

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCABELICA

(Creada por Ley N° 25265)

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



TESIS

**Identificación de *Azospirillum* spp. Asociada a las raíces del maíz  
amiláceo (*Zea mays* L.) en Pomacocha-Acobamba-Huancavelica**

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

SUELOS

PRESENTADO POR:

Bach. RUBEN CRISTIAN CCENTE GASPAR

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGRÓNOMO

HUANCAVELICA, PERÚ

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCVELICA  
(Creada por ley N° 25265)  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



### ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En la Ciudad Universitaria "Común Era"; auditorio de la Facultad de Ciencias Agrarias, a los 30 días del mes de abril del año 2019, a horas 2:30 p.m., se reunieron los miembros del Jurado Calificador, conformado de la siguiente manera:

**PRESIDENTE** : Ph. D. Agustín PERALES ANGOMA  
**SECRETARIO** : M. Sc. Rolando PORTA CHUPURGO  
**VOCAL** : Dr. Isaac Nolberto ALIAGA BARRERA  
**ACCESITARIO** : Ing. Santiago Oscar PUENTE SEGURA

Designados con resolución N° 371-2018-D-FCA-UNH; del proyecto de investigación titulado:

**"DIVERSIDAD BACTERIANA DE LA RIZÓSFERA DE QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd) CULTIVADA EN SUELO FÉRTIL Y DEGRADADO"** Cuyo autor es la graduada.

**BACHILLER:** Leonor Neda CARBAJAL CUADROS.

**ASESORADO POR:** Dr. Ruggierths Neil DE LA CRUZ MARCOS

A fin de proceder con la evaluación y calificación de la sustentación del proyecto de investigación, antes citado.

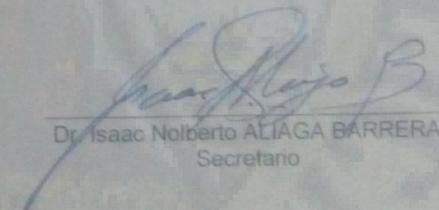
Finalizando la evaluación; se invitó al público presente y al sustentante abandonar el recinto; y luego de una amplia deliberación por parte del jurado, se llegó al siguiente resultado.

APROBADO POR  POR UNANIMIDAD

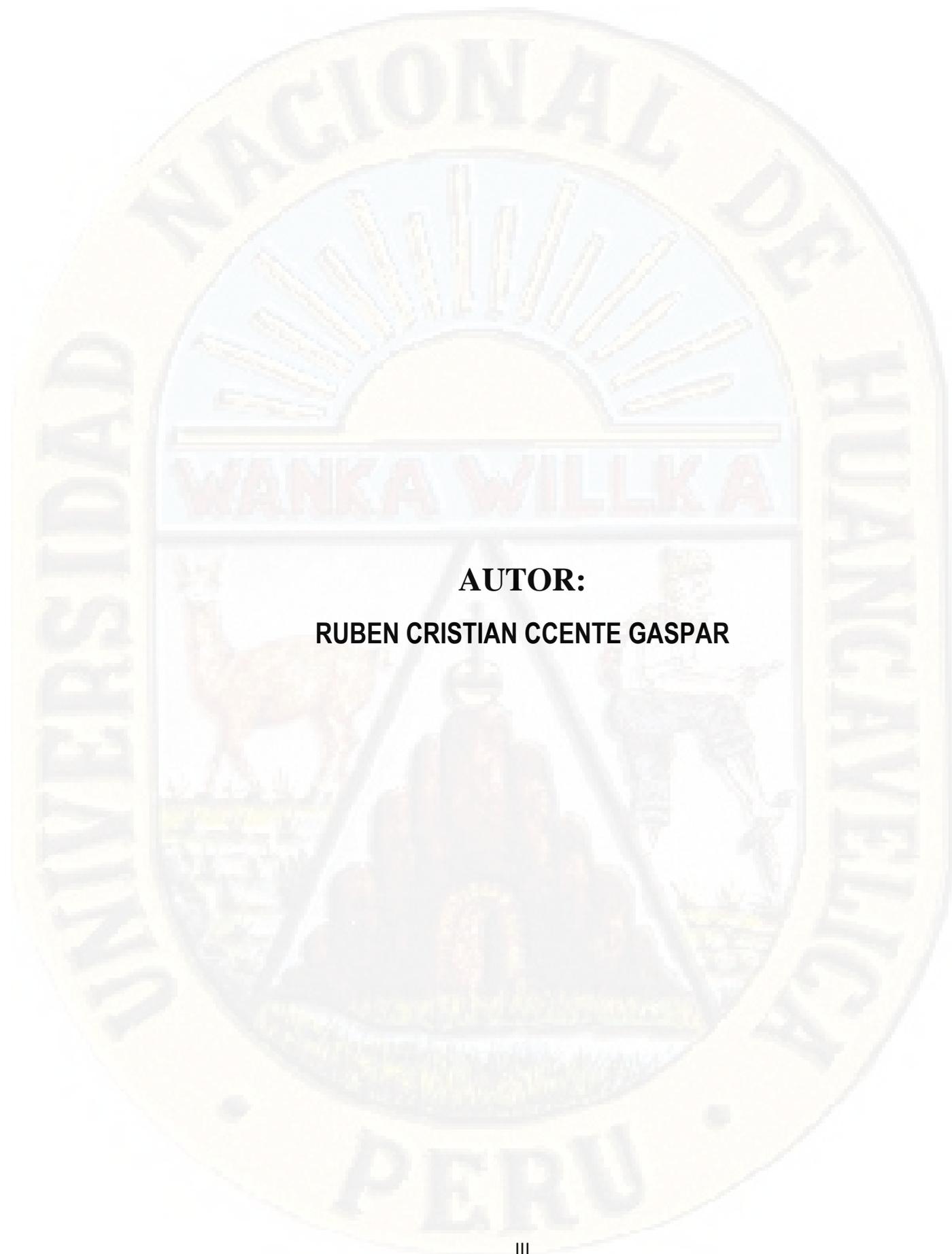
DASAPROBADO

En conformidad a lo actuado firmamos al pie.

  
M. Sc. Rolando PORTA CHUPURGO  
Presidente

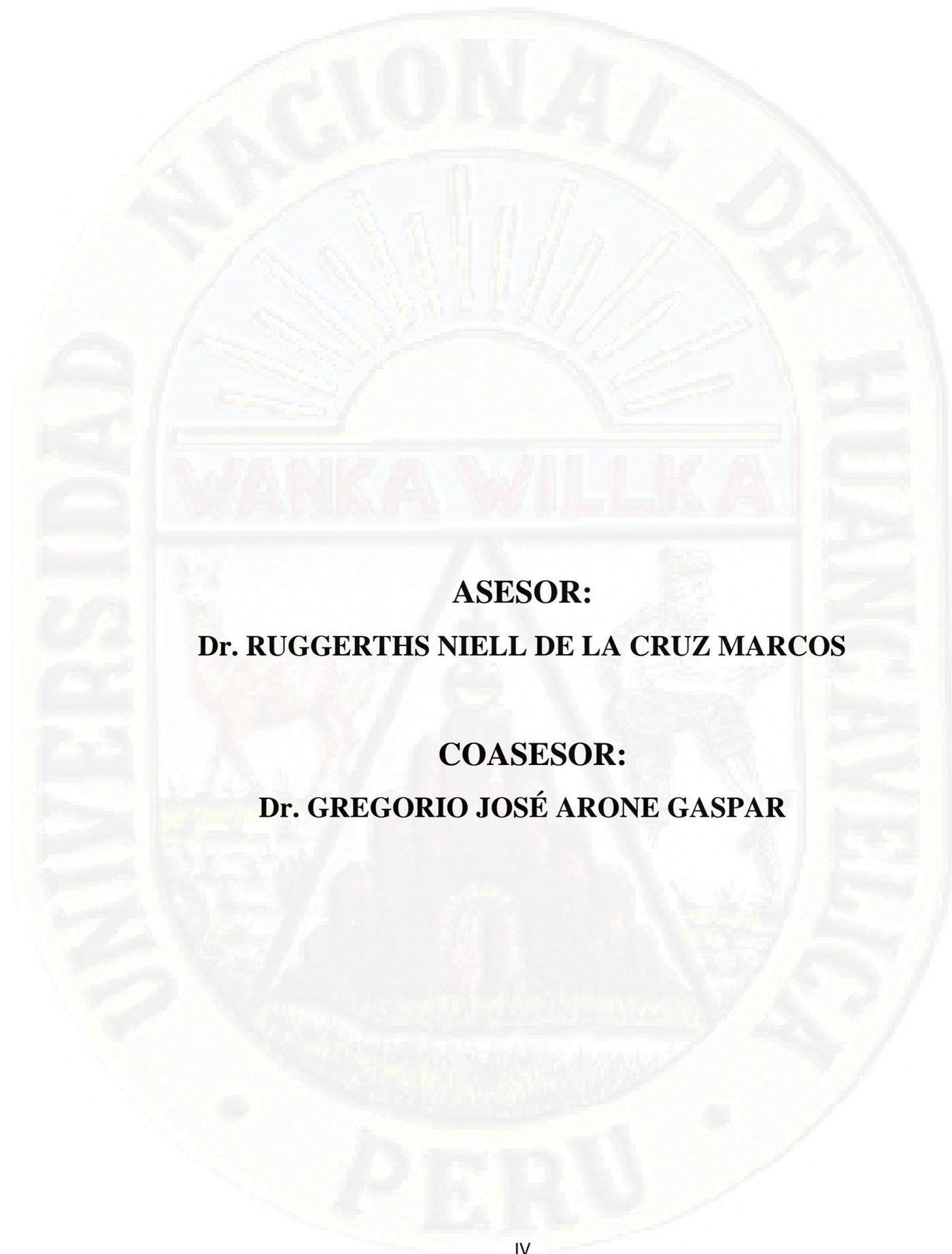
  
Dr. Isaac Nolberto ALIAGA BARRERA  
Secretario

  
Ing. Santiago Oscar PUENTE SEGURA  
Vocal



**AUTOR:**

**RUBEN CRISTIAN CCENTE GASPAR**

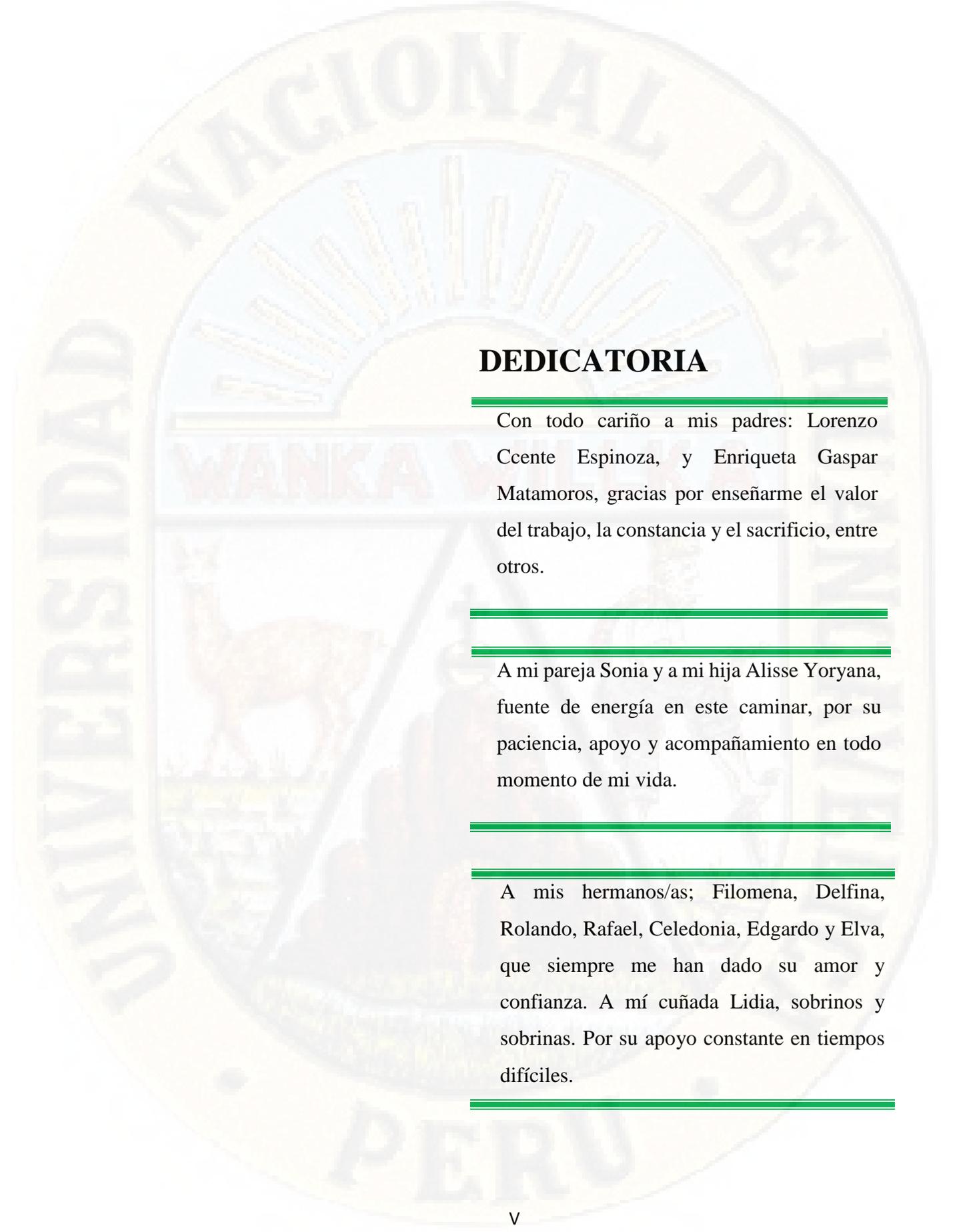


**ASESOR:**

**Dr. RUGGERTHS NIELL DE LA CRUZ MARCOS**

**COASESOR:**

**Dr. GREGORIO JOSÉ ARONE GASPAR**



## **DEDICATORIA**

---

Con todo cariño a mis padres: Lorenzo Ccente Espinoza, y Enriqueta Gaspar Matamoros, gracias por enseñarme el valor del trabajo, la constancia y el sacrificio, entre otros.

---

A mi pareja Sonia y a mi hija Alisse Yoryana, fuente de energía en este caminar, por su paciencia, apoyo y acompañamiento en todo momento de mi vida.

---

A mis hermanos/as; Filomena, Delfina, Rolando, Rafael, Celedonia, Edgardo y Elva, que siempre me han dado su amor y confianza. A mí cuñada Lidia, sobrinos y sobrinas. Por su apoyo constante en tiempos difíciles.

---

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por darme la oportunidad de vivir y disfrutar de una vida en convivencia con unos padres que lo han dado todo por sus hijos y unos hermanos que han sacrificado muchas cosas. A mi padre quien es mi ejemplo por seguir. Gracias, papá por todo lo que me has enseñado en el transcurso de mi vida junto a ti. A ti mamá por darme los mejores años de tu vida y enseñarme muchas cosas que han sido de mucha utilidad para mi formación profesional, gracias madre por acompañarme siempre en mis momentos de desaliento y felicidad, gracias por tu amor y cariño que siempre me das, gracias por tus palabras de aliento al saber que tu hijo está lejos de ti, gracias por haberme dado la vida y la dicha de tenerme siempre a tu lado.

Expresar mi agradecimiento a la Universidad Nacional de Huancavelica, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela profesional de Agronomía.

A mis amigos del LIBPM – EPA-UNH; Isaí, Toño y Maribel, por brindarme sus amistades y comprensión, gracias, amigos por escucharme siempre y dejarme sentir como uno de tus hermanos.

A mis amigos del LIBPM – EPA-UNH. Neda, gracias, amiga por darme tu apoyo en la ejecución de proyecto de la tesis, estoy muy contento por haberte conocido, y también a Juan, gracias, amigo por tu amistad ten siempre presente que en mí tendrás a un amigo que te estima.

Al Dr. Gregorio José ARONE GASPAR, por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto y sobre todo por la confianza que ha puesto en mí y por su asesoría en la realización de este proyecto y por su amistad gracias.

Al Dr. Ruggert N. DE LA CRUZ MARCOS, por sus sabias palabras y su acertada orientación para poder llevar a cabo el presente trabajo.

Al Mg. Marino BAUTISTA VARGAS, por encaminarme en la investigación y hacer que este trabajo llegue a su final.

**A TODOS MUCHAS GRACIAS**

## ÍNDICE.

<b>AUTOR:</b> .....	iii
<b>ASESOR:</b> .....	iv
<b>DEDICATORIA</b> .....	v
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	vi
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	x
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	xii
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	xiii
<b>RESUMEN</b> .....	xiv
<b>ABSTRACT</b> .....	xv
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	xvi
<b>CAPÍTULO I:</b> .....	17
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	17
<b>1.1. Planteamiento del Problema</b> .....	17
<b>1.2. Formulación del Problema</b> .....	17
<b>1.3. Objetivos</b> .....	18
<b>1.3.1. Objetivo general</b> .....	18
<b>1.3.2. Objetivos Específicos</b> .....	18
<b>1.4. Justificación</b> .....	18
<b>CAPITULO II:</b> .....	20
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	20
<b>2.1. Antecedentes</b> .....	20
<b>2.2. Bases Teóricas</b> .....	25
<b>2.2.1. El género <i>Azospirillum</i></b> .....	25
<b>2.2.2. Metabolismo de <i>Azospirillum</i> spp.</b> .....	26
<b>2.2.3. Requerimientos nutricionales de <i>Azospirillum</i> spp.</b> .....	26
<b>2.2.4. Efectos de factores físico-químicos sobre <i>Azospirillum</i> spp.</b> .....	26
<b>2.2.5. Metabolismo del Nitrógeno</b> .....	27

2.2.6. Hábitat del género <i>Azospirillum</i> .....	28
2.2.7. Aislamiento.....	28
2.2.8. La rizósfera .....	29
2.2.9. Las Rizobacterias (Bacterias Libres Asimiladoras de N <sub>2</sub> - BLAN <sub>2</sub> ) ...	30
2.2.10. Factores que determinan el desarrollo de las Rizobacterias .....	31
2.3. Definición de términos .....	33
2.4. Hipótesis .....	34
2.4.1. Hipótesis general(Hg).....	34
2.5. Variables de estudio .....	34
<b>CAPÍTULO III. ....</b>	<b>35</b>
<b>METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>35</b>
3.1. Ámbito temporal y espacial .....	35
3.1.1. Ubicación política: .....	36
3.1.2. Ubicación Geográfica: .....	36
3.1.3. Factores climáticos: .....	36
3.1.4. Análisis de suelo .....	37
3.2. Tipo de investigación.....	38
3.3. Nivel de investigación.....	38
3.4. Población, muestra y muestreo .....	38
3.5. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	38
3.5.1. Para <i>Azospirillum</i> spp. ....	38
3.5.2. Recolección de muestras para <i>Azospirillum</i> spp. ....	40
3.5.3. Esterilización superficial de las raíces de maíz amiláceo .....	41
3.5.4. Siembra de suelo rizósferico y no rizósferico en medio NFB .....	43
3.5.5. Cuantificación.....	45
3.5.6. Purificación .....	45
3.5.7. Obtención de ADN Metagenómico de los tubos positivos de la dilución .....	48
<b>CAPÍTULO IV. ....</b>	<b>60</b>

<b>PRESENTACIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>60</b>
<b>4.1. Análisis de información.....</b>	<b>60</b>
<b>4.1.1. Crecimiento de <i>Azospirillum</i>.....</b>	<b>60</b>
<b>4.1.2. Bioensayos Inoculados de maíz amiláceo con <i>Azospirillum spp</i>.....</b>	<b>64</b>
<b>4.1.3. Evaluación de los bioensayos .....</b>	<b>65</b>
<b>4.1.4. Presencia de <i>Azospirillum spp</i> en la zona maicera de Chilcapite -     Pomacocha – Acobamba – Huancavelica .....</b>	<b>67</b>
<b>4.1.5. Población del <i>Azospirillum spp</i> en la zona maicera de Chilcapite -     Pomacocha – Acobamba – Huancavelica .....</b>	<b>68</b>
<b>4.1.6. Altura de planta de maíz amiláceo .....</b>	<b>69</b>
<b>4.1.7. Peso seco foliar del maíz amiláceo .....</b>	<b>70</b>
<b>4.1.8. Peso seco de raíz de maíz amiláceo .....</b>	<b>71</b>
<b>4.1.9. Longitud de raíz de maíz amiláceo .....</b>	<b>72</b>
<b>4.1.10. Secuenciación de ADN en la plataforma de Illumina - Miseq     procedente de la Endorizosfera, rizosfera y suelo no rizosferico del     maíz amiláceo.....</b>	<b>73</b>
<b>4.2. PRUEBA DE HIPÓTESIS .....</b>	<b>84</b>
<b>4.2.1. Hipótesis general(Hg).....</b>	<b>84</b>
<b>4.3. DISCUSIÓN.....</b>	<b>84</b>
<b>4.3.1. Altura de planta del cultivo de maíz amiláceo .....</b>	<b>84</b>
<b>4.3.2. Peso seco foliar del cultivo del maíz amiláceo .....</b>	<b>85</b>
<b>4.3.3. Peso seco de raíz del cultivo de maíz amiláceo.....</b>	<b>86</b>
<b>4.3.4. Tamaño de Raíz de plantas de maíz amiláceo.....</b>	<b>87</b>
<b>4.3.5. Identificación de <i>Azospirillum spp</i>.....</b>	<b>88</b>
<b>CAPITULO V.....</b>	<b>91</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>91</b>
<b>CAPITULO VI. ....</b>	<b>92</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>92</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>93</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Ilustración 1. Localizacion del experimento .....	33
Ilustración 2. Proceso de preparacion del medio de cultivo para <i>azospirillum spp</i> ...	37
Ilustración 3. Proceso de preparación de solucion salina para siembra de <i>Azospirillum spp</i> .....	38
Ilustración 4 Process previos para siembra de <i>Azospirillum spp</i> .....	39
Ilustración 5. Procesos de esterilizacion superficial de muestras de raices de maiz para siembra de <i>Azospirillum spp</i> .....	40
Ilustración 6. Procesos de siembra de suelo rizosferico y suelo no rizosferico.....	42
Ilustración 7. Procesos de siembra de <i>Azospirillum spp</i> del medio liquidos a solido en placas. ....	43
Ilustración 8. Procesos de purificacion de aislados de <i>Azospirillum spp</i> .....	44
Ilustración 9. Resumen de proceso de aislamiento y cuantificacion de <i>Azospirillum spp</i> . .....	45
Ilustración 10. Muestra de ADN en Ependorff de 1.5.ml. ....	47
Ilustración 11. Gel de agarosa en cubetas de electroforesis .....	49
Ilustración 12. Muestras de ADN cargando en las camas de electroforesis.....	50
Ilustración 13. Muestras de ADN de suelos visualizadas en el fotocomentador con luz UV. ....	51
Ilustración 14. Remocion de secuencias ambiguas en la plataforma de SEED 2.1....	52
Ilustración 15. Alineamiento de secuencias de ADN en la plataforma de RDP 1. ....	53
Ilustración 16. Semillas de maíz en solución de HgCl <sub>2</sub> al 2,5%.....	54
Ilustración 17. Solución nutritiva esterilizando en autoclave a 120 °C durante 20 minutos .....	55
Ilustración 18. Proceso de siembra en jarra Leonard. ....	56
Ilustración 19. Observacion de anillos en la zona superior del tubo de ensayo .....	59

