



**UNIVERSIDAD NACIONAL
PEDRO RUIZ GALLO**



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA
Y PARASITOLOGÍA**

**“Potencial como promotoras del crecimiento de
plantas de las enterobacterias aisladas de la rizósfera
de *Zea mays* L. “maíz” en Lambayeque, 2013”**

TESIS

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

PRESENTADO POR:

**BR. LUIS HUMBERTO LEÓN MENDOZA
BR. GUSTAVO HORACIO SERNAQUÉ REYES**

**LAMBAYEQUE, PERÚ
2014**



**UNIVERSIDAD NACIONAL
PEDRO RUIZ GALLO**



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA
Y PARASITOLOGÍA**

**“Potencial como promotoras del crecimiento de
plantas de las enterobacterias aisladas de la rizósfera
de *Zea mays* L. “maíz” en Lambayeque, 2013”**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA MICROBIOLOGÍA-PARASITOLOGÍA

PRESENTADO POR:

**BR. LUIS HUMBERTO LEÓN MENDOZA
BR. GUSTAVO HORACIO SERNAQUÉ REYES**

APROBADO POR:

**M.Sc. CLARA CUEVA CASTILLO
PRESIDENTE**

**M.Sc. GILBERTO CHÁVEZ SANTA CRUZ
SECRETARIO**

**Lic. JULIO CESAR SILVA ESTELA
VOCAL**

**Dra. Blga. CARMEN ROSA CARREÑO FARFÁN
PATROCINADORA**

**LAMBAYEQUE, PERÚ
2014**

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.....	4
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
	3.1 Materiales.....	9
	3.1.1 Material biológico.....	9
	3.1.2 Población y muestra del estudió.....	9
	3.2 Metodós.....	10
	3.2.1 Variables en estudio.....	10
	3.2.2 Tipos de estudio y diseño de contrastación de hipótesis.....	10
	3.2.3 Lugar del muestreo	10
	3.2.4 Muestra del suelo rizosférico	14
	3.2.5 Aislamiento e identificación de enterobacterias.....	14
	3.2.6 Selección y mantenimiento	19
	3.2.7 Producción de enzimas	19
	3.2.8 Producción y cuantificación de ácido indolacético (AIA) producción <i>in vitro</i>	24
	3.2.9 Detección y cuantificación de nitrógeno fijado <i>in vitro</i>	24
	3.2.10 Detección y cuantificación de fósforo solubilizado <i>in vitro</i>	28
	3.2.11 Prueba de antagonismo de <i>Fusarium verticilliodes</i>	30
	a. Aislamiento e identificación de <i>F. verticilliodes</i>	30
	b. Prueba de antagonismo.....	34
	3.2.12 Efecto en la emergencia y supervivencia del maíz.....	34
	a. Ubicación del experimento e instalacion del cultivo.....	34
	b. Características de la especie vegetal.....	38
	c. Acondicionamiento del suelo vegetal.....	38
	d. Porcentaje de germinación.....	38
	e. Obtención del inóculo bacteriano.....	40
	f. Tratamiento de las semillas.....	40

g.	Aplicación de las bacterias en la semilla.....	40
h.	Determinación del porcentaje de emergencia.....	40
i.	Aplicación de las bacterias en la rizósfera.....	46
j.	Determinación del porcentaje de supervivencia.....	46
3.3	Análisis estadísticos de los datos.....	46
IV.	RESULTADOS.....	48
4.1	Especies de enterobacterias aisladas e identificadas de suelo rizósferico del maíz	48
4.2	Potencial biológico de enterobacterias nativas.....	53
4.3	Efecto de enterobacterias nativas en la emergencia y supervivencia de maíz amarillo duro.....	67
V.	DISCUSIÓN	74
5.1	especies de enterobacterias aisladas e identificadas.....	74
5.2	potencial biológicos de enterobacterias nativas.....	75
VI.	CONCLUSIONES	82
VII.	RECOMENDACIONES.....	83
VIII.	RESUMEN.....	84
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	85
X.	ANEXOS.....	95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Posición de los campos comerciales de <i>Zea mays</i> L. “maíz” donde se realizó el muestreo de suelo rizosférico durante enero – abril, 2013.....	12
Tabla 2.	Análisis físico- químico de muestras de suelo rizosférico de <i>Zea mays</i> L. “maíz” lambayeque, 2013.....	15
Tabla 3.	Características diferenciales de los géneros de enterobacterias identificados en suelo rizosférico de <i>Zea mays</i> L. “maíz” en Lambayeque, 2013.....	51
Tabla 4.	Halo (cm) de hidrólisis formado por enterobacterias nativas en agar leche durante 48 horas.....	55
Tabla 5.	Enterobacterias nativas que desarrollaron en agar quitina durante 120 horas.....	57
Tabla 6.	Ácido indolacético (ppm) producido por enterobacterias nativas en caldo tripticasa soya durante 96 horas.....	59
Tabla 7.	Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por enterobacterias nativas en caldo extracto de suelo durante 7 días.....	61
Tabla 8.	Halo (cm) de la solubilización de fósforo por enterobacterias nativas en agar SRSM durante 48 horas.....	63
Tabla 9.	Fósforo solubilizado (ppm) por enterobacterias nativas en caldo SRSM durante 96 horas.....	64
Tabla 10.	Rango del porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Fusarium verticilloides</i> por enterobacterias nativas.....	69
Tabla 11.	Emergencia de <i>Zea mays</i> L. “maíz” amarillo duro simple, 7 días después de la inoculación de enterobacterias nativas en las semillas, 2013.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ubicación geográfica de la zona de muestreo en los distritos de Monsefú y Reque, provincia de Chiclayo, región Lambayeque. Enero, 2013.....	11
Figura 2.	Ubicación de los campos comerciales de <i>Zea mays</i> L. “maíz” en Monsefú y Reque, donde se realizó el muestreo de suelo rizosférico de maíz durante enero – abril de 2013.....	13
Figura 3.	Cultivo de <i>Zea mays</i> L. “maíz” en floración.....	16
Figura 4.	Rizosfera de <i>Zea mays</i> L. “maíz”.....	16
Figura 5.	Muestra de suelo rizosferico de <i>Zea mays</i> L.“maíz.....	17
Figura 6.	Diluciones de suelo rizosférico en solución salina esterilizada.....	17
Figura 7.	Colonias fermentadoras (a) y no fermentadoras (b) de lactosa en agar Mac Conkey.....	18
Figura 8.	Prueba de oxidasa en tiras reactivas.....	18
Figura 9.	Fermentación de la glucosa, sacarosa y lactosa, formación de gas y sulfuro de hidrógeno en agar HierroTriple Azúcar.....	20
Figura 10.	Descarboxilación de la lisina y formación de sulfuro de hidrógeno en agar Hierro Lisina.....	20
Figura 11.	Utilización del citrato como fuente de carbono y energía en agar Citrato de Simmons.....	21
Figura 12.	Producción de indol en caldo peptonado.....	21
Figura 13.	Producción de acetoina en caldo rojo de metilo Voges-Proskauer.....	22

Figura 14.	Cultivos puros de enterobacterias.....	22
Figura 15.	Agar leche cultivado con enterobacterias nativas durante 48 horas.....	23
Figura 16.	Agar quitina cultivado con enterobacterias nativas durante 120 horas.....	23
Figura 17.	Caldo tripticasa soya suplementado con triptófano cultivado con enterobacterias nativas y centrifugado.....	25
Figura 18.	Sobrenadante de caldo tripticasa soya cultivado con enterobacterias nativas.....	25
Figura 19.	Viraje del indicador del verde al azul en el medio Nfb cultivado con enterobacterias nativas.....	26
Figura 20.	Película blanquesina bajo la superficie del medio Nfb cultivado enterobacteria fijadora de nitrógeno.....	26
Figura 21.	Caldo extracto de suelo cultivado con enterobacterias nativas.....	27
Figura 22.	Caldo extracto de suelo con KCl 2M.....	27
Figura 23.	Colonias de enterobacterias nativas desarrolladas en agar Sundara Rao Sinha Medium, SRSM.....	29
Figura 24.	Caldo SRSM para la cuantificación de fósforo solubilizado.....	29
Figura 25.	Granos de <i>Zea mays</i> L. “maíz” para el aislamiento de <i>Fusarium verticillioides</i>	31
Figura 26.	Desinfección de granos de <i>Zea mays</i> L. “maíz” con hipoclorito de sodio.....	31

Figura 27.	Siembra de granos de <i>Zea mays</i> L. “maíz” en agar papa dextrosa más cloranfenicol.....	32
Figura 28.	Colonias de hongos filamentosos desarrollados en agar papa dextrosa más cloranfenicol.....	32
Figura 29.	Cultivo puro de <i>Fusarium verticillioides</i> aislado de granos de <i>Zea mays</i> L. “maíz”.....	33
Figura 30.	Enterobacterias sembradas en agar papa dextrosa para la prueba de antagonismo.....	35
Figura 31.	<i>Fusarium verticillioides</i> desarrollado en agar papa dextrosa.....	35
Figura 32.	Ensayo para determinar el efecto de enterobacterias nativas en la emergencia de <i>Zea mays</i> L. “maíz” amarillo duro híbrido simple.....	36
Figura 33.	Ensayo para determinar el efecto de enterobacterias nativas en la sobrevivencia de <i>Zea mays</i> L. “maíz” amarillo duro híbrido simple.....	37
Figura 34.	Semillas de <i>Zea mays</i> L. “maíz” amarillo duro híbrido simple.....	39
Figura 35.	Prueba de germinación de <i>Zea mays</i> L. “maíz” amarillo duro híbrido simple.....	39
Figura 36.	Obtención del inóculo bacteriano.....	41
Figura 37.	Determinación de peso del insecticida en polvo soluble.....	41
Figura 38.	Adición del insecticida en semillas de <i>Zea mays</i> L. “maíz” amarillo duro.....	42
Figura 39.	Homogenización del insecticida con las semillas de <i>Zea mays</i> L. “maíz” amarillo duro.....	42

Figura 40.	Inoculación de enterobacterias nativas en las semillas de <i>Zea mays</i> L. “maíz” amarillo duro.....	43
Figura 41.	Semillas de <i>Zea mays</i> L. “maíz” inoculadas con enterobacterias nativas.....	43
Figura 42.	Semillas en estufa para la disminución del exceso de humedad.....	44
Figura 43.	Ensayo de emergencia de semillas de <i>Zea mays</i> L. “maíz” amarillo duro inoculadas con enterobacterias nativas.....	44
Figura 44.	Inicio de la emergencia de semillas de <i>Zea mays</i> L. “maíz” amarillo duro, inoculadas con enterobacterias nativas.....	45
Figura 45.	Emergencia de <i>Zea mays</i> L. “maíz” amarillo duro inoculado con enterobacterias nativas en las semillas.....	45
Figura 46.	Inoculación de enterobacterias nativas en la rizósfera de <i>Zea mays</i> L. “maíz” amarillo duro.....	47
Figura 47.	Sobrevivencia de plántulas de <i>Zea mays</i> L. “maíz” amarillo duro, inoculado con enterobacterias nativas.....	47
Figura 48.	Frecuencia de bacterias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa aisladas del suelo rizosférico de maíz en agar Mac Conkey.....	49
Figura 49.	Frecuencia de bacterias desarrolladas en agar Mac Conkey según la positividad y negatividad en la prueba de oxidasa.....	49
Figura 50.	Frecuencia de bacterias oxidasa negativas según la fermentación de la glucosa en agar HierroTriple Azúcar.....	50
Figura 51.	Frecuencia de géneros de enterobacterias aisladas de <i>Zea mays</i> L. “maíz” en Lambayeque, 2013.....	52
Figura 52.	Frecuencia de géneros de bacterias no fermentadoras aisladas de suelo rizosférico <i>Zea mays</i> L. “maíz” en Lambayeque, 2013.....	52

Figura 53.	Porcentaje (%) de enterobacterias nativas con actividad proteolítica en Lambayeque, 2013.....	54
Figura 54.	Halo de hidrólisis formado por enterobacterias en agar leche.....	54
Figura 55.	Porcentaje (%) de enterobacterias nativas con actividad quitinolítica en Lambayeque, 2013.....	56
Figura 56.	Biomasa formada por enterobacterias nativas en agar quitina.....	56
Figura 57.	Porcentaje (%) de enterobacterias nativas productoras de ácido indolacético, en Lambayeque, 2013.....	58
Figura 58.	Coloración grosella observada en la cuantificación de ácido indolacético por la reacción colorimétrica de Salkowski.....	58
Figura 59.	Porcentaje (%) de enterobacterias nativas fijadoras de nitrógeno en caldo extracto de suelo en Lambayeque, 2013.....	60
Figura 60.	Coloración observada en la cuantificación de amonio por el método colorimétrico de fenolhipoclorito.....	60
Figura 61.	Porcentaje (%) de enterobacterias nativas solubizadoras de fosforo en Lambayeque, 2013.....	62
Figura 62.	Halos translucidos alrededor de colonias de enterobacterias nativas solubilizadoras de fosforo en agar SRSM.....	62
Figura 63.	Coloración observada en la cuantificación de fosforo solubilizado por el método colorimétrico de molibdato.....	63
Figura 64.	Observación macroscópica de colonia <i>Fusarium verticillioides</i>	64
Figura 65.	Observación microscópica (400x) de microconidias de <i>Fusarium verticillioides</i>	65

Figura 66.	Observación microscópica (400x) macroconidia de <i>Fusarium verticillioides</i>	65
Figura 67.	Observación microscópica (400x) de hinchamiento de hifa de <i>Fusarium verticillioides</i>	66
Figura 68.	Porcentaje (%) enterobacterias nativas inhibitorias de <i>Fusarium verticillioides</i>	68
Figura 69.	Antagonismo de enterobacterias nativas frente a <i>Fusarium verticillioides</i>	68
Figura 70.	Emergencia de <i>Zea mays</i> L. “maíz” amarillo duro hibrido, 7 días después de la inoculación de enterobacterias nativas en las semillas...	69
Figura 71.	Porcentaje de enterobacterias nativas según el efecto de emergencia de <i>Zea mays</i> L. “maíz” amarillo duro hibrido a los 7 días.....	70
Figura 72.	Incremento de la emergencia y vigor de <i>Zea mays</i> L. “maíz” amarillo duro inoculado con enterobacterias nativas en las semillas.....	70
Figura 73.	Altura y vigor de plantas de <i>Zea mays</i> L. “maíz” amarillo duro hibrido inoculado con enterobacterias nativas en comparación con el testigo...	72
Figura 74.	Disminución de la emergencia de <i>Zea mays</i> L. “maíz” amarillo duro hibrido inoculado con enterobacterias nativas en las semillas.....	72
Figura 75.	Sobrevivencia <i>Zea mays</i> L. “maíz” amarillo duro 20 días después de la inoculación de enterobacterias nativas en la rizósfera.....	73

DEDICATORIA

A la santísima trinidad, por los dones concedidos por protegerme y darme las fuerzas necesarias para superar los diferentes obstáculos y dificultades que se han presentado a lo largo de mi vida.

A mi familia, por su entusiasmo y buenos deseos en aquellos momentos importantes en mi vida, en especial a mi abuelo Eudoro, quien mediante sus consejos y sus palabras me alentó en cada momento.

A mi madre, Janet Marina quien es mi ejemplo de vida, la cual me enseñó el valor del esfuerzo y la perseverancia, a mantenerme siempre en pie en los peores momentos para seguir adelante, quien me demostró la importancia seguir mis sueños por más difícil que sea llegar la meta, por eso y muchas cosas más siempre te admirare y respetare.

A una persona la cual he compartido mis alegrías y tristezas en los buenos y en los malos momentos me dio su apoyo su aliento, que a pesar de todo siempre me tendió su mano y apoyo, mi amor Cindy Yuriko.

Luis Humberto

*A Dios por darme la vida, por ser mi guía,
esperanza, fortaleza, sustento en cada paso que
doy; por permitirme realizar este proyecto y
porque siempre se haga su voluntad y no la
mía.*

*A mi madre, María Reyes que además de ser
mi mejor amiga es mi mejor ejemplo de sacrificio
y amor, me ha enseñado a no desfallecer y no
rendirme ante nada y siempre "Luchar",
atreves de sus sabios consejos.*

*A mi hermano Mike, a mi abuela Laura,
sobrinos Triana, Bianca, José Enrique y a
mis amigos por su apoyo, y por sus buenos
deseos hacia mi persona tan importante en mi
vida*

*A mi tío Eduardo y primas Karol y Laura,
por su generosidad y alegrías que logran en la
familia*

Gustavo (Buru)

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar te agradezco a Dios y a la Santísima Virgen María quien siempre ilumino mi camino, me proporciono de paciencia y templanza para continuar en el camino correcto, la fuerza para nunca desistir y cumplir mis metas.

A mi madre Janet por sus enseñanzas, su apoyo, por su constante preocupación para que yo mejore cada día, por ser la gran guía para encaminarme, por alentarme a cumplir mis metas y demostrarme que por más difícil que sea el camino a seguir debo perseverar porque al final de este recibiré los frutos de todos mis esfuerzos, por estar a mi lado y por muchas cosas más.

Muchas Gracias Mamá.

A mi familia quien me brindó su apoyo y cariño, en especial a mi abuelo Eudoro por todo ese apoyo incondicional, sabiduría, y consejos.

Muchas Gracias Abuelito

A la Dra. Carmen Carreño Farfán, quien se comportó como una madre con nosotros, gracias por su continuo esfuerzo con nosotros, por su tiempo, por su dedicación, por su sabiduría, en especial por su paciencia, por todo ese apoyo que nos brindó Muchas Gracias Profesora Carmen.

Para una personita muy especial, Yuriko, la cual me apoyo y estuvo a mi lado en todo momento, me dio sus palabras de aliento en aquellos momentos difíciles, gracias por todo tu amor como una hermana, amiga, compañera, Muchas Gracias Amor.

Para Mi Compañero, Gustavo, y mis amigos los cuales me apoyaron, encubrieron, rieron, bromearon, y compartieron todos esos momentos especiales durante todo este transcurso de tiempo Muchas Gracias Muchachos

Luis Humberto

"La patience est amère, mais son fruit est doux"
Jean-Jacques Rousseaus

Son muchas las personas especiales a las que me gustaría agradecer su amistad, apoyo y compañía. Algunas están aquí conmigo y otras en mi recuerdo. Sin importar en donde estén o si alguna vez llegan a leer esto, quiero agradecerles por haber formado parte de mi vida, por todo lo que me han brindado y sus bendiciones.

Primero y como más importante agradezco sinceramente mi asesora de tesis Dra. Carmen Carreño Farfán, por su esfuerzo dedicación, sus conocimientos, su persistencia, paciencia y carisma, que me han sido fundamentales para mi formación profesional. Siendo capaz ganarse mi lealtad y admiración

A mi amigo y compañero de tesis, Luis con quien entre risa y enojos hemos culminado este proyecto.

A mis amigos, porque gracias a ustedes comprobé lo que es una verdadera amistad,

En especial a Marita "Goldita", Susseti, Losa, Juanita. Mil gracias por los momentos que hemos pasado juntos en el laboratorio.

Gustavo (Buru)

I.INTRODUCCIÓN

El cultivo de *Zea mays* L. “maíz”, originario de América representa uno de los aportes más valiosos a la seguridad alimentaria mundial. El maíz amarillo duro es el tercer cultivo en importancia en el Perú y forma parte de la cadena maíz-avicultura-porcicultura, de impacto significativo en la actividad económica y social nacional; sin embargo, en el 2011, solo 40% del maíz ofertado correspondió a la producción nacional y 60% fue importado (MINAG, 2012)

Los fertilizantes químicos representan 20 – 30 % de los costos de producción de un cultivo y cuando son correctamente utilizados incrementan la productividad y rentabilidad; sin embargo, cada año se incrementa la cantidad de fertilizantes por aplicar, debido a la menor eficiencia de adsorción en el suelo y absorción por la planta. Según la Asociación Internacional de la Industria de Fertilizantes entre 1996 a 2008, el consumo se incrementó en 31% en el mundo y 56 % en los países en vías de desarrollo, así como también el precio de algunos fertilizantes se triplicó, disminuyendo la rentabilidad del cultivo (Nicolalde & Quintana, 2010).

En la búsqueda de alternativas para disminuir el uso de fertilizantes químicos se realizan investigaciones con las denominadas rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (Plant growth promoting rhizobacteria, PGPR). Estas bacterias de vida libre, asociadas a las raíces, cerca o incluso en el interior de los tejidos, estimulan los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes, fijan nitrógeno atmosférico de una manera no simbiótica, solubilizan fosfatos, producen reguladores del crecimiento y sideróforos, así como, también reduce el ataque de microorganismos patógenos e insectos. Las PGPR a menudo incrementan la superficie de raíz, con el consecuente aumento de la absorción de nutrientes y la producción de la planta. (Bashan., *et al.*, 1996; Kloepper, 2003; Bhattacharyya & Jha, 2012)

Ejemplos por excelencia de las PGPR incluyen *Actinoplanes*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Amorphosporangium*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Cellulomonas*, *Flavobacterium*, *Gluconacetobacter*, *Microbacterium*, *Micromonospora*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y enterobacterias como *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pantoe* y *Serratia*. Ensayos realizados en diferentes suelos, regiones climáticas y cultivos de importancia agronómica demostraron 5 – 30 % de incremento en el rendimiento, así como, la disminución de 25 – 50 % de la dosis del fertilizante químico (Aguado & Moreno, 2008; Adesemoye *et al.*, 2009; García *et al.*, 2012); sin embargo, también se han reportado resultados contradictorios en los que no se ha obtenido la respuesta positiva esperada, posiblemente porque los microorganismos no se adaptaron a las condiciones del suelo, muy diferentes a las de su procedencia, no compitieron exitosamente con la biota nativa o no fueron capaces de sobrevivir en condiciones desfavorables (Díaz *et al.*, 2001).

En Lambayeque, se practica la agricultura en diversos suelos y condiciones climáticas. Es posible que en la rizósfera de los cultivos de maíz se encuentren enterobacterias con características de promotoras del crecimiento de plantas; sin embargo, en la actualidad no se han realizado estudios para aislarlas, caracterizarlas y posteriormente determinar su efecto en los cultivos agrícolas.

Por lo expuesto, se planteó la siguiente investigación, teniendo como objetivos aislar e identificar enterobacterias en la rizósfera de *Zea mays* L. “maíz” de campos agrícolas en los distritos de Monsefú y Reque, en Lambayeque; determinar *in vitro* el potencial biológico de las enterobacterias nativas como productoras de enzimas y ácido indolacético, fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fósforo, antagonistas de *Fusarium verticillioides*, así como también determinar el efecto en la emergencia y sobrevivencia de maíz amarillo duro híbrido simple en condiciones de invernadero.

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

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

Los manglares son ecosistemas altamente productivos, pero generalmente pobres en nitrógeno y fósforo, por lo que se investigaron microorganismos solubilizadores de fosfatos en muestras rizosféricas de *Avicennia germinans* L. y *Laguncularia racemosa* L. "mangles". En medio SRSM con fosfato tricálcico se obtuvieron 30 aislados de bacterias solubilizadoras, reconocidas por el halo transparente formado alrededor de las colonias y se identificaron los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Vibrio*, *Xanthobacter*, *Pseudomonas*, *Chryseomonas* y las enterobacterias *Enterobacter aerogenes*, *E. taylorae*, *E. arburiae* y *Kluyvera cryocrescens* (Vazquez *et al.*, 2000).

Pantoea sp. 9c, una bacteria endófito fijadora de nitrógeno, aislada del interior de tallos de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar” formó halos de solubilización, con diámetros de hasta 6 mm en medio sólido NBRI-P y en el mismo medio líquido solubilizó fosfato tricálcico: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ hasta acumular $1128 \text{ mg P mL}^{-1}$, después de 7 días, a 30°C . La bacteria sobrevivió durante 35 días en un sustrato preparado con mezcla de vermiculita y suelo ferralítico rojo, alcanzando poblaciones de $3,2 \times 10^{15}$ células g^{-1} . A continuación, plantas de *Raphanus sativus* L. var. Scarletglobe de alta demanda de fósforo y crecimiento rápido se cultivaron en suelos inoculados con *Pantoea sp.* 9c. y se determinó que absorbieron más fósforo que las plantas no inoculadas, alcanzando más de 3500 ppm en los tejidos foliares (Cordero *et al.*, 2008).

En la rizósfera de maíz rojo criollo se aisló una bacteria que fue identificada como *Enterobacter cloacae*, con 95% de similitud según las pruebas fenotípicas y 96,3% según la comparación del ARN 16S. A continuación, semillas de maíz germinadas por 3 días, a 30°C en medio sólido suplementado con sacarosa fueron sumergidas en una suspensión de la bacteria ($9 \times 10^8 \text{ ufc mL}^{-1}$) y después fueron depositadas en tubos con 5 g de vermiculita esterilizada. Transcurridas 12 horas se cuantificó $1,05 \times 10^7 \text{ ufc mL}^{-1}$ de bacterias adheridas por plantas. A su vez, después de 10 y 20 días de inoculación se registraron $7,12 \times 10^8$ y $1,86 \times 10^9 \text{ ufc g}^{-1}$, respectivamente. También se observó que las plántulas provenientes de semillas tratadas presentaron significativamente mayor biomasa (0,168 g) que los testigos (0,080 g) y después de 8 meses el rendimiento fue de 19,6 y 12,86 kg, respectivamente (Morales *et al.*, 2011).

Con el objetivo de obtener PGPR se colectaron muestras de suelo rizosférico de *Oryza sativa* L. “arroz”, aislando 69 bacterias, entre las que 51 % fue identificado como *Pseudomonas*, principalmente *P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y *P. citriformis*; 26 % se identificó como perteneciente al género *Azotobacter*, especies *vinelandii*, *chromococcum* y *nigrificans*. A su vez, 21 % correspondió a las enterobacterias *Klebsiella*, *Serratia* y *Enterobacter spp.*, las cuales sintetizaron ácido indolacético, destacando

klebsiella sp., con 15,2 mgL⁻¹, después de 60 horas. Por su parte, se detectó la producción de sideróforos por *Pseudomonas* sp. y se observó la inhibición de hasta 100 % del crecimiento de *Phytophthora infestans* con *P. putida* y hasta 78 % con *P. fluorescens* (Guineth et al., 2000).

Las bacterias de los géneros *Azospirillum* y *klebsiella* son fijadoras de nitrógeno y pueden contribuir con la fertilización del maíz y su ancestro el teocintle, por lo que se aislaron 43 cepas de *Azospirillum* spp. y 50 de *klebsiella* spp. de la rizósfera, rizoplano, tallo y semillas de estos cultivos. En cuanto a *klebsiella*, las bacterias mostraron actividad de la enzima nitrogenasa, alcanzando 42,0 a 122,46 nmol C₂H₄ mL⁻¹h⁻¹; sintetizaron 9,11 a 40,55 ppm de índoles totales y 90 % de las cepas sintetizó sideróforos. Aunque las especies de *klebsiella* no son agentes de control biológico, pueden considerarse como rizocompetentes, capaces de multiplicarse para originar grandes poblaciones, por lo que podrían desplazar a los fitopatógenos y reducir la severidad de la enfermedad, así como también mejorar el crecimiento de las plantas (Carcaño et al., 2006).

Los sistemas pastoriles en su mayoría se basan en la utilización de *Lolium perenne* "gras" importante planta forrajera para la alimentación animal. Para incrementar su calidad nutricional se debe aumentar el contenido del nitrógeno, para lo cual las PGPR son una alternativa. Con este fin se aislaron bacterias de la rizósfera, en las que se investigó la fijación de nitrógeno y se seleccionaron los aislados C1 y C2 porque alcanzaron 2506,73 y 2538,86 nmolC₂H₄mL⁻¹ 24 horas⁻¹, respectivamente. Estas bacterias también sintetizaron hasta 30 ppm de ácido indolacético, siendo identificadas con el sistema Api 20E como *Serratia liquefaciens*, con 82,5 % de similitud y mediante la secuenciación del ADNr 16S como *Pantoea agglomerans*, con 98,5 % de semejanza. A continuación, fueron inoculadas en semillas pre-germinadas de *L. perenne* y después de 50 días incrementaron en 30 % el peso seco de los brotes (Shoebitz, 2006).

El rol de las PGPR en la fitoremediación de suelos contaminados con metales pesados es muy importante para su reutilización en la producción agrícola. En el presente estudio se aisló y se identificó *Serratia phymathica* del rizoplasma de *Echinochloa crus-galli* presente en un suelo contaminado con petróleo y metales pesados. El aislado demostró capacidad para sintetizar ácido indolacético y sideróforos, por lo que se inoculó en semillas de maíz determinándose incremento en la longitud de la raíz a los 8 días de crecimiento con cadmio y cobre. Después, la bacteria fue inoculada en plántulas de 7 días, en cultivos hidropónicos con y sin cadmio, observándose con *S. phymathica* una influencia favorable en el crecimiento inicial y biomasa del tallo de maíz sin cadmio; no obstante, la biomasa radical se incrementó significativamente cuando el cadmio estuvo presente, evidenciándose que *S. phymathica* mejora la eficiencia de la fitoremediación (Koo & Kjung, 2009).

En la rizosfera de *Lolium perenne* “gras” una de las pasturas más importantes para la alimentación del vacuno, se aislaron bacterias fijadoras de nitrógeno en medio de cultivo semisólido sin nitrógeno. Entre los 13 aislados obtenidos, *Enterobacter ludwigii* fue considerado PGPR porque fijó nitrógeno, sintetizó ácido indolacético, solubilizó fosfato tricálcico ($1-5 \text{ mg mL}^{-1}$) y presentó actividad antagónica frente a *Fusarium solani*, inhibiendo 35 % el crecimiento micelial, así como también 65 % de germinación de las esporas del fitopatógeno. Por su parte, *E. ludwigii* fue inoculado en semillas de *L. perenne* y después de 20 días se determinó 14 y 20 % de incremento en el peso fresco y altura, respectivamente, así como también 50 % de incremento en el peso fresco radicular, pero no se observó incremento en la longitud de la raíz (Shoebitz *et al.*, 2009).

Con el objetivo de obtener bacterias productoras de sideróforos se realizaron aislamientos de muestras de rizosfera de alfalfa, identificándose *Enterobacter* sp., tanto por sus características morfológicas como bioquímicas, así como también por el análisis del ARNr 16S. En estudios posteriores la producción de sideróforos se realizó en medio ácido succínico modificado, alcanzando los valores máximos (71,5 % unidades) a las 72 horas, en fase

estacionaria. La absorbancia máxima del sobrenadante libre de células se alcanzó a 210 nanómetros, detectándose sideróforos del tipo catecol en la prueba de Arnow y en el análisis de cromatografía en capa. Se concluyó que por la síntesis de sideróforos, *Enterobacter* sp., es una bacteria promisorio para el control biológico de fitopatógenos (Bharucha *et al.*, 2011).

Con el objetivo de aislar bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Azospirillum* se procesaron nuestras rizosfera de maíz y se sembraron en medio semisólido sin nitrógeno. La caracterización morfológica y bioquímica identificó *Azospirillum* sp; sin embargo, la caracterización filogenética demostró 94,4 % de identidad en *Enterobacter asburiae*. Esta bacteria sintetizó celulosa, pectinasas y ácido indolacético ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) y fijó nitrógeno, por lo que fue inoculada en semillas de maíz y arroz para investigar su actividad como PGPR. Se determinó 100 y 90 % de germinación en las semillas de maíz y arroz, en comparación con 80 y 70 % de los testigos respectivamente. Asimismo, se alcanzó 43 % de incremento en el peso de las raíces de maíz y 37 % en arroz. En invernadero, las plantas provenientes de semillas inoculadas y cultivadas por 45 días alcanzaron diferencias significativas en el peso, con 0,818 g, en comparación con 0,56 g en los testigos; no obstante, las diferencias fueron no significativas en el peso radicular, obteniéndose 1,34 y 1,03 g, respectivamente (Ogho & Okonkwo, 2012).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Material biológico

El material biológico estuvo constituido por muestras de suelo rizosférico de maíz, cultivos de enterobacterias nativas y semillas de maíz amarillo duro híbrido simple.

