



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
"PEDRO RUIZ GALLO"**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA  
Y PARASITOLOGÍA**

**Bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno en  
*Oryza sativa* L. "arroz", Lambayeque, 2014**

# **TESIS**

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

**PRESENTADO POR:**

**Br. Leonardo Guido Ramirez Bazán**

**Br. Juan Francisco Segundo Ugaz Hoyos**

**LAMBAYEQUE - PERÚ  
2014**



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



**Bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno en *Oryza sativa* L.**  
**“arroz”, Lambayeque, 2014**

**TESIS**

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

**PRESENTADO POR:**

**Br. Leonardo Guido Ramírez Bazán**

**Br. Juan Francisco Segundo Ugaz Hoyos**

**LAMBAYEQUE, PERÚ**

**2014**

**Bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno en *Oryza sativa* L.**

**“arroz”, Lambayeque, 2014**

**TESIS**

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

**APROBADO POR:**

Dr. Cesar Estela Campos

**PRESIDENTE**

Dr. Luis Chicoma Chaqui

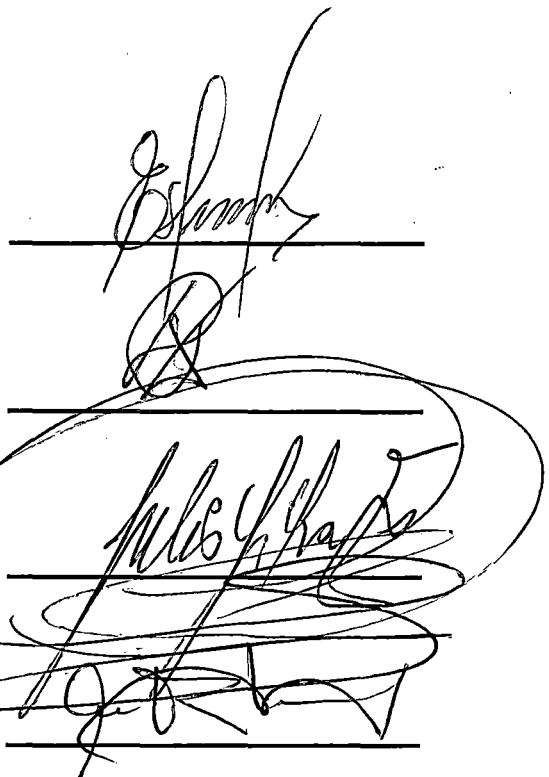
**SECRETARIO**

Lic. Julio Silva Estela

**VOCAL**

Dra. Carmen Carreño Farfán

**PATROCINADORA**

The image shows four handwritten signatures, each on a horizontal line. The first signature is for Dr. Cesar Estela Campos. The second is for Dr. Luis Chicoma Chaqui. The third is for Lic. Julio Silva Estela. The fourth is for Dra. Carmen Carreño Farfán. The signatures are written in black ink and are somewhat stylized.

**LAMBAYEQUE, PERÚ**

**2014**

## **DEDICATORIA**

A Dios, por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida, por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorarlo cada día más. A mi madre por ser la persona que me ha acompañado durante todo mi trayecto estudiantil y de mi vida, a mi padre quien con sus consejos ha sabido guiarme para culminar mi carrera profesional. A mis hermanas y hermano quienes han velado por mí durante este arduo camino para convertirme en un profesional. A la doctora Carmen Rosa Carreño Farfán, gracias por su tiempo, por su apoyo así como por la sabiduría que me ha transmitido en el desarrollo de mi formación profesional.

***Juan Francisco Segundo Ugaz Hoyos***

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar doy infinitamente gracias a Dios, por haberme dado fuerza y valor para culminar esta etapa de mi vida.

Agradezco también la confianza y el apoyo brindado por parte de mi madre, que sin duda alguna en el trayecto de mi vida me ha demostrado su amor, corrigiendo mis faltas y celebrando mis triunfos.

A mi padre, que siempre lo he sentido presente en mi vida. Y sé que está orgulloso de la persona en la cual me he convertido.

A mis hermanas y hermano, que con sus consejos me han ayudado a afrontar los retos que se me han presentado a lo largo de mi vida.

Agradezco especialmente a la doctora Carmen Rosa Carreño Farfán, por toda la colaboración brindada, durante la elaboración de este proyecto.

A mi amigo Leonardo Ramírez Bazán por haber logrado nuestro gran objetivo con mucha perseverancia.

Finalmente a una persona muy especial, por su apoyo incondicional y por demostrarme la gran fe que tiene en mí, acompañándome durante todo este arduo camino y compartir conmigo alegrías y fracasos.

***Juan Francisco Segundo Ugaz Hoyos***

## **DEDICATORIA**

Esta tesis se la dedico a mi Dios quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

***“La dicha de la vida consiste en tener siempre algo que hacer, alguien a quien amar y alguna cosa que esperar”. Thomas Chalmers***

***Leonardo Ramírez Bazán***

## **AGRADECIMIENTO**

A mi familia quienes por ellos soy lo que soy.

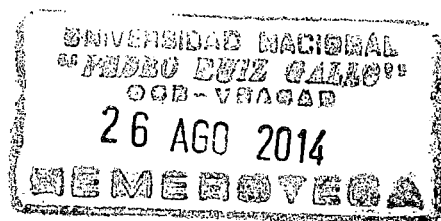
Para mis padres por su apoyo, consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles, y por ayudarme con los recursos necesarios para estudiar. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos.

A mis hermanas Aimeé y Cecilia por estar siempre presentes, acompañándome. Gracias por su paciencia, por preocuparse por su hermano menor, gracias por compartir sus vidas, pero sobre todo, gracias por estar en otro momento tan importante en mi vida

Un agradecimiento singular debo a la Profesora Dra. Carme Carreño Farfán que, como directora de esta tesis, me ha orientado, apoyado y corregido en mi labor científica con un interés y una entrega que han sobrepasado, con mucho, todas las expectativas que, como alumno, deposité en su persona.

A todos mis amigos, sin excluir a ninguno, pero en especial a Juan Francisco compañero de tesis, Eswin, Altamirano, Raúl, Pierine, Luisa, Zina, Lorena, Ester y Ana, mil gracias por todos los momentos que hemos pasado juntos y porque han estado conmigo siempre.

***Leonardo Ramírez Bazán***



## Índice

I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. ANTECEDENTES .....	4
2.1 Antecedentes de la investigación .....	4
2.2 Base teórica .....	9
III. MATERIAL Y MÉTODOS .....	14
3.1 Material.....	14
3.1.2 Población y muestra de estudio .....	14
3.2 Métodos.....	14
3.2.1 variables en estudio.....	14
3.2.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis .....	15
3.2.3 Lugar de muestreo .....	15
3.2.4 Obtención de muestras de raíz y suelo rizosférico .....	15
3.2.5 Aislamiento de bacterias rizosféricas diazotróficas .....	22
3.2.6 Identificación fenotípica de bacterias fijadoras de nitrógeno .....	30
3.2.7 Mantenimiento de los cultivos de bacterias .....	35
3.2.8 Cuantificación de nitrógeno fijado <i>in vitro</i> .....	35
3.2.9 Selección de bacterias fijadoras de nitrógeno .....	43
3.2.10 Identificación del gen <i>nifH</i> en bacterias rizosféricas aisladas de arroz .....	43
3.2.11 Análisis de los datos.....	49
IV RESULTADOS.....	51
4.1 Bacterias rizosféricas, fijadoras de nitrógeno, microaerófilas aisladas de suelo rizosférico de arroz .....	51
4.2 Bacterias rizosféricas, fijadoras de nitrógeno, aerobias aisladas de suelo rizosférico de arroz .....	62
4.3 Características fenotípicas de bacterias microaerófilas rizosféricas diazótrofes.....	67
4.4 Características fenotípicas de bacterias aerobias rizosféricas diazótrofes ..	67
4.5 Nitrógeno fijado como amonio por bacterias rizosféricas nativas .....	75
4.4 Bacterias seleccionadas.....	75
4.5 Gen <i>nifH</i> identificado en bacterias rizosféricas diazotróficas aisladas de arroz .....	83



V. DISCUSIÓN .....	84
VI. CONCLUSIONES .....	92
VII. RECOMENDACIONES .....	93
VIII. RESUMEN.....	94
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
X. ANEXOS .....	103

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b>	Lote de ubicación de los puntos de muestreo de raíces y suelo rizosférico de <i>Oryza sativa</i> L., durante marzo – mayo de 2014.....	17
<b>Tabla 2.</b>	Posición de los campos de cultivo de <i>Oryza sativa</i> L., donde se realizó el muestreo de raíces y suelo rizosférico, durante marzo – mayo de 2014.....	18
<b>Tabla 3.</b>	Análisis físico – químico de muestras de suelo rizosférico de cultivos de <i>Oryza sativa</i> L. en Lambayeque, 2014.....	23
<b>Tabla 4.</b>	Características diferenciales de las especies de <i>Azospirillum</i> spp....	36
<b>Tabla 5.</b>	Características diferenciales de <i>Herbaspirillum</i> spp.....	37
<b>Tabla 6.</b>	Características diferenciales de <i>Gluconoacetobacter</i> spp.....	37
<b>Tabla 7.</b>	Características diferenciales de <i>Burkholderia</i> spp.....	38
<b>Tabla 8.</b>	Características diferenciales de <i>Azotobacter</i> spp.....	38
<b>Tabla 9.</b>	Características diferenciales de <i>Derxia</i> spp.....	39
<b>Tabla 10.</b>	Características diferenciales de <i>Beijerinckia</i> spp.....	39
<b>Tabla 11.</b>	Características macroscópicas de colonias de bacterias microaerófilas fijadoras de nitrógeno aisladas de <i>Oryza sativa</i> L., en Lambayeque, 2014.....	68
<b>Tabla 12.</b>	Características macroscópicas de colonias de bacterias aeróbicas fijadoras de nitrógeno aisladas de <i>Oryza sativa</i> L., en Lambayeque, 2014.....	72
<b>Tabla 13.</b>	Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por <i>Azospirillum</i> spp. nativas en caldo extracto de suelo durante 7 días.....	77
<b>Tabla 14.</b>	Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por <i>Burkholderia</i> spp. nativas en caldo extracto de suelo durante 7 días.....	78
<b>Tabla 15.</b>	Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por <i>Azotobacter</i> spp. nativas en caldo extracto de suelo durante 7 días.....	78
<b>Tabla 16.</b>	Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por <i>Beijerinckia</i> spp. nativas en caldo extracto de suelo durante 7 días.....	79

**Tabla 17.** Prueba de Kruskal – Wallis de la concentración de amonio (ppm) por *Azospirillum* spp. .... 80

**Tabla 18.** Prueba de Kruskal – Wallis de la concentración de amonio (ppm) por *Burkholderia* spp..... 81

**Tabla 19.** Prueba de Kruskal – Wallis de la concentración de amonio (ppm) por *Azotobacter* spp..... 81

**Tabla 20.** Prueba de Kruskal – Wallis de la concentración de amonio (ppm) por *Beijerinckia* spp..... 82

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b>	Ubicación del lugar de muestreo correspondiente a la Estación Experimental Agraria Vista Florida en Lambayeque, 2014.....	16
<b>Figura 2.</b>	Ubicación de los campos de cultivo de <i>Oryza sativa</i> L. en la Estación Experimental Agraria Vista Florida, donde se realizó el muestreo de raíces y suelo rizosférico durante marzo – mayo de 2014.....	19
<b>Figura 3.</b>	Cultivo de <i>Oryza sativa</i> L. en macollamiento.....	20
<b>Figura 4.</b>	Extracción de raíces con suelo rizosférico de <i>Oryza sativa</i> L.....	20
<b>Figura 5.</b>	Muestras de plantas de <i>Oryza sativa</i> L. para el aislamiento de bacterias rizosféricas.....	21
<b>Figura 6.</b>	Procedimiento para el aislamiento de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno.....	24
<b>Figura 7.</b>	Deshidratado bajo sombra de raíces y suelo rizosférico de <i>Oryza sativa</i> L.....	25
<b>Figura 8.</b>	Corte de raíces con suelo rizosférico de <i>Oryza sativa</i> L.....	25
<b>Figura 9.</b>	Inmersión de fragmentos de raíces con suelo rizosférico de <i>Oryza sativa</i> L. en solución salina esterilizada.....	26
<b>Figura 10.</b>	Agitación de raíces y suelo rizosférico de <i>Oryza sativa</i> L. en solución salina esterilizada.....	26
<b>Figura 11.</b>	Suspensión de raíces y suelo rizosférico de <i>Oryza sativa</i> L. en solución salina esterilizada.....	27
<b>Figura 12.</b>	Siembra en medios semisólidos mediante la técnica de puntura.....	27
<b>Figura 13.</b>	Siembra en medios sólidos mediante la técnica de agotamiento y estría.....	28

<b>Figura 14.</b>	Medios semisólidos libres de nitrógeno para el aislamiento de bacterias.....	28
<b>Figura 15.</b>	Película blanquecina y viraje del indicador por bacterias fijadoras de nitrógeno en medio semisólido.....	29
<b>Figura 16.</b>	Primer (a) y segundo (b) subcultivo de bacterias fijadoras de nitrógeno en medio semisólido.....	29
<b>Figura 17.</b>	Suspensión de bacterias fijadoras de nitrógeno en solución salina esterilizada.....	31
<b>Figura 18.</b>	Siembra de bacterias microaerófilas fijadoras de nitrógeno en medio sólido.....	31
<b>Figura 19.</b>	Colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno en medio JNFb.....	32
<b>Figura 20.</b>	Cultivos puros de bacterias microaerófilas fijadoras de nitrógeno.....	32
<b>Figura 21.</b>	Medios sólidos libres de nitrógeno para el aislamiento de bacterias aerobias.....	33
<b>Figura 22.</b>	Bacterias aerobias fijadoras de nitrógeno desarrolladas en medio sólido LG.....	33
<b>Figura 23.</b>	Bacterias aerobias fijadoras de nitrógeno cultivadas por segunda vez en medio LG.....	34
<b>Figura 24.</b>	Cultivos puros de bacterias aerobias fijadoras de nitrógeno.....	34
<b>Figura 25.</b>	Cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno en agar nutritivo.....	40
<b>Figura 26.</b>	Procedimiento para la cuantificación de nitrógeno fijado <i>in vitro</i> por bacterias.....	41
<b>Figura 27.</b>	Caldo extracto de suelo cultivado en bacterias diazotróficas.....	42

<b>Figura 28.</b>	Adición de KCl al caldo extracto de suelo.....	44
<b>Figura 29.</b>	Centrifugación del caldo extracto de suelo mezclado con KCl.....	44
<b>Figura 30.</b>	Adición de solución alcohólica de fenol al caldo extracto de suelo.....	45
<b>Figura 31.</b>	Adición de nitroprusiato de sodio al caldo extracto de suelo.....	45
<b>Figura 32.</b>	Adición de solución oxidante al caldo extracto de suelo.....	46
<b>Figura 33.</b>	Bacterias rizosféricas cultivadas en medio sólido sin nitrógeno.....	46
<b>Figura 34.</b>	Selección de una colonia bacteriana representativa.....	47
<b>Figura 35.</b>	Suspensión de colonia bacteriana en Eppendorf con agua bidestilada. ....	47
<b>Figura 36.</b>	Calentamiento de bacterias en baño maría.....	48
<b>Figura 37.</b>	Eppendorf con material genético de bacteria fijadora de nitrógeno.....	50
<b>Figura 38.</b>	Película blanquecina y viraje del indicador por bacterias fijadoras de nitrógeno en cinco medios semisólidos, NFb (a), LGI (b), LGI-P (c), JNFb (d), JMV (e).....	52
<b>Figura 39.</b>	Película bacteriana y viraje del indicador por bacterias diazótrofes en medio NFb.....	53
<b>Figura 40.</b>	Frecuencia de suelo rizosférico 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 41.</b>	Película bacteriana y viraje del indicador por bacterias diazótrofes en medio LGI.....	54

<b>Figura 42.</b>	Frecuencia de suelo rizosférico 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 43.</b>	Película bacteriana y viraje del indicador por bacterias diazótrofes en medio LGI-P.....	56
<b>Figura 44.</b>	Frecuencia de suelo rizosférico de <i>Oryza sativa</i> L. con bacterias fijadoras de nitrógeno, observadas en LGI-P después de la siembra y tres subcultivos, 2014.....	56
<b>Figura 45.</b>	Película bacteriana y viraje del indicador por bacterias diazótrofes en medio JNFb.....	57
<b>Figura 46.</b>	Frecuencia de suelo rizosférico de <i>Oryza sativa</i> L. con bacterias fijadoras de nitrógeno, observadas en JNFb después de la siembra y tres subcultivos, 2014.....	57
<b>Figura 47.</b>	Película bacteriana por bacterias diazotróficas en medio JMV.....	58
<b>Figura 48.</b>	Frecuencia de suelo rizosférico de <i>Oryza sativa</i> L. con bacterias fijadoras de nitrógeno, observadas en JMV después de la siembra y tres subcultivos, 2014.....	58
<b>Figura 49.</b>	Frecuencia de suelo rizosférico de <i>Oryza sativa</i> L. con bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en cinco medios semisólidos después de tres subcultivos.....	59
<b>Figura 50.</b>	Bacterias microaerófilas fijadoras de nitrógeno aisladas en medios NFb, LGI, LGI-P, JNFb, JMV.....	59
<b>Figura 51.</b>	Frecuencia de <i>Azospirillum</i> spp. en bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en NFb.....	60
<b>Figura 52.</b>	Frecuencia de <i>Azospirillum</i> spp. en bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en LGI.....	60
<b>Figura 53.</b>	Frecuencia de <i>Burkholderia</i> spp. en bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en JMV.....	61

<b>Figura 54.</b>	Frecuencia de <i>Azospirillum</i> y <i>Burkholderia</i> en suelo rizosférico de <i>Oryza sativa</i> L., en Lambayeque, 2014.....	63
<b>Figura 55.</b>	Frecuencia de las bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas y aerobias en las diferentes variedades de <i>Oryza sativa</i> L.....	63
<b>Figura 56.</b>	Colonias de bacterias en medio LG.....	64
<b>Figura 57.</b>	Colonias de bacterias en medio LGD.....	64
<b>Figura 58.</b>	Colonias de bacterias en medio Beijerinckia.....	65
<b>Figura 59.</b>	Frecuencia de suelo rizosférico de <i>Oryza sativa</i> L. con bacterias aerobias fijadoras de nitrógeno aisladas en tres medios sólidos.....	65
<b>Figura 60.</b>	Bacterias aerobias fijadoras de nitrógeno aisladas en medios sólidos LG, LGD y Beijerinckia.....	66
<b>Figura 61.</b>	Frecuencia de <i>Azotobacter</i> spp. y <i>Beijerinckia</i> spp. en suelo rizosférico de <i>Oryza sativa</i> L., en Lambayeque, 2014.....	66
<b>Figura 62.</b>	Observación macroscópica de colonias representativas de <i>Azospirillum</i> spp. en medio NFb sólido.....	68
<b>Figura 63.</b>	Observación macroscópica de colonias representativas de <i>Burkholderia</i> spp. desarrolladas en medio JMV sólido.....	69
<b>Figura 64.</b>	Utilización de carbohidratos como fuente de carbono y tolerancia al NaCl 3% por <i>Azospirillum</i> .....	69
<b>Figura 65.</b>	Hidrólisis de la gelatina por <i>Azospirillum</i> .....	70
<b>Figura 66.</b>	Porcentaje (%) de especies de <i>Azospirillum</i> fijadoras de nitrógeno aisladas en el medio NFb y LGI, en Lambayeque 2013.....	70
<b>Figura 67.</b>	Descarboxilación de la lisina (LIA) por <i>Burkholderia</i> spp.....	71
<b>Figura 68.</b>	Resistencia a la polimixina B por <i>Burkholderia</i> spp.....	71



<b>Figura 69.</b>	Observación macroscópica de colonias representativas de <i>Azotobacter</i> spp. desarrolladas en medio LG sólido.....	72
<b>Figura 70.</b>	Observación macroscópica de colonias representativas de <i>Beijerinckia</i> spp. desarrolladas en medio Beijerinckia sólido.....	73
<b>Figura 71.</b>	Acidificación de carbohidratos por <i>Azotobacter</i> spp.....	73
<b>Figura 72.</b>	Utilización de citrato como fuente de carbono por <i>Beijerinckia</i> spp.	74
<b>Figura 73.</b>	Coloración observada en la cuantificación del nitrógeno fijado como amonio.....	76

## I. INTRODUCCION

El cultivo de *Oryza sativa* L. "arroz" constituye un alimento básico en Asia, América Latina y el Caribe. El cereal proporciona el 20% del suministro de energía alimenticia del mundo, en tanto que a *Triticum aestivum* L. "trigo" le corresponde el 19% y a *Zea mays* L. "maíz" el 5% (FAO, 2004). En el Perú, como en otros países, el rendimiento está muy relacionado con la aplicación de insumos químicos que constituyen 44,6% de los costos de producción, destacando con 21,7% los fertilizantes químicos (MINAG, 2012).

Los fertilizantes químicos reponen los nutrientes removidos del suelo, a través de la cosecha de los cultivos, posibilitan el uso de variedades de alto rendimiento y contribuyen significativamente a la productividad agrícola. El uso de estos insumos ha sido crítico para el mejoramiento de suelos nutricionalmente pobres, contribuyendo con 30–50% al incremento de los rendimientos (Pelletier *et al.*, 2011).

La necesidad por fertilizantes químicos se incrementa día a día, proyectándose para el 2020 un requerimiento de 208 millones de toneladas, de los 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, han 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 las formas de amoníaco, óxidos nítrico y nitroso causan la 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).

La fijación biológica de nitrógeno es una alternativa para proveer de este elemento a las plantas. Las bacterias diazotróficas o fijadoras de nitrógeno reducen el nitrógeno molecular hasta amoníaco. Estas bacterias pueden ser rizosféricas y endófitas y forman parte de las denominadas rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR). Las PGPR benefician a los cultivos agrícolas a través de mecanismos directos como la fijación de nitrógeno, síntesis de reguladores del crecimiento, solubilización de minerales, producción de sideróforos y estimulación del sistema de absorción de iones como los nitratos. También presentan mecanismos indirectos o de biocontrol, mencionándose, la competencia por un nicho ecológico o por

nutrientes, la interacción directa con el patógeno (parasitismo y lisis enzimática), antibiosis, producción de sideróforos e inducción de resistencia sistémica en las plantas (Hernández *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2010; Nihorimbere *et al.*, 2011; Bhattacharyya & Jha, 2012).

En Lambayeque no se han realizado investigaciones para aislar y caracterizar las bacterias diazotróficas en los cultivos de arroz, requisito indispensable para trabajos posteriores en invernadero y campo, con la perspectiva de obtener un inoculante comercial. La investigación de bacterias promotoras del crecimiento como las diazotróficas requiere en primer lugar el aislamiento y caracterización en el laboratorio, para luego determinar el efecto en invernadero y campo y posteriormente investigar el incremento masivo para la comercialización. El propósito es la obtención de un paquete tecnológico que pueda ser aplicado en la región, dándole un valor agregado a los recursos propios, incrementando la rentabilidad y disminuyendo al máximo los insumos contaminantes.

En Lambayeque el arroz es un cultivo muy importante, habiéndose aprobado 30207,26 ha 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 rizosféricas fijadoras de nitrógeno en *Oryza sativa* L. "arroz", en Lambayeque?. Para resolver este problema se planteo como objetivo general obtener bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno en los suelos de arroz. Los objetivos específicos fueron aislar bacterias rizosféricas diazotróficas microaerófilas y aerobias, caracterizar fenotípicamente las bacterias, cuantificar el nitrógeno fijado e identificar el gen *nifH*. La hipótesis planteada fue Las bacterias rizoféricas aisladas de arroz son microaerófilas y aerobias, fijan nitrógeno *in vitro* y presentan el gen *nifH*.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Antecedentes de la investigación

En los sistemas pastoriles, *Lolium perenne* L. es fundamental en la alimentación animal. Con el fin de incrementar su calidad nutricional, se aislaron bacterias de la rizosféra, para investigar su capacidad de fijación de nitrógeno y síntesis de compuestos indólicos. En caldo NFb libre de nitrógeno las bacterias diazotróficas se reconocieron por el desarrollo de una película blanca, densa y ondulada bajo la superficie y se aislaron en agar Rojo Congo ácido málico, a 33°C, por 96 horas, obteniéndose 14 morfotipos. En la prueba de reducción de acetileno, las bacterias C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> alcanzaron 2507 y 2539nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> mL<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> respectivamente, así como también, sintetizaron ácido indolacético (AIA) durante 48 horas. Mediante pruebas bioquímicas se identificó *Serratia liquefaciens*; no obstante, la secuenciación del ARNr 16S correspondió a *Pantoea agglomerans* (Schoebitz, 2006).

Los géneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* y *Burkholderia* presentan potencial como biofertilizantes en diferentes cultivos agrícolas. 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 éstos, diez aislados 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) y *A. brasilense* y *A. lipoferum* fueron evaluados *in vitro*. En la fijación de nitrógeno, *A. brasilense* y *A. lipoferum* alcanzaron los mayores valores (41,08 y 46,82  $\mu\text{g N mL}^{-1}$ , respectivamente). En la producción de ácido indolacético, el aislado I-31 alcanzó el mayor valor (13,47  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Se concluyó que las bacterias diazotróficas aisladas de cultivares de la región tienen potencial como inoculantes, para el cultivo de arroz (Vicentini, 2006).

La deficiencia de nitrógeno es una de las principales causas de la pérdida de competitividad de los sistemas ganaderos. En este contexto, se realizó un estudio para aislar bacterias diazotróficas asociadas a pastos y realizar la caracterización molecular de las promisorias, para una futura inoculación en plantas. En los lugares de muestreo se obtuvieron plantas de *Panicum maximum*, *Dichantium aristatum* y *Brachiaria* sp. y se aislaron bacterias de suelo rizosférico, raíces, hojas y tallos en medios de cultivo semiespecíficos sólidos y semisólidos, sin fuente de nitrógeno. Se obtuvieron 352 aislados, en diez grupos, según sus características fenotípicas. Mediante la prueba de reducción de acetileno se seleccionaron once aislados bacterianos y con el análisis del ARNr 16S se identificó *Klebsiella pneumoniae*, *Azospirillum brasilense* y *Klebsiella* sp. (Garrido, 2007).

La necesidad apremiante de estrategias sostenibles para la agricultura requiere el 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 al NaCl 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 hidroxipatita. Por su parte, con los macerados de las semillas se aislaron 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).

La fertilización química suple las necesidades de nitrógeno para el cultivo del arroz; sin embargo, bajo un manejo inadecuado causa contaminación. Como alternativa, se investigaron bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Azospirillum*. Fragmentos de raíces previamente desinfectados se sembraron en medio NFb semisólido, donde las bacterias diazotróficas se reconocieron por una película blanquecina bajo la superficie y el viraje del indicador. El aislamiento se realizó en agar Rojo de Congo, obteniéndose 96 cultivos bacterianos, con los que se investigó la fijación de nitrógeno y producción de ácido indolacético por el método colorimétrico del Berthelot y Salkoski, respectivamente. Se alcanzaron 7,95 - 29,09ppm de amonio y 2,69 – 38,02ppm de ácido indolacético, por lo que se concluyó que estas bacterias son promisorias para su utilización como biofertilizantes en el cultivo de arroz (García & Muñoz, 2010).

La aplicación de las PGPR en el campo requiere estudios previos que garanticen su establecimiento y efectividad. Con este propósito se aisló *Azospirillum* sp. de raíces de maíz. Las raíces se fragmentaron, se esterilizaron superficialmente con etanol, cloramina y se enjuagaron con agua destilada. Después, se sembraron en medio de cultivo semigelificado y

las bacterias se aislaron en medio sólido. La caracterización de *Azospirillum* sp. se hizo con base a la morfología colonial y microscópica y la selección por la actividad de la enzima nitrogenasa, N<sup>2</sup>asa, mediante la reducción del acetileno. Los valores de la N<sup>2</sup>asa oscilaron entre 0 a 281,5nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> planta<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>. Las bacterias con los mayores valores se inocularon en plántulas de 13 días en hidroponía, determinándose la mayor infección (91%) en la zona basal de la raíz, disminuyendo con la profundidad radicular media (86%) y apical (84%), concluyéndose que la dinámica poblacional de *Azospirillum* spp. estuvo relacionada con la concentración de oxígeno y nitrógeno (Rangel *et al.*, 2011).

Con el objetivo de obtener bacterias que puedan ser investigadas a nivel de invernadero y posteriormente en campo, se aislaron bacterias diazotróficas de la rizósfera de *Olea europea* "olivo". Se tomaron alícuotas de las muestras previamente enriquecidas y se sembraron en agar sin nitrógeno, obteniendo 104 aislados. El 58,65% produjo ácido indolacético, alcanzando 46,47ug ml<sup>-1</sup> con *Sphingobium scionense*. El 25,96% solubilizó fosfato tricálcico, alcanzando 5,84cm<sup>2</sup> con *Erwinia tasmaniensis*. A su vez, 47% de bacterias incrementó la germinación de semillas de alfalfa; 42,3% no la afectó y 12,5% la redujo. Se identificaron molecularmente 20 bacterias fijadoras de nitrógeno, correspondiendo a *Novosphingobium scionense*, *N. resinovorum*, *Burkholderia metallica*, *Rhizobium massiliae*, *Klebsiella pneumoniae* ssp. *rhinoscleromatis*, *Azotobacter vinelandii*, *Erwinia tasmaniensis* y *Raoultella planticola*. El incremento de la germinación, junto con la producción de AIA y solubilización de fosfatos, indica el potencial de las bacterias como inoculantes para el cultivo de olivo (Clavijo *et al.*, 2012).

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 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 el análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado ARDRA 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).

*Azotobacter* y *Azospirillum* son bacterias utilizadas como promotoras del crecimiento vegetal debido a su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico y producir hormonas de tipo indólico. Estas bacterias se aislaron de la rizósfera de cultivos de *Gossypium hirsutum* “algodón”. Las poblaciones microbianas se caracterizaron fenotípicamente en los medios de cultivo semiespecíficos: Ashby y LG (*Azotobacter* sp.) y NFb, LGI y Batata (*Azospirillum* sp.). La promoción de crecimiento vegetal se determinó mediante la actividad de la enzima nitrogenasa, por la técnica de reducción de acetileno y producción de indoles por el método colorimétrico de Salkowsky. Se obtuvieron nueve aislados de *Azotobacter* sp. y cuatro de *Azospirillum* sp., observándose diferencias significativas en la actividad N’asa, con un rango de  $19,87 - 460,60 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ mL}^{-1}\text{h}^{-1}$  y en la producción de indol se alcanzó  $20,08 \text{ ug mL}^{-1}$  (Guzmán *et al.*, 2012 ).

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal se adaptan, colonizan y persisten en la rizosféra de la planta, lo cual favorece su crecimiento y desarrollo. Se aislaron 32 bacterias diazotróficas, de muestras de suelo rizosférico de diferentes cultivos y se identificaron con los medios de cultivo tradicionales y el sistema BBL CRYSTAL. Nueve aislados correspondieron a *Stenotrophomonas maltophilia* y uno a *Azotobacter vinelandii*. Después, se realizó un ensayo en invernadero para determinar el efecto fertilizante en plantas de maíz, con un diseño experimental de bloques al azar y nueve

tratamientos, por triplicado: T1: *A. vinelandii* ATCC 9046; T2 a T7 para los seis aislados; T8 para fertilización química y T9 para suelo sin fertilización (testigo). Los aislados M8-10, M10-1 y M11-3, identificados como *S. maltophilia* incrementaron la emergencia de las plantas, considerándose por tanto como potencial biofertilizante (Moreno *et al.*, 2013).

## **2.2 Base teórica**

### **a. Fijación biológica de nitrógeno, FBN**

La disponibilidad del carbono y nitrógeno en los organismos vivos a partir del gas carbónico y el nitrógeno molecular del aire se da a través de la fotosíntesis y fijación biológica del 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 contiene 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.*, 2004).