Ilustración 20. Crecimiento de <i>Azospirillum</i> spp. En la endorizosfera (raíz), suelo rizosferico y suelo no rizosferico al respecto del testigo.....	62
Ilustración 21. Crecimiento de <i>Azospirillum</i> spp. ....	63
Ilustración 22. Crecimiento de <i>Azospirillum</i> spp en medio solidos. ....	61
Ilustración 23. Crecimiento de plantas de maíz después de 25 días de la siembra ....	65
Ilustración 24. Comparación del volumen radicular de maíz inoculada y sin inocular (T).....	66
Ilustración 25. Comparación entre el testigo y los tratamientos .....	67
Ilustración 26. <i>Azospirillum</i> spp, aislado de la endorizosfera y suelo rizosferico del maíz al 50 % de floración de la chacra maicera de Chilcapite .....	68
Ilustración 27. Altura de planta de maíz amiláceo a 60 días, en los bioensayos Acobamba - Huancavelica. 2017.....	84
Ilustración 28. Peso seco foliar del maíz amiláceo a los 60 días de bioensayos Acobamba – Huancavelica 2017.....	85
Ilustración 29. Peso seco de raíz del cultivo de maíz amiláceo a 60 días, en los bioensayos Acobamba - Huancavelica. 2017 .....	86
Ilustración 30. Tamaño de raíz del cultivo de maíz amiláceo a 60 días, en los bioensayos Acobamba - Huancavelica. 2017.....	87

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 3.1. Medios específicos de reactivos de <i>Azospirillum</i> spp	36
Tabla N° 3.2. Mezcla de reacción para electroforesis de ADN	49
Tabla N° 3.3. Secuencias unidas de la muestra número 1 suelo rizosférico	52
Tabla N° 4.1. Obtención de secuencias de ADN normalizadas de muestras	71
Tabla N° 4.2. Número de OTUs de <i>Azospirillum</i> spp e la Endorizosfera	72
Tabla N° 4.3. Número de secuencias asignadas de las muestras de suelo	72
Tabla N° 4.4. Secuencias bacterianas en la endorizosfera	73
Tabla N° 4.5. Géneros bacterianos involucrados como solubilizadores de fosforo	76
Tabla N° 4.6. Géneros bacterianos biofúngicos del cultivo de maíz	77
Tabla N° 4.7. Géneros bacterianos implicados en Biorremediación	77
Tabla N° 4.8. Géneros bacterianos y secuencias implicadas en biocontrol	77
Tabla N° 4.9. Géneros bacterianos nitrificantes	78
Tabla N° 4.10. Géneros bacterianos productoras de fitohormonas	78
Tabla N° 4.11. Géneros bacterianos productores de sideroforos	79
Tabla N° 4.12. Géneros bacterianos productores de ACC - deaminasa	79

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N° 4.1. Análisis de varianza de altura de planta (cm) de maíz	66
Cuadro N° 4.2. Comparación de medias mediante la prueba de Duncan	66
Cuadro N° 4.3. Análisis de varianza del peso seco foliar del maíz	67
Cuadro N° 4.4. Comparación de promedios de Duncan para peso seco del maíz	67
Cuadro N° 4.5. Análisis de varianza del peso seco de raíces (g) de plantas	68
Cuadro N° 4.6. comparación de promedios de Duncan de peso seco de raíz	68
Cuadro N° 4.7. Análisis de varianza de longitud de raíces (m) de plantas	69
Cuadro N° 4.8. Comparación de promedios de Duncan de longitud de raíces	69

## RESUMEN

Con el propósito de identificar y determinar la presencia de la población nativa de *Azospirillum* spp. En la zona maicera de Chilcapite - Pomacocha de la Provincia de Acobamba – Huancavelica, durante la campaña agrícola 2017 – 2018, se evaluó en la Endorizosfera (ER), Suelo Rizosferico (SR) y Suelo no Rizosferico (SNR) del maíz amiláceo al 50% de floración de plantas. Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Interacciones Beneficiosas Planta Microorganismo (IBPM) de la Escuela Profesional de Agronomía, Universidad Nacional de Huancavelica. Se encontró para la zona maicera de Chilcapite, Pomacocha, una población nativa de  $180 \times 10^6$  ufc/g de raíz de *Azospirillum* spp en la ER,  $17,5 \times 10^6$  ufc/g de suelo en el SR y  $13 \times 10^6$  ufc/g de suelo en el SNR. Asimismo, en el bioensayo establecido con siembras de maíz amiláceo en Jarras Leonard con tratamientos T0 (sin inoculación con *Azospirillum* spp), y T1 (ER), T2 (SR) y T3 (SNR) con inoculación de aislados de *Azospirillum* spp, evaluado a los 60 días después de la siembra, muestran diferencias estadísticas significativas para altura de planta, materia seca, peso seco de raíz y longitud de radicular. Asimismo, al realizar la secuenciación masiva de ADN procedente de los medios de cultivo de la dilución  $10^{-4}$  en la plataforma de Illumina miseq, el número de secuencias correspondientes al género *Azospirillum*, fueron muy escasos.

**Palabras claves:** *Azospirillum*. Rizosfera, Maíz amiláceo, Secuenciación Masiva

## ABSTRACT

With the purpose of identifying and determining the presence of the native population of *Azospirillum* spp. The Chilcapite - Pomacocha maize area of the Province of Acobamba - Huancavelica, during the 2017-2018 agricultural campaign, was evaluated in the Endorizosphere (ER), Rhizospheric Soil (SR) and Non-Rhizospheric Soil (SNR) of 50% starch corn of flowering plants. The samples were processed in the Laboratory of Beneficial Interactions Plant Microorganism (IBPM) of the Professional School of Agronomy, National University of Huancavelica. A native population of  $180 \times 10^6$  cfu / g root of *Azospirillum* spp in the ER,  $17.5 \times 10^6$  cfu / g of soil in the SR and  $13 \times 10^6$  cfu / g was found for the corn zone of Chilcapite, Pomacocha of soil in the SNR. Likewise, in the established bioassay with silage corn crops in Jarras Leonard with T0 treatments (without inoculation with *Azospirillum* spp), and T1 (ER), T2 (SR) and T3 (SNR) with inoculation of *Azospirillum* spp isolates, evaluated a 60 days after sowing, they show significant statistical differences for plant height, dry matter, dry root weight and root length. Also, when carrying out the massive sequencing of DNA from the culture media of dilution  $10^{-4}$  on the Illumina miseq platform, the number of sequences corresponding to the genus *Azospirillum* were very scarce.

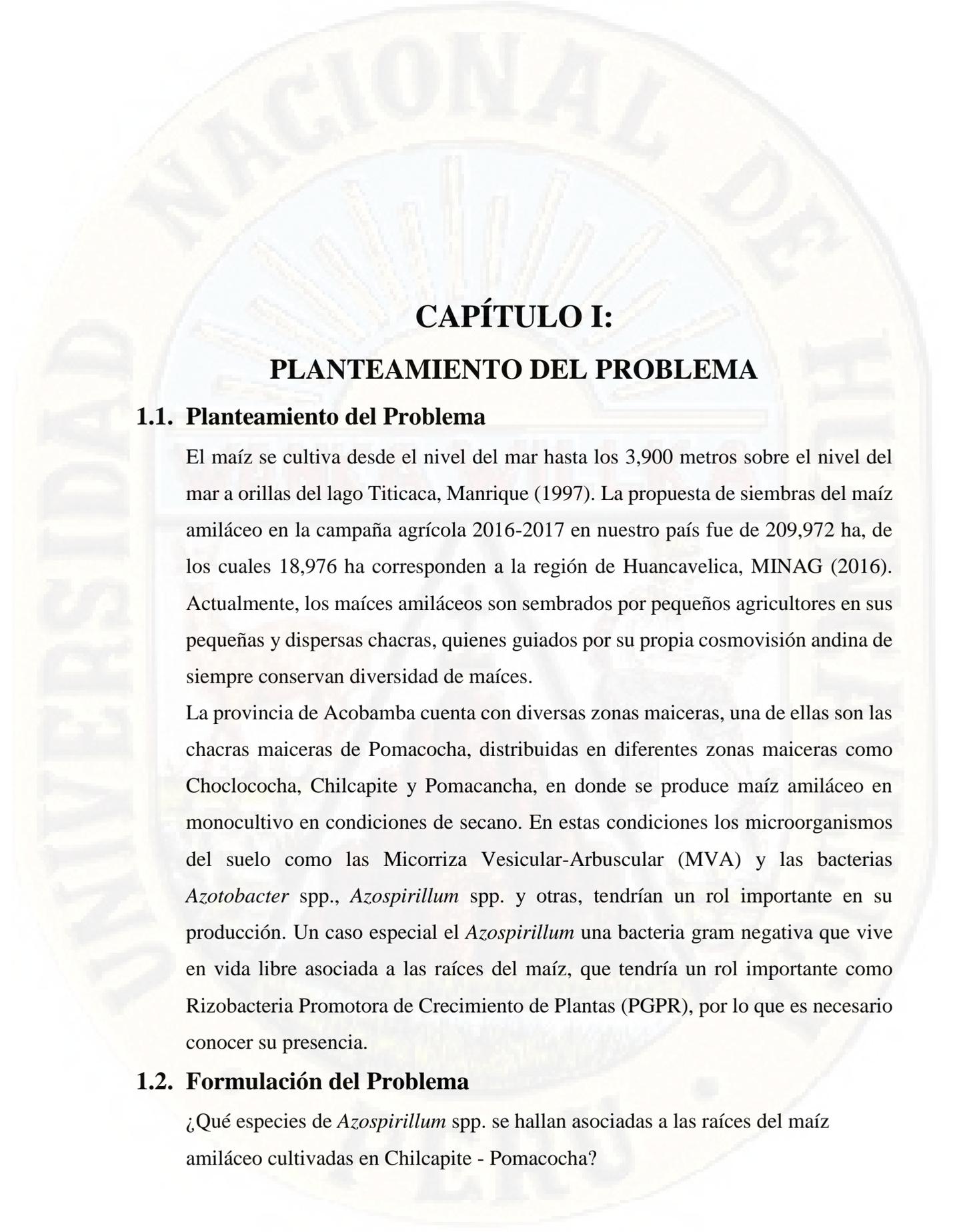
Keywords: *Azospirillum*. Rhizosphere, Starchy Corn, Mass Sequencing.

## INTRODUCCIÓN

La agricultura actual se caracteriza por la obtención de altos rendimientos mediante el empleo desmedido de agroquímicos que, en muchos casos se emplea de manera indiscriminada, causando en el mediano plazo el deterioro del medio ambiente. Sin embargo, en la zona alto andina de la sierra peruana, aún es posible encontrar reductos donde se practica una agricultura de bajos insumos; ciertamente con rendimientos sostenidos. Donde la presencia dinámica del microorganismo biológico estaría contribuyendo a conservar la fertilidad natural del suelo en especial de las chacras maiceras de Chilcapite - Pomacocha y permite producir cosechas sin acceder a los agroquímicos. De acuerdo a las investigaciones, la fijación biológica del nitrógeno (FBN) por bacterias diazotroficas tendría un rol importante al contribuir en el rendimiento de las cosechas, que reduce la necesidad de los fertilizantes nitrogenados y la emisión de gases tóxicos como el  $N_2O$ , obteniendo beneficios económicos y ambientales.

Actualmente, en comunidades aledañas a Chilcapite, Pomacocha, Provincia de Acobamba, ya se utiliza fertilizantes sintéticos para compensar la baja fertilidad de los suelos y así obtener mayores rendimientos. Pero, cabe aclarar, en estas zonas maiceras la siembra se realiza solo en presencia de la lluvia y muchas veces, por la ausencia de lluvias, las cosechas no cubren los gastos generados por los fertilizantes y además, los suelos son superficiales, posiblemente en el futuro se aprecie eutrofización de aguas en los manantes que consumen los mismos agricultores.

El monocultivo tradicional del maíz amiláceo en las zonas maiceras de Chilcapite, en condiciones de secano, sin el empleo de fertilizantes sintéticos, pero con buenos rendimientos sostenidos, ofrecen condiciones para conocer la presencia de *Azospirillum* spp, en relación a la producción del cultivo de maíz.



# CAPÍTULO I:

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### 1.1. Planteamiento del Problema

El maíz se cultiva desde el nivel del mar hasta los 3,900 metros sobre el nivel del mar a orillas del lago Titicaca, Manrique (1997). La propuesta de siembras del maíz amiláceo en la campaña agrícola 2016-2017 en nuestro país fue de 209,972 ha, de los cuales 18,976 ha corresponden a la región de Huancavelica, MINAG (2016). Actualmente, los maíces amiláceos son sembrados por pequeños agricultores en sus pequeñas y dispersas chacras, quienes guiados por su propia cosmovisión andina de siempre conservan diversidad de maíces.

La provincia de Acobamba cuenta con diversas zonas maiceras, una de ellas son las chacras maiceras de Pomacocha, distribuidas en diferentes zonas maiceras como Choclococha, Chilcapite y Pomacancha, en donde se produce maíz amiláceo en monocultivo en condiciones de secano. En estas condiciones los microorganismos del suelo como las Micorriza Vesicular-Arbuscular (MVA) y las bacterias *Azotobacter* spp., *Azospirillum* spp. y otras, tendrían un rol importante en su producción. Un caso especial el *Azospirillum* una bacteria gram negativa que vive en vida libre asociada a las raíces del maíz, que tendría un rol importante como Rizobacteria Promotora de Crecimiento de Plantas (PGPR), por lo que es necesario conocer su presencia.

### 1.2. Formulación del Problema

¿Qué especies de *Azospirillum* spp. se hallan asociadas a las raíces del maíz amiláceo cultivadas en Chilcapite - Pomacocha?

### 1.3. Objetivos

#### 1.3.1. Objetivo general

- ❖ Evaluar la presencia de *Azospirillum* spp. asociada a las raíces del maíz amiláceo cultivadas en Chilcapite - Pomacocha.

#### 1.3.2. Objetivos Específicos

- ❖ Aislar y cuantificar población de *Azospirillum* spp. de la endorizósfera y rizósfera del maíz amiláceo y, suelo no rizosférico de Chilcapite - Pomacocha
- ❖ Identificar población de *Azospirillum* spp. aislada de la endorizósfera y rizósfera del maíz amiláceo y, suelo no rizosférico de Chilcapite - Pomacocha.
- ❖ Determinar los efectos de los aislados en el crecimiento del maíz amiláceo

### 1.4. Justificación

El departamento de Huancavelica siembra anualmente 18,976 ha<sup>-1</sup> de maíz amiláceo, con un rendimiento promedio de 2300 kg/ha<sup>-1</sup>; de los cuales, la provincia de Acobamba siembra en promedio 2,544 ha<sup>-1</sup> con un rendimiento promedio de 2300 kg/ha<sup>-1</sup>, cuyas cosechas son logradas en condiciones de secano (MINAG, 2016), en este escenario, el rol de las rizobacterias tendría un rol importante en la producción de cosechas. Por otro lado, los campesinos de Pomacocha han integrado los animales y otras prácticas que armonizan con la chacra y la producción sostenida del maíz. Pero, esta cultura de convivir con la naturaleza viene en deterioro debido a la implantación de tecnologías foráneas de alto costo, que rompen toda relación armoniosa que existe entre plantas, suelos, microorganismos, el hombre y la salud de la naturaleza.

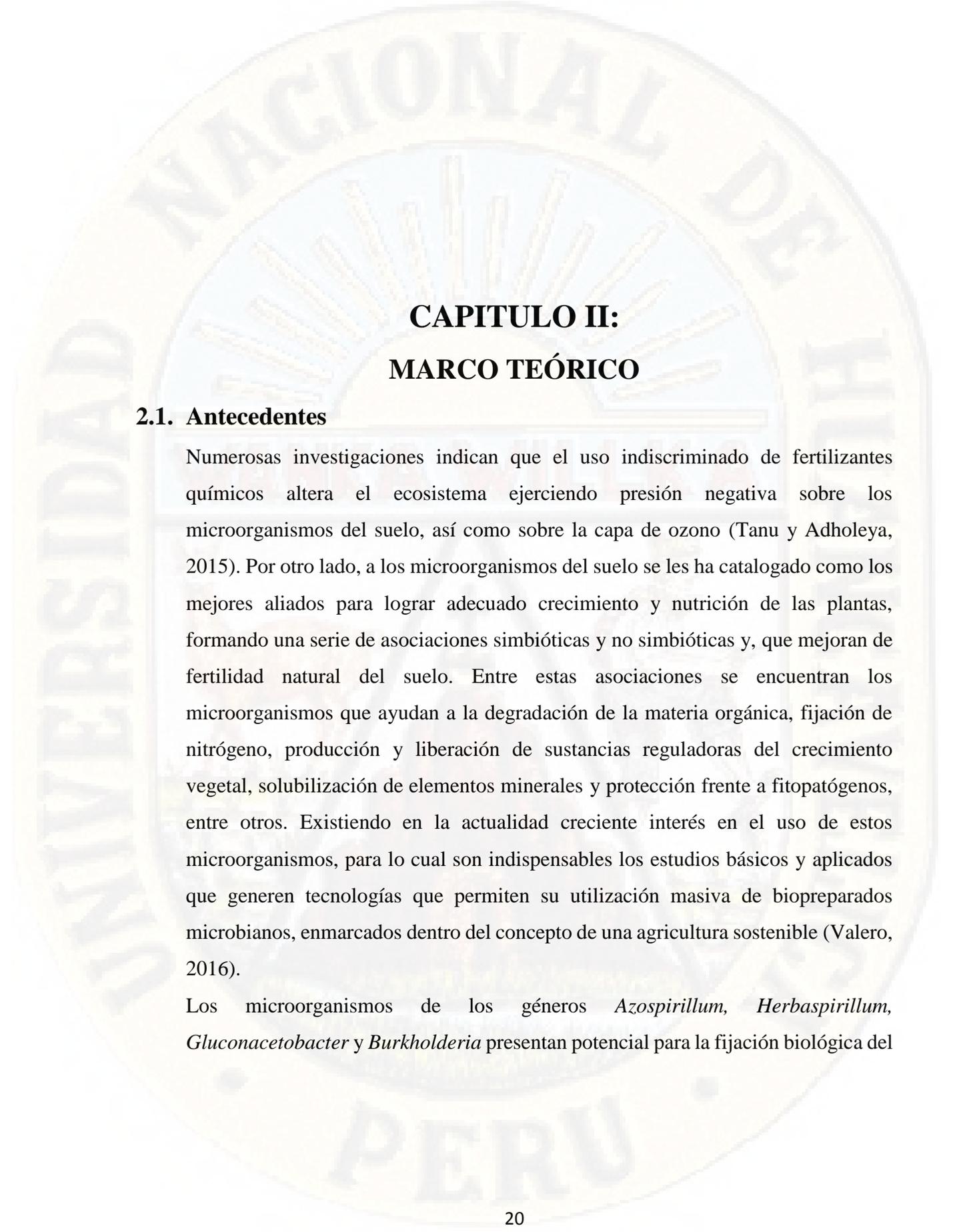
Desde el punto de vista ecológico, la vigorización de las chacras con prácticas de biofertilización permite reducir el uso de energía fósil, degradación del

agroecosistema y pérdida de nutrientes (Izaguirre y Mayoral, 2014). Por otro lado, en la Agenda 21 de la Conferencia sobre Medio Ambiente y Desarrollo firmada en Río de Janeiro en junio de 1992, pide en su capítulo 3:

- a.** Encontrar sustitutos o mejoras ecológicamente racionales de los procesos de producción que son nocivos para el medio ambiente.
- b.** Elaborar aplicaciones para reducir al mínimo la necesidad de insumos químicos sintéticos insostenibles y para utilizar al máximo productos ecológicamente adecuados incluidos los naturales.
- c.** Elaborar nuevas tecnologías para la selección rápida de organismos que puedan tener propiedades biológicamente útiles.

En este contexto, apremia conocer la población nativa de *Azospirillum* spp asociadas a las raíces del maíz en las chacras maiceras de Chilcapite - Pomacocha, los que estarían favoreciendo la producción natural de cosechas, generar recursos y, contribuye al bienestar familiar dotando seguridad alimentaria.

Asimismo, una vez realizada los bioensayos, las cepas promisorias servirán de materia prima para la producción futura de biofertilizantes y proveerlos a los agricultores de la provincia y la región y, con ello contribuir a reducir el empleo de los agroquímicos y la contaminación del medio ambiente.



## CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

Numerosas investigaciones indican que el uso indiscriminado de fertilizantes químicos altera el ecosistema ejerciendo presión negativa sobre los microorganismos del suelo, así como sobre la capa de ozono (Tanu y Adholeya, 2015). Por otro lado, a los microorganismos del suelo se les ha catalogado como los mejores aliados para lograr adecuado crecimiento y nutrición de las plantas, formando una serie de asociaciones simbióticas y no simbióticas y, que mejoran de fertilidad natural del suelo. Entre estas asociaciones se encuentran los microorganismos que ayudan a la degradación de la materia orgánica, fijación de nitrógeno, producción y liberación de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, solubilización de elementos minerales y protección frente a fitopatógenos, entre otros. Existiendo en la actualidad creciente interés en el uso de estos microorganismos, para lo cual son indispensables los estudios básicos y aplicados que generen tecnologías que permitan su utilización masiva de biopreparados microbianos, enmarcados dentro del concepto de una agricultura sostenible (Valero, 2016).

Los microorganismos de los géneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* y *Burkholderia* presentan potencial para la fijación biológica del

nitrógeno, FBN y producción de reguladores del crecimiento en diferentes cultivos agrícolas. En este contexto, se cuantificaron y aislaron bacterias diazotróficas de nueve cultivares de arroz irrigado. Utilizando los medios FBN (*Azospirillum brasilense/ lipoferum*), JNFb (*Herbaspirillum*), JMV (*Burkholderia*), LGI (*Azospirillum amazonense*) y LGI-P (*Gluconacetobacter*), se obtuvieron 58 aislados. De éstos, diez obtenidos en el medio NFb, *A. brasilense* y *A. lipoferum* fueron evaluados. En la FBN, *A. brasilense* y *A. lipoferum* presentaron los mayores valores (41,08 y 46,8 ugN mL<sup>-1</sup>, respectivamente). En cuanto a la síntesis de ácido indolacético, el aislado I-31 fue el mayor productor (13,47 ug mL<sup>-1</sup>). Se concluyó que bacterias diazotróficas endofíticas aisladas de cultivares de la región tienen potencial como inoculante para el cultivo de arroz (Vicentini, 2016).

La aplicación de las PGPR en el campo agrícola requiere estudios previos que garanticen su establecimiento y efectividad. Con este propósito se aisló *Azospirillum* sp. de raíces de maíz y plantas relacionadas. Las raíces se fragmentaron, se esterilizaron con etanol 70%, cloramina 1% y se enjuagaron con agua destilada. Después, se sembraron en medio de cultivo semigelificado y las bacterias se aislaron en medio sólido. La caracterización de *Azospirillum* sp. se hizo con base a la morfología colonial y microscópica y la selección por la actividad de la enzima N<sup>o</sup>asa, mediante la reducción de acetileno. El valor máximo de la N<sup>o</sup>asa fue 281,5 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> planta<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>. Las bacterias con los mayores valores se inocularon en plántulas de 13 días en hidroponía, determinándose la mayor infección (91%) en la zona basal de la raíz, disminuyendo con la profundidad radicular media (86%) y apical (84%). Se concluyó que la dinámica poblacional de *Azospirillum* spp. estuvo relacionada con la concentración de oxígeno y nitrógeno en el sustrato hidropónico (Rangel y Rodríguez, 2011).

Igualmente, con el objetivo de aislar bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Azospirillum* se procesaron nuestras de rizosfera de maíz y se sembraron en medio semisólido sin nitrógeno. La caracterización morfológica y bioquímica identificó *Azospirillum* sp; sin embargo, la caracterización filogenética demostró 94,4 % de

identidad en *Enterobacter asburiae*. Esta bacteria sintetizó celulasas, pectinasas y ácido indolacético ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y fijó nitrógeno, por lo que fue inoculada en semillas de maíz y arroz para investigar su actividad como PGPR, y se determinó entre 100 y 90 % de germinación en las semillas de maíz y arroz, en comparación con 80 a 70 % de los testigos, respectivamente. Asimismo, se alcanzó 43 % de incremento en el peso de las raíces de maíz y 37 % en arroz. En invernadero, las plantas provenientes de semillas inoculadas y cultivadas por 45 días alcanzaron diferencias significativas en el peso foliar, con 0,818 g, en comparación con 0,56 g en los testigos; no obstante, las diferencias fueron no significativas en el peso radicular, obteniéndose 1,34 y 1,03 g, respectivamente, (Oqho y Okokwo, 2012).