3.1.2 Población y muestra de estudio

Se consideró como población las enterobacterias, presentes en el suelo rizosférico de maíz cultivado en campos comerciales de los distritos de Monsefú y Reque, provincia de Chiclayo, en la Región Lambayeque y se trabajó con las bacterias aisladas de 54 muestras, cifra que fue calculada según la fórmula mencionada por Alvitres (2000), con una prevalencia de 90 %, determinada por los autores en un muestreo piloto (Anexo1).

1.2 Métodos

3.2.1 Variable de estudio

Las variables cuantitativas fueron las enterobacterias productoras de enzimas y de ácido indol acético, fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fósforo y antagonistas del hongo *Fusarium verticillioides*.

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 & Hatt (Alvitres, 2000).

3.2.3 Lugar de muestreo

Para el aislamiento de enterobacterias durante enero-abril de 2013, se colectaron 54 muestras de suelo rizosférico en 17 campos comerciales de maíz de los distritos de Monsefú y Reque en la Región Lambayeque (Figura 1), determinando la posición de los puntos de muestreo con un GPS GARMIN e Trex Vista HCx (Tabla 1, figura 2). Los distritos de Monsefú y Reque están entre los 20 de la provincia de Chiclayo. Monsefú abarca 44,94 km² y está comprendido entre los paralelos 6° 52'30" de latitud sur y 79° 52'09" longitud oeste, con un clima desértico subtropical árido, un rango de temperatura de 15,37 a 28,27 °C. A su vez, el distrito de Reque tiene una superficie de 47,03km² y se ubica entre los paralelos 6°52'00" latitud sur y 79°49'27" longitud oeste, presentando un clima seco tropical, cuya temperatura oscila entre 19 y 22°C, llegando hasta los 33°C en verano (Municipalidad Distrital de Monsefú, 2013; Municipalidad Distrital de Reque, 2013).

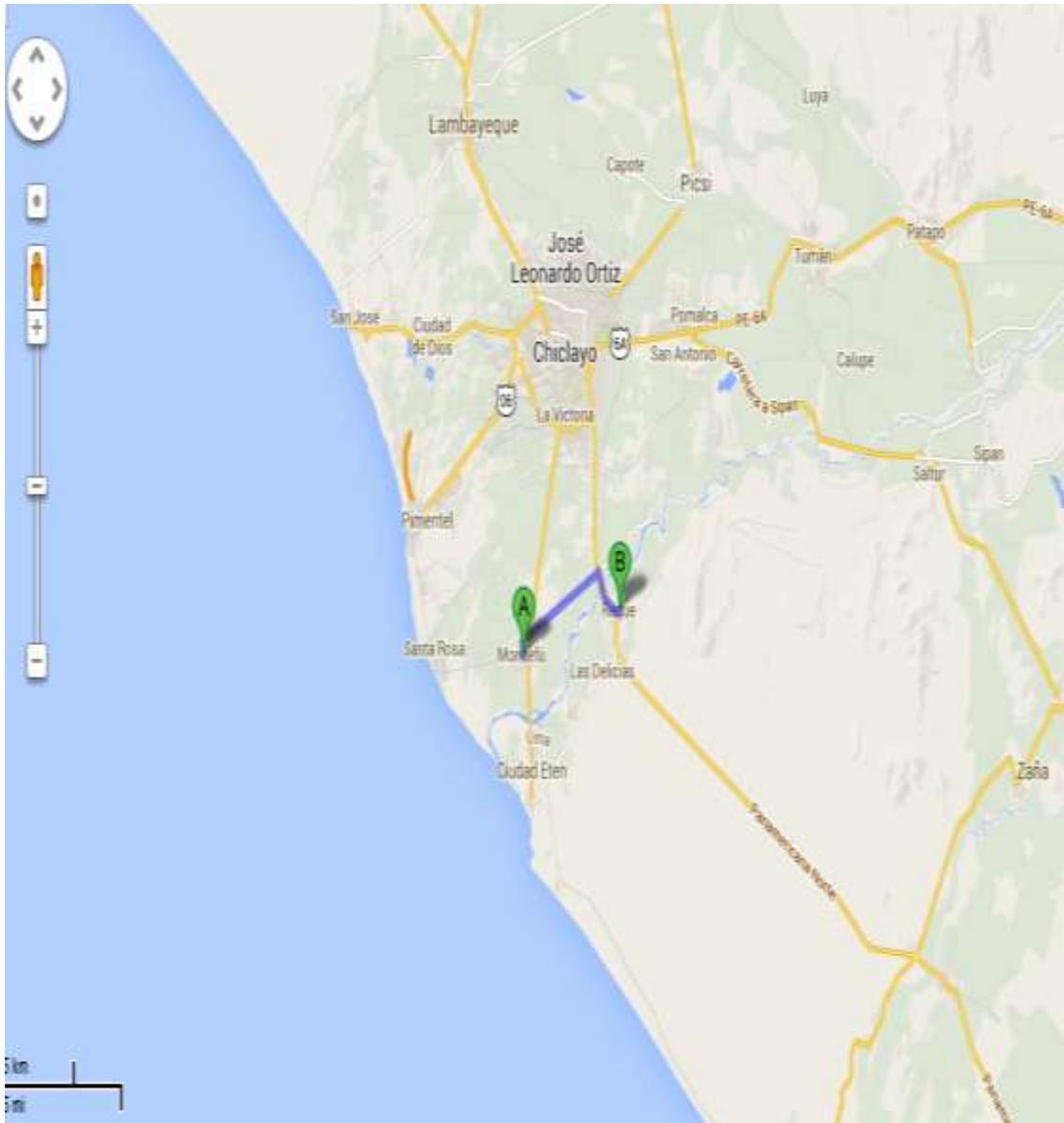


Figura 1. Ubicación geográfica de la zona de muestreo en los distritos de Monsefú y Reque, provincia de Chiclayo, región Lambayeque. Enero, 2013 (<https://maps.google.com.pe/>)

Tabla 1. Posición de los campos comerciales de *Zea mays* L. “maíz” donde se realizó el muestreo de suelo rizosférico durante enero -abril de 2013

Campo agrícola	Distrito	Punto	Posición	(UTM) – 17M	msnm
1	Monsefú	007	0624753	9242999	19
2	Monsefú	008	0624766	9242859	17
3	Monsefú	009	0624900	9241378	18
4	Monsefú	010	0624805	9240291	21
5	Monsefú	021	0631206	9243182	42
6	Monsefú	022	0631073	9242842	31
7	Monsefú	024	0631632	9243888	33
8	Requé	002	0630139	9240638	23
9	Requé	003	0629717	9240533	23
10	Requé	004	0629553	9240462	25
11	Requé	005	0629098	9240215	24
12	Requé	006	0629153	9239660	25
13	Requé	015	0631753	9241791	88
14	Requé	016	0631825	9241960	46
15	Requé	018	0632014	9242083	44
16	Requé	019	0631792	9242114	41
17	Requé	020	0632126	9242285	43

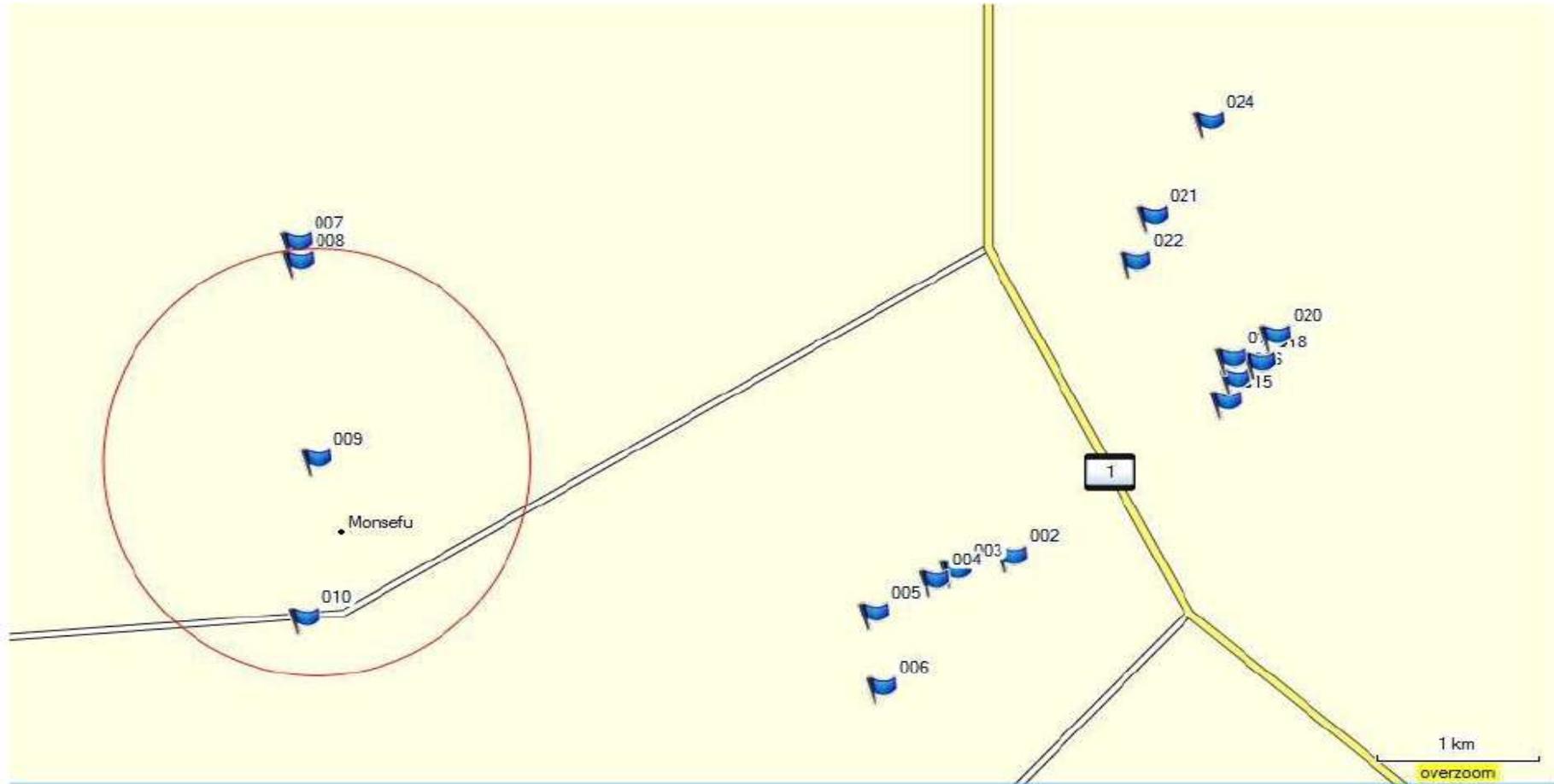


Figura 2. Ubicación de los campos comerciales de *Zea mays* L. “maíz” en Monsefú y Reque, donde se realizó el muestreo de suelo rizosférico durante enero - abril de 2013

3.2.4 Muestreo de suelo rizosférico

En los 17 campos de maíz se seleccionaron tres a cuatro plantas en floración (Figuras 3, 4) y de cada una se tomaron aproximadamente 50 gramos de raíz y suelo adherido, se depositaron en bolsas de polietileno debidamente etiquetadas e inmediatamente se transportaron para su procesamiento en el laboratorio de Microbiología y Parasitología, sección Biotecnología, de la Facultad de Ciencias Biológicas en la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo de Lambayeque.

En simultaneo al muestreo para el aislamiento de bacterias, se tomaron muestras para realizar el análisis físico – químico del suelo en el Instituto Nacional de Innovación y Extensión Agraria, Estación Experimental Vista Florida de Chiclayo. El análisis de los suelos rizosféricos de cultivos de maíz en Monsefú y Reque (Tabla 2), demostró una reacción moderadamente alcalina (pH 7,6), con niveles bajos y variables de sales solubles ($CE = 1,20 - 1,61 \text{ dSm}^{-1}$). La fertilidad es de tendencia media, con aporte de elementos como el calcio (1,30 – 3,46%) y potasio (319 – 360 ppm), valores medios de materia orgánica (1,60 – 1,90 %) y con deficiencia de fosfato (7,5 – 7,6 ppm). La textura predominante fue franca arenosa, con mediana retención de humedad.

3.2.5 Aislamiento e identificación de enterobacterias

Para el aislamiento de enterobacterias, según la metodología mencionada por Cadena y Martínez (2011), cada muestra de suelo rizosférico fue deshidratada bajo sombra durante 72 horas y después fue triturada y tamizada. Del material obtenido se tomaron 10 g para realizar una dilución en 90mL de solución salina esterilizada: NaCl 0,85%, p/v (Figuras 5,6). De esta dilución 10^{-1} se extrajo una alícuota, se sembró mediante la técnica del agotamiento y estría en placas de Petri, con agar Mac Conkey y se incubó a 30°C, por 48 horas. A continuación, se diferenciaron las colonias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa (Figura 7) y se cultivaron en agar tripticasa soya (TSA), a 30 °C, por 24 horas, para realizar las pruebas de oxidasa (Figura 8), catalasa y tinción de Gram. Después las colonias constituidas por bacilos Gram negativos, oxidasa negativos y catalasa positivas se guardaron en refrigeración a 8 °C (Anexo 2)

Tabla 2. Análisis físico-químico de muestras de suelo rizosférico de *Zea mays* L. “maíz” en Lambayeque, 2013*

Procedencia de la muestra	pH	CE (dSm ⁻¹)	MO %	P (ppm)	K (ppm)	Calcáreo (%)	Texturas (%)			Tipo de suelo
							Ao	Lo	Ar	
Monsefú	7,60	1,61	1,90	7,50	360	3,46	70	14	16	FoAo
Reque	7,60	1,20	1,60	7,60	319	1,30	72	16	12	FoAo

*Instituto Nacional de Innovación y Extensión Agraria
Estación Experimental Vista Florida – Chiclayo.



Figura 3. Cultivo de *Zea mays* L. “maíz” en floración.



Figura 4. Rizósfera de *Zea mays* L. “maíz”.



Figura 5. Muestra de suelo rizosférico de *Zea mays* L. “maíz”.



Figura 6. Diluciones de suelo rizosférico en solución salina esterilizada.

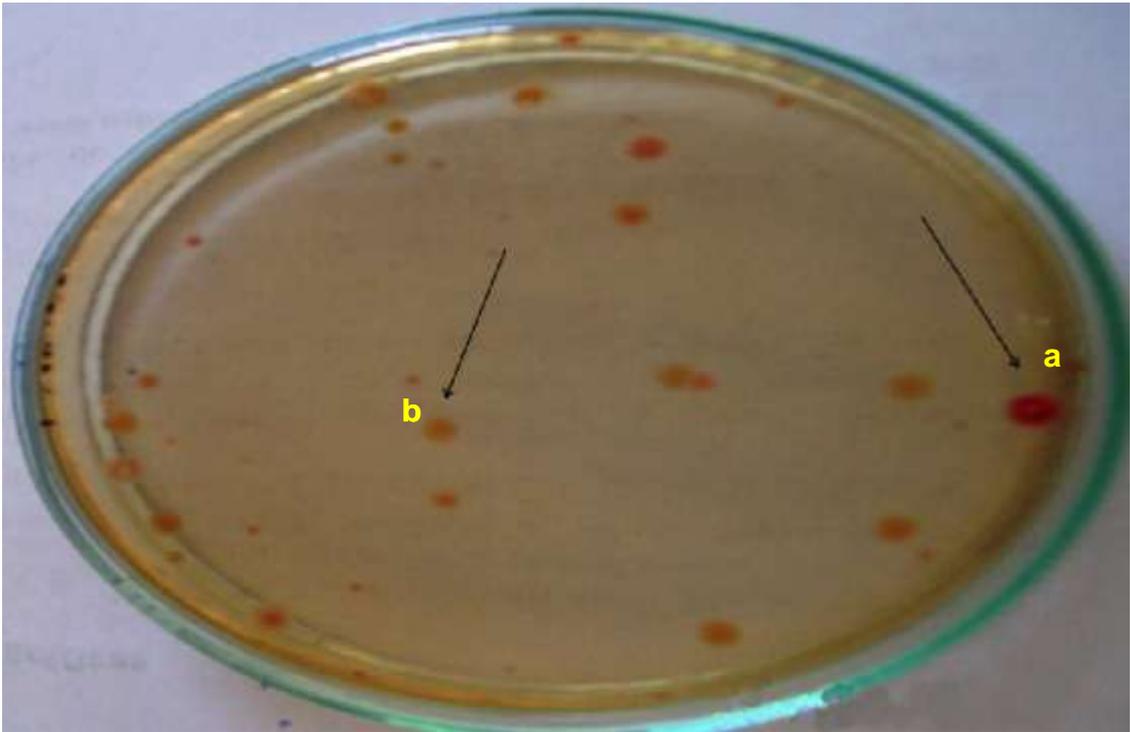


Figura 7. Colonias fermentadoras (a) y no fermentadoras (b) de lactosa en agar Mac Conkey.

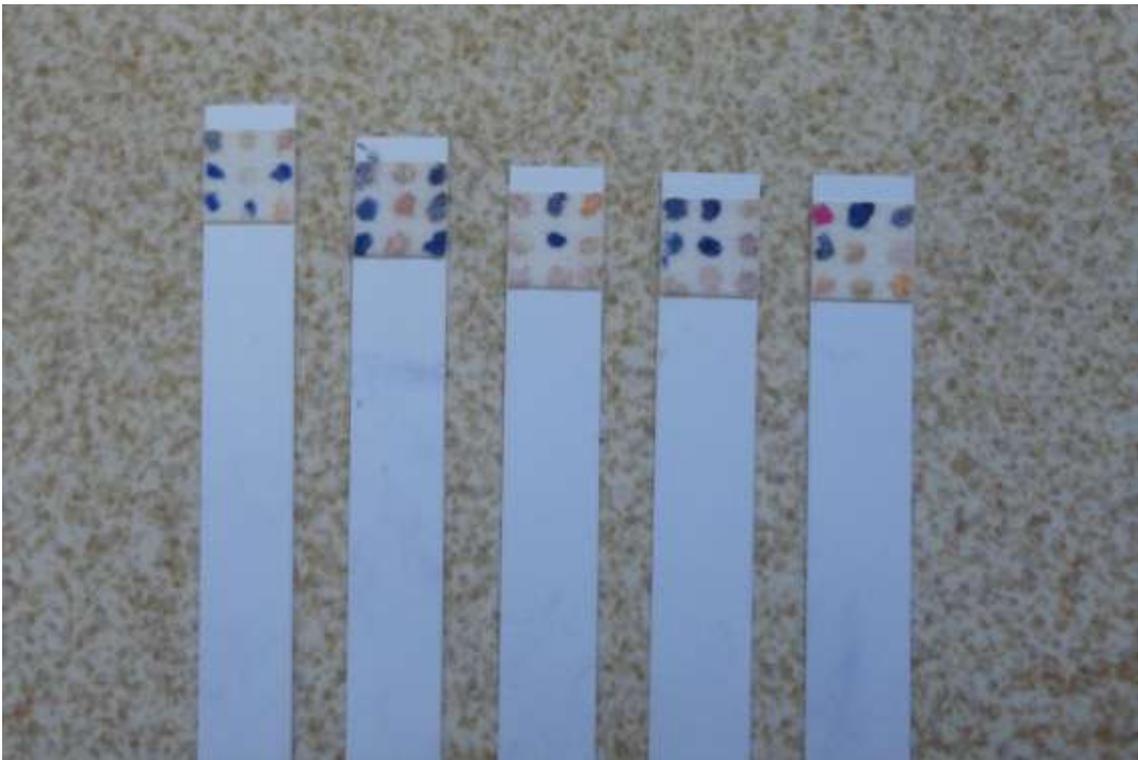


Figura 8. Prueba de oxidasa en tiras reactivas

Para identificar los géneros de las bacterias nativas según Brenner *et al.* (2005), se investigó la fermentación de la glucosa, sacarosa y lactosa, así como la formación de gas y sulfuro de hidrógeno en agar Hierro Triple Azúcar: TSI (Figura 9), la descarboxilación de la lisina y producción de sulfuro de hidrógeno en agar Hierro Lisina: LIA (Figura 10), la utilización del citrato como fuente de carbono y energía en agar Citrato de Simons (Figura 11), la producción de indol en caldo peptonado (Figura 12), la formación de acidez a partir de la glucosa y producción de acetoina en caldo rojo de metilo Voges-Proskauer (Figura 13) y la reducción de nitratos en caldo nitrato.

3.2.6 Selección y mantenimiento

Con base al porcentaje de géneros de enterobacterias identificados se seleccionaron 100 cultivos (Figura 14) que fueron sembrados en agar tripticasa soya durante 24 horas y luego fueron llevados a refrigeración (8 °C), realizándose subcultivos cada 30 días.

3.2.7 Producción de enzimas

Cada enterobacteria nativa fue sembrada por puntura superficial con el asa bacteriológica en anillo (0,4 cm de diámetro) sobre agar leche 1 % (figura15) y agar quitina coloidal al 1 % (figura 16) y fueron incubadas a 30 °C, por 48 y 120 horas, respectivamente, en aerobiosis, para la investigación de la actividad proteolítica Rios & Zuñiga (2012) y quitinolítica (Franco 2008). Con este propósito se observaron las colonias desarrolladas para detectar y medir el halo de hidrólisis o zona clara alrededor que evidenció la actividad proteolítica. A su vez, las bacterias que desarrollaron en agar quitina se consideraron con actividad quitinolítica.



Figura 9. Fermentación de la glucosa, sacarosa y lactosa, formación de gas y sulfuro de hidrógeno en agar Hierro Triple Azúcar.

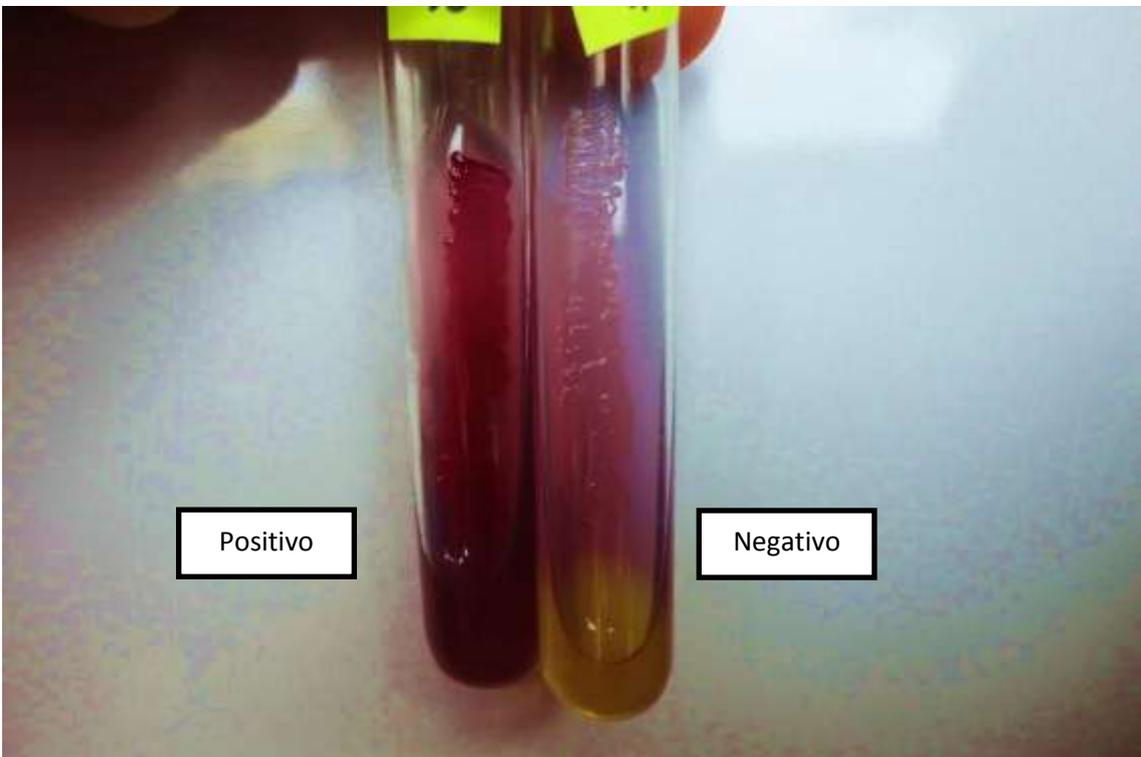


Figura 10. Descarboxilación de la lisina y formación de sulfuro de hidrógeno en agar Hierro Lisina

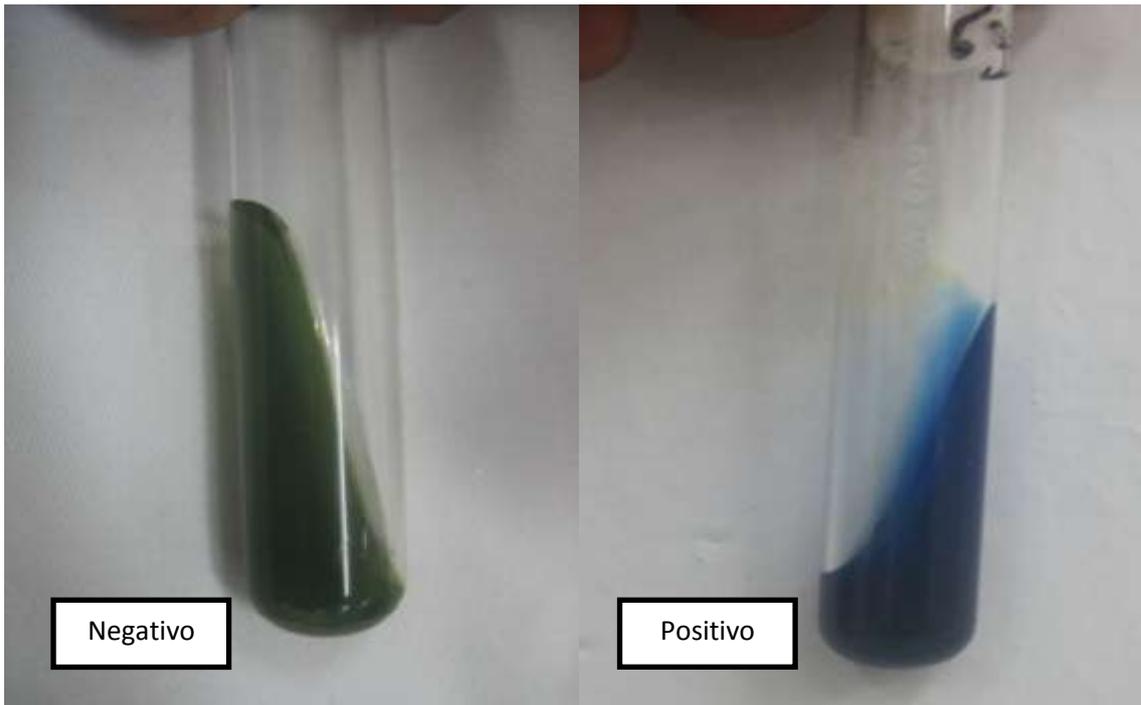


Figura 11. Utilización del citrato como fuente de carbono y energía en agar Citrato de Simmons.

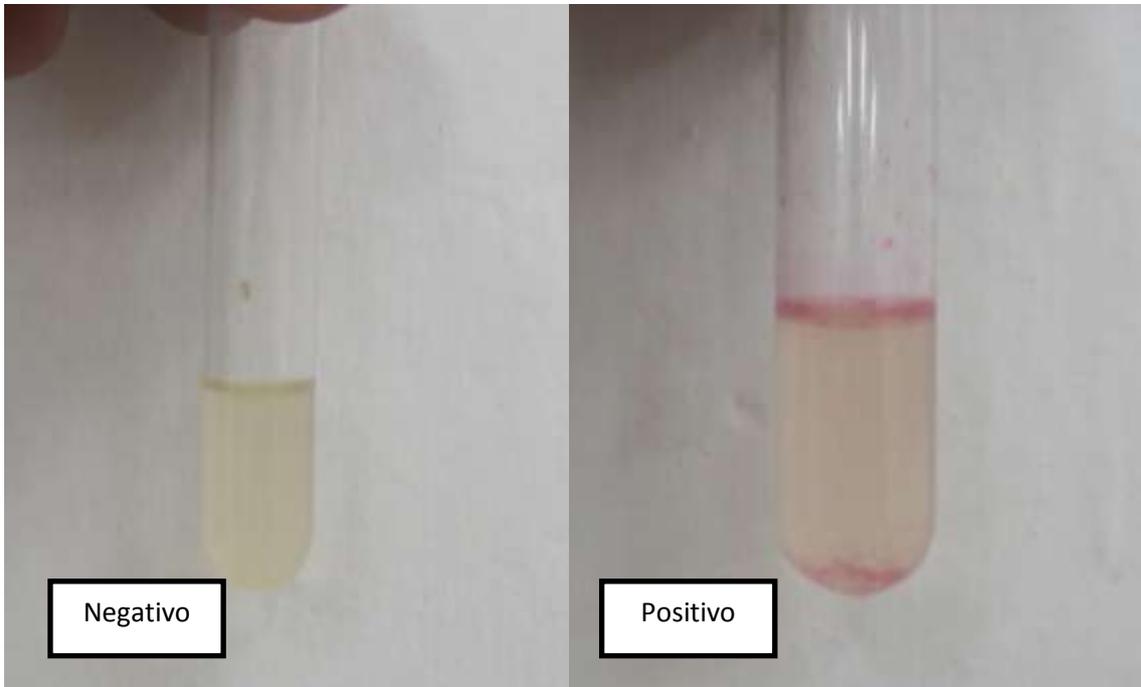


Figura 12. Producción de indol en caldo peptonado

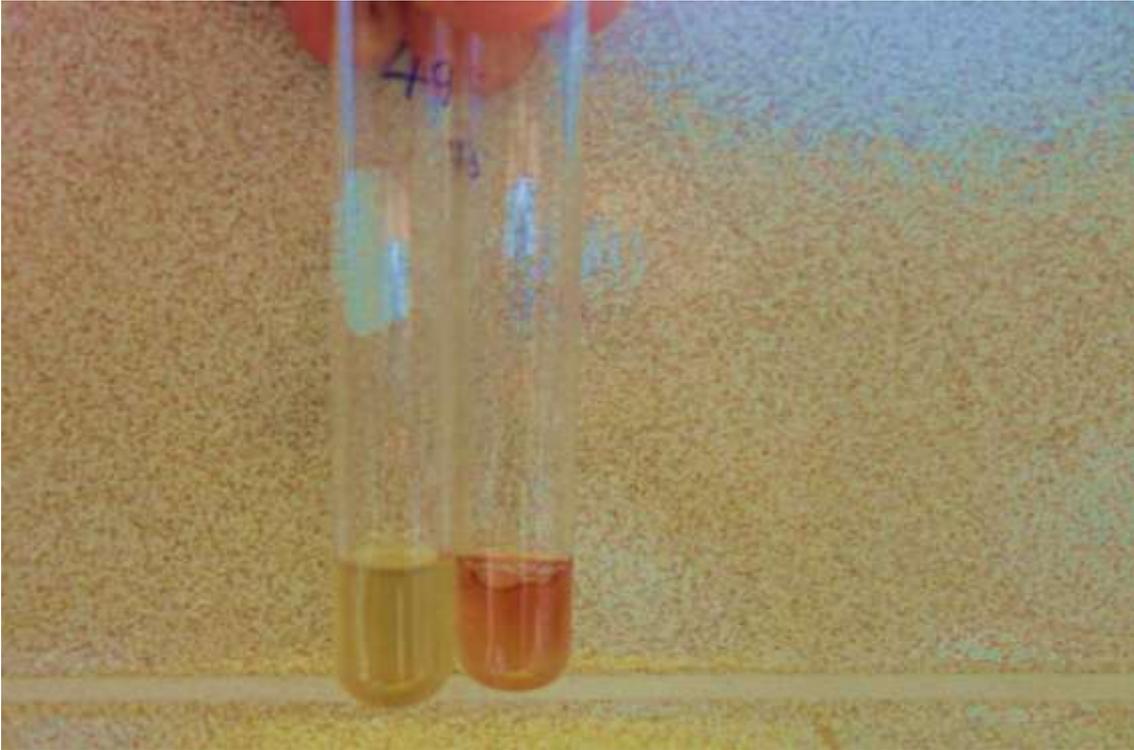


Figura 13. Producción de acetoina en caldo rojo de metilo Voges- Proskauer.



