
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,002
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,6
Azul de bromotimol (0,5% en KOH 0.2N)	5mL
FeEDTA (Solución 1,64%)	4mL
Solución de vitaminas	1mL
Agua destilada en cantidad suficiente	1000mL

Ajustar el pH 6,0-6,2. Para el medio semisólido se adiciona 1,75g de agar agar  $\text{L}^{-1}$ , para medio sólido 15g de agar agar  $\text{L}^{-1}$  y 20mg $\text{L}^{-1}$  de extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

**e. Medio de Cultivo JNFb (*Herbaspirillum* spp.)**

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

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

Ajustar el pH a 5,8. Para medio semisólido agregar 1,8g de agar agar L<sup>-1</sup>, para medio sólido 18g de agaragar L<sup>-1</sup> y 20mg L<sup>-1</sup> de extracto de levadura como fuente de nitrógeno, la solución de micronutrientes es similar al medio NFb.

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

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

Componentes	gL <sup>-1</sup>
Cristales de azúcar	100
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,2
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,02
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,002
Azul de bromotimol (0,5% en KOH 0.2N )	5mL
Solución de vitaminas	1mL
FeCl <sub>3</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,01
Agua destilada en cantidad suficiente	1000mL

Ajustar el pH a 5,5. Para medio semisólido agregar 1,8g de agar agarL<sup>-1</sup>, para medio sólido 17g de agar agarL<sup>-1</sup> y 20mg L<sup>-1</sup> de extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

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

Componentes	gL <sup>-1</sup>
Manitol	5,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2
NaCl	0,1
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,02
Azul de bromotimol (0,5 % en KOH 0.2N)	2mL
FeEDTA 1,64%	4mL
Agar	2,1
Solución de micronutrientes	2mL
Solución de vitaminas (complejo B)	2mL
Extracto de levadura	0,1
Agua destilada en cantidad suficiente	1000mL

Ajustar el pH 5,0. Para obtener la solución de vitaminas, diluir una pastilla de complejo B comercial en 10mL de agua destilada.

**Solución de micronutrientes II**

Componentes	gL <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub>	0,1
MnCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,03
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,3
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,2
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,01
NiCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,02
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,03

Completar el volumen para 1000mL de agua destilada.

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

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

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



**i. Reactivos** (en Lara *et al.*, 2007; Cadena & Martínez, 2011)

- **Cloruro de potasio 2M**

Cloruro de potasio	149,12g
Agua destilada	1000mL

- **Solución alcohólica de fenol 10%**

Fenol concentrado	10mL
Alcohol 97°	90mL

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

Nitroprusiato de sodio	0,5g
Agua destilada	100mL

- **Solución oxidante**

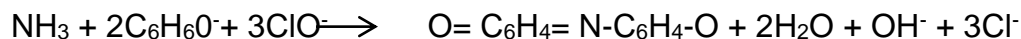
Citrato de sodio	20g
Hidróxido de sodio	1g
Hipoclorito de sodio 5% (lejía comercial)	2mL
Agua destilada	100mL

### ANEXO 3

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

##### a. Fundamento del método colorimétrico de Berthelot (fenolhipoclorito)

Se basa en la formación de un color azul intenso de indofenol, que resulta de la reacción del ión amonio ( $\text{NH}_4$ ) con los compuestos fenólicos, en presencia de un agente oxidante, el cual puede ser hipoclorito de sodio u o-fenol; y la presencia de 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. Preparación de diluciones a partir de una solución madre de $\text{NH}_4\text{Cl}$