*Azospirillum brasilense* es una de las bacterias empleadas para la formulación de uno de los biofertilizantes (Azofer) de Bio-fábrica; es una bacteria con capacidad de fijación de nitrógeno, coloniza la superficie de las raíces de las plantas y la rizósfera de diversos cultivos de importancia agrícola tales como trigo, maíz, sorgo, arroz, cebada o avena. Otra característica de esta bacteria es su capacidad para producir reguladores del crecimiento vegetal (principalmente ácido indol acético, IAA), favoreciendo el crecimiento radicular, lo que permite mayor capacidad de absorción de agua y nutrientes disponibles en el suelo, incluyendo nutrientes o fertilizantes aplicados. En un ensayo realizado en México, en el cultivo de maíz; cuando se aplicó Micorriza se obtuvo 3.1 t/ha; con *Azospirillum brasilense* rindió 3.3 t/ha; y cuando se aplicó Micorriza + *Azospirillum brasilense* el rendimiento fue 3.4 t/ha; mientras que el promedio general fue 1.9 t/ha (Masagro, 2012).

Según Bashan (2010), quienes evaluaron el efecto de *Azospirillum brasilense* en el rendimiento del maíz (*Zea mays* L.), empleando cuatro tratamientos: (T0) = Testigo (no inoculado con *A. brasilense* ni fertilizado químicamente); (T1) = inoculado/no fertilizado químicamente; (T2) = inoculado/fertilizado con media dosis del N total recomendado para el maíz en la región de estudio (60 kg/ha); (T3) = inoculado/fertilizado con la dosis completa de N recomendada (120 kg/ha) y (T4) = no inoculado/fertilizado con la dosis completa del N recomendado. Cabe destacar

los incrementos en el rendimiento de la ganancia neta por hectárea, así como de la relación beneficio/costo promedio en los dos experimentos. La aplicación del fertilizante químico incrementó sustantivamente los costos de producción, pero no se incrementó significativamente el rendimiento de grano respecto al testigo absoluto o el tratamiento que incluyó a *A. brasilense*, de modo que la relación beneficio/costo fue cercana a cero e incluso en el tratamiento inoculado con la bacteria más la mitad del nitrógeno. Esto indica que la inoculación con *A. brasilense* podría ser una alternativa económica viable para la producción de maíz.

El *Azospirillum brasilense* es un microorganismo fijador de nitrógeno no simbiótico, que vive en las zonas de las raíces de las plantas y muy asociados a las mismas. Ejercen efectos beneficiosos sobre el crecimiento de las plantas en una amplia variedad de condiciones ambientales y de suelos. Estudios profundos demostraron que los efectos positivos del *A. brasilense* se debe a que la bacteria produce auxina que a su vez modifica el contenido de las diferentes fitohormonas de la planta, promoviendo la elongación de la raíz, aumentando la densidad y longitud de los pelos radiculares (Masagro, 2012).

La capacidad de *Azospirillum* para colonizar la rizosfera puede depender de algunas propiedades de la bacteria, como la quimiotaxis hacia los exudados de la raíz, un metabolismo versátil que incluye la fijación de nitrógeno, el antagonismo y la competencia con los microorganismos. En tal sentido, resulta importante su habilidad para unir las raíces de las plantas y las partículas del suelo, lo que sugiere que la unión de *Azospirillum* a las raíces involucra dos fases distintas: adsorción y anclaje (Bashan, 2010).

Las bacterias del género *Azospirillum* hacen posible que se mantengan altos los niveles de fijación de nitrógeno a bajas tensiones de oxígeno, aún en condiciones anaeróbicas, además estas bacterias pueden mantener su población en condiciones de estrés por diferentes mecanismos fisiológicos (Cardenas y Garrido, 2010).

Otros de los efectos de la inoculación de *Azospirillum* en plantas están dados por el desarrollo radicular al colonizar tanto la parte interna como la externa de la raíz.

Algunos de los cambios morfológicos que sufre el sistema radicular se encuentra relacionado directamente con la concentración del inóculo, lo cual aumenta el volumen, hay un incremento en el área de la superficie, estimulación de la exudación; así como en la morfología externa de las raíces (Vital y Mendoza, 2014). Las cepas de *Azospirillum* son bien conocidas como Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR, conocidas así por sus siglas en inglés) debido a su capacidad para estimular directamente el crecimiento de las plantas, a través de diversos mecanismos (Vital y Mendoza, 2014).

Según Caballero (2010) afirma que a partir de investigaciones realizadas en México se han empleado cepas de *Azospirillum brasilense* seleccionadas para promover el rendimiento de los cultivos de cereales y maíz, como una alternativa tecnológica para aquellas regiones donde no se aplicaban fertilizantes minerales, o bien, para disminuir su uso en otras regiones. En este sentido Manuel – Lobbit et al. (2013), exponen que la integración de fijación biológica de nitrógeno a cultivos mejora la sustentabilidad de sistemas agrícolas como maíz, sorgo y trigo, demandantes de N<sub>2</sub> o de leguminosas. Asimismo, se ha podido comprobar que *Azospirillum* tanto en condiciones de invernadero y a nivel de campo desempeña un rol muy importante en las poáceas y leguminosas, provocando el aumento de peso seco total, tamaño de la hoja, brotes, aparición temprana de la espiga, número y granos en estas, peso y tamaño del grano, altura de la planta, índice de área foliar y tasa de germinación, cambios en el sistema radicular; igualmente, influye en la tolerancia a la sequía en maíz. Se ha utilizado, además, como alternativa tecnológica para aquellas regiones donde no se aplicaba fertilizantes minerales, o bien, para disminuir su uso en cultivos como el maíz y los cereales de modo que la integración de fijación biológica de nitrógeno a cultivos puede mejorar la sustentabilidad de sistemas agrícolas como maíz, sorgo y trigo, cultivos que demandan grandes cantidades de N<sub>2</sub>.

*Azospirillum* tiene la capacidad de promover el crecimiento vegetal a través de la producción de fitohormonas, la inducción de resistencia sistémica, y la resistencia a diferentes condiciones de estrés medioambiental. Este género es uno de los mejores

candidatos para formular biofertilizantes para incrementar el rendimiento de cultivos de importancia económica. La coinoculación con otras PGPR y micorrizas es otra opción para incrementar los efectos benéficos inducidos por *Azospirillum*. Estudios adicionales son necesarios para conocer los mecanismos moleculares implicados durante la interacción con la planta, sobre la fisiología de las bacterias durante condiciones de estrés y la coinoculación con otros microorganismos para la generación de mejores biofertilizantes (Mortimer, 1981).

## **2.2. Bases Teóricas**

### **2.2.1. El género *Azospirillum***

*Azospirillum* es un género de las proteobacterias gram negativas, de vida libre que taxonómicamente pertenecen a la familia Azotobacteraceae (Caballero, 2015). En el año 1978, se propone la creación del género *Azospirillum* y actualmente son reconocidas once especies. Las dos primeras en ser descritas y las más estudiadas son *A. lipoferum* y *A. brasilense*. Posteriormente fueron descritas las especies *A. amazonense*, *A. halopraeferans*, *A. irakense*, *A. largimobile* y otros. Pocos años antes ésta especie fue considerada como un sinónimo de la especie *A. lipoferum*, pero recientemente, en honor de quien impulsara los estudios con este género bacteriano y descubriera otros diazótrofos, se ha propuesto la especie candidata *A. doebereineriae* (Novo, 2002).

*Azospirillum* no solo fija nitrógeno, produce además auxinas, sustancias promotoras del crecimiento vegetal, como el ácido indol acético (IAA), el cual induce la deformación y el aumento de pelos radiculares, logrando en la planta una mayor absorción de nutrientes. Otra auxina que se ha relacionado con *Azospirillum brasilense* es el ácido indol butírico (IBA) encontrado en plántulas de maíz inoculadas con este microorganismo. Otros posibles mecanismos que benefician el crecimiento de las plantas son la producción de sideróforos, activación de mecanismos de mineralización y solubilización, por producción de antibióticos y por inducción de la

expresión de factores de resistencia por las plantas (Philippot et al. 2005; Raaijmakers *et al.* 2013).

#### **2.2.2. Metabolismo de *Azospirillum* spp.**

Las especies de *Azospirillum* spp., difieren en su capacidad para usar compuestos como fuentes de Carbono y Nitrógeno. Usando para su crecimiento unos pocos monosacáridos, disacáridos, alcoholes polihidroxilados, y principalmente ácidos orgánicos como málico y succínico y algunos aminoácidos Tiene un metabolismo carbonado y nitrogenado muy versátil adaptándose mejor en el entorno rizosférico. Como fuentes nitrogenadas, *Azospirillum* spp., puede utilizar un amplio rango de sustratos como: amonio, nitrato, nitrito, aminoácidos y nitrógeno molecular. En condiciones de estrés se puede enquistar, recubriéndose de una capa de polisacáridos y produciendo gránulos de  $\beta$ -hidroxibutirato como reserva de fuente carbonada (Izaguirre y Moyaral, 2014).

#### **2.2.3. Requerimientos nutricionales de *Azospirillum* spp.**

Están determinados por el tipo de metabolismo celular y condiciones del cultivo. Para la producción de células bacterianas de *Azospirillum* spp. se debe tener una relación C/N mínima para que pueda iniciar su metabolismo (Valero, 2016).

#### **2.2.4. Efectos de factores físico-químicos sobre *Azospirillum* spp.**

Cuando las bacterias se siembran en un medio óptimo y en condiciones adecuadas, sucede un incremento en el número de células en cortos periodos. Puede alcanzarse la población máxima en 24 h; para determinar el desarrollo se debe medir cuantitativamente la población de células al tiempo de sembrar y nuevamente después de la incubación.

❖ **pH:** *Azospirillum* spp., tiene un crecimiento óptimo en un rango de pH de 6,5 -7,0.

- ❖ **Temperatura:** la óptima de crecimiento cercana a los 30 °C, excepto para *Azospirillum largimobile* que presenta una temperatura de 28 °C y *Azospirillum halopraeferens* 41° C.
- ❖ **Aireación:** Crece mejor en medios microaerofílicos. El oxígeno afecta la nitrogenasa (Elbeltagy – Suzuki et al., 2001).

#### 2.2.5. Metabolismo del Nitrógeno

La fijación de nitrógeno es el principal mecanismo por el cual *Azospirillum* afecta el crecimiento de las plantas. En los últimos años, pocos estudios han focalizado el ciclo del nitrógeno dentro de las células, y los genes involucrados. Aparentemente, la habilidad de las cepas de *Azospirillum* suelen mantenerse en forma natural, mejorando su capacidad para expresar una actividad excepcional de la nitrogenasa. La eficiencia de la fijación de nitrógeno y la desnitrificación puede ser regulada a través de la concentración de oxígeno, nitratos y molibdeno.

Sin embargo, bajo condiciones de fijación de nitrógeno, la tasa de respiración no parecía ser un limitante para el crecimiento vegetal. Además, posee la capacidad de adaptarse a bajas temperaturas y a concentraciones bajas de oxígeno, dependiendo de la capacidad de la bacteria para usar eficientemente los nitritos y nitratos (Tsgou, 2003).

La fijación de nitrógeno por *Azospirillum*, fue el primer mecanismo sugerido para promover el crecimiento de las plantas. La mayoría de las evidencias registradas durante las tres décadas anteriores sobre este mecanismo de acción ha generado controversia. Algunos experimentos en invernadero y campo han de mostrado repetidamente que es mínima la transferencia de nitrógeno fijado por *Azospirillum*; sin embargo, no se descarta su capacidad de fijar nitrógeno (Tsgou, 2003). Asimismo, se conoce que todas las cepas colonizan la superficie y la parte interna de la raíz, estimulando el crecimiento vegetal, incrementando en un 80% del nitrógeno fijado en el suelo y la planta (Pérez, 2011).

### **2.2.6. Hábitat del género *Azospirillum***

Las especies de *Azospirillum* son habitantes de la rizósfera y de la phyllosphera, existiendo como flora epífita no patógena. Algunas especies existen en grandes cantidades en la rizósfera de las plantas superiores, en crecimiento asociativo con estas, beneficiándolas con el nitrógeno fijado (García y Olivares, 2012).

Cabe indicar que *Azospirillum* muestra una amplia distribución geográfica alrededor del mundo. Son más abundantes en las regiones tropicales, pero también se les encuentra en las regiones templadas, frías y desérticas. El pH del suelo juega un papel importante en la presencia de las especies del género *Azospirillum*. Las especies de *A. brasilense* y *A. lipoferum* se encuentran en mayor abundancia en suelos con valores de pH cercanos a la neutralidad. A pH por debajo de 5 se les encuentra en forma esporádica, y su aislamiento no se logra de suelos con pH menor a 4.5. Algunos factores abióticos tales como porcentaje de arcilla, contenido de materia orgánica, capacidad de retención de agua y contenido de nitrógeno afectan positivamente la sobrevivencia de *A. brasilense*, en tanto que el tamaño de las partículas de arena y especialmente la alta concentración de carbonato de calcio afectan negativamente la sobrevivencia de esta especie en ausencia de plantas (Masagro, 2012).

### **2.2.7. Aislamiento**

El aislamiento de la bacteria *Azospirillum* resulta por lo general muy simple, ya sea a partir de suelo rizosférico o de la superficie de las raíces (rizoplano) de numerosas plantas hospederas. También se le aísla del interior de las raíces o tallos de algunas plantas (Dobereiner *et al.*, 1976; Novo, 2002). El medio de cultivo usado para el aislamiento de las especies de *Azospirillum* es el NFB (nitrogen fixation biological) semigelificado, libre de nitrógeno y con malato como fuente de carbono. En este medio de cultivo son aisladas predominantemente cepas de las especies *A. lipoferum* y *A. brasilense*. El

medio NFB con algunas modificaciones en su composición y pH, que permiten el aislamiento predominante de otras especies de *Azospirillum*. Estos medios modificados son usados frecuentemente para evaluar la actividad reductora de acetileno, como indicativo de la fijación de nitrógeno (Mortimer – Balows et al., 1981). En tubos, el crecimiento bacteriano en forma de sombrilla, transformado en una película blanca y densa a 2-3 mm por debajo de la superficie del medio de cultivo y el cambio de color del indicador azul de bromotimol son considerados tentativamente como positivos para el aislamiento de la bacteria (Novo, 2002).

#### **2.2.8. La rizósfera**

La rizosfera es la zona comprendida entre las raíces y el suelo donde se producen un gran número de interacciones entre microorganismos e invertebrados que afectan a los ciclos biogeoquímicos, al crecimiento y a la tolerancia de las plantas frente al estrés (biótico y abiótico) (Hinsinger – Bengaough, 2009). La combinación de varios factores tales como la arquitectura física de la matriz del suelo, la distribución espacial y temporal de los rizodepositos y el rol de las raíces como sumideros de agua y nutrientes determinan la ecología de esta área (Bais–Vivanco 2007).

El microbiota presente en la rizosfera está compuesto por bacterias, hongos, oomicetos, virus y arqueas. Estos microorganismos pueden ser atraídos (o no) por los rizodepositos (nutrientes, exudados, células y mucílago liberado por las raíces) (Hinsinger–Bengaough, 2009). La liberación de estos compuestos orgánicos por las raíces, además de suponer una fuente de energía necesaria para el desarrollo de comunidades activas de microorganismos, actúan como señales químicas (a nivel raíz-raíz o raíz-microorganismos) con diferentes respuestas para la misma señal (p. ej. pueden alejar a un organismo al mismo tiempo que atraen a otro o atraer a organismos muy diferentes con consecuencias distintas para la planta), (Arone, 2007).

La rizósfera es el área influenciada por el sistema radicular donde viven grandes concentraciones de microorganismos. Este volumen interfacial entre las raicillas y el espesor del suelo no tiene límites exactos, donde parte de la población rizosférica está en contacto directo con la raíz y hasta puede penetrar en la capa superficial de las raicillas (rizoplano) y en parte extenderse en el suelo próximo, su característica fundamental es que cobija una población alta de microorganismos (Curl, 1986).

La rizósfera se divide en tres áreas: (Curl, 1986).

1. La rizósfera en sentido estricto (rizósfera externa), comprende la región del suelo alrededor de las raíces de las plantas y las poblaciones de los microorganismos habitándolas.
2. El Rizoplano (o la superficie radicular) formado por la superficie radicular y los microorganismos viviendo en él.
3. La Endorizósfera (o rizósfera interna) formado por la corteza radical de la raíz invadido y colonizado por microorganismos saprofitos del suelo (infección del hospedero no patogénica).

#### **2.2.9. Las Rizobacterias (Bacterias Libres Asimiladoras de N<sub>2</sub>- BLAN<sub>2</sub>)**

Las rizobacterias benéficas que promueven el desarrollo vegetal se designaron como promotoras del crecimiento vegetal (PGPR- RPCV) y son extensamente estudiadas por sus efectos benéficos en rendimientos de importantes cultivos. Se conoce que algunos géneros entre ellos *Azospirillum* y *Azotobacter*, se concentran en el rizoplano y su población varía de acuerdo a los cultivos; asimismo, puede penetrar dentro de la corteza de la raíz y producen fitohormonas como giberelinas, auxinas (ácido indolacético), citoquininas, ácido absícico y asimilan N<sub>2</sub> e incrementan el rendimiento en gramíneas (Bashan, 1999).

Las bacterias diazotróficas como *Azospirillum* y *Azotobacter* son capaces de ejercer efectos positivos en las plantas por producir y secretar reguladores del crecimiento vegetal como: auxinas, giberelinas y citoquininas. Por lo

tanto, la germinación, el desarrollo radicular, nutrición mineral y la utilización del agua son mejoradas (Huauya, 2001).

#### **2.2.10. Factores que determinan el desarrollo de las Rizobacterias**

Según Curl (1986), la presencia de las rizobacterias en las chacras estaría influenciados entre otros por:

- a. La disposición de fuentes de carbono
- b. Etapa fenológica de la planta
- c. Fertilidad del suelo,
- d. pH del suelo
- e. Contenido de humedad del suelo,
- f. Sistemas de cultivo
- g. Factores ambientales

El *Azospirillum spp.*, son bacterias microaerofílicas de vida libre asimiladoras de N<sub>2</sub>. Su presencia natural en la rizósfera del cultivo de maíz fue reportada por Dobereiner (1990), en las chacras maiceras de los ayllus Oyolo-Ayacucho. Existiendo también otras especies como reporta, Arone (2007) la existencia de otros géneros de bacterias que tiene una similitud de comportamiento al *Azospirillum lipoferum*, estos microorganismos son: *Azospirillum brasiliense*, *Azospirillumam azonense*, *Azospirillum halopraeferan* y otros. Al respecto, Dobereiner *et al.* (1994), manifiestan, que *Azospirillum spp.* han sido frecuentemente aislados del interior de raíces y partes aéreas de muchas plantas. Asimismo, se ha demostrado que los componentes específicos de los exopolisacáridos del *Azospirillum brasiliense* Sp7 determinan el grado de penetración a las raíces, Will (1992) y Dobereiner (1990). Las especies del género *Azospirillum* aunque son capaces de crecer adecuadamente con aireación completa en presencia de nitrógeno combinado, pueden asimilar N<sub>2</sub> solamente cuando se reduce drásticamente la tensión de O<sub>2</sub> pero no se elimina totalmente, este modo de vida se denomina “microaerofilia” (Rodelas, 2001).

La aplicación práctica de la inoculación con diazótrofos ha sido positiva, observándose notables incrementos en los rendimientos en diferentes cultivos, principalmente en cereales. Estos resultados obtenidos, especialmente con la inoculación de *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum brasilense*, no deben atribuirse exclusivamente a la ganancia de N<sub>2</sub> por las plantas, ya que el efecto beneficioso de estos microorganismos en determinadas condiciones se debe fundamentalmente a la capacidad de solubilizar fosfatos y sintetizar sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal, tales como, vitaminas y hormonas vegetales que intervienen directamente sobre el desarrollo de las plantas, donde *A. chroococcum* sintetiza tiamina de 50–100 mg g<sup>-1</sup> de sustancia celular seca; ácido nicotínico de 200–600 mg g<sup>-1</sup> de sustancia celular seca y ácido pantoténico y biotina; ácido indolacético (AIA); ácido giberélico y citoquininas (Sambrook, 1989). En el Perú se han realizados algunos estudios sobre el efecto que ejerce los microorganismos en la rizósfera, estos autores encontraron a nivel de la rizósfera una población mucho mayor de bacterias asimiladoras de N<sub>2</sub> (*Azotobacter* spp, *Azospirillum* spp) con respecto al suelo libre de la influencia de las raíces, relación que es establecida por el coeficiente Rizósfera/Suelo (R/S). Asimismo, Sambrook (1989). Al evaluar la variación poblacional de *Azospirillum* spp y *Azotobacter* spp durante el desarrollo del maíz, estableció que durante la floración ocurrió la mayor población endorizosférica del *Azospirillum* spp, mientras que, en el siguiente estado de llenado de grano del maíz, ocurrió un aumento de la población rizosférica tanto de *Azospirillum* spp. como de *Azotobacter* spp.

Los diazótrofos son capaces de sintetizar sustancias fungistáticas que, al inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos del suelo, promueven indirectamente el desarrollo de las plantas, especialmente en las etapas tempranas del cultivo. Estos compuestos tienen acción sobre hongos pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium* y

*Rhizoctonia*, variando su acción antagónica con la cepa bacteriana utilizada' (Sambrook, 1989).

### 2.3. Definición de términos

- **Identificación.-** La identificación está vinculada a la identidad, que es el conjunto de los rasgos propios de un sujeto o de una comunidad. Dichos rasgos caracterizan al individuo o al grupo frente a los demás. La identidad es, por otra parte, la conciencia que un ser humano tiene respecto a sí mismo.
- **Asociación de microorganismos.-** es la simbiosis *lato sensuse* define como cualquier interacción biológica entre especies, ya sea que estas incidan positiva o negativamente entre ellas, como por ejemplo el mutualismo, comensalismo y parasitismo.
- **Endorizosfera.-**Consiste en el tejido de la raíz e incluye la endodermis y las capas corticales.
- **Inocular. -**Introducir en el organismo por medios artificiales el virus o la bacteria de una enfermedad contagiosa.
- **Cepas. -** Cepa es, en microbiología, población de células de una sola especie descendientes de una única célula, usualmente propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias. De una manera más básica puede definirse como un conjunto de especies bacterianas que comparten, al menos, una característica
- **Bioensayo.** Utilización de organismos vivos para medir el efecto de una sustancia, factor o condición, comparando la situación antes y después del experimento.
- **Diazotróficas.-** Los diazótrofos son bacterias que hacen fijación de nitrógeno atmosférico en una forma más disponible como es el amonio (Postgate, 1998). Un diazótrofo es un organismo que es capaz de crecer sin fuentes externas de nitrógeno fijado.
- **Rizobacterias.-** Bacterias que habitan dentro de la rizósfera de la planta

## 2.4. Hipótesis

### 2.4.1. Hipótesis general(Hg)

Existencia de *Azospirillum* spp. asociada a las raíces del maíz amiláceo cultivadas en Chilcapite - Pomacocha

## 2.5. Variables de estudio

- ❖ Se evaluó presencia de población nativa de *Azospirillum* spp. en la Endorizósfera, Rizosfera y Suelo no Rizoferico del maíz amiláceo crecida en Chilcapite - Pomacocha mediante del número más probable.
- ❖ Se evaluó presencia de población nativa de *Azospirillum* spp. en la Endorizósfera, Rizosfera y Suelo no Rizoferico del maíz amiláceo en la dilución  $10^{-4}$  mediante secuenciación masiva Illumina miseq del gen 16S rRNA.