Figura 14. Cultivos puros de enterobacterias nativas.

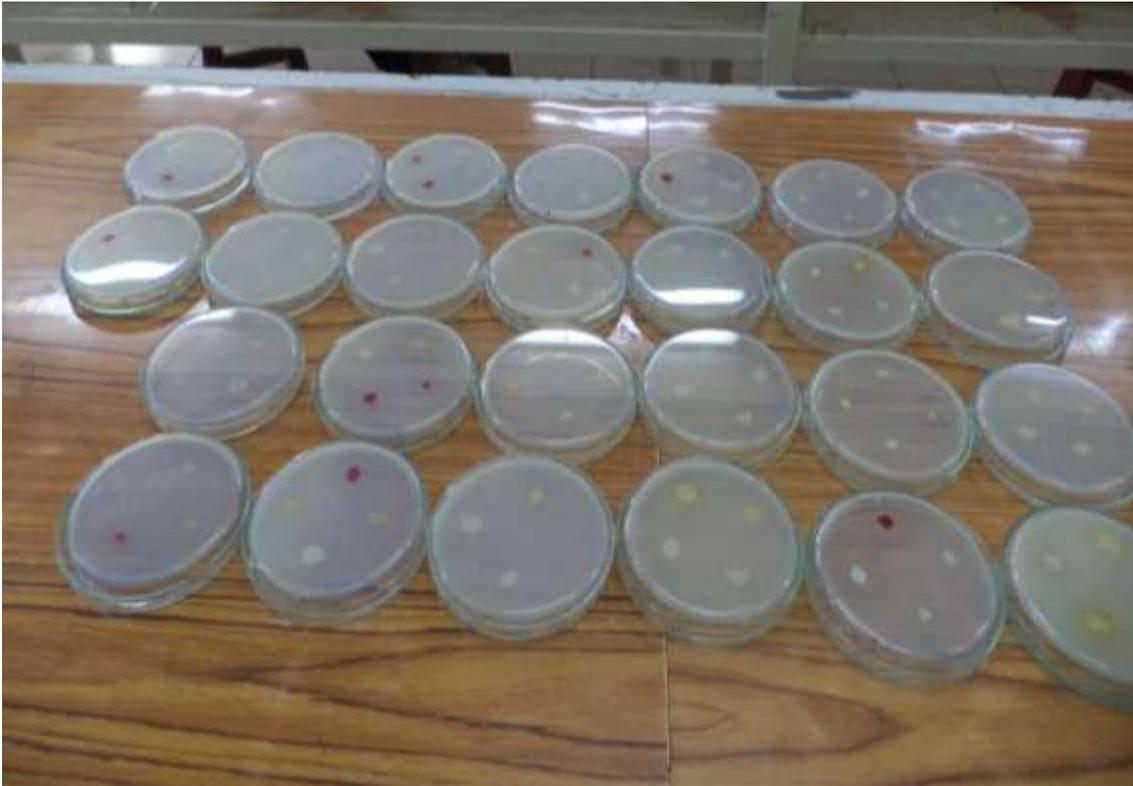


Figura 15. Agar leche cultivado con enterobacterias nativas durante 48 horas.

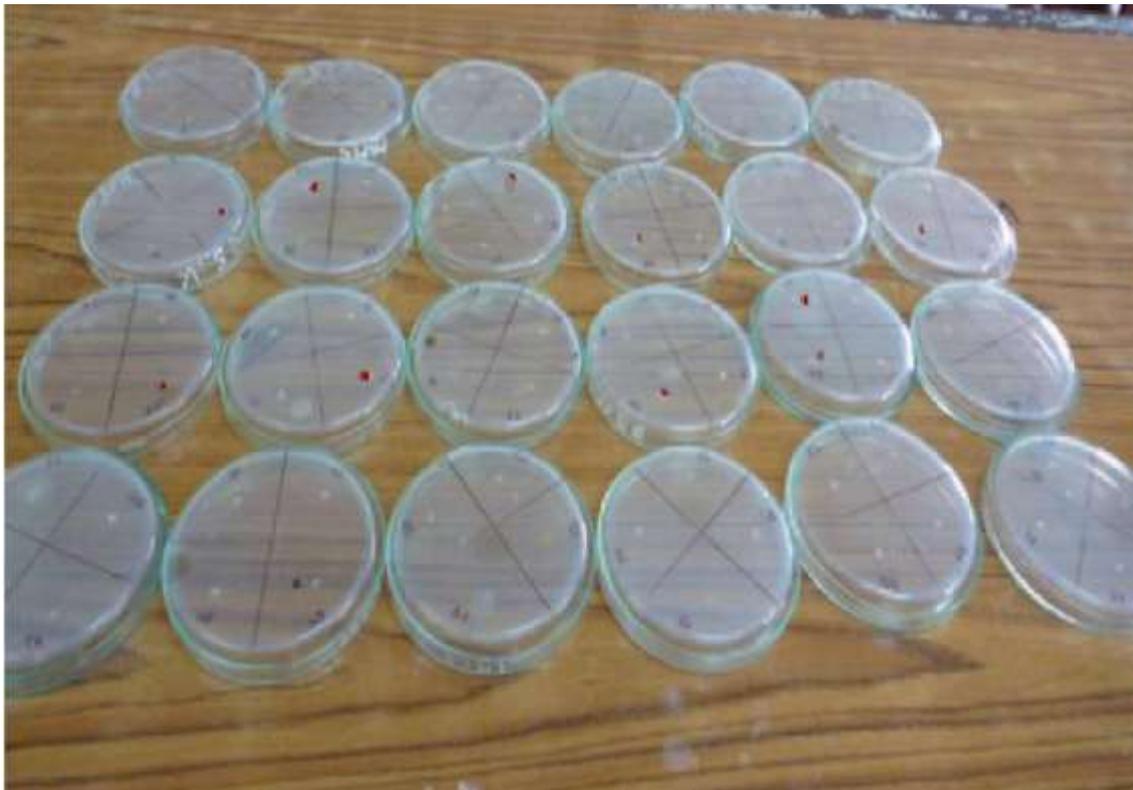


Figura16. Agar quitina cultivado con enterobacterias nativas durante 120 horas.

3.2.8 Detección y cuantificación de ácido indol acético (AIA) producido *in vitro*

Para la detección y cuantificación de ácido indol acético según la reacción colorimétrica de Salkowski descrita por Mantilla (2007) y García & Muñoz (2010), cada bacteria nativa fue cultivada en 5 mL de caldo nutritivo por 24 horas, de donde se tomaron 0,6 mL para inocularlos en 5 mL de caldo tripticasa soya suplementado con triptófano (Figura 17, Anexo 4). Después de la incubación a 30 °C, por 72 horas, en agitación constante (150 rpm), los cultivos fueron centrifugados a 3000 rpm, durante 5 minutos. A continuación 0,4 mL de cada uno de los sobrenadantes (Figura 18) se depositaron en tubos, se agregaron 1,6 mL del reactivo de Salkowski modificado (Anexo 4) en una relación 1:4, se mezclaron y se dejaron en reposo durante 30 minutos, en oscuridad. La positividad a la producción de ácido indol acético estuvo dada por una coloración grosella y se leyó la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible a 530 nm. Las concentraciones se calcularon en una recta patrón que fue obtenida con diluciones sucesivas de una solución 100 ppm de ácido indol acético.

3.2.9 Detección y cuantificación de nitrógeno fijado *in vitro*

Para la detección de nitrógeno fijado *in vitro* según Cadena & Martínez (2011), cada bacteria fué sembrada por puntura en 6 mL de medio libre de nitrógeno con azul de bromotimol (Nfb) semisólido (Anexo 5). La incubación se realizó en aerobiosis, a 30 °C, hasta por 1 semana y se consideraron como enterobacterias fijadoras de nitrógeno, aquellas donde se observó una película gruesa blanquecina entre 3 a 5 mm bajo la superficie del medio de cultivo y el viraje del indicador (Figuras 19, 20).

Para la cuantificación de nitrógeno fijado *in vitro* según el método colorimétrico del fenolhipoclorito (Anexo 5), descrito por Lara *et al.* (2007) y Cadena & Martínez (2011), cada bacteria nativa cultivada en agar nutritivo por 24 horas, fue inoculada en tubos de 15 x 150 mm conteniendo 3 mL de caldo extracto de suelo (Figura 21) y se incubaron a 30 °C, por 72 horas en agitación constante (150 rpm). A continuación, se agregaron 9 mL de KCl 2M (Figura 22), se agitaron a 150 rpm, durante 1 hora y se dejaron en reposo por



Figura 17. Caldo Trypticase soya suplementado con triptófano cultivado con enterobacterias nativas y centrifugado.

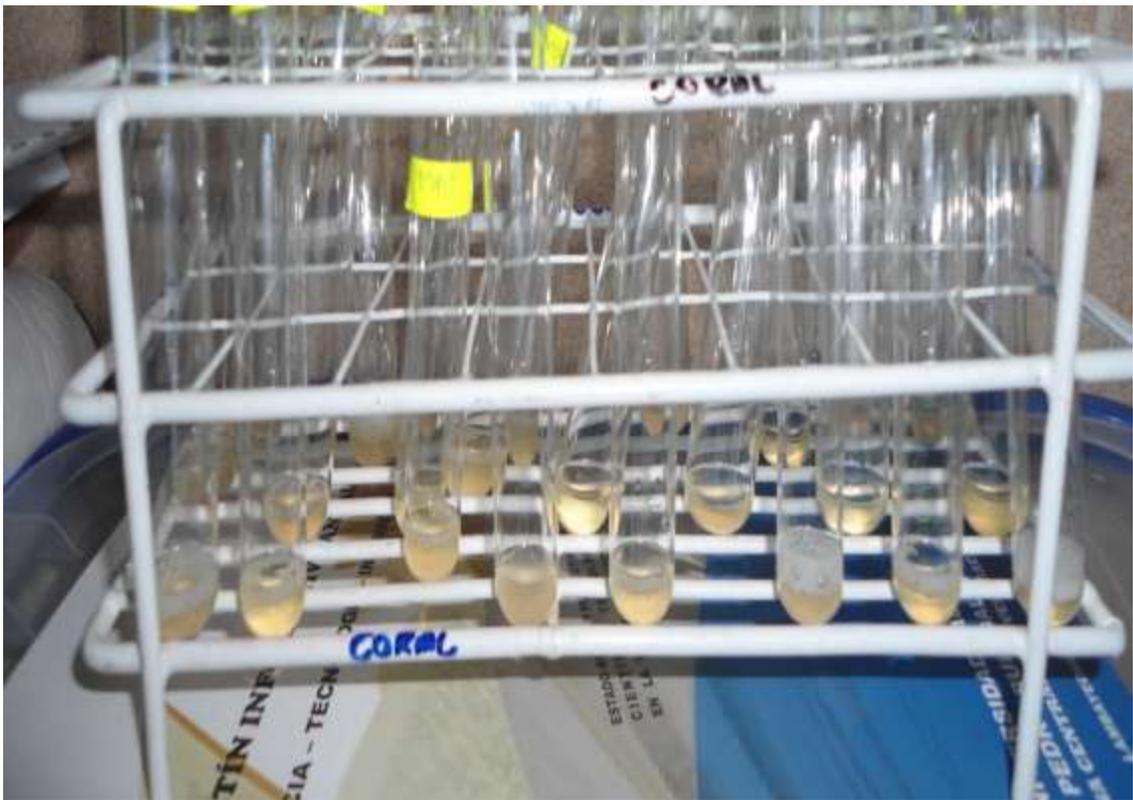


Figura 18. Sobrenadante de caldo tripticase soya cultivado con enterobacterias nativas.



Figura 19. Viraje del indicador del verde al azul en el medio Nfb cultivado con enterobacterias nativas.



Figura 20. Película blanquecina bajo la superficie del medio Nfb cultivado con enterobacteria fijadora de nitrógeno.



Figura 21. Caldo extracto de suelo cultivado con enterobacterias nativas.



Figura 22. Caldo extracto de suelo con KCl 2M.

1 hora adicional, para después tomar 10 mL del sobrenadante y centrifugarlos (3 000 rpm) durante 5 minutos. Luego, los sobrenadantes se vertieron en tubos de dilución, se añadieron 0,4 mL de solución alcohólica de fenol al 10 %; 0,4 mL de nitroprusiato de sodio al 0,5 % y 1 mL de solución oxidante. Se agitaron para mezclar y después se dejaron en reposo durante 1 hora.

La positividad a la fijación del nitrógeno *in vitro* estuvo dada por una coloración azul y se leyó la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible, a 632,9 nm. Las concentraciones de nitrógeno fijado como amonio, se calcularon en una recta patrón que fue obtenida con diluciones sucesivas de una solución de 100 ppm de cloruro de amonio.

3.2.10 Detección y cuantificación de fósforo solubilizado *in vitro*

Para la detección de fósforo solubilizado *in vitro*, se utilizó la metodología descrita por Vazquez *et al.* (2000). Cada bacteria fue sembrada por puntura superficial en agar para aislamiento de microorganismos solubilizadores de fósforo, Sundara Rao Sinha Medium, SRSM (Anexo 6). Las placas de Petri se incubaron a 30 °C, por 96 horas y las colonias solubilizadoras de fósforo fueron reconocidas por el cambio de color del indicador al amarillo y la formación de un halo traslúcido alrededor de la colonia (Figura 23). Después, las colonias se cultivaron nuevamente en agar SRSM, para verificar la actividad solubilizadora de fósforo y se midió el diámetro del halo de las colonias que conservaron su capacidad para solubilizar fósforo.

Para la cuantificación del fósforo solubilizado, se obtuvo el inóculo de cada una de las bacterias solubilizadoras de fósforo cultivadas en 1 mL de caldo SRSM a 30 °C, durante 20 horas en agitación constante a 150 rpm (Figura 24). A continuación; 0,6 mL de cada uno de los cultivos bacterianos fueron inoculados en tubos con 6 mL de caldo SRSM e incubados a 30 °C, con agitación constante (150 rpm). Al momento de la inoculación (0 horas) y después de 72 horas, se tomaron submuestras de 3 mL de caldo SRSM que fueron centrifugados a 3 000 rpm por 5 minutos y en el sobrenadante se cuantificó el fósforo soluble mediante el método colorimétrico del molibdato según Rodier & Rodi, 2005 (Anexo 6). Los resultados se expresaron como fósforo solubilizado (ppm).

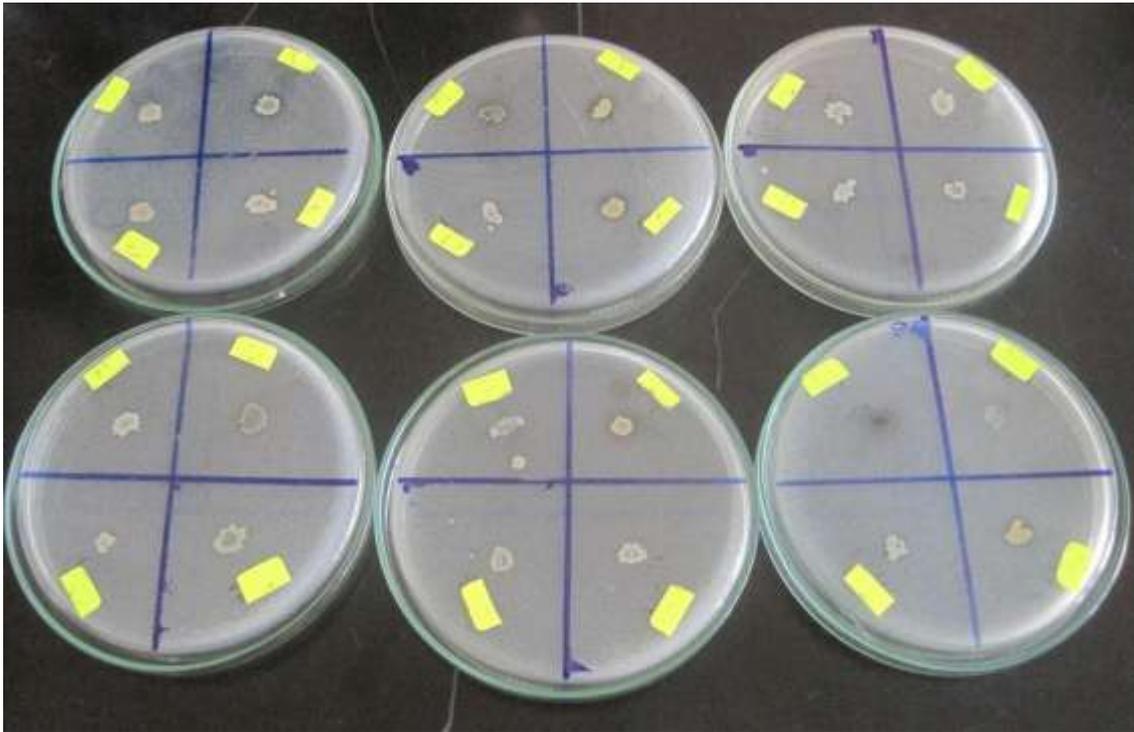


Figura 23. Colonias de enterobacterias nativas desarrolladas en agar Sundara Rao Sinha Medium, SRSM.



Figura 24. Caldo SRSM, para la cuantificación de fósforo solubilizado.

3.2.11 Prueba de antagonismo de *Fusarium verticillioides*

Para la prueba de antagonismo las enterobacterias nativas se enfrentaron *in vitro* a *Fusarium verticillioides* aislado de granos de maíz.

a. Aislamiento e identificación de *F. verticillioides*

En dos campos comerciales de maíz donde se observaron síntomas de pudrición de tallo y de la mazorca se recolectaron cinco tallos y aleatoriamente 200 granos de maíz, procedentes de diez mazorcas desgranadas y recién cosechadas en el campo (Figura 25).

Para el aislamiento de hongos, según Ríos & Zúñiga (2012), los tallos fueron lavados con agua de caño. Después, en asepsia fueron cortados en fragmentos de aproximadamente 0,5 cm, que fueron depositadas en un vaso de precipitación, donde se adicionaron 40 mL de hipoclorito de sodio comercial 10 % (v/v) y se homogenizó el contenido con movimientos rotatorios durante 2 minutos. A continuación, se eliminó el sobrenadante y se vertieron 50 mL de agua destilada esterilizada. A su vez, se seleccionaron 60 granos de maíz aleatoriamente y según García & Martínez (2010) se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio comercial al 1 % (v/v) durante 1 minuto (Figura 26).

Finalizada la desinfección, los fragmentos de tejido vegetal y granos de maíz fueron depositados sobre papel filtro esterilizado, para eliminar el exceso de humedad y luego fueron llevados en número de seis y dispuestos radialmente sobre placas de Petri con agar papa dextrosa (PDA) más cloranfenicol (Figura 27, anexo 7). Después de la incubación a 30 °C, hasta por 7 días, fragmentos de los micelios desarrollados se cultivaron en viales con PDA (Figura 28), se incubaron a 30 °C, por 4 días y constituyeron los cultivos puros de hongos (Figura 29), que fueron guardados en refrigeración. La identificación de los hongos se realizó según Barnett y Hunter (1999), Figueroa *et al.* (2010) y Solano *et al.* (2011).



Figura 25. Granos de *Zea mays* L. “maíz” para el aislamiento de *Fusarium verticillioides*.



Figura 26. Desinfección de granos de *Zea mays* L. “maíz” con hipoclorito de sodio



Figura 27. Siembra de granos de *Zea mays* L. "maíz" en agar papa dextrosa más cloranfenicol.



Figura 28. Colonias de hongos filamentosos desarrollados en agar papa dextrosa más cloranfenicol.



Figura 29. Cultivo puro de *Fusarium verticillioides* aislado de granos de *Zea mays* L. "maíz".

b. Prueba de antagonismo

Para la prueba de antagonismo se utilizó la técnica de enfrentamiento en “cultivo dual” descrita por Fernández & Vega (2001), según la cual cada bacteria nativa se sembró masivamente en uno de los cuatro extremos de una placa de Petri con PDA, ocupando aproximadamente un cuarto del área total y se incubó a 30 °C, por 72 horas. A continuación, un fragmento (0,9 cm de diámetro) del hongo *F. verticillioides* se depositó en el centro de las placas de Petri (Figuras 30, 31). Después de 5 días de incubación a 30°C, se midió el radio de la colonia del hongo y se comparó con una placa testigo para determinar si el crecimiento fúngico fue afectado por enterobacterias. Los resultados se expresaron con porcentaje de inhibición del crecimiento respecto al testigo.

3.2.12 Efecto en la emergencia y sobrevivencia de maíz.

Las semillas y la rizósfera de plántulas de maíz híbrido simple se inocularon independientemente con cada uno de los 100 cultivos de enterobacterias nativas (Figuras 32, 33) y se determinaron los porcentajes de emergencia y sobrevivencia a los 7 y 20 días respectivamente.

a. Ubicación e instalación del cultivo

El cultivo de maíz amarillo duro híbrido simple y la inoculación de 100 enterobacterias nativas, previamente caracterizadas se realizó en el invernadero de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, en Lambayeque. El ensayo fue conducido entre el 10 de abril al 6 de mayo de 2013, con una temperatura mínima de 18 °C y una máxima de 26 °C.

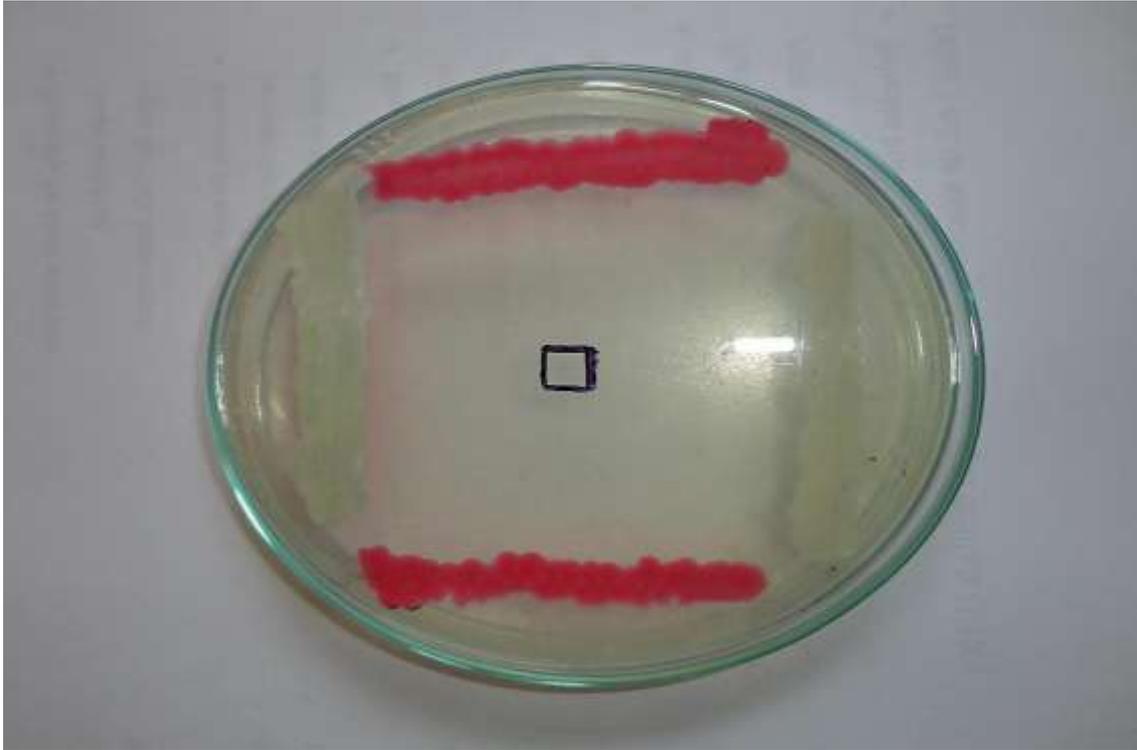


Figura 30. Enterobacterias sembradas en agar papa dextrosa para la prueba de antagonismo.

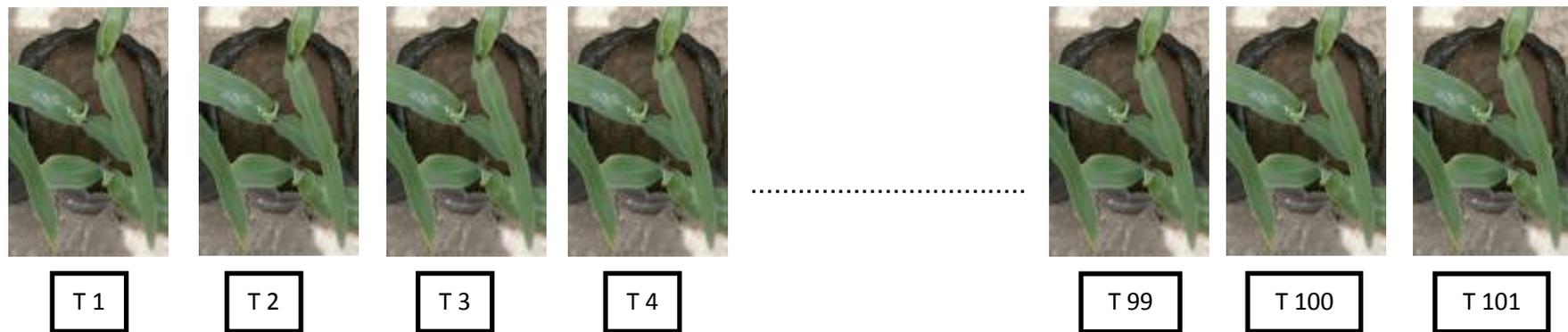


Figura 31. *Fusarium verticillioides* desarrollado en agar papa dextrosa.



Donde T 1, T 2, T 3, T4... T 99, T 100; enterobacteria nativas
T101; testigo agua destilada

Figura 32. Ensayo para determinar el efecto de enterobacterias nativas en la emergencia de *Zea mays* L. “maíz” amarillo duro híbrido simple.



Donde **T 1, T 2, T 3... T 99, T 100**; enterobacterias nativas.
T 101; Testigo agua destilada.

Figura 33. Ensayo para determinar el efecto de enterobacterias nativas en la sobrevivencia de *Zea mays* L. “maíz” amarillo duro híbrido simple

a. Características de la especie vegetal

El maíz amarillo duro (Figura 34), es un híbrido simple precoz con un periodo vegetativo de 115 días. El número de plantas por hectárea es de 55 000, con un potencial de rendimiento de 14 000 Kg ha^{-1} . Las plantas alcanzan 1,90 m de altura y requieren cinco riegos (Casos & Santiago, 2013)

b. Acondicionamiento del suelo experimental

El suelo experimental estuvo constituido por 202 Kg de una mezcla de suelo agrícola, arena y compost en la proporción 2,5:2:0,5 que se solarizó durante 30 días. A continuación, la mezcla de suelo experimental se distribuyó en bolsas de polietileno negro de 16,5 x 23,5 cm, a razón de 1 Kg por bolsa, totalizando 202 bolsas.

c. Porcentaje de germinación

Para determinar el porcentaje de germinación de las semillas de maíz, en cinco bandejas de tecnopor de 20 x 14 cm, en cuyo fondo se colocaron cuatro capas de papel toalla esterilizado, humedecido con agua destilada esterilizada y con ayuda de pinzas esterilizadas, se depositaron 20 semillas de maíz por bandeja, distribuidas en dos hileras, a razón de diez por hilera (Figura 35). Las bandejas se taparon y se mantuvieron a temperatura ambiente (28 °C), humedeciéndolas intermedariamente, hasta observar el máximo de germinación que fue 98 %, después de 7 días.



Figura 34. Semillas de *Zea mays* L. “maíz” amarillo duro híbrido simple.



Figura 35. Prueba de germinación de *Zea mays* L. “maíz” amarillo duro híbrido simple

e. Obtención del inóculo bacteriano

Para el inóculo (Figura 36), cada bacteria fue cultivada en 5 mL de agar nutritivo, a 30 °C, por 24 horas. Después se obtuvieron 13 mL de una suspensión de células en solución salina esterilizada 0,85 % p/v, cuya concentración se estandarizó con el tubo 3 del nefelómetro de Mac Farland.

f. Tratamiento de las semillas

Las semillas de maíz se depositaron en una bolsa de polietileno, donde se agregó el insecticida en polvo soluble Acefato O, S – dimethyl acetylphosphoramidothioate (Orthene 75PS), en la dosis de 4,8 g/kg de semillas (Figuras 37, 38). Después, el contenido fue homogenizado (Figura 39), por movimientos de rotación durante 2 minutos, para que el insecticida se distribuya uniformemente sobre las semillas. A continuación, las semillas fueron extendidas en el interior de la bolsa y llevadas sobre una bandeja a la estufa a 30 °C, para disminuir el exceso de humedad.

g. Aplicación de las bacterias en las semillas

En 101 bolsas de polietileno transparente de 2,5 x 8,0 cm se depositaron diez semillas de maíz amarillo híbrido por bolsa. A continuación se inoculó 1 mL de la suspensión bacteriana correspondiente por bolsa (Figura 40) equivalente a 307, 69 mL especie semilla⁻¹ y el contenido fue homogenizado para que las bacterias se distribuyan uniformemente en las semillas. Después, éstas fueron extendidas en la bolsa (Figura 41) y llevadas en una bandeja hacia la estufa a 30 °C para disminuir el exceso de humedad (Figura 42). Posteriormente, con una pinza, las semillas de maíz previamente inoculadas se sembraron en el suelo experimental contenido en bolsas plásticas de polietileno negro, a razón de 10 semillas por bolsa (Figura 43) y se realizaron los riegos correspondientes según los requerimientos de las plantas.



Figura 36. Obtención del inóculo bacteriano



Figura 37. Determinación del peso del insecticida en polvo soluble.



Figura 38. Adición del insecticida en semillas de *Zea mays* L. “maíz” amarillo duro.



Figura 39. Homogenización del insecticida con las semillas de *Zea mays* L. “maíz” amarillo duro.



Figura 40. Inoculación de enterobacterias nativas en las semillas de *Zea mays* L. “maíz” amarillo duro.



Figura 41. Semillas de *Zea mays* L. “maíz” inoculadas con enterobacterias nativas.



Figura 42. Semillas en estufa para la disminución del exceso de humedad.



Figura 43. Ensayo de emergencia de semillas de *Zea mays* L. "maíz" amarillo duro inoculadas con enterobacterias nativas.



Figura 44. Inicio de la emergencia de semillas de *Zea mays* L. “maíz” amarillo duro, inoculadas con enterobacterias nativas.



Figura 45. Emergencia de *Zea mays* L. “maíz” amarillo duro inoculado con enterobacterias nativas en las semillas.

h. Determinación del porcentaje de emergencia

Diariamente, hasta 7 días después de la inoculación de las bacterias en las semillas de maíz se contaron las plántulas emergidas (Figuras 44,45), calculándose después el porcentaje de emergencia.

i. Aplicación de las bacterias en la rizósfera

En 101 bolsas de polietileno negro conteniendo el suelo experimental se sembraron tres semillas de maíz amarillo híbrido por bolsa y después de 7 días se inocularon las bacterias nativas en la rizósfera. Previamente, en ambos lados de la plántula se realizaron dos surcos a 5 cm del tallo y con una profundidad de 3 cm, donde se depositaron respectivamente 6 mL del inóculo bacteriano, totalizando 12 mL, a razón de 4 mL/plántula (Figura 46).

j. Determinación del porcentaje de sobrevivencia

Diariamente, hasta 20 días después de la inoculación de las bacterias en la rizósfera, se contaron las plántulas sobrevivientes (Figura 47), calculándose después el porcentaje de sobrevivencia.