Todos los microorganismos reductores de  $N_2$  presentan actividad del complejo enzimático N-asa, constituida por dos metaloproteínas: proteína I “dinitrogenasa o hierro - molibdeno - proteína” y proteína II “dinitrogenasa reductasa o hierro – proteína”. El complejo N-asa requiere 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 la subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  están ligadas los grupos P (4Fe-4S) y los dos grupos FeMoCo unidos a la subunidad  $\alpha$ , llevándose a cabo el transporte de electrones para la reducción

del N<sub>2</sub>. 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<sub>2</sub> (Elmerich, 2012).

Según su localización las bacterias diazótroficas 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.*, (1992) 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. 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; Loaces, 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 la 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 rizoplano y después invadir los tejidos vegetales, a través de grietas formadas en los lugares de emergencia de las raíces laterales vegetales. Al igual que las endófitas pasajeras, se limitan al córtex radicular. Por su parte, los endófitos competentes, 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 encuentra 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 en forma vertical o vía vectores. La colonización activa involucra tres pasos. El primero es el acercamiento espacial de la bacteria a 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 por 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).

#### **b. Cultivo de *Oryza sativa* L. "arroz"**

El arroz (*Oryza sativa* L.) es una especie perteneciente a la familia de las gramíneas (Poaceas), cuyo fruto es comestible y constituye la base de la dieta de casi la mitad de la población mundial. Las especies asiáticas *perennes* conocidas como *O. ruffipogon* y *O. nivara* son los progenitores de la especie cultivada *O. sativa* L., mientras que las especies africanas *perennes* *O. barthii* y *O. breviligulata* son los progenitores directos de la especie *O. glaberrima* Steud., cultivada básicamente en el oeste del África (Acevedo *et al.*, 2006).

El sistema taxonómico para el género *Oryza*, está basado en el sugerido por Sharma y Shastry en 1965, con ciertas modificaciones. En esta propuesta, 24 especies fueron reorganizadas y colocadas en tres secciones: la sección *Padia* en 3 series y 6 especies; la sección *Oryza* en 3 series y 17 especies y la sección *Brachyantha* en una serie y una especie (Lu, 2004).

La taxonomía del arroz mencionada por Lu (2004) y Llatas (2006) es:

Dominio	:	Eukarya
Reino	:	Plantae
Sub-reino	:	Tracheobionta
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Liliopsida
Sub-clase	:	Commelinidae
Orden	:	Poales
Familia	:	Poaceae
Sub-familia	:	Bambusoideae
Tribu	:	Oryzeae
Género	:	<i>Oryza</i>

El arroz es una planta cuyo sistema radicular principal es adventicio. El tallo es erecto y cilíndrico, normalmente presenta cuatro a seis entrenudos alargados, con más de 1 cm, al momento de la cosecha. En cada nudo se forma una yema y una hoja. Las hojas son de lámina larga, compuestas de dos partes: una lámina y una vaina hendida longitudinalmente que abraza una porción del tallo, rodeando un internudo completo. La altura de la planta es una función del número y longitud de los entrenudos, que aunque son características varietales definidas, pueden variar por efectos ambientales. Las flores son verdes, dispuestas en espiguillas y en conjunto constituyen una panícula. La espiguilla es la unidad de la inflorescencia y encierra una sola flor que lleva el lema y la palea. Las inflorescencias o panículas corresponden a prolongaciones de los tallos a partir del último nudo. Las

panículas permanecen erectas durante la floración y a medida que los granos van llenando se doblan sobre sus propios ejes (Zamolloa, 2008).

El arroz es una planta de suelos húmedos e inundados. Es cultivado desde el nivel del mar hasta alturas superiores a 2500 msnm y desde los 49° latitud norte a 36° latitud sur. Es un cultivo tropical y subtropical, pero la mayor producción se obtiene en climas húmedos tropicales. China es el principal país productor de arroz, donde se obtiene el 29% de la producción mundial (IRRI/USDA 2013). En las condiciones climáticas del Perú la planta de arroz concluye su ciclo de vida en 120 - 220 días. El ciclo de vida puede ser dividido en tres fases principales, con características definidas: fase vegetativa, de germinación a diferenciación de panoja; fase reproductiva, de la diferenciación de panoja a floración y fase de maduración, de floración a maduración total (Moquete, 2010).

El arroz es el alimento básico predominante para 17 países de Asia y el Pacífico, nueve países de América del Norte y del Sur y ocho países de África. El perfil de aminoácidos del arroz indica que presenta alto contenido de ácido glutámico y aspártico, en tanto que la lisina es el aminoácido limitante. También constituye una buena fuente de tiamina, riboflavina y niacina; sin embargo, el arroz, como alimento único, no proporciona todos los nutrientes necesarios para una alimentación adecuada (FAO, 2004).

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1 Material**

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

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

Se consideró como población las bacterias rizosféricas diazotrofas presentes en raíz y suelo de los cultivos de arroz en la Estación Experimental Agraria Vista Florida, del Instituto Nacional de Innovación Agraria, distrito de Picsi. Se trabajó con las bacterias aisladas de 54 muestras colectadas durante marzo-mayo de 2014. El número de muestras fue calculado según la formula 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 en estudio**

Las variables cuantitativas fueron las bacterias nativas rizosféricas fijadoras de nitrógeno.

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

El trabajo de investigación fue descriptivo y transeccional (Hernández *et al.*, 2003) 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**

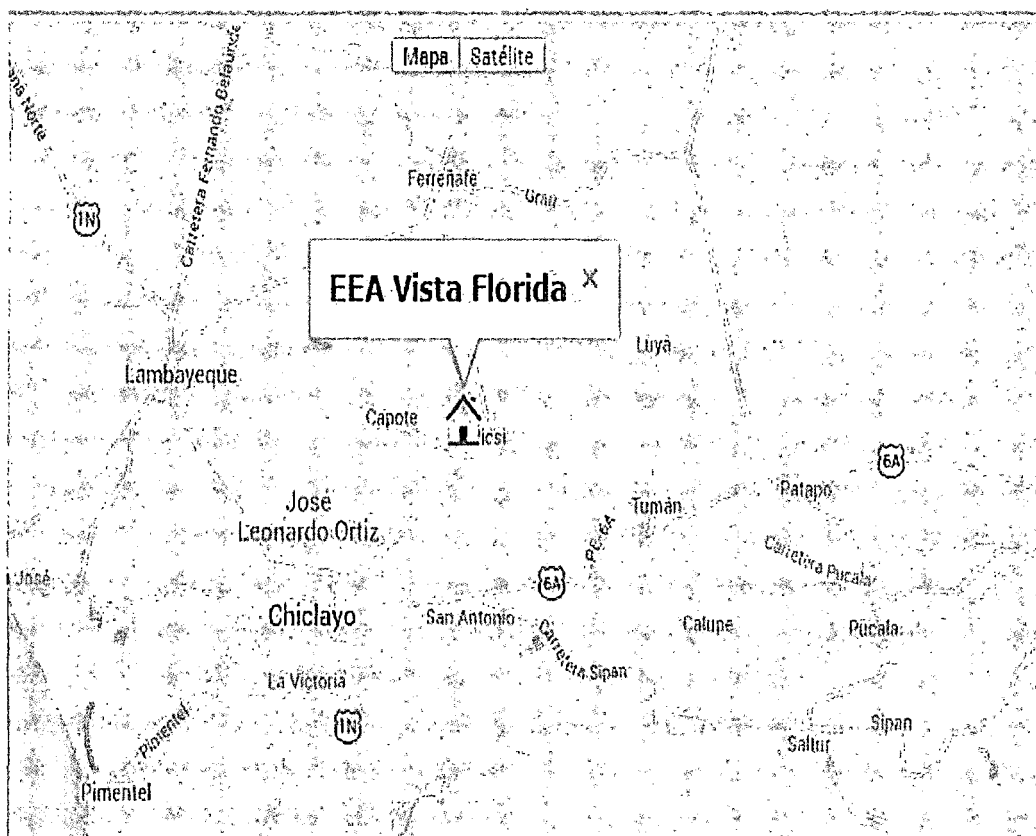
Se colectaron 54 muestras de raíces y suelo rizosférico en tres lotes de arroz en la Estación Experimental Agraria Vista Florida, distrito de Picsi, región Lambayeque (Figura 1, tabla 1), determinando la posición de los puntos de muestreo (Tabla 2) con un GPS GARMIN e Trex Vista HCx (Figura 2). La Estación Experimental Agraria Vista Florida, del Instituto Nacional de Innovación Agraria, está ubicada a 06° 43' 34" latitud sur, 74° 46' 49" longitud oeste, 30 msnm y precipitación 40mm (MINAGRI, 2014). Los lotes correspondieron a la variedades de arroz Tinajones (lote 52), IR-43 (53) y Mallares (54).

### **3.2.4 Obtención de muestras de raíz y suelo rizosférico**

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

En simultáneo al muestreo de suelo rizosférico 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.





**Figura1.** Ubicación del lugar de muestreo correspondiente a la Estación Experimental Agraria Vista Florida en Lambayeque, 2014 (<http://www.inia.gob.pe/vista-florida/ubicacion-geografica>).

**Tabla 1.** Lote de ubicación de los puntos de muestreo de raíces y suelo rizosférico de *Oryza sativa* L, durante marzo – mayo de 2014

Lote	Puntos de muestreo
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	20,21,23,24,25,26,27,28,29,31,34,35,38
Lote 53	39,40
Lote 54	45,46,49
Lote 54	40,41,42,43,44,47,51,52,54
Lote 54	48,50,53

**Tabla 2.** Posición de los campos de cultivo de *Oryza sativa* L, donde se realizó el muestreo de raíces y suelo rizosférico, durante marzo - mayo 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



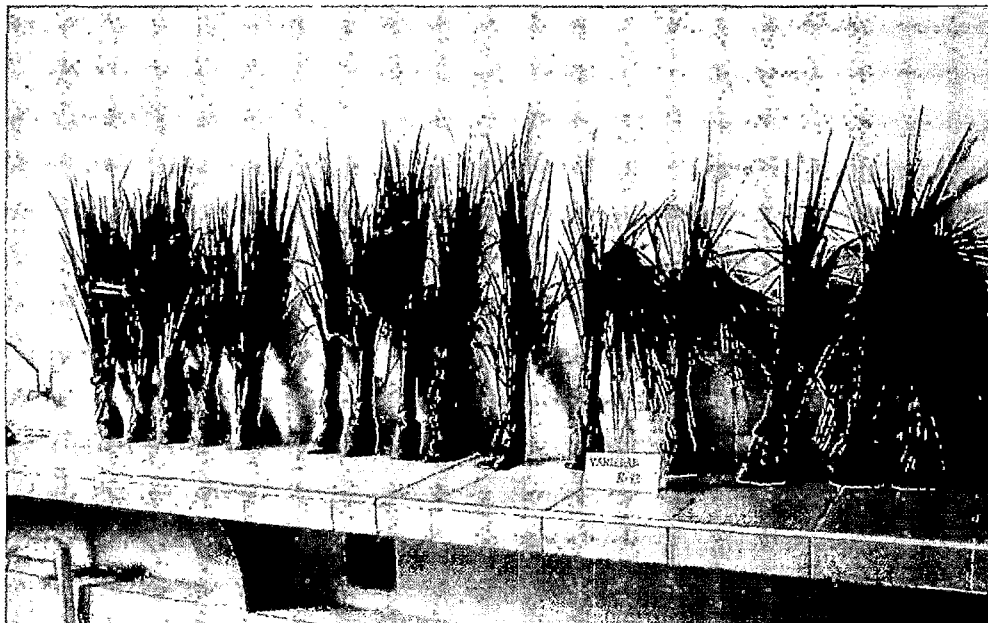
**Figura 2.** Ubicación de los campos de cultivo de *Oryza sativa* L. en la Estación Experimental Agraria Vista Florida, donde se realizó el muestreo de raíces y suelo rizosférico durante marzo – mayo de 2014.



**Figura 3.** Cultivo de *Oryza sativa* L. en macollamiento.



**Figura 4.** Extracción de raíces con suelo rizosférico de *Oryza sativa* L.



**Figura 5.** Muestras de plantas de *Oryza sativa* L. para el aislamiento de bacterias rizosféricas.

Según los resultados (Tabla 3), el suelo es medianamente alcalino (pH 7,4) y ligeramente salino ( $CE=2,50 \text{ dSm}^{-1}$ ), con textura franco arenoso-arcilloso, niveles bajos de materia orgánica (1,32%), nitrógeno (0,123%), fósforo disponible (7,0ppm) y contenido medio de potasio (327,0ppm).

### **3.2.5 Aislamiento de bacterias rizosféricas diazotróficas**

Las muestras de raíces con suelo rizosférico adherido se depositaron en bandejas de polietileno, bajo sombra, a temperatura ambiente, por 72 horas. Después, se cortaron en fragmentos de aproximadamente 5cm, aleatoriamente se tomaron submuestras de 10g de raíces junto con el suelo adherido y se depositaron en frascos de 250mL de capacidad (Figuras 6, 7, 8, 9), conteniendo 90mL de solución salina esterilizada (NaCl 0,85%, p/v). Después de agitar el contenido de los frascos ( $10^{-1}$ ) manualmente (Figura 10), durante 10 minutos, se obtuvo el sobrenadante (Figura 11), para el aislamiento de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno según Garrido (2007). Se tomó una alícuota y se sembró mediante la técnica de puntura en medios semisólidos libres de nitrógeno para bacterias microaerófilas (Figura 12) y agotamiento y estría sobre la superficie de medios sólidos para bacterias aerobias (Figura 13).

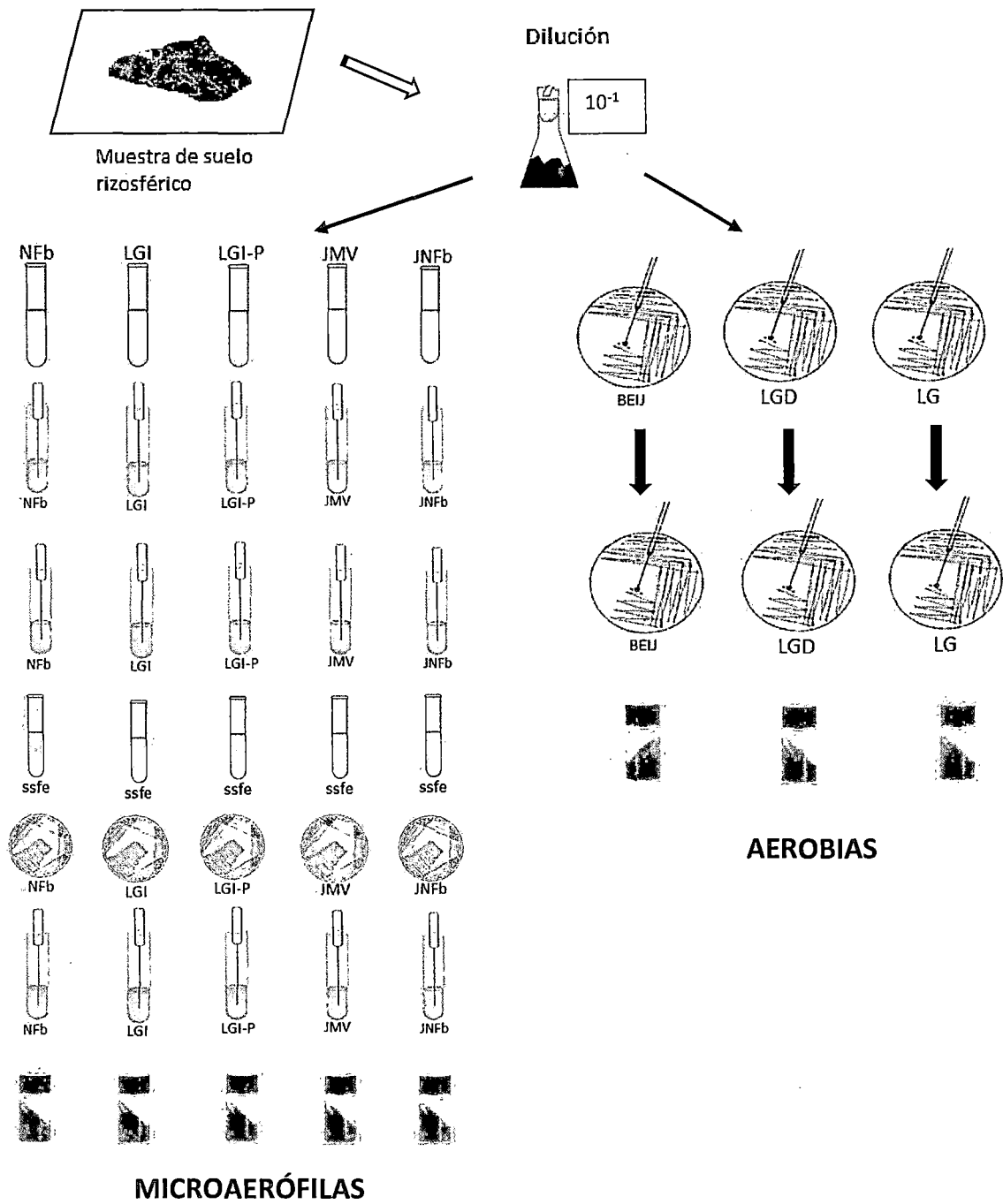
Los medios de cultivo semisólidos (Figura 14, anexo 2) fueron NFb y LGI para *Azospirillum* spp., JNFb para *Herbaspirillum* spp., LGI-P para *Gluconacetobacter* spp. y JMV para *Burkholderia* spp. (Garrido, 2007; Jha *et al.*, 2009). Después de la incubación a  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 7 días, 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 15) y se realizaron subcultivos en los mismos medios, por dos veces consecutivas (Figura 16).

**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	MO	N	P	K	Calcáreo	Textura			Tipo de suelo
		(dSm <sup>-1</sup> )	(%)	(%)	(ppm)	(ppm)	(%)	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 Ar

\* Instituto Nacional de Innovación y Extensión Agraria  
Estación Experimental Vista Florida - Chiclayo

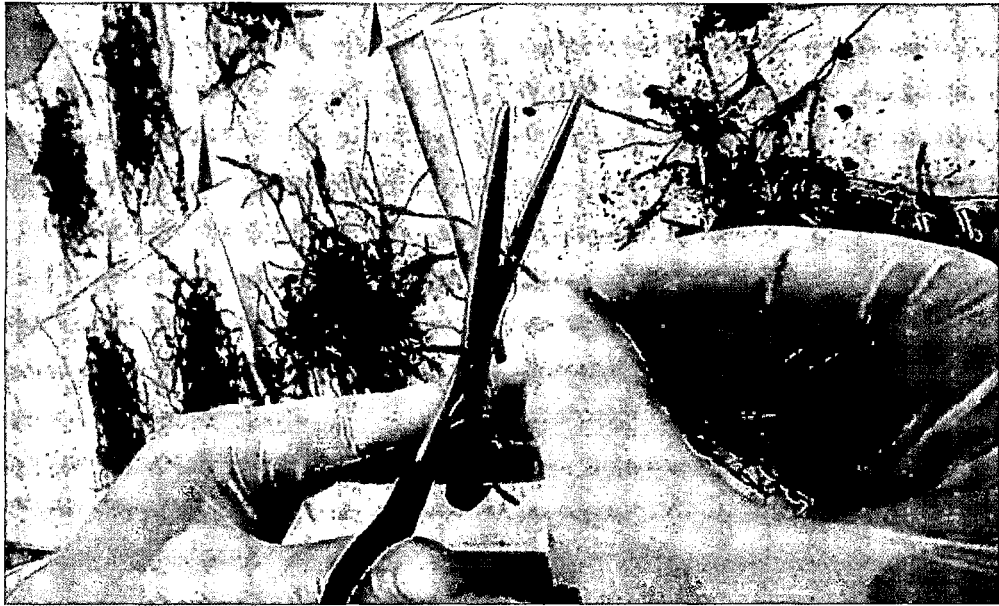




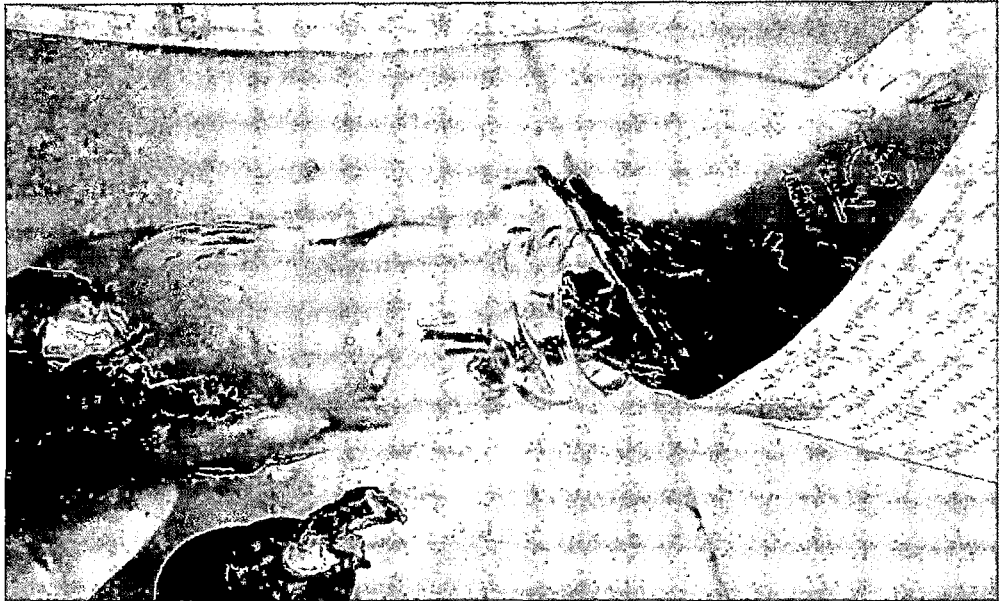
**Figura 6.** Procedimiento para el aislamiento de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno.



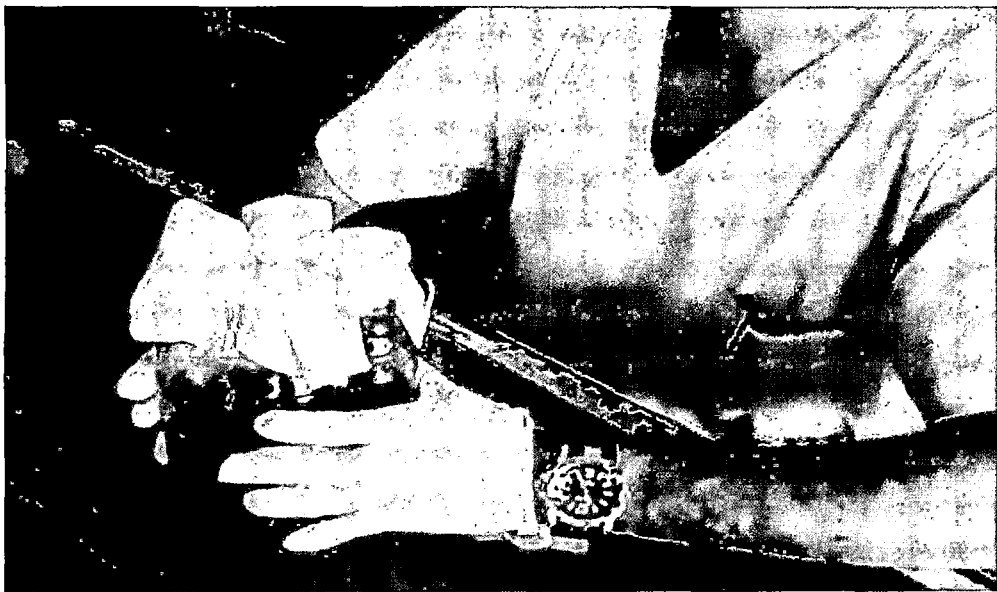
**Figura 7.** Deshidratado bajo sombra de raíces y suelo rizosférico de *Oryza sativa* L.



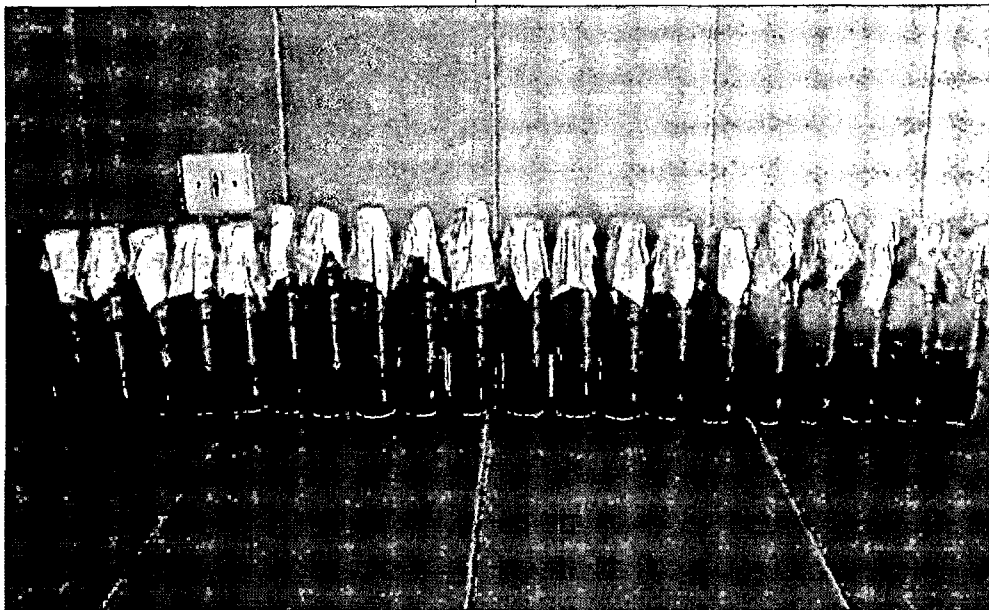
**Figura 8.** Corte de raíces con suelo rizosférico de *Oryza sativa* L.



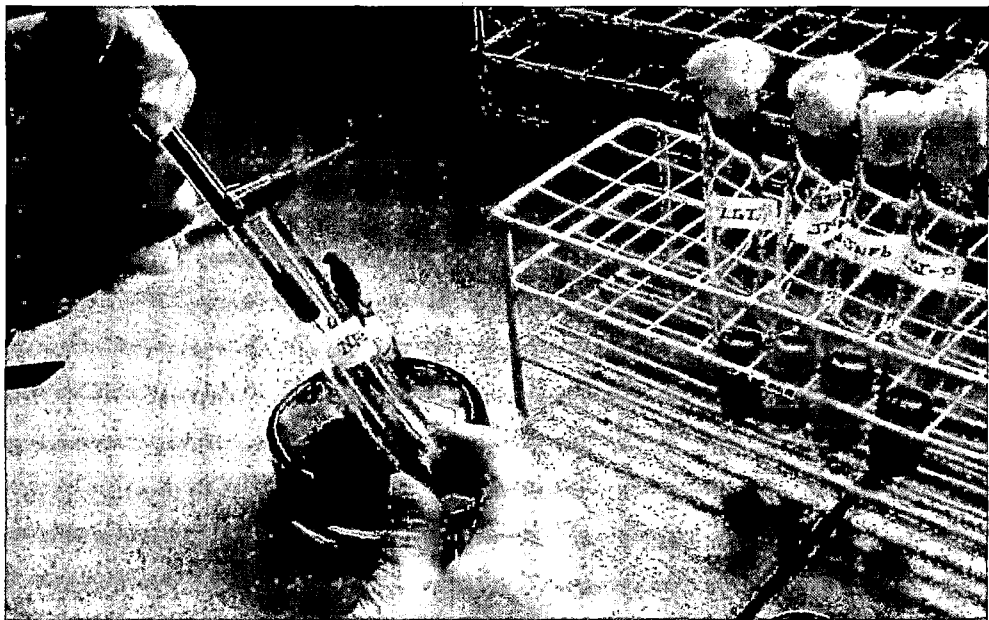
**Figura 9.** Inmersión de fragmentos de raíces con suelo rizosférico de *Oryza sativa* L. en solución salina esterilizada.



**Figura 10.** Agitación de raíces y suelo rizosférico de *Oryza sativa* L. en solución salina esterilizada.



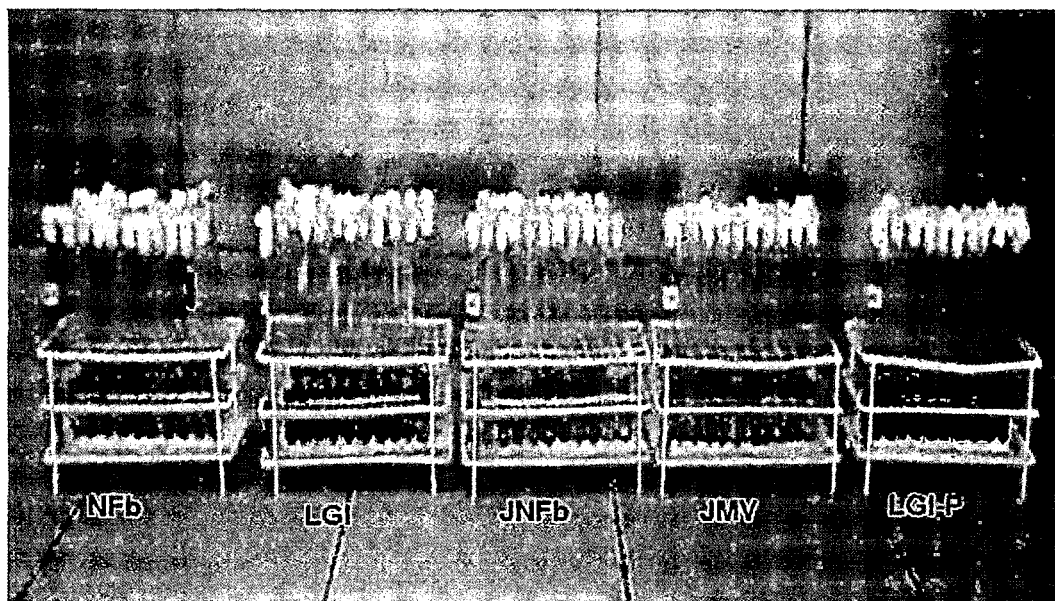
**Figura 11.** Suspensión de raíces y suelo rizosférico de *Oryza sativa* L. en solución salina esterilizada.



**Figura 12.** Siembra en medios semisólidos mediante la técnica de puntura.



**Figura 13.** Siembra en medios sólidos mediante la técnica de agotamiento y estría.



**Figura 14.** Medios semisólidos libres de nitrógeno para el aislamiento de bacterias.



**Figura 15.** Película blanquecina y viraje del indicador por bacterias fijadoras de nitrógeno en medio semisólido.



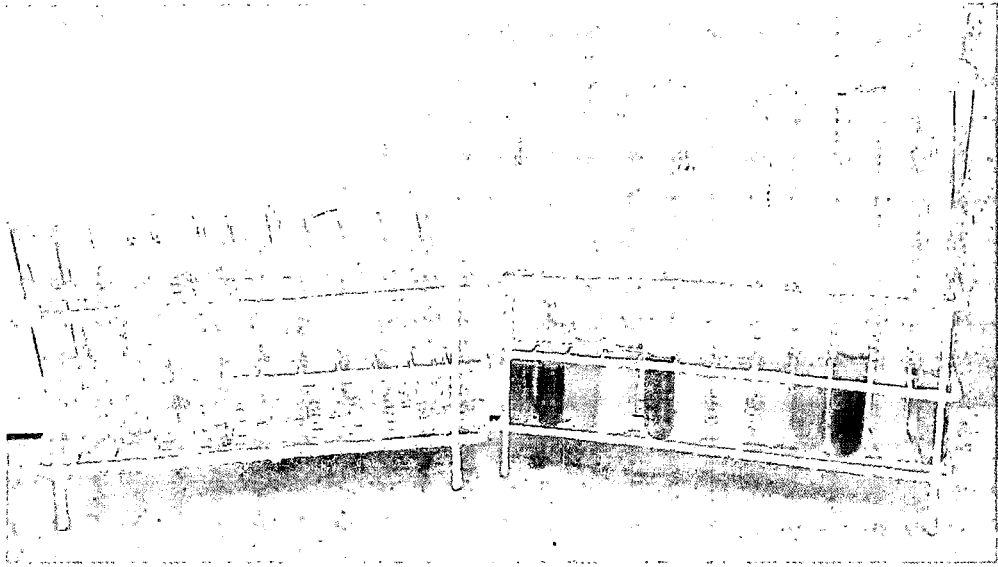
**Figura 16.** Primer (a) y segundo (b) subcultivo de bacterias fijadoras de nitrógeno en medio semisólido.