## CAPÍTULO III.

### METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

#### 3.1. **Ámbito temporal y espacial**

El presente trabajo de investigación se realizó durante la campaña agrícola 2017 - 2018, en la comunidad de Chilcapite, Distrito Pomacocha y Provincia de Acobamba, departamento de Huancavelica-Perú.



**Ilustración 1.** Localización del experimento en Chilcapite, Pomacocha, Acobamba.

### 3.1.1. Ubicación política:

Región	: Huancavelica
Provincia	: Acobamba
Distrito	: Pomacocha
Zona maicera	: Chilcapite

### 3.1.2. Ubicación Geográfica:

Altitud	: 3557 m.s.n.m.
Latitud sur	: 12°15'24"
Latitud Oeste	: 74°30'43" Meridiano de Greenwich

### 3.1.3. Factores climáticos:

Temperatura promedio	: 12 °C
Humedad relativa	: 70%
Precipitación promedio anual	: 600 – 800 mm.

Fuente SENAMHI. Estación Meteorológica Acobamba

### 3.1.4. Análisis de suelo



**VALLE GRANDE**  
Laboratorio de Química Agrícola

**50 AÑOS**  
1965 -

SOLICITANTE: RUBEN CRISTIAN CGENTE  
GASPAR

PREDIO: CHILCAPITE

MATRIZ: SUELO AGRICOLA

ANÁLISIS N° 501-01S -2018

LUGAR: ACOBAMBA

FECHA DE RECEP: 03/05/2018

#### INFORME DE ANÁLISIS DE SUELO CARACTERIZACIÓN

MUESTRA: PREDIO CHILCAPITE: CULTIVO DE MAIZ

PARÁMETRO	RESULTADO	UNIDAD	MÉTODO	TÉCNICA
Textura				
Arena	19.76	%		
Limo	40.72	%		
Arcilla	39.52	%	MES - 001	Bouyoucos
Clase Textural	FRANCO ARCILLO LIMOSA			
Porcentaje de Saturación de Agua		%	MES - 002	Gravimétrico
Carbonato de Calcio Total	43.51	%	MES - 003	Gravimétrico
Conductividad Eléctrica (E.S) a 25 °C.	< 0.01	dS / m	MES - 004	Electrométrico
pH (1/1) a Temp = 24.1 °C	0.57		MES - 005	Electrométrico
Fósforo Disponible	6.93	ppm	MES - 006	Olsen
Materia Orgánica	7.09	%	MES - 007	Walkley y Black
Potasio Disponible	2.90	ppm	MES - 009	Acetato de Amonio
Cationes Cambiables	103.20			Extractante: Ac. Amonio
Calcio		mEq / 100 g	MES - 010	FAAS
Magnesio	17.87	mEq / 100 g	MES - 011	FAAS
Sodio	1.16	mEq / 100 g	MES - 012	FAAS
Potasio	0.06	mEq / 100 g	MES - 013	FAAS
Aluminio + Hidrógeno	0.26	mEq / 100 g	MES - 014	KCl / Volumétrico
P.A.I	< 0.01	%	MES - 015	Cálculo Matemático
C.I.C.E	< 0.05	%	MES - 017	Cálculo Matemático
	19.35	mEq / 100 g		

#### DONDE:

E.S : Extracto de Saturación.  
( 1 / 1 ): Relación Masa del Suelo / Volumen del Agua.  
P.A.I: Porcentaje de Acidez Intercambiable.  
C.I.C.E : Capacidad de Intercambio Catiónico Efectivo.

% : Masa / Masa.

ppm : mg / Kg.

MES : Método Propio del Laboratorio.

FAAS : Espectrometría de Absorción Atómica por Llama.

#### NOTA

- 1: Los resultados presentados corresponden sólo a la muestra indicada
- 2: Se prohíbe la reproducción parcial o total del presente informe sin la autorización del Laboratorio de Química Agrícola.

MSc. Quím. Alexis Saucedo Chacón  
JEFE DEL LABORATORIO



MSc. Agr. Julio Castro Lazo  
DIRECTOR DEL LABORATORIO

Promotora de Obras Sociales y de Instrucción Popular  
Panamericana Sur Km. 143, San Vicente de Cañete, Lima - Perú  
Teléfono: (011) 581 2261 | Celular: 991 092 569  
Email: laboratorio@vallegrande.edu.pe | Web: www.vallegrande.edu.pe

Fuente: Laboratorio química agrícola Valle Grande, 2018.

### 3.2. Tipo de investigación

El presente trabajo de investigación es descriptivo.

### 3.3. Nivel de investigación

El presente trabajo de investigación es básica.

### 3.4. Población, muestra y muestreo

**Población:** Estaba conformada por 300 plantas.

**Muestra:** Se tomó 90 plantas al azar al estado de 50% de floración de plantas.

**Muestreo:** Se empleó muestreo simple - aleatorio.

### 3.5. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

#### 3.5.1. Para *Azospirillum* spp.

Se empleó el método del Número Más Probable (NMP), con 5 repeticiones, utilizando la técnica de las diluciones sucesivas, según Alexander (1965), adaptadas para *Azospirillum* por Dobereiner (1980) y aplicado por Julca (1991); cuyo medio específico es:

**Tabla N° 3.1.** Medios específicos de reactivos de *Azospirillum* spp

REACTIVOS	CANTIDAD	UNIDAD
Ácido Málico	5.00	G
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.50	G
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.50	G
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.20	G
CaCl <sub>2</sub>	0.02	G
NaCl	0.10	G
FeCl <sub>2</sub> (0.1% en solución)	0.01	G
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.01	G
EDTA(Fe)(1% p/v en agua)	4.00	MI
Glucosa	2.50	G
Agar	1.75	G
KOH	4.00	G
Extracto de levadura	0.02	G
Azul de Bromotimol	3.00	MI
(Solución al 5% en etanol y 50% de agua de caño)		
pH*	6.6 - 6.8	(verde Claro)

Completar con agua destilada	hasta 1000	MI
------------------------------	------------	----

Durante el proceso de preparación del medio libre de nitrógeno para *Azospirillum* spp., para llegar al pH 6.7 se agregó pizcas de KOH puro hasta que el medio viró de amarillo intenso a verde claro, como se puede apreciar en la ilustración 2.



**Ilustración 2.** Proceso de preparación del medio del cultivo para *Azospirillum* spp. (a) Pesado de reactivos sólidos, (b) Cambio de pH del medio de cultivo líquido con KOH, (c) Medio de cultivo con pH 6.7, (d) Proceso de pipeteo de Medios de cultivo, solución salina y tapado de los tubos.

Todo este medio mineral carente de nitrógeno y específico para *Azospirillum*, y todo el material que se ha requerido fueron auto clavadas por 15 minutos a una presión de 15 – 20 atmosferas (Ilustración 3).



**Ilustración 3.** Proceso de preparación de solución salina para siembra de *Azospirillum* spp.

### **3.5.2. Recolección de muestras para *Azospirillum* spp.**

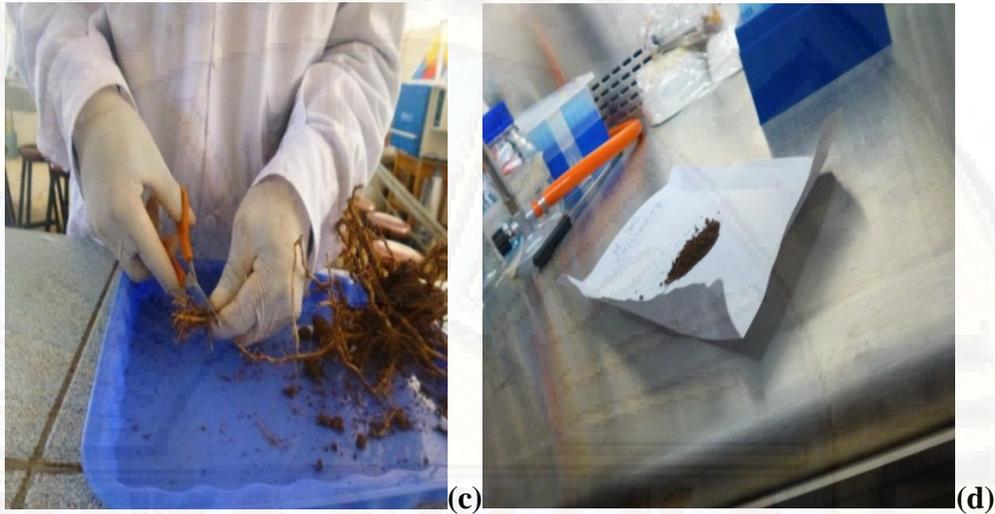
Las muestras de raíces sirvieron para el aislamiento de *Azospirillum* spp. Se seleccionó de las raíces de 90 plantas de maíz amiláceo, de las cuales se tomó 3 g de suelo rizósferico, 3 g de suelo no rizósferico y 3 g de raíces, según la metodología descrita por Areche y Mauri (2009).



**(a)**



**(b)**



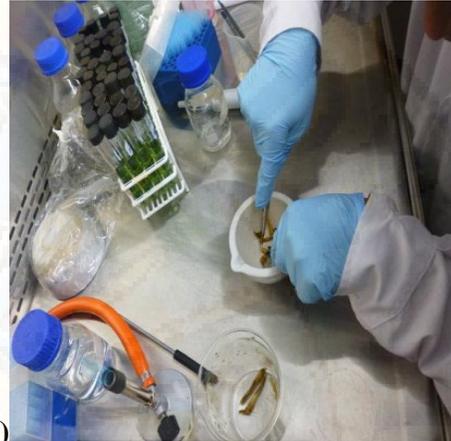
**Ilustración 4.** Procesos previos para siembra de *Azospirillum* spp. (a) Oreado de raíz del maíz muestreado, (b) Extracción de suelo rizósferico en placas, (c) Corte de raíces finas, (d) Pesado de suelo rizósferico, no rizósferico y raíces cortadas.

### 3.5.3. Esterilización superficial de las raíces de maíz amiláceo

Una vez lavado las raíces con agua de caño y agua destilada se procedieron a cortar las raíces más finas de cada planta (hasta 2 mm de diámetro) a una longitud de 5 cm, posteriormente se mezcló y pesó 3 g de raíces finas. Estas raíces se sumergieron a un falcón con etanol al 96% por un periodo de 1 minuto, se tapó herméticamente el falcón para agitar manualmente, luego de eliminar el alcohol se adiciono lejía al 4% por 15 minutos, se agito cada cierto tiempo y finalmente se eliminó la lejía y, nuevamente se adiciono etanol al 96% por 30 segundos, y posteriormente se lavó con H<sub>2</sub>O destilada estéril por 5 veces a más. Una vez esterilizada superficialmente las raíces se colocaron en un mortero estéril con adición de solución salina al 0,85% para proceder a triturar, el líquido obtenido se sembró en cada tubo de ensayo conteniendo medio (NFB) libre de nitrógeno (Areche y Mauri, 2009).



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)

**Ilustración 5.** Procesos de esterilización superficial de muestras de raíces de maíz para siembra de *Azospirillum* spp. (a) Lavado de raíz con agua destilada (b) Cortado de raíces a 2 mm, (c) Triturado de raíces finas de maíz en el mortero estéril, (d) Líquido obtenido del mortero en solución salina al 0.85 % (e) Siembra del líquido obtenido en cada tubo de ensayo conteniendo medio (NFB) libre de nitrógeno.

### 3.5.4. Siembra de suelo rizósferico y no rizósferico en medio NFB

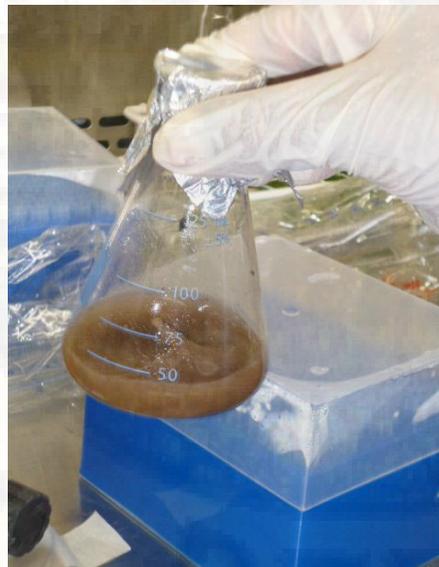
Se pesó 3 g de suelo y se adicionaron a la solución salina (0,85%) de 27 ml, a partir de la cual se procedió la dilución respectiva hasta  $10^{-8}$  en 9ml de solución salina. En cada dilución se empleó 1 ml de la solución y posteriormente de cada dilución se utilizó 1 ml para inocular el medio cultivo líquido NFB (medio libre de nitrógeno), según Dobereiner (1990). Finalmente, fueron incubados por 15 días a una temperatura de 28 °C y las lecturas fueron evaluadas diariamente.



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)

**Ilustración 6.** Procesos de siembra de suelo rizósferico y suelo no rizósferico (a) Pesado de suelo rizósferico de 3 g, (b) Adición de solución salina al erlenmeyer, (c) Preparado de suelo rizósferico con solución salina, (d) Siembra en tubos de ensayo, (e) incubación por 15 días a una temperatura de 28 °C.

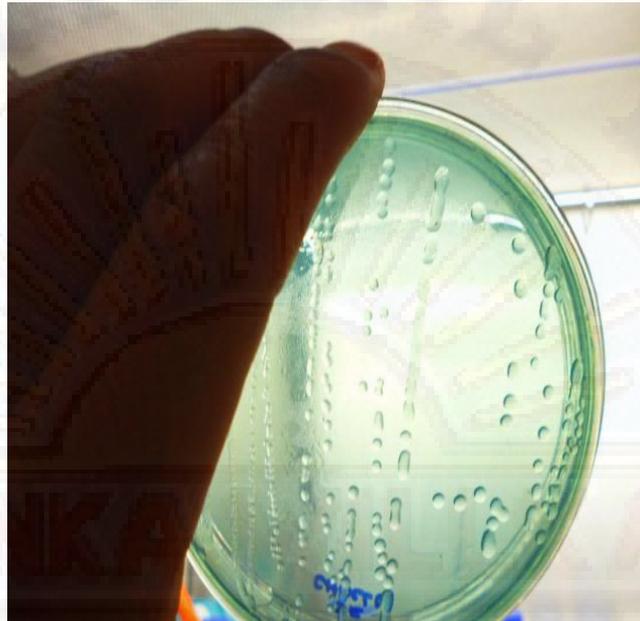
Para la siembra en medio sólido se utilizó de la dilución  $10^4$  y se incubaron a 28 °C durante 8 días. Las unidades formadoras de colonias (UFCs) con diferente morfología se seleccionaron mediante inspección de una lupa de aumento de 10X y cada una de ellas se resembró en placas petri hasta la obtención de colonias morfológicamente uniformes. No se observó la aparición de nuevas UFCs después de 72 horas de incubación (Areche y Mauri, 2009).



(a)



(b)



(c)

**Ilustración 7.** Procesos de siembra (a) Siembra de *Azospirillum* spp. del medio líquido a sólido en placas, b) Incubación de placas, c) Obtención de colonias morfológicamente uniformes.

### 3.5.5. Cuantificación

La población de *Azospirillum* spp. fueron cuantificadas mediante la aplicación del NMP (Tabla estadística de Cochran, 1950).

### 3.5.6. Purificación

La purificación de la cepa aislada de *Azospirillum* spp, se prepararon en el medio NFB (medio libre de nitrógeno), sólido, a partir de los tubos de ensayo positivos, las muestras de *Azospirillum* spp, se tomaron con un ansa (previamente esterilizada) y fueron sembradas mediante estrías, para que las colonias queden uniformemente distribuidas. Las placas de Petri se incubaron a 28°C por 24 - 48 horas (Dobereiner,1976).



**Ilustración 8.** Proceso de purificación de aislados de *Azospirillum* spp. (a) Placas preparadas con medio sólido, (b) Aislamiento de *Azospirillum* de tubos positivos de  $10^4$ , (c) Siembra de bacteria (*Azospirillum* spp.) en placa como se muestra, (d) Placas Petri fueron incubadas a  $28^{\circ}\text{C}$  por 24 - 48 h, dependiendo del crecimiento de *Azospirillum* spp.



**Ilustración 9.** Resumen del proceso de aislamiento y cuantificación de *Azospirillum* spp. en la zona maicera de Chilcapite - Pomacocha – Acobamba – Huancavelica

### **3.5.7. Obtención de ADN Metagenómico de los tubos positivos de la dilución**

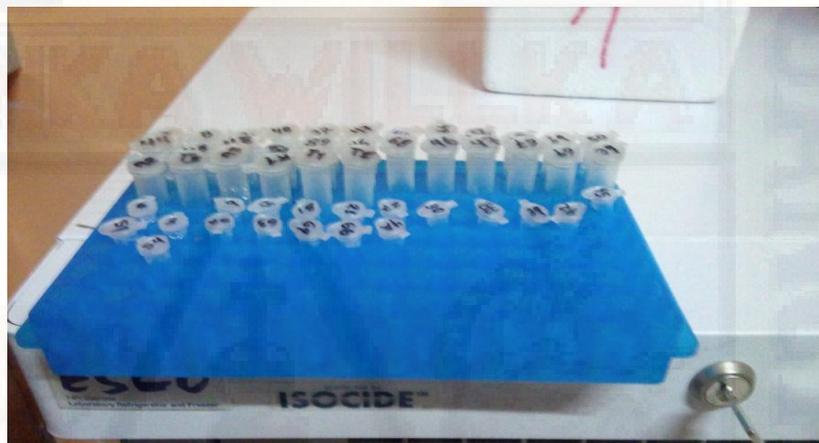
#### **10<sup>-4</sup> de las muestras de suelo endorizoférico, rizoférico y no rizoférico**

Para la obtención de ADN metagenómico se utilizó el producto PowerSoil® DNA Isolation Kit Mo Bio, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

#### **Protocolo de extracción de ADN metagenómico**

- 1) Obtención de pellet de los tubos positivos de la dilución 10<sup>-4</sup>
- 2) Mezclar la muestra, resuspender el pellet con ligero vortex, y adicionar la solución C<sub>1</sub>, 60 µl (si este precipitado es de color blanco lechoso, calentar a 60 °C hasta disolver).
- 3) Invertir manualmente varias veces los microtubos para mezclar.
- 4) Utilizar el homogenizador por 90 segundos a 1600 rpm.
- 5) Centrifugar en una microfuga a 12200 rpm por 30 segundos (no exceder los 10000xg los tubos se pueden romper).
- 6) Retirar el sobrenadante a un nuevo tubo de 2 ml aprox. de 400 a 500 µl.
- 7) Adicionar la solución C<sub>2</sub>, 250 µl y dar vortex por 5 segundos.
- 8) Incubar a 4 °C por 5 minutos.
- 9) Centrifugar a 12200 rpm por 1 minuto.
- 10) Retirar el sobrenadante, aprox. 600 µl a un nuevo tubo de 2 ml.
- 11) Adicionar la solución C<sub>3</sub>, de 200 µl y dar vortex ligero.
- 12) Incubar a 4 °C por 5 minutos.
- 13) Centrifugar a 12200 rpm por 1 minuto.
- 14) Retirar el sobrenadante hasta 750 µl a un nuevo microtubo de 2 ml.
- 15) Adicionar solución C<sub>4</sub> (mezclar bien antes de utilizar), 1200 µl y dar vortex por 5 segundos.
- 16) Cargar dentro del SPIN FILTER aproximadamente 650 µl.
- 17) Centrifugar a 12200 rpm por 1 minuto, volver a cargar 650 µl, centrifugar y cargar otra vez; realizar solo 3 cargadas y desechar el eluido.
- 18) Lavar con la solución C<sub>5</sub>, adicionar 500 µl, al SPIN FILTER.

- 19) Centrifugar a 12200 rpm por 30 segundos. Desechar el eluido.
- 20) Volver a centrifugar a 12200 rpm por 1 minuto.
- 21) Retirar el filtro y colocar en un nuevo tubo eppendorf.
- 22) Adicionar 50  $\mu$ l de agua MLQ estéril a la membrana.
- 23) La membrana se debe rehidratar por más de un minuto.
- 24) Centrifugar a 12200 rpm por 30 segundos.
- 25) El ADN está listo en el eluido.
- 26) Almacenar el ADN a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.



**Ilustración 10.** Muestra de ADN en Eppendorff de 1.5 ml

**Preparado de geles de agarosa para la comprobación de ADN proveniente de la dilución  $10^{-4}$  de las muestras de suelo endorizosférico, rizosférico y no rizosférico**

Es necesario comprobar la presencia y la calidad de ADN extraído mediante la técnica de electroforesis.

**Protocolo para preparar tampón buffer para electroforesis de ADN.**

Tenemos el tampón TBE 10x (0,5x), para saber las cantidades a emplear realizamos la siguiente ecuación de cálculo de dilución en una concentración está planteada por la siguiente formula:

$$C1.V1= C2.V2$$

$$10x . V1=0,5x . 500 \text{ ml}$$

$$V1=\frac{0,5x . 500 \text{ ml}}{10x} = 25 \text{ ml}$$

C1: concentración inicial

C2: concentración final

V1: volumen inicial

1. Para preparar 500 ml de tampón buffer necesitamos 25 ml de tampón TBE 10x (0,5x) y 475 ml de agua ultra pura. (Los 475 ml de agua ultra pura se complementan con los 25 ml de tampón TBE 10x lo que corresponde a 500 ml de solución).

### **Protocolo para el preparado de geles de agarosa al 1%**

1. Preparar la cama de electroforesis con cinta masking tape para evitar derrames de la solución.
2. Para el tamaño de la cama que se empleó, se usó 0,6 g de agarosa la que se adicionó a un frasco de 250 ml de tapa color azul con rosca.
3. Medir 40 ml de tampón TBE en una probeta de 100 ml que está en el ambiente oscuro.
4. Una vez medida los 40 ml de tampón TBE adicionar al frasco que contiene 0,6 g de agarosa.
5. Llevar la solución al microondas por un tiempo de 120 segundos para disolver la agarosa, en caso que no se disolviera bien la agarosa, aumentar por un tiempo de 20 segundos en el microondas, hasta que la solución se muestre claro sin grumos.
6. Una vez retirada la solución del microondas vaciar a la cama de electroforesis, previamente preparada.
7. Colocar los peines en la cama y dejar que solidifique por un tiempo de 40 minutos.

#### **a. Preparado de marcador de DNA 300 $\mu$ l.**

DNA marcador 1  $\mu$ l x 50= 50  $\mu$ l

Loading dye 6x 1  $\mu$ l x 50= 50  $\mu$ l

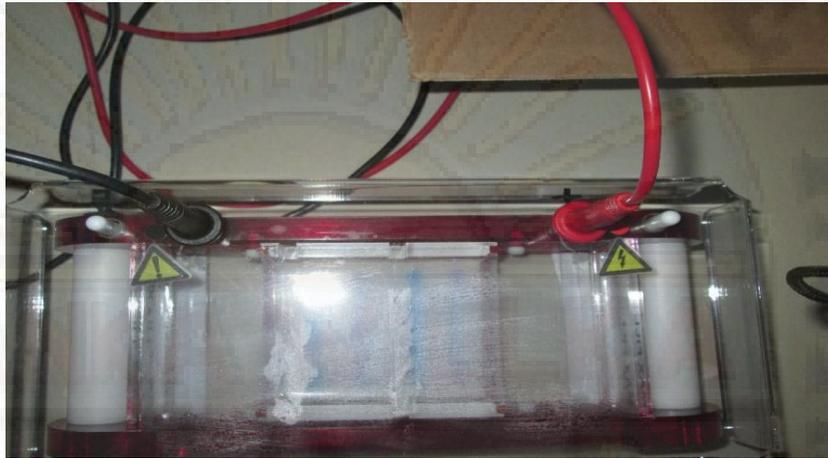
Agua ultra pura 4  $\mu$ l x 50= 200  $\mu$ l

300  $\mu$ l

**b. Preparado de Gel Red para 1ml**

Gel Red (1000x) 3  $\mu$ l

Loading buffer 997  $\mu$ l, por 1000  $\mu$ l.