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

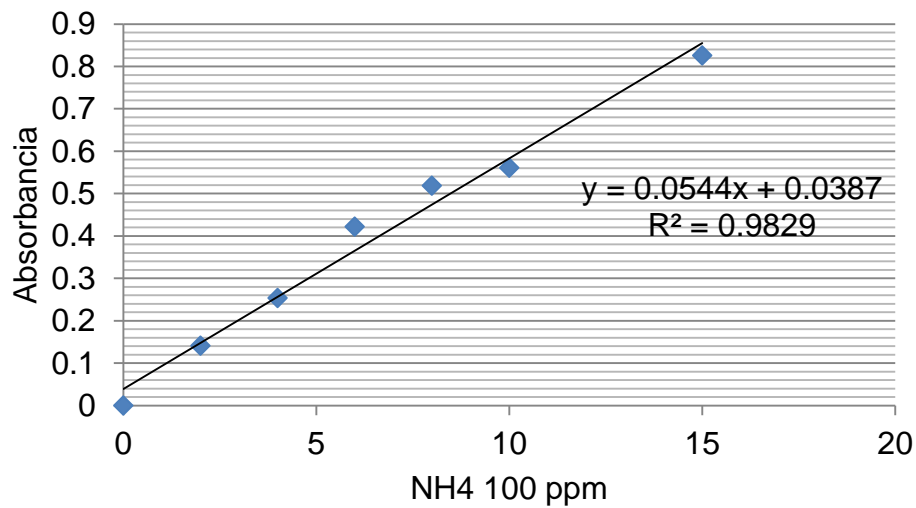
N° de tubo	Solución patrón [mL]	H <sub>2</sub> O bidestilada [mL]	NH <sub>4</sub> Cl (Ug/mL = ppm) NH <sub>4</sub> Cl
1	0,0	10,0	0
2	0,2	9,8	2
3	0,4	9,6	4
4	0,6	9,4	6
5	0,8	9,2	8
6	1,0	9,0	10
7	1,5	8,5	15
8	2,0	8,0	20

### c. Procedimiento para la cuantificación de amonio por colorimetría

Obtenida 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 2013, 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.

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

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



En la ecuación obtenida:

$$y = 0.0544x + 0.0387$$

Donde:

y=representa la absorbancia captada (variable dependiente)

x=cantidad de amonio en ppm (variable independiente)

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

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

## ANEXO 4

### Bacterias endófitas diazotróficas aisladas de raíces de *Oryza sativa* L., en Lambayeque, 2014

Medios	NFB					LGI					JNFb					LGI-P					JMV				
S M <sup>+</sup>	S <sub>0</sub>		S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>0</sub>		S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>0</sub>		S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>0</sub>		S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>0</sub>		S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>
	a	b				a	b				a	b				a	b				a	b			
1	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
7	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
9	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
10	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
11	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
12	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
13	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
14	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
15	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
16	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
17	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
20	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
22	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
23	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
29	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+
30	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
32	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
33	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
35	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-
36	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
37	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
38	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+
40	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
41	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
42	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
43	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
44	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
45	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
46	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+
47	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
48	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
49	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
50	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-
51	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
52	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
53	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
54	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
	22	36	42	33	28	20	29	30	27	23	14	19	24	21	20	8	17	23	12	8	10	14	17	13	12



## Anexo 5

*Azospirillum* spp. aisladas en muestras de raíces de *Oryza sativa* L., en medios NFB y LGI