Para el aislamiento, con la película bacteriana se obtuvo una suspensión en solución salina esterilizada (Figura 17) y se sembró en los medios sólidos respectivos (Figura 18), incubando a  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 7 días. Con las colonias características (Figura 19), 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 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 20), siendo guardados en refrigeración ( $8^{\circ}\text{C}$ ).

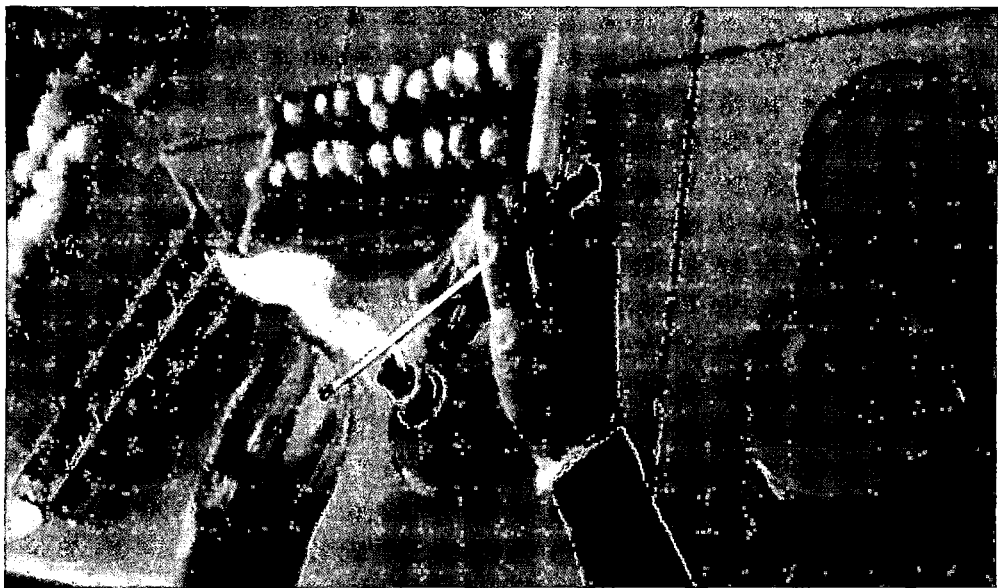
Para aislar bacterias aerobias, los medios de cultivo sólidos (Figura 21) fueron LG para *Azotobacter* spp., LGD para *Derxia* spp. y medio Beijerinckia para *Beijereinckia* spp. (Garrido, 2007; Jha *et al.*, 2009). Después de la incubación a  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 2 días, los morfotipos de las bacterias representativas (Figura 22) se cultivaron en los mismos medios sólidos, las veces requeridas para observar un desarrollo homogéneo de colonias, obteniéndose así los cultivos puros de bacterias aerobias fijadoras de nitrógeno (Figura 23). A continuación, se realizaron tinciones de Gram y las bacterias se cultivaron en agar nutritivo y su respectivo medio sólido sin nitrógeno, constituyendo los cultivos puros (Figura 24), que fueron guardados en refrigeración ( $8^{\circ}\text{C}$ ).

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

La identificación del género de las bacterias rizosféricas 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.

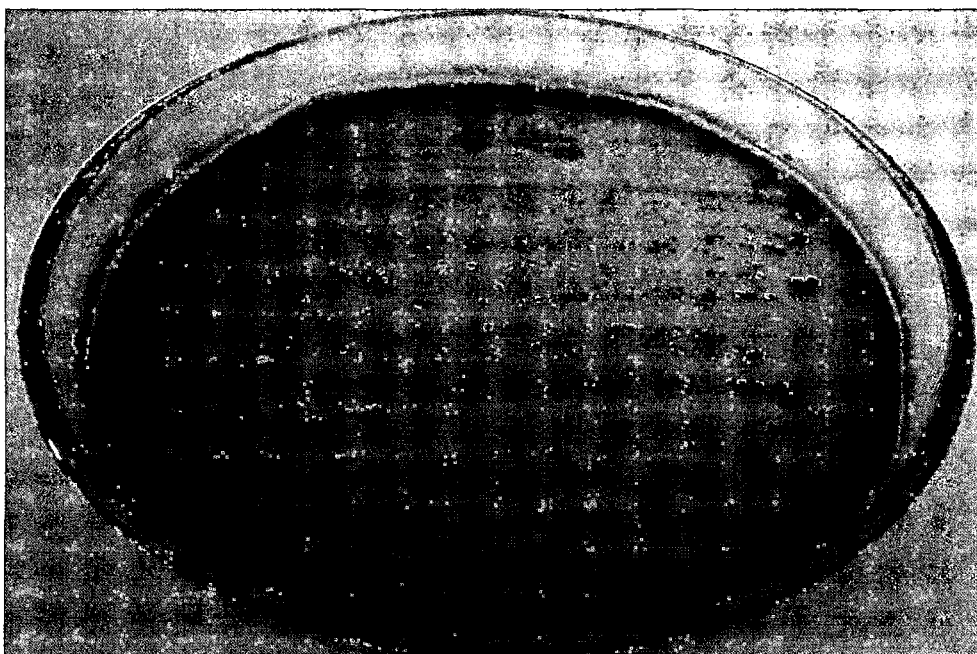


**Figura 17.** Suspensión de bacterias fijadoras de nitrógeno en solución salina esterilizada.

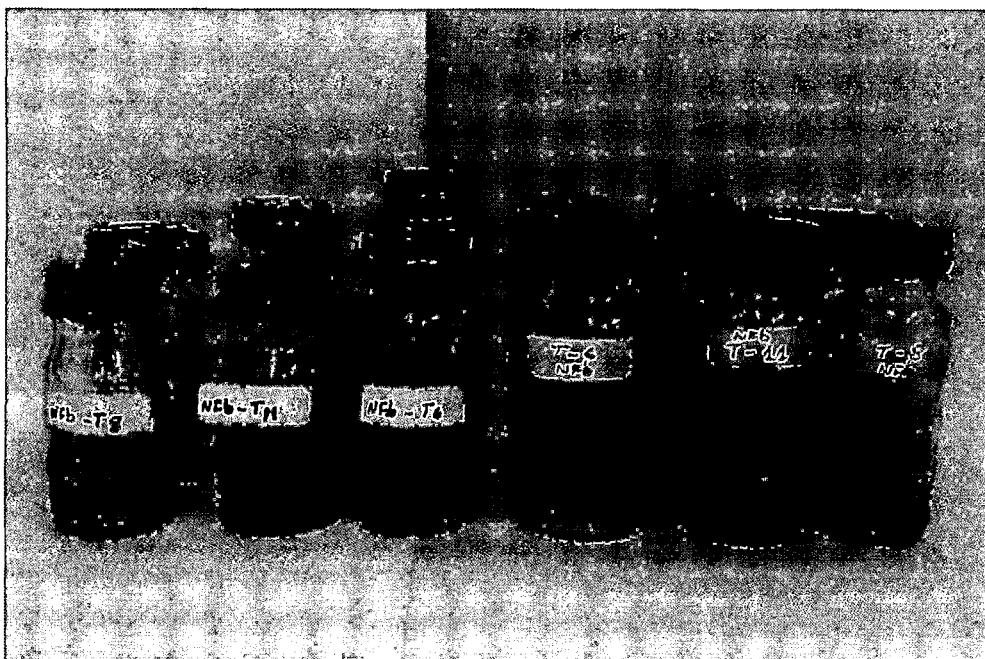


**Figura 18.** Siembra de bacterias microaerófilas fijadoras de nitrógeno en medio sólido.

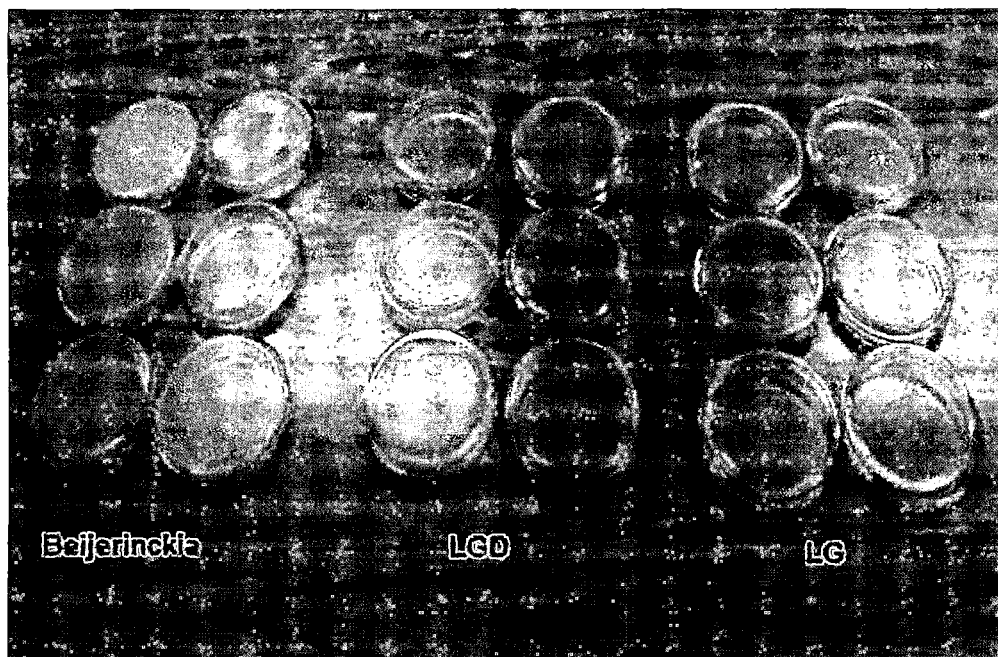




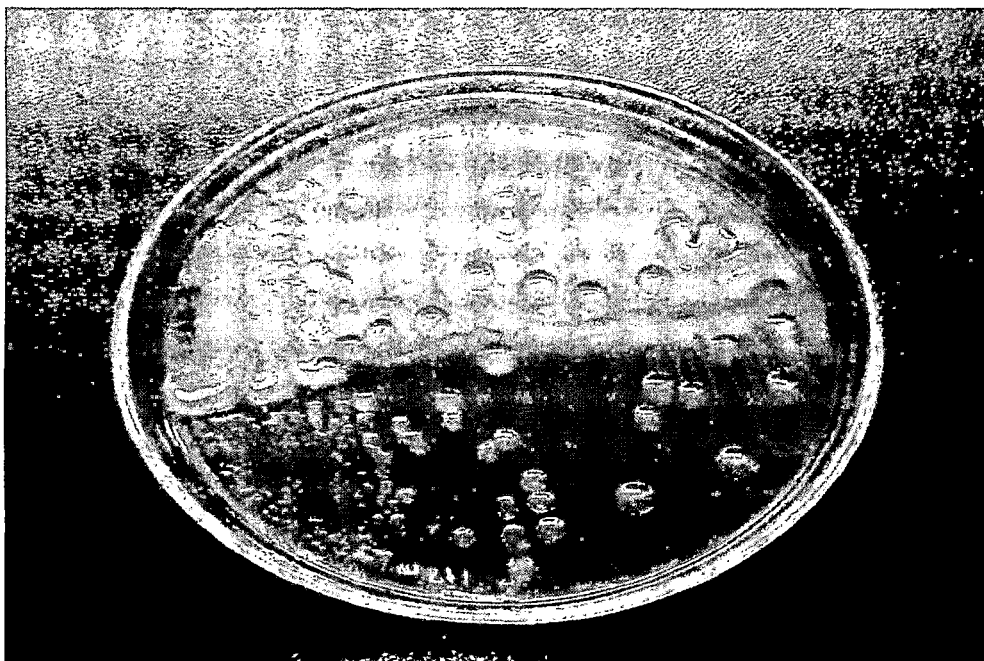
**Figura 19.** Colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno en medio JNFb.



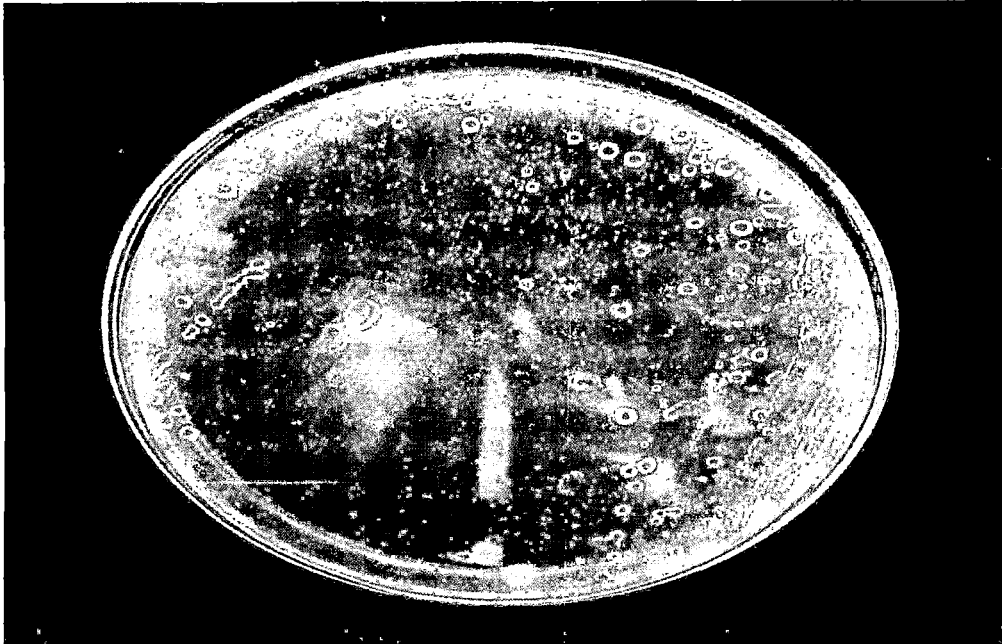
**Figura 20.** Cultivos puros de bacterias microaerófilas fijadoras de nitrógeno.



**Figura 21.** Medios sólidos libres de nitrógeno para el aislamiento de bacterias aerobias.



**Figura 22.** Bacterias aerobias fijadoras de nitrógeno desarrolladas en medio solido LG.



**Figura 23.** Bacterias aerobias fijadoras de nitrógeno cultivadas por segunda vez en medio LG.



**Figura 24.** Cultivos puros de Bacterias aerobias fijadoras de nitrógeno.

Para las bacterias microaerófilas del género *Azospirillum*, las pruebas fueron tolerancia a NaCl 3%, utilización de ácido málico, glucosa, manitol y sacarosa como fuentes de carbono para la fijación de nitrógeno, requerimiento de biotina e hidrólisis de la pectina (Tabla 4). Para el género *Herbaspirillum* se investigó el crecimiento en caldo NFb, hidrólisis de la urea y reducción de nitratos (Tabla 5). Para *Gluconacetobacter* se investigó el crecimiento en agar Batata, hidrólisis de la gelatina y almidón y utilización del citrato, glucosa y sacarosa al 30% (Tabla 6). Para *Burkholderia*, se realizaron pruebas de resistencia a la polimixina-B (300UI), descarboxilación de lisina y prueba de hidrólisis de la urea (Tabla 7).

Con las bacterias aerobias del género *Azotobacter*, las pruebas fueron acidificación de glucosa, sacarosa, maltosa y fructosa (Tabla 8). Para los géneros *Derxia* y *Beijerinckia*, las pruebas fueron producción de Indol, utilización del citrato como fuente de carbono y crecimiento en 1% de agua peptonada (Tablas 9,10).

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

Las bacterias rizosféricas diazotróficas identificadas (Figura 25) se sembraron en medio sólido sin nitrógeno y 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 rizosféricas, se utilizó el método colorimétrico del fenolhipoclorito (Figura 26, anexo 3), descrito por Lara *et al.* (2007) y Cadena & Martínez (2011). Cada bacteria cultivada en el medio sólido libre de nitrógeno correspondiente, por 48 horas, fue inoculada por triplicado en tubos de 15 x 150mL conteniendo 3mL de caldo extracto de suelo 10% (Figura 27) y se incubaron a 30°C, por 72 horas, en agitación constante (150rpm).

**TABLA 4.** Características diferenciales de las especies de *Azospirillum* spp.

Características*	<i>A. brasilense</i>	<i>A. lipoferum</i>	<i>A. halopreferens</i>	<i>A. irakense</i>	<i>A. amazonense</i>
Pleomorfismo	-	+	+	+	+
Tinción Gram	-	-	-	-	-
Motilidad	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+
Biotina	-	+	+	-	-
NaCl 3%	+/-	-	+	+	-
Ureasa	+	+	+	+	+
Gelatinasa	-	-	-	-	-
NO <sub>3</sub> -NO <sub>2</sub>	+	+	+	+	+
PHA	+	+	+	+	+
Fuente de C:					
- Ac. Málico	+	+	+	+	+
- Glucosa	-	+	-	-	+
- Manitol	-	+	+	-	-
- Sacarosa	-	-	-	+	+

\* (+) positivo; (-) negativo

\* Brenner *et al.* (2005); Garrido, (2007); Mehnaz *et al.* (2007); Reyes, (2011); Carrera, (2012).

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

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

- (+) positivo; (-) negativo.
- Eckert, *et al.* (2001); Brenner *et al.* (2005); Schoebitz, (2006); Garrido, (2007).

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

Características *	<i>Gluconoacetobacter</i> spp.
Células	Bacilos pequeños
Tinción de Gram	-
Motilidad	+
Catalasa	+
Oxidasa	+
Hidrolisis de urea	+
Hidrolisis de gelatina	-
Hidrolisis de almidón	+
Reducción de nitratos	
Fuente de C :	
- 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.

Características *	<i>Burkholderia</i> spp.
Células	Bacilos rectos
Tinción de Gram	-
Motilidad	+
Catalasa	+
Oxidasa	+
Hidrolisis de gelatina	+
Descarboxilación de lisina	+
Resistencia a Polimixina B (300 UI)	+
Fuente de C :	
- Ácido málico	+
- Glucosa	+
- Manitol	+
- Sacarosa	+

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

\* Eckert, *et al.* (2001);Brenner *et al.* (2005); Mora *et al.* (2007) ); Gonzáles, (2009);.

**Tabla 8.** Características diferenciales de *Azotobacter* spp.

Características *	<i>Azotobacter</i> spp.
Células	Bacilos grandes
Tinción de Gram	-
Motilidad	+
Catalasa	+
Oxidasa	+
Acidificación de:	
- Glucosa	+
- Maltosa	+
- Sacarosa	+
- Fructosa	+

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

\* Brenner *et al.* (2005); Mora *et al.* (2007); Gonzáles, (2009)

**Tabla 9.** Características diferenciales de *Derxia* spp.

Características *	<i>Derxia</i> spp.
Células	Bacilos pequeños
Tinción de Gram	-
Motilidad	+
Catalasa	+
Oxidasa	+
Producción de Indol	+
Utilización de Citrato	+
Crecimiento en 1% Peptona	+
Acidificación de :	
- Glucosa	+
- Manitol	+
- Sacarosa	+

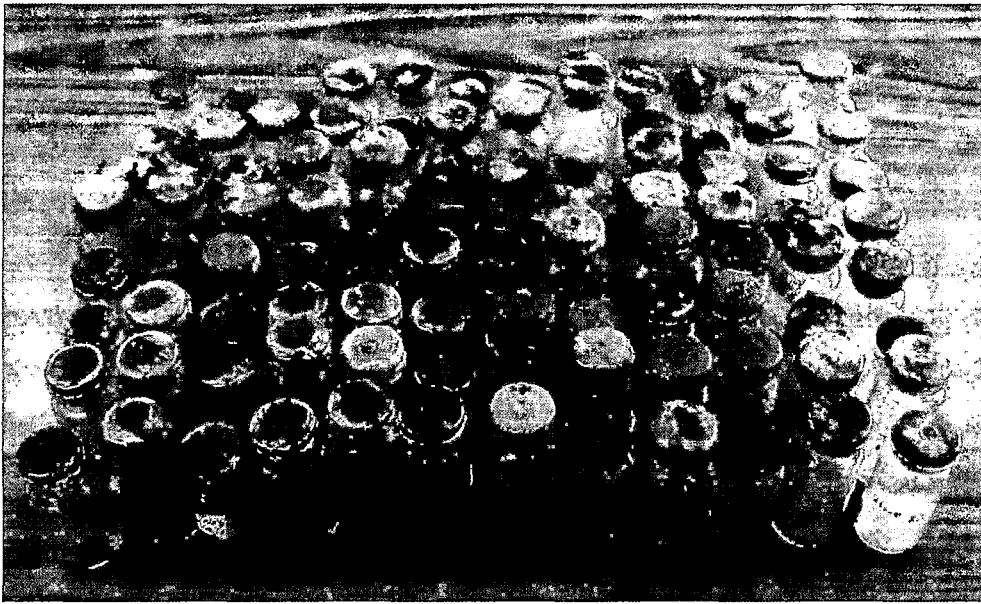
\* (+) positivo; (-) negativo.  
\* Kennedy, (2004); Brenner *et al.* (2005).

**Tabla 10.** Características diferenciales de *Beijerinckia* spp.

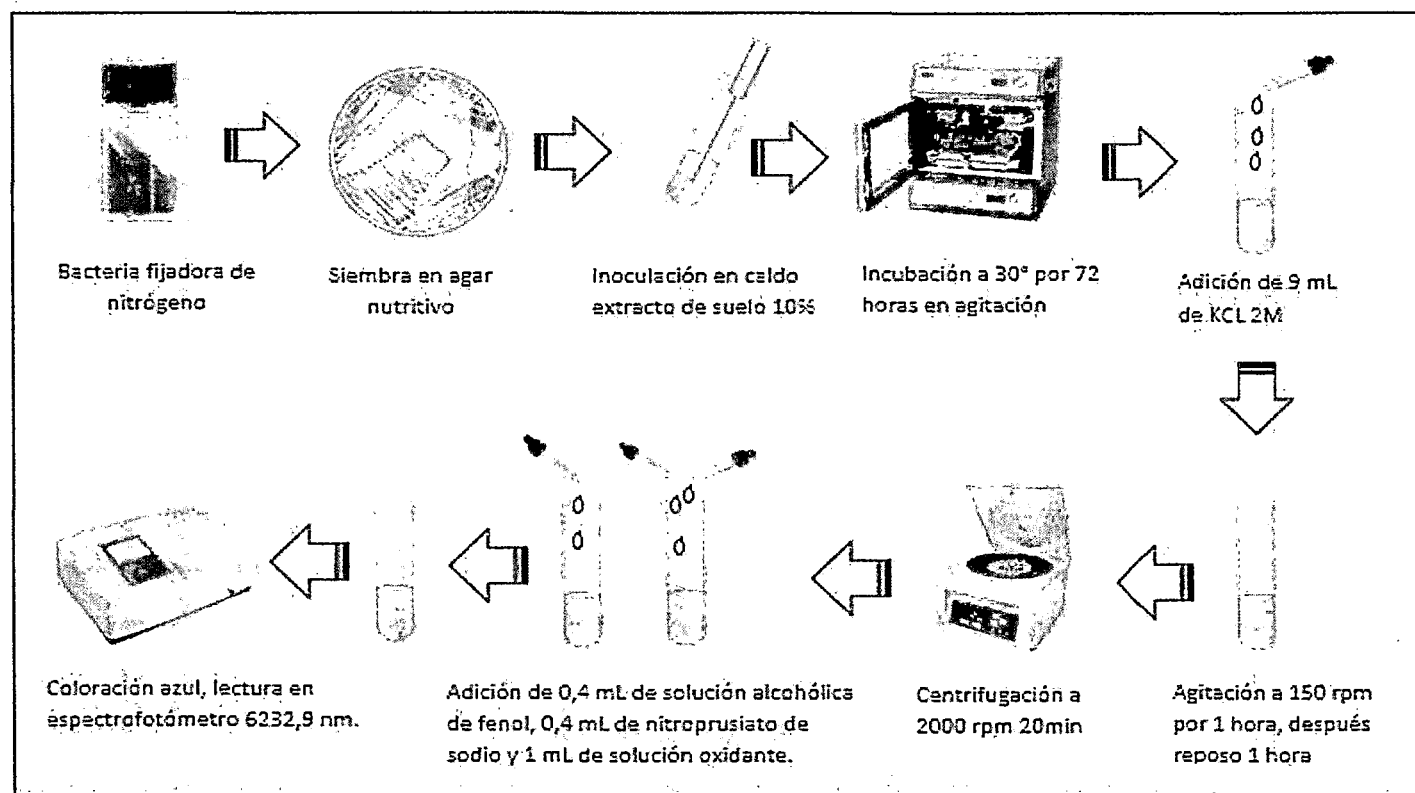
Características*	<i>Beijerinckia</i> spp
Células	Bacilos pequeños
Tinción de Gram	-
Motilidad	+
Catalasa	+
Oxidasa	+
Producción de Indol	-
Utilización de Citrato	+/-
Crecimiento en 1% Peptona	-
Acidificación de:	
- Glucosa	+
- Manitol	+
- Sacarosa	+

\* (+) positivo; (-) negativo.  
\* Kennedy, (2004); Brenner *et al.* (2005).

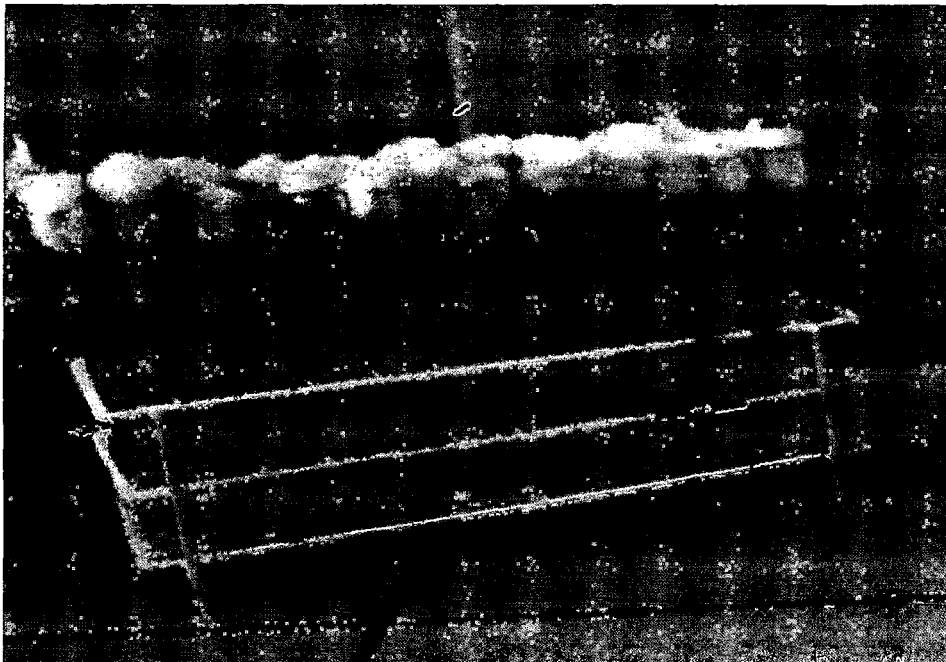




**Figura 25.** Cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno en agar nutritivo.



**Figura 26.** Procedimiento para la cuantificación de nitrógeno fijado *in vitro* por bacterias.



**Figura 27.** Caldo extracto de suelo cultivado en bacterias diazotróficas.

A continuación se agregaron 9mL de KCl 2M, se agitaron a 150rpm durante 1 hora y se dejaron en reposo por 1 hora adicional (Figura 28), para después tomar 10mL del sobrenadante y centrifugarlos (3500 rpm) durante 5 minutos (Figura 29).

Los sobrenadantes se llevaron a tubos de dilución y se añadieron 0,4mL de solución alcohólica de fenol al 10% (Figura 30); 0,4mL de nitroprusiato de sodio al 0,5% (Figura 31) y 1mL de solución oxidante (Figura 32). Los tubos se agitaron para mezclar y se dejaron en reposo durante 1 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. Las concentraciones se calcularon en una recta patrón obtenida con diluciones sucesivas de una solución de 100ppm de cloruro de amonio.

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

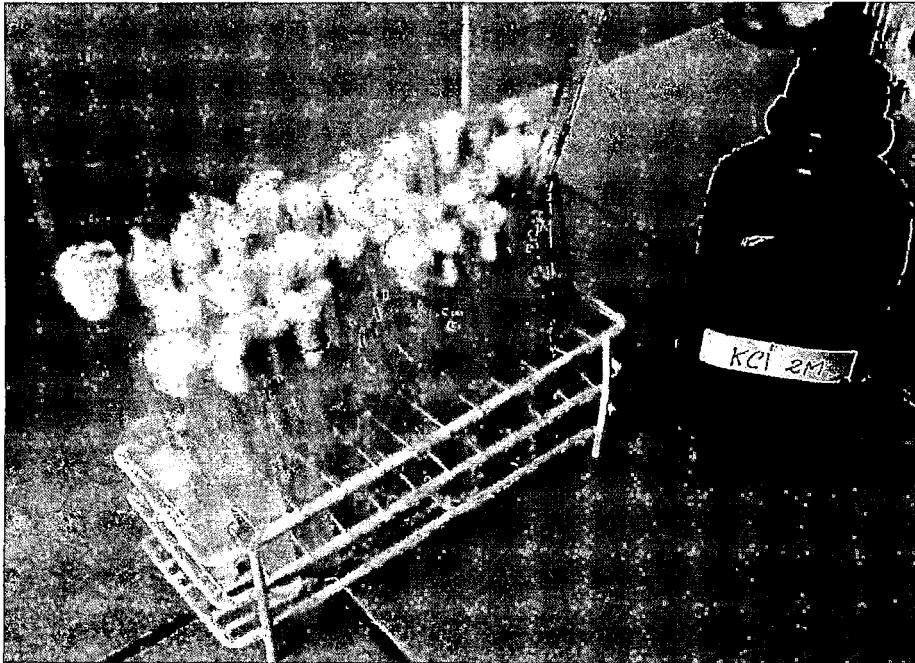
Las bacterias fijadoras de nitrógeno de cada uno de los géneros investigados, que alcanzaron los mayores valores en la concentración de amonio, proveniente de la fijación del nitrógeno, fueron seleccionadas para su análisis molecular.

