



**UNIVERSIDAD NACIONAL
PEDRO RUIZ GALLO**



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA
Y PARASITOLOGÍA**

**Sustratos naturales para el incremento masivo de
Azotobacter sp. nativa caracterizada como promotora
del crecimiento de *Zea mays* L. “maíz” en Lambayeque,
2013**

TESIS

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

PRESENTADO POR:

**Bach. HANS RAMÓN QUIROZ RUIZ
Bach. SANDRA AILEEN CHÁVEZ NAVARRO**

**LAMBAYEQUE - PERÚ
2014**



**UNIVERSIDAD NACIONAL
PEDRO RUIZ GALLO**



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA
Y PARASITOLOGÍA**

**Sustratos naturales para el incremento masivo de *Azotobacter*
sp. nativa caracterizada como promotora del crecimiento de
Zea mays L. “maíz” en Lambayeque, 2013**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA MICROBIOLOGÍA-PARASITOLOGÍA

PRESENTADO POR:

**Bach. Hans Ramón Quiroz Ruiz
Bach. Sandra Aileen Chávez Navarro**

APROBADO POR:

M.Sc. José T. Reupo Periche

PRESIDENTE

Dra. Tarcila Amelia Cabrera Salazar

SECRETARIA

Lic. Julio César Silva Estela

VOCAL

Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán

PATROCINADORA

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	4
	2.1 Antecedentes de investigación.....	4
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
	3.1 Materiales.....	9
	3.1.1 Material biológico.....	9
	3.1.2 Población y muestra de estudio.....	9
	3.2 Métodos.....	9
	3.2.1 Variables en estudio.....	9
	3.2.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis.....	10
	3.2.3 Obtención de cultivo de trabajo.....	10
	3.2.4 Formulación de medios de cultivo con base a sustratos naturales.....	10
	3.2.5 Análisis físico químicos de los sustratos naturales.....	14
	3.2.6 Número más probable, NMP, de <i>Azotobacter</i> sp. nativa en sustratos naturales líquidos.....	14
	3.2.7 Concentración celular de <i>Azotobacter</i> sp. nativa en sustratos naturales líquidos y sólidos	16
	3.2.8 Selección de un sustrato natural líquido y sólido.....	16
	3.2.9 Cuantificación del ácido indolacético producido, nitrógeno fijado y fosfato solubilizado.....	18
	3.2.10 Poder germinativo de maíz por efecto de <i>Azotobacter</i> sp. nativa cultivada en sustratos naturales.....	19
	3.2.11 Análisis de datos.....	22
IV.	RESULTADOS.....	23
	4.1 Medios de cultivo formulados con sustratos naturales.....	23
	4.2 Número más probable se <i>Azotobacter</i> sp.UNPRG67 nativa en sustratos naturales líquidos.....	23
	4.3 Concentración celular de <i>Azotobacter</i> sp.UNPRG67 nativa en sustratos naturales.....	27
	4.4 Sustratos naturales seleccionados.....	30
	4.5 Ácido indolacético producido, nitrógeno fijado y fosfato solubilizado.....	30

4.6 Poder germinativo de semillas de <i>Zea mays</i> “amarillo duro” por efecto de <i>Azotobacter</i> sp.UNPRG67 cultivado en sustratos naturales.....	36
V. DISCUSIÓN.....	42
VI. CONCLUSIONES.....	47
VII. RECOMENDACIONES.....	48
VIII.RESUMEN.....	49
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
X. ANEXOS.....	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Componentes y preparación de los medios de cultivo en base a sustratos naturales.....	11
Tabla 2.	Contenido (%) de carbono, nitrógeno y humedad de sustratos Naturales utilizados en la formulación de medios de cultivo para el incremento de <i>Azotobacter</i> sp.UNPRG67.....	24
Tabla 3.	Número más probable, NMP de <i>Azotobacter</i> sp.UNPRG67 en quince sustratos naturales líquidos.....	28
Tabla 4.	Recuento de <i>Azotobacter</i> sp.UNPRG67 en cinco sustratos Naturales líquidos suplementados con urea.....	29
Tabla 5.	Concentración celular (UFCmL ⁻¹) de <i>Azotobacter</i> sp.UNPRG67 en cinco sustratos naturales líquidos suplementados con urea....	29
Tabla 6.	Prueba de Kruskal Wallis para los promedios de la celular de <i>Azotobacter</i> sp.UNPRG67 en cinco sustratos líquidos suplementados con urea.....	31
Tabla 7.	Concentración celular (UFCmL ⁻¹) de <i>Azotobacter</i> sp.UNPRG67 en cinco sustratos naturales sólidos suplementados con urea.....	33
Tabla8.	Prueba de Kruskal Wallis para los promedios de la concentración celular de <i>Azotobacter</i> sp.UNPRG67 en cinco sustratos sólidos suplementados con urea.....	33
Tabla 9.	Concentración celular de sustratos naturales seleccionados para el incremento masivo de <i>Azotobacter</i> sp.UNPRG67.....	34
Tabla 10.	Ácido indolacético (ppm) producido por <i>Azotobacter</i> sp. UNPRG67 reislada de caldo algarroba y pajilla -melaza.....	34
Tabla 11.	Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por <i>Azotobacter</i> sp. UNPRG67 reislada de caldo algarroba y pajilla melaza.....	35

Tabla 12.	Fósforo solubilizado (ppm) por <i>Azotobacter</i> sp.UNPRG67 reaislada de caldo algarroba y pajilla-melaza.....	37
Tabla 13.	Análisis de varianza de la concentración de ácido indolacético (ppm) producido por <i>Azotobacter</i> sp.UNPRG67 reaislada de caldo algarroba y pajilla melaza.....	37
Tabla 14.	Análisis de varianza de la concentración de nitrógeno fijado como amonio (ppm) por <i>Azotobacter</i> sp.UNPRG67 reaislada de caldo algarroba y pajilla melaza.....	38
Tabla 15.	Análisis de varianza de la concentración de fosfato solubilizado (ppm) por <i>Azotobacter</i> sp. UNPRG67 reaislada de caldo Algarroba y pajilla melaza.....	38
Tabla 16.	Porcentaje de germinación y poder germinativo de semillas de <i>Zea mays</i> L. amarillo duro AGRI-144 por efecto de <i>Azotobacter</i> sp.UNPRG67 cultivada en sustratos naturales.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Preparación del sustrato Caldo algarroba (a) Pesado de la algarroba, (b) Cocinado, (c) Filtrado, (d) Caldo algarroba.....	12
Figura 2.	Sustratos naturales para el incremento masivo de <i>Azotobacter</i> sp.UNPRG67.....	13
Figura 3.	Inoculación del sustrato natural líquido algarroba.....	15
Figura 4.	Inoculación del medio mineral sin nitrógeno para determinar el número más probable de <i>Azotobacter</i> sp. UNPRG67.....	17
Figura 5.	Sustratos sólidos cultivados con <i>Azotobacter</i> sp.UNPRG67.....	17
Figura 6.	<i>Azotobacter</i> sp.UNPRG67 cultivada en caldo SRSM.....	20
Figura 7.	Inoculación de semillas de <i>Zea mays</i> L. con <i>Azotobacter</i> sp. UNPRG67 cultivada en sustrato líquido algarroba.....	20
Figura 8.	Semillas de maíz inoculadas con <i>Azotobacter</i> sp.UNPRG67 cultivada en pajilla-melaza.....	21
Figura 9.	Prueba para determinar el poder germinativo de <i>Zea mays</i> L.....	21
Figura 10.	Sustrato líquido melaza + urea cultivado con <i>Azotobacter</i> sp.....	25
Figura 11.	Viraje del indicador y velo desarrollado por <i>Azotobacter</i> sp. en Medio mineral sin nitrógeno.....	26
Figura 12.	Crecimiento de <i>Azotobacter</i> sp. en medio mineral sin nitrógeno...	26
Figura 13.	Colonias de <i>Azotobacter</i> sp.UNPRG67 en medio Ashby - Sacarosa.....	32
Figura 14.	Germinación de semillas de <i>Zea mays</i> por efecto de <i>Azotobacter</i> sp.UNPRG67 cultivada en caldo algarroba y pajilla - melaza.....	39

Figura 15. Germinación de semillas de *Zea mays*. por efecto de
Azotobacter sp.UNPRG67 cultivada en caldo Ashby..... 39

Figura 16. Plántulas normales (PN), plántulas anormales (PPA) y
semillas de *Zea mays* L. no germinadas (NG)..... 40

“La vida es un fluido fascinante”

Ph.D PEDRO CHIMOY EFFIO

DEDICATORIA

A Isabel Ruiz Cajo, *in memoriam*

A Ramón Ruiz Castillo, *in memoriam*

No se formaron en biología, pero ambos fueron biólogos, porque les gustó la vida, porque enseñaron mucho sobre ella.

Bach. HANS RAMÓN QUIROZ RUIZ

A Dios por mostrarme día a día que con humildad, paciencia y sabiduría todo es posible.

A mis padres y hermanas quienes con su amor, apoyo y comprensión incondicional estuvieron siempre a lo largo de mi vida estudiantil; a ellos que siempre tuvieron una palabra de aliento en los momentos difíciles y que han sido incentivos de mi vida.

Bach. SANDRA AILEEN CHÁVEZ NAVARRO

AGRADECIMIENTO

En estas líneas quiero agradecer a todas las personas que contribuyeron de diferente forma en la realización de esta tesis y a todos aquellos con los que he compartido gratos momentos.

A Dios, por cada uno de los días y por las muchas cosas otorgadas.

Agradecer de manera muy especial a la Doctora Carmen Rosa Carreño Farfán por el tiempo, dedicación, apoyo y valioso asesoramiento. Por ese apasionamiento por la ciencia, por la amistad, por confiar en mí y porque todo lo que pueda decir no sería suficiente.

A todos los miembros de mi familia, afectuosamente.

Al laboratorio de Biotecnología microbiana, por recibirme y permitirme ser parte de esa familia en crecimiento constante.

A todos los amigos y compañeros con los que he compartido experiencias, aulas, diálogos, observaciones microscópicas, asas bacteriológicas, medios de cultivo, cultivos puros, cultivos contaminados, etc. Por permitirme crecer junto a ellos a lo largo de toda la formación universitaria.

A la Licenciada Nathalí Hernández Palomino, por el apoyo brindado.

Al Sr. Floriano Saucedo Gallardo de la Facultad de Ingeniería Química e Industrias alimentarias, por su amabilidad y colaboración.

A los señores miembros del Jurado.

Bach. HANS RAMÓN QUIROZ RUIZ

Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza y brindarme una vida llena de aprendizaje, experiencias y sobre todo felicidad.

A mi asesora de tesis, Dra. Carmen Carreño Farfán por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación ha logrado en mí que pueda terminar mis estudios con éxito.

A mis padres, Itamar y Víctor, quienes han sido la guía y el camino para poder llegar a este punto de mi carrera, que con su ejemplo, dedicación y palabras de aliento nunca bajaron los brazos para que yo tampoco lo haga.

A mis hermanas, Leticia y Elizabeth, por ser parte importante de mi vida, por sus consejos y alegrías.

A Bruno, por su cariño, amistad y palabras de aliento.

A mis amigos, por su tiempo, consejos brindados y por estar conmigo siempre que los he necesitado.

Al Sr. Floriano Saucedo Gallardo de la Facultad de Ingeniería Química e Industrias alimentarias, por su sencillez, humildad y apoyo brindado.

Bach. SANDRA AILEEN CHÁVEZ NAVARRO

I. INTRODUCCION

La introducción de fertilizantes químicos y posteriormente plaguicidas, la utilización de híbridos de alto rendimiento y la mecanización de la agricultura permitieron intensificar los sistemas productivos, abandonar la rotación y pasar al monocultivo, internacionalizándose el modelo exitoso de los países desarrollados e implantando "paquetes tecnológicos" en los subdesarrollados (Gómez, 2000). Diversas investigaciones en las fincas de los agricultores, bajo el primer Programa de Fertilizantes de la FAO durante 25 años, en 40 países, demostraron que el aumento promedio de los fertilizantes para *Triticum aestivum* "trigo", fue de 60%, con variaciones según la región, cultivo y país (IFA, 2002). Como contraparte a la "revolución verde", el hambre continua amenazando, se marginó a la población rural y se observan consecuencias negativas en los ecosistemas, como erosión, salinización y pérdida de la fertilidad de los suelos, destrucción de bosques, disminución de la biodiversidad, contaminación de suelos y agua e intoxicación con agrotóxicos en los productores e inclusive en los consumidores (Gómez, 2000).

La agricultura orgánica es un sistema alternativo al convencional o moderno, que exige optar por otro sistema de producción con el que se evite o excluya el uso de fertilizantes químicos, plaguicidas, reguladores del crecimiento y aditivos sintéticos para la alimentación animal. En este contexto, las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR), constituyen biofertilizantes. 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, solubilizan fosfato, producen reguladores del crecimiento y sideróforos, así como también, reducen el ataque de microorganismos patógenos e insectos (Bhattacharyya & Jha, 2012; Hayat *et al.*, 2010; Hernández *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2010; Nihorimbere *et al.*, 2011).

Las rizobacterias promotoras del crecimiento incluyen entre otras, especies de *Azotobacter*. Estas bacterias se encuentran presentes en la mayoría de suelos, no obstante, sus poblaciones son mínimas por lo que no inducen efectos positivos visibles en cultivos agrícolas, requiriéndose de inoculaciones en las semillas o en la rizósfera para incrementar el desarrollo vegetativo y rendimiento (Obando, 2012; Lara *et al.*, 2011; Sachin, 2009; Salhia, 2010; Velez & Orellana, 2010).

El incremento masivo de las PGPR se realiza en medios de cultivo definidos como el Caldo Soya tripticasa y caldo nutritivo; sin embargo, éstos tienen un costo elevado, por lo que su aplicación es restringida. Se requiere que los bioinoculantes sean producidos fácilmente por la industria existente, con una oferta y precio razonables. Una opción viable para disminuir el costo, en el incremento masivo de los microorganismos, es la formulación de medios de cultivo con base a sustratos naturales como *Solanum tuberosum* “papa”, *Ipomoea batatas* “camote” y *Hordeum vulgare* “cebada” (Fernández, 2010), así como también, pueden ser utilizados residuos sólidos y efluentes industriales (Rodrigues, 2005; Córdova *et al.*, 2009). El desarrollo del medio de cultivo implica el conocimiento de las necesidades metabólicas del microorganismo a multiplicar, para así lograr el ambiente ideal para el crecimiento mediante la

selección de los componentes a utilizar y la concentración adecuada de éstos (Loredo *et al.*, 2004).

En el laboratorio de Microbiología y Parasitología se aislaron bacterias de *Azotobacter* spp. de la rizósfera de malezas asociadas a *Zea mays* L. “maíz” y se determinó en laboratorio e invernadero que son promotores del crecimiento de las plantas; sin embargo, para su aplicación fueron cultivadas en medios de cultivo sintéticos, cuyo uso no es factible para una propagación masiva, requiriéndose la investigación de sustratos económicos y disponibles. En la región Lambayeque, la actividad agropecuaria es económicamente muy importante y genera productos y residuos que podrían ser utilizados para el incremento masivo de las PGPR, disminuyendo los costos de producción y generando valor agregado en beneficio de los agricultores.

Por lo expuesto se planteó la siguiente investigación, cuyos objetivos fueron formular diez sustratos naturales líquidos con recursos de bajo costo y disponibles en la región Lambayeque; determinar el número más probable de *Azotobacter* sp. nativa en cinco sustratos naturales líquidos, determinar la concentración celular de *Azotobacter* sp. nativa en cinco sustratos naturales líquidos y sólidos, seleccionar un sustrato natural líquido y uno sólido con base a la mayor concentración celular, cuantificar el ácido indolacético producido, nitrógeno fijado y fósforo solubilizado por *Azotobacter* sp. nativa reaislada de los sustratos naturales líquido y sólido seleccionados; así como también determinar el poder germinativo de maíz por efecto de *Azotobacter* sp. nativa cultivada en los sustratos naturales líquido y sólido seleccionados.

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1 Antecedentes de la investigación

Con el objetivo de obtener mayor productividad y reducir los costos, se investigó la utilización de residuos de industrias amiláceas para la producción de poli-3-hidroxibutirato, P(3HB) por *Ralstonia eutropha*. El cultivo de las bacterias se realizó en frascos con agitación constante (150 rpm), donde la fuente de carbono fue un medio sintético con similares características a los residuos amiláceos y al inicio del proceso se suplementó con ácido oleico o con aceite de soya. Cada 2 horas se tomaron muestras, para monitorear el crecimiento celular, azúcares reductores, nitrógeno residual y concentración de polímero. Se alcanzaron 46, 50 y 56% de P(3HB) con 0,22; 0,37 y 0,49 gL⁻¹ h⁻¹ de productividad con el residuo, después de 28 horas; con el residuo suplementado con ácido oleico después de 24 horas y con el residuo más aceite de soya, después de 22 horas, respectivamente. Se demostró que los residuos amiláceos constituyen una fuente de carbono para el crecimiento de *R. eutropha* y producción de P3HB (Rodrigues, 2005).