3.3 Análisis de los datos

Los datos obtenidos fueron ordenados en tablas y figuras, que permitieron determinar el potencial de las enterobacterias nativas como promotoras de crecimiento de plantas. En el presente trabajo se utilizaron los programas Microsoft Office Word y Excel versión 2010.



Figura 46. Inoculación de enterobacterias nativas en la rizósfera de *Zea mays* L. “maíz” amarillo duro.



Figura 47. Supervivencia de plántulas de *Zea mays* L. “maíz” amarillo duro, inoculado con enterobacterias nativas.

IV.RESULTADOS

4.1. Enterobacterias aisladas e identificadas de suelo rizosferico de maiz

En el 100% (54) de las muestras rizosféricas de maíz, se aislaron bacterias que desarrollaron en agar Mac Conkey, obteniéndose 269 cultivos puros. Entre los 269 cultivos puros de bacterias, 30% (81) fermentó lactosa y 70% (188) no la fermentó (Figura 48). A su vez, en el subcultivo realizado, el 51% (137) resultó oxidasa positivo, el 42% (120) oxidasa negativo y 4% (12) no creció (Figura 49).

El 87% (104) de las bacterias oxidasa negativas fermentó la glucosa en TSI, siendo considerado como enterobacterias y el 13% (16) como bacterias no fermentadoras (Figura 50), tal que en el 39% (21) de las muestras rizosféricas de maíz se aislaron enterobacterias.

En las enterobacterias nativas se identificaron *Pantoea* (49%), *Klebsiella* (17%), *Kluyvera* (16%), *Serratia* (11%), *Citrobacter* (4%) y *Hafnia* (3%) (Tabla 3, figura 51). Por su parte, entre las bacterias no fermentadoras se identificaron *Acinetobacter* con 79% y *Stenotrophomonas* con 21% (Figura 52). Para la investigación del potencial biológico se seleccionaron 100 cultivos de enterobacterias (Anexo 8).

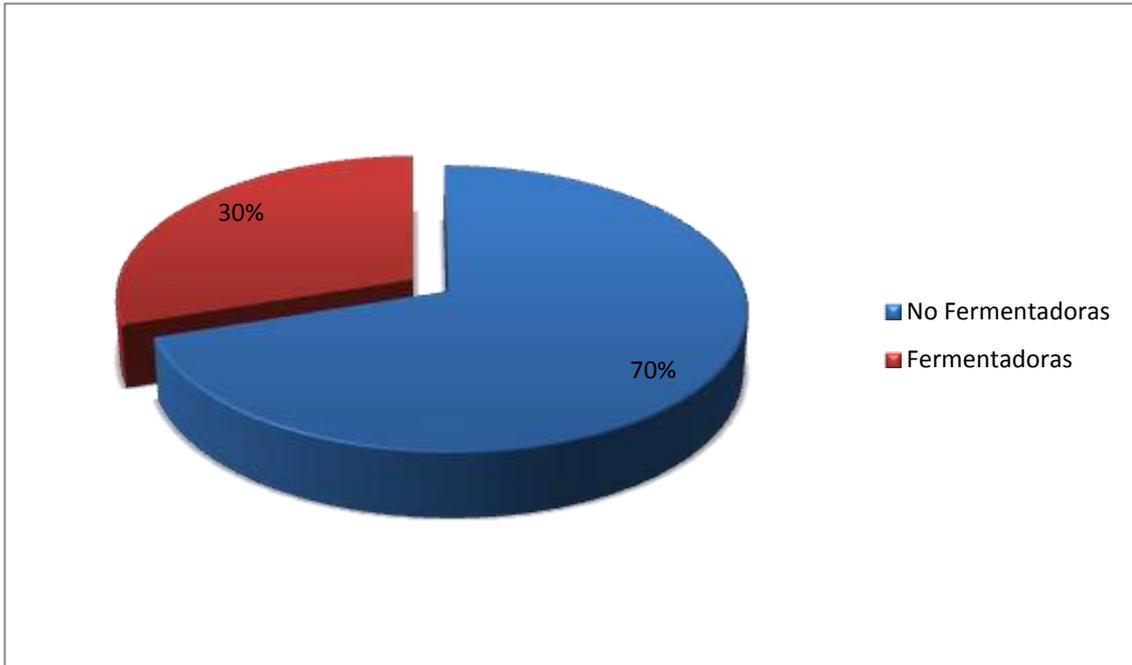


Figura 48. Frecuencia de bacterias Fermentadoras y No fermentadoras de lactosa aisladas del suelo rizosférico en agar Mac Conkey.

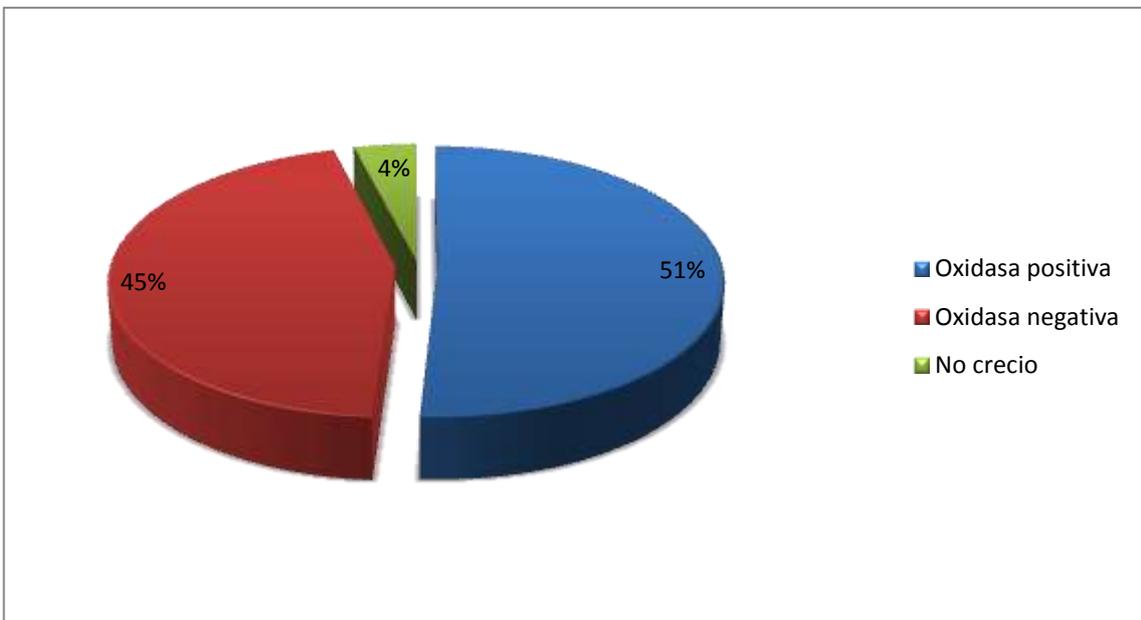


Figura 49. Frecuencia de bacterias desarrolladas en agar Mac Conkey según la positividad y negatividad en la prueba de oxidasa.

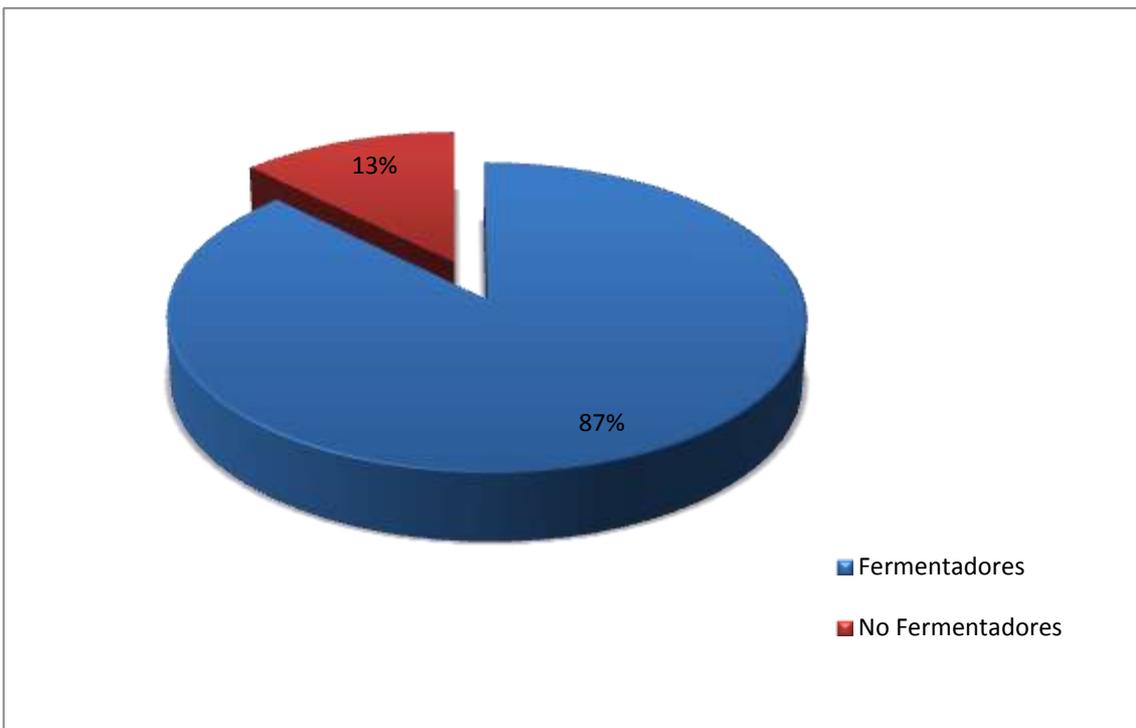


Figura 50. Frecuencia de bacterias oxidasa negativas según la fermentación de la glucosa en agar HierroTriple Azúcar.

Tabla 3. Características diferenciales de los géneros de enterobacterias identificados en suelo rizosférico de *Zea mays* L. “maíz” en Lambayeque, 2013.

Características diferenciales	1	2	3	4	5	6
Fermentación en TSI	K/A	K/A	K/A	A/A	K/A	K/A
Gas	±	-	+	±	±	+
Sulfuro de hidrógeno	-	-	-	-	-	+
Utilización de citrato	±	±	+	+	±	±
Descarboxilación de lisina	-	+	±	+	±	-
Acidez de glucosa en caldo	±	±	+	±	±	+
Formación de acetoína	+	±	-	±	±	-
Producción de indol	±	-	±	-	±	+

1 = *Pantoea* 2 = *Hafnia* 3 = *Kluybera* 4 = *Klebsiella* 5 = *Serratia* 6 = *Citrobacter*

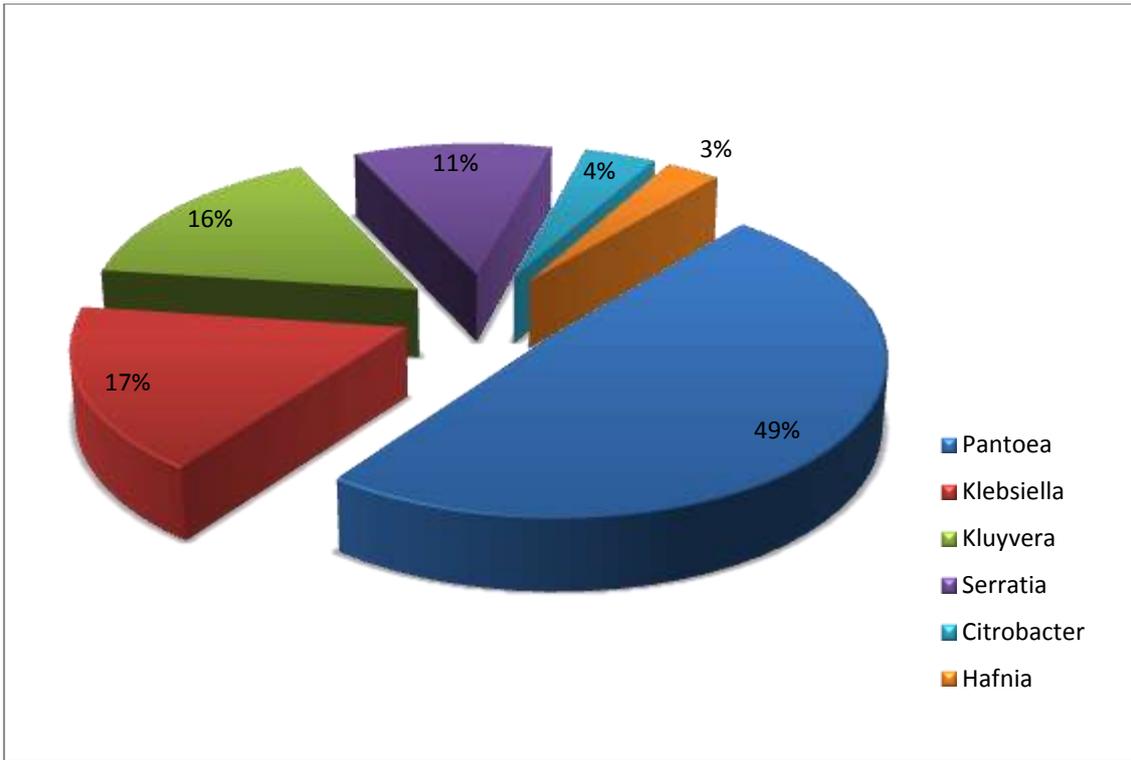


Figura 51. Frecuencia de géneros de enterobacterias aisladas de *Zea mays* L. “maíz” en Lambayeque, 2013.

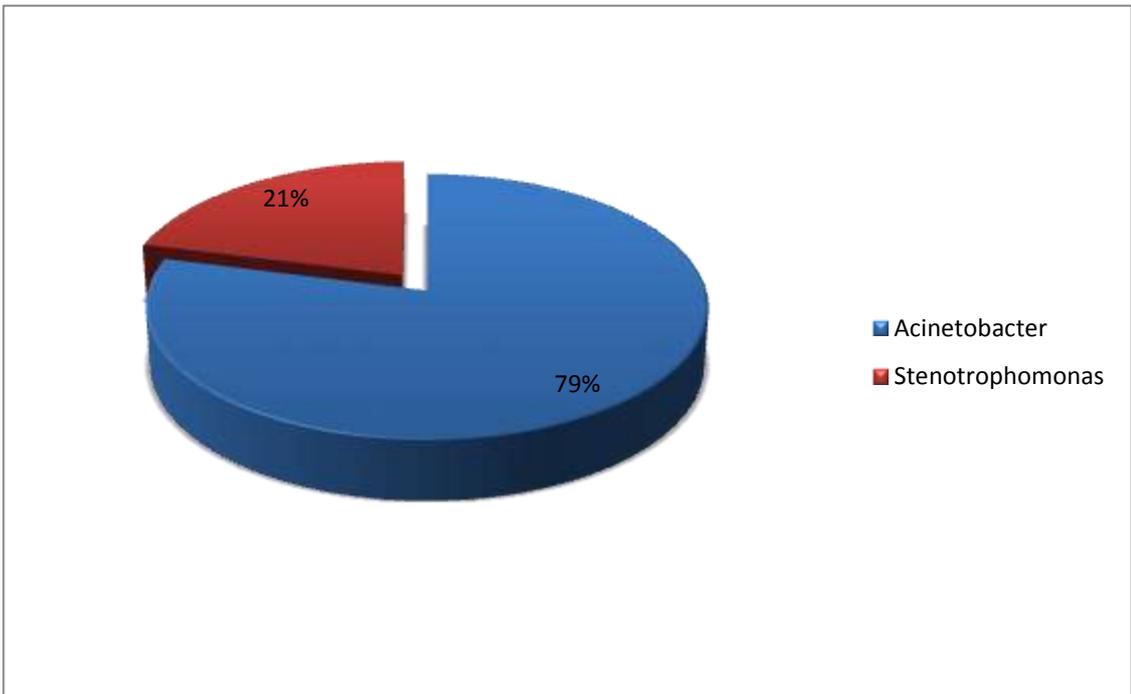


Figura 52. Frecuencia de géneros de bacterias no fermentadoras aisladas de suelo rizosferico *Zea mays* L. “maíz” en Lambayeque, 2013.

4.2 Potencial biológico de enterobacterias nativas

En el 22% de enterobacterias nativas se detectó actividad proteolítica (Figura 53), evidenciada por la formación de halos alrededor de las colonias (Figura 54), cuyo tamaño osciló entre menos de 2,5 cm y 4,5 cm para *Klebsiella sp.* 89 y *Serratia sp.* 84, respectivamente (Tabla 4,). A su vez, el 25% de enterobacterias presentó actividad quitinolítica (Figuras 55, 56), demostrada por el crecimiento en agar quitina (Tabla 5).

El 97% de las enterobacterias nativas sintetizaron ácido indolacético (Figura 57), denotado por la aparición de una coloración grosella (Figura 58) y se cuantificó entre 0,75 y 54,25 ppm para *Klebsiella sp.* 5, *Pantoea sp.* 32 y *Serratia sp.* 43, respectivamente (Tabla 6).

El 96% de las enterobacterias nativas fijaron nitrógeno *in vitro* (Figura 59), evidenciado por la aparición de una película y viraje del indicador al azul (Figura 60) y se cuantificó entre 1,16 y 31,67 ppm de amonio para *Klebsiella sp.* 94 y *Pantoea sp.* 99, respectivamente (Tabla 7).

En cuanto a la solubilización de fósforo, el 16% de enterobacterias nativas solubilizó fosfato dicálcico (Figura 61), observándose viraje del indicador al amarillo y halos translúcidos en agar SRSM (Figura 62), cuyos tamaños oscilaron entre menos de 0,1 y 0,5 cm (Tabla 8). En caldo SRSM se cuantificó el fósforo soluble observándose una coloración azul. A su vez, la concentración de fósforo solubilizado osciló entre 4,78 y 1,25 ppm para *klebsiella sp.* 89 y *Pantoea sp.* 34, respectivamente. (Figura 63, tabla 9). Para la prueba de antagonismo se aisló *Fusarium verticillioides* de granos de maíz. El hongo fue reconocido por su crecimiento en agar papa dextrosa, donde se observó el micelio en un inicio de color blanco y posteriormente morado (Figura 64), las microconidias se observaron con abundancia (Figura 65), las macroconidias fueron escasas y cuando se encontraron presentaron la célula apical curvada y la basal en forma de pie con tres o siete septas (Figura 66). El hongo no formó clamidosporas, pero sí hinchamientos de hifas que podrían ser confundidas con clamidosporas (Figura 67).

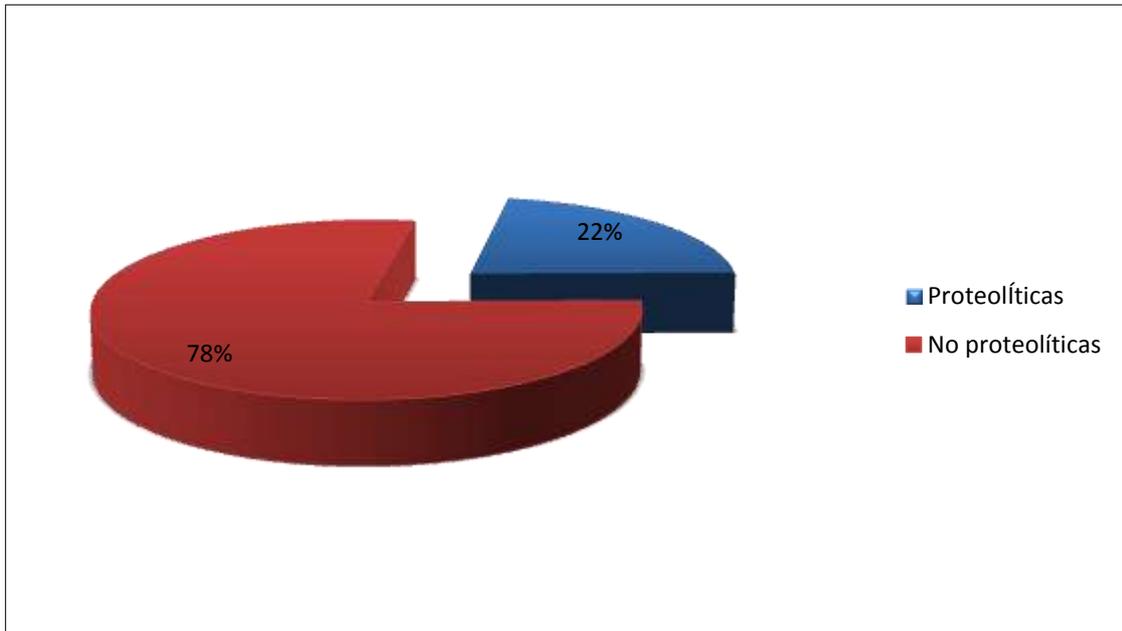


Figura 53. Porcentaje (%) de enterobacterias nativas con actividad proteolítica en Lambayeque, 2013.

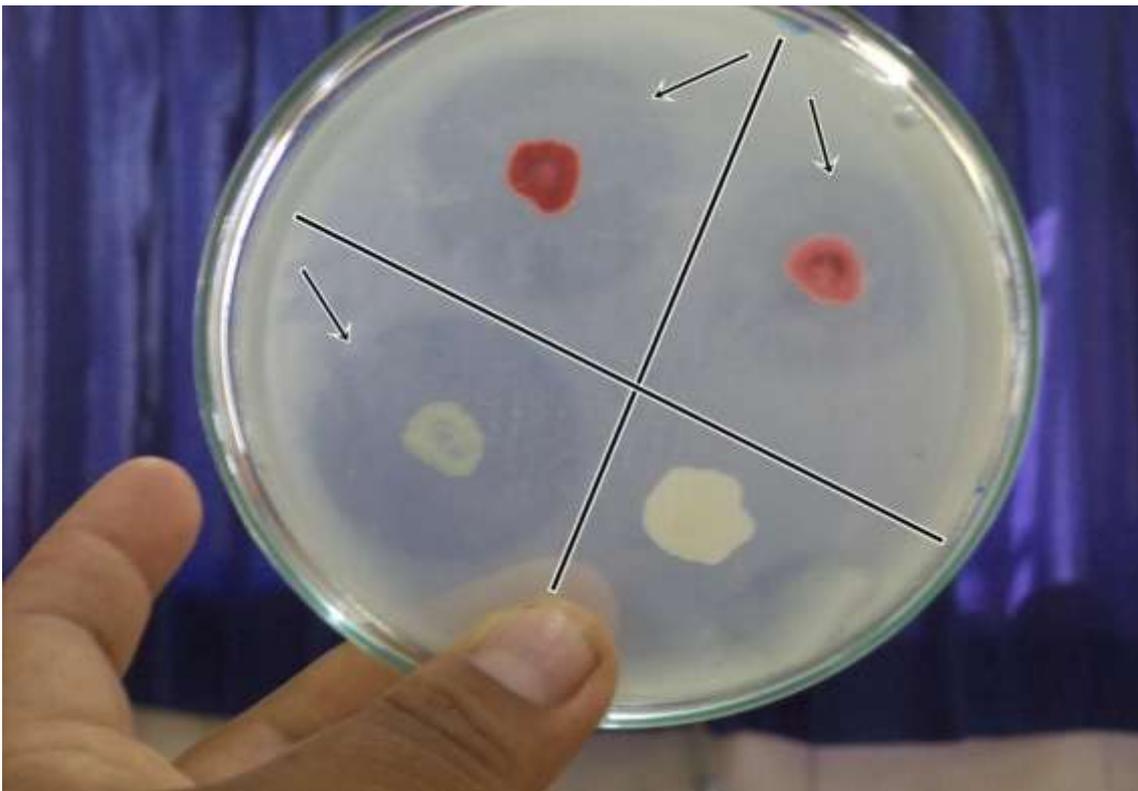


Figura 54. Halo de hidrólisis formado por enterobacterias en agar leche.

Tabla 4. Halo (cm) de hidrólisis formado por enterobacterias nativas en agar leche durante 48 horas

Enterobacterias código UNPRG	Halo	Enterobacterias código UNPRG	Halo
<i>Serratia sp.</i> 84	4,5	<i>Klebsiella sp.</i> 91	4,0
<i>Kluyvera sp.</i> 2	4,0	<i>Serratia sp.</i> 30	3,5
<i>Pantoea sp.</i> 4	4,0	<i>Serratia sp.</i> 56	3,5
<i>Pantoea sp.</i> 14	4,0	<i>Pantoea sp.</i> 58	3,5
<i>Serratia sp.</i> 31	4,0	<i>Klebsiella sp.</i> 94	3,5
<i>Serratia sp.</i> 33	4,0	<i>Kluyvera sp.</i> 54	3,0
<i>Serratia sp.</i> 43	4,0	<i>Pantoea sp.</i> 61	3,0
<i>Serratia sp.</i> 46	4,0	<i>Serratia sp.</i> 64	3,0
<i>Pantoea sp.</i> 48	4,0	<i>Pantoea sp.</i> 73	3,0
<i>Pantoea sp.</i> 53	4,0	<i>Pantoea sp.</i> 97	3,0
<i>Pantoea sp.</i> 71	4,0	<i>Klebsiella sp.</i> 89	2,5

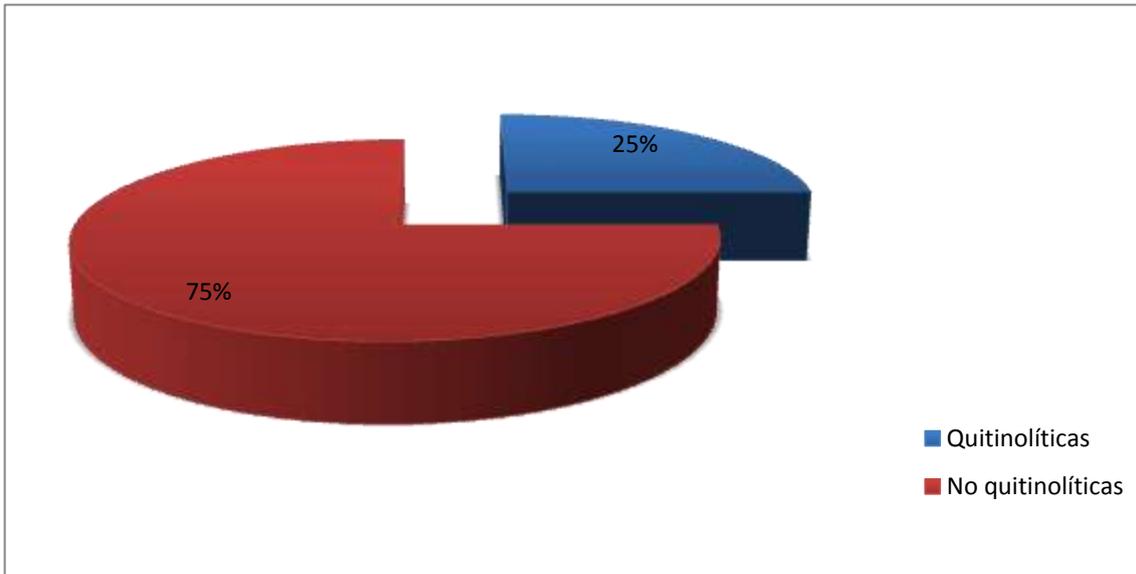


Figura 55. Porcentaje (%) de enterobacterias nativas con actividad quitinolítica en Lambayeque, 2013.

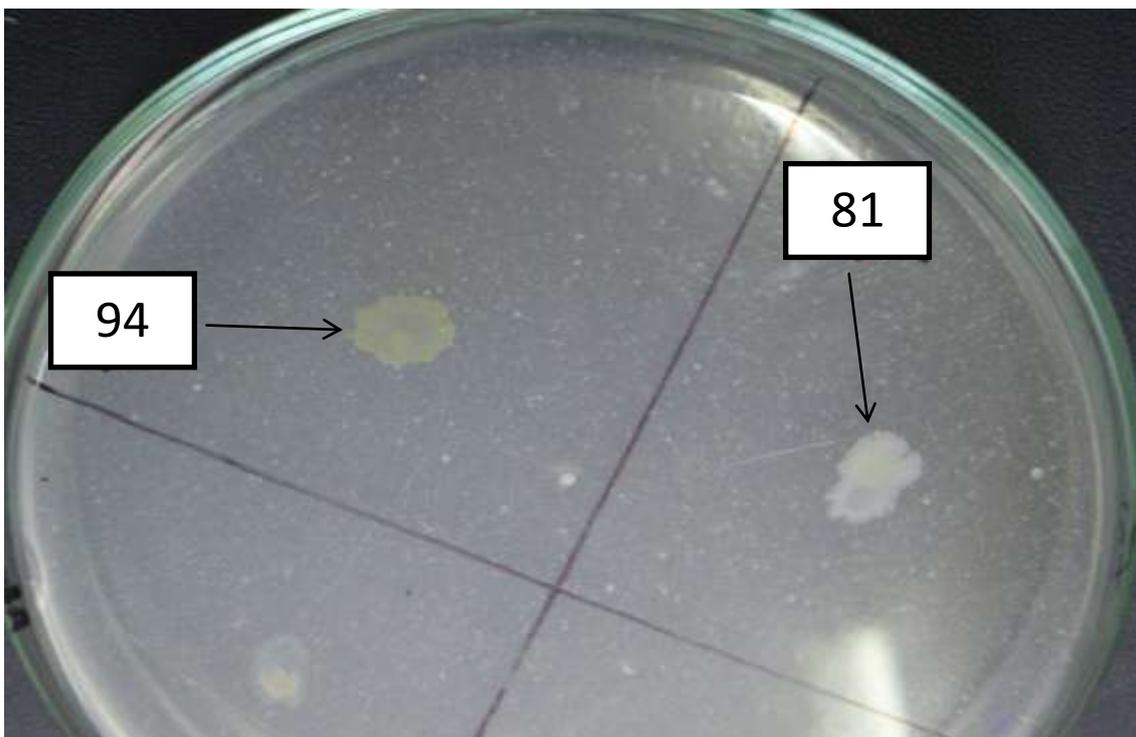


Figura 56. Biomasa formada por enterobacterias nativas en agar quitina.

Tabla 5. Enterobacterias nativas que desarrollaron en agar quitina durante 120 horas

Enterobacterias código UNPRG	
<i>Pantoea sp.</i> 41	<i>Kluyvera sp.</i> 22
<i>Serratia sp.</i> 33	<i>Klebsiella sp.</i> 15
<i>Serratia sp.</i> 43	<i>Klebsiella sp.</i> 91
<i>Klebsiella sp.</i> 89	<i>Serratia sp.</i> 75
<i>Klebsiella sp.</i> 94	<i>Kluyvera sp.</i> 54
<i>Serratia sp.</i> 56	<i>Klebsiella sp.</i> 35
<i>Kluyvera sp.</i> 37	<i>Klebsiella sp.</i> 95
<i>Klebsiella sp.</i> 81	<i>Serratia sp.</i> 30
<i>Pantoea sp.</i> 3	<i>Pantoea sp.</i> 48
<i>Kluyvera sp.</i> 60	<i>Klebsiella sp.</i> 94
<i>Pantoea sp.</i> 38	<i>Pantoea sp.</i> 59
<i>Citrobacter sp.</i> 25	<i>Kluyvera sp.</i> 62
<i>Pantoea sp.</i> 18	

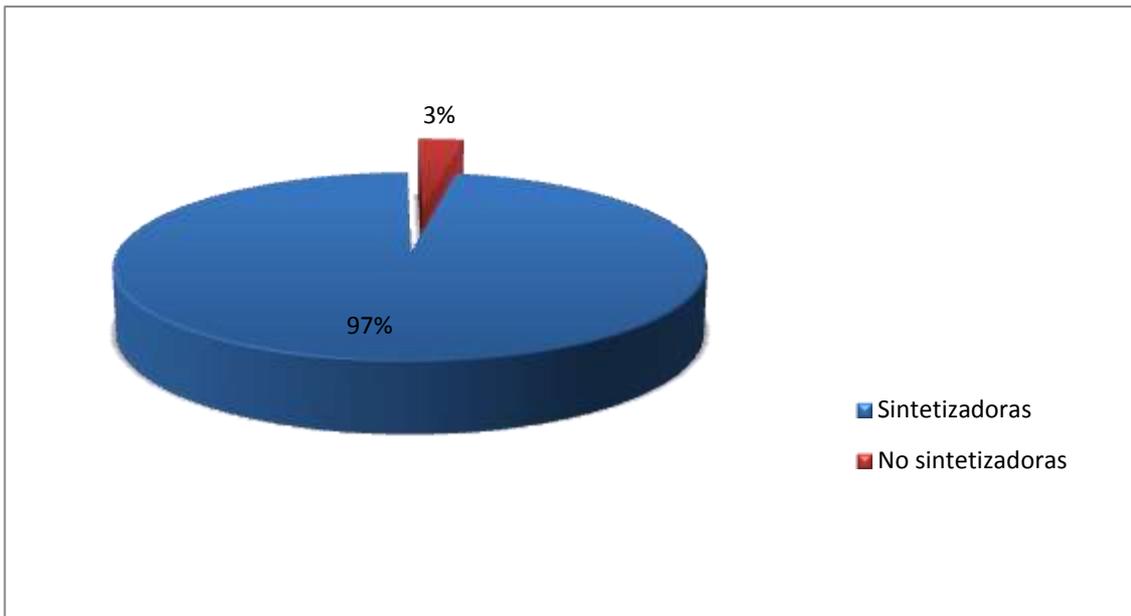


Figura 57. Porcentaje (%) de enterobacterias nativas productoras de ácido indolacético, en Lambayeque, 2013.



Figura 58. Coloración grosella observada en la cuantificación de ácido indolacético por la reacción colorimétrica de Salkowski.

Tabla 6. Ácido indolacético (ppm) producido por enterobacterias nativas en caldo tripticasa soya durante 96 horas

Enterobacterias código UNPRG	AIA (ppm)	Enterobacterias código UNPRG	AIA (ppm)
<i>Serratia sp.</i> 43	54,25	<i>Pantoea sp.</i> 76	9,50
<i>Kluyvera sp.</i> 98	54,00	<i>Hafnia sp.</i> 87	9,25
<i>Pantoea sp.</i> 1	53,75	<i>Serratia sp</i> 93	9,25
<i>Pantoea sp.</i> 61	51,25	<i>Pantoea sp.</i> 6	9,00
<i>Pantoea sp.</i> 55	50,25	<i>Pantoea sp.</i> 51	9,00
<i>Klebsiella sp.</i> 91	48,75	<i>Pantoea sp.</i> 9	8,87
<i>Kluyvera sp.</i> 68	45,75	<i>Citrobacter sp.</i> 28	8,87
<i>Pantoea sp.</i> 78	44,00	<i>Klebsiella sp.</i> 100	8,87
<i>Pantoea sp.</i> 97	40,75	<i>Kluyvera sp.</i> 24	8,50
<i>Kluyvera sp.</i> 22	38,25	<i>Citrobacter sp.</i> 25	8,25
<i>Serratia sp</i> 56	37,75	<i>Kluyvera sp.</i> 79	8,25
<i>Serratia sp</i> 64	37,25	<i>Pantoea sp.</i> 58	8,25
<i>Kluyvera sp.</i> 42	33,25	<i>Pantoea sp.</i> 14	8,00
<i>Kluyvera sp.</i> 60	33,00	<i>Pantoea sp.</i> 26	8,00
<i>Pantoea sp.</i> 72	33,00	<i>Pantoea sp.</i> 70	7,50
<i>Serratia sp</i> 93	28,25	<i>Pantoea sp.</i> 44	7,50
<i>Kluyvera sp.</i> 69	26,75	<i>Serratia sp</i> 90	7,50
<i>Klebsiella sp.</i> 15	24,25	<i>Klebsiella sp.</i> 81	7,25
<i>Serratia sp</i> 84	22,25	<i>Pantoea sp.</i> 99	7,25
<i>Klebsiella sp.</i> 65	20,25	<i>Pantoea sp.</i> 41	7,25
<i>Pantoea sp.</i> 13	20,00	<i>Pantoea sp.</i> 88	6,75
<i>Pantoea sp.</i> 71	19,75	<i>Klebsiella sp.</i> 67	6,75
<i>Pantoea sp.</i> 77	19,50	<i>Klebsiella sp.</i> 74	6,50
<i>Pantoea sp.</i> 12	19,00	<i>Kluyvera sp.</i> 7	6,50
<i>Pantoea sp.</i> 27	18,75	<i>Citrobacter sp.</i> 8	6,25
<i>Klebsiella sp.</i> 35	18,75	<i>Kluyvera sp.</i> 37	6,25
<i>Klebsiella sp.</i> 19	18,00	<i>Pantoea sp.</i> 48	6,25
<i>Pantoea sp.</i> 57	17,50	<i>Klebsiella sp.</i> 83	6,00
<i>Kluyvera sp.</i> 82	17,25	<i>Klebsiella sp.</i> 95	6,00
<i>Kluyvera sp.</i> 40	16,00	<i>Pantoea sp.</i> 23	6,00
<i>Pantoea sp.</i> 21	15,75	<i>Klebsiella sp.</i> 80	5,75
<i>Pantoea sp.</i> 96	15,25	<i>Kluyvera sp.</i> 20	5,50
<i>Kluyvera sp.</i> 2	15,25	<i>Kluyvera sp.</i> 54	5,50
<i>Pantoea sp.</i> 47	15,00	<i>Pantoea sp.</i> 59	5,25
<i>Hafnia sp.</i> 39	14,75	<i>Pantoea sp.</i> 16	5,25
<i>Pantoea sp.</i> 50	14,00	<i>Pantoea sp.</i> 52	4,50
<i>Klebsiella sp.</i> 89	13,25	<i>Serratia sp</i> 46	4,50
<i>Klebsiella sp.</i> 17	13,25	<i>Pantoea sp.</i> 53	4,00
<i>Pantoea sp.</i> 36	12,50	<i>Pantoea sp.</i> 4	4,00
<i>Pantoea sp.</i> 92	11,50	<i>Pantoea sp.</i> 38	4,00
<i>Pantoea sp.</i> 10	11,25	<i>Pantoea sp.</i> 86	3,75
<i>Hafnia sp.</i> 66	10,75	<i>Klebsiella sp.</i> 94	3,75
<i>Serratia sp</i> 31	10,50	<i>Pantoea sp.</i> 18	3,00
<i>Pantoea sp.</i> 3	10,50	<i>Serratia sp</i> 46	3,00
<i>Pantoea sp.</i> 73	9,75	<i>Pantoea sp.</i> 34	2,50
<i>Serratia sp</i> 33	9,75	<i>Kluyvera sp.</i> 62	1,75
<i>Pantoea sp.</i> 45	9,50	<i>Pantoea sp.</i> 32	0,75
<i>Serratia sp</i> 75	9,50	<i>Klebsiella sp.</i> 5	0,75
<i>Serratia sp</i> 30	9,50		

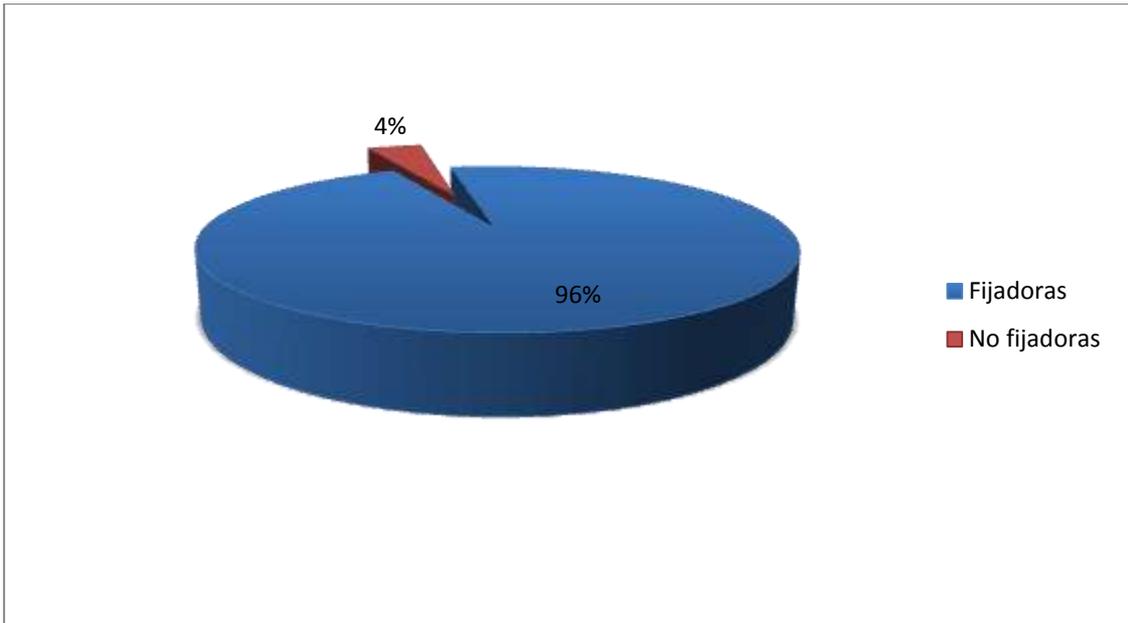


Figura 59. Porcentaje (%) de enterobacterias nativas fijadoras de nitrógeno en caldo extracto de suelo en Lambayeque, 2013.

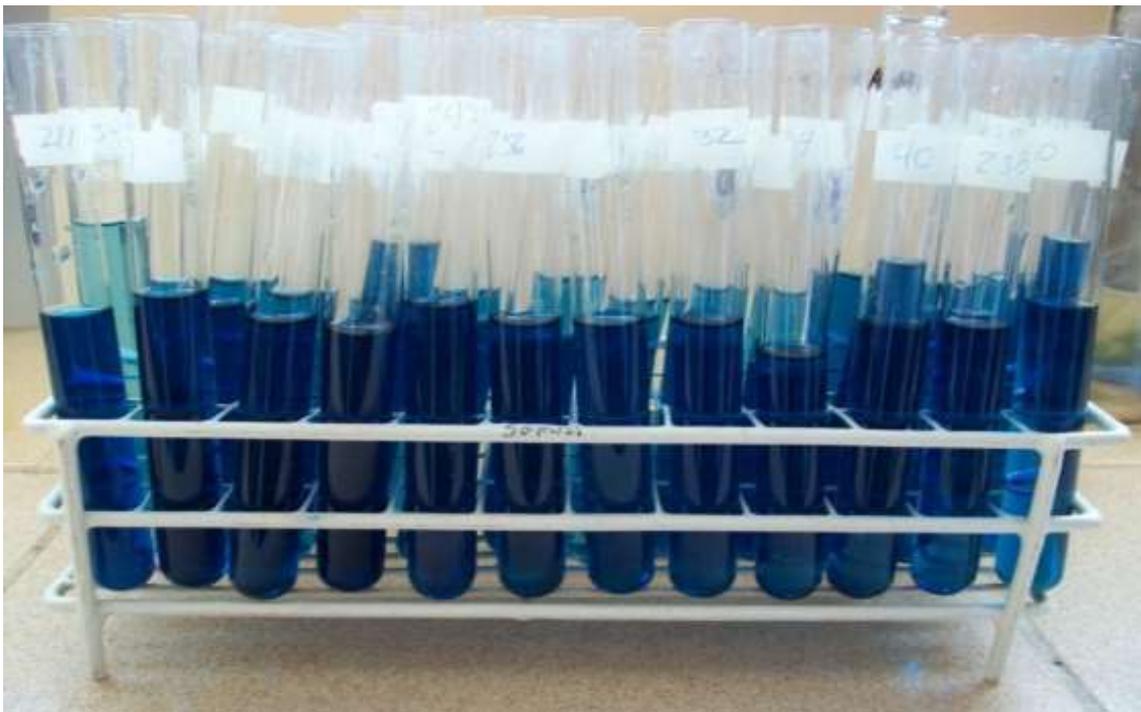


Figura 60. Coloración observada en la cuantificación de amonio por el método colorimétrico de fenolhipoclorito.

Tabla 7. Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por enterobacterias nativas en caldo extracto de suelo durante 7 días.

Enterobacterias código UNPRG	Amonio (ppm)	Enterobacterias código UNPRG	Amonio (ppm)
<i>Pantoea sp.</i> 99	31,67	<i>Pantoea sp.</i> 1	13,84
<i>Kluyvera sp.</i> 20	27,81	<i>Pantoea sp.</i> 76	13,75
<i>Pantoea sp.</i> 27	27,57	<i>Pantoea sp.</i> 88	13,75
<i>Pantoea sp.</i> 32	27,11	<i>Pantoea sp.</i> 45	15,53
<i>Pantoea sp.</i> 48	26,80	<i>Serratia sp.</i> 31	13,46
<i>Pantoea sp.</i> 47	26,58	<i>Klebsiella sp.</i> 85	13,18
<i>Klebsiella sp.</i> 67	23,90	<i>Citrobacter sp.</i> 11	13,05
<i>Pantoea sp.</i> 73	22,76	<i>Pantoea sp.</i> 21	12,92
<i>Pantoea sp.</i> 6	22,46	<i>Klebsiella sp.</i> 5	12,72
<i>Pantoea sp.</i> 41	22,44	<i>Pantoea sp.</i> 59	12,65
<i>Klebsiella sp.</i> 65	22,35	<i>Kluyvera sp.</i> 62	12,46
<i>Klebsiella sp.</i> 91	22,22	<i>Klebsiella sp.</i> 17	12,06
<i>Serratia sp.</i> 75	22,21	<i>Klebsiella sp.</i> 81	12,06
<i>Pantoea sp.</i> 16	21,54	<i>Pantoea sp.</i> 86	12,02
<i>Klebsiella sp.</i> 80	21,08	<i>Pantoea sp.</i> 52	11,78
<i>Kluyvera sp.</i> 22	20,63	<i>Serratia sp.</i> 43	11,45
<i>Serratia sp.</i> 33	19,56	<i>Klebsiella sp.</i> 19	11,32
<i>Kluyvera sp.</i> 60	19,51	<i>Klebsiella sp.</i> 15	11,18
<i>Citrobacter sp.</i> 25	18,88	<i>Pantoea sp.</i> 9	11,14
<i>Pantoea sp.</i> 44	18,36	<i>Citrobacter sp.</i> 28	11,14
<i>Pantoea sp.</i> 63	17,94	<i>Pantoea sp.</i> 87	11,07
<i>Pantoea sp.</i> 53	17,33	<i>Kluyvera sp.</i> 68	10,86
<i>Pantoea sp.</i> 55	17,21	<i>Pantoea sp.</i> 29	10,66
<i>Serratia sp.</i> 64	16,95	<i>Pantoea sp.</i> 4	10,64
<i>Serratia sp.</i> 56	16,58	<i>Pantoea sp.</i> 34	10,64
<i>Klebsiella sp.</i> 89	16,56	<i>Kluyvera sp.</i> 98	10,44
<i>Serratia sp.</i> 46	16,51	<i>Pantoea sp.</i> 50	9,93
<i>Kluyvera sp.</i> 2	16,49	<i>Pantoea sp.</i> 58	9,82
<i>Pantoea sp.</i> 92	16,40	<i>Serratia sp.</i> 90	9,74
<i>Serratia sp.</i> 84	16,14	<i>Pantoea sp.</i> 96	9,67
<i>Pantoea sp.</i> 14	16,07	<i>Pantoea sp.</i> 77	9,39
<i>Pantoea sp.</i> 51	16,05	<i>Pantoea sp.</i> 49	8,75
<i>Klebsiella sp.</i> 100	15,46	<i>Kluyvera sp.</i> 42	8,68
<i>Serratia sp.</i> 30	15,39	<i>Klebsiella sp.</i> 95	8,40
<i>Serratia sp.</i> 93	15,35	<i>Pantoea sp.</i> 78	8,31
<i>Pantoea sp.</i> 57	15,33	<i>Kluyvera sp.</i> 24	8,20
<i>Kluyvera sp.</i> 40	15,28	<i>Pantoea sp.</i> 36	8,18
<i>Pantoea sp.</i> 10	15,15	<i>Citrobacter sp.</i> 8	8,07
<i>Pantoea sp.</i> 12	15,11	<i>Pantoea sp.</i> 3	7,74
<i>Pantoea sp.</i> 13	14,98	<i>Kluyvera sp.</i> 82	7,61
<i>Kluyvera sp.</i> 54	14,94	<i>Pantoea sp.</i> 70	6,73
<i>Pantoea sp.</i> 38	14,93	<i>Pantoea sp.</i> 35	6,34
<i>Hafnia sp.</i> 39	14,85	<i>Pantoea sp.</i> 23	5,86
<i>Klebsiella sp.</i> 74	14,41	<i>Kluyvera sp.</i> 37	5,64
<i>Kluyvera sp.</i> 7	14,36	<i>Pantoea sp.</i> 71	5,50
<i>Pantoea sp.</i> 18	14,36	<i>Pantoea sp.</i> 83	3,42
<i>Pantoea sp.</i> 97	14,28	<i>Pantoea sp.</i> 26	3,05
<i>Pantoea sp.</i> 12	14,14	<i>Klebsiella sp.</i> 94	1,16

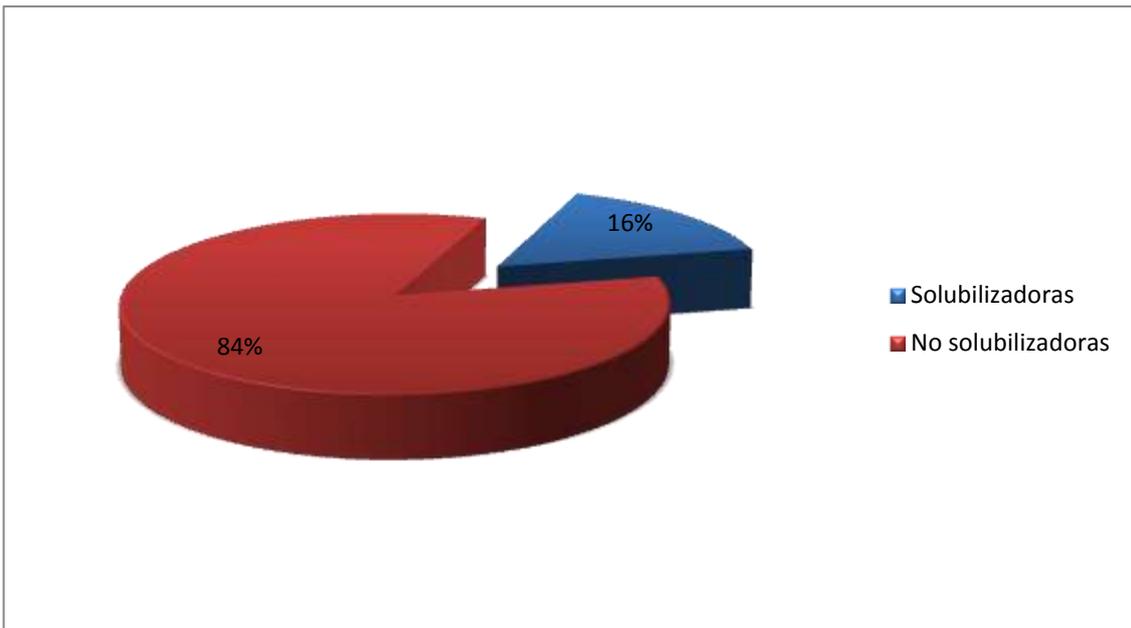


Figura 61. Porcentaje (%) de enterobacterias nativas solubilizadoras de fósforo en Lambayeque, 2013.

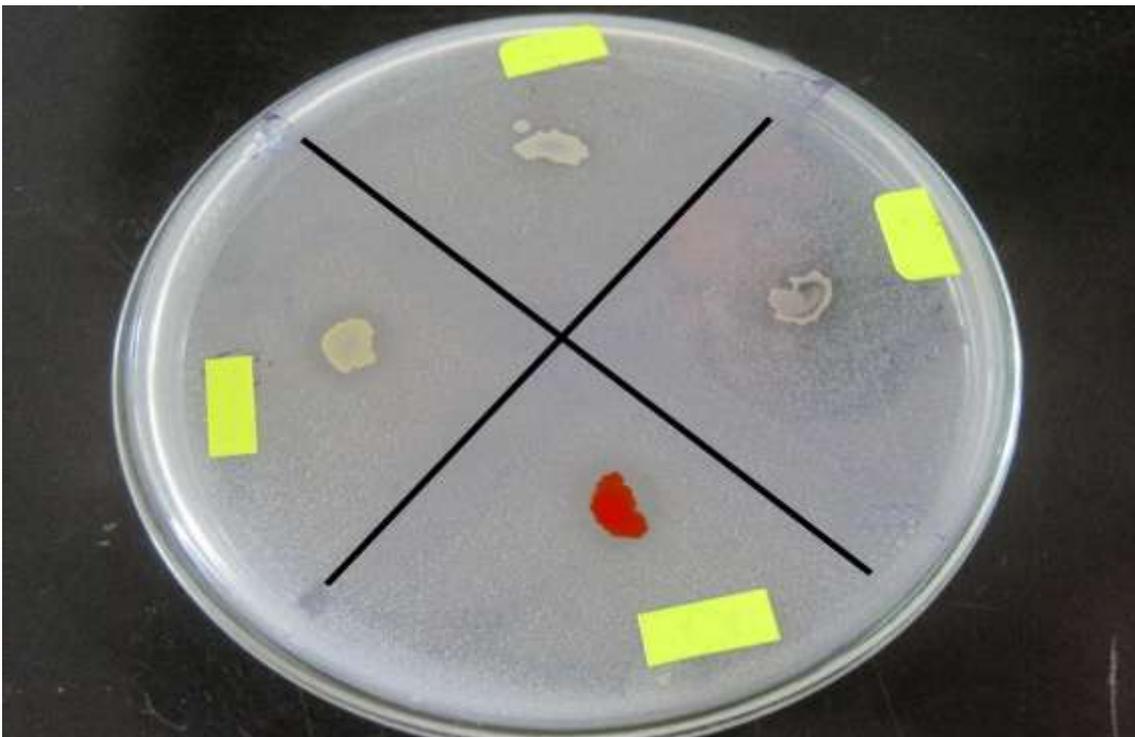


Figura 62. Halos translúcidos alrededor de colonias de enterobacterias nativas solubilizadoras de fósforo en agar SRS.

Tabla 8. Halo (cm) de la solubilización de fósforo por enterobacterias nativas en agar SRSM durante 48 horas

Enterobacterias código UNPRG	Halo (cm)	Enterobacterias código UNPRG	Halo (cm)
<i>Pantoea sp.</i> 16	0,5	<i>Pantoea sp.</i> 18	0,1
<i>Serratia sp.</i> 75	0,5	<i>Pantoea sp.</i> 21	0,1
<i>Pantoea sp.</i> 34	0,4	<i>Pantoea sp.</i> 50	0,1
<i>Kluyvera sp.</i> 62	0,4	<i>Pantoea sp.</i> 55	0,1
<i>Klebsiella sp.</i> 65	0,4	<i>Pantoea sp.</i> 78	0,1
<i>Pantoea sp.</i> 41	0,3	<i>Pantoea sp.</i> 86	0,1
<i>Pantoea sp.</i> 57	0,3	<i>Klebsiella sp.</i> 89	0,1
<i>Pantoea sp.</i> 32	0,2	<i>Pantoea sp.</i> 99	<0,1

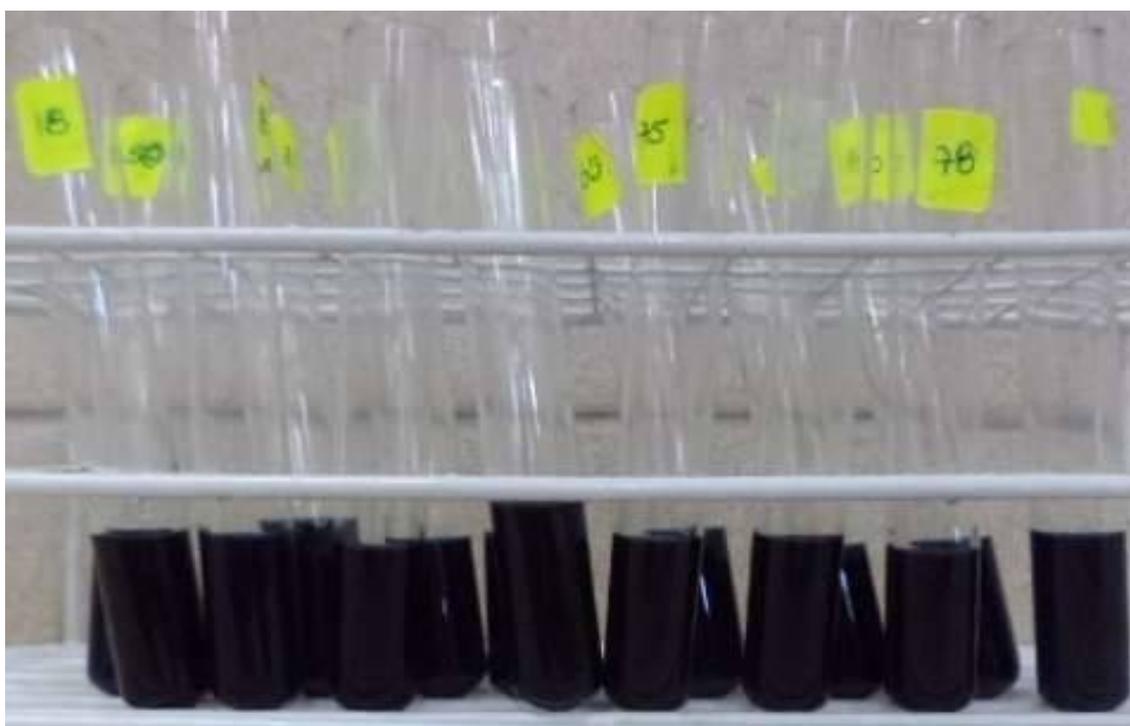


Figura 63. Coloración observada en la cuantificación de fósforo solubilizado por el método colorimétrico del molibdato.

Tabla 9. Fósforo solubilizado (ppm) por enterobacterias nativas en caldo SRSM durante 96 horas

Enterobacterias código UNPRG	Fosforo soluble (ppm)
<i>Klebsiella sp.</i> 89	4,78
<i>Pantoea sp.</i> 86	4,69
<i>Klebsiella sp.</i> 65	4,45
<i>Pantoea sp.</i> 78	4,34
<i>Pantoea sp.</i> 18	4,12
<i>Kluyvera sp.</i> 62	4,09
<i>Pantoea sp.</i> 99	4,06
<i>Pantoea sp.</i> 21	4,01
<i>Pantoea sp.</i> 16	3,98
<i>Pantoea sp.</i> 50	3,98
<i>Serratia sp.</i> 75	3,82
<i>Pantoea sp.</i> 41	3,61
<i>Pantoea sp.</i> 57	3,46
<i>Pantoea sp.</i> 32	3,36
<i>Pantoea sp.</i> 55	2,29
<i>Pantoea sp.</i> 34	1,25



Figura 64. Observación macroscópica de colonia de *Fusarium verticillioides*.



Figura 65. Observación microscópica (400x) de microconidias de *Fusarium verticillioides*.



Figura 66. Observación microscópica (400x) de macroconidia de *Fusarium verticillioides*.

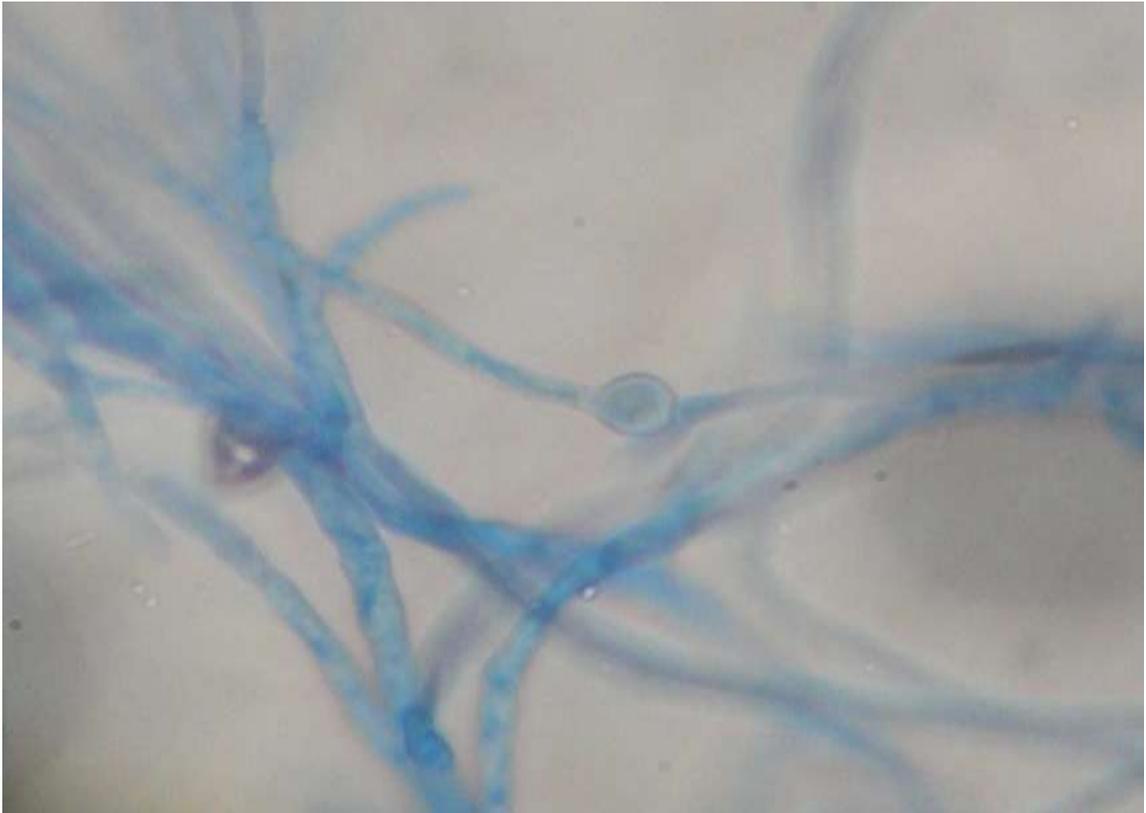


Figura 67. Observación microscópica (400x) de hinchamiento de la hifa de *Fusarium verticillioides*.

El 95 % de los cultivos de enterobacterias nativas inhibieron el desarrollo de las colonias de *Fusarium verticilloides* (Figura 68). La inhibición osciló entre 4,2–83,3% a las 96 horas y 6,3–84,4% después de 120 horas (Figura 69, tabla 10, anexo 8).

4.3 Efecto de enterobacterias nativas en la emergencia y sobrevivencia de maíz amarillo duro

Transcurridos 7 días después de la inoculación bacteriana y la siembra de maíz amarillo duro (Figura 70), el 77% de enterobacterias incrementó la emergencia, alcanzando 80-100%, valores superiores al testigo agua destilada con 50% (Figura 71, tabla 11, anexo 9). Estas bacterias también incrementaron la altura y el vigor de las plantas (Figura 72). Por su parte, el 16% de enterobacterias nativas no afectó la emergencia, alcanzando valores iguales que el testigo agua destilada (Figura 73). Por el contrario, 7% de las bacterias nativas disminuyó la emergencia de maíz, presentando valores entre 30 y 60 % (Figura 74). A su vez, transcurridos 20 días después de la inoculación bacteriana en la rizósfera de las plantas de maíz amarillo duro en todos los tratamientos, ninguna bacteria nativa afectó negativamente la sobrevivencia (Figura 75), alcanzando 100%.

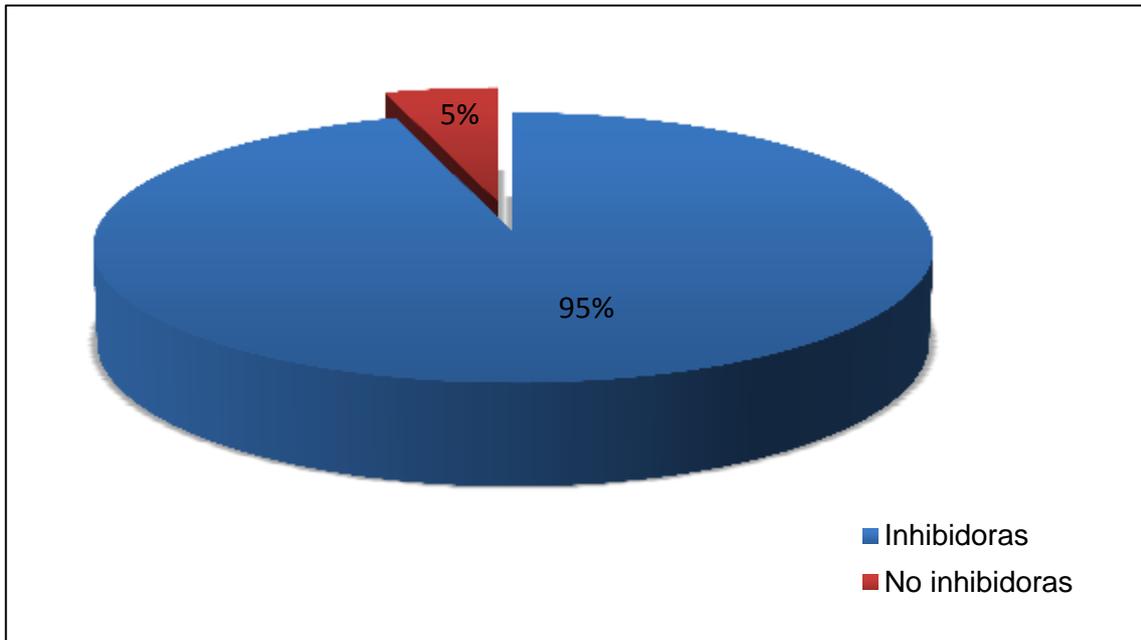


Figura 68. Porcentaje (%) de enterobacterias nativas inhibitorias de *Fusarium verticillioides*.

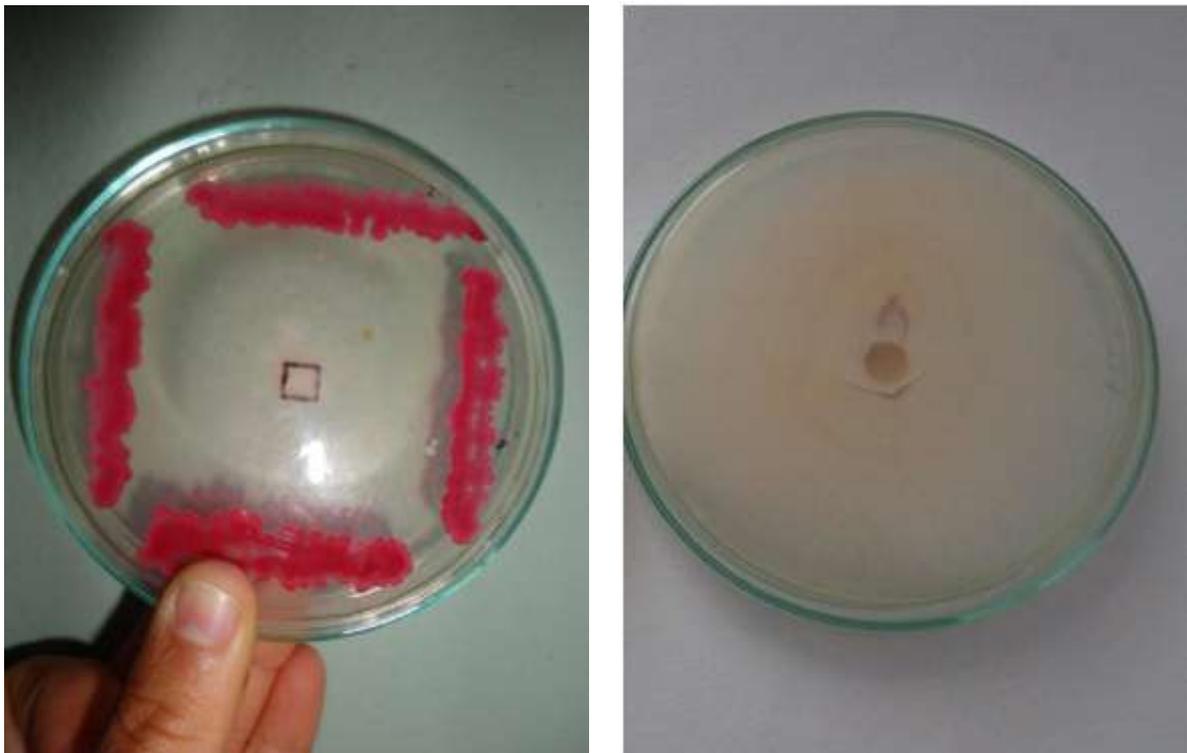


Figura 69. Antagonismo de enterobacterias nativas frente a *Fusarium verticillioides*.

Tabla 10. Rango del porcentaje de inhibición del crecimiento de *Fusarium verticillioides* por enterobacterias nativas

Tiempo (horas)	Rango	
	Radio colonia (cm)	Inhibición (%)
96	2,4 - 0,4	7,7
120	2,9 - 0,4	9,4



Figura 70. Emergencia de *Zea mays* L. “maíz” amarillo duro híbrido 7 días después de la inoculación con enterobacterias nativas en las semillas.

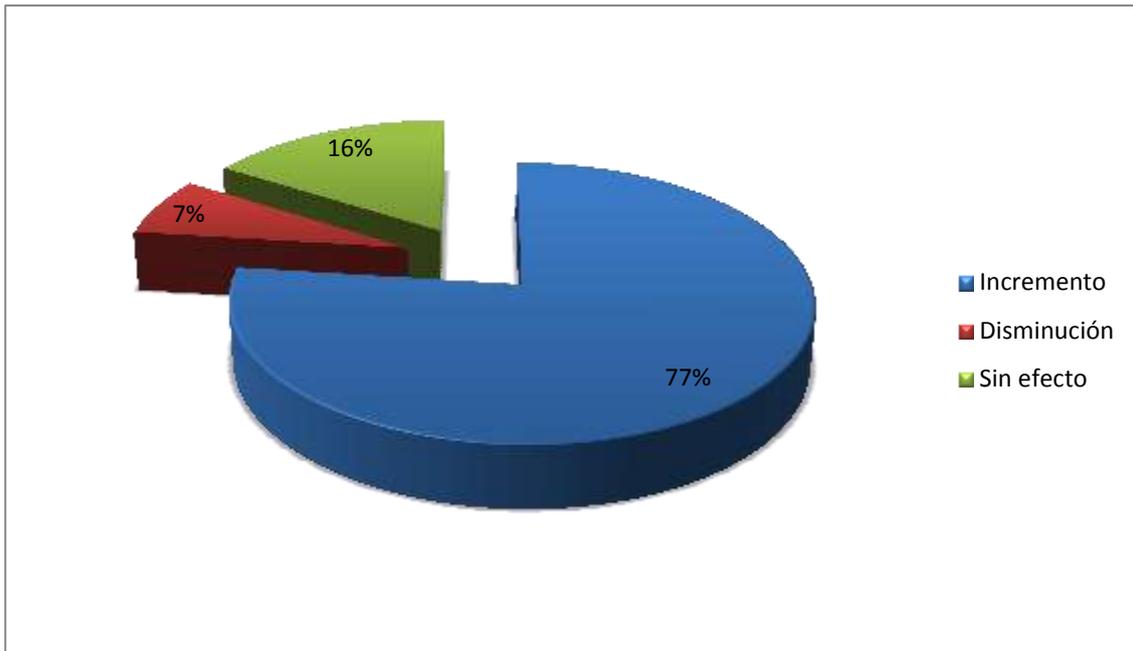


Figura 71. Porcentaje de enterobacterias nativas según el efecto en la emergencia de *Zea mays* L. “maíz” amarillo duro híbrido a los 7 días.



Figura 72. Incremento de la emergencia y vigor de *Zea mays* L. “maíz” amarillo duro inoculado con enterobacterias nativas en las semillas.

Tabla 11. Emergencia de *Zea mays* L. “maíz” amarillo duro simple, 7 días después de la inoculación de enterobacterias nativas en las semillas, 2013.

Tratamientos	Emergencia (%)	Tratamientos	Emergencia (%)
<i>Pantoea</i> sp. 4	100	<i>Kluyvera</i> sp. 98	90
<i>Pantoea</i> sp.6	100	<i>Klebsiella</i> sp. 100	90
<i>Klebsiella</i> sp. 17	100	<i>Pantoea</i> sp. 1	80
<i>Citrobacter</i> sp. 25	100	<i>Pantoea</i> sp. 13	80
<i>Pantoea</i> sp. 27	100	<i>Klebsiella</i> sp. 19	80
<i>Serratia</i> sp. 33	100	<i>Pantoea</i> sp. 21	80
<i>Klebsiella</i> sp. 35	100	<i>Pantoea</i> sp. 26	80
<i>Pantoea</i> sp. 36	100	<i>Citrobacter</i> sp. 28	80
<i>Serratia</i> sp. 43	100	<i>Serratia</i> sp. 30	80
<i>Pantoea</i> sp. 44	100	<i>Pantoea</i> sp. 32	80
<i>Pantoea</i> sp. 45	100	<i>Kluyvera</i> sp. 37	80
<i>Pantoea</i> sp. 47	100	<i>Kluyvera</i> sp. 40	80
<i>Pantoea</i> sp. 51	100	<i>Serratia</i> sp. 46	80
<i>Pantoea</i> sp. 55	100	<i>Pantoea</i> sp. 48	80
<i>Serratia</i> sp. 56	100	<i>Pantoea</i> sp. 49	80
<i>Pantoea</i> sp. 70	100	<i>Pantoea</i> sp. 50	80
<i>Pantoea</i> sp. 63	100	<i>Kluyvera</i> sp.60	80
<i>Pantoea</i> sp. 71	100	<i>Kluyvera</i> sp.69	80
<i>Pantoea</i> sp. 76	100	<i>Pantoea</i> sp. 78	80
<i>Serratia</i> sp. 84	100	<i>Kluyvera</i> sp. 79	80
<i>Pantoea</i> sp. 86	100	<i>Klebsiella</i> sp. 80	80
<i>Pantoea</i> sp. 99	100	<i>Klebsiella</i> sp. 81	80
<i>Klebsiella</i> sp. 5	90	<i>Klebsiella</i> sp. 83	80
<i>Citrobacter</i> sp. 8	90	<i>Klebsiella</i> sp. 85	80
<i>Pantoea</i> sp. 9	90	<i>Klebsiella</i> sp. 89	80
<i>Citrobacter</i> sp. 11	90	Testigo	70
<i>Pantoea</i> sp. 16	90	<i>Kluyvera</i> sp. 7	70
<i>Pantoea</i> sp. 18	90	<i>Pantoea</i> sp. 14	70
<i>Kluyvera</i> sp. 20	90	<i>Klebsiella</i> sp. 15	70
<i>Pantoea</i> sp. 23	90	<i>Kluyverasp.</i> 22	70
<i>Serratia</i> sp. 31	90	<i>Kluyvera</i> sp. 24	70
<i>Pantoea</i> sp. 34	90	<i>Pantoea</i> sp. 29	70
<i>Pantoea</i> sp. 38	90	<i>Pantoea</i> sp. 52	70
<i>Hafnia</i> sp. 39	90	<i>Pantoea</i> sp. 57	70
<i>Pantoea</i> sp. 41	90	<i>Klebsiella</i> sp. 67	70
<i>Kluyvera</i> sp. 42	90	<i>Kluyvera</i> sp. 68	70
<i>Pantoea</i> sp. 53	90	<i>Kluyvera</i> sp. 62	70
<i>Kluyvera</i> sp. 54	90	<i>Klebsiella</i> sp. 74	70
<i>Pantoea</i> sp. 58	90	<i>Pantoea</i> sp. 88	70
<i>Pantoea</i> sp. 3	90	<i>Klebsiella</i> sp. 91	70
<i>Pantoea</i> sp. 61	90	<i>Pantoea</i> sp. 96	70
<i>Serratia</i> sp. 64	90	<i>Pantoea</i> sp. 59	70
<i>Hafnia</i> sp. 66	90	<i>Serratia</i> sp. 93	60
<i>Pantoea</i> sp. 72	90	<i>Pantoea</i> sp. 10	60
<i>Pantoea</i> sp. 77	90	<i>Serratia</i> sp. 75	60
<i>Hafnia</i> sp. 87	90	<i>Kluyvera</i> sp. 82	60
<i>Serratia</i> sp. 90	90	<i>Klebsiella</i> sp. 65	50
<i>Pantoea</i> sp. 92	90	<i>Pantoea</i> sp. 73	40
<i>Kluyvera</i> sp. 2	90	<i>Pantoea</i> sp. 12	30
<i>Pantoea</i> sp. 94	90		
<i>Klebsiella</i> sp. 95	90		
<i>Pantoea</i> sp. 97	90		



Figura 73. Altura y vigor de plantas de *Zea mays* L. “maíz” amarillo duro híbrido inoculadas con enterobacterias en comparación con el testigo.



Figura 74. Disminución de la emergencia de *Zea mays* L. “maíz” amarillo duro inoculado con enterobacteria nativa en las semillas.



Figura 75. Sobrevivencia de *Zea mays* L. “maíz” amarillo duro 20 días después de la inoculación de enterobacterias nativas en la rizósfera.

V. DISCUSIÓN

5.1 *Especies de enterobacterias aisladas e identificadas*

En todas las muestras de suelo rizoférico de maíz se aislaron bacterias que desarrollaron en agar Mac Conkey, donde las sales biliares y el cristal violeta inhibieron a las bacterias Gram positivas y otras Gram negativas no entéricas (Cadena & Martínez, 2011). En este medio de cultivo también forman colonias un grupo de bacterias no fermentadoras, entre las que se han identificado los géneros *Burkholderia* y *Pseudomonas* (Cadena & Martínez, 2011; Dávila & Linares, 2013), *Cupriavidus necator* (Lisboa & Segura, 2010), así como también *Acinetobacter* y *Stenotrophomonas* (Juliet & Fernández, 2006; Salazar de Vegas & Nieves, 2011).

Las bacterias desarrolladas en agar Mac Conkey y que presentaron reacción negativa en la prueba de oxidasa se consideraron enterobacterias, diferenciándose de otras bacterias que también se aíslan en este agar, como *Burkholderia*, *Pseudomonas* y *Cupriavidus* (Lisboa & Segura, 2010; Cadena & Martínez, 2011; Dávila & Linares, 2013), pero que son positivas en la prueba de oxidasa. A su vez, la fermentación de glucosa en agar hierro triple azúcar permitió separar a otras bacterias como *Acinetobacter* que es oxidasa negativa, pero no fermentadora. La familia Enterobacteriaceae agrupa bacilos Gram negativas, no esporulados, que carecen de indofenol oxidasa, oxidan y fermentan glucosa, reducen los nitratos a nitritos y se encuentra ampliamente distribuidas en la naturaleza (Puerta & Mateos, 2010).

Las enterobacterias también han sido aisladas de arroz (Guineth *et al.*, 2000), *Lolium perenne* (Shoebitz, 2006), caña de azúcar (Cordero *et al.*, 2008),

Pinus patula “pino” (Orozco & Martínez, 2009), *Cajanus cajan* (Usha *et al.*, 2011), *Medicago sativa* (Bharucha *et al.*, 2011) y la rizósfera de maíz (Carcaño *et al.*, 2006; Morales *et al.*, 2011, Ogho & Okonkwo, 2012).

Entre las enterobacterias nativas se identificaron seis géneros, que también han sido reportados anteriormente como PGPR, mencionándose *Hafnia* (Díaz *et al.*, 2001); *Klebsiella* (Guineth *et al.*, 2000; Carcaño *et al.*, 2006), *Kluyvera* (Vázquez *et al.*, 2000); *Pantoea* (Shoebitz, 2006, Cordero *et al.*, 2008); *Serratia* (Guineth *et al.*, 2000; Zeinat *et al.*, 2010) y *Citrobacter* (Mrkovački & Bjelić, 2011). Entre las bacterias que desarrollaron en Mac Conkey como no fermentadoras y con reacción negativa en la prueba de oxidasa se identificaron *Acinetobacter* y *Stenotrophomonas* coincidiendo con Juliet & Fernández (2006) y Salazar de Vegas & Nieves (2011).

5.2 Potencial biológico de enterobacterias nativas

Las enterobacterias nativas presentaron actividad proteolítica que se evidenció en agar leche, donde la caseína es la principal proteína y se presenta como una solución coloidal responsable del color blanco y opacidad. Cuando las bacterias sintetizan caseinasa, hidrolizan la proteína, produciendo derivados solubles y cristalizables que permiten el paso de la luz, observándose halos transparentes Ríos y Zúñiga (2012). También se detectó actividad quitinolítica debido a que las bacterias desarrollaron en agar quitina. El homopolímero está formado por residuos de N-acetil-D-glucosamina con enlaces β , 1-4 y es hidrolizado por el complejo quitinasa cuando es utilizado como fuente de carbono. La actividad enzimática proteolítica permite la utilización de fuentes proteicas que no son asimilables por su gran tamaño, favoreciendo la multiplicación bacteriana en la rizósfera. A su vez según Da Silva *et al.* (2008), la actividad quitinolítica constituye un mecanismo de biocontrol de hongos fitopatógenos, porque su pared celular está constituida mayoritariamente de polisacáridos como la quitina y glucanos. Por su parte Ogho & Okonkwo(2012), observaron efecto hidrolítico de celulasas y pectinasas en *Enterobacter* sp., sugiriendo que la actividad enzimática de las rizobacterias les facilita la colonización de las plantas hospedantes.

El 97 % de los cultivos sintetizó ácido indol acético. Se coincide con Guineth *et al.* (2000), Carcaño *et al.* (2006), Shoebitz (2006), Koo & Kjung (2009), Shoebitz *et al.* (2009), Usha *et al.* (2011) y Ogho & Okonkwo (2012), quienes también demostraron la síntesis de este regulador de crecimiento vegetal en *Klebsiella*, *Serratia* y *Kluyvera*. Para la cuantificación de AIA se utilizó caldo suplementado con triptófano porque este aminoácido es el precursor del AIA (Aguilar *et al.*, 2008). El AIA se cuantificó mediante la reacción colorimétrica de Salkowski, en la que la presencia del indol es directamente proporcional a la intensidad del color rosella observado y a su vez es el resultado de una reacción oxidativa en acidez, donde por una transaminación un grupo amonio del indol es sustituido por el cloro del cloruro férrico (Mantilla, 2007).

Con un cultivo nativo de *Klebsiella* sp. se cuantificó hasta 57,50 ppm de AIA, valor superior a 15,2 y 42, 33 ppm reportados por Guineth *et al.* (2000) y Carcaño *et al.* (2006) para *Klebsiella* spp. aisladas de arroz y teocintle, un ancestro del maíz, respectivamente. Asimismo, es superior a 38 ppm de AIA mencionado por Koo & Kjung (2009) para *Serratia pymathica* aislada de la maleza *Echinochloa crus-galli*. En el presente estudio a los géneros *Serratia*, *Kluyvera* y *Pantoea* les correspondieron en su mayoría las concentraciones más altas de AIA, corroborando su capacidad de síntesis de AIA, demostrada también por Shoebitz (2006) y Martínez *et al.* (2010). No se han encontrado reportes de *Hafnia* y *Citrobacter* como productoras de AIA; no obstante, en la presente investigación estas bacterias demostraron síntesis de AIA.

El 97 % de las enterobacterias nativas fijó nitrógeno, capacidad por la que se consideran diazótrofes o bacterias que a través del complejo enzimático nitrogenasa reducen una molécula de nitrógeno en dos de amoníaco (NH₃), que rápidamente se ioniza hasta amonio, fácilmente asimilable por la planta (Coyne, 2000) . En el medio Nfb, sin nitrógeno y con ácido málico como fuente de carbono se detectaron las bacterias fijadoras de nitrógeno, porque formaron una película blanquecina bajo la superficie. Al respecto, Franco (2008) manifestó que la consistencia semisólida del medio Nfb permite 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 mantienen las

condiciones de microaerofilia requeridas para actividad de la nitrogenasa. A su vez, también se puede observar en algunos casos el viraje del indicador, debido a la alcalización por la actividad metabólica de la película, con utilización del ácido málico y transformación en malato (Mantilla, 2007). El amonio producto de la fijación de nitrógeno se cuantificó por el método Bertelot, basado en la aparición del azul de indofenol, producto de la reacción de ion amonio con los compuestos fenólicos en presencia del agente hipoclorito de sodio y el catalizador ferrosianato de potasio (Lara *et al.*, 2007)

Los mayores valores en las concentraciones de amonio correspondieron a *Pantoea spp.* denotando su importancia como diazótrofas. Se coincide con Shoebitz (2006) quién mediante la técnica de reducción de acetileno investigó la fijación de nitrógeno en bacterias aisladas de *Lolium perenne* L. y determinó que el 14,2 % identificado como *Pantoea agglomerans* alcanzó los mayores valores, con más de 2500 nmol C₂H₄ mL⁻¹ día⁻¹, superando ampliamente a las otras bacterias que fijaron entre 1,69 y 4,72 nmol C₂H₄ mL⁻¹ día⁻¹. A su vez, en la literatura científica se encuentran reportes de otras enterobacterias fijadoras de nitrógeno, destacando *Klebsiella* (Guineth *et al.*, 2000; Carcaño *et al.*, 2006; Orozco & Martínez, 2009), *Enterobacter asburiae* (Ogho & Okonkowo, 2012), *E. ludwigii* (Shoebitz *et al.*, 2009). Algunas de estas bacterias inclusive superan a la diazótrofa *Azospirillum*, habiéndose reportado que la actividad nitrógena de *Klebsiella* *sp.* aislada de maíz alcanzó 122,46 nmol C₂H₄ mL⁻¹ día⁻¹, diferenciándose significativamente de *Azospirillum spp.* nativas con 70,08 nmol C₂H₄ mL⁻¹ día⁻¹ (Carcaño *et al.*, 2006).

El 16 % de las enterobacterias nativas solubilizó fosfato dicálcico, actividad evidenciada en agar SRSM. Los medios de cultivo sólidos y líquidos que contienen fosfato insoluble en solución son adecuados para el aislamiento y detección de microorganismos solubilizadores de fósforo. En medios sólidos la positividad está dada por el viraje del indicador al amarillo y la presencia de una zona clara alrededor de las colonias (Vásquez *et al.*, 2000; Cordero *et al.*, 2008; Carreño, 2009). El principal mecanismo involucrado en la solubilización de fosfatos está relacionado con la síntesis de ácidos orgánicos que producen la acidificación de la célula y su ambiente. Entre los ácidos se mencionan el glucónico, 2-cetoglucónico, láctico, isovalérico, isobutírico, acético, fórmico,

succínico y propiónico (Da Silva & Nahas, 2008; Kaviyarasi & Ambikapathy, 2011). Otros mecanismos alternativos son la liberación de protones, la producción de sustancias quelantes y ácidos sulfúrico, nítrico y carbónico. En cualquier caso los fosfatos se solubilizan y se observan las zonas claras (Kaviyarasi & Ambikapathy, 2011; Balakrishna *et al.*, 2012).

Para cuantificar el fósforo solubilizado se utilizó el método colorimétrico de molibdato, donde en solución ácida los iones ortofosfato, producto de la solubilización del fosfato di o tricálcico, reaccionan con los iones molibdato formando ácido molidobfosfórico. Éste reducido en presencia de ácido ascórbico, forma el azul de fosfomolibdeno que presenta una coloración azul, susceptible de una determinación colorimétrica y su aparición es acelerada con el catalizador hemético tartrato doble de antimonio y potasio (Rodier & Rodi, 2005; Bobadilla & Rincón, 2008). Con *Pantoea* spp. nativas se alcanzó el mayor valor en el halo de solubilización de fosfato y concentración de fósforo solubilizado.

Cordero *et al.* (2008) informaron que *Pantoea* sp. 9C, una bacteria endofítica fijadora de nitrógeno aislada del interior de tallos de caña de azúcar, formó halos de solubilización con diámetros de hasta 6 mm en medio sólido NBRI-P y en el mismo medio líquido solubilizó fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)$ hasta acumular 112,8 ppm después de 7 días a 30°C. Por su parte, también se ha demostrado la solubilización de fosfatos en *Enterobacter* y *Kluyvera* (Vázquez *et al.*, 2000), *Enterobacter ludwigii* (Shoebitz *et al.*, 2009) y *Enterobacter* sp. (Usha *et al.*, 2011).

A partir de muestras de tallos y granos de maíz se aislaron hongos filamentosos y en el 70 % de los aislados de granos se identificó *Fusarium moniliforme*, sin *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg Tel. *Gibberella fujifuroi* (Sawada) Wollenweber. Este hongo es reconocido como fitopatógeno de una variedad de cultivos agrícolas y es el parásito mayoritario de gramíneas, particularmente en las regiones tropicales y subtropicales. Causa quemado de las plántulas, pudrición del tallo y frutos y se puede aislar de semillas (García & Martínez, 2010) y de raíces y tallos infectados (Figueroa *et al.*, 2010). Según Mendoza *et al.* (2006) las pudriciones de tallo en el maíz son causadas por dos

géneros de hongos: *Gibberella* y *Fusarium*. *F. verticillioides* coloniza el maíz durante todo el ciclo vegetativo, incluyendo raíz, tallo, mazorca y semillas; sin embargo, la infección es asintomática y el hongo es transmitido por las semillas a las plántulas, pudiendo o no desarrollarse una infección sistémica.

El 95 % de las enterobacterias nativas presentó efecto antagónico a *F. verticillioides*. De igual manera, se ha reportado efecto antagónico de *Pantoea agglomerans* frente al fitopatógeno *Monilia* sp. (Shoebitz, 2006) y *Enterobacter ludwigii* frente a *F. solani* (Shoebitz *et al.*, 2009). Por su parte, Carcaño *et al.* (2006) concluyeron que aunque las enterobacterias como *Klebsiella* spp. no son agentes de control biológico, pueden considerarse como rizocompetentes, capaces de multiplicarse para originar grandes poblaciones, por lo que podrían desplazar a los fitopatógenos y reducir la severidad de la enfermedad, así como también mejorar el crecimiento de las plantas.

El efecto de las bacterias en la emergencia de maíz fue diferente, observándose incremento, disminución y ningún efecto, respecto al testigo, coincidiendo con Berachochea (2011) y Farro & Graus (2013). El efecto diferencial, en maíz también fue observado con la inoculación de otras bacterias Gram negativas como *Azospirillum* (Casos & Santiago, 2013) *Pseudomonas* (Cadena & Martínez, 2011) y con las Gram positivas, *Bacillus* (Perleche & Rentería, 2013) y actinomicetos (Infante & Zurita, 2013).

El 77% de las bacterias nativas incrementaron la emergencia de maíz resultado explicado por la activación de procesos metabólicos en las semillas, producto de la secreción bacteriana de sustancias estimuladoras como las girebelinas, encargadas de activar la síntesis de enzimas hidrolíticas en el endospermo (Torres *et al.*, 2013). En este contexto, las α amilasas promueven la germinación, porque incrementan la disponibilidad del almidón (Bharathi *et al.*, 2004).

En semillas de maíz García *et al.* (2004) observaron efecto estimulador de filtrados de cultivos libres de células de *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense* y *Azotobacter beijerinckii*, tal que la germinación se inició a los 5-6 días con los filtrados, así como también con 50 ppm de AIA, en comparación con 7-8 días en el testigo de agua destilada. Asimismo, Idris *et al.* (2004) observaron

elongación en los coleópteros de maíz con filtrados de cultivos de *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis*, comparable con el efecto de $10^{-6} - 10^{-7}$ mol L⁻¹ de AIA; sin embargo, las bacterias sintetizaron $10^{-8} - 10^{-9}$ mol L⁻¹, concluyéndose que el incremento fue resultado de más de una sustancia promotora del crecimiento.

El 7% de las rizobacterias disminuyó la emergencia de maíz. Al respecto, Stefan *et al.* (2008) demostraron que en semillas de soya, la actividad de las enzimas aspartato y alanina amino – transferasa, requeridas para la utilización de las proteínas como fuentes de carbono y nitrógeno en la germinación, fue mayor a las 120 horas en las semillas no inoculadas, sugiriéndose que debido a la competencia por nutrientes entre semillas y bacterias, la germinación disminuye. Por su parte, Beracochea (2011) determinó que durante la germinación, semillas de maíz aplicadas con inóculos bacterianos sin diluir (10^7 ufc mL⁻¹), en promedio, presentaron radículas de menor longitud (2,48 cm) que aquellas con inóculos diluidos (10^3 ufc mL⁻¹), en las que se alcanzó 3,10 cm; sin embargo, *Enterobactersp.*, *Pantoea agglomerans* y *Herbaspirillum frisingense* disminuyeron significativamente la longitud, independiente de la concentración celular del inóculo.

El efecto negativo de la PGPR ha sido reportado también en las características vegetativas. De esta manera, Rico (2009) demostró que los metabolitos volátiles de *Azotobacter spp.* disminuyeron el peso fresco de plántulas de lechuga; no obstante, estos compuestos sintetizados por actinomicetos, incrementaron 35% el peso fresco. Al respecto, Persello *et al.* (2003) y Rico (2009) concluyeron que demasiado AIA, puede afectar negativamente el desarrollo de las raíces laterales, debido a que las plantas carecen de un sistema regulador que mantenga los niveles de AIA fisiológicamente apropiados en sus tejidos, tal que este compuesto bacteriano exógeno, podría anular la síntesis de otros metabolitos de la ruta, inhibiendo el desarrollo de la planta. Barazani & Friedman (1999), demostraron que 195 µM de ácido indolacético redujo el crecimiento radical de semillas de lechuga, mientras que 51 µM lo promovieron.

El 16% de las bacterias nativas no afectó la emergencia de maíz. Al respecto, Díaz *et al.* (2001), concluyeron que el efecto de las PGPR no es evidente, cuando no encuentran el hábitat adecuado y no se asocian con la rizósfera para escapar de los mecanismos de defensa de la planta y encontrar las condiciones nutritivas para su establecimiento y crecimiento. También es posible, que las bacterias pierdan viabilidad por el efecto inhibitorio de las semillas, tal como se demostró con extractos solubles de maíz que durante la germinación disminuyeron la multiplicación y establecimiento de *Burkholderia cepacia* (Velázquez *et al.*, 1999)

Las especies de enterobacterias que presentaron actividad proteolítica, quitinolítica, sintetizaron ácido indolacético, fijaron nitrógeno, solubilizaron fósforo e incrementaron la emergencia de maíz son consideradas bacterias promotoras del crecimiento de las plantas, por lo que se debe determinar su efecto en maíz, en condiciones de invernadero y posteriormente en campo, como requerimiento para obtención de un bioinoculante comercial

VI.CONCLUSIONES

- ✓ En el 100 % de muestras de rizósfera de maíz se identificaron seis géneros de enterobacterias correspondientes a *Pantoea* (49%), *Klebsiella* (17%), *Kluyvera* (16%), *Serratia* (11%), *Citrobacter* (4%) y *Hafnia* (3%).
- ✓ Con las enterobacterias nativas se cuantificó hasta 31,67 ppm de nitrógeno fijado como amonio; 54,25 ppm de ácido indol acético y 4,78 ppm de fósforo solubilizado, así como también se detectó actividad proteolítica, quitinolítica y antagónica a *Fusarium verticillioides*.
- ✓ El 77% de enterobacterias nativas aumentó la emergencia de maíz amarillo duro híbrido simple, 16% no le afectó y 7% la disminuyó. Así vez, ninguna enterobacteria afectó negativamente la sobrevivencia de plantas de maíz.