**Ilustración 11.** Gel de agarosa dentro de la cubeta de electroforesis.

**Comprobación de las muestras de ADN**

Para comprobar la presencia y calidad del ADN después de su extracción y purificación, se tomó 5  $\mu$ l de muestra de ADN, 4  $\mu$ l de Marcador y 2  $\mu$ l de tampón de carga, esta mezcla se empleó para cargar en geles de agarosa preparados al 1% en solución tampón TBE. La electroforesis se realizó empleando una corriente continua de 80 V, que una vez corrido en el gel se fotografiaron bajo luz UV. Como marcador de tamaño molecular se utilizó el denominado Molecular DNA Marker. En los geles debe comprobarse una banda superior a 20 kpb, a veces se nota presencia ADN degradado con valores inferiores.

**Tabla N° 3.2.** Mezcla de reacción para electroforesis de ADN

<b>Productos</b>	<b>Cantidad (<math>\mu</math>l)</b>
ADN	5 $\mu$ l
Marcador DNA	4 $\mu$ l
Loading buffer	2 $\mu$ l

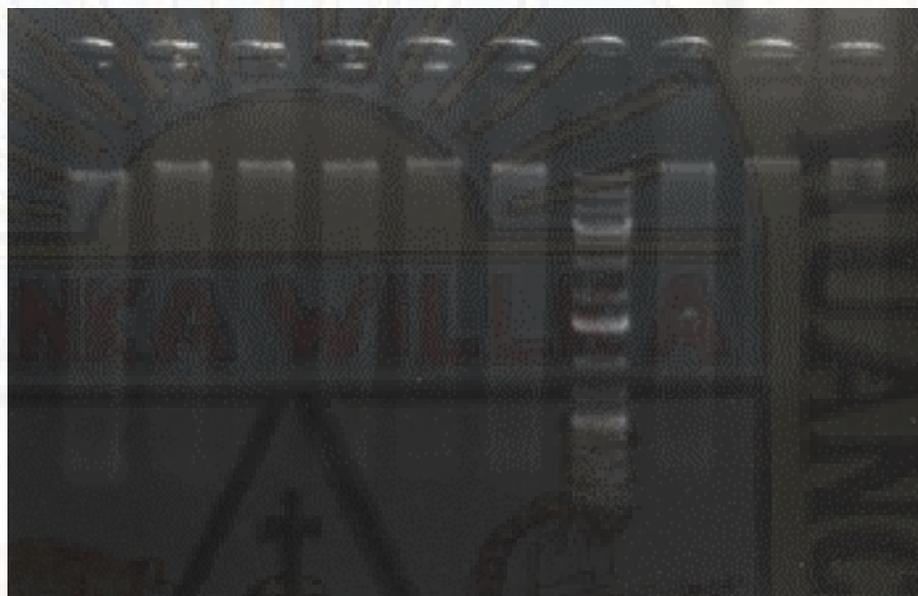
### **Protocolo para cargar las muestras ADN en gel de agarosa**

1. Retiramos las cintas maskin de las camas de electroforesis.
2. Poner la cama con gel en la cubeta de electroforesis con tampón TBE 0,5x.
3. Retirar los peines de la cama de electroforesis cuidadosamente sin dañar el gel.
4. Centrifugar con un mini spin el marcador y loading buffer para poder juntar y deshielar.
5. Extraer 5  $\mu$ l de ADN a un parafilm (para cada muestra), y adicionar 2 ul de loading buffer que contiene gel red, juntar y cargar la muestra en el gel.
6. Extraer 4  $\mu$ l de marcador y adicionar 2 ul de loading buffer que también contiene gel red, y se carga en los pocillos extremos del gel.
7. Una vez cargada las muestras de ADN se corre el gel a 80 V por un tiempo de 45 minutos.



**Ilustración 12. Cargando de muestras de ADN en gel de agarosa y colocado en camas de electroforesis.**

8. Transcurrido el tiempo, se tomaron fotos al gel empleando un fotodocumentador y con la ayuda de una laptop y el programa SMARTVIEW PRO 2100, se aprecia las bandas del ADN en la parte superior del gel.



**Ilustración 13.** El ADN se visualiza en la parte superior del gel de agarosa y se tiene de referencia un marcador.

### **Amplificación y Secuenciación del gen 16S rRNA**

Mediante un servicio de la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica (**Fisabio**) Valencia, España, se realizó la amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA en la plataforma de Illumina Miseq.

### **Procesamiento de secuencias a través de programas bioinformáticas.**

- **Unión de secuencias**

Las secuencias fueron entregadas por parte de la empresa Fisabio en formatos fastq y para la unión de Forward y Reverse de nucleótidos de estas secuencias de cada una de las muestras (suelo rizosférico, no rizosférico y endorizosférico), se llevó a cabo en el programa SEED

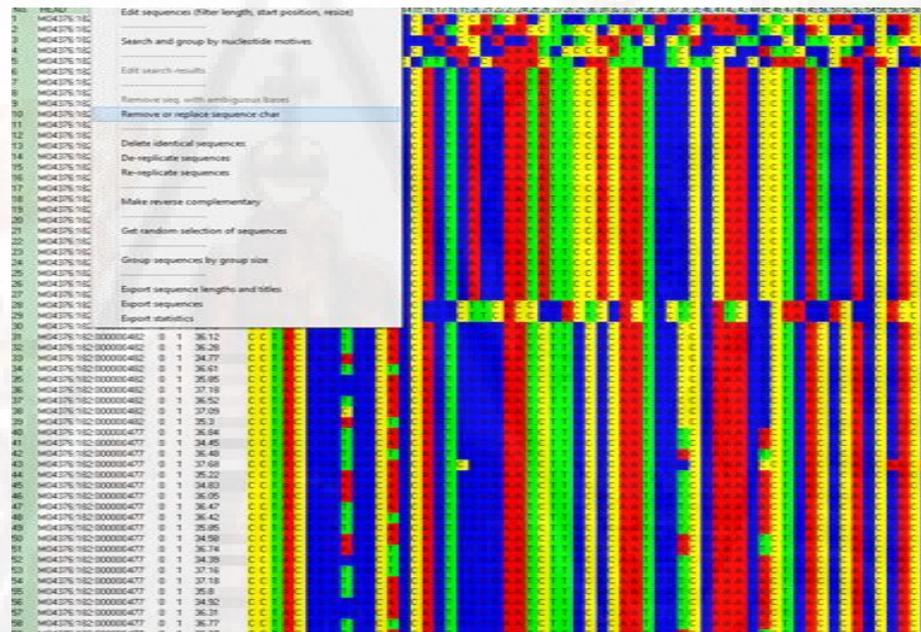
2.1

**Tabla N° 3.3. Secuencias unidas de la muestra número 1 suelo rizosférico.**

Secuencias unidas muestra N° 1	
CCTACGGGTGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGAT	
CCTAGGTGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCC	
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATCC	
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCC	
TACGGGTGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATCC	
TAGGTGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCTA	
CGGGAGGCATGGGCGCAAGCCTGATCCTAGGTGGCAGCAGTGGGGAATAT	
TGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCTACGGGAGGCATGGGCGCAAGCCTG	
ATCCTAGGTGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACA	

- **Remoción de secuencias con bases ambiguas**

En la plataforma del SEED2.1 es posible realizar la remoción de secuencias de bases ambiguas a un valor Q30.



**Ilustración 14.** Remoción de secuencias ambiguas en la plataforma de SEED 2.1.

- **Clasificación de secuencias**

Una vez normalizada las secuencias a 67235, estas fueron clasificadas en la plataforma del RDP 11: Esta plataforma clasifica e identifica secuencias de ADN a nivel de género, familia, orden, clase y phylum



- 3) Se embebió en agua destilada estéril durante 1-2 horas a temperatura ambiente, en agitación.
- 4) Se procedió a sembrar



**Ilustración 16.** Semillas de maíz en una solución de  $\text{HgCl}_2$  al 2,5% durante 10 minutos en agitación

- **Solución nutritiva para el cultivo de plantas**

Se empleó la solución mineral según Rigaud y Puppo (1975), cuya composición se describe a continuación:

**Macro elementos (por litro de agua)**

• $\text{KH}_2\text{PO}$	68 mg
• $\text{K}_2\text{HPO}_4$	44 mg
• $\text{SO}_4\text{Mg} \times 7\text{H}_2\text{O}$	123 mg
• $\text{K}_2\text{SO}_4$	174 mg
• $\text{SO}_4\text{Ca}$	173 mg
• EDTA férrico (forma comercial)	25 mg

**Micro elementos (por litro de agua):**

• $\text{MoO}_4\text{Na}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,11 mg
• $\text{BO}_3\text{H}_3$	2,85 mg
• $\text{SO}_4\text{Mn} \times 4\text{H}_2\text{O}$	3,07 mg
• $\text{SO}_4\text{Zn} \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,55 mg
• $\text{SO}_4\text{Cu} \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,2 mg

La solución se esterilizo en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.



**Ilustración 17.** Solución nutritiva esterilizando en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

### **Preparación de inóculos bacterianos**

Todos los inóculos bacterianos proceden a partir de cultivos frescos de los correspondientes medios líquido, hasta obtener una suspensión bacteriana de, aproximadamente de  $10^8$  células viables por ml. Cada semilla se inoculo con 1 ml de la correspondiente suspensión bacteriana citado por Vincent (1970).

### **Inoculación de cepas**

- Bacteria END: 2ml inoculo x 4 macetas x 2 semillas = 8ml inoculo
- Bacteria SR: 2ml inoculo x 4 macetas x 2 semillas = 8ml inoculo
- Bacteria SNR: 2ml inoculo x 4 macetas x2 semillas = 8ml inoculo
- Testigo sin inoculo
- Una vez sembradas las semillas se taparon con el suelo adyacente y con la perlita estéril la parte superior.

### **Riego:**

- Se regó empleando una probeta para distribuir el mismo volumen por maceta en función a las necesidades del cultivo.

### **Cultivo de plantas en jarra Leonard**

El cultivo se llevó a cabo utilizando la jarra Leonard (Leonard 1943). Este sistema consta de dos recipientes independientes, de manera que el superior se rellena con vermiculita y el inferior con solución nutritiva. El

conjunto se esterilizo mediante autoclave a 120 °C durante 20 minutos. En cada jarra se sembró las semillas pre-germinadas y se inoculo con 1 ml de la suspensión bacteriana. La capa superficial de vermiculita se cubrió con una capa de perlita estéril, que evita la posible contaminación ambiental y refleja la luz por lo que previene el calentamiento excesivo de las semillas. Cada jarra se envuelve en papel opaco a la luz para evitar que ésta alcance las raíces.



(a)



(b)



(c)



(d)

**Ilustración 18.** Proceso de siembra en jarra Leonard (a) Llenado del sistema consta de dos recipientes independientes, de manera que la superior se rellena con vermiculita y el inferior con solución nutritiva, (b) Se cubrió con papel platina para evitar la contaminación, (c) Esterilizando solución nutritiva en autoclave a 120 °C durante 20

minutos, (d) En cada jarra se sembró las semillas pre-germinadas y se inoculo con 1 ml de la suspensión bacteriana.

**Biomasa foliar de maíz amiláceo inoculado con *Azospirillum* spp.**

Con los datos para altura de planta, materia seca de tallo, tamaño de raíz y materia seca radicular, se elaboró el análisis de Varianza (ANVA), y coeficiente de variabilidad (CV) y se presentó mediante los histogramas de frecuencia para cada tratamiento.

## CAPÍTULO IV.

### PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

#### 4.1. Análisis de información

##### 4.1.1. Crecimiento de *Azospirillum*

La presencia de *Azospirillum* spp. se apreció por el viraje del color que se presentó en el medio de cultivo líquido selectivo, que cambió desde una tonalidad verde (pH: 6.6 A 6.7) hacia amarilla (pH: 5.4). El azul de bromotimol a pH: 6.7 indica el color verde oscuro y se torna a amarillo cuando el pH se hace más ácido. Asimismo, se visualizó la formación de anillo blanquecino de 2mm de espesor localizado en la zona sub – superficial (zona microaerofílica), el cual según la literatura es la zona preferida para el crecimiento de *Azospirillum* spp, debido a la baja presión parcial del oxígeno requerido para su crecimiento.

El cambio de viraje de color en el medio de cultivo se registró diariamente. Luego de los 7 a 15 días de incubación y evaluación se apreció una alcalinización del medio líquido, empezando por la superficie y extendiéndose en todo el volumen. Durante los 15 días de incubación a 28 °C, se observó el crecimiento característico de las BLAN<sub>2</sub>, cuyos datos se registraron diariamente, con los cuales se determinó el número característico (ver anexo N° 8) para cada muestra, la misma que consta de tres dígitos y

mediante la aplicación de la tabla NMP (Tabla estadística de Cochran, 1950), se determinó en número más probable de la población de *Azospirillum* spp. para cada muestra y se reportaron en ufc/g de suelo. Resultados obtenidos son similares a los reportados por Dobereiner (1979), Wild (1992), Huauya (2001), Arone (2007).



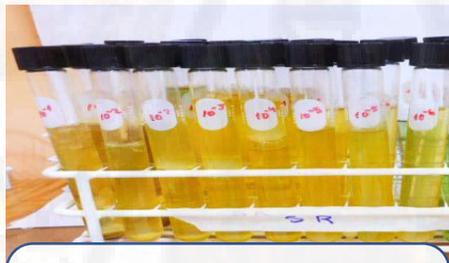
**Ilustración 19.** Observación de anillos en la zona superior del tubo de ensayo con medio de cultivo.



**TESTIGO**  
A 10 días de incubado a 28°C



**ENDORIZOSFERA (ENDR)**  
Crecimiento de *Azospirillum* spp. procedente de la raíz de *Zea mays* L. a los 10 días de



**SUELO RIZOSFERICO (SR)**  
Crecimiento de *Azospirillum* spp. Procedente de la rizosféra de *Zea mays* L. a los 10 días de inoculación

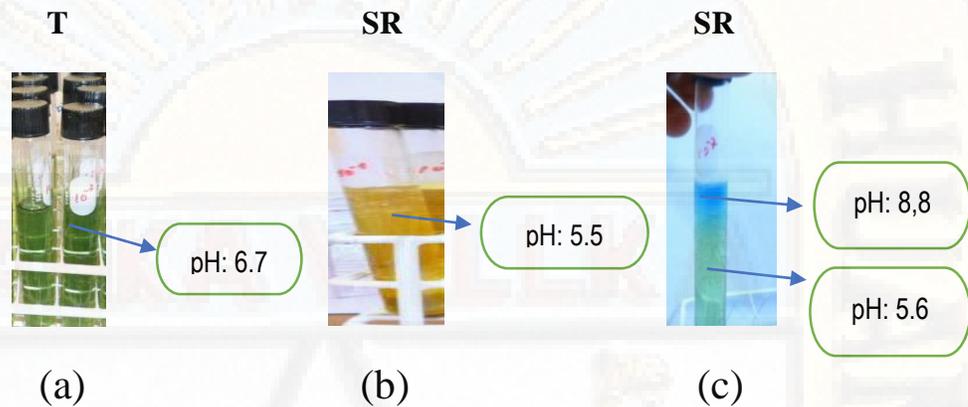


**SUELO NO RIZOSFERICO (SNR)**  
Crecimiento de *Azospirillum* spp. Procedente del suelo no rizosférico de *Zea mays* L. a los 10 días de inoculación

**Ilustración 20.** Crecimiento de *Azospirillum* spp. En la endorizosfera (raíz), SR, SNR y testigo

Cabe resaltar que conforme transcurrió el periodo de incubación se apreció una alcalinización del medio de cultivo, iniciándose en la zona superior del medio de cultivo para posteriormente extenderse a todo el medio de cultivo como se muestra en la figura (19), esta alcalinización según los autores se

debe a la oxidación del ácido málico, la cual puede estar relacionada con el desarrollo pleomórfico del *Azospirillum lipoferum* (Tarrant et al., 1978 y New y Kennedy, 1989). Además, la acidificación del medio de cultivo conteniendo glucosa es otra característica del desarrollo de *Azospirillum* (Dobereiner, 1995; Huauya, 2001).

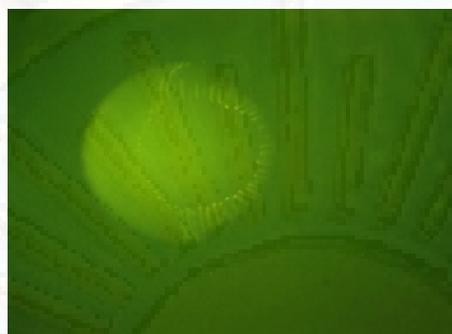


**Ilustración 21.** Crecimiento de *Azospirillum* spp. (a) Testigo, (b) Crecimiento al primer día de incubación de suelo rizósferico, (c) Crecimiento a los 10 días de incubación de suelo rizósferico.

Al realizar el aislamiento de *Azospirillum* spp del medio de cultivo líquido hacia el medio sólido mediante la técnica de estriado en la placa Petri, se observó el desarrollo de colonias liza brillantes; al principio de una tonalidad transparente, que con el paso de días de incubación de 15 días a 28 °C presentan un color crema amarillento con una tendencia a hacia el color azul, debido a la alcalinización del medio causado por la oxidación del malato (New y Kennedy, 1989).

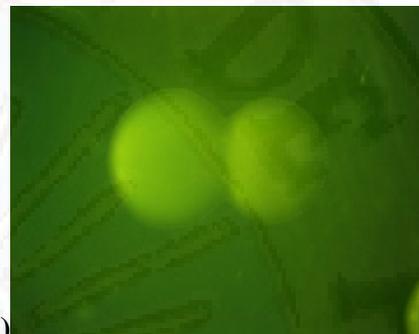


(a) Crecimiento de *Azospirillum* spp. en medio sólido procedente de la endorizosfera de maíz de la zona maicera de Chilcapite.



(c)

Crecimiento de *Azospirillum* spp. en medio solido procedente de la rizosfera de maíz de la zona maicera de Chilcapite.



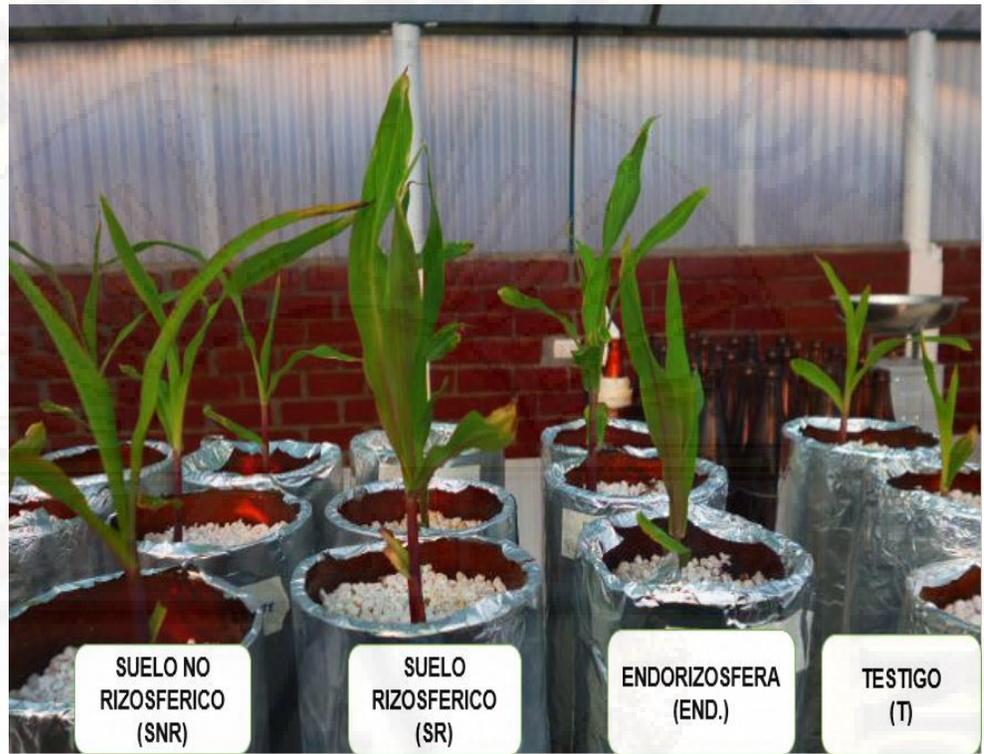
(d)

Crecimiento de *Azospirillum* spp. en medio solido procedente del suelo no rizosférico de maíz de la zona maicera de Chilcapite

**Ilustración 22.** Crecimiento de *Azospirillum* spp. en medio solido procedente de la zona maicera de Chilcapite – Pomacocha– Acobamba – Huancavelica (a) Testigo, (b) Endorizosfera, (c) Rizósfera, (d) Suelo no rizósferico.

#### 4.1.2. Bioensayos Inoculados de maíz amiláceo con *Azospirillum* spp

Al realizar los bioensayos empleando el cultivo de maíz amiláceo en jarra Leonard de; 1 kg de vermiculita, perlita (10 g) y solución nutritiva de 650 ml previamente esterilizado en autoclave por 15 minutos a una presión de 15 – 20 atmosferas, empleando los aislados procedentes de la zona maicera de Chilcapite – Pomacocha – Acobamba, bajo el diseño completamente al azar, con tres repeticiones (DCA).



**Ilustración 23.** Crecimiento de plantas de maíz amiláceo después de 25 días de la siembra

#### **4.1.3. Evaluación de los bioensayos**

Se evaluó a los 60 días después de la siembra el efecto de las cepas de *Azospirillum* spp, como se observa en las siguientes figuras.



**Ilustración 24.** Comparación del volumen radicular de maíz inoculada y sin inocular (T).

Se apreció heterogeneidad en el volumen radicular de las plantas con respecto al testigo. Al respecto varios autores sostienen que los cambios en la morfología de las raíces, en especial el incremento de la masa radicular es debido a la producción de la auxina, fitohormona producida y secretada por *Azospirillum* spp. la misma que contribuye a la mejor nutrición mineral y utilización del agua por las plantas al explorar un mayor volumen de suelo (Abbas y Okon, 1993; Lynch,1990; Bashan y Holguin, 1993; Bowen y Rovira, 1999, Okon 2000; Rodelas et al.,1999).



Ilustración 25. Comparación entre el testigo y los tratamientos

#### 4.1.4. Presencia de *Azospirillum* spp en la zona maicera de Chilcapite - Pomacocha – Acobamba – Huancavelica

La presencia de *Azospirillum* spp se determinó por los signos o propiedades características de género *Azospirillum* spp (Tarrand et al, 1979; Pakitrin et al.,1983 reportado por Huauya, 2001), además se observó al microscopio (Figura 24), cuyos signos inducen a sostener la presencia de *Azospirillum*

spp tanto en la endorizosfera como en el suelo rizósferico en el cultivo de maíz evaluado.



100 x

100 x

**Ilustración 26.** *Azospirillum* spp, aislado de la endorizosfera y suelo rizósferico del maíz al 50 % de floración de plantas de la chacra maicera de Chilcapite

Por otro lado, las condiciones edafológicas de pH y la humedad, fueron favorables para su normal crecimiento (Hamdi, 1985 y Zuñiga, 1980).

#### **4.1.5. Población del *Azospirillum* spp en la zona maicera de Chilcapite - Pomacocha – Acobamba – Huancavelica**

La presencia de *Azospirillum* spp en la zona andina del Perú, fue referido por Rivas, (1993), en los suelos del valle del Mantaro y Yanamarca de la región central del Perú, donde encontró cepas nativas de *Azospirillum* spp. en asociación al cultivo de haba. Igualmente, Huauya, 2001, cita la presencia de *Azospirillum* spp. nativo en el nicho maicero de los Oylo ayllus de Oyolo, Paucar del Sara sara, Ayacucho.