Se investigó el efecto de diferentes componentes del medio de cultivo en la producción de alginato por *A. vinelandii*. Inicialmente la bacteria fue cultivada con diferentes fuentes de carbono: fructosa, galactosa, glucosa, lactosa y sacarosa y después se cultivó en suero de leche y jugo de caña de azúcar, como fuentes alternativas. Las mayores concentraciones correspondieron a la glucosa con 5,47 gL⁻¹ de biomasa y 3,08 gL⁻¹ alginato, seguido de la galactosa (3,63 y 2,20 gL⁻¹) y fructosa (3,77 y 2,0 gL⁻¹). Con la fuente de carbono alternativa caldo Burk con jugo de caña de azúcar, se alcanzaron 9,98 gL⁻¹ de biomasa y 6,85 gL⁻¹ de alginato; no obstante, al caldo Burk – suero de leche le correspondieron 6,68 gL⁻¹ de biomasa y 1,54 gL⁻¹ de alginato. Se concluyó que el jugo de caña de azúcar es una fuente para la producción de alginato por *A. vinelandii*, superando en rendimiento y concentración a la sacarosa utilizada tradicionalmente (Cuesta *et al.*, 2006).

Los biosurfactantes ofrecen ventajas frente a los surfactantes químicos, porque tienen baja toxicidad y biodegradabilidad, por lo que se investigó el residuo de la obtención de biodiesel a partir de semilla de *Jatropha curcas* L. “piñón blanco”, como un sustrato para la producción de estos polisacáridos por *Azotobacter vinelandii*. El residuo presentó 24,60% de proteína cruda; 47,25% de carbohidratos; 10,12% de fibra cruda y 5,54% de humedad, utilizándose como fuentes de carbono en las concentraciones de 0,5; 1,0; 1,5 y 2% p/v. El bioproceso se llevó a cabo a temperatura ambiente y agitación constante (110 rpm) por 4 días. La mayor producción correspondió a 3,97 gL⁻¹ de biosurfactante, obtenido con 1,5% de torta de semillas, concluyéndose que este residuo puede ser utilizado para la producción a gran escala de biosurfactantes, dándole un valor agregado al cultivo (Helmy *et al.*, 2008).

El cultivo de *Stevia rebaudiana* es muy importante por la presencia de un edulcorante en sus hojas, esteviósido y rebaudiósido, no calórico y 300 - 350 veces más dulce que la sacarosa. Con el objetivo de obtener un biofertilizante para la producción orgánica de este cultivo, se aisló *Azotobacter* de suelo rizosférico, obteniéndose 15 cultivos, entre los que se seleccionó *A. nigricans*, debido a su mayor velocidad de crecimiento: 0,1405 h⁻¹, fase exponencial de 18 horas y una producción de 38,4 mg mL⁻¹ de AIA a las 150 horas.

Esta bacteria fue cultivada en medio leche y sintético, a 30°C, en agitación constante (120 rpm) durante 24 horas, obteniéndose 4×10^{12} UFCmL⁻¹. El cultivo se llevó a un volumen de 200 L para obtener una concentración final de 10^9 UFCmL⁻¹ y se aplicó en el cultivo de *S. rebaudiana*, alcanzándose después de 180 días, 577 kg ha⁻¹ de biomasa, en comparación con 497 kg ha⁻¹ en el control. Debido a que el biofertilizante incrementó en 15% la biomasa de *S. rebaudiana* se consideró una alternativa para mejorar las condiciones nutricionales del cultivo (Borda *et al.*, 2009).

Con el objetivo de obtener biofertilizantes, se investigó la densidad de *Azotobacter* y *Azospirillum*, así como la cantidad de nitrógeno en sustratos naturales inoculados. En muestras de suelo rizosférico de *Musa* sp. se aislaron tres cultivos de *Azospirillum* y tres de *Azotobacter* spp. con los que se estableció un experimento con 15 tratamientos y dos factores: tipo de sustrato (suelo - pollinaza, pinzote, pollinaza + suelo, pinzote + suelo) y tipo de consorcio bacteriano (sin consorcio, con *Azospirillum*, con *Azospirillum* + *Azotobacter* y con *Azotobacter*). Las bacterias fueron inoculadas en 500 g de los sustratos con 32% de humedad. A los 60 días, las mayores densidades correspondieron a pinzote - *Azospirillum*, con 15×10^5 UFCg⁻¹ y pinzote - suelo - *Azotobacter*, con 63×10^4 UFCg⁻¹ de biofertilizante. La mayor cantidad de nitrógeno total fue 5,25% con suelo – pollinaza – *Azospirillum* – *Azotobacter*, concluyéndose que esta formulación es la más adecuada para la obtención de un biofertilizante (Córdova *et al.*, 2009).

Se realizó una investigación con el objeto de determinar el efecto de tres sustratos naturales (cebada, camote, papa) en distintas concentraciones (10, 20, 30% y 20, 40, 60% p/v), tiempos (8, 24, 32 y 48 horas), temperaturas (15, 23, 35 °C) y variables de agitación (mecánica a 150 rpm, agitación manual y sin agitación) en el incremento masivo de PGPR de *Solanum tuberosum* L. "papa". La medición de la concentración celular se realizó por el método de recuento en placa; determinando que *Bacillus pumilus* A2-09/08, *Bacillus amyloliquefaciens* B1-35/06 y *Pseudomonas putida* P1-20/08 alcanzaron porcentajes de incremento de 39243,0; 32601,9 y 46021,0% respectivamente. Debido a sus ventajas como facilidad de adquisición y

almacenamiento y menor tiempo de cocción fue seleccionado el sustrato natural cebada en la concentración 30%, considerándose promisorio para el incremento masivo de PGPR (Fernández, 2010).

La utilización de biofertilizantes comercial requiere el desarrollo de bioproductos competitivos respecto a los insumos químicos tradicionales. Se investigó la cinética del crecimiento de *Bacillus megaterium* BSFS y *Sphingomonas paucimobilis* BFS3 en un medio de cultivo definido, con cuatro niveles de aireación (0, 1, 2 ,3 vvm) y después en un medio de cultivo alternativo, compuesto por melaza con 1 y 3° Brix, hueso de bovino (5 gL⁻¹) y urea (0,5 gL⁻¹) como fuentes de carbono, fósforo y nitrógeno, respectivamente. En el medio de cultivo definido, con ambas bacterias, los mayores valores en la velocidad de crecimiento y concentración celular se alcanzaron con 1 vvm, siendo de 0,74 h⁻¹ y 10,34 UFCmL⁻¹ para *S. paucimobilis*, así como 0,73 h⁻¹ y 10,15 UFC mL⁻¹ para *B. megaterium*. Por su parte, el caldo melaza 1° Brix con 10,72 UFC mL⁻¹ (*B. megaterium*) y 10,74 UFCmL⁻¹ (*S. paucimobilis*) superó al medio definido con 10,50 y 10,20 UFCmL⁻¹, respectivamente. Se concluyó que la melaza es una alternativa para producir un inoculante con bajo costo de producción (Contreras *et al.*, 2011).

La biomasa de *Azotobacter chroococcum* puede ser utilizada como biofertilizante, por lo que se realizó la optimización de la producción utilizando diferentes medios y sistemas de cultivo. Se investigaron un medio químicamente definido y uno complejo, ambos con 20 gL⁻¹ de azúcar, en un biorreactor tipo tanque con agitación. El mayor rendimiento, $Y_{x/s} = 0,476 \text{ g g}^{-1}$ y productividad $Pr = 0,302 \text{ gL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ se alcanzaron en el medio complejo, con el sistema discontinuo “repetido”; en comparación con el medio químicamente definido, con 0,223 g g⁻¹ y 0,141 gL⁻¹ h⁻¹. Se concluyó que este medio y el sistema son los adecuados para el cultivo a gran escala de *A. chroococcum*, porque se logró la mayor productividad y estabilidad en el bioproceso (Damir *et al.*, 2011).

Para incrementar *Azotobacter* sp. en sustratos con el menor costo posible, se realizó un bioensayo con melaza y levadura bajo un diseño experimental

completamente aleatorio, con arreglo factorial 4 x 2 más el medio de referencia con tres repeticiones. Los factores correspondieron a dos fuentes de carbono (C1 , C2) y de nitrógeno (N1 , N2), cada una con dos niveles: un alto de 1,5 g y un bajo de 0,75 g para C1 y C2, así como 0,075 y 0,0375 g para N1 y 0,6 y 0,3 g para N2. El medio de cultivo alternativo con mayor significancia después de 24 horas fue T1 (1,5 g de melaza + 0,6 g de levadura para un volumen de 300 mL), en una concentración de $9,31 \text{ E} + 11 \text{ UFCmL}^{-1}$. Con la ecuación de la recta ajustada por el “mínimos cuadrados” se encontró una velocidad específica de crecimiento (μ) de $0,04761 \text{ h}^{-1}$ y un número de generaciones (n) de 6,59; a diferencia, del medio sintético de referencia T0 , que en el mismo tiempo obtuvo $5,44 \text{ E} + 11 \text{ UFCmL}^{-1}$ con una μ de $0,0397 \text{ h}^{-1}$ y n de 5,21. Se demostró posibilidad de utilizar la melaza y levadura para la producción de biofertilizantes (Hernández *et al.*, 2012).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Material biológico

El material biológico estuvo constituido por *Azotobacter* sp.UNPRG67 y por sustratos naturales de la región Lambayeque.

3.1.2 Población y muestra de estudio

Se consideró como población a las bacterias promotoras del crecimiento de plantas de maíz aisladas y caracterizadas en la sección de Biotecnología del laboratorio de Microbiología y Parasitología y la muestra no probabilística, por conveniencia, fue una bacteria identificada como *Azotobacter* sp.UNPRG67.

3.2 Métodos

3.2.1 Variables en estudio

Independiente

Sustratos naturales.

Dependiente

Concentración celular de *Azotobacter* sp.UNPRG67 (UFCmL⁻¹).

3.2.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

El trabajo de investigación fue experimental, conducido con un diseño completamente aleatorio, DCA (Hernández *et al.*, 2003).

3.2.3 Obtención de cultivo de trabajo

Azotobacter sp.UNPRG67 se cultivó en caldo nutritivo a 30 °C, 150 rpm, durante 24 horas y luego en agar Ashby – Sacarosa, durante 24 horas. A continuación, se seleccionaron cinco colonias características y se cultivaron en agar nutritivo durante 24 horas, constituyendo los cultivos de trabajo, que se incrementaron según los requerimientos y se guardaron en refrigeración (8 °C).

3.2.4 Formulación de medios de cultivo con base a sustratos naturales

Para determinar los componentes y formulación de los medios de cultivo para el incremento masivo de *Azotobacter* sp.UNPRG67 se realizó una revisión bibliográfica. Tomando como criterio el bajo costo y la disponibilidad en la región Lambayeque, se seleccionaron vainas de *Prosopis pallida* (H. et Bonpl. ex Willd.) H.B.K. “algarrobo”, granos de *Phaseolus vulgaris* L. “frijol”, granos de *Zea mays* L. “maíz”, granos quebrados o “ñielen” de *Oryza sativa* L. “arroz”, mesocarpio de *Cucurbita máxima* “zapallo”, tallo subterráneo de *Solanum tuberosum* L. “papa”, raíz de *Ipomoea batatas* L. “camote”, panca más melaza conocida comercialmente como “pancamel”, melaza, harina de pescado, estiércol de pollo o pollinaza y estiércol de *Cavia porcellus* “cuy”.

En un primer ensayo se prepararon 15 sustratos líquidos (Tabla 1, figura 1) se depositaron en cantidad de 100 mL en frascos de vidrio de 200 mL de capacidad (Figura 2) y se esterilizaron en autoclave a 121°C, 1 atmósfera de presión, durante 20 minutos. En un segundo ensayo se seleccionaron los cinco sustratos líquidos en los que se alcanzó el mayor valor en el NMP mL⁻¹ y se prepararon, suplementandolos con urea (0,01%) y ajustando el pH a 7. En el tercer ensayo se prepararon los cinco sustratos líquidos, así como también los sustratos sólidos mezclando 10 g de pajilla de arroz con 30 mL de sustrato líquido. En los tres ensayos se utilizó como testigo sintético el medio mineral sin nitrógeno, MMSM (Anexo 1).

Tabla 1. Componentes y preparación de los medios de cultivo en base a sustratos naturales

Tratamientos	Componentes principales	Preparación
T1	<i>Prosopis pallida</i> L. “algarroba”	Pesar 300 g de vainas de algarrobas trituradas (0.5 - 1 cm) y hervir en 1000 mL de agua destilada durante 8 minutos. Filtrar en gasa por dos veces y completar a 1000 mL con agua destilada.
T2	<i>Phaseolus vulgaris</i> L “frejol”	Pesar 300 g de granos frejol previamente triturados (0.3 - 0.8cm) y hervir en 1000 mL de agua destilada durante 8 minutos. Filtrar en gasa por dos veces y completar a 1000 ml con agua destilada
T3	Pollinaza	Pesar 150 g de excremento de pollo, hervir en 1000 mL de agua destilada durante 8 minutos. Filtrar en gasa por dos veces y completar a 1000 mL con agua destilada.
T4	Melaza	Medir 1000 mL de agua destilada, agregar 50 mL de melaza. Mezclar.
T5	Pancamel	Pesar 300 g de pancamel (0.3- 0.5 cm) y hervir en 1000 mL de agua destilada durante 8 minutos. Filtrar en gasa por dos veces y completar a 1000 mL con agua destilada.
T6	<i>Zea mays</i> L. “maíz”	Pesar 300 g de maíz triturado (0.2- 0.4 cm) y hervir en 1000 mL de agua destilada durante 8 minutos. Filtrar en gasa por dos veces y completar a 1000 mL con agua destilada.
T7	Residuos de <i>Oryza sativa</i> L. “arroz”(Ñielen) + urea	Pesar 300 g de ñielen y hervir en 1000 mL de agua destilada durante 8 minutos. Filtrar en gasa por dos veces, completar a 1000 mL con agua destilada. Agregar 0.1 urea (45% N).
T8	Ñielen + melaza	Pesar 300 g de ñielen y hervir en 1000 mL de agua destilada durante 8 minutos. Filtrar en gasa por dos veces, completar a 1000 mL con agua destilada. Agregar 1 mL de melaza.
T9	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. “frejol” + estiercol de cuy	Pesar 150 g de frejol previamente triturado y 150 g de estiércol de cuy, hervir en 1000 mL de agua destilada durante 8 minutos. Filtrar en gasa por dos veces y completar a 1000 mL con agua destilada.
T10	Melaza + urea	Medir 1000 mL de agua destilada, agregar 50 mL de melaza y 0.1 g de urea (45% N).
T11	<i>Prosopis pallida</i> L. “algarroba” + harina de pescado	Pesar 150 g de algarroba y 150 g de harina de pescado, hervir en 1000 mL de agua Durante 8 minutos. Filtrar en gasa por dos veces, completar a 1000 mL con agua destilada.
T12	<i>Cucurbita máxima</i> “zapallo” + melaza (30 %)	Pesar 300 mL de zapallo y hervir en 1000 mL de agua destilada durante 8 minutos. Filtrar en gasa por dos veces y completar a 1000 mL con agua destilada. Agregar 1 mL de melaza.
T13	<i>Solanum tuberosum</i> L. “papa” + melaza (30 %)	Pesar 300 g de papa y hervir en 1000 mL de agua destilada durante 8 minutos. Filtrar en gasa por dos veces y completar a 1000 ml. Agregar 1 mL de melaza.
T14	<i>Ipomoea batatas</i> L. “camote” + melaza (30 %)	Pesar 300 g de camote y hervir en 1000 mL de agua destilada durante 8 minutos. Filtrar en gasa por dos veces y completar a 1000 ml. Agregar 1 mL de melaza.
T15	Estiercol de cuy + melaza (30%)	Pesar 150 g de estiércol de cuy y hervir en 1000 mL de agua destilada durante 8 minutos. Filtrar en gasa por dos veces y completar a 1000 ml. Agregar 1 mL de melaza.