VII. RECOMENDACIONES

- ✓ Caracterizar a nivel molecular las especies nativas de enterobacterias.
- ✓ Determinar el efecto de enterobacterias nativas en el desarrollo vegetativo y rendimiento de maíz en condiciones de campo.
- ✓ Investigar sustratos económicos y disponibles en la Región Lambayeque para el incremento masivo de enterobacterias nativas caracterizadas como promotoras del crecimiento de plantas.
- ✓ Difundir el uso de las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas en la fertilización de cultivos agrícolas.

VIII.RESUMEN

El presente trabajo de investigación se desarrolló con el objetivo de determinar el potencial como promotoras del crecimiento de plantas de enterobacterias aisladas de la rizósfera de *Zea mays* L. “maíz” en Lambayeque, como una alternativa para la disminución del uso de los fertilizantes químicos. Las bacterias se aislaron de la rizósfera de maíz procedentes de campos agrícolas de los distritos de Monsefú (6° 52'30" de latitud sur y 79° 52'09" longitud oeste) y Reque (6°52'00" latitud sur y 79°49'27" longitud oeste), Region Lambayeque. Se realizó una dilución en solución salina esterilizada: NaCl 0,85%, p/v y se sembró en agar Mac Conkey, incubando a 30 °C por 48 horas. Se obtuvieron 269 cultivos puros de bacterias, entre las 100% que fueron identificado como enterobacterias de los géneros *Pantoea* (49%), *Klebsiella* (17%), *Kluyvera* (16%), *Serratia* (11%), *Citrobacter* (4%) y *Hafnia* (3%). Con las enterobacterias nativas se cuantificó hasta 31,67 ppm de nitrógeno fijado como amonio; 54,25 ppm de ácido indol acético y 4,78 ppm de fósforo solubilizado, así como también se determinó actividad proteolítica, quitinolítica y antagónica a *Fusarium verticillioides*. El 77% de enterobacterias nativas aumento la emergencia de maíz amarillo duro híbrido simple, 16% no le afecto y 7% la disminuyó. Así vez, ninguna enterobacteria afectó negativamente la sobrevivencia de plantas de maíz. Se demostró la posibilidad de utilizar enterobacterias nativas como promotoras del crecimiento de plantas de maíz.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adesemoye, A., Torbert, H. & Kloepper, J. (2009). Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbial Ecology*, 58, 921-929
- Aguado, A. & Moreno, B. (2008). *Biofertilizantes bacterianos desarrollados por INIFAP*. En Aguado, A, Introducción al uso y manejo de fertilizantes en agricultura. INIFAP/SAGARPA. (pp. 151-170). Guanajuato, Mexico.
- Aguilar, J., Xiqui, M., García, S. & Baca, E. (2008). Producción del ácido indol-3 acético en *Azospirillum*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50 (1, 2), 29-37
- Alvitres V. (2000). *Método Científico. Planificación de la investigación*. 2da ed. Lambayeque: Editorial Ciencia.
- Balakrishna, G. et al. (2012). *Isolation of phosphate solubilizing actinomycetes from forest soils of Mahabubnagar district*. *IOSR Journal of Pharmacy*, 2(2): 271-275.
- Bashan, Y., Holguin, G. & Ferrera, R. (1996). Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. *Terra*, 14(2), 159-194.
- Barazani, O. & Friedman, J. (1999). Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria?. *Journal of Chemical Ecology*, 25, 2397-2406.
- Barnett, H. & Hunter, B. (1999). *Illustrated General of Imperfect Fungi*. EE.UU: Burgues Publishing.

- Bhattacharyya, P. & Jha, D. (2012). Plant growth – promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agricultura. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 28, 1327 – 1350.
- Bharathi, R., Vivekananthan, R., Harrish, S., Ramanathan, A. & Samiyappan, R. (2004). Rhizobacteria – based bioformulations for the management of fruit rot infection in chillies. *Corp Protection*, 23, 835-843
- Bharucha, U.D., Prajapati, V.S., Patel, K.C. & Trivedi.(2011). Catecholate type of siderophore production by *Enterobacter sp.*UB4 Isolated from Rhizopheric soil of Alfalfa Plant.*Journal of Cell and Tissue Research*, 11(3) 2967-2971.
- Beracochea, M. (2011). *Respuesta de variedades comerciales de maíz(Zea mays L.) a la inoculación con bacterias endófitas-diazótrofas nativas*. Tesis de Licenciatura. Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay.
- Bergey, J., Hendricks, D. & Holt, J. (2000).*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.9a ed. Philadelphia, EEUU: Editorial Lippincott, Williams & Wilkins.
- Bobadilla, C. & Rincón, C. (2008). Aislamiento y evaluación de fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenidos de residuos de plaza. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana.
- Brenner D., N, Krieg y Staley J. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria*. 2(2). USA: Springer.

- 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.
- Carcaño, M., Ferrera, R., Pérez, Jesús., Molina, J., Bashan, Y. (2006). Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle. *TERRA Latinoamericana*, 24 (4), 493-502.
- Carreño, C. (2009). Efecto de la inoculación de bacterias nativas solubilizadoras de fósforo en el desarrollo y rendimiento de tres cultivos agrícolas en Mochumí, Lambayeque, Perú. Tesis de Doctorado. Trujillo, Perú: Universidad Nacional de Trujillo.
- Carreño, C. & Muñoz, V. (2012). *Manual de Prácticas de Microbiología Industrial*. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque, Perú.
- 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.
- Cordero, J., Ortega, P. & Ortega, E. (2008). La inoculación de plantas con *Pantoea* sp., bacteria solubilizadora de fosfatos, incrementa la concentración de P en los tejidos foliares. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10 (1), 111 – 121.
- Coyne, M. (2000). *Microbiología del suelo: Un enfoque exploratorio*. España: Editorial Paraninfo.

- Da Silva, P. & Nahas, E. (2008), Bacterial diversity in soil in response to different plants, phosphate fertilizers and liming. *Brasílian Journal of Microbiology*, 33,304 – 310
- Da Silva, C., Fermino, A. & Da Silva, M. (2008). Caracterizacáo de estreptomicetos com potencial e biocontrole. *Scientia Agrícola*, 65(1), 50-55.
- Dávila, J. & Linares, V. (2013). *Especies de Burkholderia y Pseudomonas aisladas de la rizósfera de Jatropha curcas L. pinón blanco y su potencial como promotoras del crecimiento de plantas en Lambayeque, 2012*. Tesis de Licenciatura. Lambayeque, Perú: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2013.
- Delgado, D. & Ramos, L. (2009). *Temperatura y pH en la producción de pectinasas por Aspergillus niger nativo en bagazo de caña de azúcar (Saccharum officinarum) con cáscara de naranja (Citrus sinensis)*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Díaz, P., Ferrera, R., Almaraz, J. & Alcántara, J. (2001). Inoculación de bacterias promotoras del crecimiento en lechuga. *Terra*, 19(4), 327-335.
- Farro, O. & Graus, R. (2013). *Potencial promotor del crecimiento de plantas de las especies de enterobacterias aisladas de raíces de malezas asociadas a Zea mays L. "maíz" en Lambayeque, 2013*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Franco, M. (2008). *Evaluación de caracteres PGPR en Actinomicetos e Interacciones de esta Rizobacterias con hongos Formadores de Micorrizas*. Tesis doctoral. Universidad de Granada, España.

- Fernández, O. & Vega, L. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integral de Plagas*, (62), 96- 100.
- Figueroa, M., Rodríguez, R., Guerrero, B., González, M. & Pons, J. (2010). Caracterización de especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición de raíz de maíz en Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28(2).
- García, M., Farias, R., Peña, j. & Sanchez, J. (2004). Inoculación del trigo var. Pavon con *Azospirillum* spp. Y *Azotobacter beijerinckii*. *Terra latinoamericana*, 23(1), 65-72.
- García, J., Mendoza, A. & Mayek, N. (2012). Efecto de *Azospirillum brasilense* en el rendimiento del maíz en el norte de Tamaulipas, México. *Universidad y Ciencia*, 28(1), 79-84.
- García, F. & Muñoz, H. (2010). *Caracterización de cepas nativas de Azospirillum spp. y su efecto como promotor del desarrollo vegetativo de arroz (Oryza sativa)*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- García, G. & Martínez, R. (2010). Especies de *Fusarium* en granos de maíz recién cosechados y desgranados en el campo en la región de Ciudad cerdan, Puebla. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, (81): 15 – 20.
- Guineth, T.; Valencia–Plata, S.; Bernal-Castillo, J.; Martinez-Nieto, P. (2000). Insolation of Enterobacteria, *Azotobacter* sp. And *Pseudomonas* sp., Producers of Indole-3-Acid and Siderophores, from Colombian Rice Rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42, 171-176.
- Hernández, R., Fernández, C. & Baptista, P. (2003). *Metodología de la Investigación*. México: Mc Graw Hill Interamericana Editores S.A.

- Infante, S. & Zurita, D. (2013). *Potencial como promotoras del crecimiento de plantas de las especies de Actinomicetos aisladas de la rizósfera de malezas asociadas a Zea mays L. "maíz" en Lambayeque, 2013*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Idriss, E., Iglesias, D., Talon, M. & Borriss, R. (2004). Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular Plant-Microbe Interactions (MPMI)*, 20(6), 619-626.
- Juliet, C., & Fernández, A. (2006). *Stenotrophomonas maltophilia*. *Revista chilena de infectología*, 23(3), 247-248.
- Kaviyarasi, A. & Ambikapathy, V. (2011). Isolation, identification and molecular characterization of phosphate solubilizing actinomycetes isolated from the coastal region of Manora, Thanjavur (Dt.). *Asian Journal of Pharmacy and Technology*; 1(4): 119-122.
- Kloepper, J. (2003). A review of mechanisms for plant growth promotion by PGPR. 6 th Internacional PGPR workshop. 6-10 october. Calicut, India.
- Koo, S. & Kyung, S. (2009). Isolation and Characterization of a Plant Growth-Promoting Rhizobacterium, *Serratia sp.SY5*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(11), 1431–1438.
- Lara, C., Villalba, M. & Oviedo, L. (2007). Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno en la zona agrícola de San Carlos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(2), 6-14.
- Lisboa, C. & Segura, S. (2010). Rendimiento de polihidroxicanoatos de cepas de *Cupriavidus necator* aisladas de rizósfera de *Zea mays* "maíz" en Reque, Lambayeque. Tesis de Licenciatura. Lambayeque, Perú: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2010.

- 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.
- Mendoza, E., Andrio, E., López, B., Rodríguez, T., Moreno, L., Rodríguez, H. (2006). Tasa de infección de pudrición de tallo en maíz causada por *Fusarium moniliforme*. *Agronomía Mesoamericana*. 17:19-24
- Ministerio de Agricultura, MINAG. (2012). Estadística Agraria Mensual. Sistema Integrado de Estadística Agraria, SIEA, Lima, Perú.
- Morales, Y., Juárez, D., Aragón, C., Mascarua, M., Bustillos, M., Fuentes, L., Martínez, R. & Muñoz, J. (2011). Growth response of maize plantlets inoculated with *Enterobacter spp.*, as a model for alternative agriculture. *Revista Argentina de Microbiología*, (43), 287-293.
- Mrkovački, N & Bjelić, D. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and their effect on maize. *Field and Vegetable CropsResearch*, 48(2): 305-312.
- Municipalidad Distrital de Monsefú. (2013). Recuperado de <http://munimonsefu.gob.pe/>
- Municipalidad Distrital de Reque (2013). Recuperado de http://www.peru.gob.pe/Nuevo_Portal_Municipal/portales/Municipalidades/1244/entidad/pm_municipalidad.asp.
- Nicolalde, A. & Quintana, D. (2010). Utilización de bacterias fijadoras de nitrógeno (*Azotobacter*) y solubilizadoras de fósforo en el cultivo de brócoli (*Brassica oleraceae* var. *Legacy*) en Otavalo. Universidad Técnica del Norte. Ecuador.

- Orozco, C. & Martínez, P. (2009). Evaluación de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno asimbióticos aislados de la rizósfera de *Pinus patula* en Colombia. *Bosque (Valdivia)*, 30 (2), 70 – 77.
- Ogho, F. & Okokwo, J. (2012). Some Characteristics of a plant growth promoting *Enterobacter* sp. isolated from roots of maize. *Advances in Microbiology*, 2, 368-374.
- Perleche, C. & Renteria, M. (2013). *Determinación del potencial como promotoras del crecimiento de plantas de las especies de Bacillus aisladas de la rizósfera de malezas asociadas a Zea mays L. “maíz” en Lambayeque, 2013*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Persello, F., Nussaume, L. & Robaglia, C. (2003). Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant, Cell and Environment*, 26, 189-199.
- Puerta A. & Mateos F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, 10(50), 3426-3431.
- Rico, M. (2009). *Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género Azotobacter y Actinomicetos aislados de cultivos de Solanum tuberosum Linnaeus, 1753 (papa) cultivados en zonas altoandinas del Perú*. Tesis de Biólogo. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Ríos, P. & Zúñiga, L. (2012). *Bacillus spp. aisladas de rizósfera de Lycopersicon esculentum Mill. “tomate” en Lambayeque y su potencial coimo promotoras del crecimiento de plantas*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.

- Rodier, J. & Rodi, L. (2005). *Análisis de Aguas*. España: Ediciones Omega.
- Salazar de Vegas, E., & Nieves, B. (2011). Acinetobacterspp.: Aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(2), 64-71.
- Shoebitz, M. (2006). *Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de Lolium perenne L. de suelo volcánico (modelo género Azospirillum spp.)*. Tesis de pregrado. Universidad Austral de Chile.
- Shoebitz, M. et al. (2009). Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*; 41: 1768-1774.
- Solano, A., De León, C., Valdovinos, G., Silva, H. & Soto, L. (2011). La pigmentación de *Fusarium verticillioides* (sacc.) como factor de virulencia en plántulas de maíz. *Agronomía Mesoamericana*. 22(2).
- Stefan, M., Mihasan, M. & Dunca, S. (2008). Plant growth promoting rhizobacteria can inhibit the in vitro germination of *Glycine max* L. seeds. *Analele stinifice ale Universitatti Alexandra Joan Cuza. Sectiummen Gentica Biologie Moleculari*.
- Torres, R., Perez, C. & Suárez, N. (2013) influencia de la inoculación de rizobacterias sobre la germinación de semillas de frejol común (*Phaseolus vulgarid* L.). *Centro Agricola*, 30(2), 56-60
- Vazquez, P., Holguin, G., Puente, M., López, A. & Bashan, Y. (2000). Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils*, 30(1), 400-408.

- Velásquez, M., Ventura, E., Hernández, A., Aguilar, S., & Hernández, A. N. (1999). Estudio de la interacción de maíz – Burkholderia (*Pseudomonas*) cepacia. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 41, 17-23.
- Usha, M., Arundhati, R., & Reddy, G. (2011). *Bacillus cereus* and *Enterobacter cancerogenus* screened for their efficient plant growth promoting traits rhizobacteria (PGPR) and antagonistic traits among sixteen bacterial isolates from rhizospheric soils of Pigeon Pea. *African Journal of Microbiology Research*. 5(15), 2090-2094.
- Zeinat. K., Nagwa, M., El Sayed, S. & Abd, G., Optimization of microbial biomass production as biocontrol agent against root knot nematode on faba plants. (2010). *Journal of American Science*, 6(6).

ANEXOS

ANEXO 1

Cálculo del número de muestras para el aislamiento de enterobacterias (en Alvitres, 2000)

$$n = \frac{Z^2 (p \cdot q)}{t^2}$$

Donde:

n = Tamaño de muestra

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

P = Tasa de prevalencia (0,90); presencia de enterobacterias en rizósfera de maíz

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

t = Error permitido (0,08)

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

$$n = 54$$

ANEXO 2

Medios de cultivo para el aislamiento, y mantenimiento de enterobacterias (en cadena & Martínez, 2012)

a. Agar Mac Conkey

Componentes	g/L
Peptona de caseína	10,0
Peptona de carne	10,0
Agar agar	12,0
Fosfato de hidrógeno dipotásico	1,5
Sulfato de magnesio	1,5
Agua destilada	1,000 mL

b. Agar tripticasa soya (TSA)

Componentes	g/L
Triptona	15,0
Peptona	5,0
Extracto de levadura	3,0
Glucosa	5,0
Cloruro de sodio	5,0
Agar agar	15,0
Agua destilada	1000 mL

ANEXO 3

Medios de cultivo para la detección de proteasas y quitinasas *in vitro*

a. Agar leche 1 % (en Carreño y Muñoz, 2012)

Componentes	g/L
Triptona	5,0
Extracto de levadura	2,5
Glucosa	1,0
Agar agar	15,0
Leche evaporada	10 mL
Agua destilada	980 mL

b. Agar quitina coloidal 1% (en Franco, 2008)

Componentes	g/L
Solución Stock K_2HPO_4 3 % (p/v)	10,0 mL
Solución Stock $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5 % (p/v)	10,0 mL
Solución Stock ($CaCl_2$ 0,5 %, $FeCl_3$ 0,06 %, $NaCl$ 0,5 % p/v)	10,0 mL
NH_4Cl_2	1,0
Quitina coloidal 1 % (p/v)	10,0
Agar agar	15,0

Mezclar los componentes y llevar a volumen con agua destilada, calentar al fuego durante 5 minutos para disolver las sales, ajustar el pH a 6,8. Autoclavar (15 libras de presión y 121 °C). Servir en placas de Petri esterilizadas.

Obtención de la quitina de camarón

Colocar 10g de cáscarade camarón en 100mL de H_3PO_4 al 85 %, dejar reposar 24 horas a temperatura ambiente (25°C) y agitar eventualmente para bajar la espuma. Los gránulos de quitina precipitan con agua destilada. Para separar los gránulos del ácido utilizar cuatro capas de gasa y filtrar al vacío en un matraz kitasato. Lavar con agua destilada hasta quitar el exceso de ácido y neutralizar el pH. Agregar alcohol etílico 96% y dejar secar extendido en papel absorbente. A continuación, esterilizar en autoclave y guardar en refrigeración hasta su uso posterior.

b.1 Obtención de la quitina de camarón

Depositar 10 g de cáscara de camarón en 100 mL de H_3PO_4 al 85 %, dejar reposar 24 horas a temperatura ambiente ($25^\circ C$) y agitar eventualmente para bajar la espuma. Los gránulos de quitina precipitan con agua destilada. Para separar los gránulos del ácido utilizar cuatro capas de gasa y filtrar al vacío en un matraz kitasato. Lavar con agua destilada hasta quitar el exceso de ácido y neutralizar el pH. Agregar alcohol etílico 96 % y dejar secar extendido en papel absorbente. A continuación, esterilizar en autoclave y guardar en refrigeración hasta su uso.

Fundamento

Los caparazones contienen gran cantidad de proteínas y carbonato de calcio, que envuelven las microfibrillas de quitina. Estructuralmente la quitina es un mucopolisacárido, insoluble en solución acuosa, que presenta una estructura lineal compuesta de unidades repetitivas de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), unidas por enlace glicosídicos del tipo β -(1→4). El tratamiento de los caparazones de crustáceos, consiste principalmente en la desmineralización, con la que se eliminan los minerales como el carbonato de calcio. El peso se refleja con ácidos diluidos, acompañado de la eliminación de proteínas o desproteínización, con una solución alcalina caliente, por lo general, de hidróxido de sodio o potasio al 10 %



Caparazón molido de *Astacus serratus* "camarón".



Caparazón molido en 100 mL de H_3PO_4 al 85 %.



Filtrado de suspensión obtenida con agua destilada.



Centrifugación de tubos contiendo el filtrado.de caparazón molido.



Sedimento obtenido luego de la centrifugación.



Deshidratación de quitina



Quitina deshidratada.

ANEXO 4

Detección y cuantificación de ácido indolacético producido *in vitro* mediante la reacción colorimétrica de Salkowski (en Mantilla, 2007; García y Muñoz 2010)

a. Caldotripticasa soya (g/L) suplementado con triptófano

Componentes	g/L
Peptona de casein	17,0
Peptona de harina de soya	3,0
D (+) Glucosa (o dextrosa)	2,5
Cloruro de sodio	5,0
Fosfato dipotásico	2,5
Triptófano	0,01
Agua destilada en cantidad suficiente	1 L

Disolver por calentamiento y agitación. Ajustar el pH a 7,3.

b. Reactivo de Salkowski

Componentes	g/L
Agua destilada	250,0
Ácido sulfúrico concentrado	150,0
Cloruro de hierro 0,5 M en agua destilada	7,5

La solución de cloruro de hierro 0,5 M se obtiene al mezclar 1,61 g de cloruro de hierro (FeCl_3) con 20 mL de agua destilada. Realizar la mezcla bajo el chorro de agua.

c. Procedimiento para elaborar la curva de calibración para cuantificar ácido indolacético(en Mantilla, 2007)

c.1 Fundamento de la reacción de Salkowski

Por la reacción de Salkowski se detectan grupos indol presentes en el medio y la concentración de indol es directamente proporcional a la intensidad de color rojo producido. A su vez, el cambio de color es el resultado de una reacción oxidativa con el ácido sulfúrico, donde por medio de una transaminación un grupo amino es sustituido por el cloro proveniente del FeCl_3 , originando un compuesto visible de color rosado a rojo en el caso del indolacético. Otras coloraciones indican la presencia de productos intermedios de la síntesis del ácido indolacético, que pueden ser generados a partir del triptófano.

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

Para obtener una curva patrón de ácido indolacético, preparar una solución madre de $100 \mu\text{g. mL}^{-1}$, para lo cual se pesan 10 mg de ácido indolacético y se disuelven con unas gotas de NaOH en un matraz aforado a 100 mL. A continuación enrasar con agua bidestilada y agitar hasta homogenizar. Posteriormente se realizan las siguientes diluciones:

N° de tubo	Solución patrón ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) [μL]*	H₂O bidestilada [μL]	Concentración AIA (mg L^{-1})
01	0	1000	0
02	20	980	2
03	40	960	4
04	60	940	6
05	80	920	8
06	100	900	10
07	150	850	15
08	200	800	20
09	300	700	30
10	400	600	40
11	500	500	50
12	600	400	60

*1000 μL = 1 mL

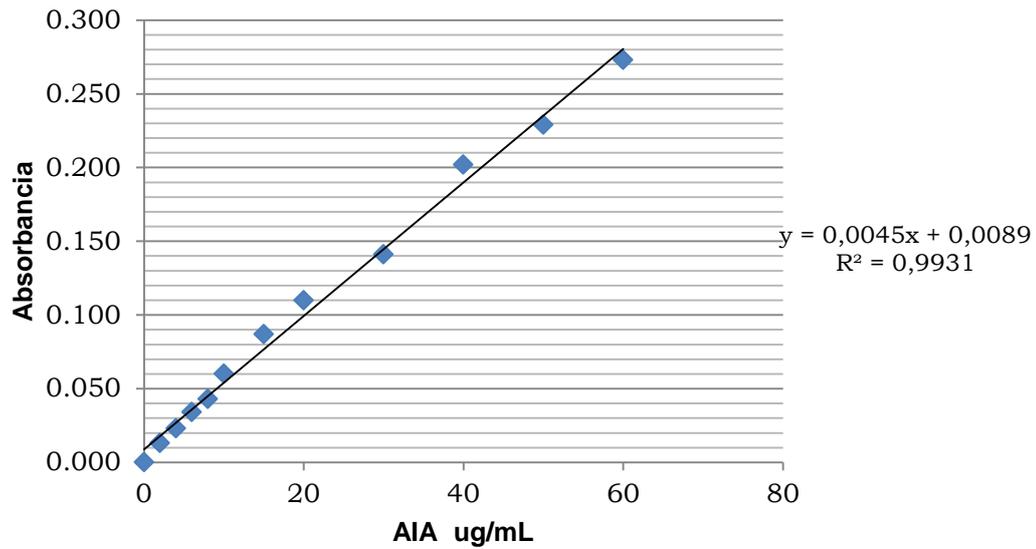
c.3 Procedimiento para la cuantificación de AIA por colorimetría

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

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

Nº tubo	AIA ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia
1	0	0,000
2	2	0,013
3	4	0,023
4	6	0,034
5	8	0,043
6	10	0,060
7	15	0,087
8	20	0,110
9	30	0,141
10	40	0,202
11	50	0,229
12	60	0,273

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



En la ecuación obtenida:

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

Donde:

y: representa la absorbancia captada (variable dependiente)

x: acido indolacético en ppm(variable independiente)

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

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

ANEXO 5

Detección y cuantificación de nitrógeno fijado *in vitro* mediante el método indirecto de valoración del ión amonio empleando la técnica colorimétrica de Berthelot (fenol – hipoclorito)

a. Medios de cultivo (en García & Muñoz, 2010)

a.1 Medio libre de nitrógeno con azul de bromotimol, NFB

Componentes	g/L
Ácido málico	5,0
KOH	4,0
K ₂ HPO ₄	0,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	Trazas
MnSO ₄ .7H ₂ O	0,01
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,01
NaCl	0,02
CaCl ₂	0,01
Na ₂ MoO ₄	0,002
Azul de Bromotimol (0,5 % p/v en etanol)	2,0 mL
Biotinol	0,5 mL
Agua destilada en cantidad suficiente	1000 mL

Ajustar el pH a 6,8-7,0 con NaOH. Para obtener medio semisólido añadir 2 g de agar agar. Para medio sólido añadir 20 mg de extracto de levadura y 15 g de agar.

a.2 Agar nutritivo (AN)

Componentes	g/L
Peptona	5,0
Extracto de carne	3,0
Agar - agar	15,0
Agua destilada en cantidad suficiente	1000 mL

a.3 Caldo extracto de suelo al 10 %

Componentes	g/L
K_2HPO_4	0,4
$MgCl_2$	0,1
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05
$FeCl_3$	0,01
$CaCl_2$	0,1
Triptona	1,0
Extracto de levadura	1,0
Extracto de suelo al 10 %	250 mL
Agua destilada	750 mL

Ajustar a pH 7,4. Para obtener extracto de suelo al 10 %, depositar en un matraz 250 g de suelo agrícola y 500 mL de agua destilada. Hervir 2 horas, completar a 500 mL con agua destilada y filtrar el sobrenadante. Tomar 25 mL del filtrado y completar a 500 mL con agua destilada.

b. Reactivos (en García & Muñoz, 2010)

• **Cloruro de potasio 2 M**

Cloruro de potasio	149,12 g
Agua destilada	1000 mL

• **Solución alcohólica de fenol 10 %**

Fenol concentrado	10 mL
Alcohol 97°	90 mL

• **Nitroprusiato de sodio 0,5 %**

Nitroprusiato de sodio	0,5 g
Agua destilada	100 mL

• **Solución oxidante**

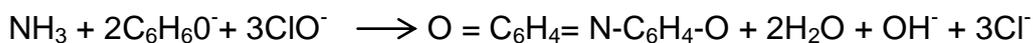
Citrato de sodio	20 g
Hidróxido de sodio	1 g
Hipoclorito de sodio 5 % (lejía comercial)	2 mL
Agua destilada	98 mL

c. Procedimiento para elaborar la curva de calibración para cuantificar el ión amonio (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 (NH₄) con los compuestos fenólicos en presencia de un agente oxidante el cual puede ser hipoclorito de sodio u o-fenilfenol; y la presencia de un catalizador, principalmente nitroprusiato de sodio o ferrocianato de potasio. El mecanismo de la reacción depende de la luz presente, la temperatura ambiente, catalizadores y pH alcalino.

Cuando se utiliza fenol o hipoclorito de sodio la reacción puede ser representada de la siguiente manera:



c.2 Preparación de diluciones a partir de una solución madre de NH₄Cl

Para obtener la curva patrón se prepara una solución madre de 100 ppm de NH₄Cl, para lo cual se pesa 0,1 g de NH₄Cl y se disuelve en 1 L de agua bidestilada. Posteriormente, a partir de la solución madre se efectúan las siguientes diluciones:

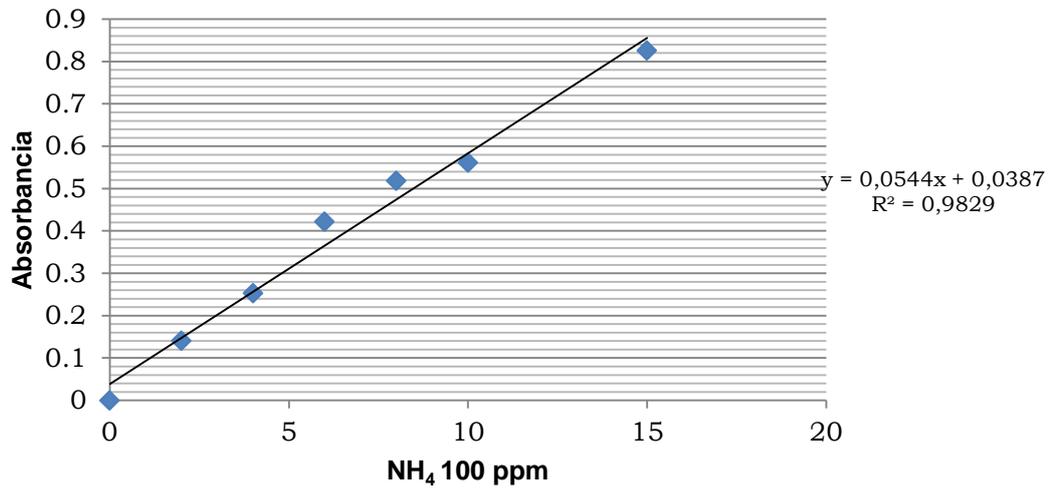
N° de tubo	Solución patrón [mL]	H ₂ O bidestilada [mL]	Concentración NH ₄ Cl [µg /mL= ppm]
01	0,0	10	0
02	0,2	9,8	2
03	0,4	9,6	4
04	0,6	9,4	6
05	0,8	9,2	8
06	1,0	9,0	10
07	1,5	8,5	15
08	2,0	8,0	20

c.3 Procedimiento para la cuantificación de amonio por colorimetría

Obtenidas las diluciones, agregar a cada tubo 0,4 mL de solución alcohólica de fenol al 10 %; 0,4 mL de nitroprusiato de sodio al 0,5 % y 1 mL 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 en función de la concentración de amonio. Leer la absorbancia de cada dilución en el espectrofotómetro a 632,9 nm.

Una vez obtenida la absorbancia de todas las concentraciones de amonio, corregir los valores y mediante regresión lineal con el programa Microsoft Excel 2007, 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.

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



En la ecuación obtenida:

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

Donde:

y: representa la absorbancia captada (variable dependiente)

x: cantidad de amonio en ppm (variable independiente)

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

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

ANEXO 6

Detección y cuantificación de fósforo solubilizado *in vitro*

a. Agar SundaraRaoSinha SRSM (en Vázquez *et al.*, 2000)

Componentes	g/L	
Glucosa	10,0	
Fosfato tricálcico	Ca ₃ (PO ₄) ₂	5,0
Sulfato de amonio	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5
Cloruro de potasio	(KCl)	0,2
Sulfato de magnesio	(MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,3
Sulfato de manganeso	(MnSO ₄ .7H ₂ O)	0,004
Sulfato de hierro	(FeSO ₄ .7H ₂ O)	0,002
Cloruro de sodio	(NaCl)	5,0
Extracto de levadura		0,5
Púrpura de bromocresol		0,1
Agar agar		15
Agua destilada en cantidad suficiente		1000 mL
pH		6,8

Como fuente de fosfato se puede usar fosfato bicálcico (1 g/L de fósforo), fosfato tricálcico (1 g/L de fósforo) y roca fosfórica (0,2 % de fósforo).

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

b.1 Fundamento

En medio ácido y en presencia de molibdato amónico, los ortofosfatos forman un complejo fosfomolibdico que, reducido por el ácido ascórbico, desarrolla una coloración azul susceptible de una determinación colorimétrica y cuya aparición se acelera utilizando el catalizador emético, tartrato doble de antimonio y potasio.

b.2 Limpieza de los recipientes de vidrio

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

b.3 Reactivos

- **Solución de ácido sulfúrico 5 N**

Ácido sulfúrico (d=1,8)	14 mL
Agua destilada hasta enrase	100 mL
- **Solución de molibdato amónico 4 %** 20 mL
- **Solución de ácido ascórbico**

Ácido ascórbico	1,76 g
Agua destilada hasta enrase	100 mL
- **Solución de emético**

Tartrato doble de antimonio y potasio	0.0274 g
Agua destilada hasta enrase	100 mL
- **Reactivo para determinación de ortofosfatos**

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

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

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

b.4 Preparación de la curva de calibración

Colocar en una serie de matraces aforados de 25 mL:

Número de matraces	T	I	II	III
Solución de fósforo de 2 mgL ⁻¹ (mL)	0	1	2	5
Agua bidestilada (mL)	20	19	18	15
Reactivo indicador (mL)	4	4	4	4
Agua destilada hasta enrase (mL)	25	25	25	25
Correspondencia de fósforo en mgL ⁻¹	0	0,1	0,2	0,5

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

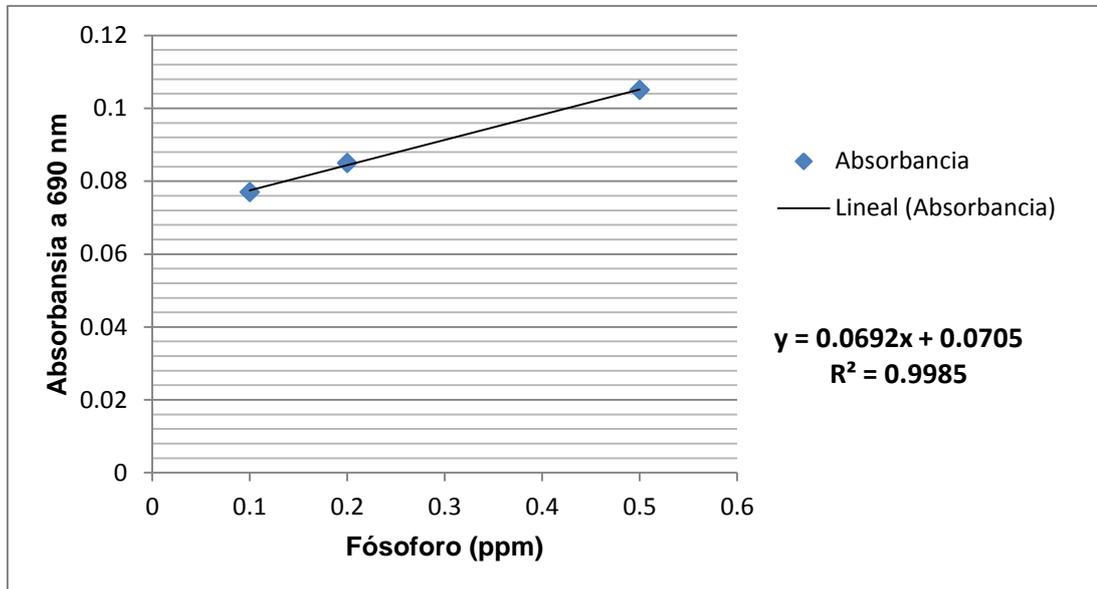
b.5 Procedimiento para cuantificar fosfatos en la muestra

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

Leer la absorbancia de cada dilución a 690 nm

Nº de tubo	Fosforo soluble (ppm)	Absorbancia
1	0,1	0,077
2	0,2	0,085
3	0,5	0,105

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



En la ecuación obtenida:

$$y = 0,0692x + 0,0705$$

Donde:

y: representa la absorbancia captada (variable dependiente)

x: cantidad de fósforo en ppm (variable independiente)

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

$$x = \frac{(y - 0,0705)}{0,0692}$$

ANEXO 7

Agar papa dextrosa, PDA (g/L) para aislamiento de hongos fitopatógenos (en Delgado y Ramos, 2009)

Componentes	g/L
Papa	250
Dextrosa	20
Agar – agar	20
Agua destilada en cantidad suficiente	1 L

Hervir 250 g de papas (peladas y picadas) en 500 mL de agua destilada durante 20 minutos. Completar a 500 con agua destilada. Filtrar a través de una gasa. Recepcionar el filtrado en un vaso de precipitación y añadir 20 g de dextrosa y 20 g de agar disuelto en 500 mL de agua (baño maria). Completar a 1 litro con agua destilada y distribuir en matraces. Esterilizar a 15 libras de presión, 121 °C durante 20 minutos.

ANEXO 8

Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Fusarium verticillioides* por efecto de enterobacterias nativas después de 72 horas

Enterobacterias código UNPRG	Halo (cm)	Inhibición (%)	Enterobacterias código UNPRG	Halo (cm)	Inhibición (%)
<i>Pantoea sp.58</i>	0,4	80,9	<i>Serratia sp. 46</i>	1,3	38,1
<i>Pantoea sp.44</i>	0,4	80,9	<i>Serratia sp. 56</i>	1,3	38,1
<i>Pantoea sp.29</i>	0,4	80,9	<i>Klebsiella sp.100</i>	1,3	38,1
<i>Pantoeasp.49</i>	0,4	80,9	<i>Klebsiella sp. 67</i>	1,4	33,3
<i>Pantoea sp.9</i>	0,4	80,9	<i>Serratia sp. 64</i>	1,4	33,3
<i>Pantoea sp.1</i>	0,4	80,9	<i>Pantoea sp. 73</i>	1,4	33,3
<i>Pantoea sp.12</i>	0,4	80,9	<i>Klebsiella sp. 65</i>	1,4	33,3
<i>Pantoea sp.18</i>	0,4	80,9	<i>Pantoea sp. 76</i>	1,4	33,3
<i>Pantoea sp.36</i>	0,5	76,2	<i>Klebsiella sp. 54</i>	1,4	33,3
<i>Pantoea sp.53</i>	0,5	76,2	<i>Kluyvera sp. 69</i>	1,4	33,3
<i>Pantoea sp.55</i>	0,5	76,2	<i>Kluyvera sp. 68</i>	1,4	33,3
<i>Pantoea sp.32</i>	0,5	76,2	<i>Kluyvera sp. 79</i>	1,4	33,3
<i>Klebsiella sp.95</i>	0,5	76,2	<i>Klebsiella sp. 35</i>	1,4	33,3
<i>Pantoea sp.34</i>	0,5	76,2	<i>Kluyvera sp. 62</i>	1,4	33,3
<i>Klebsiella sp.94</i>	0,7	66,7	<i>Pantoea sp. 77</i>	1,4	33,3
<i>Pantoea sp.10</i>	0,7	66,7	<i>Kluyvera sp. 60</i>	1,4	33,3
<i>Klebsiella sp.74</i>	0,7	66,7	<i>Pantoea sp. 78</i>	1,4	33,3
<i>Pantoea sp. 45</i>	0,7	66,7	<i>Klebsiella sp. 19</i>	1,5	28,57
<i>Pantoea sp. 57</i>	0,7	66,7	<i>Kluyvera sp. 54</i>	1,5	28,57
<i>Serratia sp. 93</i>	0,7	66,7	<i>Pantoea sp. 86</i>	1,5	28,57
<i>Pantoea sp. 21</i>	0,7	66,7	<i>Pantoea sp. 88</i>	1,5	28,57
<i>Pantoea sp. 41</i>	1,0	52,4	<i>Kluyvera sp. 42</i>	1,5	28,57
<i>Klebsiella sp. 80</i>	1,0	52,4	<i>Klebsiella sp. 17</i>	1,5	28,57
<i>Pantoea sp. 13</i>	1,0	52,4	<i>Pantoea sp. 92</i>	1,5	28,57
<i>Serratia sp. 90</i>	1,0	52,4	<i>Kluyvera sp. 40</i>	1,6	23,80
<i>Pantoea sp. 16</i>	1,0	52,4	<i>Pantoea sp. 96</i>	1,6	23,80
<i>Pantoea sp. 50</i>	1,0	52,4	<i>Citrobacter sp.25</i>	1,6	23,80
<i>Pantoea sp. 23</i>	1,0	52,4	<i>Kluyvera sp.82</i>	1,6	23,80
<i>Serratia sp. 84</i>	1,0	52,4	<i>Pantoea sp. 97</i>	1,7	19,1
<i>Pantoea sp. 26</i>	1,0	52,4	<i>Pantoea sp. 99</i>	1,7	19,1
<i>Klebsiella sp. 81</i>	1,0	52,4	<i>Kluyvera sp. 37</i>	1,7	19,1
<i>Pantoea sp. 51</i>	1,0	52,4	<i>Pantoea sp. 14</i>	1,7	19,1
<i>Pantoea sp. 48</i>	1,0	52,4	<i>Hafnia sp. 87</i>	1,9	9,52
<i>Serratia sp. 30</i>	1,1	47,6	<i>Pantoea sp. 3</i>	1,9	9,52
<i>Pantoea sp. 27</i>	1,1	7,6	<i>Kluyvera sp. 24</i>	1,9	9,52
<i>Pantoea sp. 47</i>	1,1	7,6	<i>Citrobacter sp.11</i>	1,9	9,52
<i>Pantoea sp. 59</i>	1,1	7,6	<i>Pantoea sp. 4</i>	1,9	9,52
<i>Pantoea sp. 61</i>	1,1	7,6	<i>Pantoea sp. 6</i>	1,9	9,52
<i>Pantoea sp. 63</i>	1,1	7,6	<i>Kluyvera sp. 22</i>	1,9	9,52
<i>Serratia sp. 31</i>	1,1	7,6	<i>Pantoea sp. 14</i>	1,9	9,52
<i>Pantoea sp. 70</i>	1,1	7,6	<i>Citrobacter sp.28</i>	1,9	9,52
<i>Klebsiella sp. 83</i>	1,1	7,6	<i>Kluyvera sp. 98</i>	2,0	4,8
<i>Klebsiella sp. 85</i>	1,1	7,6	<i>Kluyvera sp. 20</i>	2,0	4,8
<i>Pantoeasp. 71</i>	1,2	42,9	<i>Hafnia sp.66</i>	2,0	4,8
<i>Klebsiella sp. 89</i>	1,2	42,9	<i>Klebsiella sp. 15</i>	2,0	4,8
<i>Serratia sp. 33</i>	1,2	42,9	<i>Kluyvera sp. 7</i>	2,0	4,8
<i>Serratia sp. 75</i>	1,2	42,9	<i>Klebsiella sp. 5</i>	2,0	4,8
<i>Serratia sp. 43</i>	1,3	38,1	<i>Citrobacter sp. 8</i>	2,0	4,8
<i>Pantoea sp. 72</i>	1,3	38,1	<i>Kluyvera sp.2</i>	2,0	4,8
<i>Klebsiella sp. 91</i>	1,3	38,1	<i>Hafnia sp.39</i>	2,0	4,8
Control <i>F. verticilloides</i>	2,1				

Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Fusarium verticillioides* por efecto de enterobacterias nativas después de 96 horas

Enterobacterias código UNPRG	Halo (cm)	Inhibición (%)	Enterobacterias código UNPRG	Halo (cm)	Inhibición (%)
<i>Pantoea sp. 14</i>	0,4	84,6	<i>Kluyvera sp. 2</i>	1,1	57,7
<i>Pantoea sp. 6</i>	0,4	84,6	<i>Pantoea sp. 52</i>	1,1	57,7
<i>Pantoea sp. 4</i>	0,4	84,6	<i>Pantoea sp. 72</i>	1,1	57,7
<i>Pantoea sp.3</i>	0,4	84,6	<i>Pantoea sp. 53</i>	1,1	57,7
<i>Pantoea sp. 41</i>	0,5	80,8	<i>Pantoea sp. 73</i>	1,2	53,8
<i>Pantoea sp. 38</i>	0,5	80,8	<i>Kluyvera sp.7</i>	1,2	53,8
<i>Pantoea sp. 36</i>	0,5	80,8	<i>Klebsiella sp. 94</i>	1,2	53,8
<i>Serratia sp. 30</i>	0,5	80,8	<i>Klebsiella sp. 95</i>	1,2	53,8
<i>Serratia sp. 93</i>	0,5	80,8	<i>Pantoea sp. 76</i>	1,2	53,8
<i>Pantoea sp. 34</i>	0,5	80,8	<i>Kluyvera sp. 20</i>	1,2	53,8
<i>Pantoeasp. 32</i>	0,5	80,8	<i>Klebsiella sp. 91</i>	1,2	53,8
<i>Serratia sp. 31</i>	0,7	73,1	<i>Kluyvera sp. 22</i>	1,3	50,0
<i>Pantoea sp. 29</i>	0,7	73,1	<i>Kluyvera sp. 98</i>	1,3	50,0
<i>Pantoea sp. 1</i>	0,7	73,1	<i>Klebsiella sp. 89</i>	1,3	50,0
<i>Pantoea sp. 9</i>	0,7	73,1	<i>Kluyvera sp. 24</i>	1,3	50,0
<i>Serratia sp. 33</i>	0,7	73,1	<i>Klebsiella sp. 85</i>	1,4	46,2
<i>Pantoea sp. 10</i>	0,7	73,1	<i>Kluyverasp. 37</i>	1,4	46,2
<i>Pantoea sp. 27</i>	0,8	69,2	<i>Klebsiella sp. 83</i>	1,4	46,2
<i>Serratia sp. 43</i>	0,8	69,2	<i>Pantoea sp. 77</i>	1,5	42,30
<i>Pantoea sp. 12</i>	0,8	69,2	<i>Citrobacter sp28</i>	1,5	42,30
<i>Pantoea sp. 26</i>	0,8	69,2	<i>Klebsiella sp. 81</i>	1,5	42,30
<i>Pantoea sp. 13</i>	0,8	69,2	<i>Pantoea sp. 78</i>	1,5	42,30
<i>Pantoea sp. 23</i>	0,8	69,2	<i>Kluyvera sp. 40</i>	1,5	42,30
<i>Serratia sp. 46</i>	0,8	69,2	<i>Klebsiella sp100</i>	1,6	38,5
<i>Pantoea sp. 21</i>	0,8	69,2	<i>Klebsiella sp. 80</i>	1,6	38,5
<i>Pantoea sp. 16</i>	0,9	65,4	<i>Pantoea sp. 86</i>	1,6	38,5
<i>Klebsiella sp. 5</i>	0,9	65,4	<i>Pantoea sp. 88</i>	1,6	38,5
<i>Pantoea sp. 18</i>	0,9	65,4	<i>Pantoea sp. 92</i>	1,7	34,6
<i>Serratia sp. 56</i>	0,9	65,4	<i>Klebsiella sp. 74</i>	1,7	34,6
<i>Pantoea sp. 44</i>	0,9	65,4	<i>Citrobacter sp25</i>	1,7	34,6
<i>Klebsiella sp. 15</i>	0,9	65,4	<i>Pantoea sp. 51</i>	1,7	34,6
<i>Serratia sp. 64</i>	0,9	65,4	<i>Pantoea sp. 58</i>	1,7	34,6
<i>Pantoea sp. 99</i>	0,9	65,4	<i>Kluyvera sp. 42</i>	1,7	34,6
<i>Kluyvera sp. 79</i>	0,9	65,4	<i>Pantoea sp. 59</i>	1,8	30,8
<i>Kluyvera sp. 69</i>	0,9	65,4	<i>Pantoea sp. 8</i>	1,8	30,8
<i>Serratia sp. 75</i>	1,0	61,5	<i>Citrobacter sp11</i>	1,8	30,8
<i>Pantoea sp. 97</i>	1,0	61,5	<i>Pantoea sp. 61</i>	1,8	30,8
<i>Kluyvera sp. 82</i>	1,0	61,5	<i>Hafnia sp. 87</i>	1,9	26,9
<i>Serratia sp. 84</i>	1,0	61,5	<i>Pantoea sp. 63</i>	1,9	26,9
<i>Pantoea sp. 96</i>	1,0	61,5	<i>Pantoea sp. 55</i>	2,0	23,1
<i>Pantoea sp. 45</i>	1,0	61,5	<i>Citrobacter sp. 8</i>	2,2	15,38
<i>Serratia sp. 90</i>	1,0	61,5	<i>Klebsiella sp. 65</i>	2,2	15,38
<i>Pantoea sp. 71</i>	1,0	61,5	<i>Pantoea sp. 57</i>	2,3	11,5
<i>Pantoea sp. 50</i>	1,0	61,5	<i>Kluyvera sp. 54</i>	2,3	11,5
<i>Pantoea sp. 70</i>	1,0	61,5	<i>Klebsiella sp. 67</i>	2,4	7,7
<i>Pantoea sp. 49</i>	1,1	57,7	<i>Hafniasp. 66</i>	2,4	7,7
<i>Kluyvera sp. 68</i>	1,1	57,7	<i>Kluyvera sp. 60</i>	2,4	7,7
<i>Pantoea sp. 48</i>	1,1	57,7	<i>Klebsiella sp. 35</i>	2,4	7,7
<i>Klebsiella sp. 17</i>	1,1	57,7	<i>Klebsiella sp. 19</i>	2,4	7,7
<i>Kluyvera sp. 62</i>	1,1	57,7	<i>Hafnia sp. 39</i>	2,4	7,7
<hr/>					
Control <i>F. verticillioides</i> 2,6					

Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Fusarium verticillioides* por efecto de enterobacterias nativas después de 120 horas

Enterobacterias código UNPRG	Radio (cm)	Inhibición (%)	Enterobacterias código UNPRG	Radio (cm)	Inhibición (%)
<i>Pantoea</i> sp. 34	0,4	87,5	<i>Kluyvera</i> sp. 69	1,9	40,6
<i>Pantoea</i> sp. 55	0,4	87,5	<i>Klebsiella</i> sp. 95	1,9	40,6
<i>Pantoea</i> sp. 57	0,5	84,3	<i>Kluyvera</i> sp. 82	1,9	40,6
<i>Pantoea</i> sp. 61	0,5	84,3	<i>Klebsiella</i> sp. 94	1,9	40,6
<i>Pantoea</i> sp. 92	0,6	81,3	<i>Pantoea</i> sp. 63	1,9	40,6
<i>Pantoea</i> sp. 96	0,6	81,3	<i>Pantoea</i> sp. 32	2,0	37,5
<i>Pantoea</i> sp. 6	0,6	81,3	<i>Pantoea</i> sp. 52	2,0	37,5
<i>Pantoea</i> sp. 97	0,6	81,3	<i>Kluyvera</i> sp. 68	2,0	37,5
<i>Pantoea</i> sp. 99	0,6	81,3	<i>Kluyvera</i> sp. 60	2,0	37,5
<i>Pantoea</i> sp. 29	0,8	75,0	<i>Pantoea</i> sp. 76	2,1	34,4
<i>Pantoea</i> sp. 49	0,8	75,0	<i>Pantoea</i> sp. 53	2,1	34,4
<i>Pantoea</i> sp. 88	0,8	75,0	<i>Klebsiella</i> sp. 91	2,1	34,4
<i>Pantoea</i> sp. 70	0,8	75,0	<i>Pantoea</i> sp. 18	2,1	34,4
<i>Pantoea</i> sp.1	1,0	68,8	<i>Kluyvera</i> sp. 54	2,1	34,4
<i>Pantoea</i> sp. 10	1,0	68,8	<i>Pantoea</i> sp. 48	2,1	34,4
<i>Pantoea</i> sp. 21	1,0	68,8	<i>Kluyvera</i> sp. 7	2,3	28,1
<i>Pantoea</i> sp. 23	1,0	68,8	<i>Pantoea</i> sp. 47	2,3	28,1
<i>Pantoea</i> sp. 51	1,0	68,8	<i>Klebsiella</i> sp. 89	2,3	28,1
<i>Serratia</i> sp. 84	1,0	68,8	<i>Pantoea</i> sp. 27	2,3	28,1
<i>Pantoea</i> sp. 16	1,0	68,8	<i>Kluyvera</i> sp. 42	2,3	28,1
<i>Pantoea</i> sp. 78	1,1	65,6	<i>Citrobacter</i> sp. 28	2,4	25,0
<i>Serratia</i> sp. 75	1,1	65,6	<i>Kluyvera</i> sp. 24	2,4	25,0
<i>Serratia</i> sp. 64	1,1	65,6	<i>Hafnia</i> sp. 39	2,4	25,0
<i>Pantoea</i> sp. 77	1,1	65,6	<i>Serratia</i> sp. 93	2,4	25,0
<i>Pantoea</i> sp.4	1,1	65,6	<i>Klebsiella</i> sp. 85	2,4	25,0
<i>Pantoea</i> sp. 26	1,1	65,6	<i>Klebsiella</i> sp. 100	2,4	25,0
<i>Serratia</i> sp. 56	1,3	59,4	<i>Klebsiella</i> sp. 83	2,4	25,0
<i>Pantoea</i> sp. 71	1,3	59,4	<i>Citrobacter</i> sp. 8	2,4	25,0
<i>Pantoea</i> sp. 3	1,3	59,4	<i>Pantoea</i> sp. 14	2,4	25,0
<i>Pantoea</i> sp. 44	1,3	59,4	<i>Kluyvera</i> sp. 37	2,4	25,0
<i>Serratia</i> sp. 46	1,3	59,4	<i>Klebsiella</i> sp. 81	2,4	25,0
<i>Pantoea</i> sp. 36	1,3	59,4	<i>Hafnia</i> sp. 66	2,4	25,0
<i>Pantoea</i> sp. 12	1,5	53,1	<i>Kluyvera</i> sp. 22	2,5	21,9
<i>Kluyvera</i> sp.98	1,5	53,1	<i>Klebsiella</i> sp. 80	2,5	21,9
<i>Pantoea</i> sp. 59	1,5	53,1	<i>Kluyvera</i> sp. 20	2,5	21,9
<i>Pantoea</i> sp. 86	1,5	53,1	<i>Pantoea</i> sp. 38	2,5	21,9
<i>Pantoea</i> sp. 73	1,5	53,1	<i>Kluyvera</i> sp. 2	2,5	21,9
<i>Pantoea</i> sp. 50	1,5	53,1	<i>Citrobacter</i> sp. 11	2,7	15,6
<i>Serratia</i> sp. 43	1,7	46,9	<i>Kluyvera</i> sp. 79	2,7	15,6
<i>Pantoea</i> sp. 9	1,7	46,9	<i>Klebsiella</i> sp. 74	2,7	15,6
<i>Klebsiella</i> sp. 5	1,7	46,9	<i>Klebsiella</i> sp. 67	2,7	15,6
<i>Serratia</i> sp. 33	1,7	46,9	<i>Serratia</i> sp. 90	2,7	15,6
<i>Pantoea</i> sp. 13	1,7	46,9	<i>Klebsiella</i> sp. 65	2,7	15,6
<i>Pantoea</i> sp. 41	1,7	46,9	<i>Kluyvera</i> sp. 40	2,8	12,5
<i>Klebsiella</i> sp. 15	1,7	46,9	<i>Kluyvera</i> sp. 62	2,8	12,5
<i>Serratia</i> sp. 31	1,7	46,9	<i>Klebsiella</i> sp. 54	2,9	9,4
<i>Pantoea</i> sp. 45	1,8	43,8	<i>Citrobacter</i> sp. 25	2,9	9,4
<i>Pantoea</i> sp. 58	1,8	43,8	<i>Klebsiella</i> sp. 35	2,9	9,4
<i>Klebsiella</i> sp. 17	1,8	43,8	<i>Klebsiella</i> sp. 19	2,9	9,4
<i>Serratia</i> sp. 30	1,8	43,8	<i>Hafnia</i> sp. 87	2,9	9,4
Control <i>F. verticillioides</i> 3,2					

ANEXO 9

Emergencia (%) de *Zea mays* L. “maíz” amarillo duro híbrido, por efecto de la inoculación de enterobacterias nativas en las semillas; 2013

Tratamiento	Porcentaje de emergencia por días (%)					
	5	6	7	8	9	10
<i>Pantoea</i> sp. 1	50	70	70	80	80	80
<i>Kluyvera</i> sp. 2	40	40	60	60	60	60
<i>Pantoea</i> sp. 3	60	60	60	70	70	70
<i>Pantoea</i> sp. 4	40	80	90	90	100	100
<i>Klebsiella</i> sp. 5	30	70	90	90	90	90
<i>Pantoea</i> sp. 6	50	90	100	100	100	100
<i>Kluyvera</i> sp. 7	20	50	70	70	70	70
<i>Citrobacter</i> sp.8	50	80	90	90	90	90
<i>Pantoea</i> sp. 9	30	70	80	90	90	90
<i>Pantoea</i> sp. 10	00	30	30	50	50	60
<i>Citrobacter</i> sp. 11	30	80	90	90	90	90
<i>Pantoea</i> sp. 12	00	10	10	30	30	30
<i>Pantoea</i> sp. 13	10	30	50	80	80	80
<i>Pantoea</i> sp. 14	00	40	60	60	60	70
<i>Klebsiella</i> sp. 15	30	60	70	70	70	70
<i>Pantoea</i> sp. 16	50	70	90	90	90	90
<i>Klebsiella</i> sp. 17	40	90	100	100	100	100
<i>Pantoea</i> sp. 18	30	50	90	90	90	90
<i>Klebsiella</i> sp. 19	00	40	80	80	80	80
<i>Kluyvera</i> sp. 20	40	50	70	80	80	90
<i>Pantoea</i> sp. 21	30	60	90	90	90	80
<i>Kluyvera</i> sp. 22	10	40	70	70	70	70
<i>Pantoea</i> sp.23	20	40	80	90	90	90
<i>Kluyvera</i> sp. 24	30	50	70	70	70	70
<i>Citrobacter</i> sp. 25	40	70	90	100	100	100
<i>Pantoea</i> sp.26	10	40	80	80	80	80
<i>Pantoea</i> sp. 27	40	90	100	100	100	100
<i>Citrobacter</i> sp. 28	10	40	70	70	80	80
<i>Pantoea</i> sp. 29	10	50	50	60	70	70
<i>Serratia</i> sp. 30	20	50	60	80	80	80
<i>Serratia</i> sp. 31	30	50	70	90	90	90
<i>Pantoea</i> sp. 32	10	40	80	80	80	80
<i>Serratia</i> sp. 33	00	70	100	100	100	100
<i>Pantoea</i> sp. 34	30	60	70	90	90	90
<i>Klebsiella</i> sp. 35	20	80	90	90	100	100
<i>Pantoea</i> sp. 36	40	80	90	100	100	100
<i>Kluyvera</i> sp. 37	10	50	50	80	80	80
<i>Pantoea</i> sp. 38	30	50	90	90	90	90
<i>Hafnia</i> sp. 39	20	50	70	90	90	90
<i>Kluyvera</i> sp. 40	10	40	80	80	80	80
<i>Pantoea</i> sp. 41	30	50	80	90	90	90
<i>Kluyvera</i> sp. 42	40	70	90	90	90	90
<i>Serratia</i> sp. 43	20	50	90	90	100	100
<i>Pantoea</i> sp. 44	30	80	80	90	100	100
<i>Pantoea</i> sp. 45	10	60	90	90	100	100
<i>Serratia</i> sp. 46	20	70	80	80	80	80

Continuación

Tratamientos	Porcentaje de emergencia por días (%)					
	5	6	7	8	9	10
<i>Pantoea sp.</i> 47	10	50	90	90	100	100
<i>Pantoea sp.</i> 48	00	50	80	80	80	80
<i>Pantoea sp.</i> 49	20	60	60	80	80	80
<i>Pantoea sp.</i> 50	10	70	80	80	80	80
<i>Pantoea sp.</i> 51	40	60	90	90	100	100
<i>Pantoea sp.</i> 52	30	50	70	70	70	70
<i>Pantoea sp.</i> 53	30	50	70	90	90	90
<i>Kluyvera sp.</i> 54	20	60	80	80	80	90
<i>Pantoea sp.</i> 55	40	70	90	100	100	100
<i>Serratia sp.</i> 56	50	70	90	90	100	100
<i>Pantoea sp.</i> 57	10	30	40	70	70	70
<i>Pantoea sp.</i> 58	20	70	90	90	90	90
<i>Pantoea sp.</i> 59	00	50	90	90	90	90
<i>Kluyvera sp.</i> 60	00	40	40	80	80	80
<i>Pantoea sp.</i> 61	30	70	70	90	90	90
<i>Kluyvera sp.</i> 62	10	70	90	90	90	100
<i>Pantoea sp.</i> 63	50	70	70	100	100	100
<i>Serratia sp.</i> 64	40	60	70	90	90	90
<i>Klebsiella sp.</i> 65	00	10	30	30	50	50
<i>Hafnia sp.</i> 66	10	50	80	90	90	90
<i>Klebsiella sp.</i> 67	10	20	50	50	70	70
<i>Kluyvera sp.</i> 68	10	40	40	70	70	70
<i>Kluyvera sp.</i> 69	30	60	80	80	80	80
<i>Pantoea sp.</i> 70	20	40	70	70	70	70
<i>Pantoea sp.</i> 71	50	70	90	90	100	100
<i>Pantoea sp.</i> 72	30	70	70	90	90	90
<i>Pantoea sp.</i> 73	10	10	30	40	40	40
<i>Klebsiella sp.</i> 74	10	50	70	70	70	70
<i>Serratia sp.</i> 75	20	30	40	60	60	60
<i>Pantoea sp.</i> 76	30	70	90	90	100	100
<i>Pantoea sp.</i> 77	40	70	80	80	80	90
<i>Pantoea sp.</i> 78	10	50	50	80	80	80
<i>Kluyvera sp.</i> 79	10	40	80	80	80	80
<i>Klebsiella sp.</i> 80	00	50	80	80	80	80
<i>Klebsiella sp.</i> 81	20	50	70	80	80	80
<i>Kluyvera sp.</i> 82	10	40	50	60	60	60
<i>Klebsiella sp.</i> 83	30	60	80	80	80	80
<i>Serratia sp.</i> 84	30	50	90	100	100	100
<i>Klebsiella sp.</i> 85	50	70	80	80	80	80
<i>Pantoea sp.</i> 86	30	70	80	90	90	100
<i>Hafnia sp.</i> 87	20	70	90	90	90	90
<i>Pantoea sp.</i> 88	10	60	60	70	70	70
<i>Klebsiella sp.</i> 89	00	70	70	80	80	80
<i>Serratia sp.</i> 90	20	50	90	90	90	90
<i>Klebsiella sp.</i> 91	00	50	70	70	70	70
<i>Pantoea sp.</i> 92	00	70	80	90	90	90
<i>Serratia sp.</i> 93	10	60	80	90	90	90

Continuación

Tratamiento	Porcentaje de emergencia por días (%)					
	5	6	7	8	9	10
<i>Klebsiella sp. 94</i>	20	70	80	90	90	90
<i>Klebsiella sp. 95</i>	10	50	70	80	80	90
<i>Pantoea sp. 96</i>	10	50	70	70	70	70
<i>Pantoea sp. 97</i>	00	60	80	80	80	90
<i>Kluyvera sp. 98</i>	00	30	80	90	90	90
<i>Pantoea sp. 99</i>	30	80	90	90	100	100
<i>Klebsiella sp. 100</i>	10	40	50	90	90	90
Testigo agua	20	30	50	50	70	70