<i>Azospirillum</i> spp.	Muestra N°	Medio	<i>Azospirillum</i> spp.	Muestra N°	Medio
<i>A. irakense</i> NT5	5	NFb	<i>Azospirillum</i> sp.1 LT20	20	LGI
<i>A. lipoferum</i> NI43	43	NFb	<i>A. brasilense</i> LI43	43	LGI
<i>A. irakense</i> NT3	3	NFb	<i>A. brasilense</i> LT1	1	LGI
<i>A. braislense</i> NT16	16	NFb	<i>A. brasilense</i> NM32	32	NFb
<i>A. brasilense</i> NM21	21	NFb	<i>A. brasilense</i> NI36	36	NFb
<i>A. brasilense</i> NM25	25	NFb	<i>A. brasilense</i> NI37	37	NFb
<i>A. brasilense</i> NI47	47	NFb	<i>A. brasilense</i> NI40	40	NFb
<i>A. irakense</i> NT7	7	NFb	<i>A. brasilense</i> LT2	2	LGI
<i>A. halopraeferens</i> LI37	37	LGI	<i>A. brasilense</i> NI49	49	NFb
<i>A. brasilense</i> NI41	41	NFb	<i>A. brasilense</i> LM29	29	LGI
<i>A. halopraeferens</i> LM30	30	LGI	<i>A. brasilense</i> NI50	50	NFb
<i>A. lipoferum</i> NM27	27	NFb	<i>A. brasilense</i> LI38	38	LGI
<i>A. halopraeferens</i> LM32	32	LGI	<i>Azospirillum</i> sp.1 LT16	16	LGI
<i>A. lipoferum</i> NT9	9	NFb	<i>Azospirillum</i> sp.1 LI48	48	LGI
<i>A. brasilense</i> LI39	39	LGI	<i>A. brasilense</i> NT11	11	NFb
<i>A. brasilense</i> LI42	42	LGI	<i>A. brasilense</i> NI42	42	NFb
<i>A. brasilense</i> LI46	46	LGI	<i>A. irakense</i> NT4	4	NFb
<i>A. brasilense</i> LT13	13	LGI	<i>A. lipoferum</i> NI39	39	NFb
<i>A. irakense</i> LT9	9	LGI	<i>A. lipoferum</i> NT2	2	NFb
<i>A. irakense</i> LT19	19	LGI	<i>A. irakense</i> NT8	8	NFb
<i>A. irakense</i> LT8	8	LGI	<i>A. lipoferum</i> NI51	51	NFb
<i>A. lipoferum</i> NM23	23	NFb	<i>A. lipoferum</i> NM30	30	NFb
<i>A. lipoferum</i> LM27	27	LGI	<i>A. irakense</i> NT15	15	NFb
<i>A. lipoferum</i> LI47	47	LGI	<i>Azospirillum</i> sp.1 LI53	53	LGI
<i>A. lipoferum</i> LM31	31	LGI	<i>A. irakense</i> NT17	17	LGI
<i>A. brasilense</i> LT6	6	LGI			

De un total de 51 cultivos puros aislados en los medios NFb y LGI, 37 pertenecientes al género *Azospirillum* spp. y 14 a otros géneros bacterianos.

*Herbaspirillum* spp. aisladas en muestras de raíces de *Oryza sativa* L. en medio

JNFb

<b><i>Herbaspirillum</i> spp.</b>	<b>Muestra</b>	<b>Medio</b>
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNM29	29	JNFb
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNT9	9	JNFb
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNT6	6	JNFb
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNT4	4	JNFb
<i>Herbaspirillum</i> sp. JNT16	16	JNFb

De un total de 20 cultivos puros aislados en el medio JNFb, 5 pertenecieron al género *Herbaspirillum* spp. y 15 a otros géneros bacterianos.

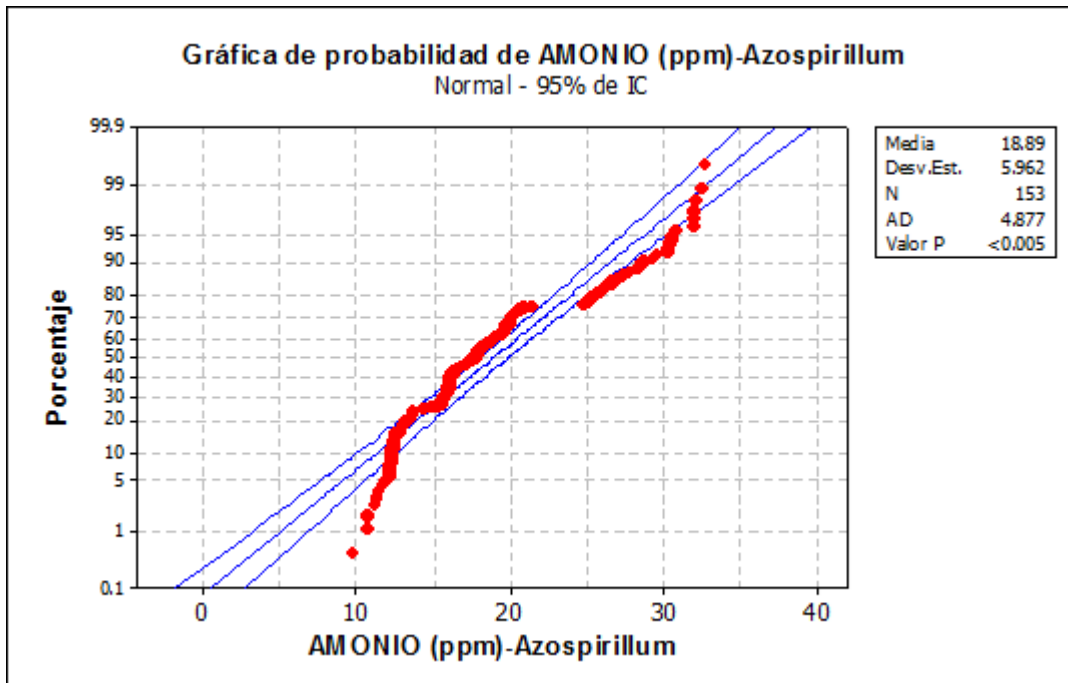
*Burkholderia* spp. aisladas en muestras de raíces de *Oryza sativa* L. en medio