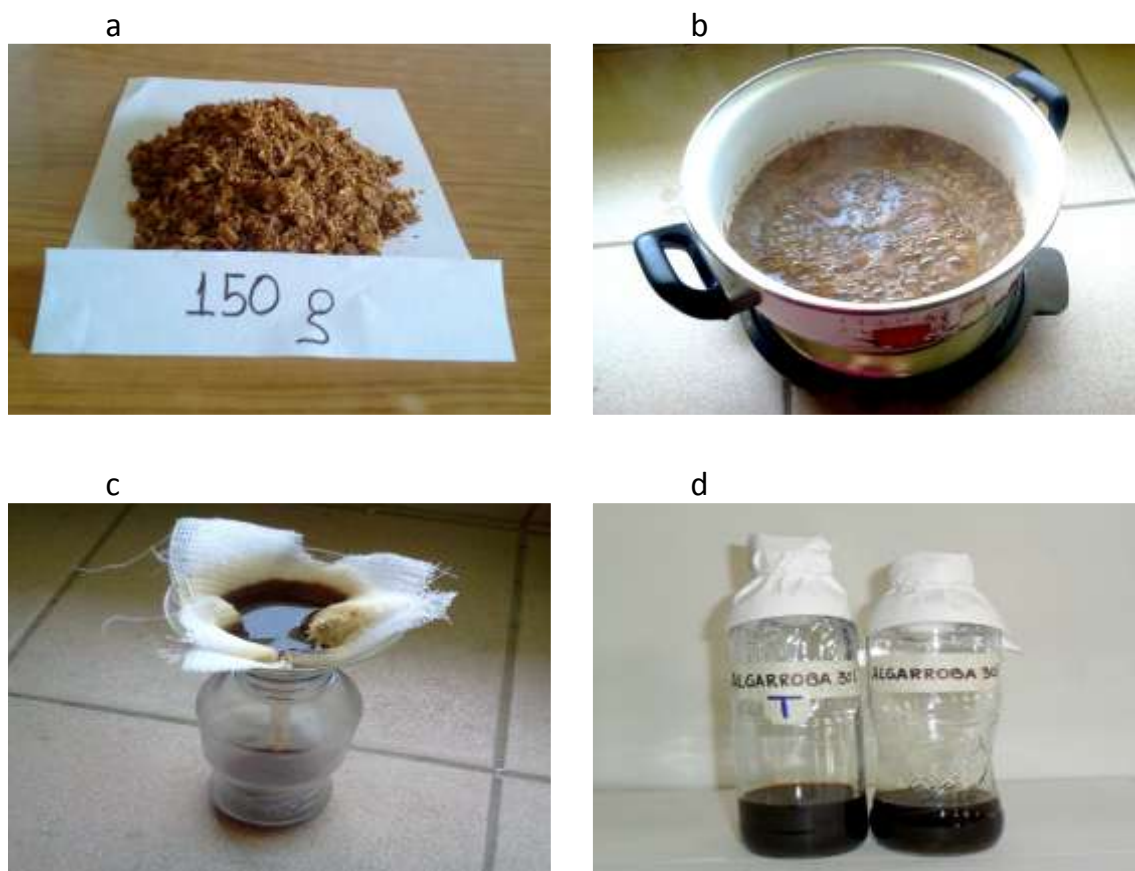


Figura 1. Preparación del sustrato Caldo algarroba (a) Pesado de la algarroba, (b) Cocinado, (c) Filtrado, (d) Caldo algarroba.



Figura 2. Sustratos naturales para el incremento masivo de *Azotobacter* sp.UNPRG67.

3.2.5 Análisis físico químico de los sustratos naturales

Para determinar el contenido de carbono, nitrógeno y humedad se realizó el análisis físico – químico de los sustratos naturales investigados en el laboratorio Colecbi S.A.C - Chimbote. La humedad se determinó por el método gravimétrico de la estufa y el contenido de ceniza por el método de incineración directa. Después, se calculó el contenido de materia orgánica, restando los porcentajes de materia seca y ceniza. El valor obtenido se dividió entre 1,8 obteniendo el porcentaje de carbono. A su vez, el nitrógeno se determinó por el método de Kjeldahl.

3.2.6 Número más probable, NMP, de *Azotobacter* sp. nativa en sustratos naturales líquidos

Para determinar el NMP de *Azotobacter* sp.UNPRG67 en los sustratos naturales se realizaron dos ensayos. En ambos casos, la bacteria nativa se cultivó en agar nutritivo durante 24 horas y después se obtuvo una suspensión bacteriana en solución salina esterilizada (NaCl 0,85% p/v), que fue centrifugada por dos veces consecutivas a 3000 rpm, durante 5 minutos y luego fue resuspendida con solución salina, estandarizando su concentración a 9×10^8 UFCmL⁻¹ por espectrofotometría a 600 nm y recuento en placa vertida. En el primero ensayo la suspensión bacteriana estandarizada se inoculó (1%) por triplicado en 15 sustratos naturales líquidos (Figura 3), incubándose a 30 °C, 150 rpm, durante 24 horas.

Después de la incubación, se determinó el número de bacterias por el método del número más probable, descrito por Wurdig (2003), según el cual se realizaron diluciones de cada sustrato natural en solución salina esterilizada, hasta 10^{-4} y de las tres últimas diluciones se inoculó 1mL por triplicado en 10 mL de medio mineral sin nitrógeno, incubándose a 30 °C, por 5 días. Para la lectura según Rico (2009) se consideraron positivos aquellos tubos donde se observó viraje del indicador al amarillo, turbidez y película superficial, realizándose el cálculo correspondiente en la tabla de Mc Grady (Anexo 2).



Figura 3. Inoculación del sustrato natural líquido algarroba.

En el segundo ensayo la suspensión bacteriana estandarizada se inoculó (1%) por triplicado en los cinco sustratos naturales líquidos, donde se alcanzaron los mayores valores en el NMP, realizándose la incubación y la determinación del número de bacterias de manera similar al primer ensayo (Figura 4).

3.2.7 Concentración celular de *Azotobacter* sp. nativa en sustratos naturales líquidos y sólidos

Para determinar la concentración celular de *Azotobacter* sp.UNPRG67 en los sustratos naturales se realizaron tres ensayos. Se obtuvo una suspensión bacteriana, cuya concentración fue estandarizada previamente y se inoculó (1%) por triplicado en cinco sustratos naturales líquidos y sus correspondientes sustratos sólidos (Figura 5).

Después de la incubación a 30 °C, durante 24 horas se determinó la concentración celular mediante el método de recuento en placa por incorporación, descrito por Fernández (2010). Se tomaron muestras de 1 mL de cada uno de los cultivos y se realizaron diluciones en solución salina NaCl 0,85%, p/v hasta 10^{-9} en todos los sustratos, a excepción del sustrato sólido pajilla-melaza (10^{-11}). De las tres últimas diluciones se tomaron por duplicado alícuotas de 1 mL y se depositaron en placas de Petri esterilizadas. A continuación, se vertieron 15 mL de medio Ashby – Sacarosa (Anexo 3), se homogenizó el cultivo y se incubó durante 30 °C, por 48 horas. Después de la incubación se realizó el conteo de colonias en las placas que presentaron 30 a 300 colonias y se calculó la concentración final expresada en UFCmL⁻¹ o UFCg⁻¹.

3.2.8 Selección de un sustrato natural líquido y sólido

Con base a la concentración celular de *Azotobacter* sp.UNPRG67 se seleccionaron los sustratos líquido y sólido, en los que se alcanzó los mayores valores.



Figura 4. Inoculación del medio mineral sin nitrógeno para determinar el número más probable de *Azotobacter* sp.UNPRG67.



Figura 5. Sustratos sólidos cultivados con *Azotobacter* sp.UNPRG67.

3.2.9 Cuantificación del ácido indolacético producido, nitrógeno fijado y fosfato solubilizado

La bacteria *Azotobacter* sp.UNPRG67 fue reaislada de los sustratos naturales líquidos y sólidos seleccionados y después se cuantificó el ácido indolacético producido, nitrógeno fijado y fosfato solubilizado.

a. Cuantificación de ácido indolacético (AIA) producido *in vitro*

Para la cuantificación de ácido indolacético producido *in vitro* según la reacción colorimétrica de Salkowski, descrita por Mantilla (2007) y García & Muñoz (2010), cada bacteria nativa cultivada en agar nutritivo se inoculó en 5 mL de caldo tripticasa soya suplementado con triptófano (Anexo 4). Después de la incubación a 30 °C, por 72 horas en agitación constante (150 rpm), los cultivos fueron centrifugados a 2000 rpm, durante 5 minutos. A continuación, 0,4 mL de cada uno de los sobrenadantes se depositaron en tubos, se agregó 1,6 mL de reactivo de Salkowski modificado en una relación 1:4, se mezclaron y se dejaron en reposo durante 30 minutos en oscuridad. La positividad a la producción de ácido indolacético 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 se obtuvo con diluciones sucesivas de una solución 100 ppm de ácido indolacético.

b. Cuantificación de nitrógeno *in vitro*

Para la cuantificación del nitrógeno fijado *in vitro* por las bacterias nativas, se utilizó el método colorimétrico del fenolhipoclorito descrito por Lara *et al.* (2007) y Cadena & Martinez (2011). Cada una de las bacterias nativas cultivadas en agar nutritivo por 24 horas, fueron inoculadas en tubos de 15 x 150 mL, conteniendo 3 mL de caldo extracto de suelo 10% (Anexo 5) y se incubaron a 30 °C, por 72 horas, en agitación constante (150 rpm). A continuación, se agregaron 9 mL de KCl 2M, se agitaron a 150 rpm durante 1 hora y se dejó en reposo por 1 hora adicional, para después tomar 10 mL del sobrenadante y centrifugarlos (2000 rpm) durante 3 minutos. Luego, los sobrenadantes se vertieron en tubos de dilución y 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. Los tubos se agitaron para mezclar y después se

dejaron en reposo durante 1 hora adicional. La positividad a la fijación de nitrógeno estuvo dada por una coloración azul y se leyó la absorbancia es espectrofotómetro de luz visible a 632,9 nm. Las concentraciones se calcularon en una recta patrón obtenida con diluciones sucesivas de una solución de 100 ppm de cloruro de amonio.

c. Cuantificación de fosfato solubilizado *in vitro*

Para la cuantificación de fosfato solubilizado, según Vázquez *et al.* (2000), las bacterias fueron cultivadas en 1 mL de caldo Sundara Rao Sinha Medium, SRSM a 30 °C, durante 20 horas, en agitación constante (150 rpm). A continuación, 0,6 mL de cada cultivo bacteriano fueron inoculados en frascos con 20 mL de caldo SRSM (Figura 6), e incubados a 30 °C, con agitación constante (150 rpm), por 96 horas. Después, los caldos fueron centrifugados y en el sobrenadante se cuantificó el fosfato soluble mediante el método colorimétrico del molibdato según Rodier & Rodi, 2005 (Anexo 6).

3.2.10 Poder germinativo de maíz por efecto de *Azotobacter* sp. nativa cultivada en sustratos naturales

Para determinar el poder germinativo de maíz según Barba y Bravo (2012) se utilizaron bandejas de tecnopor de 20 x 14 cm, en cuyo fondo se colocaron cuatro capas de papel toalla esterilizado y humedecido con agua destilada esterilizada y con la ayuda de pinzas esterilizadas, se depositaron 20 semillas de maíz previamente inoculadas con *Azotobacter* sp.UNPRG67 (en dos hileras a razón de 10 semillas por hilera). El procedimiento se realizó por triplicado para cada uno de los sustratos naturales investigados (Figuras 7, 8, 9), teniendo como testigos semillas tratadas con caldo Ashby Sacarosa inoculado y agua destilada. Las bandejas se taparon y se mantuvieron a temperatura ambiente, realizando riegos interdiariamente.

Después de 7 días de instalado el ensayo, según Pérez *et al.* (2007), Méndez *et al.* (2008) y FAO (2011), se contaron las semillas germinadas, para determinar la germinación (%), diferenciando plántulas normales (PN), plántulas anormales (PPA) y semillas no germinadas (SNG). Después, con el número de plántulas normales, se calculó el poder germinativo (%).



Figura 6. *Azotobacter* sp.UNPRG67 cultivada en caldo SRSM.



Figura 7. Inoculación de semillas de *Zea mays* L. con *Azotobacter* sp. UNPRG67 cultivada en sustrato líquido algarroba.



Figura 8. Semillas de maíz inoculadas con *Azotobacter* sp.UNPRG67 cultivada en pajilla-melaza.



Figura 9. Prueba para determinar el poder germinativo de *Zea mays* L.

3.2.11 Análisis de los datos

Los datos obtenidos fueron ordenados en tablas y figuras. Se realizó el análisis de variancia de la concentración celular de *Azotobacter* sp.UNPRG67 en los sustratos naturales líquidos y sólidos seleccionados, así como del ácido indolacético producido, nitrógeno fijado como amonio y fosfato solubilizado por la bacteria reislada y la superioridad entre los tratamientos se determinó mediante la prueba múltiple de Tukey o la prueba de Kruskal – Wallis, con un nivel de significancia de 0,05 (Hernández *et al.*, 2003). En el presente trabajo se utilizó el Software estadístico SPSS versión 15.0, así como los programas Microsoft Office Word y Excel versión 2007.

IV. RESULTADOS

4.1 Medios de cultivo formulados con sustratos naturales

Los sustratos naturales seleccionados para formular los medios de cultivo fueron productos agrícolas: granos de maíz, arroz, frejol, vainas de algarrobo, raíces de camote, tubérculos de papa, frutos de zapallo; residuos industriales: melaza, pancamel y residuos pecuarios: pollinaza y estiércol de cuy (Tabla 2). Según el análisis físico – químico, el contenido de carbono osciló entre 18,48 y 54,72% para la pollinaza y maíz respectivamente. El contenido de nitrógeno osciló entre 0,08 y 3,21% para el zapallo y frejol respectivamente. A su vez, la humedad osciló entre 9,36 y 89,00% para el ñielen y zapallo respectivamente.

4.2 Número más probable de *Azotobacter* sp.UNPRG67 nativa en sustratos naturales líquidos

En el 80% de los sustratos naturales investigados se evidenció crecimiento de *Azotobacter* sp.UNPRG67 (Figura 10). En la determinación del número más probable usando el medio mineral sin nitrógeno, MNSN el desarrollo bacteriano se determinó por un velo superficial, con viraje del indicador azul de bromotimol al amarillo (Figuras 11, 12).

Tabla 2. Contenido (%) de carbono, nitrógeno y humedad de sustratos naturales* utilizados en la formulación de medios de cultivo para el incremento de *Azotobacter* sp.UNPRG67

Sustratos naturales	C %	N %	H %
Productos Agrícolas			
Granos de <i>Zea mays</i> L. “maíz”	54,72	1,69	10,00
Granos quebrados de <i>Oryza sativa</i> L. “arroz”	54,68	1,34	9,36
Vainas de <i>Prosopis pallida</i> L. “Algarrobo”	53,61	1,30	10,00
Raíces de <i>Ipomoea batatas</i> L. “camote”	54,02	0,26	69,00
<i>Solanum tuberosum</i> L. “papa”	54,44	1,12	70,00
Fruto <i>Cucurbita máxima</i> “zapallo”	54,17	0,08	89,00
Granos de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. “frejol”	53,44	3,21	10,00
Residuos industriales			
Melaza	50,56	1,00	26,40
Pancamel	40,00	0,88	15,00
Residuos pecuarios			
Pollinaza	18,48	1,89	71,00
Estiercol de <i>Cavia porcellus</i> “cuy”	32,85	1,95	25,00

*Laboratorio Colecibi S.A.C, Chimbote



Figura 10. Sustrato líquido melaza + urea cultivado con *Azotobacter* sp.

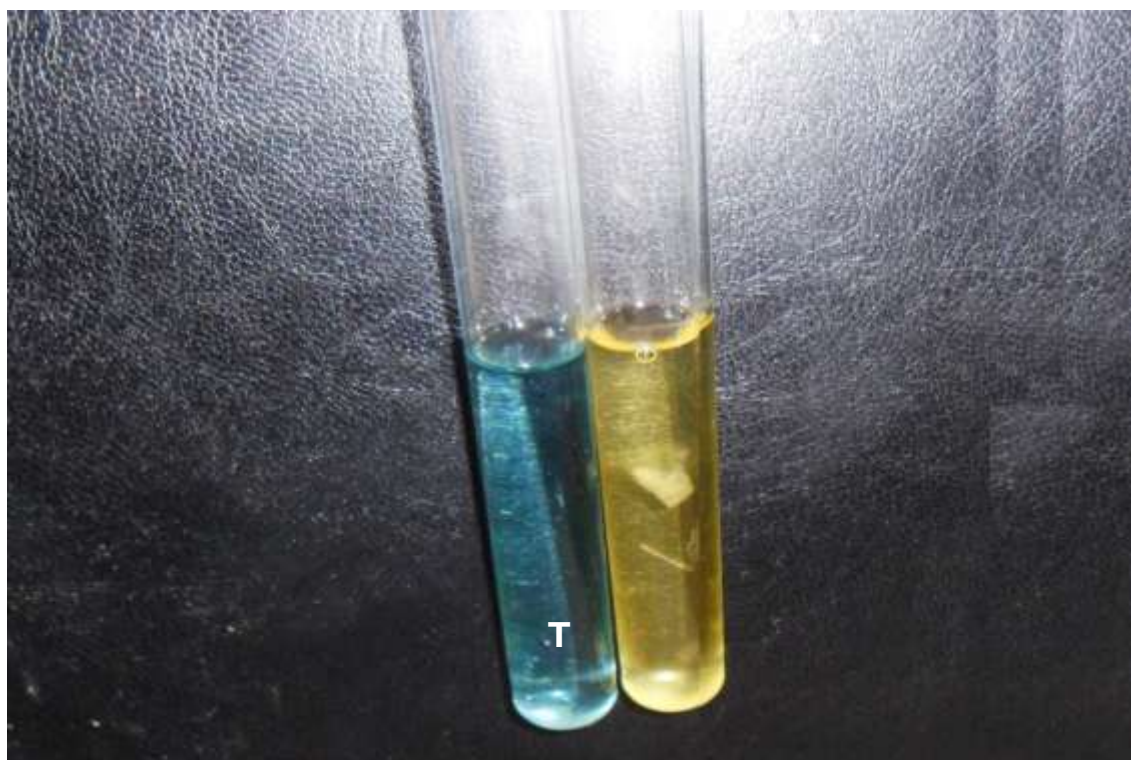


Figura 11. Virage del indicador y velo desarrollado por *Azotobacter* sp. en medio mineral sin nitrógeno.