Para las muestras en la zona maicera Chilcapite, Pomacocha, evaluado los valores poblacionales de *Azospirillum* spp. fluctúan en ufc/g de  $180 \times 10^6$  para la Endorizosfera,  $17 \times 10^6$  en la Rizosfera y  $13 \times 10^6$  para Suelo no rizosferico. Estos valores concuerdan con lo reportado por Huauya (2001), quien halló poblaciones similares de *Azospirillum* spp. al estado de floración de plantas de maíz amiláceo en las chacras de los Oylo ayllus – Ayacucho, siendo para la endorizosfera de  $9.2 \times 10^6$  ufc/g de raíz y  $5.4 \times 10^6$  ufc/g en suelo rizosferico. Igualmente, Julca (1991), al evaluar la población bacteriana de la

endrizosfera y rizosfera de camote bajo condiciones de maceta y campo, encontró valores promedios de  $10^5$  y  $10^8$  células/gramo de peso. De la misma forma manera Arone (2007), al evaluar la población bacteriana de *Azospirillum* spp. al 50 % de floración de plantas de haba halló valores  $0.54 \times 10^8$  ufc/g de raíz en la endrizosfera y  $3.1 \times 10^5$  ufc/g de suelo en la rizosfera.

#### 4.1.6. Altura de planta de maíz amiláceo

El análisis de varianza para altura de planta (cm) del maíz amiláceo en las zonas maiceras de Chilcapite Pomacocha - Acobamba, presenta diferencias estadísticas entre tratamientos.

**Cuadro N° 4.1.** Análisis de Varianza de altura de planta (cm) de maíz amiláceo inoculada con *Azospirillum* spp. a los dos meses de siembra, al 99 % de confianza ( $\alpha = 0.01$ ).

F.V.	G.L.	S.C	C.M.	F.C.	SIG.
Tratamientos	3	5456.0037	1818.6679	18.7652	* *
Error	8	775.3346	96.9168		
Total	11	6231.3383			

$$S = 9.84 \quad X = 28.58 \quad CV. = 34.43 \%$$

En el Cuadro N° 4.1, Se observa el Análisis de Varianza para altura de planta de maíz amiláceo inoculada con *Azospirillum* spp. presentan diferencias altamente significativas ( $\alpha = 0.01$ ) para altura de planta a los dos meses de siembra.

**Cuadro N° 4.2.** Comparación de medias mediante la prueba de Duncan ( $\alpha = 0.01$ ) para altura de planta inoculada con *Azospirillum* spp.

Orden mérito	Tratamiento	Altura de planta (cm)	Sig.
1	T2 (Rizosfera)	52.67	A
2	T1 (Endrizosfera)	45.33	B
3	T3 (Suelo no rizosférico)	30.33	C
4	T0 (Testigo)	16.00	D
Promedio		36.08	

En el Cuadro N° 4.2, Se observa, el T2 alcanzó mayor altura (52.67 cm), seguido por T1 con 45.33 cm. El T3 presentó la menor altura de plantas con 0.30 cm

#### 4.1.7. Peso seco foliar del maíz amiláceo

El análisis de varianza para peso seco foliar de maíz amiláceo, dentro de la fuente de variabilidad para los tratamientos presentaron diferencias estadísticas.

**Cuadro N° 4.3.** Análisis de Varianza del peso seco foliar del maíz amiláceo a los dos meses de siembra, al 99 % de confianza ( $\alpha = 0.01$ ).

F.V.	G.L.	S.C	C.M.	F.C.	SIG.
Tratamientos	3	0.3555	0.1185	7.1853	* *
Error	8	0.1319	0.0165		
Total	11	0.4874			

$$S = 0.13X = 0.41CV. = 31.70 \%$$

En el Cuadro N° 4.3, se puede observar el Análisis de Varianza del peso seco foliar de plantas de maíz amiláceo, del cual se desprende que existe diferencias altamente significativas para altura planta a los dos meses de siembra ( $\alpha = 0.01$ ).

**Cuadro N° 4.4.** Comparación de promedios de Duncan ( $\alpha = 0.01$ ) para peso seco foliar del maíz amiláceo. PONER DATOS ORIGINALES

Orden mérito	Tratamiento	Peso seco de tallo (g)	Sig.
1	T2	0.68	A
2	T1	0.40	B
3	T3	0.37	B
4	T0	0.20	C
Promedio		0.41	

En el Cuadro N° 4.4, se observa el comparativo de promedios para peso seco foliar del maíz amiláceo, que en promedio general obtuvo 0.41 g. El

Tratamiento T2 (suelo rizosférico) presentó el mayor peso seco foliar del maíz amiláceo con 0.68 g. En cambio, el Tratamiento Testigo, presentó el menor peso seco foliar de plantas de maíz con 0.20 g. El resto de tratamientos están comprendidos entre estos valores.

#### 4.1.8. Peso seco de raíz de maíz amiláceo

El análisis de varianza para el peso seco de raíz de maíz amiláceo, dentro de la fuente de variabilidad para tratamientos muestran diferencias estadísticas.

**Cuadro N° 4.5.** Análisis de Varianza del peso seco de raíces (g) de plantas de maíz amiláceo inoculada con aislados con *Azospirillum* spp., a dos meses de siembra, con un 99 % de confianza ( $\alpha = 0.01$ ).

F.V.	G.L.	S.C	C.M.	F.C.	SIG.
Tratamientos	3	0.4744	0.1581	10.7518	* *
Error	8	0.1177	0.0147		
Total	11	0.5921			

$$S = 0.12 \quad X = 0.54 \text{CV.} = 22.22 \%$$

En el **Cuadro N° 4.5**, se observa el Análisis de Varianza del peso seco de raíz de plantas de maíz amiláceo en la cual existe diferencias altamente significativas para la altura de planta a los dos meses de la siembra ( $\alpha = 0.01$ ).

**Cuadro N° 4.6.** Comparación de promedios de Duncan ( $\alpha = 0.01$ ) de peso seco de raíz de maíz amiláceo.

Orden mérito	Tratamiento	Peso seco de raíz (g)	Sig.
1	T2	0.77	A
2	T1	0.70	A
3	T3	0.37	B
4	T0	0.31	B
Promedio		0.54	

En el Cuadro N° 4.6. El Tratamiento T2 presentó el mayor peso seco de raíz con 0.77 g. En cambio, el Testigo, presentó el menor peso seco de raíces con 0.31 g. El resto de tratamientos está comprendido entre estos valores.

#### 4.1.9. Longitud de raíz de maíz amiláceo

El análisis de varianza para longitud de raíces de maíz amiláceo, dentro de la fuente de variabilidad para tratamientos muestra diferencias estadísticas.

**Cuadro N° 4.7.** Análisis de Varianza de longitud de raíces (m) de plantas de maíz amiláceo, a los dos meses de siembra, con un 99 % de confianza ( $\alpha = 0.01$ ).

F.V.	G.L.	S.C	C.M.	F.C.	SIG.
Tratamientos	3	0.6779	0.2260	18.6887	* *
Error	8	0.0967	0.0121		
Total	11	0.7747			

$$S = 0.11 \text{ X } = 0.57CV. = 19.30 \%$$

En el Cuadro N° 4.7, se observa el Análisis de Varianza ( $\alpha = 0.01$ ) de longitud de raíces de plantas de maíz amiláceo donde muestra diferencias altamente significativas para longitud de raíces a los dos meses.

**Cuadro N° 4.8.** Comparación de promedios de Duncan ( $\alpha = 0.01$ ) de longitud de raíces de maíz amiláceo a los dos meses de siembra,

Orden mérito	Tratamiento	Longitud de raíces (m)	Sig.
1	T2	0.80	A
2	T1	0.79	A
3	T3	0.41	B
4	T0	0.26	C
Promedio		0.57	

En el Cuadro N° 4.8, se observa el comparativo de promedios de longitud de raíces de maíz amiláceo, en orden decreciente el Tratamiento T2 (suelo rizosférico) alcanzó la mayor longitud (0.80 m), seguido del Tratamiento T1 (suelo endorizosférico) con 0.79 m., entre ellos no hubo diferencias

estadísticas significativas. El Tratamiento T0 (testigo) presentó la menor longitud de raíces con 0.26 m.

**4.1.10. Secuenciación de ADN en la plataforma de Illumina - Miseq procedente de la Endorizosfera, rizosfera y suelo no rizosferico del maíz amiláceo**

El ADN obtenido del pellet del medio líquido de la dilución  $10^{-4}$  de la Endorizosfera, rizosféra y suelo no rizosférico del cultivo de maíz, se amplificó utilizando la plataforma de Illumina-Miseq. Las secuencias tuvieron mayor a 400 pb y fueron normalizadas 61688, que fue el valor mínimo obtenido correspondiente a la muestra END.SR Y SNR.

**Tabla N° 4.1.** Obtención de secuencias de ADN normalizadas de muestras de la Endorizosfera, suelo rizósferico y no rizósferico de las chacras maiceras de Chilcapite, Acobamba.

Tipo de muestra	N° Secuencias inicial	Al retirar Secuencias ambiguas	Al retirar Secuencias < a Q30	Al retirar secuencias menores a 400 pb	Al retirar quimera	Sumatoria	Promedio	Secuencias Normalizadas
END	70608	70579	70357	70328	63368	185066	61688	61688
	60782	60770	60583	60563	57163			
	71495	71477	71242	71199	64535			
SR	65600	65585	65380	65334	59611	215967	71989	61688
	86006	85989	85775	85741	77327			
	86793	86771	86530	86493	79029			
SNR	72836	72820	72629	72599	68569	197157	65719	61688
	65018	65008	64872	64846	59253			
	75690	75674	75482	75458	69335			

**Tabla N°4.2.** Número de OTUs de *Azospirillum* spp en la Endorizosfera, Suelo Rizosférico y Suelo No Rizosférico del maíz amiláceo empleando secuenciación masiva Illumina - Miseq.

<b>OTUs de <i>Azospirillum</i> spp en la Endorizosfera, Rizosfera y Suelo no Rizosférico</b>			
OTUS	END.	RS	SNR
		0	37

En las secuencias procesadas, se halló para la Endorizosfera (END) y SNR 0 secuencias de *Azospirillum* spp., en cambio en la rizósfera se halló solamente 37 secuencias de *Azospirillum* spp.

**Tabla N° 4.3.** Número de secuencias asignadas a los diferentes Dominios en la endorizosfera, suelo rizosferico y suelo no rizosferico del maíz amiláceo.

Dominio	<b>MUESTRA DE SUELO ENDORISFERA, RIZOSFERA Y SUELO NO RIZOSFERICO</b>		
	END.	SR	SNR
Bacteria	61677	61674	61685
Archea	0	1	0
Secuencias no clasificadas	11	13	3
Total	61688	61688	61688
Significativamente diferente a 0.01			

**Tabla N° 4.4.** Secuencias bacterianas en la endorizosfera, suelo rizosferico y suelo no rizosferico del maíz amiláceo.

<b>GÉNERO</b>	<b>END</b>	<b>SR</b>	<b>SNR</b>
<i>Stenotrophomonas</i>	19101	19615	18230
<i>Buttiauxella</i>	6117	739	89
<i>Achromobacter</i>	4061	6183	201
<i>Pelosinus</i>	2263	12	2
<i>Pseudomonas</i>	1917	2549	18388
<i>Sphingobacterium</i>	999	474	70
<i>Serratia</i>	575	393	130
<i>Clostridium XIVa</i>	253	57	9
<i>Ochrobactrum</i>	91	0	0
<i>Rhizobium</i>	22	511	284
<i>Acidovorax</i>	14	14	0
<i>Flavobacterium</i>	13	429	439
<i>Arthrobacter</i>	10	1	128
<i>Rahnella</i>	9	0	0
<i>Lactobacillus</i>	8	3	1
<i>Janthinobacterium</i>	6	57	0
<i>Propionibacterium</i>	6	1	3
<i>Rhodococcus</i>	5	380	1
<i>Streptophyta</i>	5	5	0
<i>Staphylococcus</i>	3	1	0
<i>Luteibacter</i>	3	0	0
<i>Romboutsia</i>	3	0	0
<i>Sphingobium</i>	3	0	0
<i>Chryseobacterium</i>	2	4277	766
<i>Paenibacillus</i>	2	1248	6228
<i>Acinetobacter</i>	2	54	3866
<i>Streptococcus</i>	2	2	1
<i>Brevundimonas</i>	1	2789	34
<i>Bosea</i>	1	30	0
<i>Variovorax</i>	1	17	4725
<i>Brachybacterium</i>	1	0	0
<i>Brucella</i>	1	0	0
<i>Gardnerella</i>	1	0	0

<i>Herbaspirillum</i>	1	0	0
<i>Hydrocarboniphaga</i>	1	0	0
<i>Lentibacillus</i>	1	0	0
<i>Leuconostoc</i>	1	0	0
<i>Pseudoxanthomonas</i>	1	0	0
<i>Saccharibacteria_genera_incertae_sedis</i>	1	0	0
<i>Weissella</i>	1	0	0
<i>Delftia</i>	0	1819	252
<i>Novosphingobium</i>	0	1031	4
<i>Pedobacter</i>	0	388	1
<i>Oerskovia</i>	0	105	0
<i>Cellulomonas</i>	0	74	353
<i>Azospirillum</i>	0	37	0
<i>Neorhizobium</i>	0	23	0
<i>Phyllobacterium</i>	0	22	0
<i>Devosia</i>	0	16	0
<i>Microbacterium</i>	0	9	0
<i>Sphingopyxis</i>	0	9	0
<i>Kaistia</i>	0	7	1
<i>Aeromicrobium</i>	0	6	0
<i>Mesorhizobium</i>	0	3	0
<i>Leifsonia</i>	0	2	0
<i>Burkholderia</i>	0	1	0
<i>Ensifer</i>	0	1	0
<i>Pantoea</i>	0	1	0
<i>Plantibacter</i>	0	1	0
<i>Veillonella</i>	0	1	0
<i>Bacillus</i>	0	0	2
<i>Cloacibacterium</i>	0	0	1
<i>Dietzia</i>	0	0	1
<i>Georgenia</i>	0	0	1
<i>Haemophilus</i>	0	0	1
<i>Neisseria</i>	0	0	1
<i>Paracoccus</i>	0	0	1

<b>FAMILIA</b>	<b>END</b>	<b>SR</b>	<b>SNR</b>
Bradyrhizobiaceae	3	36	0
Brucellaceae	114	0	0
Burkholderiaceae	0	1	0
Dietziaceae	0	0	1
Enterobacteriaceae	28848	7177	910
Flavobacteriaceae	15	4761	1220
Lactobacillaceae	8	3	1
Microbacteriaceae	2	45	0
Micrococcaceae	15	2	213
Nocardiaceae	5	405	1
Oxalobacteraceae	9	85	0
Paenibacillaceae 1	2	1361	7210
Pseudomonadaceae	2053	2798	19250
Rhizobiaceae	125	4841	2012
Rhodobacteraceae	0	0	1
Xanthomonadaceae	19269	21265	18680

<b>ORDEN</b>	<b>END</b>	<b>SR</b>	<b>SNR</b>
Acidimicrobiales	29	1	660
Actinomycetales	0	743	0
Bacillales	8	1364	7213
Bacteroidales	0	0	1
Clostridiales	270	73	2069
Enterobacteriales	28848	7177	910
Flavobacteriales	15	4761	1220
Lactobacillales	12	4	4
Pasteurellales	0	0	1
Pseudomonadales	2056	2852	23202
Rhizobiales	3354	9867	2110
Rhodobacterales	0	0	1
Rhodospirillales	0	37	0
Sphingobacteriales	1002	867	71
Xanthomonadales	19270	21256	18682

<b>CLASE</b>	<b>END</b>	<b>SR</b>	<b>SNR</b>
Actinobacteria	30	744	660
Alphaproteobacteria	3363	13854	2152
Bacilli	20	1368	1
Bacteroidia	0	0	1
Betaproteobacteria	4410	8575	5292
Chloroplast	5	5	0
Clostridia	270	73	2069
Flavobacteriia	15	4761	1220

<b>PHYLA</b>	<b>END</b>	<b>SR</b>	<b>SNR</b>
Actinobacteria	30	744	660
Bacteroidetes	1019	5629	1292
Firmicutes	2553	1454	9288
Proteobacteria	58055	53828	50433

**Tabla N° 4.5.** Géneros bacterianos involucrados como solubilizadores de fosforo

<b>GÉNERO</b>	<b>SUELO DE CHILCAPITE</b>		
	<b>END.</b>	<b>SR</b>	<b>SNR</b>
<i>Acinetobacter</i>	2	54	3866
<i>Arthrobacter</i>	10	1	128
<i>Azospirillum</i>	0	37	0
<i>Bacillus</i>	0	0	2
<i>Burkholderia</i>	0	1	0
<i>Delftia</i>	0	1819	252
<i>Flavobacterium</i>	13	429	439
<i>Herbaspirillum</i>	1	0	0
<i>Mesorhizobium</i>	0	3	0
<i>Paenibacillus</i>	2	1248	6228
<i>Pantoea</i>	0	1	0
<i>Phyllobacterium</i>	0	22	0
<i>Pseudomonas</i>	1917	2549	18388
<i>Rhizobium</i>	22	511	284
<i>Rhodococcus</i>	5	380	1

<i>Streptomyces</i>	25	238	76
<i>Variovorax</i>	86	0	102

**Tabla N° 4.6.** Géneros bacterianos y secuencias con actividad para control de enfermedades en el cultivo de maíz

GÉNERO	SUELO DE CHILCAPITE		
	END.	SR	SNR
<i>Arthrobacter</i>	10	1	128
<i>Bacillus</i>	0	0	2
<i>Delftia</i>	0	1819	252
<i>Flavobacterium</i>	13	429	439
<i>Mesorhizobium</i>	0	1	0
<i>Pantoea</i>	0	0	2
<i>Pseudomonas</i>	1917	2549	18388
<i>Rhizobium</i>	22	511	284
<i>Rhodococcus</i>	5	380	1
<i>Variovorax</i>	1	17	4725

**Tabla N° 4.7.** Géneros bacterianos y secuencias implicados en Biorremediación

GÉNERO	SUELO DE CHILCAPITE		
	END	SR	SNR
<i>Arthrobacter</i>	10	1	128
<i>Bacillus</i>	0	0	2
<i>Burkholderia</i>	0	1	1
<i>Rhodococcus</i>	5	380	1
<i>Rhodopseudomonas</i>	0	0	0
<i>Stenotrophomonas</i>	19101	19615	18230

**Tabla 4.8.** Géneros bacterianos y secuencias implicadas en biocontrol

GÉNERO	SUELO DE CHILCAPITE		
	END.	SR	SNR
<i>Arthrobacter</i>	10	1	128
<i>Flavobacterium</i>	13	429	439
<i>Bacillus</i>	0	0	2
<i>Rhizobium</i>	22	511	284
<i>Pseudomonas</i>	1917	2549	18388
<i>Rhodococcus</i>	5	380	1
<i>Phyllobacterium</i>	0	22	0
<i>Stenotrophomonas</i>	19101	19615	18230
<i>Azospirillum</i>	0	37	0

<i>Pantoea</i>	0	1	0
<i>Lactobacillus</i>	8	3	1
<i>Herbaspirillum</i>	1	0	0

**Tabla N° 4.9.** Géneros bacterianos y sus secuencias con actividad nitrificante en el cultivo de maíz.

GÉNERO	SUELO DE CHILCAPITE		
	END	SR	SNR
<i>Acinetobacter</i>	2	54	3866
<i>Arthrobacter</i>	10	1	128
<i>Azospirillum</i>	0	37	0
<i>Bacillus</i>	0	0	2
<i>Burkholderia</i>	0	1	0
<i>Cellulomonas</i>	0	74	353
<i>Clostridium XIVa</i>	253	57	9
<i>Delftia</i>	0	1819	252
<i>Ensifer</i>	0	1	0
<i>Flavobacterium</i>	13	429	439
<i>Herbaspirillum</i>	1	0	0
<i>Mesorhizobium</i>	0	3	0
<i>Novosphingobium</i>	0	1031	4
<i>Paenibacillus</i>	2	1248	6228
<i>Pantoea</i>	0	1	0
<i>Phyllobacterium</i>	0	22	0
<i>Propionibacterium</i>	6	1	3
<i>Pseudomonas</i>	1917	2549	18388
<i>Rhizobium</i>	22	511	284

**Tabla N° 4.10.** Géneros bacterianos y sus secuencias como productoras de fitohormonas en el cultivo de Maíz.

GÉNERO	SUELO DE CHILCAPITE		
	END.	SR	SNR
<i>Acinetobacter</i>	2	54	3866
<i>Arthrobacter</i>	10	1	128
<i>Flavobacterium</i>	13	429	439
<i>Pedobacter</i>	0	388	1
<i>Bacillus</i>	0	0	2
<i>Rhizobium</i>	22	511	284
<i>Pseudomonas</i>	1917	2549	18388
<i>Mesorhizobium</i>	0	3	0

<i>Rhodococcus</i>	5	511	284
<i>Microbacterium</i>	0	9	0
<i>Chryseobacterium</i>	2	4277	766
<i>Stenotrophomonas</i>	19101	19615	18230
<i>Variovorax</i>	1	17	4725
<i>Burkholderia</i>	0	1	0
<i>Azospirillum</i>	0	37	0
<i>Pantoea</i>	0	1	0

**Tabla N° 4.11.** Géneros bacterianos y sus secuencias como productores de sideróforos en el cultivo de maíz.

GÉNERO	SUELO DE CHILCAPITE		
	END.	SR	SNR
<i>Acinetobacter</i>	2	54	3866
<i>Arthrobacter</i>	2	54	3866
<i>Azospirillum</i>	0	37	0
<i>Bacillus</i>	0	0	2
<i>Burkholderia</i>	0	1	0
<i>Chryseobacterium</i>	2	4277	766
<i>Ensifer</i>	0	1	0
<i>Flavobacterium</i>	13	429	439
<i>Mesorhizobium</i>	0	3	0
<i>Novosphingobium</i>	0	1031	4
<i>Paenibacillus</i>	2	1248	6228
<i>Pantoea</i>	0	1	0
<i>Pseudomonas</i>	1917	2549	18388
<i>Rhizobium</i>	22	511	284
<i>Rhodococcus</i>	5	380	1
<i>Variovorax</i>	1	17	4725

**Tabla N° 12.** Géneros bacterianos y sus secuencias como productores de ACC – deaminasa en el cultivo de maíz

GÉNERO	SUELO DE CHILCAPITE		
	END.	SR	SNR
Pseudomonas	1917	2549	18388
Rhodococcus	5	380	1
Variovorax	1	17	4725
Bacillus	0	0	2
Acinetobacter	2	54	3866
Rhizobium	22	511	284
Acidovorax	14	14	0
Mesorhizobium	0	3	0
Phyllobacterium	0	22	0
Pantoea	0	1	0
Azospirillum	0	37	0
Burkholderia	0	1	0

## 4.2. PRUEBA DE HIPÓTESIS

### 4.2.1. Hipótesis general(Hg)

Existencia de *Azospirillum* spp. asociada a las raíces del maíz amiláceo cultivadas en Chilcapite – Pomacocha

## 4.3. DISCUSIÓN

### 4.3.1. Altura de planta del cultivo de maíz amiláceo

Los resultados de altura de planta del maíz amiláceo a 60 días, presentan diferencias estadísticas entre tratamientos en el Cuadro N° 4.2.