JMV

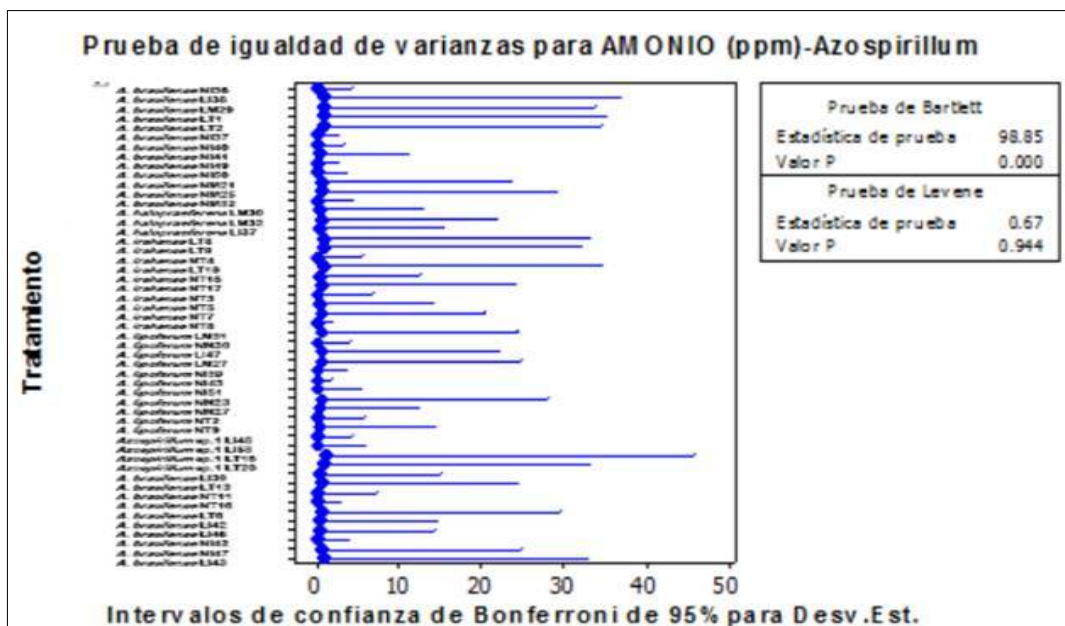
<b><i>Burkholderia</i> spp.</b>	<b>Muestra</b>	<b>Medio</b>
<i>Burkholderia</i> sp. VI46	46	JMV
<i>Burkholderia</i> sp. VI43	43	JMV
<i>Burkholderia</i> sp. VI48	48	JMV

De un total de 12 cultivos puros aislados en el medio JMV, 3 pertenecieron al género *Burkholderia* spp. y 9 a otros géneros bacterianos.

## Anexo 6



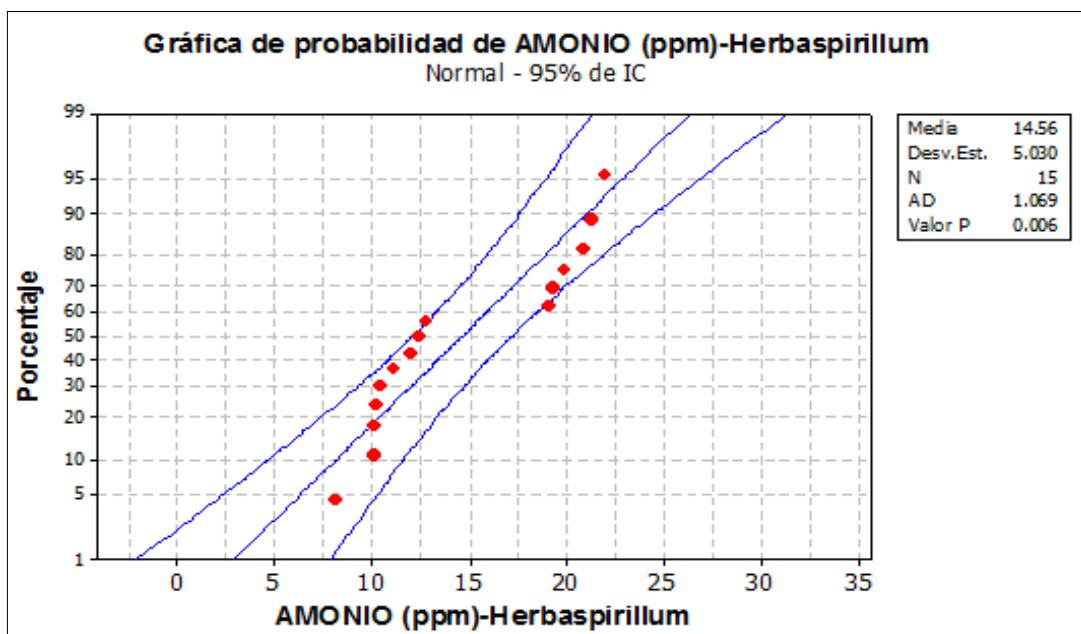
Prueba de normalidad para el nitrógeno fijado como amonio por *Azospirillum* spp. Endófitas, aisladas de raíces de *Oryza sativa* L. en Lambayeque, 2014.



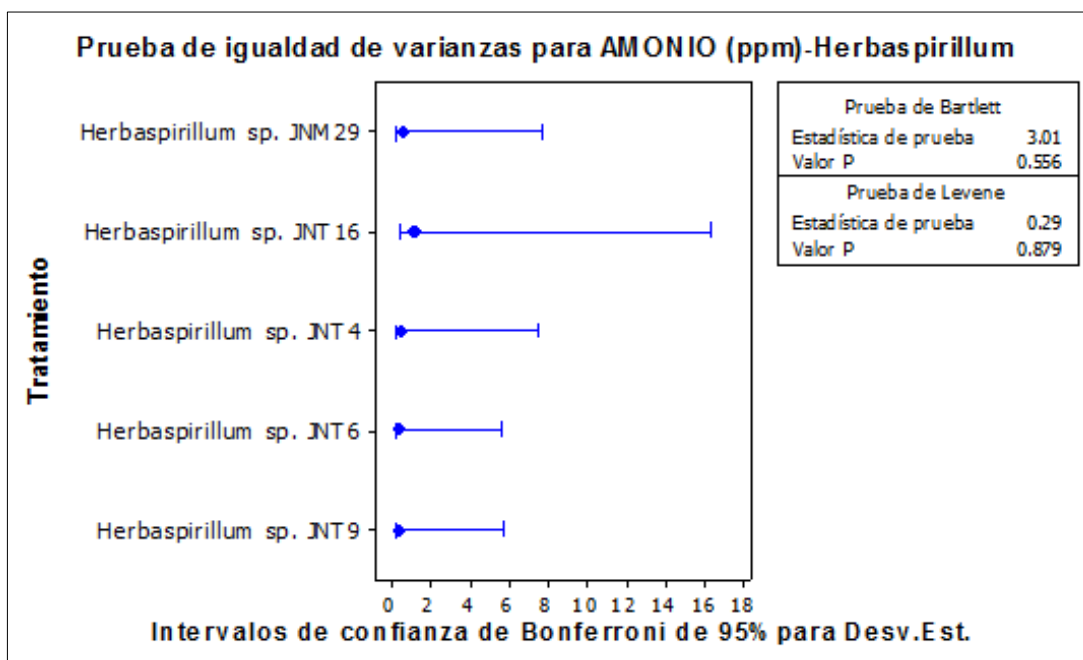
Prueba de homogeneidad de varianza para el nitrógeno fijado como amonio por *Azospirillum* spp. endófitas, aisladas de raíces de *Oryza sativa* L. en Lambayeque, 2014.

VARIABLE	TRATAMIENTO	N	MEDIAS	D.E	MEDIANAS	H	P
Nitrógeno (ppm)	<i>A. brasilense</i> NI36	3	16,07	0,09	16,05	150,42	<0,0001
Nitrógeno (ppm)	<i>A. brasilense</i> LI38	3	15,31	0,83	15,65		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. brasilense</i> LM29	3	15,63	0,75	15,98		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. brasilense</i> LT1	3	16,46	0,79	16,72		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. brasilense</i> LT2	3	15,92	0,77	16,24		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. brasilense</i> NI37	3	16,02	0,06	16,02		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. brasilense</i> NI40	3	16,00	0,07	16,00		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. brasilense</i> NI41	3	25,85	0,25	25,87		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. brasilense</i> NI49	3	15,89	0,06	15,89		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. brasilense</i> NI50	3	15,57	0,09	15,54		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. brasilense</i> NM21	3	29,16	0,53	29,31		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. brasilense</i> NM25	3	28,16	0,65	28,35		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. brasilense</i> NM32	3	16,11	0,10	16,09		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. halopraeferens</i> LM30	3	25,31	0,29	25,28		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. halopraeferens</i> LM32	3	20,89	0,49	20,87		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. halopraeferens</i> LI37	3	26,45	0,34	26,62		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. irakense</i> LT8	3	18,69	0,74	18,92		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. irakense</i> LT9	3	19,26	0,71	19,66		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. irakense</i> NT4	3	12,89	0,12	12,91		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. irakense</i> LT19	3	19,11	0,77	19,51		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. irakense</i> NT15	3	11,92	0,28	11,94		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. irakense</i> NT17	3	10,39	0,54	10,69		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. irakense</i> NT3	3	30,59	0,15	30,56		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. irakense</i> NT5	3	32,44	0,31	32,52		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. irakense</i> NT7	3	26,60	0,45	26,61		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. irakense</i> NT8	3	12,26	0,04	12,25		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. lipoferum</i> LM31	3	17,71	0,54	17,89		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. lipoferum</i> NM30	3	12,25	0,09	12,25		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. lipoferum</i> LI47	3	17,89	0,49	18,09		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. lipoferum</i> LM27	3	18,33	0,55	18,44		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. lipoferum</i> NI39	3	12,43	0,08	12,47		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. lipoferum</i> NI43	3	31,99	0,04	31,99		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. lipoferum</i> NI51	3	12,25	0,11	12,21		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. lipoferum</i> NM23	3	18,54	0,62	18,70		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. lipoferum</i> NM27	3	25,04	0,27	25,10		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. lipoferum</i> NT2	3	12,33	0,13	12,36		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. lipoferum</i> NT9	3	20,32	0,32	20,19		
Nitrógeno (ppm)	<i>Azospirillum</i> sp.1 LI48	3	13,54	0,09	13,55		
Nitrógeno (ppm)	<i>Azospirillum</i> sp.1 LI53	3	11,27	0,13	11,24		
Nitrógeno (ppm)	<i>Azospirillum</i> sp.1 LT16	3	14,79	1,02	15,24		
Nitrógeno (ppm)	<i>Azospirillum</i> sp.1 LT20	3	17,30	0,73	17,52		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. brasilense</i> LI39	3	20,28	0,34	20,34		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. brasilense</i> LT13	3	19,53	0,54	19,73		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. brasilense</i> NT11	3	13,31	0,16	13,39		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. brasilense</i> NT16	3	30,29	0,06	30,28		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. brasilense</i> LT6	3	17,46	0,65	17,71		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. brasilense</i> LI42	3	20,03	0,32	20,06		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. brasilense</i> LI46	3	19,82	0,32	19,88		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. brasilense</i> NI42	3	12,98	0,09	12,95		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. brasilense</i> NI47	3	27,88	0,55	27,76		
Nitrógeno (ppm)	<i>A. brasilense</i> LI43	3	17,02	0,73	17,21		

Prueba de Kruskal Wallis para el nitrógeno fijado como amonio por *Azospirillum* spp. endófitas, aisladas de *Oryza sativa* L. en Lambayeque, 2014.



Prueba de normalidad para el nitrógeno fijado como amonio por *Herbaspirillum* spp. endófitas, aisladas de raíces de *Oryza sativa* L. en Lambayeque, 2014.

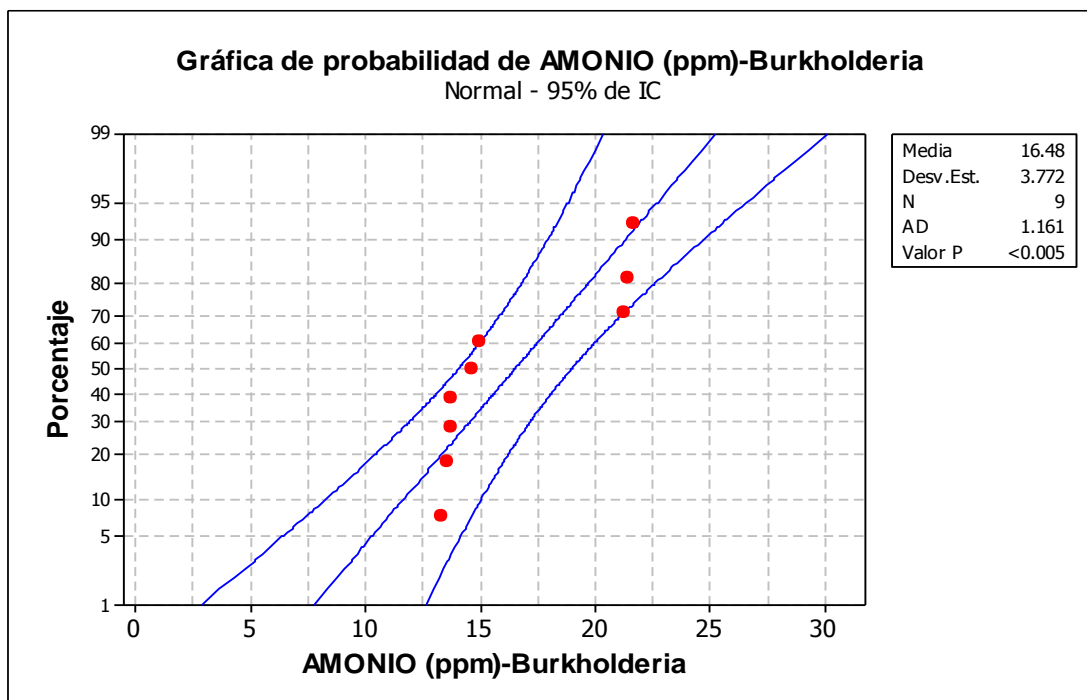


Prueba de homogeneidad de varianza para el nitrógeno fijado como amonio por *Herbaspirillum* spp. endófitas, aisladas de *Oryza sativa* L. en Lambayeque, 2014.

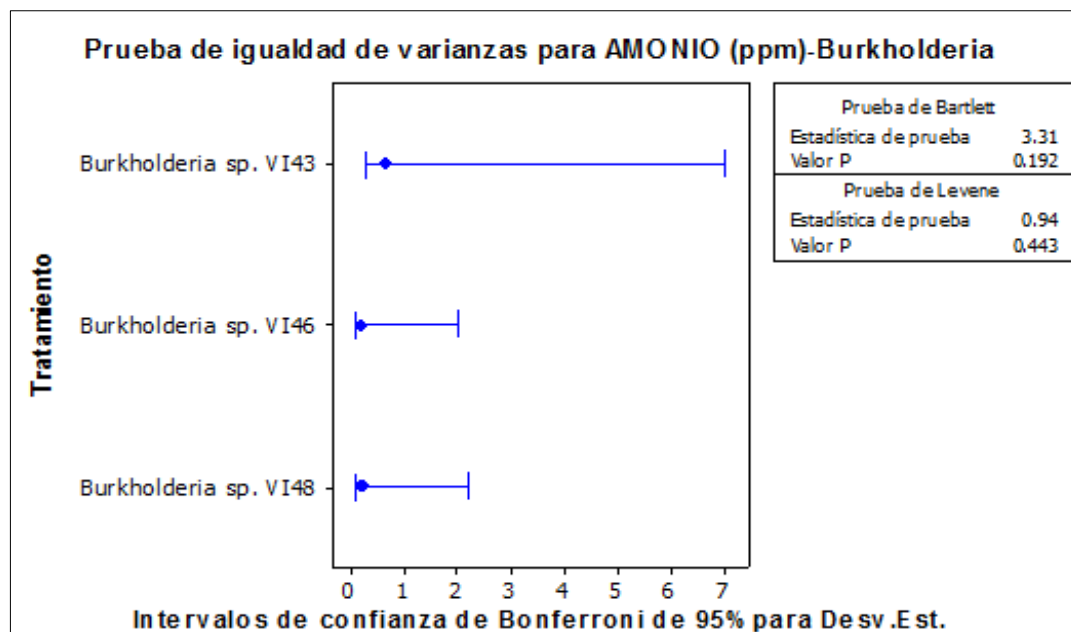
VARIABLE	TRATAMIENTO	N	MEDIAS	D.E	MEDIANAS	H	p
Nitrógeno (ppm)	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNM29	3	21,29	0,55	21,20	13,23	0,0102
Nitrógeno (ppm)	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNT16	3	9,37	1,16	9,99		
Nitrógeno (ppm)	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNT4	3	10,48	0,54	10,36		
Nitrógeno (ppm)	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNT6	3	12,32	0,40	12,36		
Nitrógeno (ppm)	<i>Herbaspirillum</i> sp. JNT9	3	19,33	0,41	19,25		

Prueba de Kruskal Wallis para el nitrógeno fijado como amonio por *Herbaspirillum* spp. endófitas, aisladas de *Oryza sativa* L. en Lambayeque, 2014.





Prueba de normalidad para el nitrógeno fijado como amonio por *Burkholderia* spp. endófitas, aisladas de raíces de *Oryza sativa* L. en Lambayeque, 2014.



Prueba de homogeneidad de varianza para el nitrógeno fijado como amonio por *Burkholderia* spp. endófitas, aisladas de *Oryza sativa* L. en Lambayeque, 2014.

VARIABLE	TRATAMIENTO	N	MEDIAS	D.E	MEDIANAS	H	p
Nitrógeno (ppm)	<i>Burkholderia</i> sp. VI43	3	14,44	0,64	14,66	142,0	0,0107
Nitrógeno (ppm)	<i>Burkholderia</i> sp. VI46	3	21,46	0,18	21,46		
Nitrógeno (ppm)	<i>Burkholderia</i> sp. VI48	3	13,54	0,20	13,54		

Prueba de Kruskal Wallis para el nitrógeno fijado como amonio por *Burkholderia* spp. endófitas, aisladas de *Oryza sativa* L., en Lambayeque, 2014.