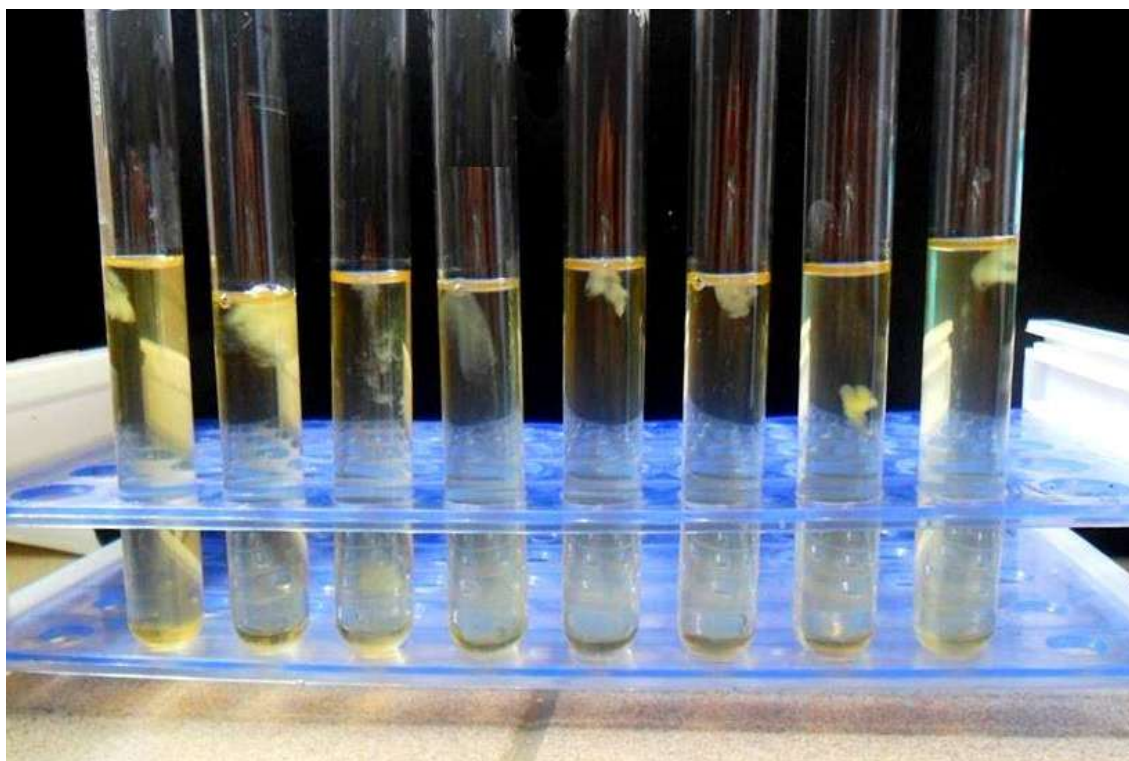


Figura 12. Crecimiento de *Azotobacter* sp. en medio mineral sin nitrógeno.

El número de bacterias (Tabla 3) osciló entre 300 NMP mL⁻¹ para T3 (pollinaza), T4 (melaza), T9 (frejol + estiércol de cuy) y T12 (zapallo + melaza) y 45 000 NMP mL⁻¹ para los sustratos T10 (melaza + urea) y T2 (frejol). Los sustratos, T1 (algarroba), T6 (maíz), T5 (pancamel), T11 (algarroba + harina de pescado), T14 (camote + melaza), T13 (papa + melaza) alcanzaron valores entre 400 y 30 000 NMP mL⁻¹. A su vez, en el testigo sintético medio mineral sin nitrógeno se obtuvo 7 500 NMP mL⁻¹. No se observó crecimiento en los sustratos T7 (ñielen + urea), T8 (ñielen + melaza), T15 (estiércol de cuy + melaza).

Los cinco sustratos naturales en los que se alcanzaron los mayores valores en el NMP de células (Tabla 4) se suplementaron con urea como fuente de nitrógeno, alcanzándose 140 000 NMP mL⁻¹ en T1 (algarroba), T4 (melaza) y T2 (frejol). Estos sustratos superaron al testigo sintético medio mineral sin nitrógeno con el que se obtuvo 7 500 NMP mL⁻¹. Con los sustratos T6 (maíz) y T5 (pancamel) se alcanzó 7 500 y 4 500 NMP mL⁻¹ respectivamente.

4.3 Concentración celular de *Azotobacter* sp.UNPRG67 nativa en sustratos naturales

La concentración celular de *Azotobacter* sp.UNPRG67 en los sustratos naturales líquidos seleccionados osciló entre 29x10⁷ UFCmL⁻¹ en T5 (pancamel + urea) y 44x10⁹ UFCmL⁻¹ en T1 (algarroba + urea), correspondientes a incrementos de 3122,2 y 488788,9%, respectivamente (Tabla 5). Con los valores de la concentración celular en los sustratos líquidos y sólidos se contrastó la normalidad de los datos (Anexo 7). La hipótesis planteada fue H₀: Los datos siguen una distribución normal vs H₁: Los datos no siguen una distribución normal. Cuando los puntos se ubicaron en el cinturón se aceptó la hipótesis nula, indicando que las muestras, así como la población de la que provienen tienen una distribución normal (p>0,05).

Para la prueba de homogeneidad de varianza la hipótesis planteada fue H₀: Las varianzas son homogéneas vs H₁: La varianzas no son homogéneas. Según el test de Bartlett, cuando los valores de “p” fueron mayores de 0,05 se aceptó la hipótesis nula, indicando que las varianzas son homogéneas (Anexo 8).

Tabla 3. Número más probable, NMP de *Azotobacter* sp.UNPRG67 en quince sustratos naturales líquidos

Sustratos	Tubos positivos en réplicas de tres por dilución			NMP mL ⁻¹
	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	
Melaza + urea (T10)	3	3	1	45 000
Frejol (T2)	3	3	1	45 000
Algarroba (T1)	3	2	3	30 000
Maíz (T6)	2	0	1	1 400
Pancamel (T5)	2	0	0	900
Algarroba + harina de pescado (T11)	1	1	0	700
Camote + melaza (T14)	1	0	1	700
Papa + melaza (T13)	1	0	0	400
Pollinaza (T3)	0	1	0	300
Melaza (T4)	0	0	1	300
Frejol + estiercol de cuy (T9)	0	1	0	300
Zapallo + melaza (T12)	0	1	0	300
Ñielen + úrea (T7)	0	0	0	0
Ñielen + melaza (T8)	0	0	0	0
Estiercol de cuy + melaza (T15)	0	0	0	0
Medio mineral sin nitrógeno (Testigo)	3	1	1	7 500

Tabla 4. Recuento de *Azotobacter* sp.UNPRG67 en cinco sustratos naturales

Sustratos naturales	Tubos positivos en réplicas de tres por dilución			NMP mL ⁻¹
	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	
Algarroba + urea (T1)	3	3	3	140 000
Melaza + urea (T10)	3	3	3	140 000
Frejol + urea (T2)	3	3	3	140 000
Maíz + urea (T6)	3	1	1	7 500
Pancamel + urea (T5)	3	1	0	4 500
Medio mineral sin nitrógeno (Testigo)	3	1	1	7 500
líquidos suplementados con urea				

Tabla 5. Concentración celular (UFCmL⁻¹) de *Azotobacter* sp.UNPRG67 en cinco sustratos naturales líquidos suplementados con urea

Sustratos líquidos	UFCmL ^{-1*}	Incremento (%)
Algarroba + urea (T1)	44 x 10 ⁹	488788,9
Melaza + urea (T10)	20 x 10 ⁹	222122,2
Frejol + urea (T2)	23 x 10 ⁸	25455,6
Maíz + urea (T6)	84 x 10 ⁷	9233,3
Pancamel + urea (T5)	29 x 10 ⁷	3122,2
Caldo Ashby (Testigo)	69 x 10 ⁷	7566,7

*Promedio de tres repeticiones

La prueba “F” del análisis de varianza de la concentración celular de *Azotobacter* sp.UNPRG67 en los sustratos líquidos resultó altamente significativa para los tratamientos, evidenciando que existió efecto de los sustratos en la concentración celular y según la prueba múltiple de Kruskal – Wallis ($\alpha=0,05$) el mayor valor se alcanzó con T1 (algarroba) diferenciándose significativamente de los testigos (Tabla 6, figura 13).

La concentración celular de *Azotobacter* sp.UNPRG67 en los sustratos naturales sólidos (Tabla 7) osciló entre 12×10^9 UFCmL⁻¹ en T5s (pajilla - pancamel) y 20×10^{11} UFCmL⁻¹ en T10s (pajilla-melaza), correspondientes a incrementos de 133233,3 y 22222122,2%, respectivamente. La prueba “F” del análisis de varianza resultó altamente significativa para los tratamientos, evidenciando que existió efecto de los sustratos en la concentración celular y según la prueba múltiple de Kruskal – Wallis ($\alpha=0,05$) el mayor valor se alcanzó con T10s (pajilla-melaza), diferenciándose significativamente de los testigos (Tabla 8).

4.4 Sustratos naturales seleccionados

Los sustratos naturales T1 (algarroba) y T10s (pajilla-melaza) fueron seleccionados, debido a que alcanzaron la mayor concentración celular en el sustrato líquido (44×10^9 UFCmL⁻¹) y sólido (20×10^{11} UFCmL⁻¹), respectivamente (Tabla 9), comparado con los testigos sintéticos caldo Ashby (69×10^7 UFCmL⁻¹) y pajilla-Ashby (60×10^8 UFCmL⁻¹).

4.5 Ácido indolacético producido, nitrógeno fijado y fosfato solubilizado

Azotobacter sp.UNPRG67 reislada de los sustratos naturales líquido y sólido, seleccionados sintetizó ácido indolacético, fijó nitrógeno y solubilizó fosfato (Tablas 10,11,12). La concentración de ácido indolacético fue 29,540 ppm con T1 (algarroba); 29,503 ppm con T10s (pajilla-melaza); así como, 29,034 ppm y 29,642 ppm en los testigos caldo y agar Ashby (Tabla 10, anexo 9). A su vez, la concentración de amonio fue de 25,317 ppm con T1 (algarroba); 25,356 ppm con T10s (pajilla + melaza); así como 25,360 y 25,102 ppm con los testigos caldo y agar Ashby (Tabla 11, anexo 10).

Tabla 6. Prueba de Kruskal Wallis para los promedios de la concentración celular de *Azotobacter* sp.UNPRG67 en cinco sustratos líquidos suplementados con urea

Tratamientos	UFCmL ⁻¹ *	Significancia
Algarroba + urea (T1)	44 x 10 ⁹	a
Melaza + urea (T10)	20 x 10 ⁹	ab
Frejol + urea (T2)	23 x 10 ⁸	abc
Maíz + urea (T6)	84 x 10 ⁷	bcd
Pancamel + urea (T5)	29 x 10 ⁷	cd
Caldo Ashby (Testigo)	69 x 10 ⁷	d

* Promedio de tres repeticiones

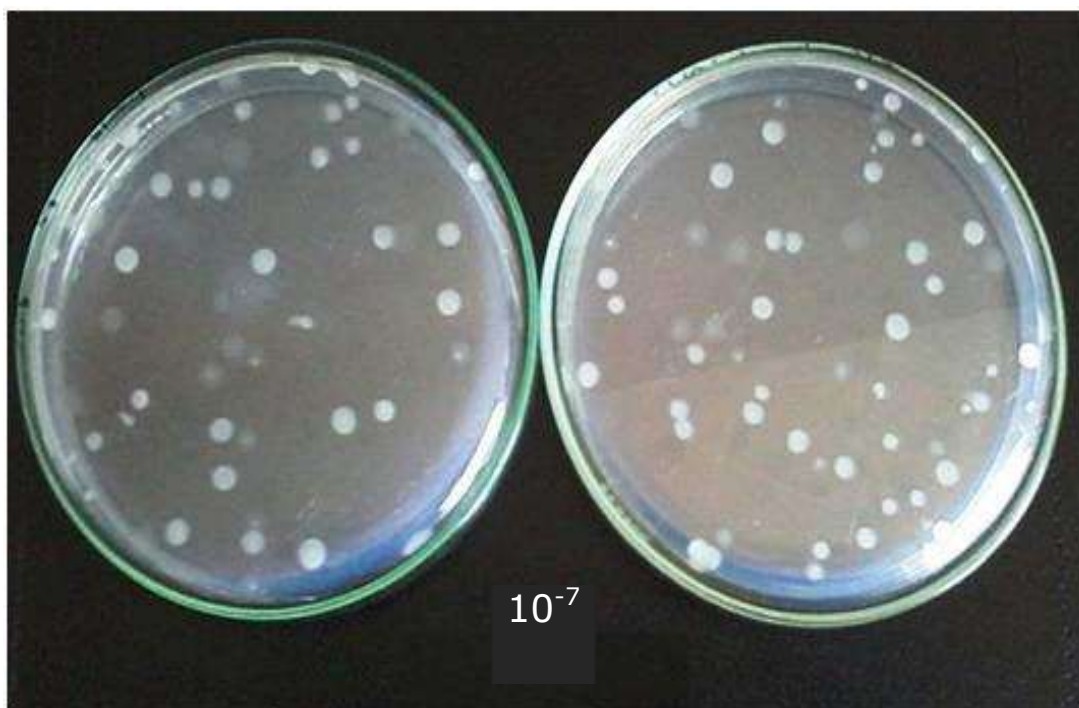


Figura 13. Colonias de *Azotobacter* sp.UNPRG67 en medio Ashby-Sacarosa.

Tabla 7. Concentración celular (UFCmL⁻¹) de *Azotobacter* sp.UNPRG67 en cinco sustratos naturales sólidos suplementados con urea

Tratamientos	UFCmL ^{-1*}	Incremento (%)
Pajilla- melaza (T10s)	20 x 10 ¹¹	22222122,2
Pajilla-algarroba (T1s)	53 x 10 ¹⁰	5888788,9
Pajilla-frejol (T2s)	67 x 10 ⁹	744344,4
Pajilla- maíz (T6s)	57 x 10 ⁹	633233,3
Pajilla - pancamel (T5s)	12x 10 ⁹	133233,3
Pajilla –medio Ashby (Testigo)	60 x 10 ⁸	66566,7

*Promedio de tres repeticiones

Tabla 8. Prueba de Kruskal Wallis para los promedios de la concentración celular de *Azotobacter* sp.UNPRG67 en cinco sustratos sólidos suplementados con urea

Tratamientos	UFCmL ⁻¹	Significancia
Pajilla- melaza (T10s)	20 x 10 ¹¹	a
Pajilla-algarroba (T1s)	53 x 10 ¹⁰	ab
Pajilla- frejol (T2s)	67 x 10 ⁹	abc
Pajilla-maiz (T6s)	57 x 10 ⁹	bcd
Pajilla - pancamel (T5s)	12x 10 ⁹	cd
Pajilla –medio Ashby (Testigo)	60 x 10 ⁸	d

Tabla 9. Concentración celular de sustratos naturales seleccionados para el incremento masivo de *Azotobacter* sp.UNPRG67

Tratamientos	Concentración celular (UFCmL ⁻¹)
Algarroba (T1)	44 x 10 ⁹
Pajilla-melaza (T10s)	20 x 10 ¹¹
Caldo Ashby (Testigo)	69 x 10 ⁷
Pajilla-Ashby (Testigo)	60 x 10 ⁸

Tabla 10. Ácido indolacético (ppm) producido por *Azotobacter* sp.UNPRG67 reaislada de caldo algarroba y pajilla-melaza

Tratamientos	Ácido indolacético (ppm)			
	r1	r2	r3	\bar{x}
Algarroba (T1)	29,133	29,022	30,466	29,540
Pajilla-melaza(T10s)	29,688	29,800	29,022	29,503
Caldo Ashby (Testigo)	29,577	29,499	28,026	29,034
Agar Ashby (Testigo)	29,568	30,302	29,056	29,642

Tabla 11. Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por *Azotobacter* sp.UNPRG67 reaislada de caldo algarroba y pajilla melaza

Tratamientos	Amonio (ppm)			
	r1	r2	r3	\bar{X}
Algarroba (T1)	25,053	25,418	25,479	25,317
Pajilla-melaza(T10s)	25,434	24,980	25,654	25,356
Caldo Ashby (Testigo)	25,575	25,479	25,026	25,360
Agar Ashby (Testigo)	24,925	25,368	25,013	25,102

Por su parte, la concentración de fosfato solubilizado fue 3,496 ppm con T1 (algarroba); 3,360 ppm con T10s (pajilla + melaza); así como 3,407 y 3,369 ppm con los testigos caldo y agar Ashby (Tabla 12, anexo 11).

La prueba “F” del análisis de varianza de los promedios de las concentraciones de ácido indolacético, amonio y fosfato resultó no significativa, evidenciando que no existió efecto de los sustratos en las variables investigadas (Tablas 13, 14 y 15).

4.6 Poder germinativo de semillas de *Zea mays* “amarillo duro” por efecto de *Azotobacter* sp.UNPRG67 cultivado en sustratos naturales

La germinación de las semillas de maíz (Figuras 14, 15) por efecto de *Azotobacter* sp. cultivada en los sustratos naturales seleccionados fue 95% en T10s (pajilla-melaza) y 93% en T1 (algarroba), similar a 93% con el testigo Caldo Ashby (Tabla 16). Asimismo, el poder germinativo (Figura 16) fue 84% con T10s, 80% con T1 y 80% con el testigo Caldo Ashby. Por su parte, el poder germinativo de maíz se incrementó por efecto de *Azotobacter* sp. cultivada en los sustratos naturales seleccionados (80 - 84%) y Caldo Ashby (80%), superando al testigo agua destilada con 77%.

Tabla 12. Fosfato solubilizado (ppm) por *Azotobacter* sp.UNPRG67 reaislada de caldo algarroba y pajilla-melaza

Tratamientos	Fósforo (ppm)			
	r1	r2	r3	\bar{x}
Algarroba (T1)	3,473	3,620	3,394	3,496
Pajilla-melaza(T10s)	3,326	3,324	3,429	3,360
Caldo Ashby (Testigo)	3,555	3,095	3,571	3,407
Agar Ashby (Testigo)	3,598	3,392	3,117	3,369

Tabla 13. Análisis de varianza de la concentración de ácido indolacético (ppm) producido por *Azotobacter* sp.UNPRG67 reaislada de caldo algarroba y pajilla melaza

$$H_0 = \mu A_1 = \mu A_2 = \mu A_3 = \mu A_4$$

H_a = Al menos una media es diferente

Fuente de variación	GL	SC	CM	F_c	p	Sign	Decisión
Tratamiento	3	0,66	0,22	0,44	0,7285	NS	Acepta H_0
Error	3	3,96	0,49				
Total	11	4,61					

Tabla 14. Análisis de varianza de la concentración de nitrógeno fijado como amonio (ppm) por *Azotobacter* sp.UNPRG67 reislada de caldo algarroba y pajilla melaza

$$H_0 = \mu A_1 = \mu A_2 = \mu A_3 = \mu A_4$$

H_a = Al menos una media es diferente

Fuente de variación	GL	SC	CM	F_c	p	Sign	Decisión
Tratamiento	3	0,14	0,05	0,58	0,6453	NS	Acepta H_0
Error	8	0,62	0,08				
Total	11	0,76					

Tabla 15. Análisis de varianza de la concentración de fosfato solubilizado (ppm) por *Azotobacter* sp.UNPRG67 reislada de caldo algarroba y pajilla melaza

$$H_0 = \mu A_1 = \mu A_2 = \mu A_3 = \mu A_4$$

H_a = Al menos una media es diferente

Fuente de variación	GL	SC	CM	F_c	p	Sign	Decisión
Tratamiento	3	0,03	0,01	0,31	0,8165	NS	Acepta H_0
Error	8	0,30	0,04				
Total	11	0,33					

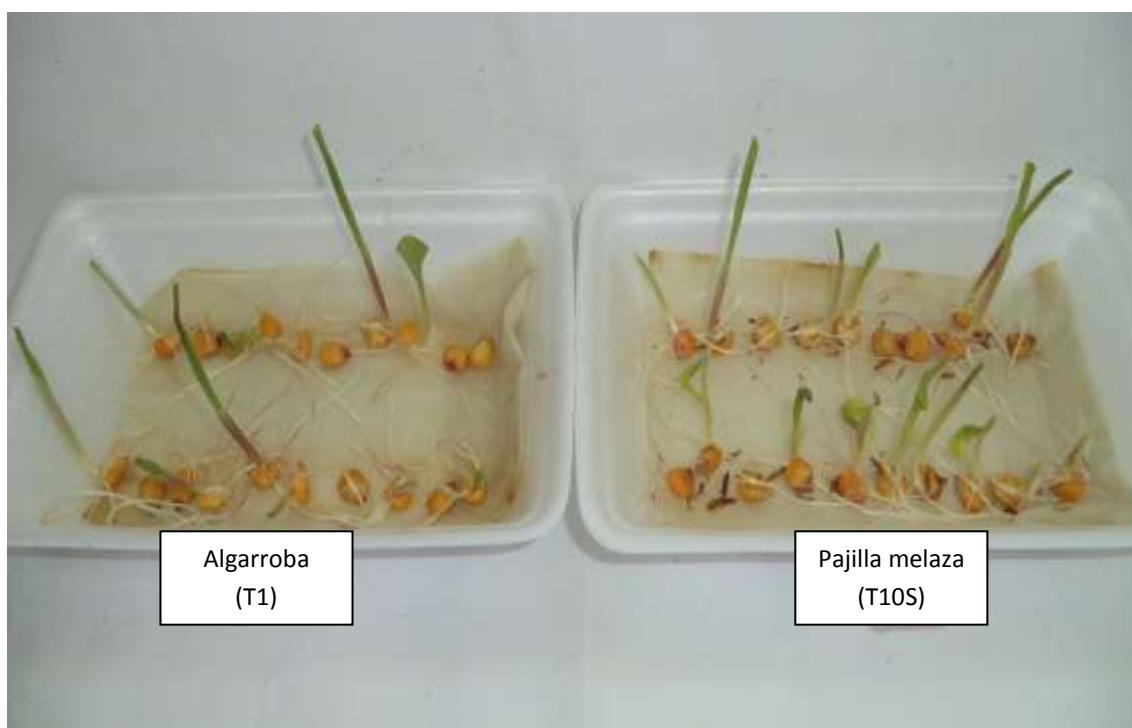


Figura 14. Germinación de semillas de *Zea mays* por efecto de *Azotobacter* sp.UNPRG67 cultivada en caldo algarroba y pajilla – melaza.

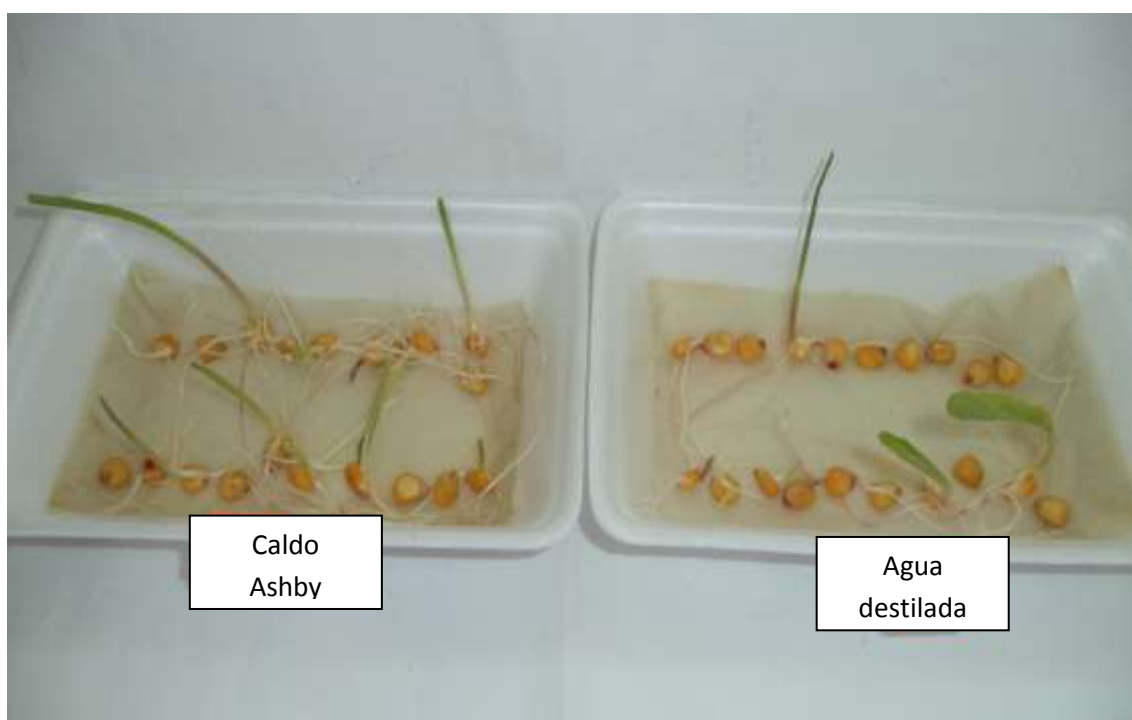


Figura 15. Germinación de semillas de *Zea mays*. por efecto de *Azotobacter* sp.UNPRG67 cultivada en caldo Ashby.

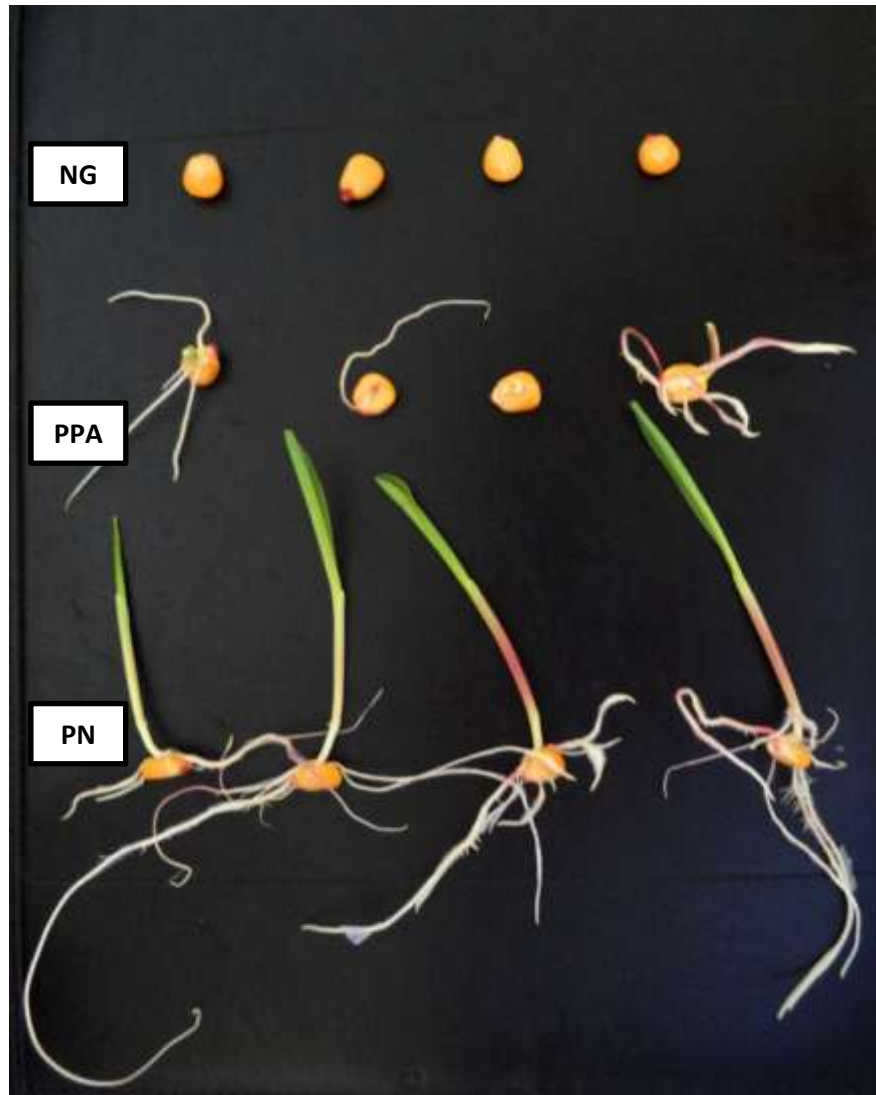


Figura 16. Plántulas normales (PN), plántulas anormales (PPA) y semillas de *Zea mays* L. no germinadas (NG).

Tabla 16. Porcentaje de germinación y poder germinativo de semillas de *Zea mays* L. amarillo duro AGRI-144 por efecto de *Azotobacter* sp.UNPRG67 cultivada en sustratos naturales

Tratamiento	Germinación (%)	Poder germinativo (%)
Pajilla-melaza (T10s)	95	84
Caldo Algarroba (T1)	93	80
Caldo Ashby(Testigo 1)	93	80
Agua destilada(Testigo 2)	90	77

V. DISCUSIÓN

La investigación de bacterias promotoras del crecimiento de plantas, PGPR comprende el aislamiento e identificación, caracterización de su actividad en laboratorio, invernadero, campo y posteriormente el incremento masivo para su producción a gran escala (Borda *et al.*, 2009). En este contexto, en la presente investigación se trabajó con la bacteria nativa *Azotobacter* sp.UNPRG67, caracterizada previamente como PGPR. Según Contreras *et al.* (2011), la utilización comercial de las PGPR no depende solo de los procesos de aislamiento y caracterización, sino que también se requiere diseños precisos de producción que permitan obtener la biomasa necesaria con el menor costo posible.

Para el incremento masivo de *Azotobacter* sp. se seleccionaron los sustratos naturales granos de arroz, frejol y maíz, vainas de algarroba, raíces de camote, tallos de papa, frutos de zapallo como productos agrícolas; melaza y pancamel como residuos industriales y pollinaza y estiércol de cuy como residuos pecuarios. El criterio fundamental para la selección fue la disponibilidad y el bajo costo, coincidiendo con Contreras *et al.* (2011), quienes manifestaron que las PGPR son una alternativa en la biofertilización de los

cultivos; sin embargo, su utilización a nivel comercial requiere el desarrollo de un bioproducto, que además de cubrir los requerimientos nutricionales, sea competitivo en costos y efecto sobre las plantas, con respecto a los fertilizantes tradicionales.

En el 80% de los sustratos naturales líquidos investigados se demostró el incremento de *Azotobacter* sp.UNPRG67. En cuanto a los residuos agrícolas se coincide con Pegnoo *et al.* (2005), quienes cultivaron la PGPR *Bacillus megaterium* en caldo arroz, camote, papa y yuca. A su vez Fernández (2010) determinó crecimiento de *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* y *P.putida* en los sustratos líquidos camote, cebada, papa.

Respecto a los residuos industriales, Peighami *et al.* (2009) incrementaron *B. subtilis* y *P. fluorescens* en caldo melaza. A su vez, Contreras *et al.* (2011) demostraron que la inclusión de melaza en el medio de cultivo favoreció la producción de biomasa de *Sphingomonas paucimobilis* y *B. megaterium*, con respecto al medio definido. Por su parte, Hernandez *et al.* (2012) concluyeron que el medio de cultivo alternativo para el incremento de *Azotobacter* sp. con mayor diferencia significativa fue T1, constituido por melaza + levadura.

Córdova *et al.* (2009) formularon con éxito un inoculante constituido por *Azotobacter* sp. en los residuos pecuarios pollinaza y pinzote o raquis central del racimo de banano. Estos investigadores concluyeron que el uso de estos residuos como acarreadores de PGPR presenta la ventaja de contener reservas de carbono orgánico, nitrógeno, fósforo y potasio, lo que le da mayor agregado al producto. Según Moat *et al.* (2002), todos los organismos vivos tienen requerimientos nutricionales como fuente de carbono, nitrógeno, energía y factores necesarios para el crecimiento. En los sustratos naturales seleccionados en la presente investigación se evidenció la multiplicación de *Azotobacter* sp. nativa porque sus componentes resultaron adecuados para su metabolismo.

La suplementación de los sustratos naturales con urea incrementó el recuento de *Azotobacter* sp. Se coincide con Kulpreecha *et al.* (2009) quienes

demonstraron que la adición de melaza 2% y urea 0,8% incrementó la biomasa de *B. megaterium*, en comparación con sacarosa al 2%.

La concentración celular de *Azotobacter* sp. alcanzó 20×10^{11} UFCg⁻¹ en los sustratos sólidos, coincidiendo con Hernandez *et al.* (2012) quienes determinaron $9,32 \times 10^{11}$ UFC mL⁻¹ de *Azotobacter* sp. en el medio alternativo T1 (melaza + levadura). A su vez, la concentración celular de los sustratos T1 (algarroba) y T10s (pajilla – melaza), superó significativamente al testigo. Se coincide con Contreras *et al.* (2011), quienes demostraron que la producción de biomasa de *B. megaterium* y *Sphingomonas paucimobilis* en caldo melaza alcanzó mayores valores respecto a la obtenida en un medio de cultivo con reactivos analíticos. Por su parte Borda *et al.* (2009) no encontraron diferencias significativas en la concentración celular de *A. nigricans* en medio leche y medio semisintético caldo nutritivo.

Nikel *et al.* (2005), Cori de Mendoza *et al.* (2006) y Kulpreecha *et al.* (2009) concluyeron que la adición de fuentes de carbono complejas como melaza, extracto de malta, suero de leche y almidón soluble incrementa la concentración celular microbiana, en comparación con azúcares puros como glucosa, fructosa y sacarosa, porque los sustratos no definidos también son fuente de vitaminas, oligoelementos y otros factores que promueven el crecimiento de los microorganismos.

El cultivo de *Azotobacter* sp. nativa en los sustratos naturales no afectó su actividad fisiológica. De esta manera, mediante reacciones colorimétricas se cuantificó el ácido indolacético producido, nitrógeno fijado y fosfato solubilizado, alcanzando concentraciones estadísticamente similares a las de las bacterias cultivadas en los medios definidos testigos caldo y agar Ashby. Al respecto, Sanchez *et al.* (2003) y Borrego *et al.* (2004) manifestaron que la formulación de medios de cultivo debe estar basada en los requerimientos nutricionales específicos que soportan el crecimiento microbiano y la síntesis de componentes celulares, así como la producción de metabolitos primarios y secundarios.

Azotobacter sp. nativa caracterizada como PGPR, sintetizó 29 ppm de ácido indolacético, superando 23,75 ppm reportado por Rojas & Vásquez

(2014). El ácido indolacético se cuantificó mediante la reacción colorimétrica de Salkowski, en la que la concentración de indol es directamente proporcional a la intensidad de una coloración grosella. A su vez, éste es el resultado de una reacción oxidativa de los compuestos indólicos por las sales férricas en acidez, donde por una transaminación un grupo amino del indol es sustituido por el cloro del cloruro férrico (Mantilla, 2007).

Azotobacter sp. nativa fijó nitrógeno, cuantificándose 25 ppm de amonio. El valor superó a 1,6 - 5,2 reportados por Escobar & Horna (2011) y Lara *et al.* (2007) para aislados de tomate y plátano pero fue inferior a 35,38 ppm reportado para aislados de malezas (Rojas, 2013). El amonio fue cuantificado por el método de Berthelot, basado en la aparición de un azul intenso de indofenol, producto de la reacción de ion amonio con los compuestos fenólicos, en presencia de agente oxidante hipoclorito de sodio y un catalizador como el nitroprusiato de sodio o el ferrocianato de potasio (Lara *et al.*, 2007).

En la solubilización de fosfato, se cuantificó 3 ppm, superando 1,81 ppm reportado por Rojas & Vásquez (2014). Los iones ortofosfato producto de la solubilización del fosfato di o tricálcico en solución ácida reaccionan con los iones molibdato, formando ácido molibdofosfórico. A su vez, éste es reducido en presencia del ácido ascórbico, formando azul de fosfomolibdato, susceptible de una determinación colorimétrica y su aparición es acelerada en el catalizador emético tartrato doble de antimonio y potasio (Rodier & Rodi, 2005; Bobadilla & Rincón, 2008).

El cultivo de *Azotobacter* sp. en los sustratos naturales no afectó negativamente el efecto de la bacteria en la germinación y poder germinativo de maíz, siendo similar al testigo Caldo Ashby.

Azotobacter sp. nativa cultivada en los sustratos naturales así como el testigo Caldo Ashby incrementó en 3-7% el poder germinativo de maíz, resultado explicado por la activación de procesos metabólicos en las semillas, producto de la secreción bacteriana de sustancias estimuladoras como las giberelinas, encargadas de activar la síntesis de enzimas hidrolíticas en el endospermo (Torres *et al.*, 2003). En este contexto, las α -amilasas promueven

la germinación, porque incrementan la disponibilidad del almidón (Bharathi *et al.*, 2004).

En los sustratos naturales algarroba y pajilla-melaza se incrementó masivamente *Azotobacter* sp. y la bacteria reaislada de estos sustratos naturales, sintetizó ácido indolacético, fijó nitrógeno, solubilizó fosfato y no afectó negativamente el poder germinativo de maíz, por lo que son considerados promisorios en la obtención de inoculantes para su producción a gran escala.

VI. CONCLUSIONES

- ✓ En el 80% de los sustratos naturales líquidos formulados se demostró crecimiento de *Azotobacter* sp. nativa.
- ✓ El número más probable de *Azotobacter* sp. nativa en los sustratos naturales osciló entre 300 y 45 000 NMP mL⁻¹ y en los sustratos naturales suplementados con urea osciló entre 45 000 y 140 000 NMP mL⁻¹
- ✓ La concentración celular de *Azotobacter* sp. nativa en los sustratos naturales líquidos fue de 20x10⁷ y 44x10⁹ UFC mL⁻¹ y en los sólidos fue de 12x10⁹ – 20x10¹¹ UFC g⁻¹
- ✓ Se seleccionaron los sustratos naturales T1, líquido algarroba y T10 sólido pajilla-melaza.
- ✓ *Azotobacter* sp. reislada de los sustratos naturales sintetizó 29,530 – 29,540 ppm de ácido indolacético, fijó nitrógeno cuantificándose 25,317 – 25,356 ppm de amonio y solubilizó 3,360 – 3,496 ppm de fosfato.
- ✓ El poder germinativo de maíz no fue afectado negativamente por *Azotobacter* sp. nativa reislada de los sustratos naturales T1 algarroba y T10 pajilla-melaza.

VII. RECOMENDACIONES

- ✓ Obtener inoculantes con *Azotobacter* sp.UNPRG67 cultivada en los sustratos naturales caldo algarroba y pajilla-melaza.
- ✓ Determinar diferentes periodos de viabilidad de *Azotobacter* sp.UNPRG67 en los inoculantes.
- ✓ Determinar el efecto de los inoculantes en el desarrollo vegetativo y rendimiento de maíz en condiciones de campo.

VIII. RESUMEN

Los inoculantes microbianos constituyen una alternativa para la disminución de los agroquímicos; no obstante, deben ser competitivos no solo en su efectividad, sino también en costos de producción. En este contexto, se investigaron sustratos naturales para el incremento masivo de *Azotobacter* sp. nativa caracterizada previamente como promotora del crecimiento de *Zea mays* L. Para la formulación de los medios de cultivo se seleccionaron productos agrícolas y residuos industriales y pecuarios. En el 80% de los sustratos naturales líquidos formulados se demostró crecimiento de *Azotobacter* sp. nativa. El número más probable de *Azotobacter* sp. nativa en los sustratos naturales osciló entre 300 y 45 000 NMP mL⁻¹ y en los sustratos naturales suplementados con urea fue 45 000 - 140 000 NMP mL⁻¹. La concentración celular de *Azotobacter* sp. nativa en los sustratos naturales líquidos fue de 20×10^7 y 44×10^9 UFC mL⁻¹ y en los sólidos fue de 12×10^9 – 20×10^{11} UFC g⁻¹. Seleccionándose los sustratos naturales T1, líquido algarroba y T10 sólido pajilla-melaza. *Azotobacter* sp. reislada de los sustratos naturales sintetizó 29,530 – 29,540 ppm de ácido indolacético, fijó nitrógeno, cuantificándose 25,317 – 25,356 ppm de amonio y solubilizó 3,360 – 3,496 ppm de fosfato. El poder germinativo de maíz no fue afectado negativamente por *Azotobacter* sp. nativa reislada de los sustratos naturales T1 algarroba y T10 pajilla-melaza. Se demostró que los sustratos naturales son potenciales para el incremento de *Azotobacter* sp.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Asociación Internacional de la Industria de los Fertilizantes, IFA. (2002) *Los fertilizantes y su uso*. Recuperado de <ftp://ftp.fao.org/agl/agll/docs/fertuso.pdf>
- Barba, S. & Bravo, R. (2012). *Especies de Burkholderia y Pseudomonas aisladas de la rizósfera de malezas y su potencial como promotoras de crecimiento de plantas en Lambayeque, 2012*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Bharathi, R., Vivekananthan, R., Harrish, S., Ramanathan, A. & Samiyappan, R. (2004). Rhizobacteria-based bioformulations for the management of fruit rot infection in chillies. *Crop Protection*, 23, 835-843.
- Bhattacharyya, P. & Jha, D. (2012). Plant growth – promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agricultura. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 28, 1327 – 1350.

- Bobadilla, C. & Rincón, C. 2008. *Aislamiento y evaluación de fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza*. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Bonaveri, A. (2012). *Ranking de hectáreas cultivadas en el planeta*. Pregón Agropecuario. Recuperado de <http://www.pregonagropecuario.com.ar/cat.php?txt=3065>
- Borda, D., Pardo, J., Martínez, M. & Montaña, J. (2009) Producción de un biofertilizante a partir de un aislamiento de *Azotobacter nigricans* obtenido en un cultivo de *Stevia rabaudiana* Bert. Revista *Universitas Scientarum*, 14(1), 71-78.
- Borrego, S., Espinosa, M.E., Martí, E. & Fonseca, M. 2004. Optimización de un medio de cultivo salino para la producción de androstendiona a partir de colesterol usando la cepa *Mycobacterium* sp. MB-3683. *Biotecnología Aplicada* 1, 21-24.
- 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.
- Contreras, B., López, S., Reyes, J. & Cárdenas, D. (2011). Producción de un inoculante a base de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista de la Universidad Francisco de Paula Santander*, 16(2), 20-29.
- Córdova-Bautista, &., Rivera-Cruz, MC., Ferrera-Cerrato., R, Obrador-Olán, JJ., & Córdova-Ávalos, V. (2009). Detección de bacterias benéficas en suelo con banano (*Musa* AAA Simmonds) cultivar 'Gran enano' y su potencial para integrar un biofertilizante. *Universidad y Ciencia*, 25(3), 253-265.
- Cori de Mendoza, M., Rivas, N., Dorta, B., Pacheco de Delahaye, E. & Bertsch, A. (2006). Obtención y caracterización de dos concentrados proteicos a partir de biomasa de *Kluyveromyces marxianus* var. *Marxianus* cultivada en suero lácteo desproteinizado. *Revista Científica (Maracaibo)*, 16(3), 315-324.
- Cuesta, A., Monsalve, J., Mesa, M., Zapata, A. & Trujillo, M. (2006). Estrategias de cultivo en la producción de alginatos por *Azotobacter vinelandii*. Universidad Nacional de Colombia, Medellín.

- Damir, O., Mladen, P., Bozidar, S., Srdran, N. (2011). Cultivation of the bacterium *Azotobacter chroococcum* for preparation of biofertilizers. *African Journal of Biotechnology*, 10(16), 3104-3111.
- Escobar, C. & Horna, Y. (2011). *Caracterización de cepas nativas de Azotobacter spp. y su potencial como promotoras del desarrollo vegetativo de "tomate" (Lycopersicon esculentum Mill.)*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Fernández, C. (2010). *Efecto de sustratos naturales en diferentes concentraciones, temperatura y agitación en el incremento masivo de rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas de papa (Solanum tuberosum L.)*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Franco, M. (2008). *Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas*. Tesis de Doctorado. Universidad de Granada, España.
- García, F. & Muñoz, H. (2010). *Caracterización de cepas nativas de Azospirillum spp. y su efecto como promotoras del desarrollo vegetativo de arroz (Oryza sativa)*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Gómez, A. (2000). *Agricultura orgánica: Una alternativa posible*. Nordan, Montevideo. Recuperado de http://www.ceuta.org.uy/files/Agricultura_organica_una_alternativa_posible.pdf
- Gouda, M., Swellam, A. & Omar, S. (2001). Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. *Microbiological Research*, 156,201-207.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R. & Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60(4), 579-598.
- Helmy, Q., Latunussa, C., Suryatmana, P., Kardenia, E. & Wisjnuapto. (2008). Jatropha seed cake as unconventional substrate for biosurfactant production by *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Applied and Industrial Biotechnology in Tropical Region*. Recuperado de <http://www.biotechindonesia.org/journal/jaib/jab-2008-00-01/jab-1-08-.pdf>

- Hernández, R; Fernández, C & Baptista, P. (2003). Metodología de la investigación. México: Mc Graw Hill Interamerica Editores S.A.
- Hernández, A., Heydrich, M., Velázquez, M. & Hernández, A. (2006). Perspectivas del empleo de rizobacterias como agentes de control biológico en cultivos de importancia económica. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24 (1), 42-49.
- Hernández, M., Córdova, Y., Ojeda, M., Gómez, S., Martínez, G. & Ruiz, D. (2012). *Evaluación de inoculantes para el crecimiento máximo de bacteria fijadora de nitrógeno*. Trabajo presentado en el XVIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica, Tabasco, México.
- Kulprecha, S., Booruangthavorn, A., Meksiriporn, B. and Thongchul, N. (2009). Inexpensive fed-batch cultivation for high poly (3-hidroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107(3), 240- 245.
- Lara, C., Oviedo, L. & Alemán, A.(2011). Aislados nativos con potencial en la producción de ácido indolacético para mejorar la agricultura. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 9(1), 17-23.
- 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.
- Loredo, C., López, L. & Espinosa, D. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *TERRA Latinoamericana*, 22(2), 225-239.
- Mantilla, M. (2007). *Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (Chrysanthemum morifolium var. yoko ono) en periodo de enraizamiento*. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Martínez, O., Jorquera, M., Crowley, D., Gajardo, G. & Mora, M. (2010). Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rizobacteria. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, (10), 293-319.
- Méndez, J., Merazo, J., Zerpa, M. & Bolívar, C. (2008). Efecto de la colocación de semillas de maíz (*Zea Mays* L.), Caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) y algodón (*Gossypium hirsutum* L.) en papel toallín (enrollados y sin enrollar) sobre la germinación y el vigor. *Revista UDO Agrícola*, 8(1): 67-71.

- Nihorimbere, V., Ongena, M., Smargiassi, M. & Thornart, P. (2011). Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnology Agronomy Society Environment*, 15(2), 327-337.
- Nikel, P., Pettinari, M., Méndez, B. & Galvagno, M. (2005). Statistical optimization of a culture medium for biomass and poly (3-hydroxybutyrate) production by a recombinant *Escherichia coli* strain using agroindustrial byproducts. *International Microbiology*, 8, 243-250.
- Obando, D. (2012). *Respuesta fisiológica del frijol caupí (Vigna unguiculata (L.) Walp) a la coinoculación de bacterias diazotróficas de los géneros Azotobacter y Rhizobium en suelos del departamento del Cesar*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura, FAO. (2011). Semillas en emergencia. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/015/i1816s/i1816s00.pdf>
- Pérez, F., Carballo, A., Santacruz, A., Hernández, A. & Molina, J. (2007). Calidad fisiológica en semillas de maíz con diferencias estructurales. *Agricultura Técnica en México*, 33(1), 53-61.
- 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.
- Rodier, J. & Rodi, L. (2005). *Análisis de Aguas*. España: Ediciones Omega.
- Rodrigues, R. (2005). *Condições de cultura para a produção de poli(3-hidroxibutirato) por Ralstonia eutropha a partir de resíduos de indústrias de alimentos*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Rojas, L. (2013). *Potencial como promotoras del crecimiento de plantas de las especies de Azotobacter aisladas de la rizosfera de malezas asociadas a Zea mays L. "maíz", en Lambayeque, 2013*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.

- Rojas, J. & Vásquez, J. (2014). *Determinación del potencial como promotoras del crecimiento de plantas de las especies de Azotobacter aisladas de la rizósfera de Zea mays L. "maíz", en Lambayeque, 2013*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Sachin, D. (2009). Effect of *Azotobacter chroococcum* (PGPR) on the growth of Bamboo (*Bambusa bamboo*) and Maize (*Zea mays*) plants. *Biofrontiers*, 1(1), 24-31.
- Salhia, B. (2010). *The effect of Azotobacter chroococcum as nitrogen biofertilizer on the growth and yield of Cucumis Sativus*. Master degree thesis. The Islamic University, Gaza.
- Sánchez, L., Ortiz, S. & Hernández, A. (2003). Obtención de sideróforos a partir de *Burkholderia cepacia* y optimización del medio de cultivo para su producción. *Revista de Salud Animal*, 25(1), 27-33.
- Torres, R., Perez, C. & Suárez, N. (2003). Influencia de la inoculación de rizobacterias sobre la germinación de semillas de frejol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Centro Agrícola*, 30(2), 56-60
- Vázquez, P., Holguin, G., Puente, M., López, A. & Bashan, Y. (2000). Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils*, 30(1), 400-408.
- Vélez, L., & Orellana, H. (2010). *Evaluación de cepas de Azotobacter spp. en el cultivo de lechuga (Lactuca sativa var. Green Salad Bowl)*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central del Ecuador. Tumbaco, Ecuador.
- Wurdig, L. (2003). *Ocorrência e distribuição de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de milho*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

ANEXOS

ANEXO 1

Medio mineral sin nitrógeno, MMSN (en Rico, 2009)

Componentes	g/L
K ₂ HPO ₄	0,655
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,20
NaCl	0,02
CaCl ₂	0,01
Cl ₃ Fe (0.1% en solución)	3,4 mL
NaMoO ₄ (H ₂ O)	0,0108
KH ₂ PO ₄	0,15
Manitol	10,0
Agar	15,0
Sacarosa	10,0
*Azul de bromotimol 0,5 %	5,0 mL
**Púrpura de bromocresol	0,04 mL
Agua destilada	1000 mL

pH 7. * Caldo ** Agar

ANEXO 2

Tabla de McGrady para el cálculo del número más probable (NMP) de bacterias diazotróficas, con tres tubos por dilución (en Wurdig, 2003)

Dilución con crecimiento	N° de diazotróficos	Dilución con crecimiento	N° de diazotróficos
000	0,0	222	3,5
001	0,3	223	4,0
010	0,3	230	3,0
011	0,6	231	3,5
020	0,6	232	4,0
100	0,4	300	2,5
101	0,7	301	4,0
102	1,1	302	6,5
110	0,7	310	4,5
111	1,1	311	7,5
120	1,1	312	11,5
121	1,4	313	16,5
130	1,6	320	9,5
200	0,9	321	15,0
201	1,4	322	20,0
202	2,0	323	30,0
210	1,5	330	25,0
211	2,0	331	45,0
212	3,0	332	110,0
220	2,0	333	140,0
221	3,0		

ANEXO 3

Medios Ashby para el aislamiento, identificación y mantenimiento de *Azotobacter* spp. (en Fernández, 2010)

Componentes	g/L
Sacarosa, manitol o benzoato	5,0
KH ₂ PO ₄	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,005
NaCl	0,2
CaCl ₂ . 7H ₂ O	0,2
Agar	15

pH 7,0 (+/- 0,2). Adicionar el indicador azul de bromotimol al 0,5 % en medio líquido.

ANEXO 4

Cuantificación de ácido indolacético producido *in vitro* mediante la reacción colorimétrica de Salkowski

a. Caldo tripticasa soya (g/L) suplementado con triptófano (en García y Muñoz, 2009)

Componentes	g/L
Peptona de caseína	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

b. Reactivo para la detección y cuantificación de ácido indolacético producido *in vitro* (en Mantilla, 2007)

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

La solución de cloruro de fierro 0,5M se obtiene al mezclar 1,61 g de cloruro de fierro (FeCl_3) con 20 mL de agua destilada.

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

c.1. Fundamento de la reacción de Salkowski

Mediante la reacción de Salkowski se detectan grupos indol presentes en el medio de cultivo y la concentración de indol es directamente proporcional a la intensidad de color rojo producido. A su vez, el cambio de color es el resultado de una reacción oxidativa con el ácido sulfúrico, donde por medio de una transaminación un grupo amino es sustituido por el cloro proveniente del 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]*	H ₂ O 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 0,4mL de solución, verter en tubos de 13 x 75 mm y agregar 1,6 mL de reactivo de Salkowski (1:4). Dejar en reposo en oscuridad por 30 minutos. Observar la presencia de una coloración rojiza en los tubos. A continuación, leer la absorbancia de cada dilución en espectrofotómetro a 530 nm. Una vez obtenida la absorbancia en todas las concentraciones de ácido 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.

ANEXO 5

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 % m/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 Caldo extracto de suelo al 10 %

Componentes	g/L
K ₂ HPO ₄	0,4
MgCl ₂	0,1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05
FeCl ₃	0,01
CaCl ₂	0,1
Tryptona	1,0
Extracto de levadura	1,0
Extracto de suelo al 10 %	250 mL
Agua destilada	750 mL

Ajustar a pH 7,3. 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.

Reactivos

- **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

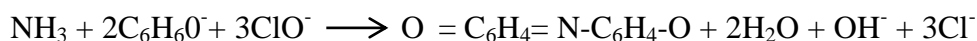
- **Solución oxidante**

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

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

b.1 Fundamento del método colorimétrico de Berthelot (fenolhipoclorito)

Se basa en la formación de un color azul intenso de indofenol, que resulta de la reacción del ión amonio (NH_4) con los compuestos fenólicos en presencia de un agente oxidante el cual puede ser hipoclorito de sodio u o-fenol; y la presencia de un catalizador, principalmente nitroprusiato de sodio o de potasio. El mecanismo de la reacción depende de la luz presente, la temperatura ambiente, catalizadores y pH alcalino. Cuando se utiliza fenol o sodio la reacción puede ser representada de la siguiente manera:



b.2 Preparación de diluciones a partir de una solución madre de NH_4Cl

Para obtener la curva patrón se prepara una solución madre de 100 ppm de NH_4Cl , para lo cual se pesa 0,1 g de NH_4Cl 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]	NH ₄ Cl (Ug/mL = ppm) NH ₄ Cl [μg /mL= ppm]
1	0,0	10,0	0
2	0,2	9,8	2
3	0,4	9,6	4
4	0,6	9,4	6
5	0,8	9,2	8
6	1,0	9,0	10
7	1,5	8,5	15
8	2,0	8,0	20

b.3 Procedimiento para la cuantificación de amonio por colorimetría

Obtenidas las diluciones, agregar a cada tubo 0,4 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.

ANEXO 6

Cuantificación de fosfato solubilizado *in vitro*

a. Agar Sundara Rao Sinha SRSM (en Vázquez *et al.*, 2000)

Componentes	g/L
Glucosa	10,0
Fosfato tricálcico	5,0
Sulfato de amonio	0,5
Cloruro de potasio	0,2
Sulfato de magnesio	0,3
Sulfato de manganeso	0,004
Sulfato de hierro	0,002
Cloruro de sodio	5,0
Extracto de levadura	0,5
Púrpura de bromocresol	0,1
Agar agar	15
Agua destilada en cantidad suficiente	1000 mL
pH	7,2

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).

- **Solución de ácido sulfúrico 5N**
 - Ácido sulfúrico (d=1.84) 14 mL
 - Agua destilada hasta enrase 100 mL
- **Solución de molibdato amónico 4 %** 20 mL
- **Solución de ácido ascórbico**
 - Ácido ascórbico 1,76 g
 - Agua destilada hasta enrase 100 mL
- **Solución de emético (preparar al momento del uso)**
 - Tartrato doble de antimonio y potasio 0.0274 g
 - Agua destilada hasta enrase 100 mL
- **Reactivo para determinación de ortofosfatos**
 - Ácido sulfúrico 5 N 40 mL
 - Solución de molibdato amónico 12 mL
 - Solución de ácido ascórbico 24 mL
 - Solución de emético 4 mL
- **Solución madre de 0,2 mgL⁻¹ de fósforo**
 - Fosfato monopotásico previamente desecado en estufa a 100 °C: 877 g
 - Agua destilada hasta enrase 100 mL
- **Solución hija de 2 mgL⁻¹ de fósforo**
 - Diluir 1 mL de solución madre en 99 de agua destilada (1/100)

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

b.1. Fundamento

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

b.2 Limpieza de los recipientes de vidrio

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

b.3 Reactivos

b.4 Preparación de la curva de calibración

Colocar en una serie de matraces aforados de 25 mL:

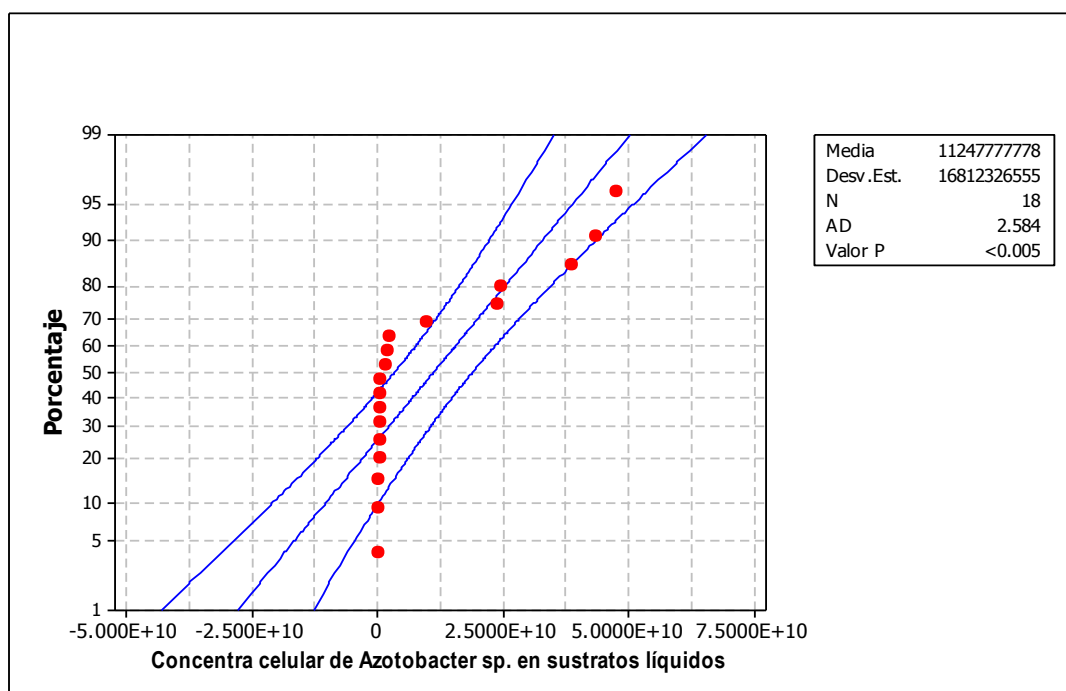
Número de matraces	T	I	II	III
Solución salina de fósforo de 2 mgL^{-1} (mL)	0	1	2	5
Agua bidestilada (mL)	20	19	18	15
Reactivo indicador (mL)	4	4	4	4
Agua destilada hasta enrase (mL)	25	25	25	25
Correspondencia de fósforo en mgL^{-1}	0	0,1	0,2	0,5

Esperar 20 minutos y efectuar las lecturas en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 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.

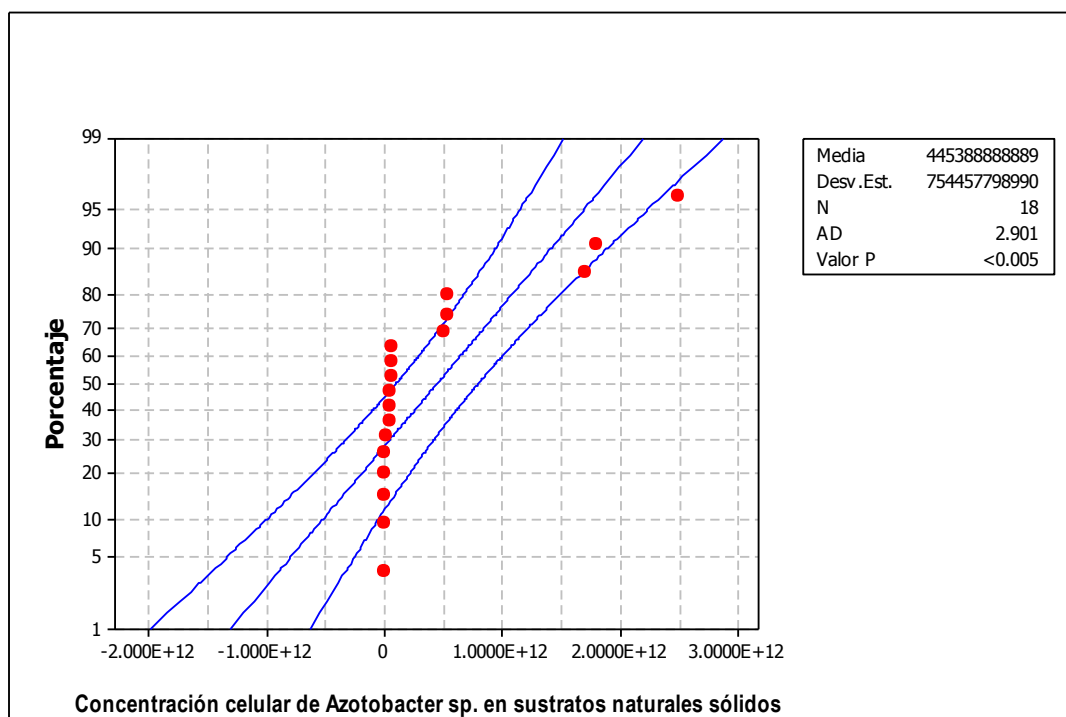
b.5 Procedimiento para cuantificar fosfatos en la muestra

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. La coloración es estable 24 horas.

ANEXO 7

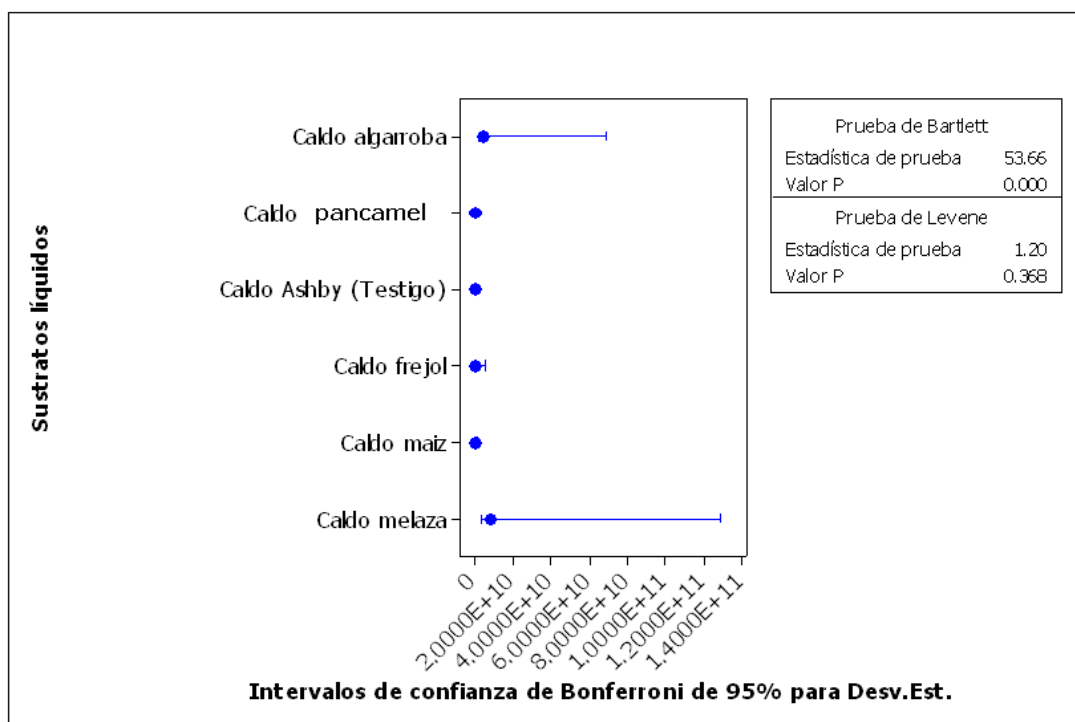


Prueba de normalidad para la concentración celular de *Azotobacter* sp. cultivada en sustratos líquidos.

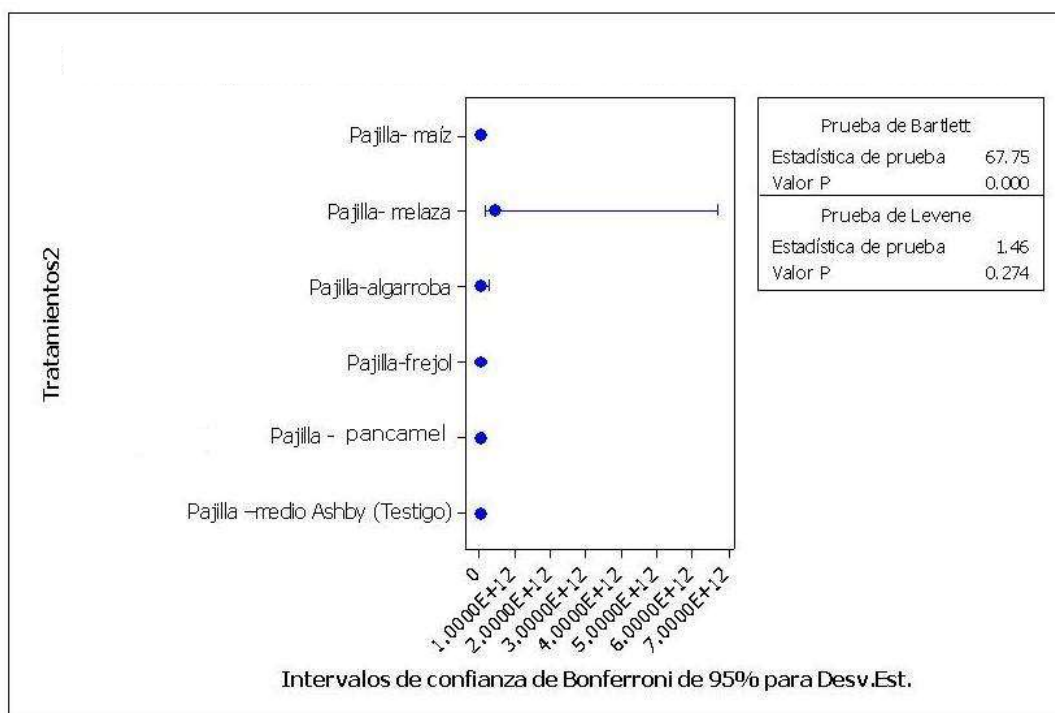


Prueba de normalidad para la concentración celular de *Azotobacter* sp. cultivada en sustratos sólidos.

ANEXO 8

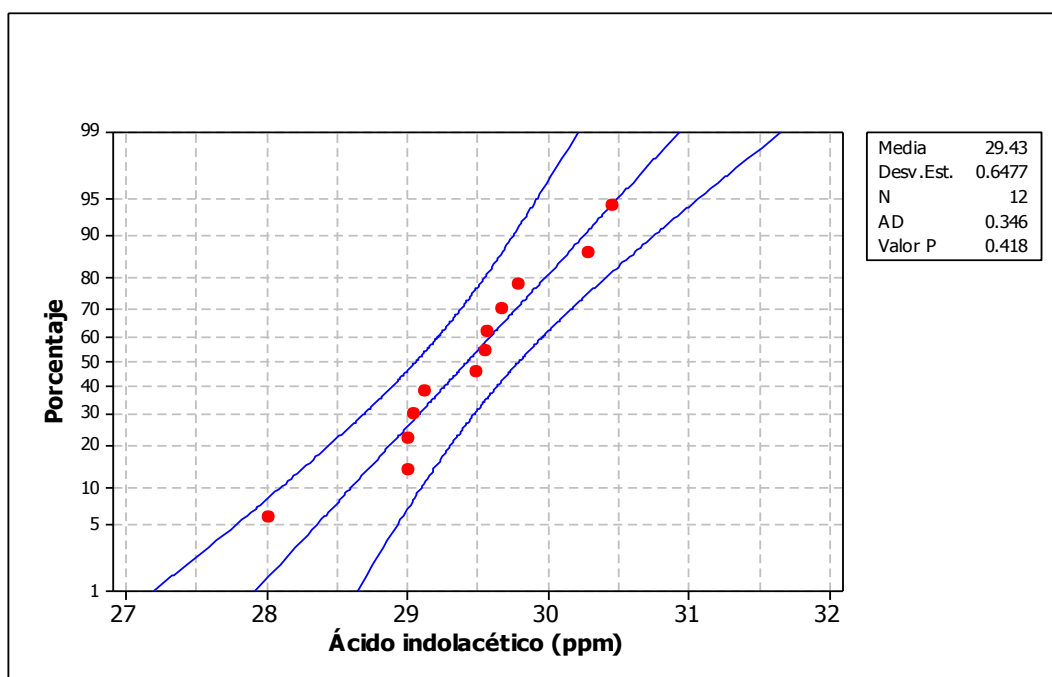


Prueba de homogeneidad de varianzas para la concentración celular de *Azotobacter* sp. en sustratos líquidos.

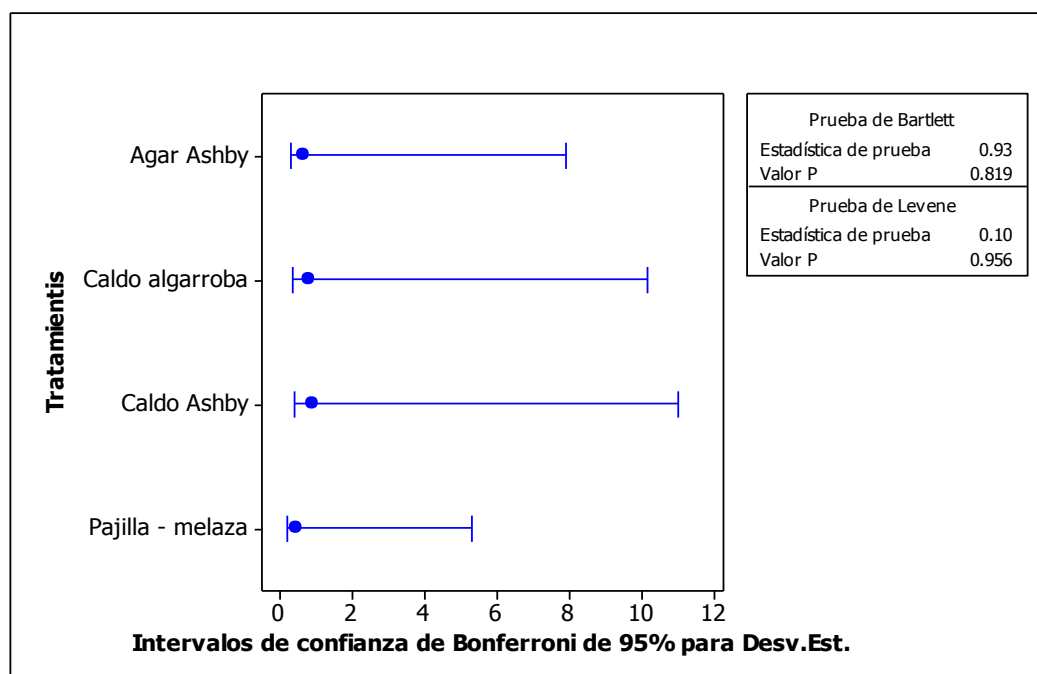


Prueba de homogeneidad de varianzas para la concentración celular de *Azotobacter* sp. en sustratos sólidos.

ANEXO 9

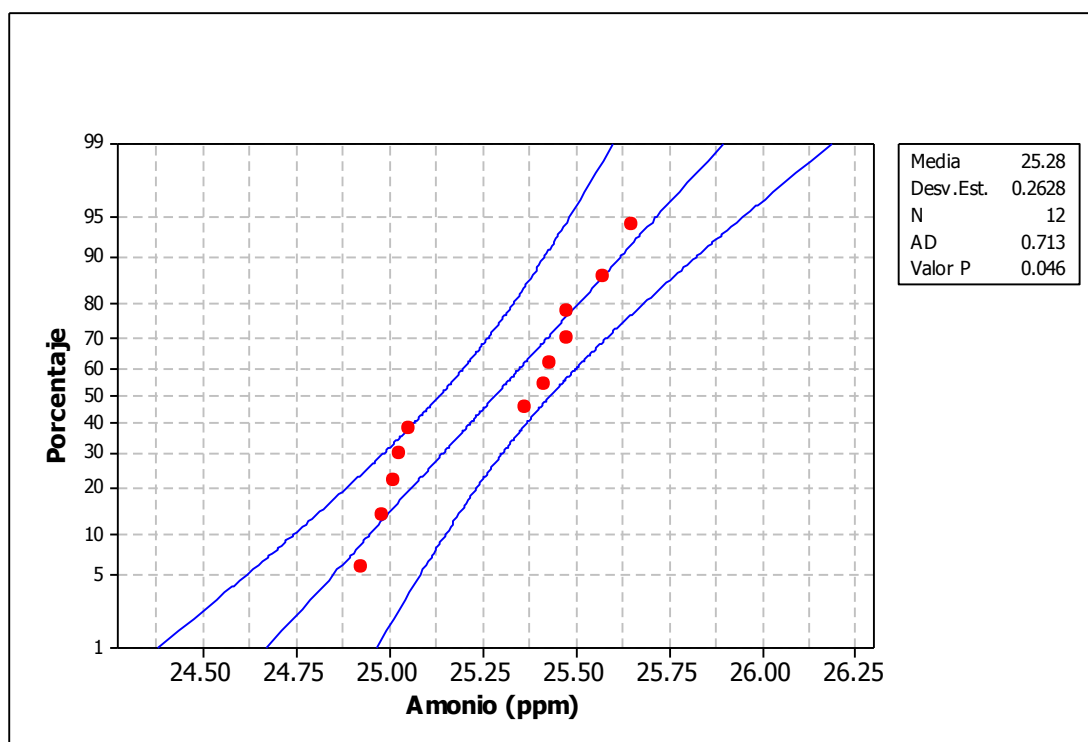


Prueba de normalidad para ácido indolacético (ppm) producido por *Azotobacter* sp.UNPRG67 reislada de sustratos naturales seleccionados.

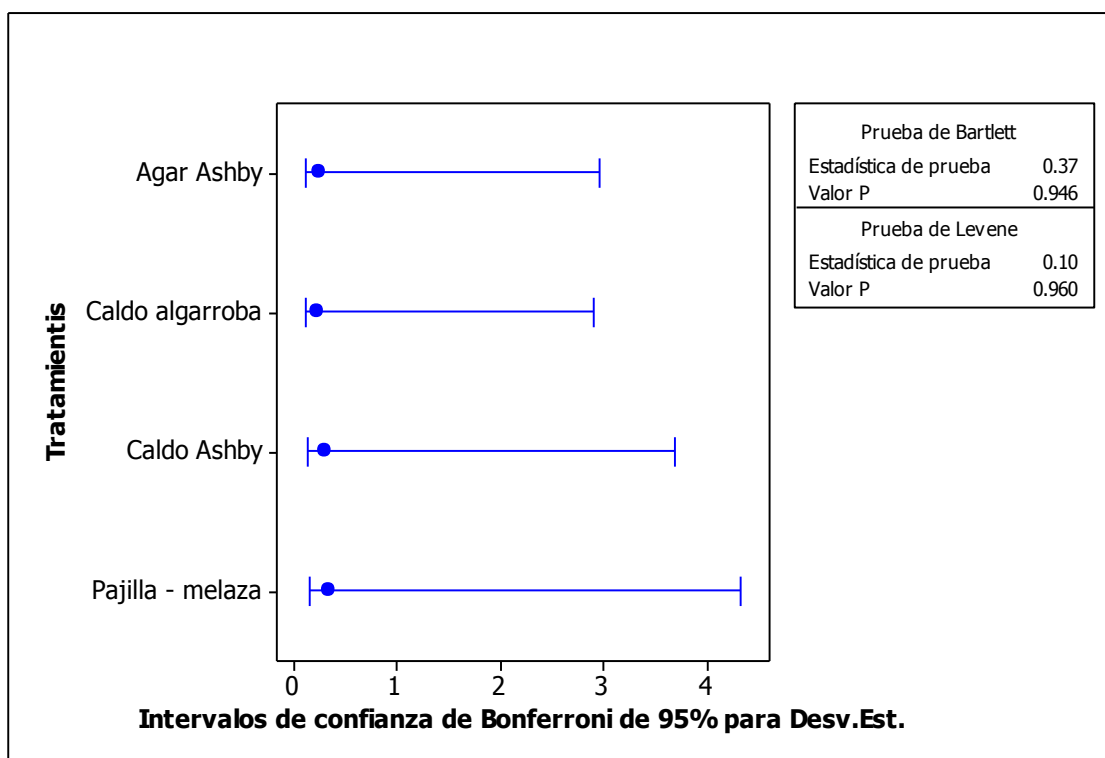


Prueba de homogeneidad de varianzas para ácido indolacético (ppm) producido por *Azotobacter* sp.UNPRG67 reislada de sustratos naturales seleccionados.

ANEXO 10

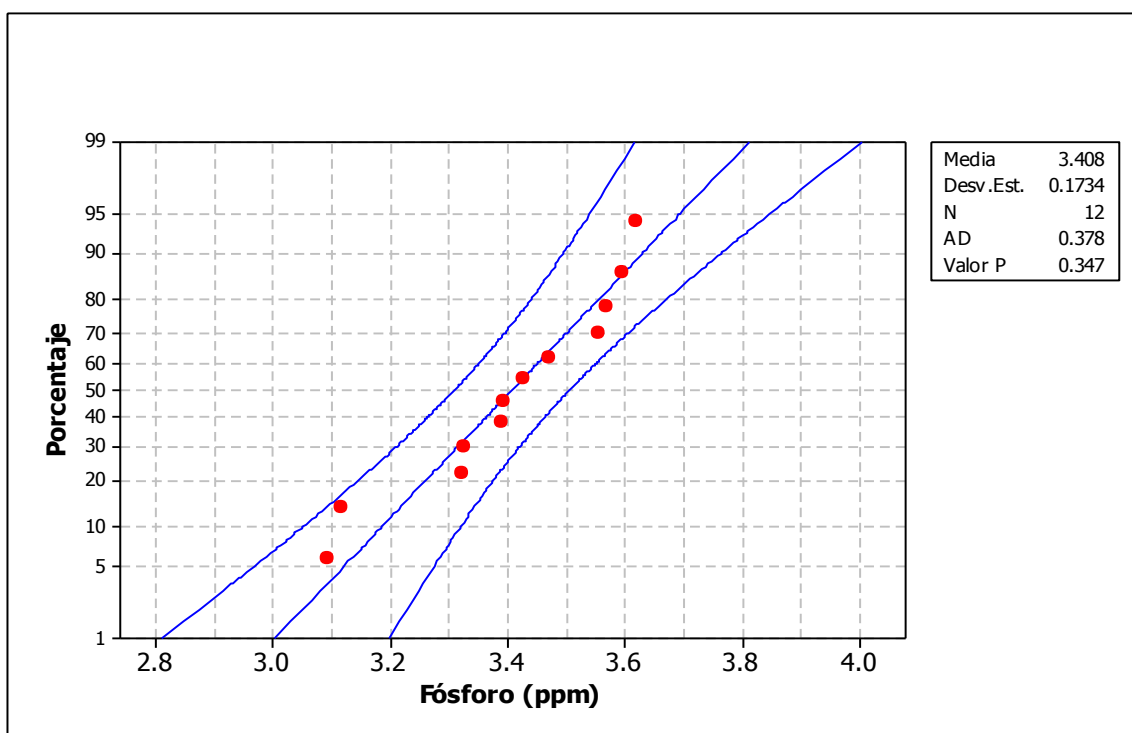


Prueba de normalidad para nitrógeno fijado como amonio (ppm) por *Azotobacter* sp.UNPRG67 reislada de sustratos naturales seleccionados.

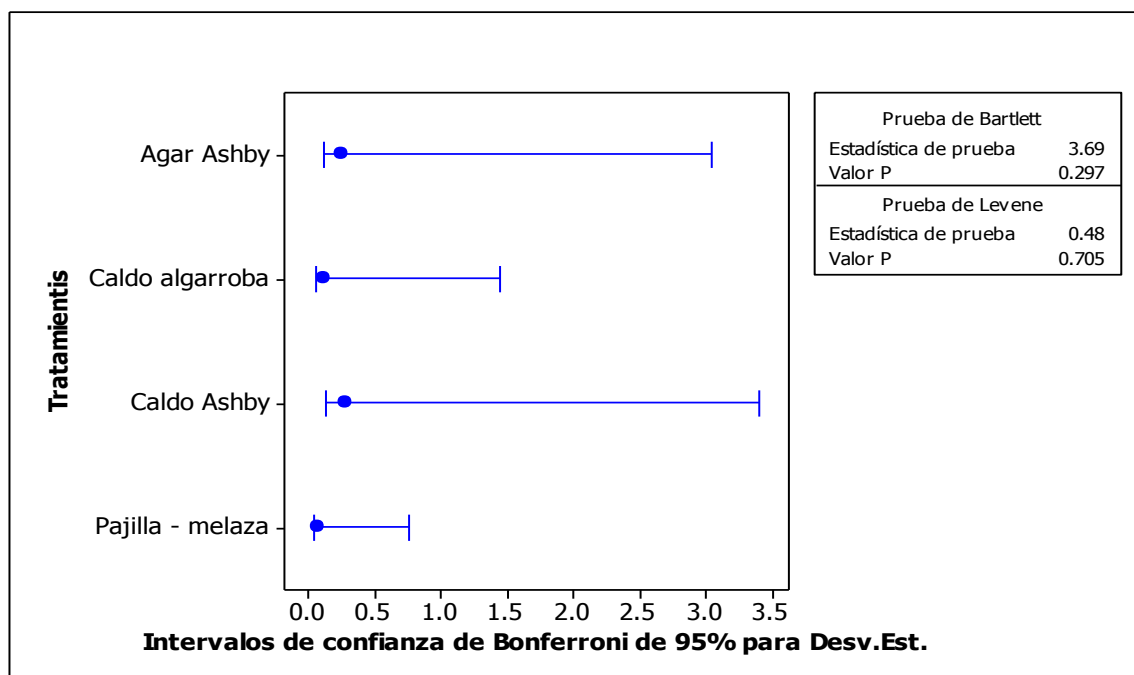


Prueba de homogeneidad de varianzas para nitrógeno fijado como amonio (ppm) por *Azotobacter* sp.UNPRG67 reislada de sustratos naturales seleccionados.

ANEXO 11



Prueba de normalidad para Fósforo solubilizado (ppm) por *Azotobacter* sp. UNPRG67 reislada de sustratos naturales seleccionados.



Prueba de homogeneidad de varianzas para Fósforo solubilizado (ppm) por *Azotobacter* sp. UNPRG67 reislada de sustratos naturales seleccionados.