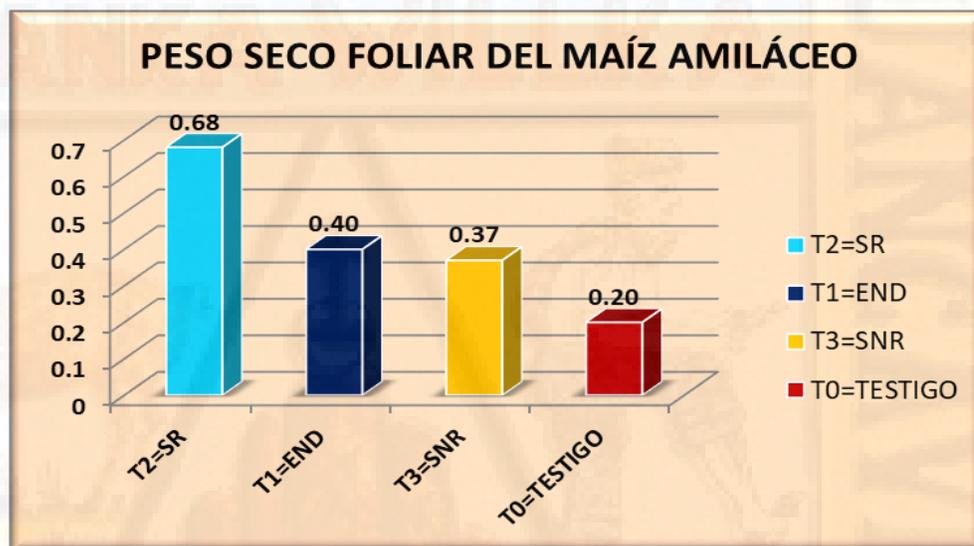


**Ilustración 197.** Altura de planta de maíz amiláceo a 60 días, en los bioensayos Acobamba - Huancavelica. 2017.

A los 60 días, los valores más altos de altura de planta de maíz amiláceo se lograron en T2 (52.67 cm) y el valor más bajo en T3 (0,30 cm) (Figura N° 25), estos valores son inferiores a los reportados por Ogho y Okokwo (2012), quién encontró para este periodo de crecimiento en las condiciones de invernadero, alturas de planta de maíz de 87, 78 cm en T1 y 67,95 cm en T0. Esta diferencia se debe a la influencia de la temperatura y las cepas de *Azospirillum* spp. inoculadas a la semilla de maíz.

#### 4.3.2. Peso seco foliar del cultivo del maíz amiláceo

Los resultados de peso seco foliar del maíz amiláceo a 60 días, presentan diferencias estadísticas altamente significativas entre tratamientos. En el Cuadro N° 4,4, se observa el comparativo de promedios del peso seco de tallos de plantas de maíz amiláceo, que en promedio general obtuvo 0.41 g. El Tratamiento T2 (suelo rizosférico) presentó el mayor peso seco de tallos con 0.68 g. Contrariamente, el Tratamiento Testigo, presentó el menor peso seco de tallos de plantas de maíz con 0.20 g. Todos los tratamientos recibieron la misma dosis de cepas de *Azospirillum spp.* aislados de las tres chacras.

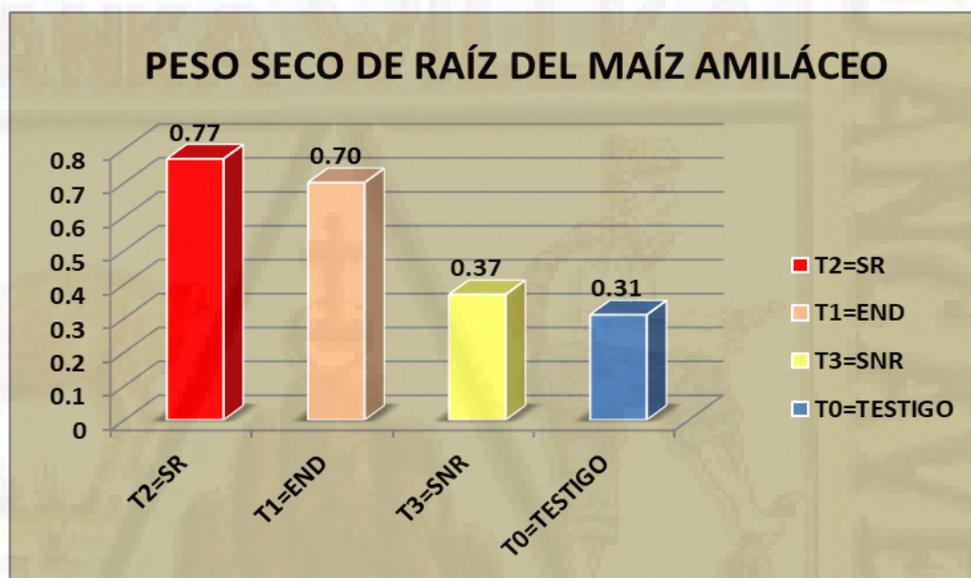


**Ilustración 20.** Peso seco foliar del maíz amiláceo a los 60 días de bioensayos Acobamba – Huancavelica 2017.

A los 60 días, los valores más altos de peso seco foliar del maíz amiláceo se lograron en T2 (0.68 g) y el valor más bajo en TO (0,20 g) (Figura N° 26), estos valores son inferiores a los reportados por Oqho y Okokwo (2012), quién encontró para este periodo de crecimiento en las condiciones de invernadero, peso seco foliar de plantas de maíz fue de 0, 818 g en T2 y 0, 56 g en T1. Esta diferencia debe a la influencia de la temperatura y las cepas de *Azospirillum spp.* inoculadas a la semilla de maíz.

### 4.3.3. Peso seco de raíz del cultivo de maíz amiláceo

Los resultados de peso seco de planta del maíz amiláceo a 60 días, presentan diferencias estadísticas altamente significativas. En el Cuadro N° 4.6, se observa el comparativo de promedios del peso seco de raíz de plantas de maíz amiláceo, que en promedio general obtuvo 0.54 g. El Tratamiento T2 (suelo rizosférico) presentó el mayor peso seco de tallos con 0.77 g. Contrariamente, el Tratamiento Testigo, presentó el menor peso seco de tallos de plantas de maíz con 0.31 g. Todos los tratamientos recibieron la misma dosis de cepas de *Azospirillum spp.* aislados de las tres chacras.

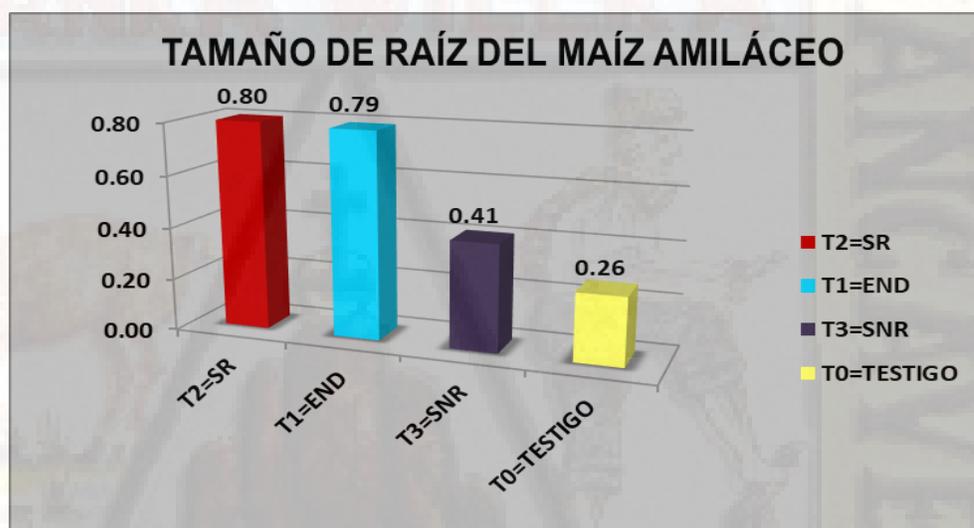


**Ilustración 29.** Peso seco de raíz del cultivo de maíz amiláceo a 60 días, en los bioensayos Acobamba - Huancavelica. 2017

A los 60 días, los valores más altos de peso seco de raíz de planta de maíz amiláceo se lograron en T2 (0,77 g) y el valor más bajo en T0 (0,31 g) (Figura N° 27), estos valores son inferiores a los reportados por Ogho y Okokwo (2012), quién encontró para este periodo de crecimiento en las condiciones de invernadero, peso seco de raíz de planta de maíz fue de 1,34 g en T1 y 1,03 g en T0. Esta diferencia se debe a la influencia de la temperatura y las cepas de *Azospirillum spp.* inoculadas a la semilla de maíz.

#### 4.3.4. Tamaño de Raíz de plantas de maíz amiláceo

Los resultados de tamaño de raíz de la planta del maíz amiláceo a 60 días, presentan diferencias estadísticas altamente significativas. En el Cuadro N° 4.8, se observa el comparativo de promedios en tamaño de raíz de plantas, en orden decreciente el Tratamiento T2 (suelo rizosférico) alcanzó la mayor altura (0.80 cm), seguido del Tratamiento T1 (suelo endorizosférico) con 0.79 cm., entre ellos no hubo diferencias estadísticas significativas. El Tratamiento T0 (testigo) presentó la menor altura de plantas con 0.26 cm en promedio. Todos los tratamientos recibieron la misma dosis de cepas de *Azospirillum spp.* aislados de las tres chacras.



**Ilustración 30.** Tamaño de raíz del cultivo de maíz amiláceo a 60 días, en los bioensayos Acobamba - Huancavelica. 2017

A los 60 días, los valores más altos de tamaño de raíz de planta de maíz amiláceo se lograron en T2 (0, 80 g) y el valor más bajo en T0 (0, 26 g) (Figura N° 28), estos valores son inferiores a los reportados por Ogho y Okokwo (2012), quién encontró para este periodo de crecimiento en las condiciones de invernadero, tamaño de raíz de planta de maíz fue de 0,90 g en T1 y 0,80 g en T0. Esta diferencia se debe a la influencia de la temperatura y las cepas de *Azospirillum spp.* inoculadas a la semilla de maíz.

#### 4.3.5. Identificación de *Azospirillum* spp.

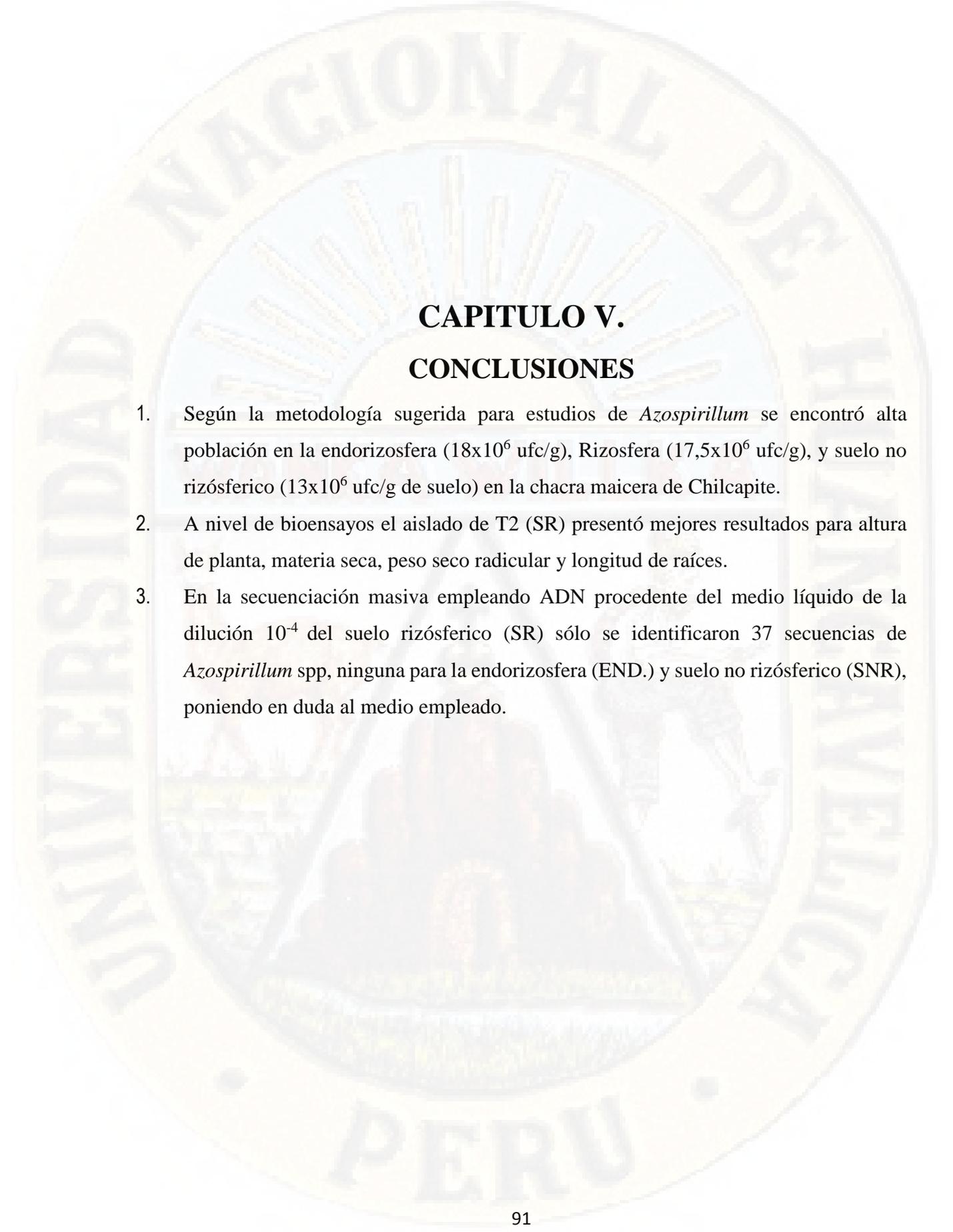
En este trabajo se llevó a cabo la identificación de *Azospirillum* spp. del suelo de Chilcapite la Endorizosfera, suelo rizósferico y suelo no rizósferico del cultivo de maíz de la zona maicera de Pomacocha – Acobamba – Huancavelica, donde a partir de las muestras purificadas en el laboratorio se extrajo del gen 16S rRNA empleando la técnica de huella genética Illumina Miseq donde se procesó los datos empleando la bioinformática para llegar a conocer los 69 géneros que se llegó a identificar, los suelos END. SR Y SNR, llegan a cumplir diversas funciones en el suelo y el medio ambiente ya que lo conforman la biodiversidad más grande del suelo con diversos géneros bacterianos como *Azospirillum* spp cuya función más agua y nutrientes dando de esta manera un mayor crecimiento y desarrollo del cultivo, situación que muchas veces produce un aumento del rendimiento a su vez, esta bacteria puede fijar nitrógeno en forma libre y suministrar este nutriente al cultivo de maíz, asimismo produciendo fitohormonas, (Dobereiner et al. 1990).

*Rhodococcus* (Ramaprasad, et al 2018), es una de las bacterias que también llega a metabolizar contaminantes ambientales nocivos, incluyendo tolueno, naftaleno, herbicidas y PCB, además, cataboliza una amplia gama de compuestos y producir esteroides bioactivos, acrilamida y ácido acrílico y su participación en la biodesulfuración de combustibles fósiles, como también otros contaminantes, como los colorantes azoicos, pesticidas y bifenilos policlorados, investigaciones recientes demuestran que este género no solo participa como biorremediador de suelos, también dio resultados dentro de la industria farmacéutica.

Demuestra que *Variovorax* en la agricultura degrada una amplia gama de contaminantes orgánicos recalcitrantes que incluyen 2,4-dinitrotolueno, policarbonatos alifáticos y bifenilos policlorados, catabolizando, neutralizando los contaminantes por metales pesados, además proporciona el crecimiento que incluye reducir el estrés de las plantas, aumentando la

disponibilidad de nutrientes e inhibiendo el crecimiento de patógenos que puedan causar daños en la raíz de las plantas, (DMSMI, 2018). *Flavobacterium* (Hernández, *et al* 2016), fueron aislados de suelos, plantas que forman nódulos, algas marinas y suelos arenosos donde describen los autores que estas bacterias des nitrificantes están asociadas a la raíz de las plantas como también suele estar fuera de la rizosfera de las plantas principalmente para fijar el nitrógeno atmosférico a través de la simbiosis de las leguminosas que llegan formar los nódulos. la nitrificación, mineralización de la materia orgánica nitrogenada ocurre principalmente con la oxidación biológica del amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) a nitrato ( $\text{NO}_3$  para luego ser reducido a nitrito, las actividades enzimáticas están relacionadas con el ciclo del fósforo, la fosfatasa ácida, alcalina y fosfodiesterasa haciéndola asimilable para las plantas, con las actividades enzimáticas relacionadas con el ciclo del carbono y azufre: b-glucosidasa y arilsulfatasa respectivamente para la nutrición de estas ya que estas bacterias están en la rizósfera de las plantas y suelos no rizosféricos. *Stenotrophomonas* (Hogg, *et al* 2019), quien también describe que tiene la función fermentar, degradar restos de cosechas o material orgánico a base de celulosa. (Héctor, *et al* 2016) describe como uno de los organismos que comúnmente se encuentra en el suelo y restos de materia orgánica como *Sphingobacteria* que degrada residuos orgánicos a partir de estiércol de ovinos transformando en materia orgánica, además cumple un rol importante en la biorremediación de suelos contaminados por aceites automotrices. *Painebacillus* (Padda, *et al* 2017), *Pseudomonas* (Paulsson, *et al* 2017), *Lactobacillus* (Jorge P 2019), *Pseudonocardia* (Chanama, *et al* 2018), *Bacillus* (William R. 2015), han demostrado las funciones que desarrollan específicamente en el suelo como las enzimas que degradan el polisacárido y las proteasas, que pueden catalizar una amplia variedad de reacciones sintéticas en campos que van desde la producción de cosméticos hasta la producción de biocombustibles, también producen sustancias antimicrobianas

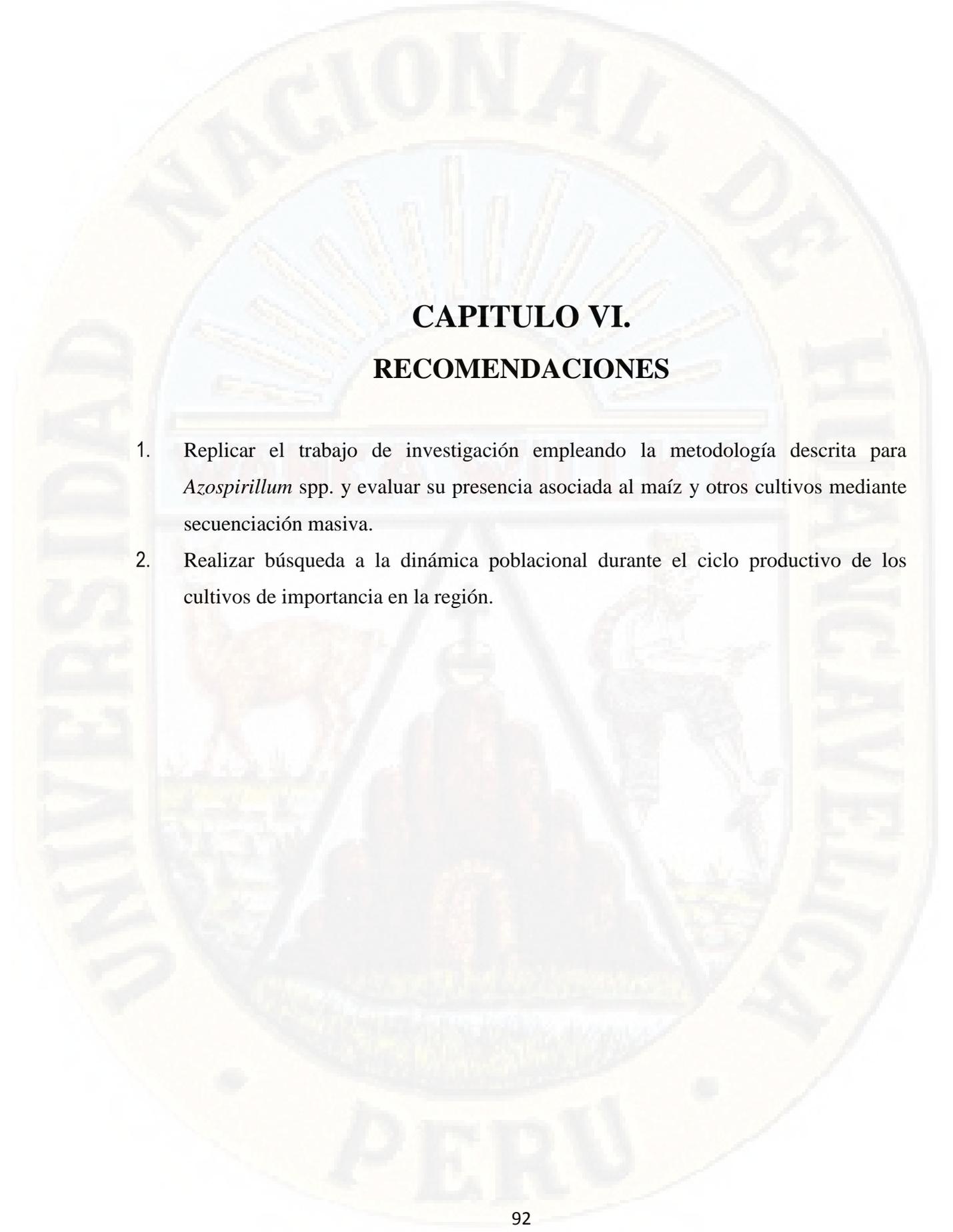
que afectan a un amplio espectro de microorganismos tales como hongos, bacterias del suelo, bacterias patógenas de plantas e incluso patógenos anaeróbicos importantes como *Clostridium botulinum*, además promueve el crecimiento de plantas (PGPR), que colonizan de forma competitiva las raíces de las plantas y pueden actuar simultáneamente como biofertilizantes y como bioplaguicidas para el control de las enfermedades.



## **CAPITULO V.**

### **CONCLUSIONES**

1. Según la metodología sugerida para estudios de *Azospirillum* se encontró alta población en la endorizosfera ( $18 \times 10^6$  ufc/g), Rizosfera ( $17,5 \times 10^6$  ufc/g), y suelo no rizósferico ( $13 \times 10^6$  ufc/g de suelo) en la chacra maicera de Chilcapite.
2. A nivel de bioensayos el aislado de T2 (SR) presentó mejores resultados para altura de planta, materia seca, peso seco radicular y longitud de raíces.
3. En la secuenciación masiva empleando ADN procedente del medio líquido de la dilución  $10^{-4}$  del suelo rizósferico (SR) sólo se identificaron 37 secuencias de *Azospirillum* spp, ninguna para la endorizosfera (END.) y suelo no rizósferico (SNR), poniendo en duda al medio empleado.



## **CAPITULO VI.**

### **RECOMENDACIONES**

1. Replicar el trabajo de investigación empleando la metodología descrita para *Azospirillum* spp. y evaluar su presencia asociada al maíz y otros cultivos mediante secuenciación masiva.
2. Realizar búsqueda a la dinámica poblacional durante el ciclo productivo de los cultivos de importancia en la región.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Areche Zambrano 2009. Aislamiento y cuantificación de *Azospirillum* spp. En zonas maiceras de Acobamba –Huancavelica” tesis. Universidad Nacional de Huancavelica,
2. Arone Gaspar, Gregorio José. 2007. Efecto de dos sistemas de rotación de cultivos en Oyolo (Ayacucho-Perú) en la presencia de hongos Micorrícicos y Bacterias Fijadoras de Nitrógeno y su Influencia en los Rendimientos. Tesis para optar el Grado de Magíster Scientiae en la Escuela de Post Grado UNALM. 350 pp.
3. Arone Gaspar, Gregorio José 2012. Biodiversidad microbiana en chacras maiceras de Allpas (Acobamba, Huancavelica, Perú) cultivadas bajo el sistema tradicional andino. Tesis para optar el grado de Doctor en Estación Experimental del Zaidin – Granada.
4. Bais, H.P., Weir, T., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M., 2007. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Annu. Rev. Plant Biol. 57, 233–266. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159.
5. Bashan, y. 1999. Interactions of *Azospirillum* spp. in soils, Review. Biol Fertil Soils 29: p. 246-256.
6. Caballero, J. 2015. Estudio de la distribución y la diversidad genética de algunas especies de diazótrofos. México DF, MX. snt. P. 2.
7. Caballero, J. 2010. Uso de *Azospirillum* en México como biofertilizante y potencial de nuevas especies bacterianas como biofertilizantes, agentes de biorremediación y biocontrol de fitopatógeno (p. 1). Presented at the XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. (p. 1).
8. Calzada Venza, Jose . 1982. Metodos estadisticos para la investigacion. Editorial Juridica S.A. 640pp.
9. Calzada venza, José. (1982) Métodos estadísticos para la investigación. Editorial jurídica S. A. 640 p.