### **3.2.10 Identificación del gen *nifH* en bacterias rizosféricas aisladas de arroz**

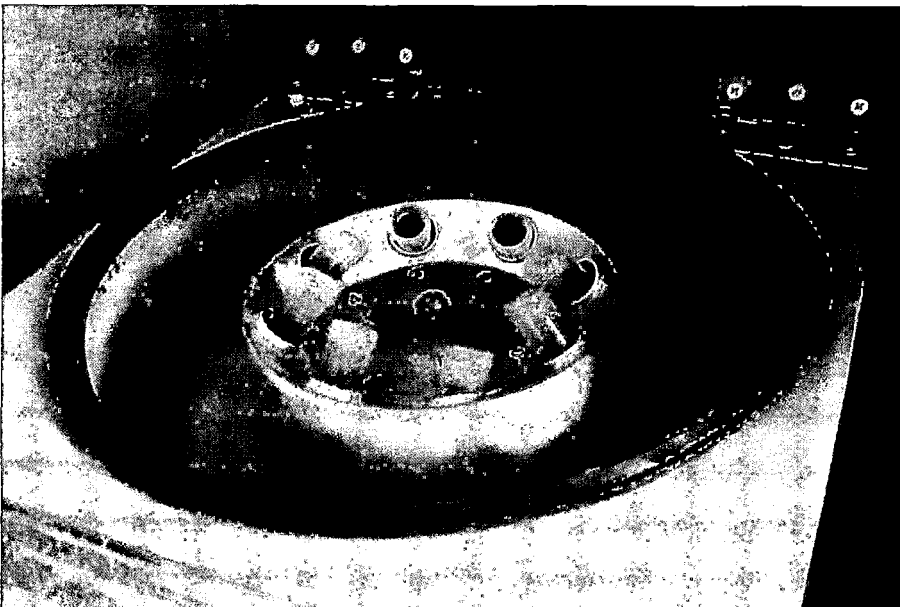
Las bacterias rizosféricas seleccionadas fueron cultivadas en sus respectivos medios sólidos sin nitrógeno durante 24 horas, para obtener colonias representativas, extraer el ADN e identificar el gen *nifH*.

#### **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 225 uL de agua bidestilada y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos (Meneses 2009). Los lisados fueron conservados a -20°C y el sobrenadante se utilizó para la amplificación del ADN (Figuras 33, 34, 35,36).



**Figura 28.** Adición de KCl al caldo extracto de suelo.



**Figura 29.** Centrifugación del caldo extracto de suelo mezclado con KCl.



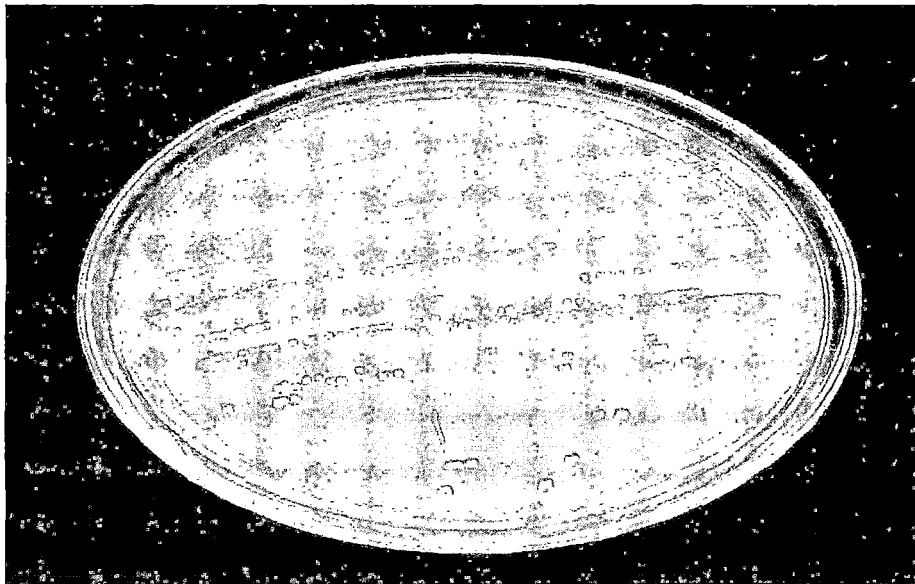
**Figura 30.** Adición de solución alcohólica de fenol al caldo extracto de suelo.



**Figura 31.** Adición de nitroprusiato de sodio al caldo extracto de suelo.



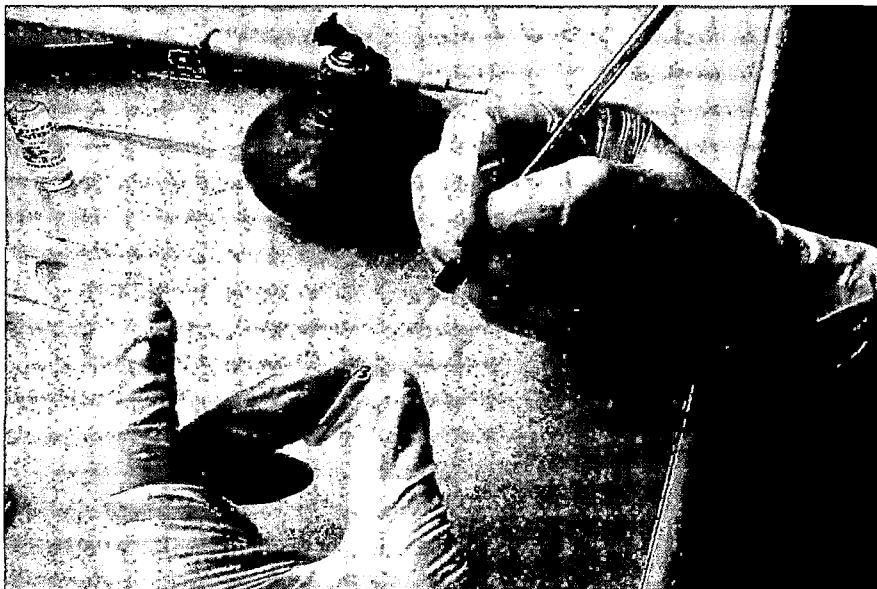
**Figura 32.** Adición de solución oxidante al caldo extracto de suelo.



**Figura 33.** Bacterias rizosféricas cultivadas en medio solido sin nitrógeno.

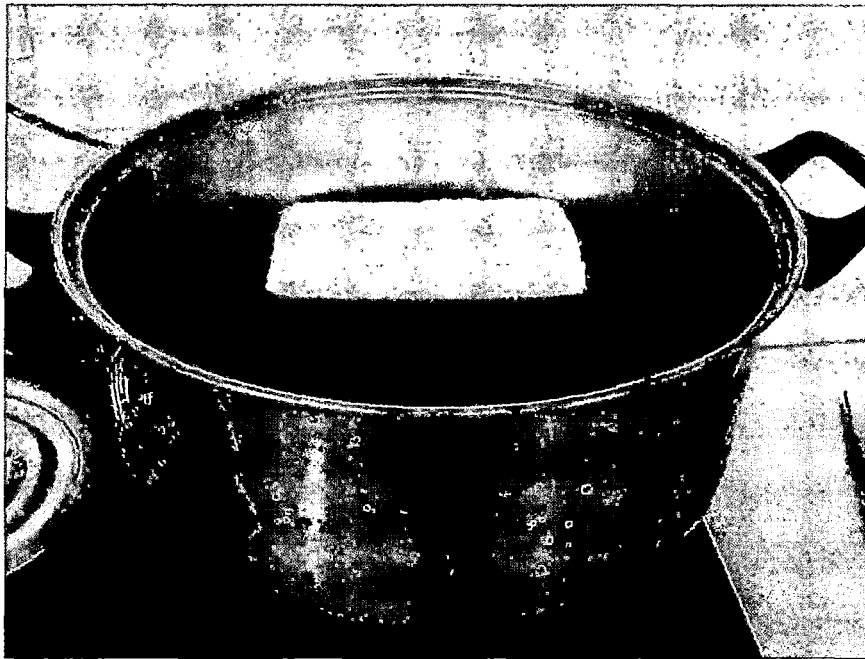


**Figura 34.** Selección de una colonia bacteriana representativa.



**Figura 35.** Suspensión de colonia bacteriana en Eppendorf con agua bidestilada.





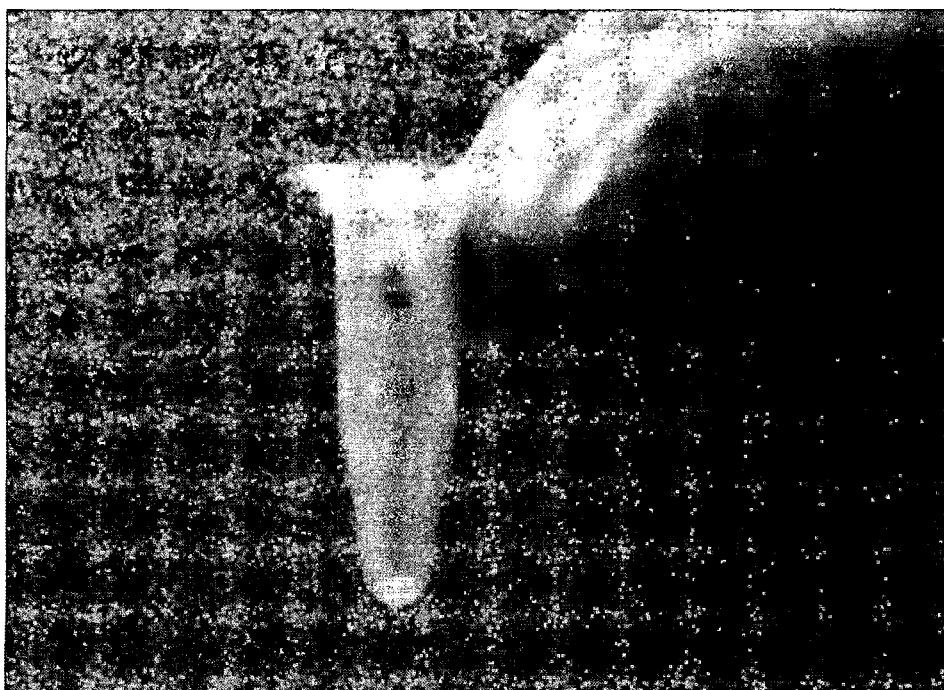
**Figura 36.** Calentamiento de bacterias en baño maría.

### **b) Identificación del gen *nifH***

Los Eppendorf conteniendo el material genético, sellados herméticamente (Figura 37), junto a un cultivo puro de cada bacteria en agar nutritivo 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 rizosféricas 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 Word y Excel versión 2010.



**Figura 37.** Eppendorf con material genético de bacteria fijadora de nitrógeno.

## **IV RESULTADOS**

### **4.1 Bacterias rizosféricas, fijadoras de nitrógeno, microaerófilas aisladas de suelo rizosférico de arroz**

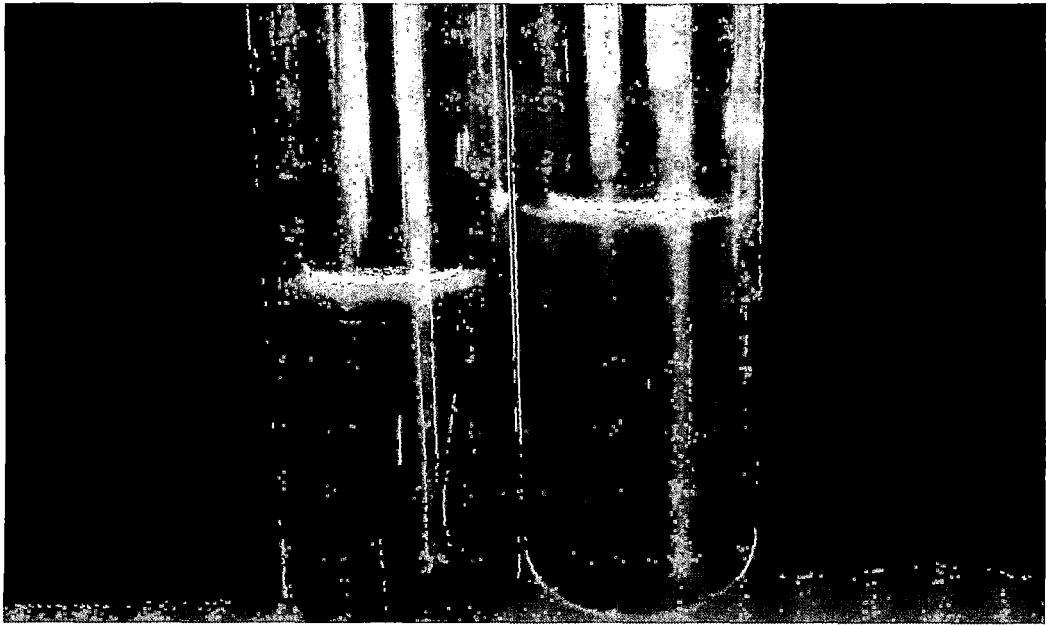
En cinco medios semisólidos se aislaron bacterias fijadoras de nitrógeno, cuya presencia se evidenció por una película blanquecina formada bajo la superficie del medio y el viraje del indicador (Figura 38).

En el medio NFb, con un color inicial celeste-azulado, se observó viraje del indicador al celeste-azulado (Figura 39). La frecuencia de muestras de suelo rizosférico de arroz positivas para bacterias fijadoras de nitrógeno fue 33,3% después de la siembra, así como 50; 42,59 y 42,59% después de los tres subcultivos, respectivamente (Figura 40).

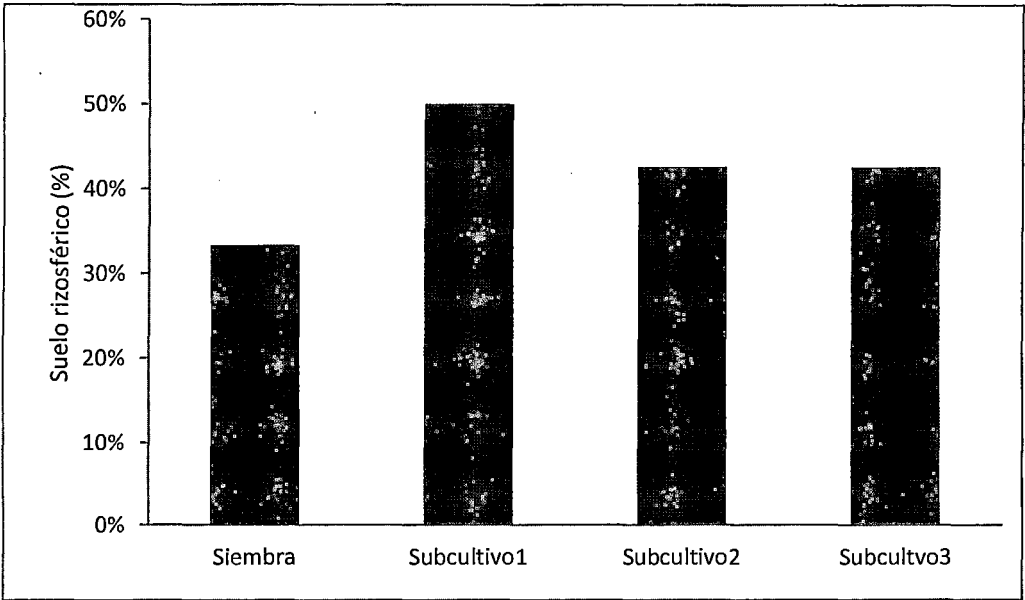
En el medio LGI, con un color inicial verde, se observó viraje del indicador al verde azulado y verde-amarillento (Figura 41). La frecuencia de muestras de suelo rizosférico positivas para bacterias fijadoras de nitrógeno fue 31,48% después de la siembra, así como 48,14; 51,85 y 51,85% después de los tres subcultivos, respectivamente (Figura 42).



**Figura 38.** Película blanquecina y viraje del indicador por bacterias fijadoras de nitrógeno en cinco medios semisólidos, NFb (a), LGI (b), LGI-P (c), JNFb (d), JMV (e).



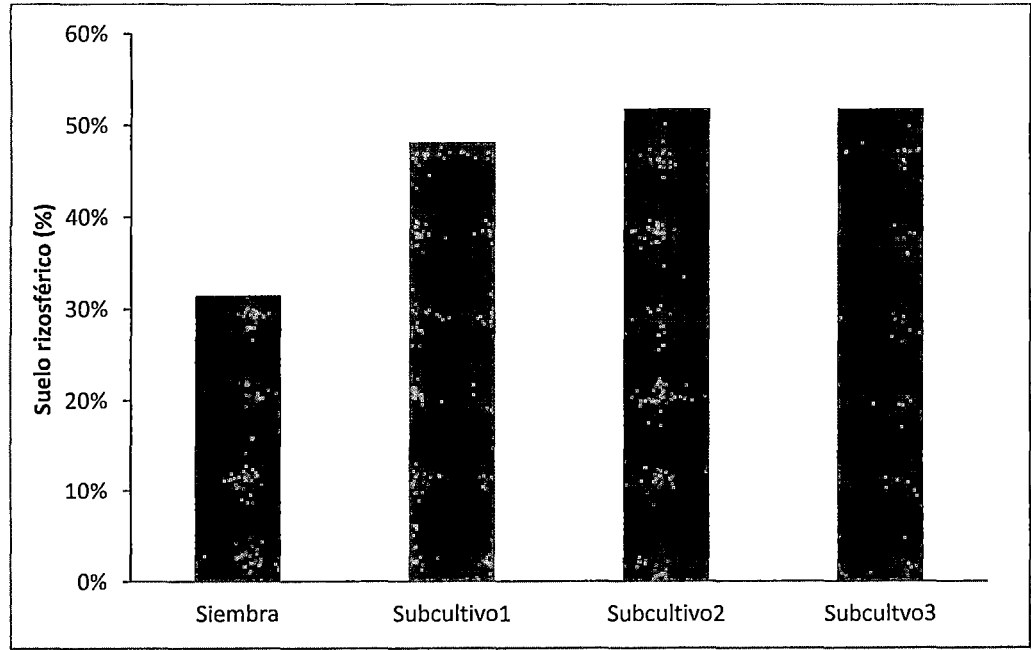
**Figura 39.** Película bacteriana y viraje del indicador por bacterias diazótroficas en medio NFb.



**Figura 40.** Frecuencia de suelo rizosférico de *Oryza sativa* L. con bacterias fijadoras de nitrógeno, observadas en NFb después de la siembra y tres subcultivos, 2014.



**Figura 41.** Película bacteriana y viraje del indicador por bacterias diazótrofes en medio LGI.



**Figura 42.** Frecuencia de suelo rizosférico de *Oryza sativa* L. con bacterias fijadoras de nitrógeno, observadas en LGI 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 43). La frecuencia de muestras de suelo rizosférico positivas para bacterias fijadoras de nitrógeno fue 37% después de la siembra, así como 35,18; 42,59 y 42,59% después de los tres subcultivos respectivamente (Figura 44).

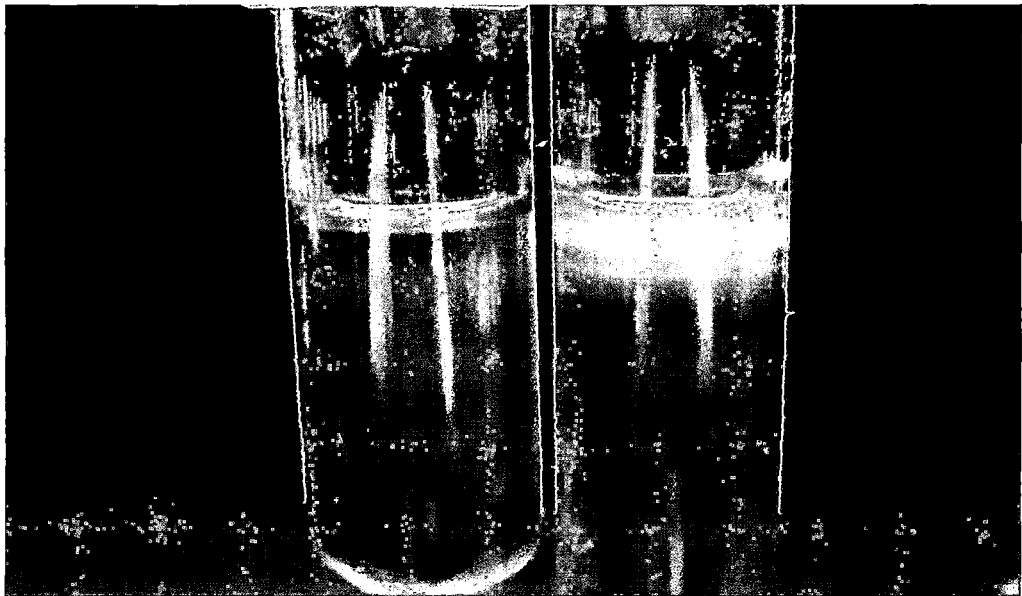
En el medio JNFb, con un color inicial amarillo, se observó viraje del indicador al celeste-azulado (Figura 45). La frecuencia de muestras de suelo rizosférico positivas para bacterias fijadoras de nitrógeno fue 44,44% después de la siembra, así como 40,74; 25,92 y 25,92% después de los tres subcultivos, respectivamente (Figura 46).

En el medio JMV, con un color inicial amarillo-opaco, no se observó viraje del indicador, pero si formación de película (Figura 47). La frecuencia de muestras de suelo rizosférico positivas para bacterias fijadoras de nitrógeno fue 42,59% después de la siembra, así como 44,44; 27,77 y 27,77% después de los tres subcultivos, respectivamente (Figura 48).

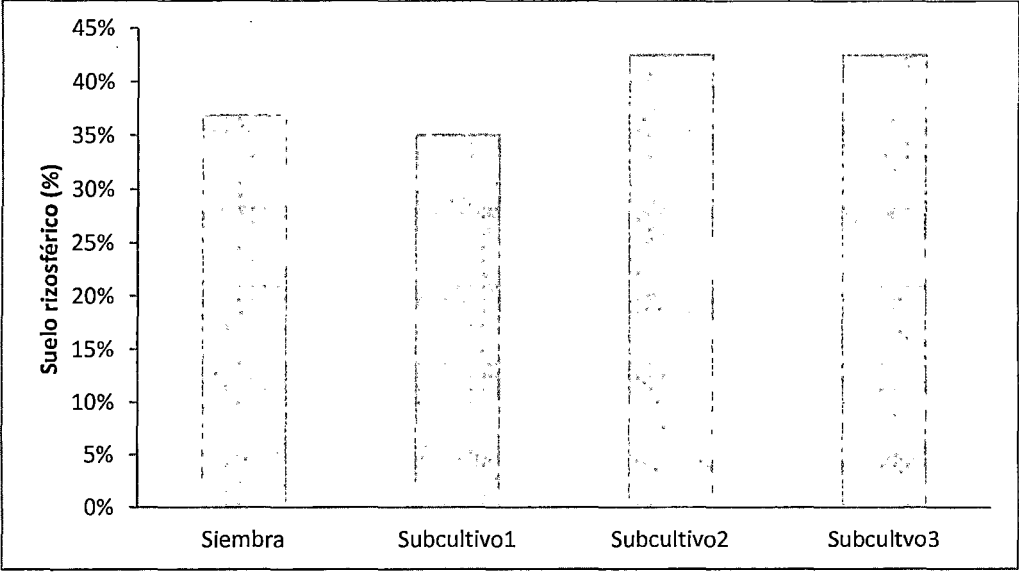
La frecuencia de suelo rizosférico de arroz con bacterias fijadoras de nitrógeno después de tres subcultivos fue 42,59% en NFb; 51,83% en LGI; 42,59% en LGI-P; 25,92% en JNFb; así como 27,77% en JMV (Figura 49). En el aislamiento se obtuvieron 103 cultivos puros de bacterias fijadoras de nitrógeno, cuya procedencia correspondió al 22,33% en NFb; 27,18% en LGI; 22,33% en LGI-P; 13,59% en JNFb y 14,56% en JMV (Figura 50).

El género *Azospirillum* fue identificado en el 86,95% de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en NFb y en el 53,57% de LGI (Figuras 51, 52). *Burkholderia* se identificó en el 20% de bacterias aisladas en JMV (Figura 53).

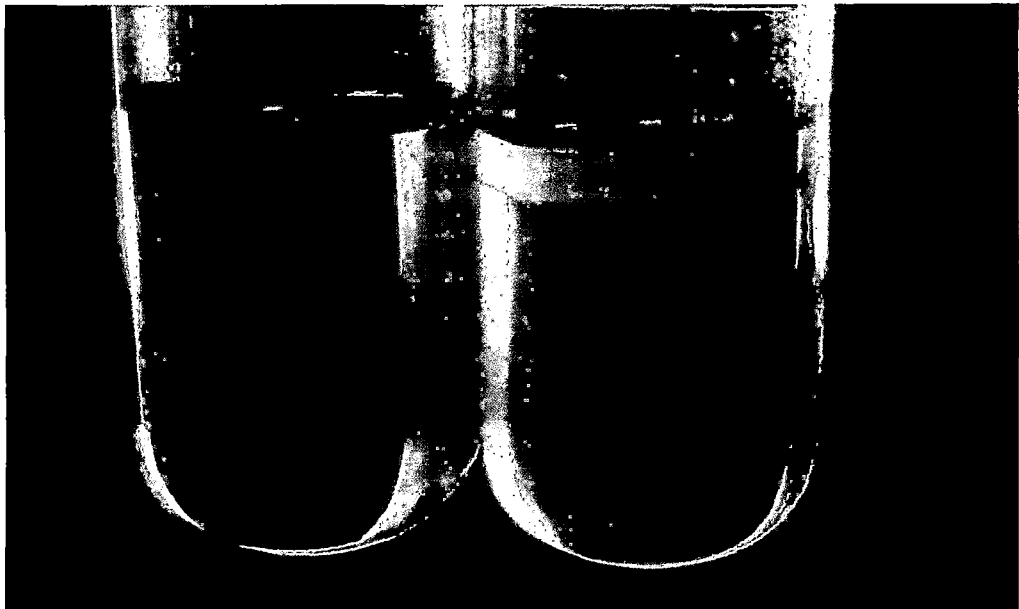




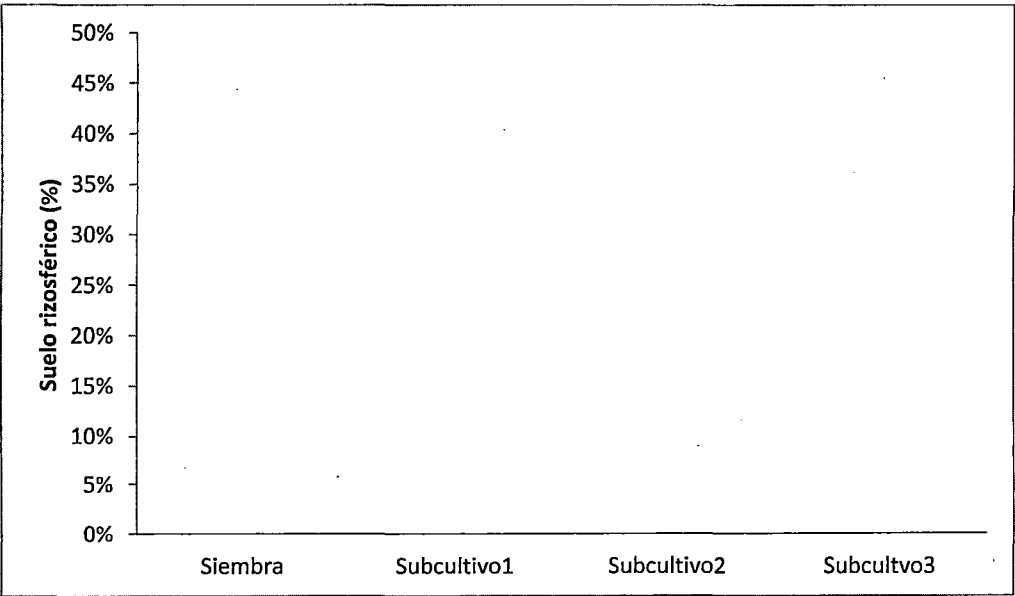
**Figura 43.** Película bacteriana y viraje del indicador por bacterias diazótrofás en medio LGI-P.



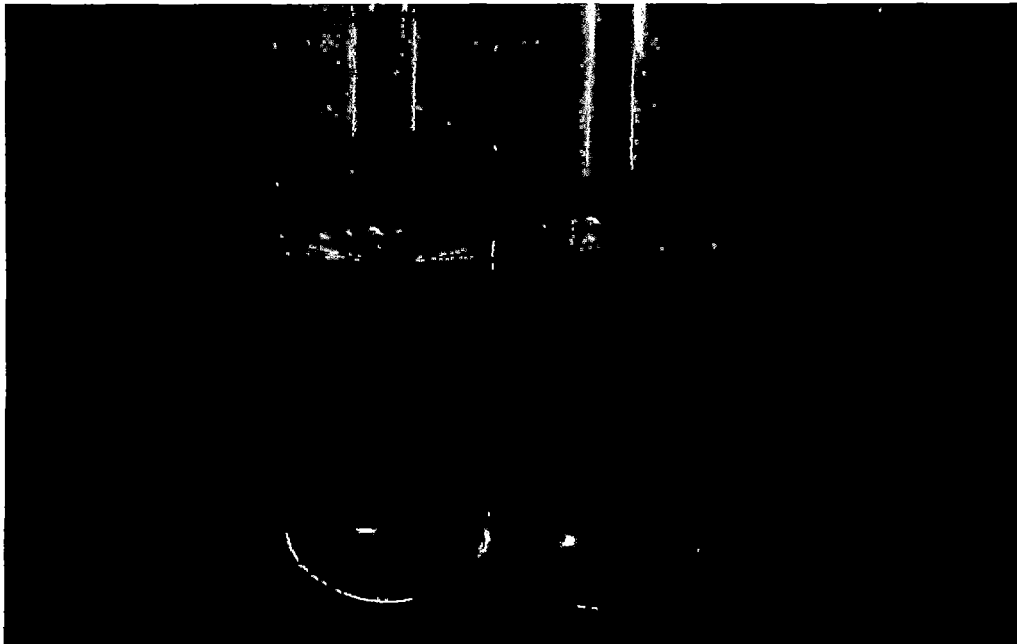
**Figura 44.** Frecuencia de suelo rizosférico de *Oryza sativa* L. con bacterias fijadoras de nitrógeno, observadas en LGI-P después de la siembra y tres subcultivos, 2014.



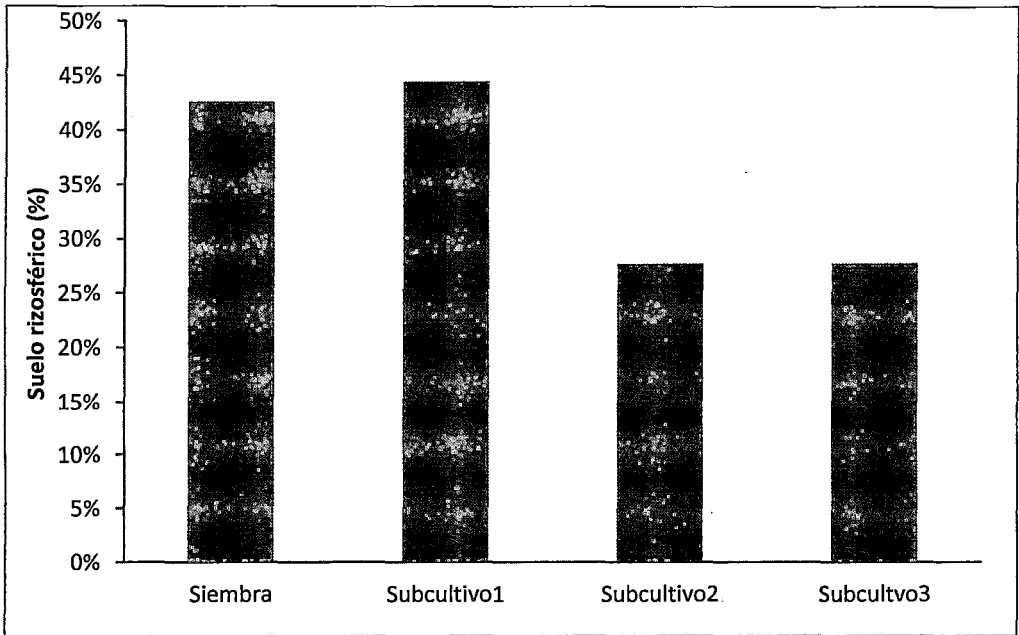
**Figura 45.** Película bacteriana y viraje del indicador por bacterias diazótroficas en medio JNFb.



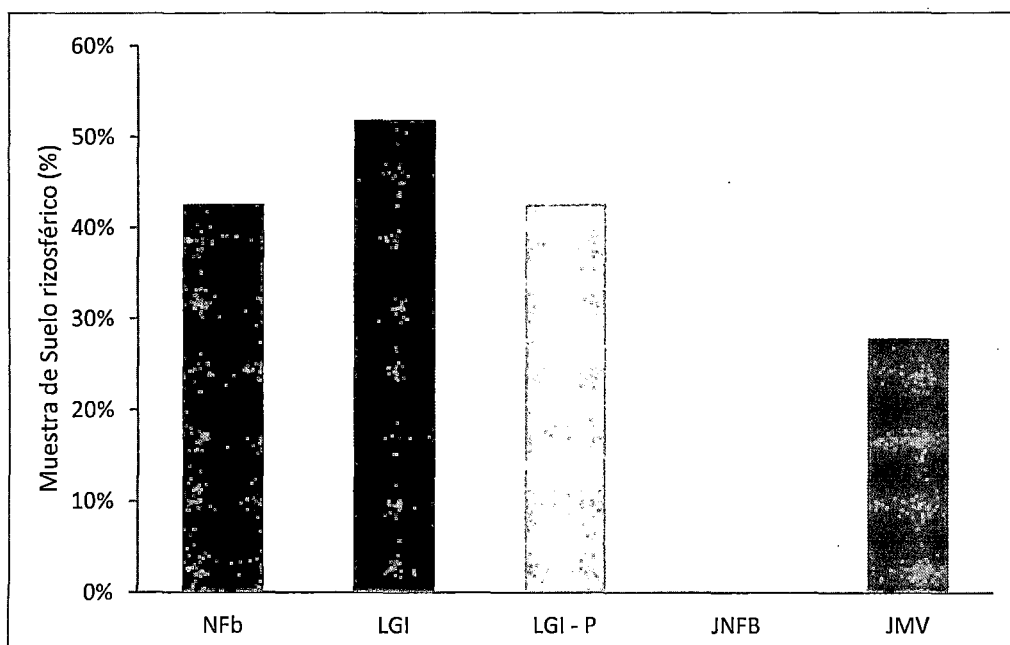
**Figura 46.** Frecuencia de suelo rizosférico de *Oryza sativa* L. con bacterias fijadoras de nitrógeno, observadas en JNFb después de la siembra y tres subcultivos, 2014.



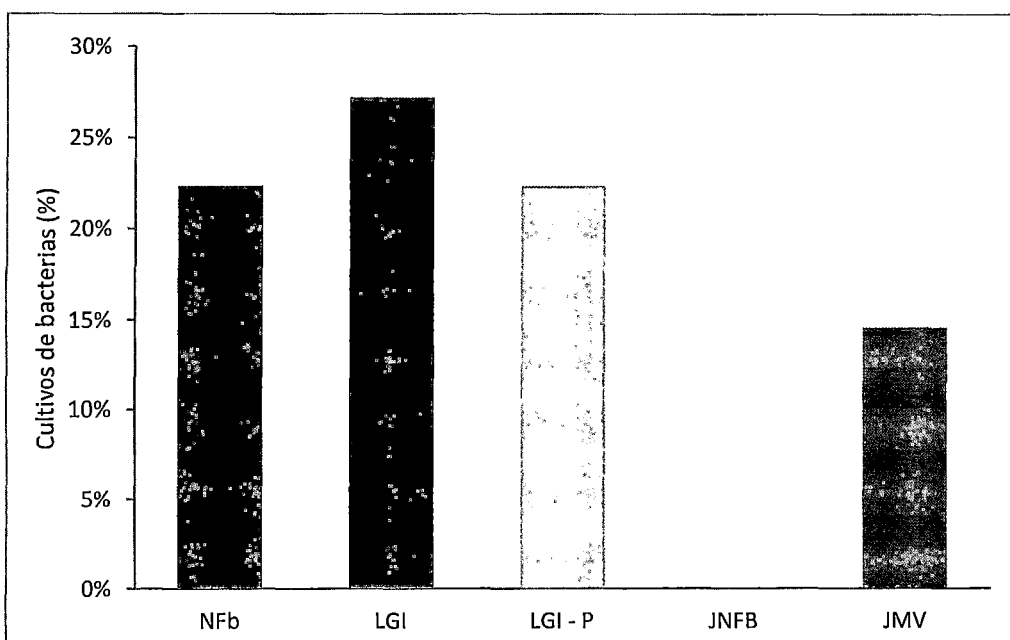
**Figura 47.** Película bacteriana por bacterias diazótrofes en medio JMV.



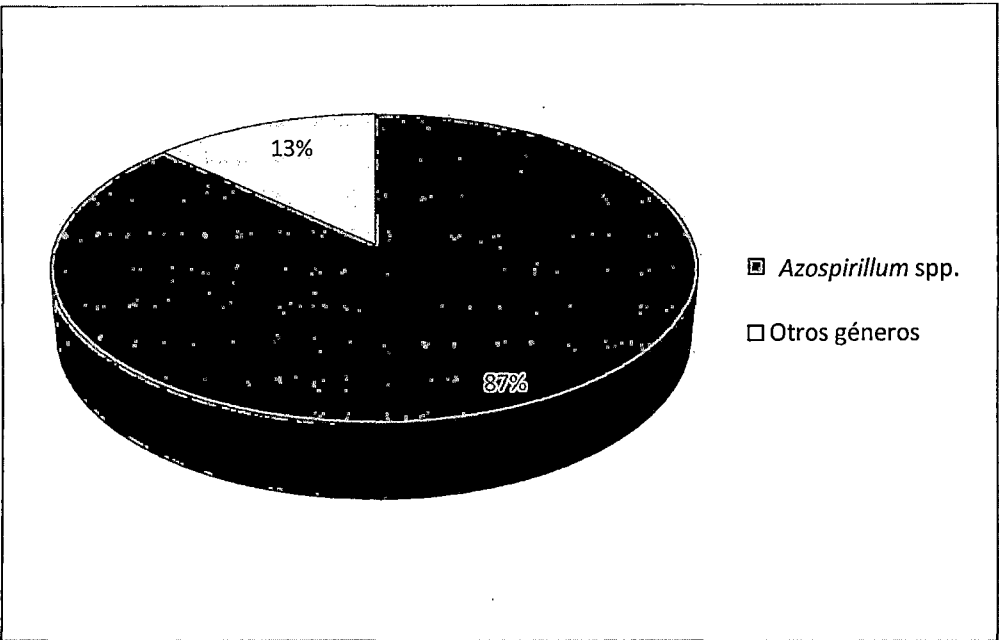
**Figura 48.** Frecuencia de suelo rizosférico de *Oryza sativa* L. con bacterias fijadoras de nitrógeno, observadas en JMV después de la siembra y tres subcultivos, 2014.



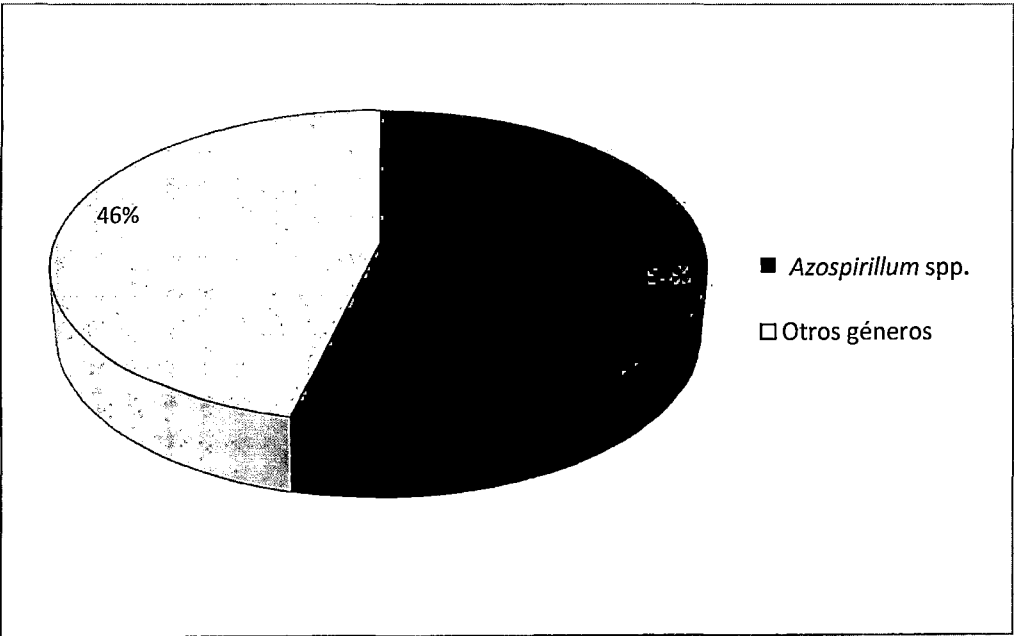
**Figura 49.** Frecuencia de suelo rizosférico de *Oryza sativa* L con bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en cinco medios semisólidos después de tres subcultivos.



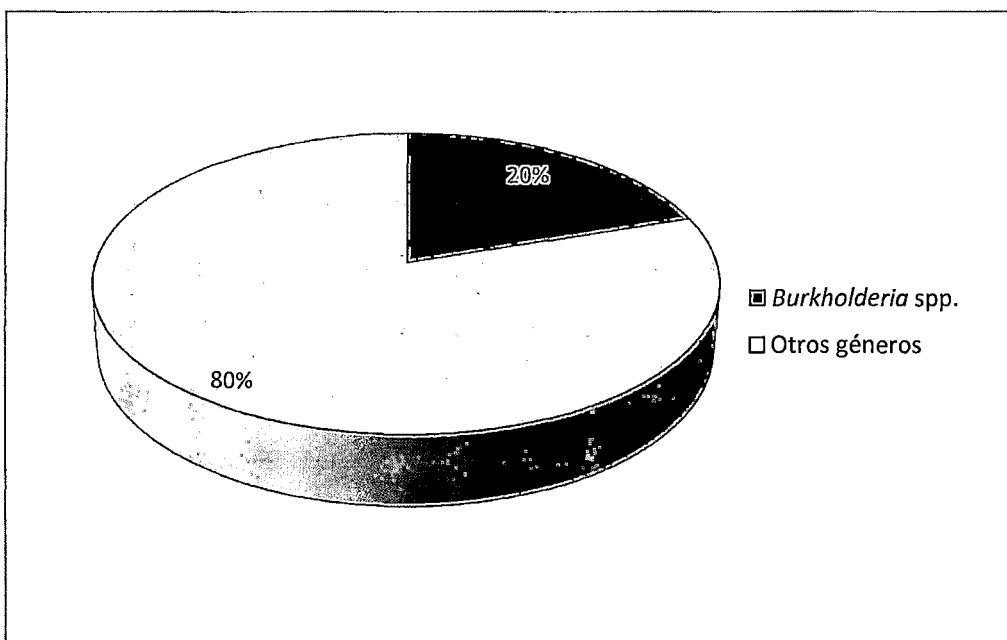
**Figura 50.** Bacterias microaerófilas fijadoras de nitrógeno aisladas en medios NFb, LGI, LGI-P, JNFB, JMV.



**Figura 51.** Frecuencia de *Azospirillum* spp. en bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en NFB.



**Figura 52.** Frecuencia de *Azospirillum* spp. en bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en LGI.



**Figura 53.** Frecuencia de *Burkholderia* spp. en bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en JMV.

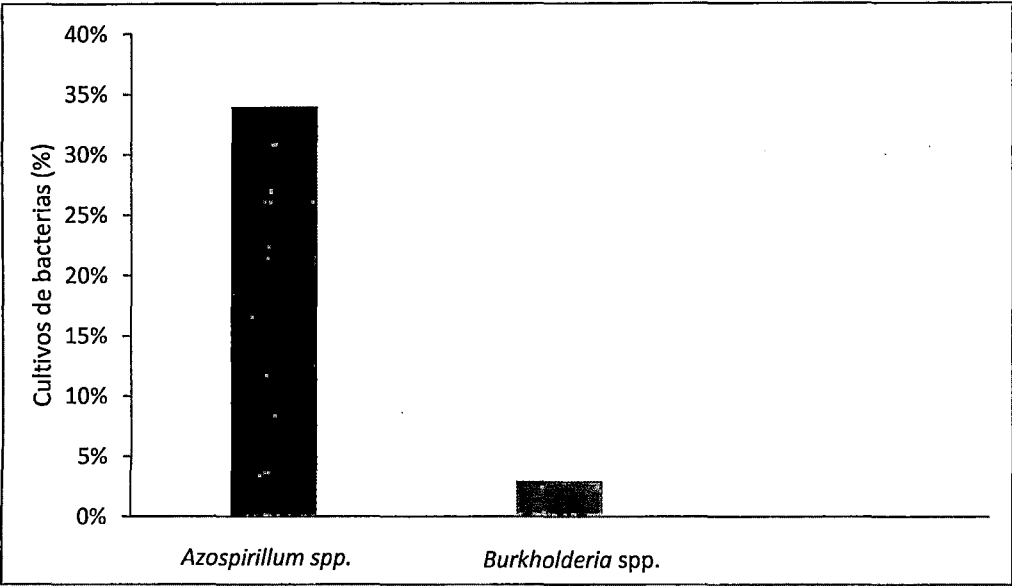
Los géneros *Gluconacetobacter* y *Herbaspirillum* no fueron identificados en las bacterias aisladas en LGI y JNFb, respectivamente. De esta manera, la frecuencia de los géneros de bacterias fijadoras de nitrógeno identificadas en la rizosféra de arroz fue 33,98% para *Azospirillum* y 2,91% para *Burkholderia* (Figura 54). A su vez, la frecuencia de las bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas en las diferentes variedades de arroz (Figura 55) fue, para *Azospirillum* 45,71% (Tinajones), 45,71% (Mallares) y 8,57%(IR-43). Por su parte, *Burkholderia* fue 33,33%(Tinajones) y 66,67%(Mallares).

#### **4.2 Bacterias rizosféricas, fijadoras de nitrógeno, aerobias aisladas de suelo rizosférico de arroz**

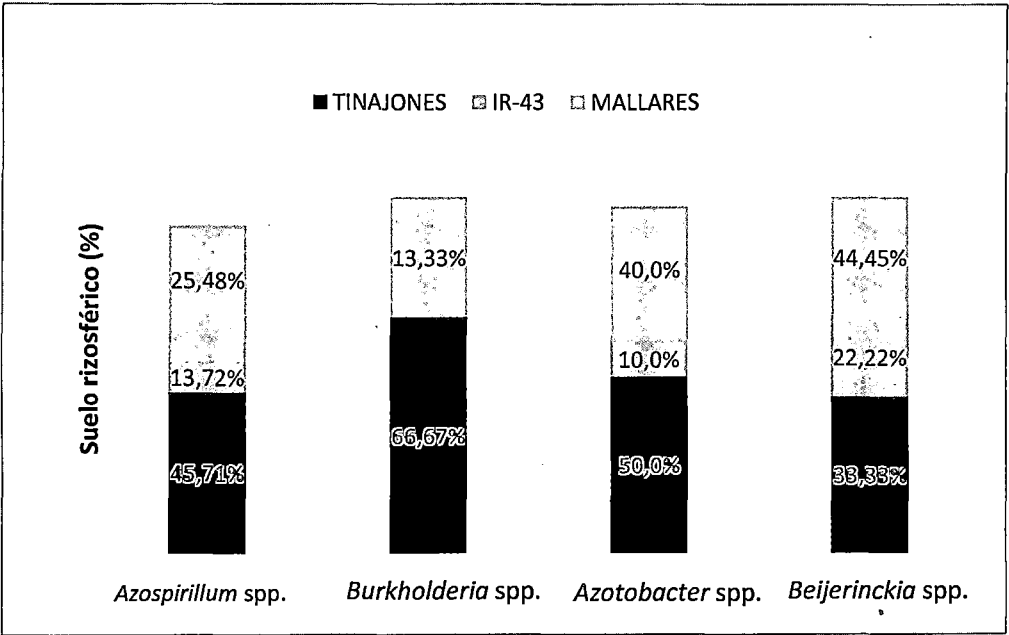
En tres medios sólidos se aislaron bacterias fijadoras de nitrógeno, cuya presencia se evidenció por las colonias desarrolladas y el viraje del indicador. En el medio LG, con un color inicial celeste se observó viraje del indicador al amarillo (Figura 56). En el medio LGD, con un color inicial verde, no se observó viraje del indicador (Figura 57). En el medio Beijerinckia, con un color inicial crema-opaco, no se observó viraje del indicador (Figura 58).

La frecuencia de suelo rizosférico de arroz con bacterias aerobias fijadoras de nitrógeno fue 55,55% en LG; 35,18% en LGD; así como 40,74% en medio Beijerinckia (Figura 59). En el aislamiento se obtuvieron 71 cultivos puros de bacterias aerobias fijadoras de nitrógeno, cuya procedencia correspondió al 42,25% en LG; 26,76% en LGD y 30,98% en medio Beijerinckia (Figura 60).

En las bacterias aerobias fijadoras de nitrógeno se identificaron los géneros *Azotobacter* con un frecuencia de 33,33% y *Beijerinckia* con 81,81% (Figura 61). No se identificó *Derxia* en las bacterias desarrolladas en LGD. A su vez, la frecuencia de las bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias en las diferentes variedades de arroz (Figura 55) fue, para *Azotobacter* 50% (Tinajones), 40% (Mallares) y 10%(IR-43). Por su parte, *Beijerinckia* fue 44,45%(Mallares) y 33,33%(Tinajones) y 22,22% (IR-13).

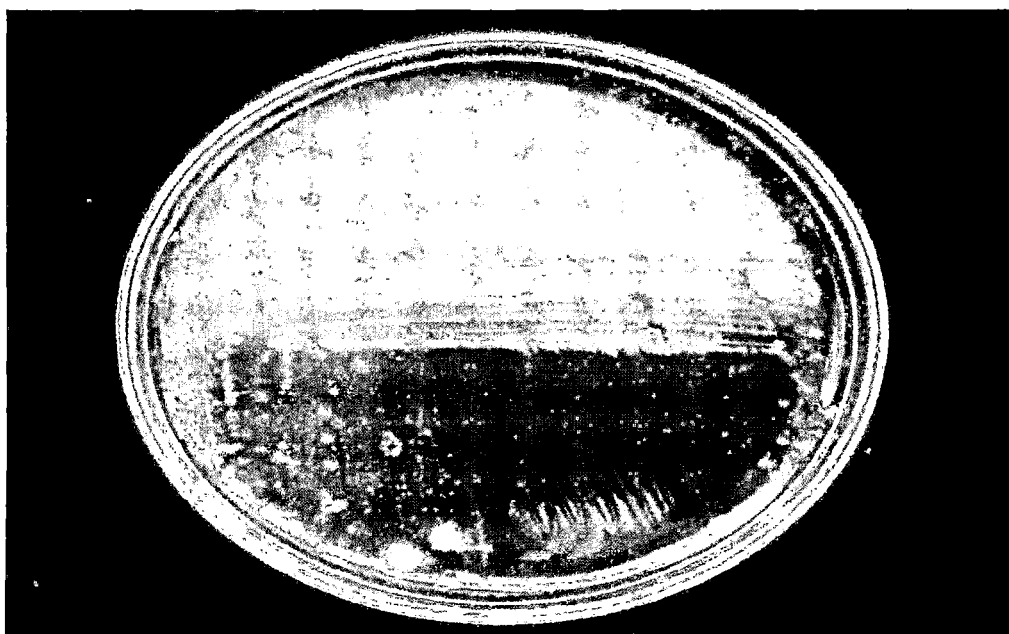


**Figura 54.** Frecuencia de *Azospirillum* y *Burkholderia* spp. en suelo rizosférico de *Oryza sativa* L., en Lambayeque, 2014.

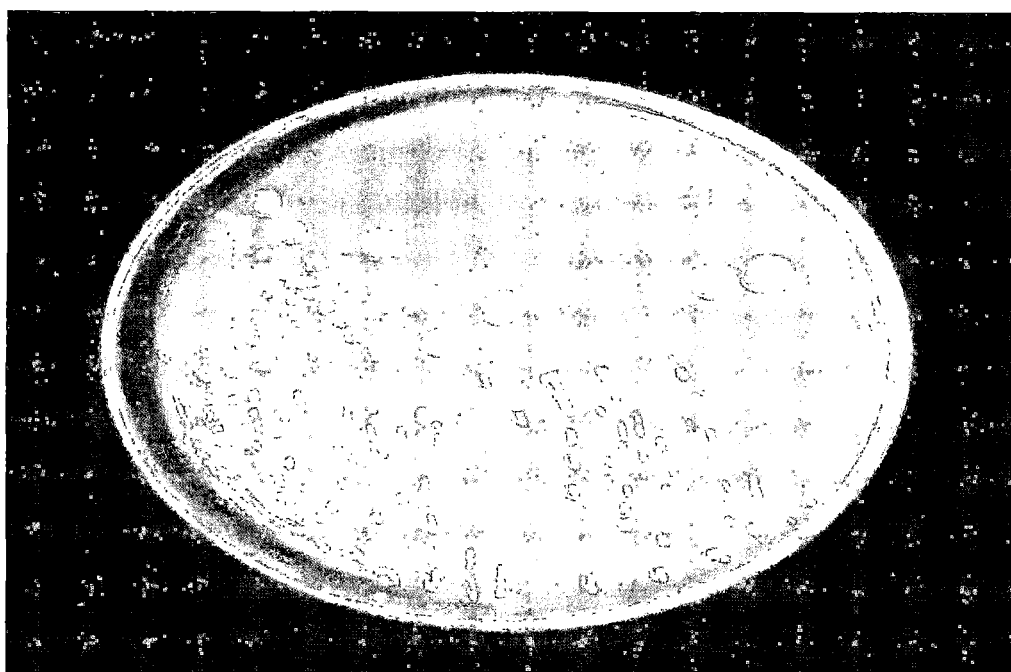


**Figura 55.** Frecuencia de bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas y aerobias en las diferentes variedades de *Oryza sativa* L.

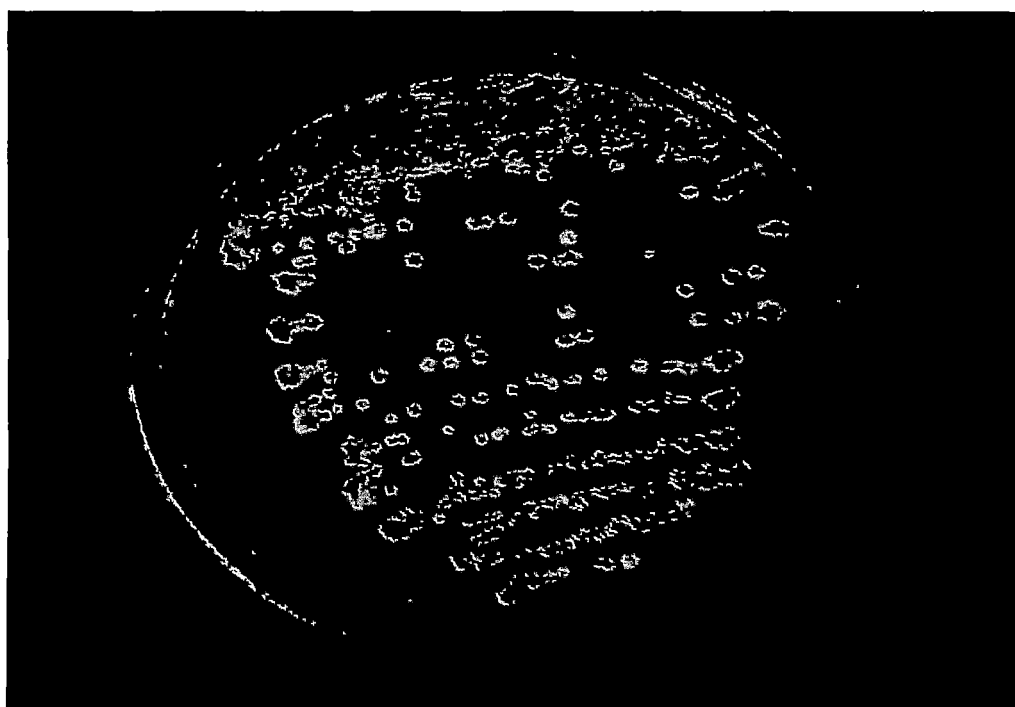




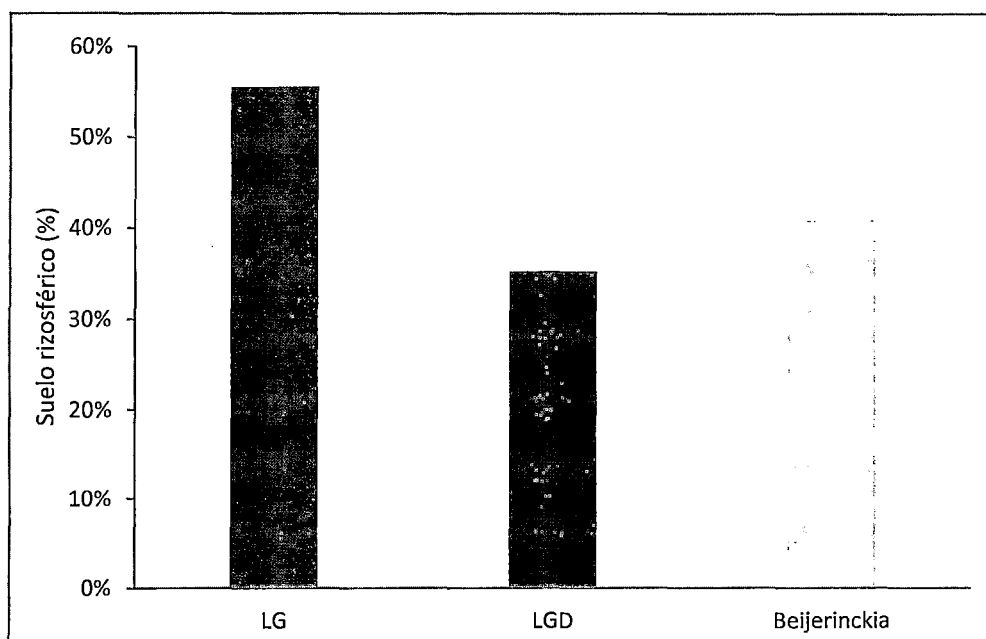
**Figura 56.** Colonias de bacterias en medio LG.



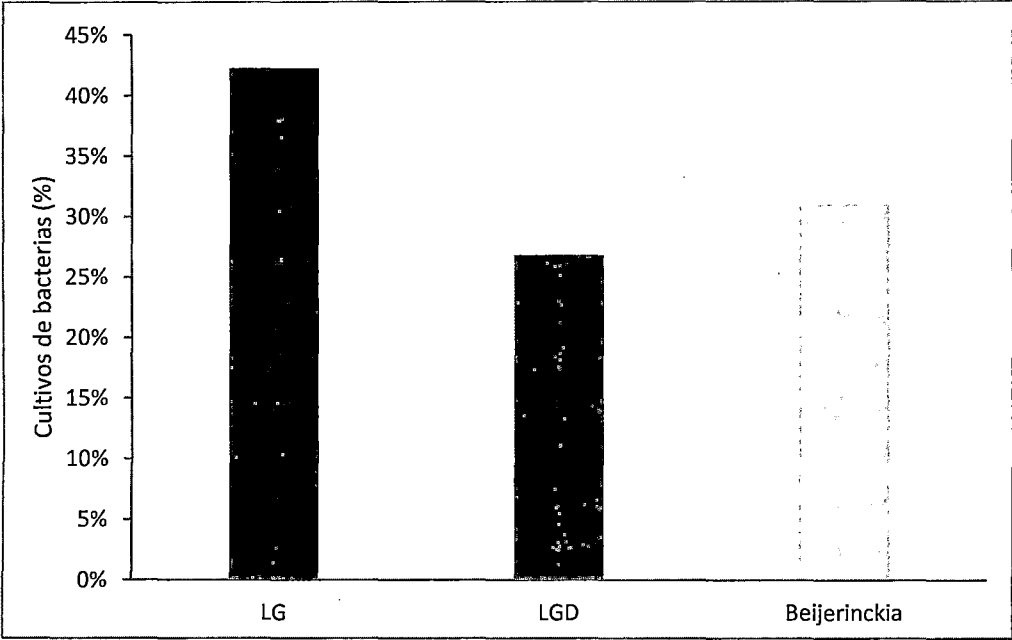
**Figura 57.** Colonias de bacterias en medio LGD.



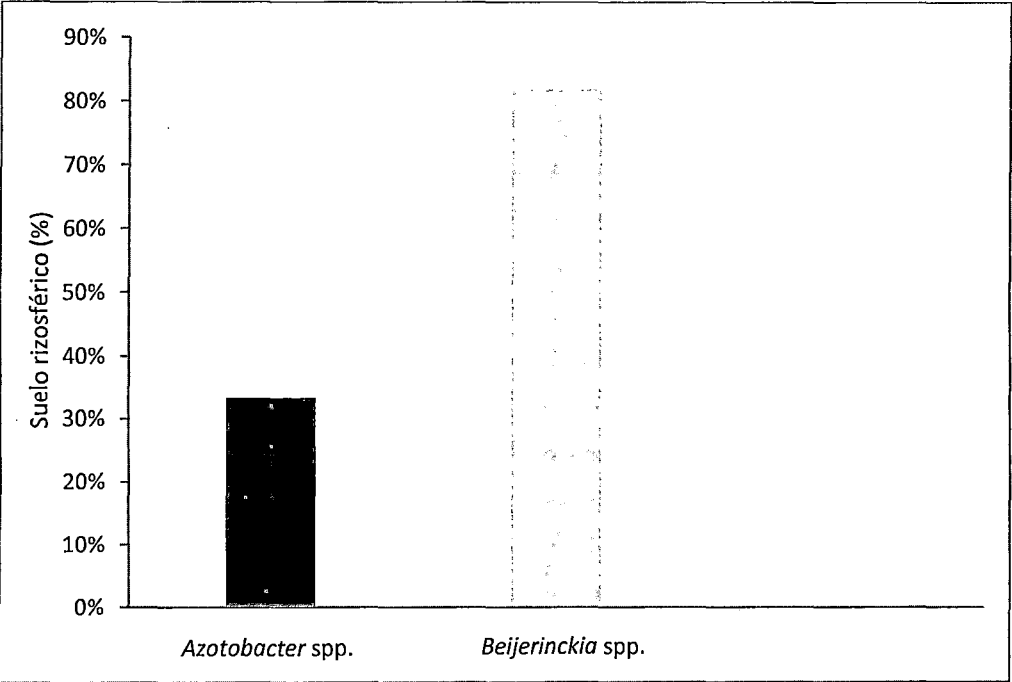
**Figura 58.** Colonias de bacterias en medio Beijerinckia.



**Figura 59.** Frecuencia de suelo rizosférico de *Oryza sativa* L. con bacterias aerobias fijadoras de nitrógeno aisladas en tres medios sólidos.



**Figura 60.** Frecuencia de bacterias aerobias fijadoras de nitrógeno aisladas en medios sólidos LG, LGD y Beijerinckia.



**Figura 61.** Frecuencia de *Azotobacter* spp. y *Beijerinckia* spp. en suelo rizosférico de *Oryza sativa* L., en Lambayeque, 2014.

#### **4.3 Características fenotípicas de bacterias microaerófilas rizosféricas diazótrofes**

Las bacterias de los géneros *Azospirillum* 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 11, figuras 62, 63). Las pruebas mencionadas, junto al requerimiento de biotina, tolerancia al 3% NaCl, hidrólisis de la urea, gelatina, reducción de nitratos y utilización de glucosa, sacarosa y manitol como fuentes de carbono para la fijación de nitrógeno, identificaron las especies de *Azospirillum*, obteniéndose seis grupos correspondientes a *A. amazonense* (3,92%), *A. halopreferens* (21,56%), *A. lipoferum* (5,88%), *A. irakense* (5,88%), *A. largimobile* con 3,92% (Figuras 64, 65, 66). En un grupo no se identificó la especie y se designó *Azospirillum* sp.1 (25,49%).

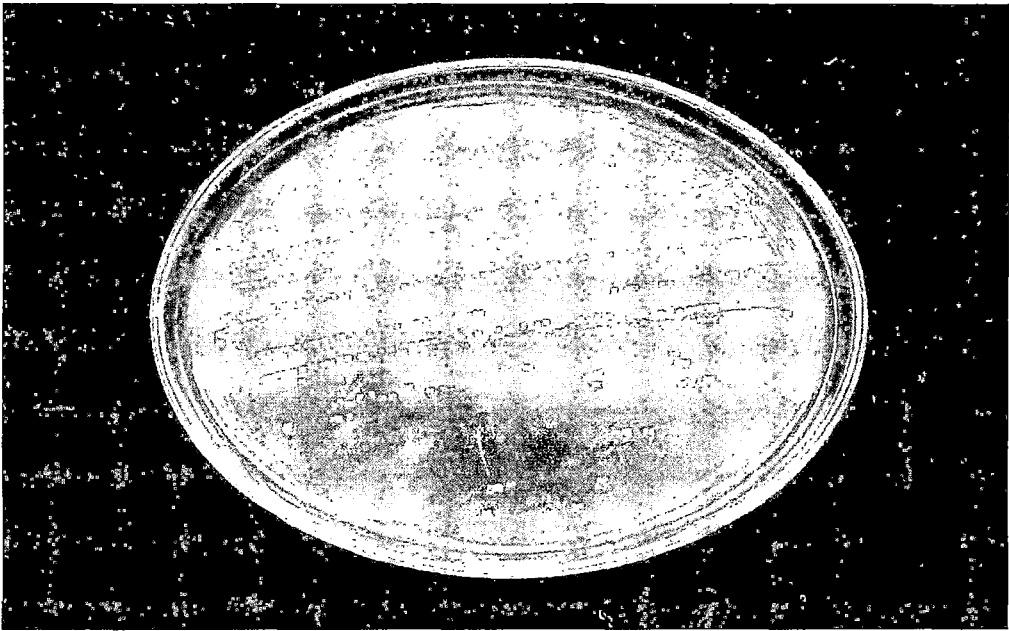
El género *Burkholderia* spp. se identificó por las hidrólisis de urea y gelatina, descarboxilación de la lisina y resistencia a 300ug de polimixina B (Figuras 67, 68).

#### **4.4 Características fenotípicas de bacterias aerobias rizosféricas diazótrofes**

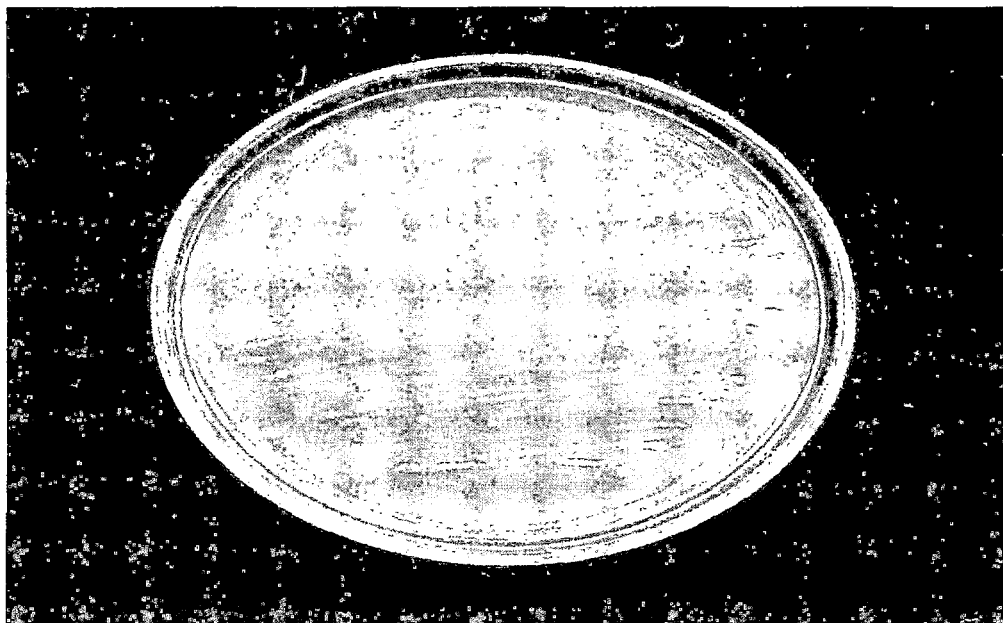
Las bacterias de los géneros *Azotobacter* y *Beijerinckia* se observaron como bacilos pequeños, Gram negativos, positivos en catalasa y oxidasa (Tabla 12, figuras 69,70). Estas pruebas, junto a la acidificación de glucosa, sacarosa, fructosa y maltosa diferenciaron al género *Azotobacter* spp. (Figura 71). A su vez, el género *Beijerinckia* se identificó por la utilización de citrato como fuente de carbono, producción de Indol, resistencia a 1% de peptona e hidrólisis de la urea (Figura72).

**Tabla 11.** Características macroscópicas de colonias de bacterias microaerófilas fijadoras de nitrógeno aisladas de *Oryza sativa* L., en Lambayeque, 2014

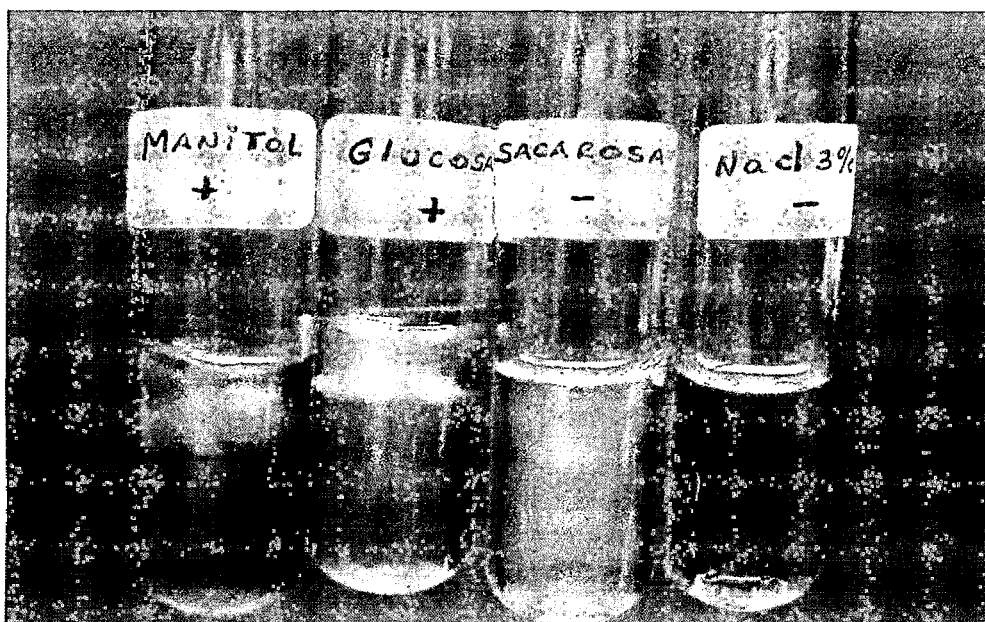
Características	<i>Azopirillum</i>	<i>Azospirillum</i>	<i>Burkolderia</i>
	NFb	LGI	JMV
Tamaño	Mediano	Mediano	Grande
Forma	Circular	Circular/Irregular	Irregular
Bordes	Enteros	Enteros	Enteros
Elevación	Convexa	Convexa	Convexa
Centro	No diferenciado	No diferenciado	Amarillo
Aspecto	Opacas/brillantes	Opacas/brillantes	Brillantes
Color	Blancas/azules	Blancas/cremosas	Amarillo



**Figura 62.** Observación macroscópica de colonias de *Azospirillum* spp. en medio NFb sólido.



**Figura 63.** Observación macroscópica de colonias de *Burkholderia* spp. en medio JMV sólido.



**Figura 64.** Utilización de carbohidratos como fuente de carbono y tolerancia a 3% NaCl por *Azospirillum* sp.

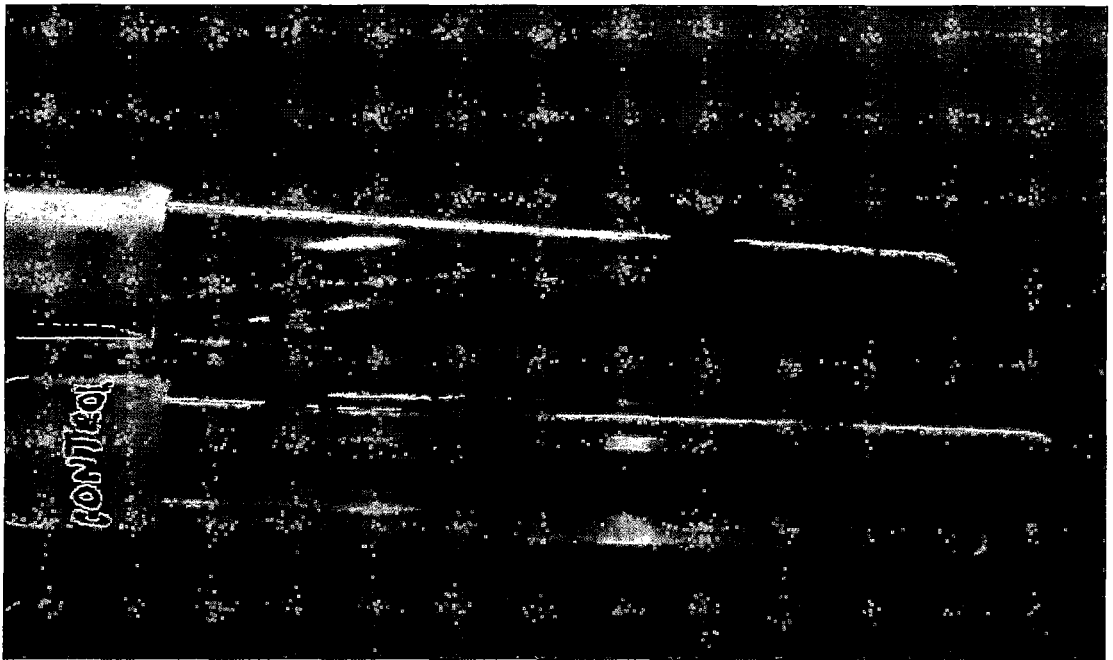


Figura 65. Hidrólisis de la gelatina por *Azospirillum* sp.

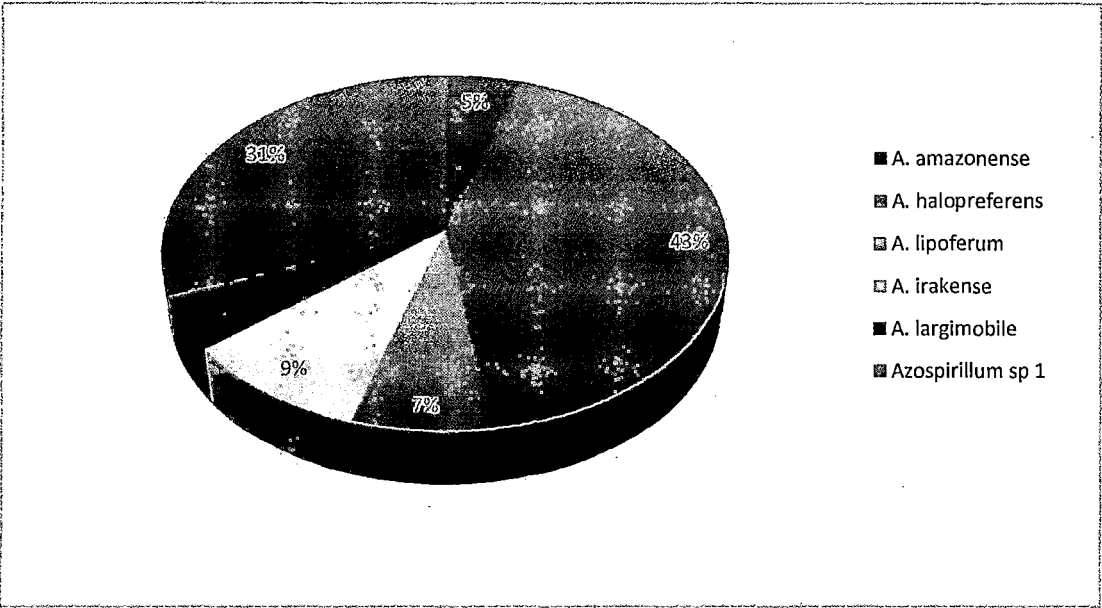


Figura 66. Porcentaje (%) de especies de *Azospirillum* fijadoras de nitrógeno aisladas en los medios NFb y LGI, en Lambayeque 2014.

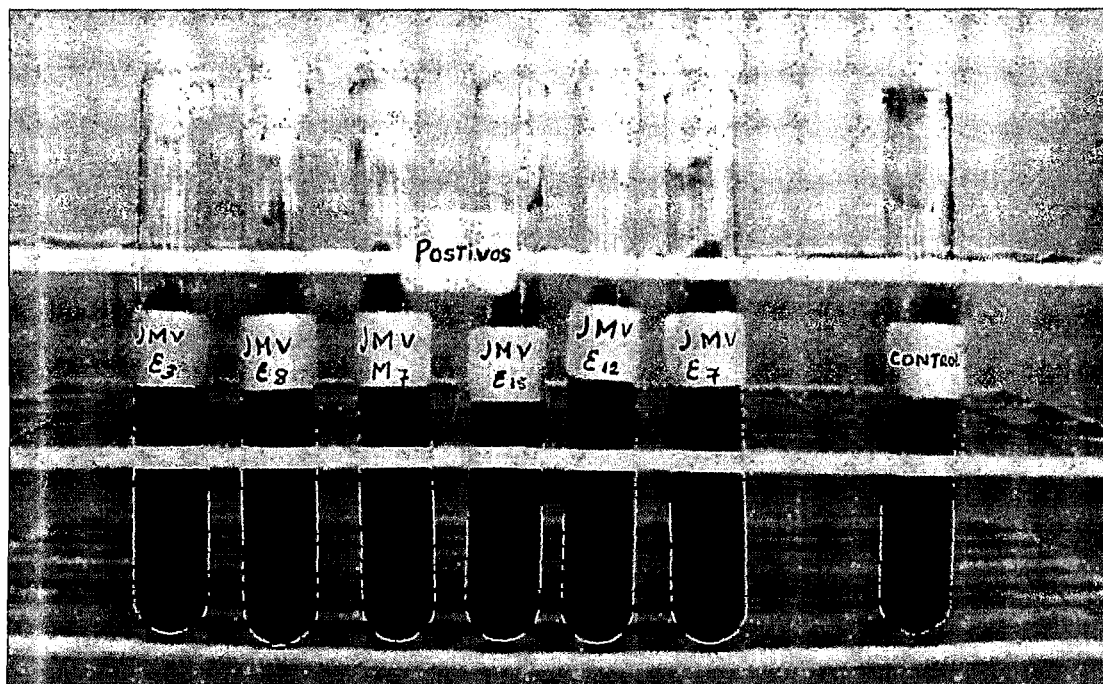


Figura 67. Descarboxilación de la lisina (LIA) por *Burkholderia* spp.

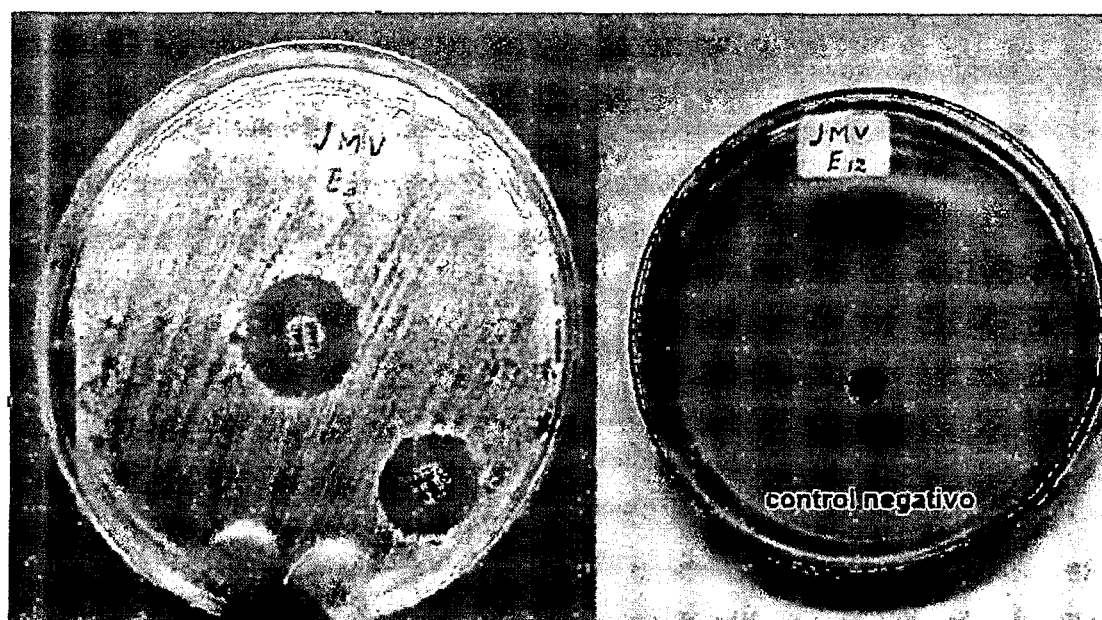
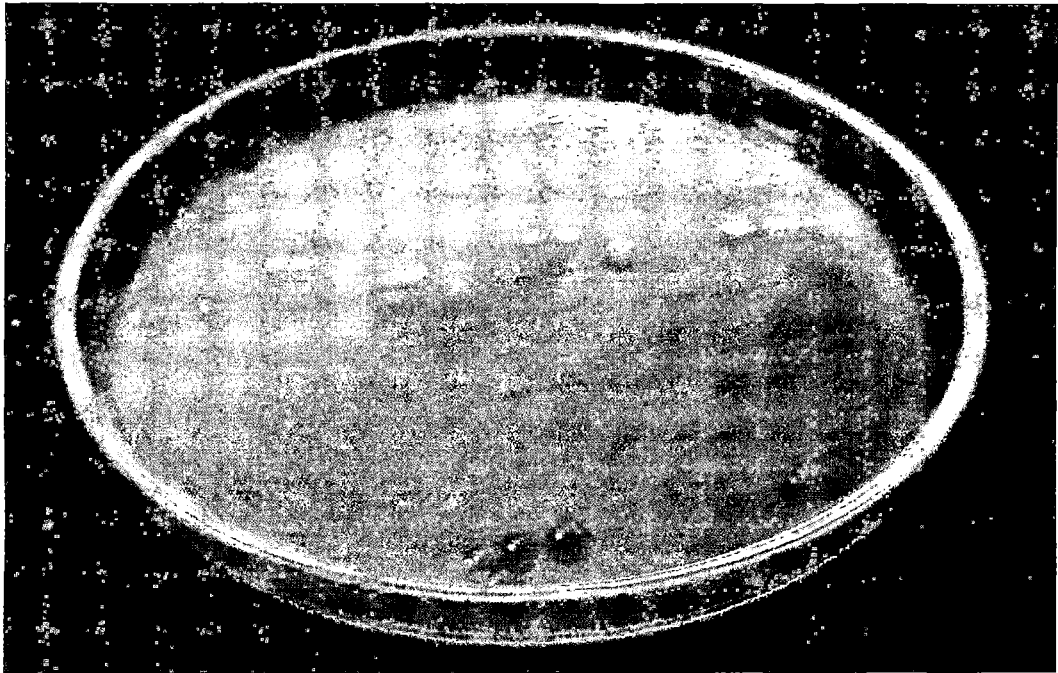


Figura 68. Resistencia a la polimixina B por *Burkholderia* spp.



**Tabla 12.** Características macroscópicas de colonias de bacterias aerobias fijadoras de nitrógeno aisladas de *Oryza sativa* L., en Lambayeque, 2014

Características	<i>Azotobacter</i> LG	<i>Derxia</i> LGD	<i>Beijerinckia</i> Beijerinckia
Tamaño	Mediano	Mediano	Mediano
Forma	Circular	Circular/ irregular	Circular
Bordes	Enteros	Enteros	Enteros
Elevación	Convexa	Convexa	Convexa
Centro	No diferenciado	No diferenciado	No diferenciado
Aspecto	Brillantes	Opacas/brillantes	Opacas
Color	Blancas/amarillas	Blancas	Blancas



**Figura 69.** Observación macroscópica de colonias de *Azotobacter* spp. en medio LG sólido.

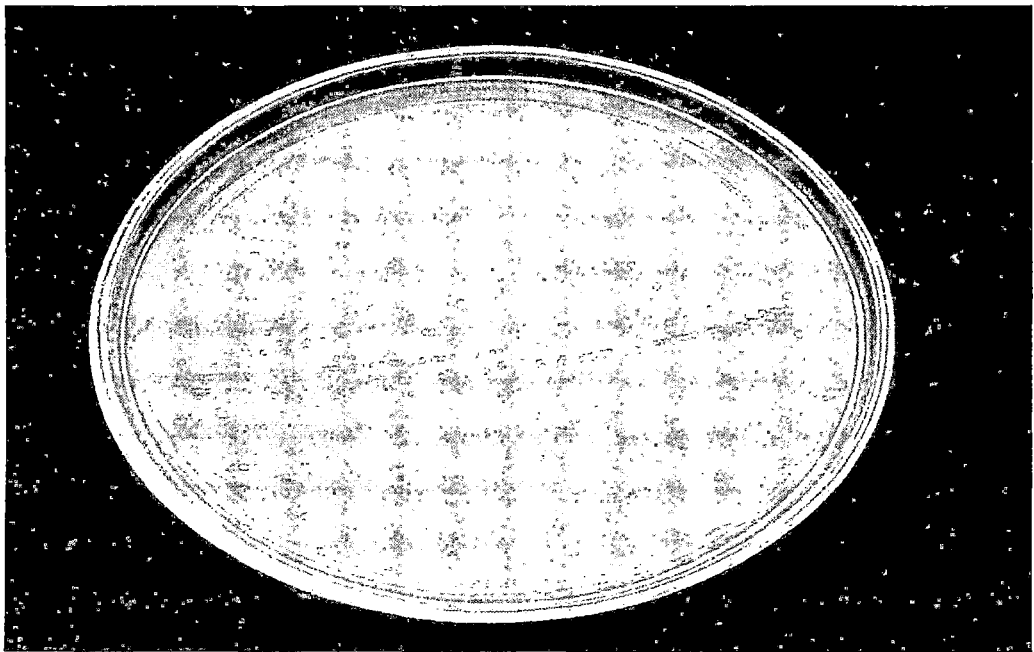


Figura 70. Observación macroscópica de colonias de *Beijerinckia* spp. en medio *Beijerinckia* sólido.

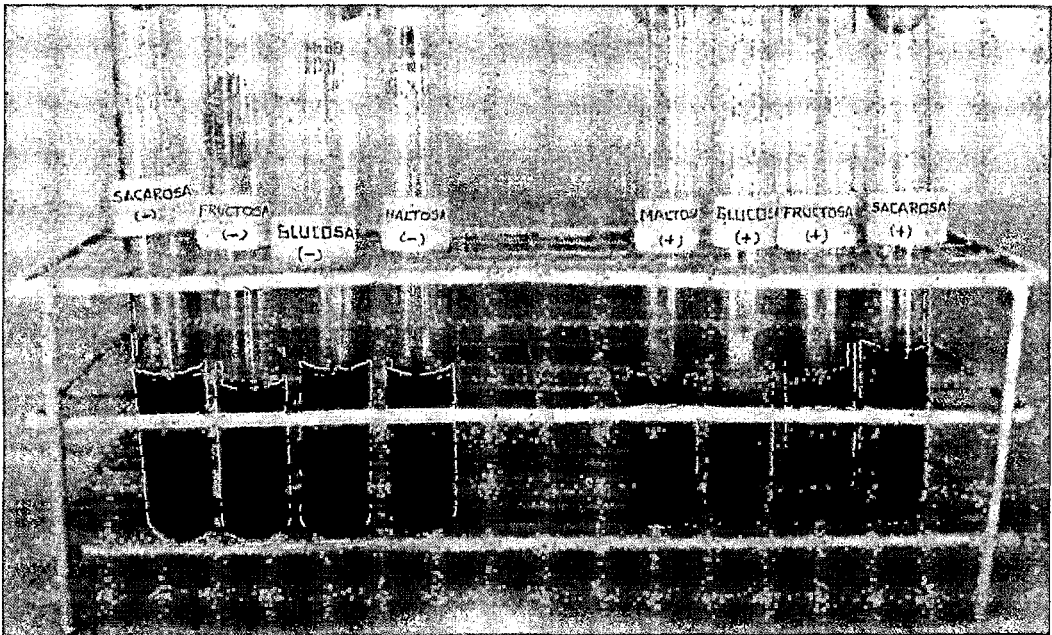
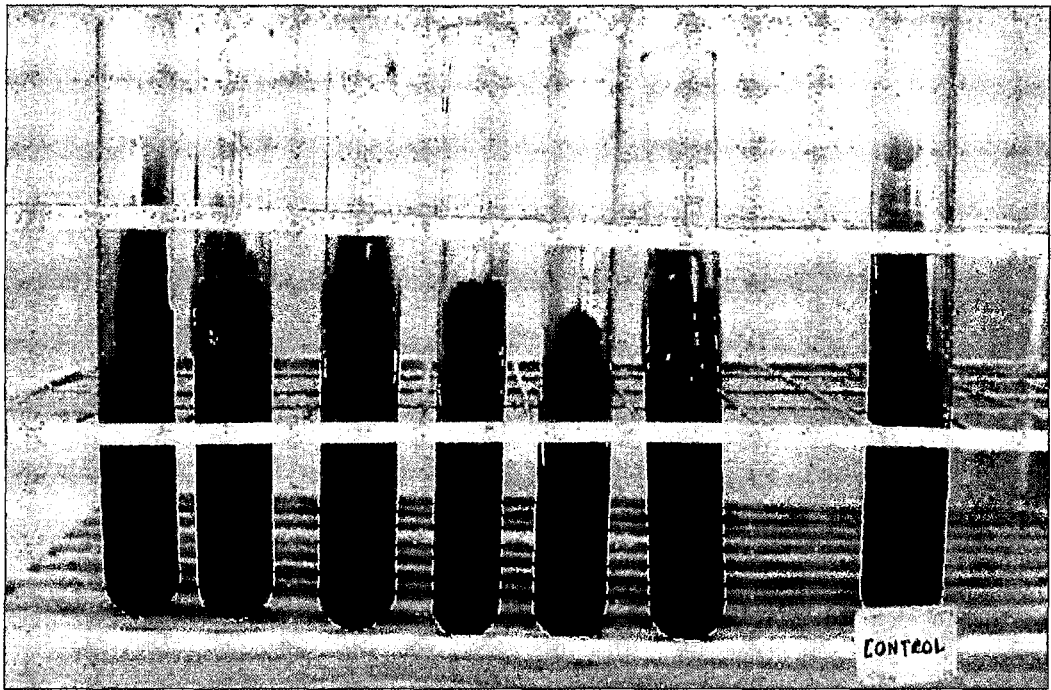


Figura 71. Acidificación de carbohidratos por *Azotobacter* spp.



**Figura 72.** Utilización de citrato como fuente de carbono por *Beijerinckia* spp.

#### 4.5 Nitrógeno fijado como amonio por bacterias rizosféricas nativas

Todas las bacterias rizosféricas fijaron nitrógeno *in vitro*, observándose una coloración azul en la cuantificación (Figura 73). El rango de amonio fue 2,30 – 18,70ppm con *Azospirillum halopreferens* I18 y *A. amazonense* E8, respectivamente; 8,34 – 12,32 ppm con *Burkholderia* spp. 7M y E3; 1,50 – 2,08ppm con *Azotobacter* spp. 74 y 80 y 0,40 – 11,52ppm con *Beijerinckia* spp. 33 y 29.

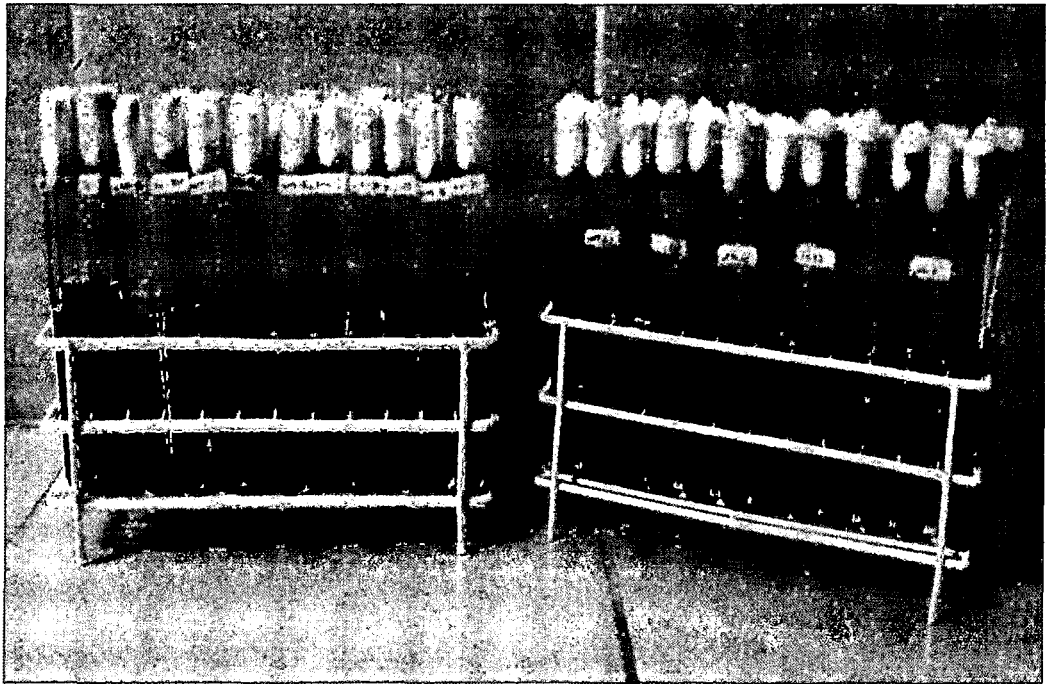
Los valores de la concentración de amonio de *Beijerinckia* spp. presentaron distribución normal ( $p > 0,05$ ) y homogeneidad de varianza ( $p > 0,05$ ), por lo que se realizó el análisis de varianza (Anexo 4, 5) y la prueba discriminatoria de Tukey (Anexo 6). A su vez, los valores de *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Burkholderia* no presentaron distribución normal, analizándose con la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis (Anexos 7, 8, 9, 10, 11,12).

La concentración de amonio fue 2,30 – 18,70 ppm para *Azospirillum* spp. (Tabla 13), 8,34 – 12,32 ppm en *Burkholderia* spp. (Tabla 14), 1,50 – 12,08 ppm en *Azotobacter* spp. (Tabla 15) y 0,40 – 11,52 ppm en *Beijerinckia* spp. (Tabla 16).

La mayor concentración de amonio correspondió a *Azospirillum amazonense* E8, (18,70ppm) diferenciándose significativamente de las demás bacterias, (Tabla 17); *Burkholderia* sp. E3 (12,33ppm) con diferencias significativas frente a *Burkholderia* spp. 7A y 7M, (Tabla 18); *Azotobacter* sp. 80 (12,08ppm) no diferenciándose significativamente de *Azotobacter* spp. 14,28 y 44 pero si de los demás tratamientos (Tabla 19) y *Beijerinckia* sp.29 (11,52ppm) sin diferencias significativas con *Beijericnkia* spp. 3, 8, 19, 17, 32, 30, 14 y 25 (Tabla 20).

#### 4.6 Bacterias seleccionadas

Las bacterias de cada uno de los géneros investigados que alcanzaron los mayores valores de nitrógeno fijado como amonio fueron seleccionados para su análisis molecular, siendo *A. amazonense* E8, *Burkholderia* sp. E3, *Azotobacter* sp. 80 y *Beijerinckia* sp. 29 (Tablas 17 a 20).



**Figura 73.** Coloración observada en la cuantificación del nitrógeno fijado como amonio.

**Tabla 13.** 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. amazonense</i> E8	1,098	18,70	<i>Azospirillum</i> sp1 I5	0,512	8,18
<i>A. irakense</i> T6	0,988	16,72	<i>A. irakense</i> E12	0,480	8,00
<i>A. lipoferum</i> T8	0,978	16,54	<i>Azospirillum</i> sp1 T3	0,464	7,38
<i>A. amazonense</i> E2	0,942	15,88	<i>Azospirillum</i> sp1 E14	0,454	7,08
<i>Azospirillum</i> sp1 I8	0,938	15,74	<i>A. halopreferens</i> E19	0,450	6,92
<i>Azospirillum</i> sp1 E6	0,900	15,12	<i>A. halopreferens</i> I1	0,426	6,84
<i>A. halopreferens</i> E17	0,884	14,80	<i>Azospirillum</i> sp1 E5	0,424	6,62
<i>Azospirillum</i> sp1 E11	0,864	14,48	<i>A. halopreferens</i> E3	0,396	6,48
<i>A. halopreferens</i> T5	0,824	13,74	<i>A. largimobile</i> E15	0,348	5,86
<i>A. lipoferum</i> E7	0,774	12,80	<i>A. lipoferum</i> E10	0,346	4,98
<i>Azospirillum</i> sp1 E9	0,716	11,72	<i>Azospirillum</i> sp1 E13	0,342	4,92
<i>A. halopreferens</i> E20	0,706	11,56	<i>Azospirillum</i> sp1 I6	0,318	4,52
<i>Azospirillum</i> sp1 T7	0,694	11,34	<i>A. halopreferens</i> E4	0,314	4,44
<i>Azospirillum</i> sp1 T19	0,640	10,94	<i>A. halopreferens</i> I8	0,304	4,36
<i>A. halopreferens</i> T4	0,598	10,32	<i>Azospirillum</i> sp1 I2	0,280	4,16
<i>A. irakense</i> E18	0,558	9,56	<i>Azospirillum</i> sp1 T13.	0,202	3,96
<i>A. largimobile</i> E1	0,534	8,82	<i>A. halopreferens</i> I18	0,186	2,30
<i>A. irakense</i> T2	0,522	8,38			

Absorbancia control: 0,194

\*Promedio de tres repeticiones

**Tabla 14.** Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por *Burkholderia* spp. nativas en caldo extracto de suelo durante 7 días

<i>Burkholderia</i> spp.	Absorbancia corregida*	N (ppm)
<i>Burkholderia</i> sp. E3	0,748	12,32
<i>Burkholderia</i> sp. 7A	0,542	8,42
<i>Burkholderia</i> sp. 7M	0,532	8,34

Absorbancia control: 0,194

\*Promedio de tres repeticiones

**Tabla 15.** Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por *Azotobacter* spp. nativas en caldo extracto de suelo durante 7 días

<i>Azotobacter</i> spp.	Absorbancia corregida*	N (ppm)
<i>Azotobacter</i> sp. 80	0,736	12,08
<i>Azotobacter</i> sp.14	0,692	11,28
<i>Azotobacter</i> sp. 28	0,560	8,88
<i>Azotobacter</i> sp. 44	0,494	7,68
<i>Azotobacter</i> sp. 77	0,374	5,46
<i>Azotobacter</i> sp. 53	0,372	5,42
<i>Azotobacter</i> sp. 18	0,344	4,88
<i>Azotobacter</i> sp. 82	0,340	4,82
<i>Azotobacter</i> sp. 81	0,324	4,52
<i>Azotobacter</i> sp. 74	0,160	1,50

Absorbancia control: 0,194

\*Promedio de tres repeticiones

**Tabla 16.** Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por *Beijerinckia* spp. nativas en caldo extracto de suelo durante 7 días

<i>Beijerinckia</i> spp.	Absorbancia Corregida *	N (ppm)
<i>Beijerinckia</i> sp. 29	0,704	11,52
<i>Beijerinckia</i> sp. 3	0,694	11,34
<i>Beijerinckia</i> sp. 8	0,534	8,40
<i>Beijerinckia</i> sp. 19	0,494	7,64
<i>Beijerinckia</i> sp. 17	0,478	7,04
<i>Beijerinckia</i> sp. 32	0,460	6,82
<i>Beijerinckia</i> sp. 30	0,438	6,64
<i>Beijerinckia</i> sp. 14	0,378	5,52
<i>Beijerinckia</i> sp. 25	0,376	5,50
<i>Beijerinckia</i> sp. 31	0,360	5,16
<i>Beijerinckia</i> sp. 7	0,340	4,80
<i>Beijerinckia</i> sp. 13	0,324	4,52
<i>Beijerinckia</i> sp. 15	0,314	4,34
<i>Beijerinckia</i> sp. 16	0,302	4,14
<i>Beijerinckia</i> sp. 21	0,296	3,20
<i>Beijerinckia</i> sp. 28	0,210	2,44
<i>Beijerinckia</i> sp. 23	0,124	0,86
<i>Beijerinckia</i> sp. 33	0,088	0,40

Absorbancia control: 0,194.

\*Promedio de tres repeticiones



**Tabla 17.** Prueba de Kruskal – Wallis de la concentración de nitrógeno fijado como amonio (ppm) por *Azospirillum* spp.

Azospirillum spp.		Amonio ppm	Significancia ( $\alpha= 0,05$ )															
A. amazonense	E8	18,70	a															
A. irakense	T6	16,72	a	b														
A. lipoferum	T8	16,54	a	b														
A. amazonense	E2	15,88	a	b	c													
Azospirillum sp1	I8	15,74	a	b	c	d												
Azospirillum sp1	E6	15,12	a	b	c	d												
A. halopreferens	E17	14,80	a	b	c	d	e											
Azospirillum sp1	E11	14,48	a	b	c	d	e											
A. halopreferens	T5	13,74	a	b	c	d	e	f										
A. lipoferum	E7	12,80	a	b	c	d	e	f	g									
Azospirillum sp1	E9	11,72	a	b	c	d	e	f	g									
A. halopreferens	E20	11,56	a	b	c	d	e	f	g	h								
Azospirillum sp1	T7	11,34	a	b	c	d	e	f	g	h	i							
Azospirillum sp1	T19	10,94	a	b	c	d	e	f	g	h	i							
A. halopreferens	T4	10,32	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j						
A. irakense	E18	9,56	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k					
A. largimobile	E1	8,82		b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l				
A. irakense	T2	8,38		b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l				
Azospirillum sp1	I5	8,18		b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m			
A. irakense	E12	8,00			c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m			
Azospirillum sp1	T3	7,38			c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m			
Azospirillum sp1	E14	7,08				d	e	f	g	h	i	j	k	l	m			
A. halopreferens	E19	6,92				d	e	f	g	h	i	j	k	l	m			
A. halopreferens	I1	6,84						f	g	h	i	j	k	l	m			
A. halopreferens	E5	6,62						f	g	h	i	j	k	l	m			
Azospirillum sp1	E3	6,48							g	h	i	j	k	l	m			
A. largimobile	E15	5,86								h	i	j	k	l	m			
A. lipoferum	E10	4,98									i	j	k	l	m			
Azospirillum sp1	E13	4,92									i	j	k	l	m			
Azospirillum sp1	I6	4,52										j	k	l	m			
A. halopreferens	E4	4,44											j	k	l	m		
A. halopreferens	I8	4,36												k	l	m		
Azospirillum sp1	I2	4,16													l	m		
Azospirillum sp1	T13	3,96													l	m		
A. halopreferens	I18	2,30														m		

**Tabla 18.** Prueba de Kruskal – Wallis de la concentración de nitrógeno fijado como amonio (ppm) por *Burkholderia* spp.

<i>Burkholderia</i> spp.	Amonio ppm	Significancia ( $\alpha= 0,05$ )
E3	12.33	a
7A	8,420	b
7M	8,340	b

**Tabla 19.** Prueba de Kruskal – Wallis de la concentración de nitrógeno fijado como amonio (ppm) por *Azotobacter* spp.

<i>Azotobacter</i> spp.	Amonio ppm	Significancia ( $\alpha= 0,05$ )
80	12,08	a
14	11,28	a b
28	8,88	a b c
44	7,68	a b c
77	5,46	b c d
53	5,42	b c d
18	4,88	c d
82	4,82	c d
81	4,52	c d
74	1,50	d

**Tabla 20.** Prueba de Kruskal – Wallis de la concentración de nitrógeno fijado como amonio (ppm) por *Beijerinckia* spp.

<i>Beijerinckia</i> spp.	Amonio ppm	Significancia ( $\alpha= 0,05$ )					
29	11,52	a					
3	11,34	a					
8	8,40	a	b				
19	7,64	a	b	c			
17	7,04	a	b	c	d		
32	6,82	a	b	c	d		
30	6,62	a	b	c	d	e	
14	5,52	a	b	c	d	e	f
25	5,50	a	b	c	d	e	f
31	5,16		b	c	d	e	f
7	4,80		b	c	d	e	f
13	4,52		b	c	d	e	f
15	4,34			c	d	e	f
16	4,14				d	e	f
21	3,20				d	e	f
28	2,44					e	f
23	0,86					e	f
33	0,40						f

#### **4.7 Gen *nifH* identificado en bacterias rizosféricas diazótroficas aisladas de arroz**

En *Azospirillum amazonense* E8, *Burkholderia* sp. E3, *Azotobacter* sp. 80 y *Beijerinckia* sp. 29, se identificó el gen *nifH*, obteniéndose un producto de 360 pares de bases en la corrida electroforética en gel de agarosa.

## V. DISCUSIÓN

En muestras de suelo rizosférico de cultivos de arroz inundado se aislaron bacterias, coincidiendo con Eckert *et al.* (2001); Rives, (2006); Garrido, (2007) y de Souza *et al.* (2010). La rizosféra es el volumen de suelo adherido a las raíces, que a menudo se encuentra de 1 a 5 mm de la superficie (Aguado, 2012). Las bacterias que habitan en la superficie y colonizan agresivamente las raíces son rizobacterias y si tienen capacidad de estimular el crecimiento de las plantas son Rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas, PGPR (Banerjee *et al.*, 2006).

Uno de los mecanismos benéficos de las PGPR es la fijación de nitrógeno. En este contexto, se utilizaron medios sólidos y semisólidos sin nitrógeno para aislar bacterias rizosféricas aerobias y microaerófilas, respectivamente, coincidiendo con Garrido (2007) y Menezes (2009) quienes aislaron estas bacterias en suelos de *Panicum maximum*, *Dichantium aristatum* y *Zea mays*.

Para aislar bacterias diazótrofes aerobias, las muestras de suelo rizosférico se sembraron en los medios LG, LGD y Beijerinckia, coincidiendo con Garrido (2007). Se obtuvieron 30 aislados en LG y 22 en Beijerinckia,

identificándose *Azotobacter* y *Beijerinckia* con el 33,33 y 81,81% de muestras, respectivamente. De igual manera, *Azotobacter* fue reportada como bacteria rizosférica aerobia en arroz. A su vez, *Beijerinckia* fue identificada en raíces, tallos y hojas de arroz por Koomnok *et al.* (2007).

El 66,67 y 18,19% de las bacterias aerobias en LG y *Beijerinckia* correspondieron a otros géneros no identificados. Al respecto, Menezes (2009) mencionó además de *Azotobacter* y *Beijerinckia*, otras bacterias diazótrofes aerobias como *Azoarcus*, *Azomonas* y *Derxia*.

En el presente estudio se aislaron bacterias diazótrofes en LGD, sin embargo, no se identificó *Derxia* spp. Al respecto, Garrido (2007) cuantificó bacterias en suelo rizosférico de pastos sembrados en LGD y aisló colonias bacterianas convexas, cremas, grandes, brillantes y mucosas, constituidas por bacilos Gram negativos con inclusiones; no obstante, el análisis de la secuencia del gen 16S rRNA identificó *Klebsiella* spp.

Para el enriquecimiento y aislamiento de bacterias diazótrofes microaerófilas, las muestras de suelo rizosférico de arroz se sembraron en medios semisólidos sin nitrógeno, coincidiendo con Koomnok *et al.* (2007), Jha *et al.* (2009) y Punschke & Mayans (2011), quienes utilizaron los medios NFb, LGI, JMV, LGI-P y JNFb.

Las bacterias diazótrofes microaerófilas fueron reconocidas por una película blanquecina formada bajo la superficie de medios semisólidos, en los que la consistencia semisólida favorece el crecimiento y desplazamiento de las bacterias hacia el lugar, donde 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). En muestras de arroz Koomnok *et al.* (2007), informaron que la película bacteriana se observó varios mm debajo de la superficie del medio después de 4 – 10 días de incubación y en la superficie después de 10 o más días.

En los medios semisólidos, además de la película bacteriana se observó viraje del indicador. Asimismo, Mantilla, (2007) reportó viraje del indicador en NFb, debido a la alcalización por la actividad metabólica de la película bacteriana, con

utilización del ácido málico y transformación en malato. A su vez, Sánchez (2008) observó viraje del indicador al azul, cuando el medio era en un inicio verde y a verde cuando era amarillo, evidenciándose cambio en el pH, por actividad de las bacterias diazótrofes.

Para tener certeza en la obtención de bacterias diazótrofes, se realizaron tres subcultivos en medios semisólidos sin nitrógeno, por cuanto, según Menezes (2009) estos medios son semiselectivos y contienen trazas de nitrógeno, proveniente de los reactivos y agua destilada, que posibilitan el crecimiento de bacterias que utilizan nitrógeno combinado. Corroborando lo expuesto, Koomnok *et al.* (2007) aislaron de arroz bacterias formadoras de película superficial en NFb; no obstante, en la prueba de reducción del acetileno no demostraron la diazotrofia.

Los subcultivos sucesivos en medios semisólidos evitan el crecimiento de saprófitos, permiten la purificación de los cultivos y minimizan la ocurrencia de falsos positivos (Koomnok *et al.*, 2007; Menezes, 2009; Sang *et al.*, 2013). De esta manera, la frecuencia de muestras de suelo rizosférico de arroz positivas para bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas fue disminuyendo desde 50,0% en NFb al primer subcultivo hasta 42,59% después del tercer subcultivo.

Las bacterias diazótrofes pueden ser de vida libre, asociativas y endófitas. Las de vida libre habitan la superficie de las raíces o la rizósfera, mencionándose *Azotobacter* y *Beijerinckia*. Las asociativas o endófitas facultativas colonizan tanto el suelo rizosférico como el interior de las raíces, siendo *Azospirillum* el género representante. A su vez, las endófitas obligadas como *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* y *Burkholderia* colonizan las raíces intracelulares de los tejidos, mayoritariamente (Garrido, 2007); no obstante, el suelo rizosférico es la mayor fuente de bacterias endófitas, porque es allí donde comienza el proceso de colonización (Beracochea, 2011).

En el presente estudio se utilizaron medios de cultivo semisólidos con diferente fuente de carbono para la fijación de nitrógeno, a pH recomendados para bacterias específicas: NFb con ácido málico para *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. irakense* y *A. halopreferens*; LGI con sacarosa para *Azospirillum amazonense*;

JNFb con pH 5,8 para *Herbaspirillum*; LGI-P con 10% sacarosa y pH 5,5 para *Gluconacetobacter* y JMV con manitol pH 4,2 – 4,5 para *Burkholderia* spp. (Sánchez, 2008; Jha *et al.*, 2009; Marra *et al.*, 2012).

El medio LGI es similar al NFb, con la diferencia que la fuente de carbono sacarosa, el aumento en la concentración de la solución tampón y la reducción del pH son factores selectivos para aislar *A. amazonense*. Este criterio denota que la investigación de la fisiología de los microorganismos nuevos, se aplica en la metodología que permite la detección de forma más segura, barata y selectiva (Massena *et al.*, 2006). Por su parte, el aislamiento de *Herbaspirillum* puede ser confundido con *Azospirillum*, por lo que el pH inicial del medio JNFb se disminuyó a 5,8. Esta condición, aunada al desarrollo de colonias con la región central azul en JNFb, con una concentración de azul de bromotimol tres veces mayor (Garrido, 2007), y así como las colonias medianas y pequeñas con el centro marrón en medio batata identifica *Herbaspirillum* spp. (Punschke & Mayans, 2011).

El género *Azospirillum* fue aislado en el 64,81% de suelo rizosférico sembrado en NFb y LGI y en el 33,98% de las bacterias fijadoras de nitrógeno. En Lambayeque, estas bacterias fueron reportadas en el 55,7% de muestras de raíces de arroz (García y Muñoz, 2010) y 33% de raíces de tomate (Baiocchi & Saavedra, 2011). *Azospirillum* también ha sido aislado de suelo rizosférico de maíz (Mehnaz *et al.*, 2007), pastos (Garrido, 2007), cereales forrajeros (de Souza, 2010) e incluso de suelo contaminado con petróleo (Young *et al.*, 2008).

El género *Burkholderia* fue identificado en el 5,56% de las muestras de suelo rizosférico sembradas en JMV y en el 2,91% de bacterias fijadoras de nitrógeno. Se coincide con Gillis *et al.* (1995) y Muthukumaromy *et al.* (2005), quienes reportaron esta bacteria en suelo rizosférico de arroz. También fue aislada de árboles frutales (Weber *et al.*, 2000), café (Caballero *et al.*, 2004), maíz y caña de azúcar (Reis *et al.*, 2004), tomate (Caballero *et al.*, 2007), e incluso se encontró en simbiosis con el hongo micorrízico *Gigaspora margarita* (Minerdi *et al.*, 2001).

La mayor frecuencia de raíces de arroz con bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas en los medios NFb y LGI correspondió al género *Azospirillum*. 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 le 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, en una colonización externa de las raíces, pero también pueden ingresar a los tejidos. Asimismo, en condiciones desfavorables producen melanina, polihidroxibutirato, polisacáridos, forman agregados celulares o "quistes" y presentan pleomorfismo (Cholula, 2005; Baca & Sánchez, 2010); mecanismos que explican su mayor número entre las bacterias rizosféricas aisladas. Por el contrario, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* y *Burkholderia* son endófitos obligados, cuya sobrevivencia es mínima sin el hospedero (de Souza *et al.*, 2010; Menezes, 2009; Garrido, 2007).

*Azospirillum* predominó frente a *Burkholderia*. Al respecto Marra *et al.* (2012) cuantificaron estas bacterias como rizosféricas y endófitas en el cultivo de flores *Syngonanthus* sp. "siempre viva", determinando que en NFb y LGI sembrados con muestras de suelo rizosférico y tejido superficial de tallos se alcanzaron 4,98 y 4,08 NMP X 10<sup>4</sup> g<sup>-1</sup> de tejido vegetal, en comparación con 3,34 NMP X 10<sup>4</sup> g<sup>-1</sup> en JNFb. Las bacterias de *Azospirillum* son consideradas rizosféricas y *Herbaspirillum* son endófitas. En este contexto, en muestras de hojas y raíces desinfectadas y sembradas en JNFb se alcanzó 2,49 NMP X 10<sup>4</sup> g<sup>-1</sup> de tejido foliar, en comparación con 0,67 y 0,65 en NFb y LGI, respectivamente.

En el 2,91 – 33,98% de las bacterias fijadoras de nitrógeno obtenidas en los diferentes medios semisólidos, se identificaron los géneros *Azospirillum* y *Burkholderia*, lo que significa que el 97,09 – 66,02% correspondió a otros géneros. Según Baldani (2004), los medios NFb, JNFb y JMV son semiselectivos, para *Azospirillum*, *Herbaspirillum* y *Burkholderia*, respectivamente; sin embargo, pueden crecer otros diazótrofos. En este contexto, Menezes (2009) utilizó LGI, JNFb y JMV para aislar bacterias diazotróficas de maíz, identificando *Achromobacter*, *Pseudomonas* y *Raoultella* como rizosféricas y *Enterobacter*, *Ochrobactrum*, *Pantoea* y *Pseudomonas* como endófitas. Por su parte, Garrido (2007) además de

*A. brasilense* y *A. lipoferum*, aisló *Klebsiella pneumoniae* de pastos guinea, angleton y braquiaria.

Corroborando lo expuesto, Sánchez (2008) investigó el crecimiento de ocho morfotipos de bacterias diazótrofes, determinando que cuatro (A10, A11, A24, A13) mostraron especificidad para su medio de aislamiento LGI-P y uno para JMV, mientras que A4 creció en LGI-P y JNFb; A12 en JMV y JNFb ; A14 en JMV y NFB y A16 en JMV y LGI-P. Con base a los resultados se concluyó que las bacterias eran diazótrofes, pero no era posible la determinación exacta del género, aun cuando solo haya crecido en uno de los medios semisólidos. En ese contexto, en el presente estudio también se realizó la caracterización fenotípica de las bacterias, confirmándose los géneros *Azospirillum* y *Burkholderia*.

En el presente estudio en arroz se aislaron bacterias diazotróficas, identificándose como aerobias *Azotobacter* y *Beijerinckia* y como microaerófilas *Azospirillum* y *Burkholderia*. En otras investigaciones, en arroz, se identificaron como diazotróficas *Paenibacillus*, *Microbacterium*, *Klebsiella* y *Bacillus* (Ji *et al.*, 2013); *Enterobacter* spp. (Mollo *et al.*, 2012; Mbai *et al.*, 2013); *Rhizobium* y *Pseudomonas* (Jha *et al.*, 2009); *Serratia marcescens* (Gyaneshwar *et al.*, 2001), *Methylobacterium* y *Curtobacterium* (Elbeltagy *et al.*, 2012).

La caracterización fenotípica de las bacterias rizosféricas incluyó la morfología, pruebas de hidrólisis y utilización de diferentes fuentes de carbono para la fijación de nitrógeno, entre otras. De igual manera, se identificó *Azospirillum*, *Herbaspirillum* y *Beijerinckia* en arroz (Elbeltagy *et al.*, 2000; Koomnok *et al.*, 2007; Baca & Sánchez 2010), *Azotobacter* en hortalizas (Escobar *et al.*, 2011) y *Burkholderia* en maíz, pastos, caña de azúcar, café y frutales (Moreno & Gálvez, 2013).

Las características fenotípicas ofrecen una visión detallada de la variación de las bacterias entre una a diferentes especies, permitiendo también reconocer los rasgos característicos de cada especie; no obstante, no permiten evidenciar la localización exacta de los microorganismos, cuando se investiga la capacidad de colonización o distribución dentro del hospedero (Rives *et al.*, 2007). En este

contexto, las técnicas convencionales de identificación no se pueden subestimar, sino que deben complementarse con las técnicas moleculares (Bou, 2011).

Todas las bacterias rizosféricas fijaron nitrógeno *in vitro*. De igual manera se demostró la fijación de nitrógeno *in vitro* mediante la técnica de reducción de acetileno, ARA, por *Azospirillum* (Mollo *et al.*, 2012), *Azotobacter* (Guzmán *et al.*, 2012), así como también mediante el método colorimétrico del fenolhipoclorito con *Azospirillum* (García & Muñoz, 2010), *Burkholderia* (Barba & Bravo 2013) y *Azotobacter* (Escobar *et al.*, 2011).

Kennedy *et al.* (2004) demostraron que dependiendo de la variedad de arroz algunas especies de *Herbaspirillum* pueden fijar 19 – 54% del nitrógeno requerido para este cultivo. Respecto a *Burkholderia*, diversas especies son capaces de fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis (Minerdi *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2006), vida libre y en asociación con plantas (Kim *et al.*, 2006; Perin *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006).

El amonio producto de la fijación de nitrógeno *in vitro* se cuantificó por el método de Bertelot, 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 rizosféricas aisladas de arroz se cuantificó hasta 18,70ppm con *Azospirillum amazonense* E8, concentracion inferior a 32,13ppm (Casos & Santiago, 2013), 29,09ppm (García & Muñoz, 2010), 21,09ppm, (Baiocchi & Saavedra, 2011) y 20,48ppm (Muñoz & Vásquez, 2012), reportado para *Azospirillum* spp. aisladas de malezas, arroz, tomate y maíz, respectivamente.

En las bacterias rizosféricas 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. 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, obteniéndose un producto de 360 pares de bases, correspondiente a un fragmento del gen *nifH* en *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter*, *Herbasprillum*, *Burkholderia* y *Pseudomonas*. El gen *nifH* codifica la ferroproteína dinitrogenasa reductasa y es

uno de los genes estructurales (*nifHDK*) de la nitrogenasa (Lara *et al.*, 2007) o complejo que cataliza la conversión del nitrógeno gaseoso a amoníaco en la fijación biológica del nitrógeno (Mayz, 2004).

## VI. CONCLUSIONES

- ✓ Se aislaron bacterias rizosféricas diazotróficas microaerófilas y aerobias en los cultivos de arroz, en Lambayeque.
- ✓ La caracterización fenotípica de 103 bacterias rizosféricas diazotróficas microaerófilas identificó *Azospirillum* (33,98%) y *Burkholderia* (2,91%) en arroz.
- ✓ La caracterización fenotípica de 71 bacterias rizosféricas diazotróficas aerobias identificó *Azotobacter* (14,08%) y *Beijerinckia* (25,35%) en arroz.
- ✓ Las bacterias rizosféricas aisladas de arroz fijaron nitrógeno *in vitro* alcanzando 2,30 – 18,70 ppm (*Azospirillum* spp.), 8,34 – 12,32 ppm (*Burkholderia* spp.), 1,50 – 12,08 ppm (*Azotobacter* spp.) y 0,40 – 11,52 ppm (*Beijerinckia* spp.).
- ✓ Se identificó el gen *nifH* en *Azospirillum amazonense* E8, *Burkholderia* E3, *Azotobacter* 80 y *Beijerinckia* 29.

## VII. RECOMENDACIONES

- ✓ Determinar el efecto de las bacterias rizosféricas 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 rizosféricas diazotróficas aisladas de arroz.
- ✓ Determinar el efecto de *Azospirillum amazonense* E8, *Burkholderia* E3, *Azotobacter* 80 y *Beijerinckia* 29, 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 las bacterias rizosféricas diazotróficas aisladas de *Oryza sativa* L. "arroz", como una alternativa para disminuir el uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos, que contaminan el ambiente. Se colectaron 54 muestras de suelo rizosférico, se diluyeron en solución salina esterilizada y alícuotas de 0,1 mL se sembraron en los medios semisólidos NFb y LGI para *Azospirillum* spp., JNFb para *Herbaspirillum* spp., LGI-P para *Gluconacetobacter* spp. y JMV para *Burkholderia* spp., así como en los medios sólidos LG, LGD y Beijerinckia para *Azotobacter* spp., *Derxia* spp. y *Beijerinckia* spp., respectivamente. Las bacterias fijadoras de nitrógeno microaerófilas se reconocieron por una película blanquecina formada debajo de la superficie del medio y por el viraje del indicador, siendo aisladas en sus respectivos medios sólidos. A su vez, las bacterias aerobias se reconocieron por sus colonias características desarrolladas. Se obtuvieron 103 cultivos de bacterias diazótrofes microaerófilas, identificándose *Azospirillum* (33,98%), *Burkholderia* (2,91%) y 71 cultivos de bacterias diazotróficas aerobias, identificándose *Azotobacter* (14,08%) y *Beijerinckia* (25,35%). Todas las bacterias fijaron nitrógeno *in vitro*, alcanzando 5,75 – 33,17 ppm (*Azospirillum* spp.), 9,61 – 21,38 ppm (*Burkholderia* spp.), 6,0 -30,57 ppm (*Azotobacter* spp.) y 9,96 – 28,78 ppm (*Beijerinckia* spp.). Se identificó el gen *nifH* A. *amazonense* E8, *Burkholderia* E3, *Azotobacter* 80 y *Beijerinckia* 29, determinándose el potencial de las bacterias rizosféricas aisladas de arroz, como fijadoras de nitrógeno.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, M., Willian, A. & Belmonte, U. (2006). Origen, Evolución y Diversidad de Arroz. *Agronomía Tropical*, 56 (2), 151-170
- 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 Oriza sativa L. "arroz"*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Baiocchi, A. & Saavedra, A. (2011). *Caracterización de cepas nativas de Azospirillum spp. y su efecto como promotoras en el desarrollo vegetativo del tomate (Lycopersicon esculentum Mill.) en invernadero*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Baldani, J. (2004). Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 549 – 579.
- Banerjee, M., Yesmin, L. & Vessey, J. (2006). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria as biofertilizers and biopesticides. *Handbook of Microbial Biofertilizers*, 137- 181.
- Barba, H. & Bravo, R. (2013). *Especies de Burkholderia y Pseudomonas aisladas de las rizosfera 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 – diazotrófas nativas*. Tesis de Licenciatura. Universidad de la República, Uruguay.
- Bhattacharyya, P. & Jha, D. (2012). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 28, 1327- 1350.
- Brenner, D., Krieg N. & Staley, J. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Proteobacteria, Part B, the Gammaproteobacteria. 2(2) USA: Springer.



- Bou, G. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de Microbiología. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 29(8), 601.
- Caballero, J., Martínez, 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. & Martínez, L. (2007). The tomato rhizosphere, an environment rich in N<sub>2</sub>-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *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, Sangolquí, Ecuador.
- 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.
- Chen, W., de Faria, S., Chou, J., James, E., Elliott, G., Sprent, J., Bontemps, C., Young, J. & Vandamme, P. (2006). *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1847-1851.
- Cholula, L. P. (2005). *Estudio de la producción de poli B – hidroxibutirato (PHB) en Azospirillum brasilense Sp. 7*. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, México.
- Clavijo, C., Chipana, V., Centeno, J., Zúñiga, D., & Guillén, C. (2012). Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias diazotróficas de la rizósfera del cultivo de *Olea europea* "olivo" en Tacna Perú. *Ecología Aplicada*, 11(2), 89-102.

- De Souza, M., Da Silva, K., Nóbrega, A. & Carvalho, F. (2010). Bacterias diazotroficas asociativas: diversidad, ecología e potencial de aplicaciones. *Comunicata Scientiæ*, 1(2), 74-99.
- Eckert, B., Weber, O., Kirchhof, G., Halbritter, A., Stoffels, M. & Hartmann, A. (2001). *Azospirillum doebereineri* a nitrogen-fixing bacterium associate with the C(4)-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.
- Elbeltagy, A., Nishioka, K., Suzuki, H., Soto, T., Soto, Y., Morisaki, H., Mitsui, H. & Minamisawa, K. (2000). Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. *Soil Science and Plant Nutrition*, 46, 617 – 629.
- Elbeltagy, A., Nishioka, K., Sato, T., Suzuki, H., Soto, T., Soto, Y., Morisaki, H., Mitsui, H. & Minamisawa, K. (2012). Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. *Soil Science and Plant Nutrition*, 46, (3), 617 – 629.
- Escobar, C., Horna, Y., Carreño, C. & Mendoza, G. (2011). Caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* spp. y su efecto en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill. "tomate" en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 2(1), 39 – 49.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO. (2004). *El Arroz y la Nutrición Humana (El Arroz es Vida)*. Recuperado de <http://www.fao.org/ri ce2004/es/f-sheet/hoja3.pdf>.
- Franco, M. (2008). *Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas*. Tesis de Doctorado. Universidad de Granada, España.
- García, F. & Muñoz, H. (2010). *Caracterización de cepas nativas de Azospirillum spp. y su efecto como promotoras del desarrollo vegetativo de arroz (Oryza sativa)*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Garrido, R. (2007). *Aislamiento e identificación de bacterias diazotróficas rizosféricas y endófitas asociadas a suelos y pastos del valle y sabana del Cesar en dos épocas climáticas*. Tesis de Maestría. Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá.

- Gillis, M., Van, V., Bardin, R., Goor, M., Herbar, P., Willems, A., Segers, P., Kertters, K., Heulin, T. & Fernandez, M. (1995). Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp.nov. for N<sub>2</sub>-fixing isolates from rice in Vietnam. *International Journal Systematic Bacteriology*, 45, 274 – 289.
- González, E. (2009). *Actividad Antifúngica de Burkholderia cepacia aislada de maíz amarillo (Zea mays L.) bajo diferentes condiciones de cultivo*. Modalidad: Investigación. Universidad de Oriente Núcleo de Sucre Escuela de Ciencias Postgrado de Biología Aplicada.
- Gyaneshwar, P., James, E., Natarajan, M., Reddy, P., Reinhold-Hurek, B. & Ladha, J. (2001). Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 183, 2634-2645.
- Guzmán, A., Obando, M., Rivera, D., & Bonilla, R. (2012). Selección y caracterización de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 224, 182-190
- Hernández, A., Heydrich, M., Velázquez, M. & Hernández, A. (2006). Perspectivas del empleo de rizobacterias como agentes de control biológico en cultivos de importancia económica. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24 (1), 42-49.
- Hernández, R., Fernández, C., & Batista, P. (2010). *Metodología de la Investigación*. México: 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>
- Kennedy, I., Choudhury, A. & Kecskes, M. (2004). Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: Can their potential for plant growth promotion be better exploited ?. *Soil Biology and Biochemistry*, 36, 1229-1244.
- Kim, H., Park, M., Yang, H., An, D., Jin, H. & Yang, D. (2006). *Burkholderia ginsengisoli* sp. Nov., a beta- glucosidase- producing bacterium isolated from soil of a ginseng field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 2529 – 2533.

- Kloepper JW, Tuzun S and Kuc JA (1992). Proposed definitions related to induced disease resistance. *Biocontrol Science and Technology*, 2: 349–351.
- Koomnok, Ch., Teaumroong, N., Rerkasem, B. & Lumyong, S. (2007). Diazotroph endophytic bacteria in cultivated and wild rice in Thailand. *Science Asia*, 33, 429 – 435.
- 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., Ferrando, L. & Fernández, A. (2011). Dynamics, diversity and function of endophytic siderophore-producing bacteria in rice. *Microbiology Ecology*, 61,606-618.
- Lu, B. R. 2004. Taxonomy of the genus *Oryza* (Poaceae): Historical perspective and current status. *International Rice Research Notes* IRRN,24:4-9.
- Llatas, S. (2006). Estudio de las Poaceas Peruanas. Lambayeque, Perú.
- Mantilla, M. (2007). *Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de Crisantemo (Chrysanthemum morifolium var. Yoko ono) en periodo de enraizamiento*. Tesis Microbiólogo Agrícola Veterinario. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Martínez, O., Growley, D., Gajardo, G. & Moro, M. (2010). Mechanisms and practical consideration involved in Plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, (10) , 293-319.
- Marra, L., Graziotti, P., Nunes, U. & de Souza, F. (2012). Diazotrophic bacteria in Star Flowers. *Bioscience. J., Uberlândia*, 28 (1), 17- 24.
- Massena, V. Baldani, & Baldani, J. (2006). Ecología, aislamiento e identificación de bacterias diazotróficas. Recuperado de <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sciarttext&pid=s0100-204>
- Mayz, J. (2004). Fijación Biológica de Nitrógeno. *Revista UDO Agrícola*, 4 (1), 1-20.
- Mehnaz, S., Weselowski, B. & Lazarovits, G. (2007). *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 620–624.
- Menezes, S. (2009). *Aislamiento y caracterización de bacterias diazotrofas asociadas a maíz (Zea mays)*. Tesis de Licenciatura. Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay.
- Mbai, F., Magiri, E., Matiru, V., Ng'ang'a, V., & Nyambati, V. (2013). Isolation and characterisation of bacterial root endophytes with potential to enhance plant growth from Kenyan Basmati rice. *American International Journal of Contemporary Research*, 3(4), 25 – 40.

- Minerdi, D., Fani, R., Gallo, R., Boarino, A., Bonfante, P. (2001). Nitrogen fixation genes in a endosymbiotic *Burkholderia* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 725 – 732.
- Ministerio de Agricultura, MINAG. (2012). *Estadística Agraria Mensual. Sistema Integrado de Estadística Agraria, SIEA*. Perú. Recuperado de <http://www.minag.gob.pe/portal/>
- 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. *Actas 7mo Congreso de Medio Ambiente, AUGM*, La Plata, Argentina. Recuperado de <http://www.congresos.unlp.edu.ar/index.php/CCMA/7CCMA/paper/view/909/208>
- Moquete, C. (2010). El Cultivo de Arroz. *Guía técnica, Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal, Inc (CEDAF)*. Santo Domingo, República Dominicana.
- Mora, E. & Toro, M. (2007). Estimulación del crecimiento vegetal por *Burkholderia cepacia*, una cepa nativa de suelos ácidos de Sabanas Venezolanas. *Agronomía Tropical*, 57(2), 123-128.
- Moreno, L., & Gálvez, F. (2013). Potencial biofertilizante de bacterias diazótrofes aisladas de muestras de suelo rizosférico. *Pastos y Forrajes*, 36 (1), 33-37.
- 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, I., Cleenwerck, G., Revathi, M., Vadivelu, D., Janssens, B., Hoste, K., Gum, K., Park, C., Son, T. & Caballero, J. (2005). Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice, syst. *Applied and Environmental Microbiology*, 28, 277 – 286.
- Nihorimbere, V., Ongeno, M., Smorgissi, M., & Tlonart, P. (2011). Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biothechnology Agronomy Society Environment*, 15 (2), 327-337
- 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.

- Pelletier, N., Audsley, E., Brodt, S., Garnett, T., Henriksson, P., Kendall, A. (.....) & Troell, M. (2011). Energy intensity of agriculture and food systems. *Annual Review of Energy and the Environment*, 36, 223-246.
- 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.
- Perin, L., Martínez – Aguilar, L., Paredes – Valdez, G., Baldani, J., Estrada, P., Reis, V. & Caballero, J. (2006). *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1931 – 1937.
- Punschke, K. & Mayans, M. (2011). Selección de cepas de *Herbaspirillum* spp. promotoras del crecimiento de arroz. *Agrociencia Uruguay*, 15 (1), 19 – 26.
- Rangel, L., Rodríguez, M., & Cerrato, J. (2011). Afinidad y efecto de *Azospirillum* sp. en Maíz. *Agronomía Mesoamericana*, 22(2), 269-279.
- Reyes, A. (2011). *Aislamiento e identificación de cepas de Azospirillum sp., y evaluación de su capacidad para suplir las necesidades de nitrógeno en el cultivo de maíz, (Zea mays) L. semihidropónico con dos sustratos diferentes bajo invernadero*. Tesis de Ingeniero Agropecuario. Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.
- Reis-Junior, F., Silva, M., Teixeira, K., Urquiaga, S. & Reis, V. (2004). Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* asociados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bacteria. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo* 28, 103 – 113.
- Rives, N. (2006). *Caracterización de géneros bacterianos rizosféricos y endófitos en el cultivo de arroz (Oryza sativa L.)*. Tesis de Maestría. Universidad de la Habana, Cuba.
- Rives, N., Acebo, Y. & Hernández, A. (2007). *Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en cultivo de arroz (Oryza sativa L.)*. Perspectivas de su uso en Cuba. *Cultivos Tropicales*, 28(2), 29- 38.
- 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
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA. (2010). *Uso de fertilizantes*. México. Recuperado de <http://www.sagarpa.gob.mx/>

- Sang, H., Mayank, A. & Se-Chul. Ch. (2013). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiological Research*. Recuperado de Microbiological Research (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres>
- Schoebitz, C. (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.
- Vicentini, K. (2006). *Fijación de nitrógeno por bacterias diazotróficas en cultivos de arroz irrigado*. Tesis de Doctorado. Universidad Federal de Santa María, Santa María, RS, Brasil.
- United States Department of Agriculture, USDA. (2013). *Journal Department of Agriculture of the United States*, 32(9), 506 – 524.
- Weber, O., Baldani, I., & Dobereiner, I. (2000). Bacterias diazotróficas 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.
- Young, C., Hupfer, H., Siering, C., Ho, M., Arun, A., Lai, W., Rekha, P., Shen, F., Hung, M., Chen, W. & Yassin, A. (2008). *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 959-963.
- Zamalloa, E. (2008). Comparativo de rendimiento de cuatro variedades de arroz en pozas con enmiendas en dos localidades de la selva del Manú en Perú. Disponible en: <http://www.edym.com/pm/pro manu/web01/literat.htm>

## **X. ANEXOS**



## ANEXO 1

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

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

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

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

Dónde:

n = Tamaño de la muestra

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

p = Prevalencia o presencia de bacterias rizoféricas fijadoras de nitrógeno (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 fijadoras de nitrógeno (en Garrido, 2007; Jha *et al.*, 2009)

a. Medio de cultivo NFb (*Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum irakense* y *Azospirillum halopraeferans*)

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	4,5g

Pesar los compuestos en el orden indicado, posteriormente completar el volumen a 1000mL con agua destilada y ajustar el pH a 6,5 - 6,8.

Para el medio semisólido se agrega 1,75-1,8g de agar agar L<sup>-1</sup>, para el medio sólido 15g de agar agar L<sup>-1</sup> y 20mg L<sup>-1</sup> de extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

Solución de micronutrientes

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

Completar el volumen a 1000 mL con 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 1L con agua desmineralizada, para obtener la solución 1,64% de Fe deseada.

**b. Medio de cultivo LGI (*Azospirillum amazonense*)**

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

Componentes	g $\text{L}^{-1}$
Azúcar de cristal	5,0
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	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% KOH 0,2N)	5mL
FeEDTA (Solución 1,64%)	4mL
Solución de vitaminas (biotinol)	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.

**c. 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 agar agar 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

**d. 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>
Azúcar cristal	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 (biotinol)	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 medios semisólidos agregar 1,8g de agar agar L<sup>-1</sup>, para medio sólido 17g de agar agar L<sup>-1</sup> y 20mg L<sup>-1</sup> de extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

**e. 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	0,2
Azul de bromotimol (0,5 % en KOH 0,2N)	2mL
FeEDTA (Solución 1,64%)	4mL
Agar	2,1
Solución de micronutrientes	2mL
Solución de vitaminas (complejo B comercial)	2mL
Agua destilada en cantidad suficiente	1000mL

Ajustar el pH 5,0.

**Solución de micronutrientes**

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>4</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 1000 mL de agua destilada

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

El medio LG fue elaborado por Lipman (1904)

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

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

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

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

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

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

El medio LGD o medio LG (Lipman, 1994) fue modificado por Campêlo & Döbereiner (1970)

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

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

### ANEXO 3

#### a.3 Caldo extracto de suelo al 10% (en García y 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 250 g 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.

#### Reactivos (en Lara *et al*; 2007., Cadena y Mantilla, 2011)

- **Cloruro de potasio 2M**

Cloruro de potasio	149,12g
Agua destilada	1000mL

- **Solución alcohólica de fenol 10%**

Fenol concentrado	10mL
Alcohol 97°	90mL

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

Nitroprusiato de sodio	0,5g
Agua destilada	100mL

- **Solución oxidante**

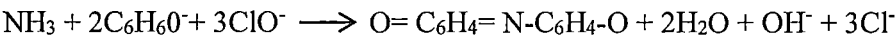
Citrato de sodio	20,0g
Hidróxido de sodio	1,0g
Hipoclorito de sodio 5% (lejía comercial)	2mL
Agua destilada	100mL



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

**c.1 Fundamento del método colorimétrico de Berthelot (fenolhipoclorito)**

Se basa en la formación de un color azul intenso de indofenol, que resulta de la reacción del ión amonio (NH<sub>4</sub>) 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:



**c.2 Preparación de diluciones a partir de una solución madre de NH<sub>4</sub>Cl**

Para obtener la curva patrón se prepara una solución madre de 100ppm de NH<sub>4</sub>Cl, para lo cual se pesa 0,1g de NH<sub>4</sub>Cl y se disuelve en 1L de agua bidestilada. Posteriormente, a partir de la solución madre se efectúan las siguientes diluciones:

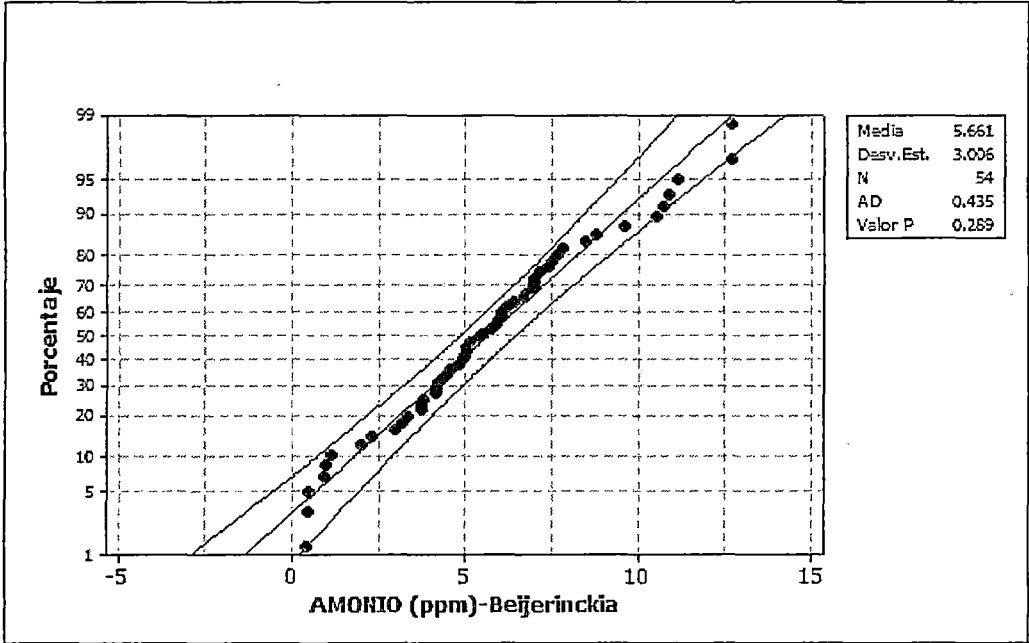
Nº de tubo	Solución patrón [mL]	H <sub>2</sub> O bidestilada [mL]	NH <sub>4</sub> Cl (Ug/mL = ppm) NH <sub>4</sub> Cl [µg /mL= ppm]
1	0,0	10,0	0
2	0,2	9,8	2
3	0,4	9,6	4
4	0,6	9,4	6
5	0,8	9,2	8
6	1,0	9,0	10
7	1,5	8,5	15
8	2,0	8,0	20

**c.3 Procedimiento para la cuantificación de amonio por colorimetría**

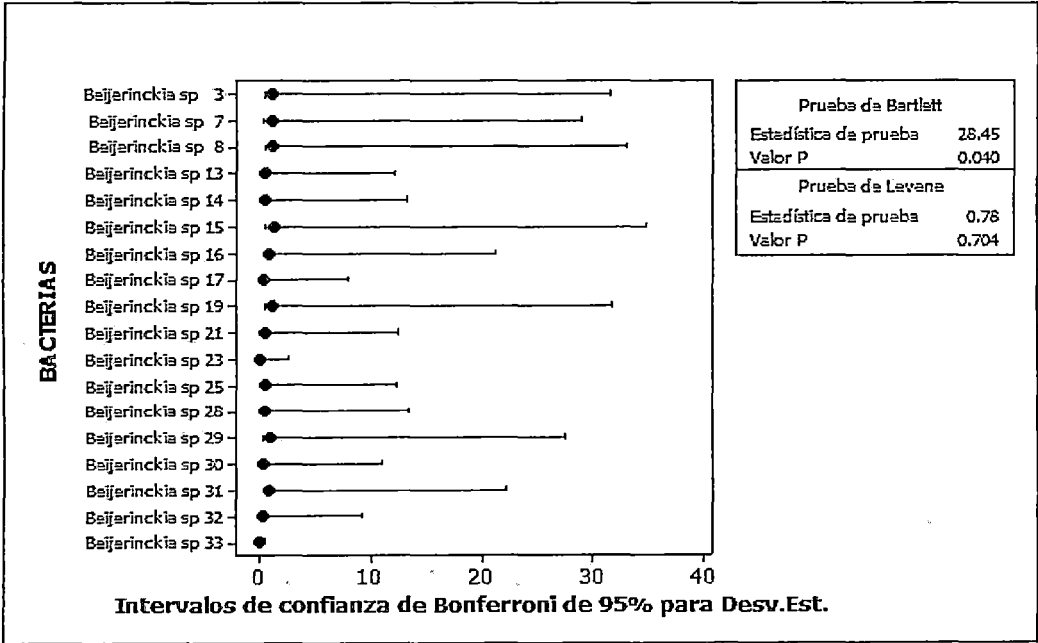
Obtenidas las diluciones, agregar a cada tubo 0,4mL de solución alcohólica de fenol al 10%; 0,4mL de nitroprusiato de sodio al 0,5% y 1mL de solución oxidante, luego agitar para mezclar y dejar en reposo durante 1 hora. Observar una coloración que varía del verde azul al azul intenso según la concentración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

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

ANEXO 4



Prueba de normalidad para la concentración de nitrógeno fijado como amonio por *Beijerinckia* spp.



Prueba de homogeneidad de varianzas para la concentración de nitrógeno fijado como amonio por *Beijerinckia* spp.

ANEXO 5

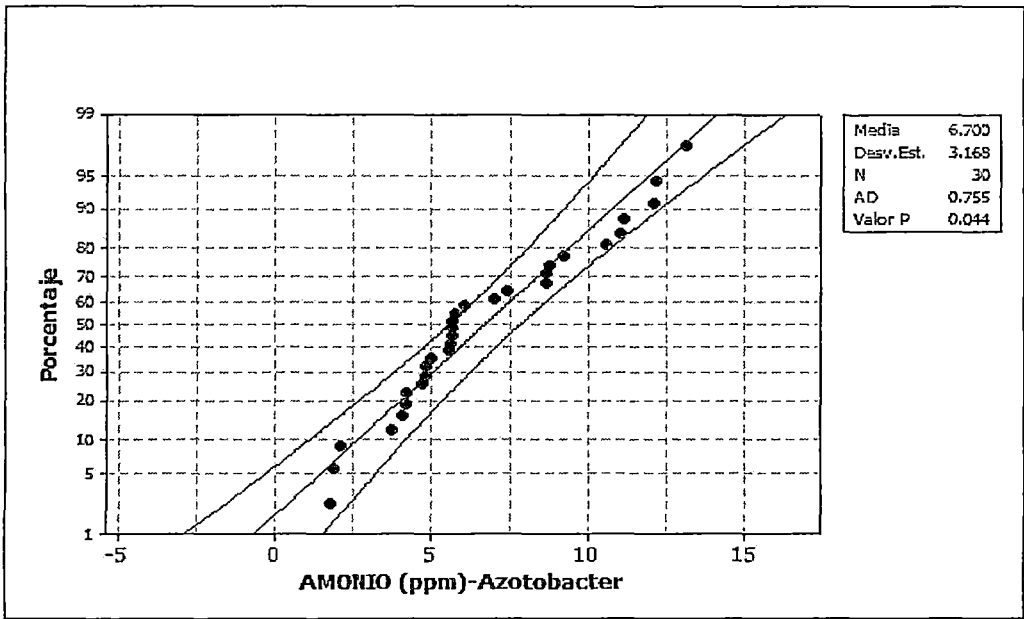
Análisis de varianza de la concentración de nitrógeno fijado como amonio por *Beijerinckia* spp.

$H_0 = \mu A_1 = \mu A_2 = \mu A_3 = \mu A_4 \dots \mu A_{20}$

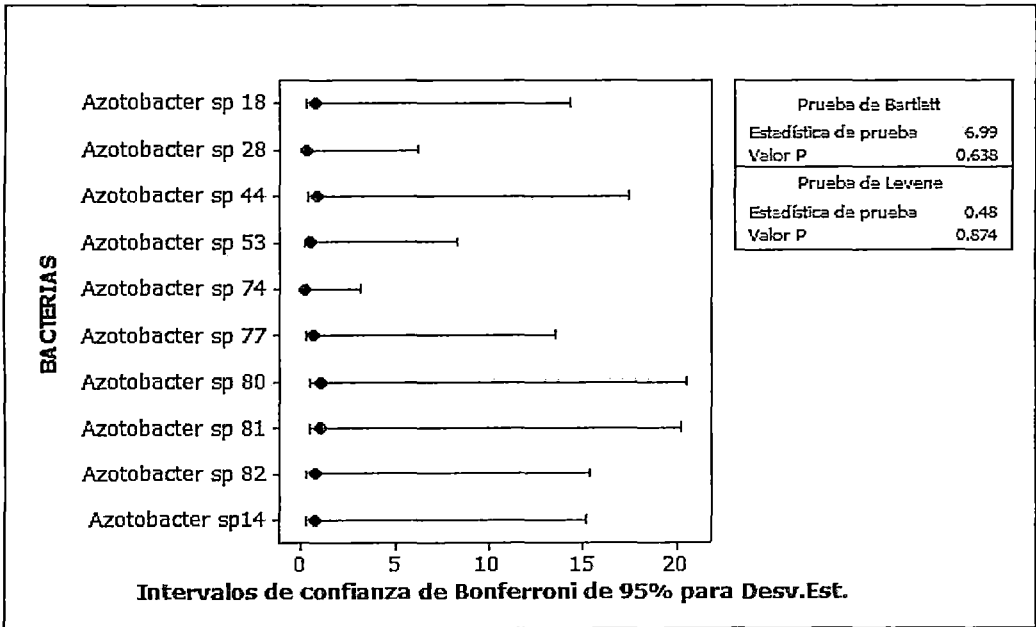
$H_a$  = Al menos una media es diferente

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fc	p	Sign.	Decisión
Bacterias	17	456,62	26,86	43,66	<0,0001	**	Rechaza $H_0$
Error	36	22,15	0,62				
Total	53	478,77					

ANEXO 6

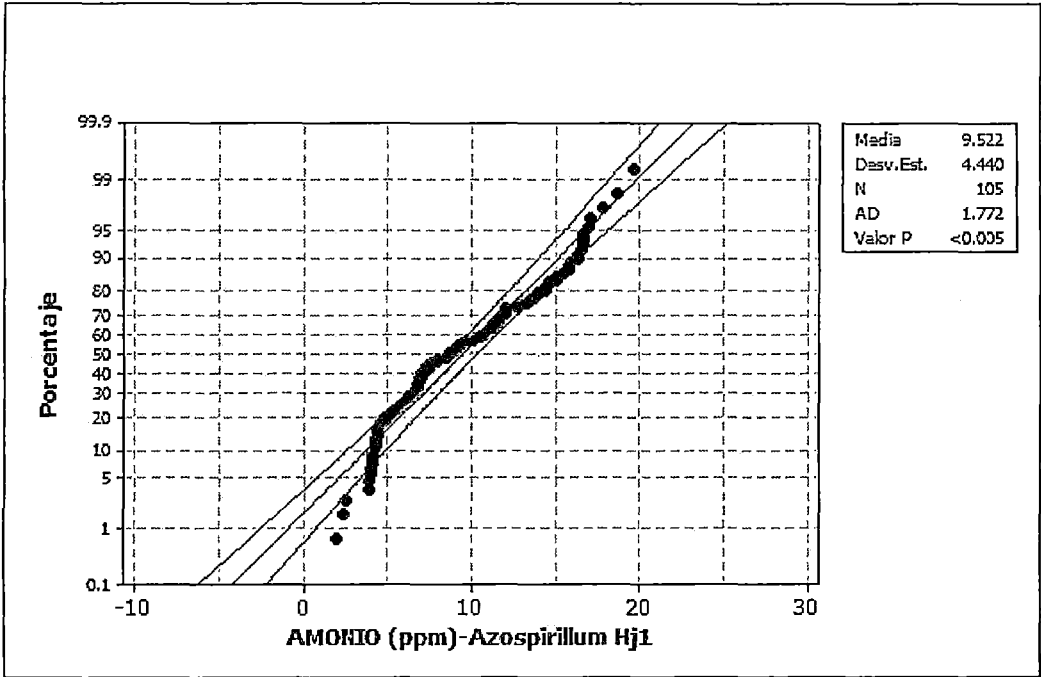


Prueba de normalidad para la concentración de nitrógeno fijado como amonio por *Azotobacter* spp.

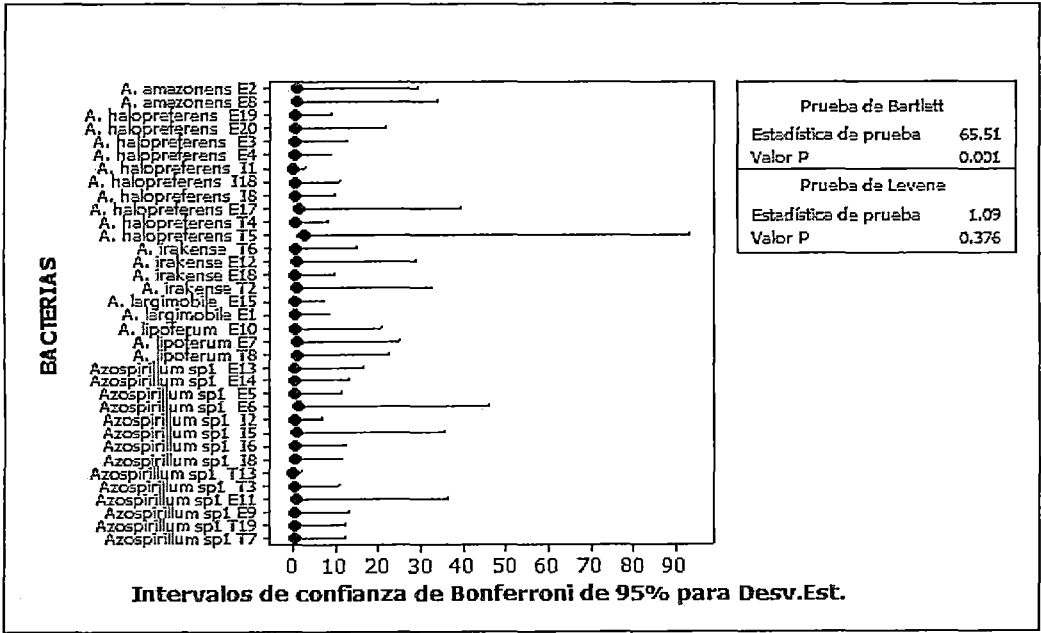


Prueba de homogeneidad de varianzas para la concentración de nitrógeno fijado como amonio por *Azotobacter* spp.

ANEXO 7

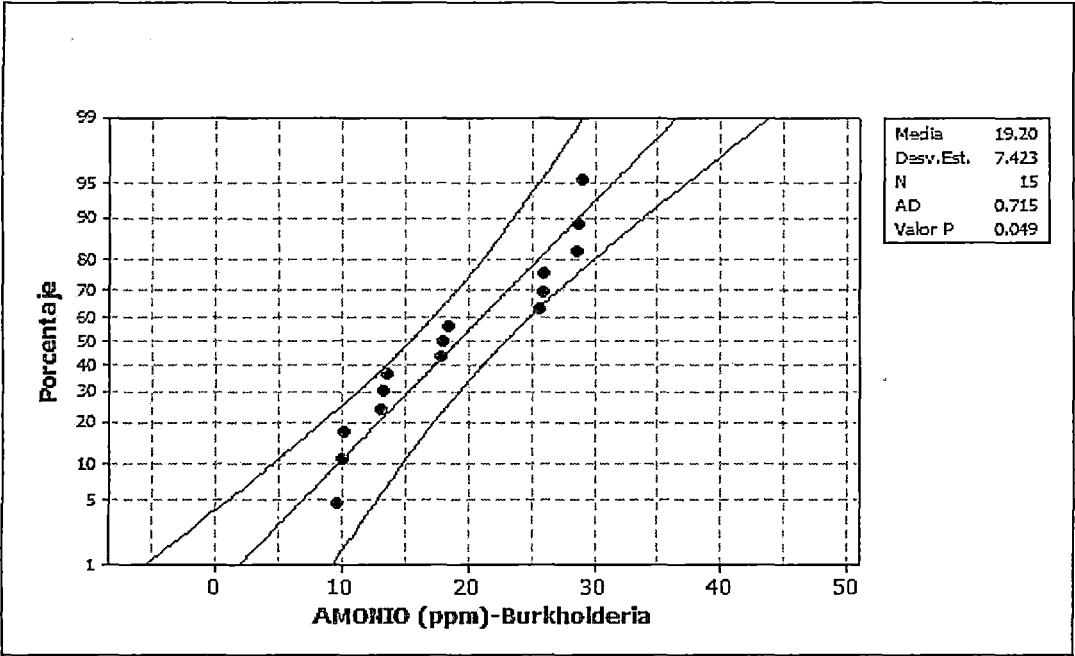


Prueba de normalidad para la concentración de nitrógeno fijado como amonio por *Azospirillum* spp.

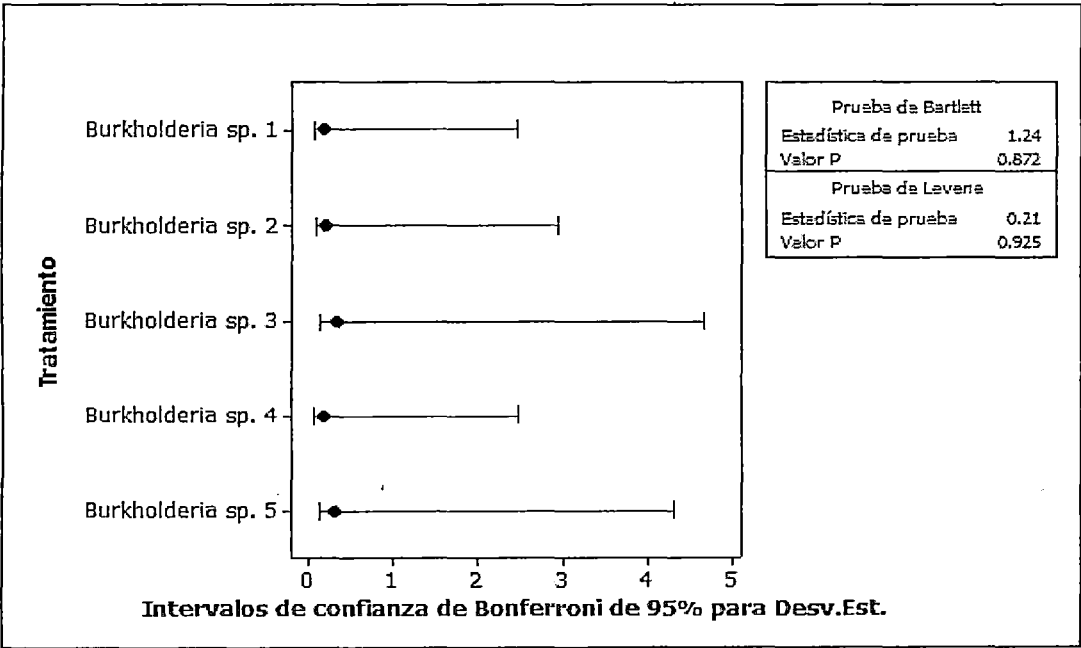


Prueba de homogeneidad de varianzas para la concentración de nitrógeno fijado como amonio por *Azospirillum* spp.

ANEXO 8



Prueba de normalidad para la concentración de nitrógeno fijado como amonio por *Burkholderia* spp.



Prueba de homogeneidad de varianzas para la concentración de nitrógeno fijado como amonio por *Burkholderia* spp.

## ANEXO 9

Primers para la amplificación del gen *nifH*

nifHf (59-GGCAAGGGCGGTATCGGCAAGTC-39)

nifHr (59-CCATCGTGATCGGGTCGGGATG-39)

nifDf (59-TGC ACTTCACCTCGGATTTCCAGG-39)

nifDr (59 CCTTGATGCTGTCGTCGAACAGAGC-39)

nifKf (59-AAGGCTGCGTCGCCTATTACCG-39)

nifKr (59-GTCGCGCTCCAGATATTTGCC-39).