10. Cárdenas, D.M., Garrido, M. F., Bonilla R. 2010. Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum sp.* en pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) del Valle del Cesar, 33(3), 15-19.
11. Chanama S, Janphen S, Suriyachadkun C, Chanama M. (2018). *Pseudonocardia mangrovi* sp. nov., aislado del suelo. doi: 10.1099 / ijsem.0.002927.
12. Cochran, W. 1950. Estimation of bacterial by means of most Probable Number. *Biometrics*. 6.105 – 116.
13. Córdova, S., Cárdenas, R., Peña, J. Salgado, S., Castelán, M., Lobbit, C. y Vera-Núñez, J. A. 2013. Fijación biológica de nitrógeno por cuatro fabáceas en suelos ácidos de Tabasco. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina*, 44(1), 1–9.
14. Curl, E. A. y B. Truelove. 1986. *The rizosphere*. Springer-Verlag. New York.
15. De-Bashan, Luz E.; Hernández, J. P.; Bashan, y. Maier, Raina M. 2010. *Bacillus pumilus* ES4: Candidate plant growth-promoting bacterium to enhance establishment of plants in mine tailings. *Environ. Exp. Bot*, 69 (3):343-352.
16. DMSMI. Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran. (2018). *Williamsia* spp. are emerging opportunistic bacteria Masoud Keikha. doi: 10.1016/j.nmni.2017.11.002.
17. Dobereiner, J. 1995. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non – leguminous crops. In *Azospirillum VI* and related microorganism. Eds. I. Fendrik, M del Gallo, J Vanderlegden and M de Zamarocy. p: 3 – 14. Springer, Berlín, Germany.
18. Dobereiner, J.; 1990. De Paula M. Y Da Silva, E. A pesquisa em microbiología de solo no Brasil. *Rev. Brasil. Biol.* 50(4): 841-854.
19. Dobereiner. 1990 Simbiosis asociativa y sistemas de vida libre. En: Newton, W.E., Nyman, C.J., (eds.) *Actas del I Simposio Internacional sobre la fijación de nitrógeno*. Universidad Estatal de Washington. Prensa. Pullman., 518 – 538.
20. Elbeltagy, A., Nishioka, K., Sato, T., Suzuki, H., Sato, T., Ye, B., Hamada, T., Isawa, T., Mitsui, H. & Minamisawa, K. Endophytic 2001. Colonization and in plant

- nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11), 5285-5293,
21. García – Olivares, J., A. Mendoza, N. Mayek. 2012. Efectos de *Azospirillum brasilense* en el rendimiento del maíz en el norte de Tamaulipas, *Universidad y Ciencia*, Vol. 28. N° 1. Villahermosa. 5p.
  22. Guzmán, A., Obando, M., Rivera, D. & Bonilla, R. 2012. Selección y caracterización de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14 (1), 182-190.
  23. Hamdi, Y. 1985. La fijación de nitrógeno en la explotación de los suelos. *Boletín de suelos de la FAO- ONU*. N° 49 Roma – Italia
  24. Héctor Guillermo, Anza Cruz, Paula Deyanira, Orantes Calleja, Raúl González, Herrera Alejandro, Ruíz Marín, Eduardo Espinoza, Medinilla Rebeca, Isabel Martínez, Salinas Carlos, Manuel García, Lara Pedro, Vera Toledo. (2016).
  25. Hernández, Escareno, Castillo, Tovar Sánchez, Yáñez, (2016). *Microbiología Industrial y del Suelo*. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Apdo. Postal 414. cp. 64000.
  26. Hinsinger, P., Bengough, A.G., Vetterlein, D., Young, I.M., *Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance*. *Plant Soil* 321, 117–152. 2009. <http://doi.org/10.1007/s11104-008-9885-9>
  27. Hogg HDJ, Siah WF, Okonkwo A, Narayanan M, Figueiredo FC. (2019) *Stenotrophomonas maltophilia*-A Case Series of a Rare Keratitis Affecting Patients With Bandage Contact Lens. doi: 10.1097/ICL.0000000000000479.
  28. Huauya, M. 2001. Evaluación de bacterias libres fijadoras de N<sub>2</sub> durante el ciclo vegetativo del cultivo de maíz (*Zea mays*) bajo el sistema de agricultura natural en Oyolo – Ayacucho. Tesis para optar el Título de Biólogo. UNALM – PERU.
  29. Izaguirre-Mayoral, M. L.; C. Labandera y J. Sanjuán. *Biofertilizantes en Ibero América: Una visión técnica, científica y empresarial*. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Uruguay. 2014.

30. Jorge Poveda Arias (2019). Los microorganismos asociados a los insectos y su aplicación en la agricultura. doi.org/10.22201/codeic.16076079e.2019.v20n1 a2.
31. Julca del Aguila , Miriam Consuelo. 1991. Efecto de la fertilizacion nitrogenada y de la inoculacion de *Azospirillum* sp en el rendimiento y concentracion de nitrogeno de dos variedades de camote (*Ipomoea batata*). Tesis de Magister Scientiae – UNALM Lima Peru.
32. Leonard L. A 1943 Simple assembly for use in testing of culture of rhizobia. J. Bacteriol. 45:523-527.
33. Manrique Chávez P. A.1997. El maíz en el Perú. Concytec. Peru,
34. Manuel M, Gómez, Elda, Castro, Mercado, Ernesto García y Pineda 2014.\* Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edif. A1´, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán, CP 58040, México Julio 16(1): 11–18.
35. Masagro. Noctin Azo. *Azospirillum brasilense*. Plegable Técnico. Quito, Ecuador, 2012. 2p.
36. Ministerio de Agricultura. 2016. Campaña Agrícola 20015 – 2016. Resumen de Propuesta de siembra en ha. Comisión del Plan Nacional de Siembras.
37. Mortimer, p., stolp, h., trüper, h. y balows, a., schlegel, h. The Prokariotes. A 1981.handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria. New York, US. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. v. 1, Pp. 796-808.
38. Mortimer, P., Stolp, H., Truper, H., Balows, A., Schlegel, H. *The Prokariotes. A1981.handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria*. New York, US. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1981 Vol.1, pp. 796 a 808.
39. New , P. B. and I. R. Kennedy. 1989. Regional distributionand Ph sensitivity of *Azospirillum* associated with wheat roots in Eastern Australia. Microb. Ecol. 17:299 – 309.
40. Novo, R. 2002. Memorias curso internacional de microbiología del suelo, los biofertilizantes y la biofertilización. Quito - Ecuador. ASOINCO.

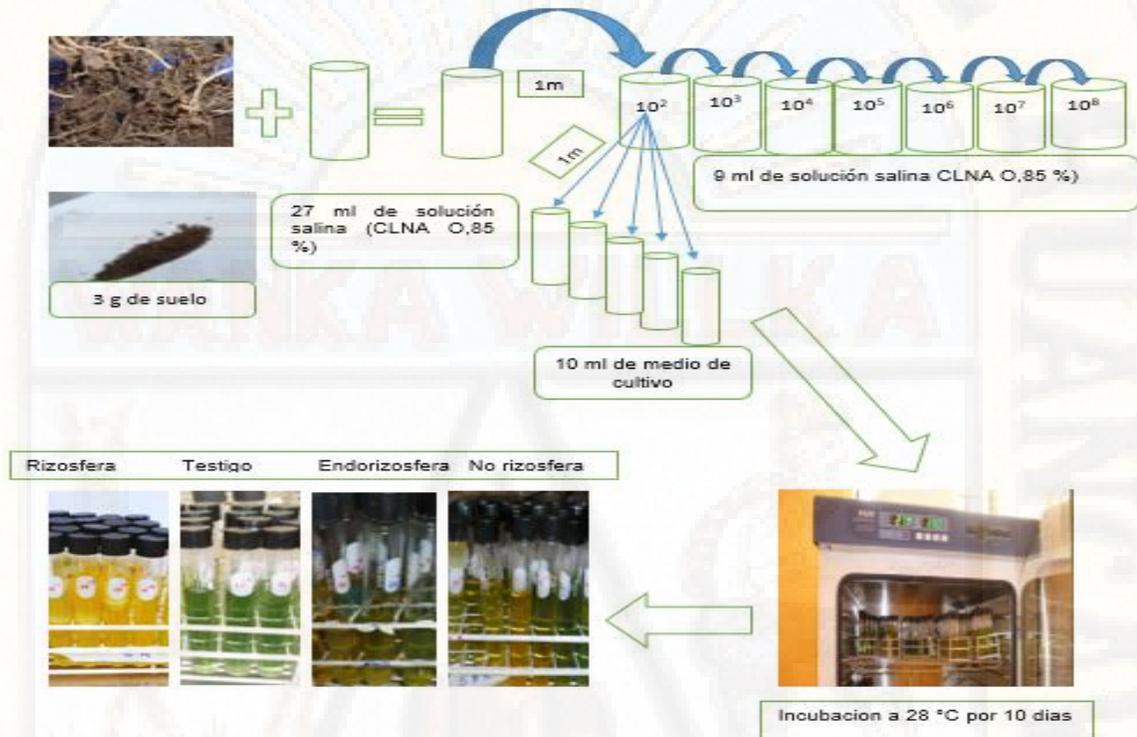
41. Ogho, F. & Okokwo, J. 2012. Some Characteristics of a plant growth promoting *Enterobacter* sp. isolated from roots of maize. *Advances in Microbiology*, 2, 368-374.
42. Padda, Kiran Preet; Puri, Akshit; Chanway, Chris P. (2017). *Microbios de importancia agrícola para la agricultura sostenible*. Springer, Singapur. pp. 165–191. doi : 10.1007 / 978-981-10-5343-6\_6.
43. Paulsson M, Granrot A, Ahl J et al 2017. Antimicrobial combination treatment including ciprofloxacin decreased the mortality rate of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: a retrospective cohort study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 36:1187-1196. DOI: 10.1007/ s10096-017-2907-x.
44. Pérez, C. J. 2011. Extraordinarios resultados en maíz y frijol con biofertilizantes. Disponible en: [http:// www.biofabrica.com.mx/blog/?tag=azospirillum-brasilense](http://www.biofabrica.com.mx/blog/?tag=azospirillum-brasilense).
45. Philippot, 2005. Contribution of bacteria to initial input and cycling of nitrogen in soil. En: Buscot F, Varma A (eds.) *Microorganisms in soils Roles in Genesis and Functions*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany 159-176 pp.
46. Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P., van der Putten, W.H., Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 789–99. doi:10.1038/nrmicro3109,2013.
47. Ramaprasad, EVV; Mahidhara, Ganesh; Sasikala, Ch.; Ramana, cap. V. (2018). "Rhodococcus sp. Nov., Una actinobacteria electroactiva marina aislada de arrecifes de coral". *Revista Internacional de Microbiología Sistemática y Evolutiva*. 68 (8): 2644-2649. doi: 10.1099 / ijsem.0.002895.
48. Rangel, L., Rodriguez, M., & Cerrato, J. 2011. Afinidad y efecto de *Azospirillum* sp. en Maíz. *Agronomía Mesoamericana*, 22(2), 269-279.
49. Rigaud J. y Puppo A. 1975. Indole-3 acetic catabolism by soybean bacteroids. *J. Gen. Bacteriol.* 88:223-228.
50. Rivas y fredrey 1993. Efecto asociativa del *Azospirillum* sp. Con *Rhizobium leguminosarum* sobre la nodulacion y redimiento de materia seca de haba (vicia faba). Tesis para optar el grado de M.Sc.UNALM. Lima –Peru.

51. Rodelas, María Belén. Interacción *Rhizobium* – *Azospirillum* y *Rhizobium-Azotobacter*. Efecto sobre la nodulación y fijación simbiótica del nitrógeno en *Vicia faba*. 2001. En: (<http://193.146.205.198/sefin/Ecologia/Rodelas.html>)
52. Sambrook, J., E.F. Fritsch y T. Maniatis. 1989 Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2<sup>d</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbour, NY, USA.
53. Saubidet, M., Fatta, N., Barneix, A. 2002. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. *Plant Soil*. p. 215 a 222.
54. Schloter, M.; Kirchof, G.; Hienzmann, U.; Dobereiner, J. and Hartmann, A. 1994. Immunological studies of the wheat – root colonization by the *Azospirillum brasilense* strains Sp 7 and Sp 245 using strain specific monoclonal antibodies. In: nitrogen fixation with non – legumes. Eds. N. Hegazi, M. Fayez and M. Monib. pp: 290 – 295. The American University in Cairo Press. Egypt.
55. Shi-Lei Sun, Wen-Long Yang, Wen-Wan Fang, Yun-Xiu Zhao, Ling Guo, Yi-Jun Dai. (2018). El Rhizobacterium *Variovorax boronicumulans* CGMCC 4969, que promueve el crecimiento de las plantas, regula el nivel de ácido indol-3-acético sintetizado a partir de indol-3-acetonitrilo. DOI: 10.1128 / AEM.00298-18.
56. Tanu, P.A. y Adholeya A. 2015. Potential of arbuscular mycorrhizae in organic farming systems. En: Handbook of microbial biofertilizers. Eds Rai MK. Food products Press. The Haworth Press, Inc. Londres.
57. Tarrand, J. J.; N.R. Krieng and J. Dobereiner. 1978. *A taxonomic study of the spirillum lipoferum gen. nov. and two species, Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. Nov. and *Azospirillum brasilense* sp. Nov. *Can. J. Microbiol.* 24:967 – 980.
58. Tsgou, v., Kefalogianni, i., Sini, k., Aggeli, g. 2003. *etabolic activities in Azospirillum grown in the presence of NH4*. *Biotechnology*. pp. 574 a 578.
59. Valero, N. 2016. Potencial biofertilizante de bacterias diazótroficas y solubilizadoras de fosfatos asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). Tesis de Maestría en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá,

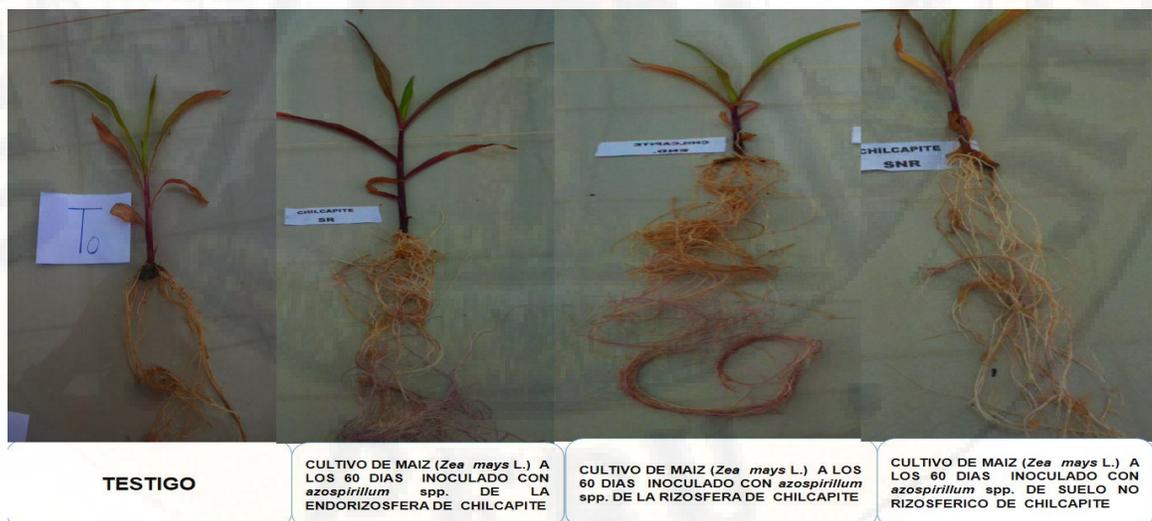
60. Vicentini, K. 2016. Fijación de nitrógeno por bacterias diazotróficas en cultivos de arroz irrigado. Tesis de Doctorado. Universidad Federal de Santa María, Brasil,
61. Vincent JM. A 1970. manual for the practical study of root-nodule bacteria IBP Handbook 15 Blackwell Scientific Publications, Oxford.
62. Vital, L. y Mendoza 2014. (*A. Azospirillum*), habitante de la gramínea. Revista de divulgación científica y tecnológica de la universidad veracruzana, Mayo-Agosto, 27(2), 4.
63. Wild, A. 1992. Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell. Ed. Mundi – Prensa. 1045 pg.
64. William Rivera-Méndez. (2015). Microbiological control as experience of local sustainability in Central American agricultura.
65. Zapatero Rovira, J. M. 1975. Evaluación en el maíz del coeficiente Rizosfera/suelo (R/S) referente a las bacterias libres fijadoras de nitrógeno. Análisis científicos. UNA. VXII (1 - 2):45 – 57.
66. Zuñiga Davila, Doris 1980. Variación del coeficiente R/S de bacterias fijadoras de nitrógeno en *Sycios badera*, durante la época húmeda en las lomas de Lanchay. Tesis para optar el título de biólogo. UNALM – PERU.

## APÉNDICE

Anexo 1. Esquema de del procedimiento de siembra de *Azospirillum* spp.



Anexo 2. Comparación de tratamientos en bioensayo inoculadas con *Azospirillum* spp.



Anexo 3. Datos originales de altura de planta de maíz amiláceo en (cm)

REP.	TESTIGO (T)	CHILCAPITE ENDORIZOSFERA (END)	CHILCAPITE SUELO RIZOSFERICO (SR)	CHILCAPITE SUELO NO RIZOSFERICO (SNR)
1	16	37	40	33
2	18	64	60	28
3	14	35	58	30

Anexo 4. Datos originales de peso seco de tallo de planta de maíz amiláceo en (g)

REP.	TESTIGO (T)	CHILCAPITE ENDORIZOSFERA (END)	CHILCAPITE SUELO RIZOSFERICO (SR)	CHILCAPITE SUELO NO RIZOSFERICO (SNR)
1	30	35	69	35
2	14	48	90	34
3	16	36	45	43

Anexo 5. Datos originales de peso seco de raíz de planta de maíz amiláceo en (g)

REP.	TESTIGO (T)	CHILCAPITE ENDORIZOSFERA (END)	CHILCAPITE SUELO RIZOSFERICO (SR)	CHILCAPITE SUELO NO RIZOSFERICO (SNR)
1	52	80	80	34
2	22	69	88	36
3	20	60	64	42

Anexo 6. Datos originales de longitud de raíces de planta de maíz amiláceo en (cm)

REPETICIÓN.	TESTIG O (T)	ENDORIZOSFERA (END)	SUELO RIZOSFERICO (SR)	SUELO NO RIZOSFERICO (SNR)
1	29	80	58	45
2	26	88	94	40
3	23	70	89	38

Anexo 7. Datos de hoja de lectura de la evaluación de desarrollo de *Azospirillum* spp. provenientes de la Endorizosfera, rizosfera y suelo no Rizosferico de la zona maicera de Chilcapite –Pomacocha – Acobamba – Huancavelica.

CRECIMIENTO DE <i>Azospirillum</i> spp. EN LA ENDORIZOSFERA DE MAIZ AMILACEO AL 50 % DE FLORACION DE PLANTAS EN CHILCAPITE -2017								
DIAS	DILUCION							
	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>
1 D 02/07/17	5+	5+	4+	3+	1+	0	0	0
2 D 03/07/17	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+
3 D 04/07/17	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+
4 D 05/07/17	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+
5 D 06/07/17	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+
6 D 07/07/17	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+
7 D 08/07/17	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+
8 D 09/07/17	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+
9 D 10/07/17	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+
10 D 11/07/17	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+
11 D 12/07/17	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+
12 D 13/07/17	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+
13 D 14/07/17	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+
14 D 15/07/17	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+
15 D 16/07/17	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+	5+

Número Característico: 555

Total, de tubos evaluados por dilución: 5

Presencia de *Azospirillum* spp.:

Número de ufc/g de suelo: 180 x 10<sup>6</sup>

8 Tubos positivos de: 5

Ausencia de *Azospirillum* spp.

**Intervalo de confianza:**

=  $180 \times 10^6 = 180.000.000$  Organismos/g de Raíz

Anexo 8. Crecimiento de *Azospirillum* spp. en la rizosfera de maíz amiláceo al 50% de floración en chacra de Chilcapite -2017

DIAS	DILUCIÓN							
	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>
1 D 02/07/17	5+	1+	0	0	0	0	0	0
2 D03/07/17	5+	5+	5+	4+	0	0	0	0
3 D04/07/17	5+	5+	5+	5+	0	0	0	0
4 D05/07/17	5+	5+	5+	5+	2+	0	0	0
5 D06/07/17	5+	5+	5+	5+	3+	0	0	0
6 D07/07/17	5+	5+	5+	5+	4+	0	0	0
7 D08/07/17	5+	5+	5+	5+	5+	1+	0	0
8 D09/07/17	5+	5+	5+	5+	5+	2+	0	0
9 D10/07/17	5+	5+	5+	5+	5+	2+	0	0
10 D11/07/17	5+	5+	5+	5+	5+	3+	0	0
11 D12/07/17	5+	5+	5+	5+	5+	3+	0	0
12 D13/07/17	5+	5+	5+	5+	5+	3+	0	0
13 D14/07/17	5+	5+	5+	5+	5+	4+	3+	3+
14 D15/07/17	5+	5+	5+	5+	5+	4+	3+	3+
15 D16/07/17	5+	5+	5+	5+	5+	5+	3+	3+

Número Característico: 533

Numero de ufc/g de suelo:  $17,5 \times 10^6$

Total, de tubos evaluados por dilución: 5

6 Tubos positivos de:5

Presencia de *Azospirillum* spp.:

Ausencia de *Azospirillum* spp:

**Intervalo de confianza:**

=  $17,5 \times 10^6 = 17500.000$  Organismos/g de suelo

Anexo 9. Crecimiento de *Azospirillum* spp. en el Suelo no rizosférico del maíz amiláceo al 50 % de floración en la chacra de Chilcapite -2017

<b>CRECIMIENTO DE <i>Azospirillum</i> spp. EN EL SUELO NO RIZOSFERICO DEL MAIZ AMILACEO AL 50 % DE FLORACION DE PLANTAS EN CHILCAPITE -2017</b>								
DIAS	DILUCION							
	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>
1 D 02/07/17	4+	0	0	0	0	0	0	0
2 D 03/07/17	5+	5+	3+	0	0	0	0	0
3 D 04/07/17	5+	5+	4+	1+	0	0	0	0
4 D 05/07/17	5+	5+	5+	3+	0	0	0	0
5 D 06/07/17	5+	5+	5+	4+	1+	0	0	0
6 D 07/07/17	5+	5+	5+	5+	2+	0	0	0
7 D 08/07/17	5+	5+	5+	5+	3+	0	0	0
8 D 09/07/17	5+	5+	5+	5+	4+	0	0	0
9 D 10/07/17	5+	5+	5+	5+	4+	0	0	0
10 D 11/07/17	5+	5+	5+	5+	4+	0	0	0
11 D 12/07/17	5+	5+	5+	5+	4+	0	0	0
12 D 13/07/17	5+	5+	5+	5+	4+	1+	0	0
13 D 14/07/17	5+	5+	5+	5+	4+	3+	0	0
14 D 15/07/17	5+	5+	5+	5+	5+	4+	0	0
15 D 16/07/17	5+	5+	5+	5+	5+	4+	0	0

Número Característico: 540

Número de ufc/g de suelo:  $13 \times 10^5$

Total, de tubos evaluados por dilución: 5

5 Tubos positivos de: 5

Presencia de *Azospirillum* spp.:

Ausencia de *Azospirillum* spp: