

UNIVERSIDAD PRIVADA DE TACNA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL



TESIS

**“DETERMINACIÓN DE LA INFLUENCIA DE AZOTOBACTER
NATIVOS EN CULTIVOS DE *Raphanus sativus* COMO
BIOFERTILIZANTE EN EL DISTRITO DE PACHÍA”**

PARA OPTAR:

TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AMBIENTAL

PRESENTADO POR:

Bach. Jeanfranco Alfredo Ibarra Kocfú

Bach. Wilfredo Reynaldo Llica Flores

TACNA – PERÚ

2020

UNIVERSIDAD PRIVADA DE TACNA**FACULTAD DE INGENIERÍA****ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL****“DETERMINACIÓN DE LA INFLUENCIA DE AZOTOBACTER
NATIVOS EN CULTIVOS DE *Raphanus sativus* COMO
BIOFERTILIZANTE EN EL DISTRITO DE PACHÍA”**

Tesis sustentada y aprobada el 28 de diciembre del 2020; estando el jurado calificador integrado por:

PRESIDENTE:



M Sc. Blgo. José Oswaldo Cazorla Galdos

SECRETARIO:



M Sc. Ing. Martha Daniela Rubira Otárola

VOCAL :



M Sc. Ing. Germán Mamani Aguilar

ASESOR :



Dr. Blgo. Richard Sabino Lazo Ramos

DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD

Yo, Jeanfranco Alfredo Ibarra Kocfú y Wilfredo Reynaldo Llica Flores, en calidad de Bachiller de la Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Privada de Tacna, identificado (a) con DNI 70429463 y 70915649

Declaro bajo juramento que:

1. Soy autor (a) de la tesis titulada: “Determinación de la Influencia de Azotobacter Nativos en cultivos de *Raphanus sativus* como biofertilizante en el Distrito de Pachía”, la misma que presento para optar el:

Título Profesional de Ingeniero Ambiental

2. La tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente, para la cual se han respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas.

3. La tesis presentada no atenta contra derechos de terceros.

4. La tesis no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.

5. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falsificados, ni duplicados, ni copiados.

Por lo expuesto, mediante la presente asumo frente a LA UNIVERSIDAD cualquier responsabilidad que pudiera derivarse por la autoría, originalidad y veracidad del contenido de la tesis, así como por los derechos sobre la obra y/o invención presentada. En consecuencia, me hago responsable frente a LA UNIVERSIDAD y a terceros, de cualquier daño que pudiera ocasionar, por el incumplimiento de lo declarado o que pudiera encontrar como causa del trabajo presentado, asumiendo todas las cargas pecuniarias que pudieran derivarse de ello en favor de terceros con motivo de acciones, reclamaciones o conflictos derivados del incumplimiento de lo declarado o las que encontrasen causa en el contenido de la tesis, libro y/o invento.

De identificarse fraude, piratería, plagio, falsificación o que el trabajo de investigación haya sido publicado anteriormente; asumo las consecuencias y sanciones que de mi acción se deriven, sometiéndome a la normatividad vigente de la Universidad Privada de Tacna.

Tacna, 29 de Diciembre del 2020



Jeanfranco Alfredo Ibarra Kocfú

DNI: 70429463



Wilfredo Reynaldo Llica Flores

DNI: 70915649

DEDICATORIA

A Dios, quién supo guiarnos por el buen camino, darnos fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas durante nuestra etapa de pre grado.

A nuestros padres, por el esfuerzo, apoyo incondicional y por apostar por nosotros en toda nuestra formación personal y profesional.

A nuestros amigos, por su apoyo y aliento para hacer posible el presente trabajo de investigación.

A nuestros profesores, por la enseñanza brindada, principalmente por la formación profesional impartida, experiencias y momentos inolvidables, la presente investigación está dedicada a los docentes: Dr. Blgo. Richard Lazo, M Sc. Blgo. José Carzorla, M Sc. Ing. Javier Alca, M Sc. Blga. Claudia Clavijo Koc, M Sc. Ing. Martha Rubira, M Sc. Ing. David Rubira, M Sc. Ing. José Dapozzo, M Sc. Ing. Vicente Málaga, M Sc. Ing. Juan Carlos Romaina, M Sc. Ing. Humberto Santana, M Sc. Ing. Fermin Gárnica, M Sc. Ing. Carmen Román y M Sc. Abog. Ana Mazuelos.

También, a todos aquellos que aparecieron fugazmente en los momentos menos pensados durante el desarrollo de nuestro presente trabajo de investigación y de que alguna manera fueron partícipes de la realización del mismo.

Dedicado de manera especial para mi madre, Maria Rosa Flores Asquez, mi padre Juan Llica Mamani, mi hermana Rosalia Teresa Llica Flores, mi tío Nicanor Llica Mamani y mi tía Elia Angelica Flores Asque quienes fueron mi pilar y mis fuerzas para seguir adelante y lograr mis metas.

Wilfredo Reynaldo Llica Flores

Finalmente, dedicado especialmente para mis abuelos Luis Alfredo Kocfú Fang, quien me guía desde el cielo y Olga Piedad Aragón Jara al Monte por su apoyo constante en mi formación profesional; a mi madre, Yanira Erika de Lourdes Kocfú Aragón, mi padre, Jorge Luis Ibarra Zavala, mi hermano César Alonso Ibarra Kocfú, mis tíos Rossana Ibarra, Norka Kocfú y Humberto Ramos e infinitamente a David Enrique Albornoz Juárez y Teresa Pérez Lazo y a todos mis amigos por la paciencia, compromiso, apoyo y porque gracias a ellos pude realizar la presente investigación.

Jeanfranco Alfredo Ibarra Kocfú

AGRADECIMIENTO

A nuestras familias por su apoyo Incondicional en todo el proceso de formación profesional.

A nuestros maestros de la Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental, que contribuyeron y aportaron de manera significativa a mi formación académica y personal.

A nuestros amigos por estar siempre en las buenas y en las malas ayudándonos a seguir adelante en la presente investigación.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|-----|
| DEDICATORIA | iii |
| AGRADECIMIENTO | iv |
| ÍNDICE GENERAL | v |
| CAPÍTULO I | 4 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 4 |
| 1.1. Descripción del problema..... | 4 |
| 1.2. Formulación del problema..... | 5 |
| 1.2.1. Interrogante principal | 5 |
| 1.2.2. Interrogantes específicas..... | 5 |
| 1.3. Justificación e importancia | 5 |
| 1.4. Objetivos | 6 |
| 1.4.1. Objetivo general | 6 |
| 1.4.2. Objetivos específicos | 6 |
| 1.4.3. Hipótesis general..... | 6 |
| 1.4.4. Hipótesis específicas..... | 6 |
| CAPÍTULO II | 7 |
| MARCO TEÓRICO | 7 |
| 2.1. Antecedentes del estudio..... | 7 |
| 2.2. Bases teóricas | 9 |
| 2.3. Definición de términos | 21 |
| CAPÍTULO III | 23 |
| MARCO METODOLÓGICO..... | 23 |
| 3.1. Tipo y diseño de la investigación | 23 |
| 3.2. Población y/o muestra de estudio | 23 |
| 3.3. Operacionalización de variables | 23 |
| 3.4. Técnicas e instrumentos para la recolección de datos | 25 |
| 3.5. Procesamiento y análisis de datos | 30 |
| CAPÍTULO IV | 31 |
| RESULTADOS..... | 31 |
| 4.1. PRUEBAS DE LABORATORIO | 31 |
| 4.2. PRUEBAS DE CAMPO | 36 |

| | |
|---|----|
| 4.3. DESARROLLO ESTADISTICO DE LA INVESTIGACION | 38 |
| CAPÍTULO V | 53 |
| DISCUSIÓN | 53 |
| CONCLUSIONES..... | 55 |
| RECOMENDACIONES | 56 |
| BIBLIOGRAFÍA | 57 |
| ANEXOS..... | 61 |
| MATRIZ DE CONSISTENCIA..... | 79 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| TABLA 1. . Colores de pigmentos solubles en agua producidos por bacterias del género <i>Azotobacter</i> | 16 |
| TABLA 2. Operacionalización de Variables..... | 23 |
| TABLA 3. Materiales y/o instrumentos para la investigación | 29 |
| TABLA 4. Aislamiento de <i>Azotobacter</i> – Semana 01..... | 31 |
| TABLA 5. Aislamiento de <i>Azotobacter</i> – Semana 06..... | 32 |
| TABLA 6. Caracterización fisiológica de las 8 cepas aisladas de la rizósfera de Rábano en Pachía – Tacna | 32 |
| TABLA 7. Valores en la escala turbidimétrica de Mc Farland..... | 34 |
| TABLA 8. Selección de 8 cepas mediante la valoración de las características fenotípicas, bioquímicas y fisiológicas usando el análisis de ponderados..... | 34 |
| TABLA 9. Efecto de la inoculación de <i>azotobacter</i> nativos en el porcentaje de germinación de rábano (<i>Raphanus Sativus</i>) a las 48 h de germinación..... | 35 |
| TABLA 10. Resultados de los 6 Tratamientos en cultivos de Rábano (<i>Raphanus Sativus</i>) de la cepa: A1-M12-PA6. Semana 8..... | 37 |
| TABLA 11. Resultados de los 6 Tratamientos en cultivos de Rábano (<i>Raphanus Sativus</i>) de la cepa: A1-M19-PA6. Semana 8..... | 37 |
| TABLA 12. Resultados de los Tratamientos en cultivos de Rábano de la cepa: A1-M12-PA6 en base al factor Tiempo de Germinación..... | 38 |
| TABLA 13. Resultados de los Tratamientos en cultivos de Rábano de la cepa: A1-M12-PA6 en base al factor Longitud de la Planta..... | 38 |
| TABLA 14. Resultados de los Tratamientos en cultivos de Rábano de la cepa: A1-M12-PA6 en base al factor Longitud de la Raíz..... | 38 |
| TABLA 15. Resultados de los Tratamientos en cultivos de Rábano de la cepa: A1-M12-PA6 en base al factor Peso en Fresco | 38 |
| TABLA 16. Resultados de los Tratamientos en cultivos de Rábano de la cepa: A1-M19-PA6 en base al factor Tiempo de Germinación..... | 39 |
| TABLA 17. Resultados de los Tratamientos en cultivos de Rábano de la cepa: A1-M19-PA6 en base al factor Longitud de la Planta | 39 |
| TABLA 18. Resultados de los Tratamientos en cultivos de Rábano de la cepa: A1-M19-PA6 en base al factor Longitud de la Raíz..... | 39 |

| | |
|---|----|
| TABLA 19. Resultados de los Tratamientos en cultivos de Rábano de la cepa: A1-M19-PA6 en base al factor Peso en Fresco..... | 39 |
| TABLA 20. Características y ventajas de cada método aplicado..... | 40 |
| TABLA 21. Análisis de varianza para el tiempo de germinación. – Cepa M12..... | 41 |
| TABLA 22. Comparaciones múltiples de Dunnet con un control. – Tiempo de Germinación – Cepa M12..... | 41 |
| TABLA 23. Análisis de varianza para la longitud de la Planta. – Cepa M12..... | 42 |
| TABLA 24. Comparaciones múltiples de Dunnet con un control. – Longitud de la Planta. – Cepa M12..... | 43 |
| TABLA 25. Análisis de varianza para la longitud de la raíz de la planta. – Cepa M12... | 44 |
| TABLA 26. Comparaciones múltiples de Dunnet con un control. – Longitud de la Raíz. – Cepa M12..... | 44 |
| TABLA 27. Análisis de varianza para el peso en fresco de la planta. – Cepa M12..... | 45 |
| TABLA 28. Comparaciones múltiples de Dunnet con un control. – Peso en Fresco. – Cepa M12..... | 46 |
| TABLA 29. Análisis de varianza para el tiempo de germinación. – Cepa M19..... | 47 |
| TABLA 30. Comparaciones múltiples de Dunnet con un control. – Tiempo de Germinación – Cepa M19..... | 47 |
| TABLA 31. Análisis de varianza para la longitud de la Planta. – Cepa M19..... | 48 |
| TABLA 32. Comparaciones múltiples de Dunnet con un control. – Longitud de la Planta. – Cepa M19..... | 49 |
| TABLA 33. Análisis de varianza para la longitud de la raíz de la planta. – Cepa M19... | 50 |
| TABLA 34. Comparaciones múltiples de Dunnet con un control. – Longitud de la Raíz. – Cepa M19..... | 50 |
| TABLA 35. Análisis de varianza para el peso en fresco de la planta. – Cepa M19..... | 51 |
| TABLA 36. Comparaciones múltiples de Dunnet con un control. – Peso en Fresco. – Cepa M19..... | 52 |

ÍNDICE DE GRÁFICAS

| | |
|--|----|
| GRÁFICA 1. Intervalos de Tiempo de Germinación VS. Tratamiento 1, 5 y 6. – Ceba M12 | 53 |
| GRÁFICA 2. Intervalos de Longitud de la Planta VS. Tratamiento 1, 5 y 6. – Ceba M12 | 54 |
| GRÁFICA 3. Intervalos de Longitud de la Raíz VS. Tratamiento 1, 5 y 6. – Ceba M12. | 56 |
| GRÁFICA 4. Intervalos de Peso en Fresco VS. Tratamiento 1, 5 y 6. – Ceba M12 | 57 |
| GRÁFICA 5. Intervalos de Tiempo de Germinación VS. Tratamiento 1, 5 y 6. – Ceba M19 | 59 |
| GRÁFICA 6. Intervalos de Longitud de la Planta VS. Tratamiento 1, 5 y 6. – Ceba M19 | 60 |
| GRÁFICA 7. Intervalos de Longitud de la Raíz VS. Tratamiento 1, 5 y 6. – Ceba M19. | 62 |
| GRÁFICA 8. Intervalos de Peso en Fresco VS. Tratamiento 1, 5 y 6. – Ceba M19 | 63 |

RESUMEN

En la presente investigación sobre la influencia de *Azotobacter* nativos en cultivos de *Raphanus sativus*, se realizó Distrito de Pachía, Región de Tacna teniendo en consideración el tipo de suelo y condiciones ambientales y climatológicas de la zona, teniendo dos fases: fase de laboratorio y fase de campo, en las cuales se realizaron los siguientes procesos: Muestreo de Suelo, Selección de Medios de Cultivo, Aislamiento, sembrado y purificación de las cepas de *Azotobacter* nativos, y Pruebas fisicoquímicas para la identificación, caracterización y aplicación de las cepas de *Azotobacter* idónea las fueron seleccionadas en base a su capacidad facilitadora de crecimiento, mediante la producción de Ácido Indol Acético (AIA), solubilización de fosfato tricálcico, germinación de semillas de rábano y crecimiento en MMNS. El 100% de cepas no produjo AIA, el 100% no solubilizó fosfato tricálcico, el 45% aumentó significativamente la germinación de las semillas de rábano con respecto al control y a su vez, registró un crecimiento límite de 6×10^8 UFC.ml-1 en la prueba de crecimiento en MMSN, para su posterior uso como biofertilizante en cultivos de *Raphanus sativus* en comparación con los tratamientos con 3 repeticiones de cada uno (Tratamiento 1: Control, Tratamiento 2: Tierra esterilizada, Tratamiento 3: Bioinoculante de 10^6 UFC/ml, Tratamiento 4: Bioinoculante de 10^7 UFC/ml, Tratamiento 5: Bioinoculante de 10^8 UFC/ml, Tratamiento 6: Urea). Evaluando indicadores referente al Tiempo de germinación, Longitud de la planta, Longitud de la raíz y Peso fresco.

Finalmente, se seleccionaron 8 cepas idóneas, donde la cepa M19 presentó un mayor porcentaje de ponderación (59.73%) respecto a los cuatro indicadores analizadas, seguida de la cepa M12 (58.81). Finalmente se pudo observar la eficiencia significativa entre los tratamientos 1, 5 y 6 tales como: reducción en el tiempo de germinación de 7 a 3 días, aumento en la longitud de la planta de 4.9cm a 13.7cm y aumento en el peso fresco de 18.9gr a 48.9gr; asimismo que la longitud promedio de la raíz de la planta mediante los tres tratamientos es igual, oscilando entre los 12.3cm y 15.8cm, según al diseño de experimentos unifactorial aplicando, determinándose la eficiencia significativa y positiva en la aplicación de *Azotobacter*.

PALABRAS CLAVES: *Azotobacter*, *Raphanus sativus*, Biofertilizante, Agroquímico, Control, Tiempo de Germinación, Longitud de la planta, Longitud de la raíz, Peso fresco.

ABSTRACT

In the present investigation on the influence of native *Azotobacter* in *Raphanus sativus* crops, it was carried out Pachía District, Tacna Region, taking into consideration the type of soil and environmental and climatic conditions of the area, having two phases: laboratory phase and field phase, in which the following processes were carried out: Soil Sampling, Selection of Culture Media, Isolation, sowing and purification of the native *Azotobacter* strains, and physical-chemical tests for the identification, characterization and application of the suitable *Azotobacter* strains were selected based on their growth facilitating capacity, through the production of Indole Acetic Acid (AIA), solubilization of tricalcium phosphate, germination of radish seeds and growth in MMNS. 100% of strains did not produce AIA, 100% did not solubilize tricalcium phosphate, 45% significantly increased radish seed germination over the control and in turn, registered a growth limit of 6×10^8 CFU.ml⁻¹ in the growth test in MMSN, for subsequent use as a biofertilizer in *Raphanus Sativus* crops compared to treatments with 3 replicates of each (Treatment 1: Control, Treatment 2: Sterilized soil, Treatment 3: 10^6 CFU/ml bioinoculant, Treatment 4: 10^7 CFU/ml bioinoculant, Treatment 5: 10^8 CFU/ml bioinoculant, Treatment 6: Urea). Evaluating indicators related to germination time, plant length, root length and fresh weight.

Finally, eight identical strains were selected, where the M19 strain presented a higher weighting percentage (59.73%) with respect to the four indicators analyzed, followed by the M12 strain (58.81). Finally, it can be observed the significant efficiency among the treatments 1, 5 and 6, such as: reduction in germination time from 7 to 3 days, increase in the length of the plant from 4.9cm to 13.7cm and increase in the fresh weight from 18.9gr to 48.9gr; also that the average length of the plant's root through the three treatments is equal, oscillating between 12.3cm and 15.8cm, according to the design of unifactorial experiments applying an ANOVA. Determining the significant and positive efficiency in the application of *Azotobacter*.

KEY WORDS: *Azotobacter*, *Raphanus sativus*, Biofertilizer, Agrochemical, Control, Germination time, Plant length, Root length, Fresh weight.

INTRODUCCIÓN

Globalmente vivimos una problemática ambiental, agraria y ecológica Según La Organización de las Naciones Unidas (ONU); donde los fertilizantes químicos y agroquímicos contribuyen a la contaminación del medio ambiente y sus elementos, causando bioacumulación negativa de los elementos, la reducción del nitrógeno y por ende la alteración de su ciclo natural, la reducción de los polinizadores y a su vez la destrucción de la biodiversidad, posibles intoxicaciones, resistencia a plaguicidas y efectos nefastos en la cadena trófica; negativas en la salud de las personas y la cultivación de alimentos; causando diversos tipos de enfermedades como el cáncer entre otros desequilibrios.

En la naturaleza existe una considerable colonización microbiana; coexistiendo diversos microorganismos beneficiosos para el desarrollo de la vegetación, que son caracterizados por realizar funciones importantes para la vida vegetal, una de ellas es fijar el nitrógeno atmosférico, también la antibiosis, la dilución del fósforo insoluble y además de su importante aporte en el desarrollo vegetal y los cultivos; Las bacterias del género *Azotobacter* son utilizadas para la producción agrícola en todo el mundo, ya que fijan el nitrógeno en las plantas hasta el 50%, este proceso se llevan a cabo a partir en la atmósfera en el Ciclo del Nitrógeno, además de suministrarles sustancias para la estimulación durante el desarrollo vegetal.

En Tacna, en el periodo de agosto a julio de la Campaña Agrícola 2017-2018, el comportamiento de las siembras de cultivos como Olivo, Papa, Rábano, Betarraga, Maíz Chala, entre otros mostró un crecimiento de 27% (2,846 ha) en comparación a las ejecutadas en similar periodo de la Campaña Agrícola 2016-2017, es por ello que el desempeño de la producción agrícola al mes julio 2018, tuvo un crecimiento de 16.7% en relación a similar periodo del año 2017, teniendo que mejorar no solo la producción agrícola de la región Tacna sino también manteniendo la condiciones ambiental y la calidad del suelo.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción del problema

La degradación de tierras es un proceso en el cual logra un deterioro progresivo a afectan en diferentes medidas la calidad del suelo. Los sistemas agrícolas y la aplicación de los agroquímicos han conducido a un deterioro continuo del factor suelo principalmente visto desde lo físico-químico, reduciendo significativamente la productividad del suelo agrícola, entre otros problemas ambientales. Estos diversos procesos de degradación del suelo son bastante habituales en las regiones áridas del mundo, como es el caso de Tacna, Perú según artículo de investigación (Quiñonez & DalPozzo, 2008).

En consecuencia, la implementación de sistemas agrícolas que contemplan el uso de agroquímicos en estos tipos de zonas, lo que ocasiona una degradación química terrestre por el exceso acumulativo de sales solubles, y por ende la degradación fisiológica y estructural de suelos, ocasionando una deficiencia nutricional y a su vez también disminuyen la capacidad productiva de estos suelos según estudio de (Muñoz, Ferreira, Escalante, & López, 2013).

Todo ello trae como consecuencia el incremento de las posibilidades de suelos afectados por sales, erosión hídrica (por acción del agua) y eólica (por acción del aire), trayendo como resultando la infertilidad de suelos, disminución de hidrología disponible para los diferentes cultivos, lo que puede generar una pérdida de la biodiversidad de los ecosistemas; esto conduce a la falta de productividad de los recursos naturales que existen en las zonas de trabajo según: (Rodríguez, Florentino, Torres, Yendis, & Zamora, 2009).

En la región de Tacna, hay un bajo porcentaje de aplicación en cuanto a biofertilizantes en cultivos, esto conlleva a la contaminación de suelos por agroquímicos y la acumulación de sales que a largo plazo altera la calidad del suelo haciéndolo infértil.

1.2. Formulación del problema

1.2.1. Interrogante principal

¿Es factible determinar la influencia de azotobacter nativos en cultivos de *Raphanus sativus* como biofertilizante en el distrito de Pachía?

1.2.2. Interrogantes específicas

- ¿Es posible aislar azotobacter nativos con características fisiológicas de biofertilizantes en la zona de Pachía?

- ¿Cuál es el porcentaje de germinación de las semillas aplicando azotobacter?

- ¿Qué tan significativa sería la influencia de Azotobacter nativos en comparación con la urea y el tratamiento control de cultivos de *Raphanus sativus* aplicando?

1.3. Justificación e importancia

La presente investigación busca una alternativa útil con ayuda de la biotecnología, aislar la bacteria azotobacter que actúa como un compuesto sensible al oxígeno, estimulando el crecimiento del área radicular contribuyendo con la solubilidad fosfática y de calcio, volviéndose favorable para la producción de un biofertilizante.

Según el estudio de Franco & Dobereiner, Biología de solo e a sustentabilidad de dos solos tropicais, (1994), el nitrógeno es el elemento perjudicial para el crecimiento de las plantas en el suelo, el incremento anual de uso de agroquímicos, con el fin de elevar la producción agraria conlleva a la variación en los niveles de nitrógeno que es un elemento vital para los reinos vegetal y animal; Existen reportes científicos de diversos compuestos químicos a base de nitrógeno a nivel mundial para el uso exclusivo como fertilizante una amplia variedad de cultivos de relevancia agronómica, entre ellas cereales, tubérculos, legumbres y flores; dejando un impacto negativo en los recursos naturales (agua y el suelo), tal como el exceso nitratos en aguas subterráneas ocasiona una toxicidad en las plantas, la concentración excesiva de eventualmente conlleva a la extinción de biota del suelo, dejando como

consecuencia la desintegración de biogeoquímicos que dejen un desarrollo insostenible y con ello un alto costo económico, social y ambiental según (Marin, Baldani, Dos Santos, & Baldani, 2003).

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Determinar la influencia de azotobacter nativos en cultivos de *Raphanus sativus* como biofertilizante en el distrito de Pachía.

1.4.2. Objetivos específicos

- Aislar y seleccionar cepas de Azotobacter nativos del Distrito de Pachía con características biofertilizantes mediante la evaluación de sus características Fisiológicas.
- Determinar el porcentaje de germinación aplicando inóculo.
- Determinar la eficiencia de la cepa de Azotobacter en comparación con el agroquímico urea y el tratamiento control en cultivos de *Raphanus sativus*.

1.4.3. Hipótesis general

El Azotobacter nativo como biofertilizante tiene una influencia positiva en la producción cultivos de *Raphanus sativus* en el distrito de Pachía.

1.4.4. Hipótesis específicas

- Se logrará aislar y seleccionar cepas de Azotobacter nativos en la zona de Pachía con características fisiológicas óptimas para ser utilizado como biofertilizante.
- El porcentaje de germinación aumenta en comparación con agua destilada.
- La eficiencia aplicando la fertilización química y biológica bajo tratamiento de control en base a los indicadores de producción se incrementa.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del estudio

Antecedentes Internacionales

En el estudio de (Borda-Molina, Pardo-García, Martínez-Salgado, & Montaña-Lara, 2009), se plantea la metodología para el aislamiento de *Azotobacter* con la técnica de gránulos de suelo la cual promedia un 30% de recuperación de bacterias sensibles al oxígeno. En agar Ashby presenta una formación de halos incoloros rodeando algunos gránulos producto de la solubilización del carbonato de calcio. Estas separaciones manifestaron características macro y microscópicas, así mismo se observa una similitud para *A. Chroococcum*, *A. Vinelandii* y *A. Nigricans* como: irregularidad colonial con gran crecimiento de bacterias halofílicas, forma bacilar corta, formación de quistes y pigmentación, mediante la utilización de diversas pruebas bioquímicas como: la evaluación de la actividad fosfatasa como el caso de la solubilización de fosfato tricálcico o dicálcico y producción AIA (ácido indolacético), se determinó la cepa de *Azotobacter* adecuada, que fue empleada como biofertilizante. (Aquilanti, Favilli, & Clemeti, 2004).

Finalmente para la selección de la cepa utilizada en la elaboración del biofertilizante, muestra comportamientos de cinética de orden 1 pero la mayor velocidad de crecimiento ($p < 0,05$), observándose que su fase estacionaria es alcanzada luego de las 24 horas, en la cual la cepa cumple con las cualidades suficientes para la fijación del nitrógeno en el suelo para un posterior proceso de producción en biomasa según lo expone (Peniche, 2005).

Antecedentes Nacionales

Basados en la investigación de (Carreño, Escobar, Horna, & Mendoza, 2011), se realizó en dos etapas; Descriptiva y Explicativa, se realizó la tipificación del *Azotobacter* spp., a su vez la ponderación del ácido indolacético resultante, nitrógeno fijado y la solubilidad de roca fosfórica de Bayóvar alcanzada por las cepas nativas, mediante el diseño transeccional descriptivo. Según (Hernández,

Fernández, & Baptista, 2003). En la fase explicativa, a través de la estimulación del crecimiento se determinan cuatro cepas nativas capaces de producir ácido indolacético, sensibles al oxígeno y con gran solubilidad de fosfato lo cual es un gran aporte evolutivo a los cultivos de invernadero.

Según estudios reportados por (Jiménez, 2007); (Borda-Molina, Pardo-García, Martínez-Salgado, & Montaña-Lara, 2009). El 93.33% de las muestras de raíces y suelo adherido de hortalizas resultó positivo para el enriquecimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno, porcentaje superior a 42.5% y 30.0%; Se puede concluir que la diferencia del presente estudio es resultado de manipular muestras enriquecidas, dando paso a la incubación de estas bacterias, caso contrario a otras técnicas utilizadas por algunos investigadores como lo es gránulos de suelo, en la cual no es enriquecido el muestreo. Por su parte el resultado favorable de 81.67% de separación de *Azotobacter* spp. Obteniendo de las cepas, presentando bacilos grandes observados microscópicamente así mismo, quistes y Gram negativos, comprando de esta manera la investigación de (Lozada & Rivas, 2010).

Antecedentes Locales

En la investigación de (Clavijo, Chipana, Centeno, Zúñiga, & Guillén, 2012), se tipifican 104 cepas bacterianas diazotróficas nativas de la rizósfera de cultivo de olivo en el Fundo San Martín de Porres ubicado en Tacna – Perú. Se observa correlación de colonias bacterianas y el material orgánico existente en el suelo y sus características, permitieron la tipificación y evaluación de las bacterias en basados en su estimulación del crecimiento, a través de su producción de Ácido Indol Acético (AIA), el crecimiento en Medio Mineral sin Nitrógeno, la solubilidad de fosfatos y germinación de semillas de alfalfa resultando que el 58.65% de cepas produce AIA, el 25.96% solubilizó fosfato tricálcico, el 45.2% incrementó de manera importante la germinación; con respecto al control demostrando un crecimiento máximo de 6×10^8 UFC.ml⁻¹ en la prueba de crecimiento en Medio Mineral sin Nitrógeno. Finalmente fueron seleccionadas 20 cepas, donde la cepa 11A presentó el porcentaje más alto en el ponderado (69.02%) respecto a las cuatro variables analizadas. 11A (AIA 46.47 µg/ml), cepa 14A (5.84 cm² de área de solubilización de fosfato tricálcico) y cepa 3A (45.83% de porcentaje de germinación).

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Importancia del Nitrógeno en el crecimiento de las plantas

Entre Los beneficios principales obtenidos de las bacterias presentes en la rizósfera podemos resaltar la capacidad disolutiva de minerales y macro absorción y/o fijación de nutrientes, optimizando la presencia del nitrógeno para su desarrollo, producción de hormonas vegetales reguladoras crecimiento, interacción con casual de diversos microorganismos beneficiosos para las raíces y su proceso inhibitor de patógenos vegetales; que resultan en la estimulación de la productividad vegetal según nos expone (Rueda, y otros, 2015). Una gran suma de investigaciones conllevan a la estimulación favorable del reino vegetal y se enfatizan en el uso de bacterias sensibles al oxígeno oriundas de gramíneas y poaceas; en algunas condiciones suele ser importante la fijación del nitrógeno realizada por estas fitohormonas, así lo explica (Ramírez, y otros, 2014).

2.2.2. Ciclo del Nitrógeno

El ciclo del nitrógeno tiene una importante participación cambios de estados de oxidación que se puede dar y al hecho de que ese cambio en el estado de oxidación puede ser llevado a cabo por diferentes organismos vivos. Este cambio en el estado de oxidación producido por los microorganismos como bacterias, puede ser positivo o negativo, el cual depende de las condiciones aeróbicas o anaeróbicas que presenta la zona (Sawyer & Mc Carty, 1978).

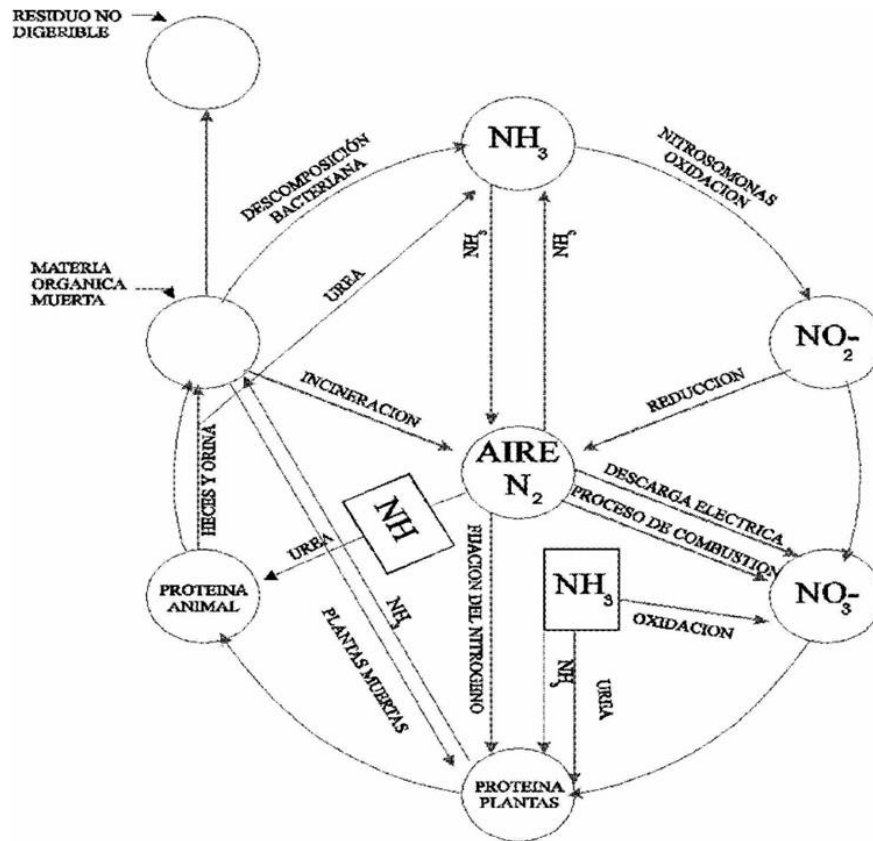


Figura 1. Ciclo del Nitrógeno

Fuente: Sawyer y McCarty, 1978

2.2.3. Bacterias Fijadoras de Nitrógeno

Son bacterias sensibles al oxígeno de forma natural del suelo, desarrolladas naturalmente en el suelo; es un biofertilizante ecológico que a su vez se representa en dos macro divisiones: por una parte, el *Rhizobium*, presente en las legumbre y plantas de corta altitud y por otra *Azotobacter* y *Azospirillum*, presentes y desarrolladas en los suelos de manera fortuita y/o prolongada y su reproducción y vida no es dependiente de una planta, siendo estos últimos de suma importancia para sustituir las fertilizantes industrializados, utilizados en óptimas concentraciones, pueden logrando una elevación de producción a menor costo en el mismo lapso. Expuesto así en el estudio (Tortora, Funke, & Case, 2007).

2.2.4. Diazotrófos

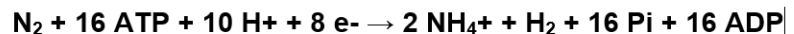
La fijación biológica de nitrógeno molecular la llevan a cabo diversos géneros de bacterias de vida libre, mucha de estas se encuentran en la rizósfera en vida libre, y otros géneros bacterianos forman asociaciones mutuas con plantas (Saribay, 2003). Las bacterias fijadoras de nitrógeno presentan una amplia diversidad taxonómica, con diferentes estilos y formas de vida y de asociación con los vegetales. Sin embargo, solo un pequeño porcentaje de especies es capaz de realizarlo, 87 especies en dos géneros de arqueobacterias, 38 de bacteria, y 20 géneros de cianobacterias se han identificado como diazótrofes (Hussein, 1999).

2.2.5. Fijación Biología del Nitrógeno

- Bacterias Diazotróficos Simbióticos

Las bacterias diazotróficas simbióticas son aquellos que son capaces de fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis con las raíces de plantas leguminosas. Esta fijación se hace mediante bacterias del tipo *Rhizobium* que viven en los nódulos radiculares de las leguminosas. Estas raíces presentan pequeños engrosamientos llamados nódulos que contienen bacteroides o rizobios, la planta suministra nutrientes y protección, mientras que el rizobio proporciona a la planta nitrógeno fijado a la atmosfera (Espin, 2002).

Entre las bacterias, los únicos capaces de llevar a cabo la fijación de N son organismos procariotas. Estos organismos diazótrofes o fijadores de N llevan a cabo este proceso complejo enzimático “nitrogenasa” que se puede encuentra únicamente en organismos procariotas y cataliza la siguiente reacción:



- Bacterias Diazotróficos Asimbióticos

Las bacterias diazotróficas asimbióticas son aquellas que pueden fijar nitrógeno atmosférico sin la necesidad de formar una relación simbiótica con plantas, poseyendo diferentes estrategias

para defender el complejo nitrogenasa. Estas bacterias se encuentran fundamentalmente en los diferentes hábitats: mar, suelo, fuentes de agua dulce y sedimentos. (Rodríguez, Urrego, Martínez, & Bernal, 2003) (Franco & Dobereiner, Biología do solo e a sustentabilidade de dois solos tropicais, 1994).

Entre las bacterias de vida libre se tienen: anaeróbicas o facultativas (*Clostridium pasteurianum*, *Klebsiella* spp, *Desulfovibrio* sp) y fotosintéticas (bacterias purpuras sulfurosas y no sulfurosas y bacterias verdes sulfurosas) (Allan & Graham, 2002).

Las bacterias aeróbicas dependen diferentes factores tales como: oxígeno, humedad y materia orgánica, y las anaeróbicas son predominantes en condiciones de humedad y materia orgánica en los suelos anegados. La FBN en los suelos tropicales con las condiciones requeridas de temperatura, humedad y materia orgánica es generalmente elevada. Se reporta que el número de bacteria fijadoras de nitrógeno es alto en la zona cercana a la raíz (rizósfera), debido a la liberación de compuestos orgánicos que le sirven como nutrimento (Dugan, 2004).

2.2.6. Rizósfera

La rizósfera es el área del suelo más cercana a las raíces de las plantas. En esta área se lleva a cabo una cadena de reacciones físicas y químicas que alteran la estructura del suelo y a los microorganismos que viven en él. Según el estudio de Kennedy & Smith (1995), el término rizósfera hace referencia a la zona del suelo afectada por el desarrollo radicular, en donde los microorganismos inician la proliferación; y según la investigación de Hiltner (1904); este efecto rizosférico se debe al suministro de exudados radicales que contienen azúcares, aminoácidos, vitaminas y enzimas, además de señales que modulan la interacción microbio-planta (Kennedy & Smith, 1995).

Por otra parte, el autor Nogales (2005), nos resalta que los microorganismos en la rizósfera realizan funciones de mucha importancia en los diversos procesos de edafogénesis, ciclos biogeoquímicos de elementos como el oxígeno, el carbono, el hierro, el nitrógeno, el fósforo, el azufre y otros metales; asimismo, interviene en la fertilidad de las plantas y la protección frente a agentes patógenos del medio; finalmente facilitan producción de fitohormonas y posibilitan la degradación de compuestos xenobióticos.

El área de la rizósfera es rica en nutrientes y energía, en la cual alberga grandes poblaciones microbianas que están compuestas, en su mayor parte, por los grupos de microorganismos del suelo como hongos, bacterias, protozoos, algas y virus, según los investigadores Lee & Pankhurst (1992) nos hacen alusión a que la mayor parte de las investigaciones de la rizósfera se enfocan en bacterias y hongos.

Los principales grupos de microorganismos son 10 a 100 veces más abundantes en la rizósfera debido a que las sustancias que se producen, incentivan su crecimiento en ella, opuesto a lo que sucede en suelos adyacentes, (Pritchett, Gay, Besser, & Hancock, 1991).

2.2.7. Clasificación Taxonómica de *Azotobacter*

Joint Genome Institute (2009) y Uniprot Consortium (2009) ubican a las bacterias del género *Azotobacter* dentro de la siguiente clasificación taxonómica:

Dominio: Bacteria
 Phylum: Proteobacteria
 Clase: Gammaproteobacteria
 Orden: Pseudomonadales
 Familia: Pseudomonadaceae
 Género: *Azotobacter*
 Especies: *A. vinelandii*, *A. chroococcum*, *A. beijerinckii*

Bergey, (2005)

2.2.8. Familia Azotobacteraceae

La familia Azotobacteraceae pertenece a la subclase gamma de las proteobacterias (Tchan, Family II Azotobacteraceae, 1984), está formada por bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre que habitan generalmente en agua, suelo y sedimentos. Estudios de DNA ribosomal 16s (DNAr 16S) han identificado dos géneros en esta familia, Azomonas y Azotobacter, el género Azotobacter se diferencia de Azomonas por la presencia de quistes pero no se puede diferenciar morfológicamente de muchos otros géneros de bacterias diazotrófas como Azospirillum y Beijerinckia; comprende siete especies: *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. paspali* (Dobereiner & Day, 1975), *A. armeniacus*, *A. nigricans* (Tchan & New, Genus I Azotobacter, 1984) y *A. salinestris* (Page & Shivprasad, 1991). El género Azomonas comprende tres especies: *A. agilis*, *A. macrocytogenes*, y *A. insignis* (Tchan & New, Genus II Azomonas, 1984).

Los miembros de esta familia Azotobacteraceae tienen la capacidad de sintetizar antibióticos y generar sustancias promotoras del crecimiento vegetal (Pandey & Kumar, Inhibitory effects of *Azotobacter chroococcum* and *Azospirillum brasiliense* on a range of rhizosphere fungi, 1990), además de fijar nitrógeno no simbióticamente, especies como *A. chroococcum* y *A. vinelandii* son utilizadas como bioinoculantes en suelos tropicales y alcalinos. Igualmente muchos miembros de la familia Azotobacteraceae son utilizados para producción de compuestos de interés comercial como polisacáridos, (Sabra, Zeng, & Deckwer, 2001) vitaminas y pigmentos (Pandey, Sharma, & Palni, Influence of bacterial inoculation on maize in upland farming systems of the Sikkim Himalaya, 1998).

2.2.9. Azotobacter

Azotobacter es una bacteria cuya principal característica se basa en la fijación del nitrógeno presente en la atmósfera y en el suelo, de manera que quede accesible para la planta, lo que significa un aporte natural de nitrógeno. (Bishop, 1986).

Las *Azotobacter* proporcionan muchas ventajas como regular el crecimiento de las plantas, promueve el crecimiento de raíces lo que conlleva a un aumento en la concentración de materia seca, producción de fitohormonas, sideróforos y

sustancias antifungicas y genera enzimas que favorecen a la solubilización de fosfatos y oligoelementos, facilitando la asimilación de estos compuestos. (Bishop, 1986), tales como: Bacilos o cocos Gram negativos; Habitan en el suelo y en el agua; Fijan nitrógeno atmosférico (N^2 a NH^3); Vida libre; Forman quistes (similar a endosporas).

Son bacterias quimioorganotróficas, es decir, que utilizan azúcares, alcoholes y sales inorgánicas para crecer. Utilizan nitrato y sales de amonio y ciertos aminoácidos como fuentes de nitrógeno, dependiendo de la presencia de Molibdeno, Vanadio o enzimas nitrogenasas que contengan hierro. A su vez, este género solubiliza fosfatos y sintetizan sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal como tiamina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, biotina, ácido indolacético (AIA), ácido giberélico y citoquininas, que intervienen directamente sobre el desarrollo de las plantas.

- **Generalidades del Género Azotobacter**

Los microorganismos de este género comprenden bacterias con forma bacilar, reaccionan a la tinción de Gram como Gram negativos y en cultivos viejos como Gram variables, las células son ovoides y miden aproximadamente de $2\mu m$ a $4\mu m$ de diámetro, siendo las de mayor tamaño las de *A. chroococcum* que llegan a medir hasta $6\mu m$, puede llegar a formar cadenas de tamaños variables, la forma de resistencia son quistes; son aerobios pero algunos pueden vivir en tensiones bajas de oxígeno y su movilidad se debe a flagelos peritricos, además, producen pigmentos solubles en agua en medios específicos (Saribay, 2003).

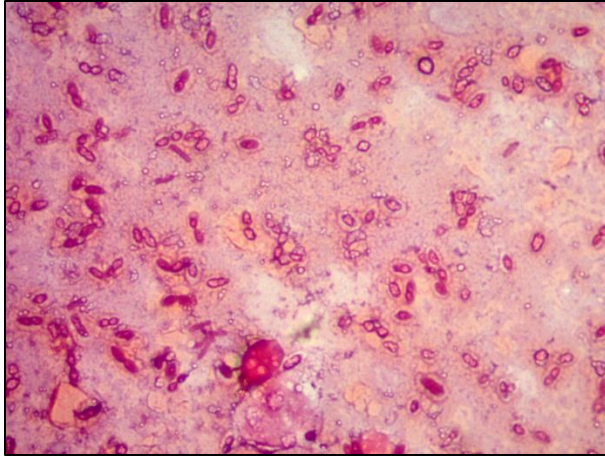


Figura 2. Quistes de *Azotobacter* spp.

Fuente: Propio.

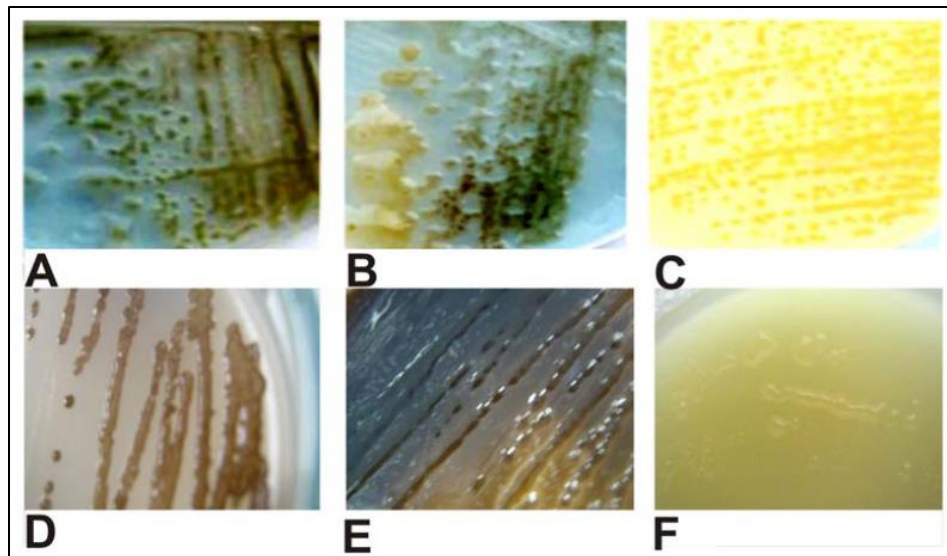


Figura 3. Colonias de diferentes especies de *Azotobacter* spp. en medio diferencial LG.

A) *Azotobacter vinelandii* DSM2289; B) *Azotobacter armeniacus* DSM2284; C) *Azotobacter paspali* DSM2283; D) Pigmentación café característica de *A. armeniacus*, *A. chroococcum* y *A. nigricans*; E) Pigmentación negra-café característica de *A. nigricans* y *A. chroococcum*; F) Pigmentación verde-amarillo característica de *A. vinelandii* y *A. paspali*.

Fuentes: Aquilanti et al., (a) (2004). Pigmentación de diferentes especies en medio Ashby con benzoato. y (Jiménez, 2007).

Tabla 1. Colores de pigmentos solubles en agua producidos por bacterias del género *Azotobacter*. Fuente: Holt, 2000.

| Pigmento | A. <i>vinelandii</i> | A. <i>beijerinckii</i> | A. <i>paspali</i> | A. <i>armeniacus</i> | A. <i>nigricans</i> | A. <i>chroococcum</i> |
|-----------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------|
| Amarillo-Verde fluorescente | + | - | + | - | - | - |
| Verde | D | - | - | - | - | - |
| Café-Negro | - | - | - | - | D | D |
| Café-Negro a Violeta-Rojo | - | - | - | + | + | - |
| Rojos-Violetas | D | - | + | + | D | - |

D: 11% – 89% de las cepas son positivas a producir pigmento.

+: 90% o más de las cepas son positivas a producir pigmento.

- : 90% o más de las cepas son negativas a producir pigmento.

2.2.10. Factores de crecimiento del azotobacter

- Oxígeno

El oxígeno, es el elemento químico que abunda en la corteza de la tierra y el tercer elemento en todo el universo, es importante para el metabolismo microbiano y a su vez es crucial debido a que el anhídrido carbónico es el producto metabólico resultante de mayor importancia. Cabe resaltar que no es un gas muy soluble ya que una solución saturada de oxígeno contiene aproximadamente 9 mg/L de oxígeno en agua. Debido a la influencia de los ingredientes del cultivo, el contenido máximo de oxígeno realmente es más bajo de lo que debería ser en agua. El suministro se logra pulverizando aire en el fermentador durante el proceso. Una vez disuelto el O₂ este tiene que transferirse desde la burbuja de gas a cada célula individual. (Andrade, 2009); (Carrillo, 2003).

- Temperatura

Los microorganismos que en su proceso de crecimiento presentan una temperatura inferior o baja provocan retardado en su crecimiento y por lo tanto reducida la producción celular, es decir afecta directamente a su productividad. Por otro lado, si la

temperatura es demasiado alta o superior, pero no mortífero, puede incitar a una respuesta de estrés al choque térmico debido al incremento en la temperatura, con la consiguiente producción de proteasas celulares que pueden ocasionar una disminución significativa en el rendimiento de los productos proteicos. (Andrade, 2009); (Carrillo, 2003).

- PH

La mayor parte de los microorganismos crecen óptimamente entre PH 5,5 y 8,5. Pero durante el crecimiento en un fermentador, los metabolitos celulares son liberados al medio, lo que puede originar un cambio en el PH del medio del cultivo. Por lo tanto se debe controlar el PH del medio del cultivo y añadir un ácido o una base cuando se necesite para mantener constante el PH. Por supuesto que esta adición del ácido o base debe ser mezclada rápidamente de tal manera que el PH del medio de cultivo sea el mismo en todo el fermentador. (Andrade, 2009); (Carrillo, 2003).

2.2.11. Clasificación Taxonómica del Rábano

Pertenece a la familia de las Brassicaceae que se cultiva por sus raíces comestibles. Una de las propiedades fundamentales de la hortaliza, reside en que contienen unos compuestos de azufre, considerados como potentes antioxidantes que ayudan a prevenir enfermedades, la cual tiene la siguiente clasificación taxonómica:

Dominio: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Brassicales

Familia: Brassicaceae

Género: *Raphanus*

Especie: *Raphanus sativus*

Linneo, (1753)

2.2.12. Rábano (*Raphanus sativus*)

Es una raíz carnosa y comestible de la familia Brassicaceae. El rábano tiene una raíz picante y dura al igual que el rabanito. Su ciclo vegetativo de crecimiento oscila entre 3 y 5 semanas después del sembrado.

Su raíz presenta un escaso desarrollo de la raíz (zona radicular), las raíces pueden alcanzar profundidades entre los 5 hasta 25 cm. Durante el desarrollo vegetativo, las raíces tuberosas se forman a partir de la parte superior de la raíz y del hipocótilo. Destacan por sus formas diversas (redondas, fusiformes, alargadas, ovaladas, cónicas) y variación de colores como amarillo, negro, rojo, etc.

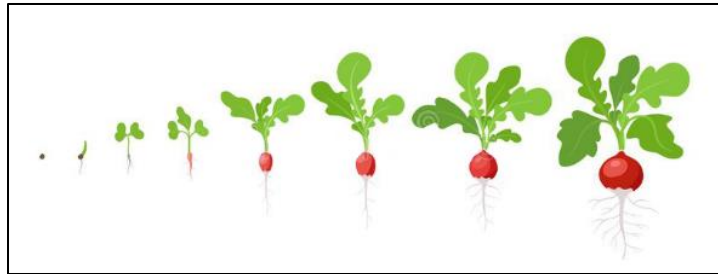


Figura 4. Ciclo de crecimiento del Rábano

Fuente: iStock

El rábano se caracteriza por tener propiedades como: ser un buen antioxidante natural, con el apoyo de su contenido de vitamina C, tener la capacidad de aumentar la flora intestinal, es ideal para personas con un intestino “vago”, ser rico en fibras, de manera que arrastra residuos intestinales, es un desinfectante y antiséptico, combate el frío y las enfermedades como; la gripe, tos constantes, catarros, infecciones urinarias, a su vez, estimula la digestión y cura las infecciones intestinales, ayuda en la insuficiencia de la vesícula biliar actúa depurativamente en las enfermedades de la piel, boca, y baja la fiebre, finalmente interviene en la formación de dientes, huesos, y glóbulos rojos.

Presenta cuatro subespecies: *Raphanus sativus* var. *Longipinnatus*, *R. sativus* var. *Mougri*, *R. sativus* var. *Niger* y *R. sativus* var. *Sativus*; y tres variedades: Rábano chino, japonés o daikon, Rábano negro o de invierno y Rabanitos.

2.2.13. Importancia de los Biofertilizantes

Los biofertilizantes se caracterizan por la presencia de grupos de bacterias o microorganismos vivos que aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo de las plantas, y que no afectan a la salud del hombre, animales o plantas. Es por ello, que pueden utilizarse tanto bacterias como hongos microscópicos, llamados micorrizicos, que se agrupan de forma natural en la rizósfera ubicada en las raíces de las plantas, mejorando el rendimiento en cuanto al crecimiento y la productividad de los cultivos. En su mayoría, los microorganismos contribuyen con en el proceso de crecimiento de las plantas y el rendimiento de los cultivos, pero, para ello es indispensable que los hongos y/o bacterias se encuentren con vida. Según la investigación de Crossman & Hill (1987), en las últimas décadas, las áreas de estudio que últimamente están impactando en la agricultura, es la aplicación de biofertilizantes haciendo énfasis en el empleo reciente de microorganismos como bacterias y hongos que viven en simbiosis con las plantas, lo cual ha resultado benéfico para fertilizar diversos cultivos y suelos.

Las bacterias promotoras del crecimiento de plantas, en las dos últimas décadas, han sido objeto de estudio con un alto grado de interés. En años recientes se ha despertado cierta controversia con este grupo, ya que no se sabe hasta qué punto se puede considerar a una rizobacteria como una bacteria promotora de crecimiento, por lo que se han establecido cuatro características generales que definen este grupo: a) Que no requieran de la invasión interna de tejidos en plantas, como ocurre en hongos micorrizicos con la formación de nódulos o arbusculos en el caso de *Rhizobium*; b) Que tengan una elevada densidad poblacional en la rizósfera después de su inoculación, ya que una población que declina rápidamente tiene una baja capacidad competitiva con la microflora nativa del suelo; c) Que presenten capacidad de colonización efectiva en la superficie de la raíz y como consecuencia puedan influir positivamente en el crecimiento de la planta y d) Que no produzcan daño en el hombre ni a otros microorganismos (Rueda-Puente y col., 2009).

2.3. Definición de términos

Aislamiento bacteriano

Es la separación de un determinado microorganismo del resto que le acompañan, técnicas usadas en el laboratorio de microbiología para la transferencia de un microorganismo de un ambiente a otro con la finalidad de inducir su crecimiento para su identificación. (Anónimo)

Agar-Agar

El agar, o agar -agar, es un polisacárido que se obtiene de algas del género Gelidium, algas que se han utilizado en la cocina tradicional japonesa, por sus propiedades gelificantes, desde hace muchos siglos. En los productos de laboratorio los agares son mezclados con enzimas, minerales, químicos, etc, que cambian su composición. (Lung-tung, 1997).

Agroquímico

Los agroquímicos o biocidas son sustancias químicas muy utilizadas especialmente en la agricultura como insecticidas, herbicidas o fertilizantes (Ortega, 2012).

Azotobacter

El Azotobacter es uno de los primeros géneros conocidos como fijadores asociativos de nitrógeno, siendo el más estudiado en el ámbito mundial a juicio de Martínez y Dibut (1996). Su nombre proviene de la palabra francesa “asoto” que significa nitrógeno y del griego “bacter” que significa bacilo (Hernández et al., 1994).

Bioestimulante

En bioestimulante de plantas es cualquier sustancia o microorganismo aplicado a las plantas con el objetivo de mejorar la eficiencia de la nutrición, la tolerancia al estrés abiótico y / o los rasgos de calidad del cultivo, independientemente de su contenido de nutrientes. Por extensión, los

bioestimulantes de plantas también designan productos comerciales que contienen mezclas de tales sustancias y / o microorganismos (Jardin, 2015).

Biomasa

El glosario de términos de la OCDE define la biomasa como “la cantidad de materia viva de origen vegetal o animal presente en un momento dado en un área determinada” (García, 2014).

Catalasa

Es un enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos. Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas. (Fernández, 2010).

Diazótrofos

Los microorganismos diazótrofos, organismos de vida libre capaces de fijar nitrógeno, descritos desde el siglo pasado, han sido objeto no solo de estudio en microbiología de suelos, sino también en el desarrollo de productos biológicos comerciales. (Jiménez, 2007).

Medio de Cultivo

En los medios de cultivo las bacterias se multiplican y es necesario esperar al menos 18-24 horas para visualizarlas. En términos generales todas las bacterias tienen unos requerimientos nutricionales imprescindibles para su crecimiento. (Fernández, 2010).

Pruebas Bioquímicas

Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias objeto de identificación. Algunas de estas pruebas son técnicas rápidas, ya que evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varía entre unos segundos hasta unas pocas horas. (Fernández, 2010).

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1. Tipo y diseño de la investigación

Tipo de investigación

El presente trabajo se enmarca una investigación de tipo descriptiva y experimental con la manipulación de la variable independiente en función a la dependientes, describiendo, analizando y comparando los resultados de la presente investigación para la determinación de la influencia de *Azotobacter Nativos* en cultivos de rábano.

Diseño de la investigación

El diseño de esta investigación se basará en el experimental apoyado en el laboratorio y en el campo, debido a que dicha investigación tiene que ser descrita y analizada en laboratorio y aplicada en campo para determinar la influencia del *Azotobacter* en su aplicación en cultivos de *Raphanus sativus*.

3.2. Población y/o muestra de estudio

La presente investigación se realizará en el Distrito de Pachía – Región de Tacna, y en área de estudio será extraída de la propiedad del Sr. Richard Ibarra. (Anexo 37)

19K Este 376665.15 m. Norte 8019828.27m. Altura: 1034 m.s.n.m.

Latitud:-17.898848 y Longitud:-70.16431874474392

3.3. Operacionalización de variables

Tabla 2. Operacionalización de Variables

| Variable | Dimensión | Sub-dimensión | Indicador |
|--------------------------------------|--|---|---|
| Influencia <i>Azotobacter ssp</i> | Estudio de cepas de <i>Azotobacter spp.</i> | Aislamiento de azotobacter | Medio de cultivo Ashby 1 (UFC/ml). |
| | | | Medio de cultivo Ashby 2 (UFC/ml). |
| | | Medio de cultivo <i>Azotobacter</i> (UFC/ml). Morfología de la cepa (quistes, Bacilar, alargada y redonda, etc) | |
| | Pruebas físicoquímicas - | Tinción gram | Lectura por espectrofotometría en una absorbancia de 530 nm |

| | | | |
|--|--|--|---|
| Producción de <i>Raphanus sativus</i> | Caracterización del <i>Azotobacter</i> ssp | Prueba de solubilización de fosfato tricálcico Efecto bacteriano en la germinación de semillas de <i>raphanus sativus</i> | Diámetro de las colonias y halos (cm/placa) Germinación mediante la incubación de semillas a 25°C por 48h. |
| | Producción en Biomasa | Producción en masa por medio de un biorreactor | Conteo de UFC/ml hasta llegar a un 10 ⁸ . |
| | Tiempo de germinación | Control | Crecimiento/mes |
| | | Semillas con tierra esterilizada | |
| | | Biofertilizante 10 ⁶ UFC/ml | |
| | Longitud de la planta | Biofertilizante 10 ⁷ UFC/ml | Cm de la planta/mes |
| | | Biofertilizante 10 ⁸ UFC/ml | |
| | | Urea | |
| | Longitud de la raíz | Control | Cm de la raíz/mes |
| | | Semillas con tierra esterilizada | |
| Biofertilizante 10 ⁶ UFC/ml | | | |
| Peso en fresco de toda la planta | Biofertilizante xx10 ⁷ UFC/ml | Gr de la planta/mes | |
| | Biofertilizante 10 ⁸ UFC/ml | | |
| | Urea | | |

Fuente: Elaboración Propia

3.4. Técnicas e instrumentos para la recolección de datos

Las actividades a realizar en la investigación serán efectuarán los siguientes pasos metodológicos:

a) Muestreo de Suelo.

Se tomarán diez muestras de suelo del Distrito de Pachía y del Cercado de Tacna a una profundidad aproximada entre los 10 y 15 cm (Martyniuk & Martyniuk 2003; Tejera et al., 2005), en forma de zig-zag se realizará el muestreo a lo largo del terreno. (Torres et al., 2000). Se empaquetarán las muestras en envases de plástico herméticos y posteriormente se transportará en un cooler a temperaturas óptimas.

b) Selección de Medios de Cultivo.

Se seleccionarán y se prepararán los siguientes medios de cultivo más óptimos para el aislamiento del género *Azotobacter*, Andrade M. José. (2009). **A)** Medio para *azotobacter* (g/100ml) (Composición química anexo 1); **B)** Agar Ashby 1 (g/100ml) (Composición química anexo 2); **C)** Agar Ashby 2 (g/100ml) (Composición química anexo 3). Estos medios de cultivo selectivo son óptimos para el género *Azotobacter* debido a que estos medios carecen de nitrógeno. Su beneficio es el crecimiento lento por ser un medio selectivo, es observable que entre los 3 - 5 días de realizar el implique un mayor gasto de energético menciona producción.

c) Aislamiento, sembrado y purificación

Se aislará los *Azotobacter* spp. obtenidos del muestreo para el aislamiento en los diferentes medios de cultivo, se aplicará el método de sembrado por agotamiento, de tal manera que al paso de las semanas las cepas se purificará en los medios de cultivo.

d) Tinción gram

Se realizará la tinción gram para visualidad la morfología del género *Azotobacter*, para esta actividad se utilizará el microscopio.

Procedimiento: Después del proceso de incubación de las colonias microbiana de *Azotobacter*, se someterán a la coloración Gram para observar las características microscópicas. Se aplicará la siguiente metodología: a) Prepara el frotis. b) Fijar a la llama. c) Colorear: colocando una gota suficiente del colorante cristal de violeta o violeta de genciana sobre la muestra dejándolo actuar por dos minutos. d) Lavar con agua destilada. e) Cubrir el portaobjetos con Lugol por un minuto. f) Decolorar: eliminar el Lugol y lavar la lámina con alcohol acetona hasta observar que ya no sale más colorante. g) Lavar la lámina con agua. h) Coloración de contraste: colocar unas gotas de safranina por dos minutos. i) Lavar la lámina y dejar secar; luego observar al microscopio con el objetivo 100X de inmersión de aceite.

De esta manera se visualizará las características morfológicas con ayuda del microscopio.

e) Conteo en la cámara de Neubauer

Se realizará el conteo en la cámara de Neubauer, cuadrante por cuadrante para determinar la Unidades Formadores de Colonias en cada cepa seleccionada para cada medio de cultivo trabajado.

Su altura deberá alcanzar 0,1 mm en la suspensión celular. Basado en estos datos, y considerando uno de los cuadrados grandes, por tanto, el volumen contenido en éste será de: $1 \times 1 \times 0,1 = 0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ ml}$, se deberá tener en cuenta que la cuadrícula de recuento está formada por nueve cuadrados grandes, y a su vez, cada uno de ellos con 1 mm^2 de superficie.

f) Pruebas fisicoquímicas – Caracterización del *Azotobacter*

- Cuantificación de la producción de AIA.

Se aplicará la metodología de Naik y Sakthivel (2006), empleando el reactivo de Salkowski, se tomará una colonia bacteriana y se sembrará en un medio enriquecido con triptófano al 1%, incubar a 28°C por 7 días. Luego se centrifugará por 15 min a 4000 rpm. Se tomando 1 ml del sobrenadante, se pasará a un tubo de ensayo y se agregará 1 ml del reactivo de Salkowsky.

Finalmente se incubará en total oscuridad a 25°C por 30 min., realizar la lectura por espectrofotometría en una absorbancia de 530 nm.

- Prueba de solubilización de fosfato tricálcico.

Se aplicará la metodología de Nautiyal (1999). Se reactivará a partir de un cultivo puro las bacterias aisladas siendo colocadas en tubos de ensayo con 10 ml de Caldo Trypticase de Soya, posteriormente se incubará por 48 horas a 28°C hasta conseguir una población microbiana aproximada de 10^8 UFC/ml, aplicando la cámara de Neubauer para el recuento. Finalmente se sembrará en cultivo bacteriano por triplicado una alícuota de 10 μ l en el Medio NBRIP (Medio National Botanical Research Institute's Phosphate) nutrido con fosfato tricálcico colocándolo en placas Petri e incubar por 15 días a 28°C, evaluando el diámetro de los halos y colonias.

- Efecto bacteriano en la germinación de semillas de *raphanus sativus*.

Se utilizará la metodología de Zúñiga (2012). Se reactivará las bacterias en cepas seleccionadas con 10 ml de MMSN, se sembrará cada cepa por triplicado, se incubará por 3 días a 28 °C. Luego, a través de la Cámara de Neubauer se realizará el recuento respectivo en UFC/ml y luego diluir hasta la obtención de 10 ml a dicha concentración. Se desinfectará las semillas de rábano, se enjuagará con agua destilada, alcohol al 70% por 3 min., lejía al 3% por 3 min. y finalmente para eliminar el exceso de lejía, se realizarán dos enjuagues con agua destilada. Se colocará las semillas a secar y embeberlas por 30 min., para el caso del control, embeber las semillas en 10 ml de MMSN, luego se colocarán 80 semillas en cada placa y agregar 10 ml de SSF en cada placa para mantener la humedad. Incubar por 48 horas a 25°C.

Obtener el valor central de los resultados independientemente para cada cepa, utilizando este valor para selección. Realizar una evaluación del efecto de la cepa de Azotobacter en la germinación mediante la prueba de Dunnett, mediante el software Statgrtaphics Centurion XV con un nivel de significancia del 0.05%.

- Crecimiento en el MMSN método turbidimétrico de Mc Farland (1907).

Se reactivarán las cepas de *Azotobacter* a partir de cultivos puros en tubos con 10 ml de MMSN por triplicado, se incubará por 72 horas a 28°C. Luego de la incubación se realizará la comparación de la turbidez presentada en cada tubo con los tubos de la escala turbidimétrica de Mc Farland.

- Producción en masa por medio de un biorreactor.

Se tomará la muestra puro de *azotobacter*, la cual con el asa de Drigalsky de extraerá la mayor cantidad de *azotobacter* y se colocará en una placa Petri con 200ml de Solución Salina a un 0.85% de concentración. Después tenemos que realizar el conteo por cuadrante en la cámara de Neubauer para determinar la cantidad de células de *azotobacter* hasta llegar a un 10⁸ UFC/ml. Luego dicha placa se pasará a un matraz el cual con dos ductos de aireación de material INOX ayudado con un motor de pecera para la aireación continua. Finalmente, se incubará en una incubadora casera a 28°C para su producción en biomasa.



Figura 5. Sistema de aireación a base de un matraz y un motor
Fuente: MYCAP® CCX.

- Aplicación en cultivos de *Raphanus sativus*

Se elaborarán biopreparados a diferentes concentraciones de bacteria de *Azotobacter* (10⁶ UFC/ml, 10⁷ UFC/ml y 10⁸ UFC/ml) en un medio de cultivo combinado con 500g de tierra esterilizada para cada cultivo de rábano

(*Raphanus sativus*). Se utilizará un diseño estadístico de experimentos con una variable respuesta y un factor a 3 niveles:

- T1, control; T2, semillas con tierra esterilizada; T3, semillas con bioinoculante de 10^6 UFC/ml; T4, semillas con bioinoculante de 10^7 UFC/ml; T5, semillas con bioinoculante de 10^8 UFC/ml; T6, semillas con urea.

Se evaluarán los siguientes indicadores:

- Tiempo de germinación, Longitud de la planta, Longitud de la raíz y Peso fresco de toda la planta.

3.4.1. Materiales e instrumentos

La presente investigación requirió de los siguientes reactivos, materiales y equipos.

Tabla 3. Materiales y/o instrumentos para la investigación

| Reactivos | Materiales | Equipos |
|---|-------------------------------|----------------------|
| • Manitol ($C_6H_{14}O_6$) | • Caja de guantes quirúrgicos | • Balanza analítica |
| • Sacarosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$) | • Caja de mascarilla | • Espectrofotómetro |
| • Fosfato monopotásico (KH_2PO_4) | • Algodón | • Cámara de Neubauer |
| • Fosfato dipotásico (K_2HPO_4) | • Alcohol al 96% | • Hornilla |
| • Sulfato de Magnesio Heptahidratado ($MgSO_4 + 7H_2O$) | • Frascos herméticos | • Microscopio |
| • Cloruro de Sodio ($NaCl$) | • Matraz 500 ml | • Incubadora |
| • Cloruro de Calcio ($CaCl_2$) | • Matraz 1000ml | • Autoclave |
| • Sulfato ferroso Heptahidratado ($FeCl_2 + 7H_2O$) | • Placas Petri descartables | • Refrigeradora |
| • Sulfato de Calcio ($CaSO_4$) | • Probeta | • Agitador |
| • Carbonato de Calcio ($CaCO_3$) | • Pipeta | |
| • Molibdato de sodio (Na_2MoO_4) | • Portaobjeto | |
| • Benzoato de sodio | • Cubreobjeto | |
| • Agar Powder | • Espátula | |
| • Agua destilada | • Mechero | |
| | • Vaso precipitado | |
| | • Asa de Kolle | |
| | • Piceta | |

Fuente: Elaboración propia.

3.5. Procesamiento y análisis de datos

Para la investigación se seleccionará la cepa de *Azotobacter* mediante la sumatoria de promedios ponderados de las pruebas a realizar. Se establecerá la ponderación de acuerdo al grado de importancia y se hallará el promedio máximo para cada prueba.

Luego, seleccionará 8 cepas para obtener las mayores sumatorias de promedios ponderados. (Clavijo, Claudia, 2012).

A su vez, en el presente trabajo, se utilizará el análisis de varianza (ANOVA) para comprobar la existencia o no de diferencias significativas entre conjuntos de datos, según Montgomery y Runger (1994).

Finalmente, se determinará la influencia de *Azotobacter* en cultivos de *Raphanus sativus*, mediante los paquetes estadísticos Minitab y Statgraphics Centurion XV; empleando un diseño de experimentos con una variable y un factor a 3 niveles en el mismo software; se considerará $P < 0,05$ como diferencias significativa y altamente significativa, respectivamente. También se aplicará la prueba de Dunnett confirmándose la significancia.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. PRUEBAS DE LABORATORIO

Proceso de Muestreo de Suelo

En la presente investigación se realizó el muestreo mediante la aplicación de dos metodologías (Martyniuk & Martyniuk 2003; Tejera et al., 2005 y Torres et al., 2000), que consistió en realizar un hoyo a una profundidad de 10 a 15 cm de profundidad en los cultivos de *Raphanus sativus* y luego se repitió el proceso en forma de zig-zag a lo largo del terreno, hasta conseguir 30 muestras para iniciar la investigación. (Anexo 37)

Se empacó las muestras en envases de plástico herméticas y posteriormente se transportó en un cooler a temperatura óptima.

Aislamiento, sembrado y purificación

Para el aislamiento de *Azotobacter* spp. se obtuvieron 8 cepas del muestreo del aislamiento en los diferentes medios de cultivo (Medio azotobacter, Ashby 1 y Ashby 2) (Anexo 1, Anexo 2 y Anexo 3), incubando a 23°C entre 5 a 10 días en una incubadora casera, partiendo de 30 muestras (Tabla 4), depurando las cepas para la selección final, aplicando el método de sembrado por agotamiento, en un periodo de 6 semanas. A su vez, se visualizaron las características macroscópicas de las cepas seleccionadas. (Tabla 5).

Tabla 4. Aislamiento de *Azotobacter* – Semana 01

| N° de orden | Cepa | Características Macroscópica | Observación |
|-------------|------------|---|-----------------------------|
| 1 | A1-M1-PA1 | Proliferación negra con hifas | Contaminado |
| 2 | A1-M2-PA1 | Colonia bacteriana color crema | Sospecha <i>Azotobacter</i> |
| 3 | A1-M3-PA1 | Colonia bacteriana color crema y amarilla | Sospecha <i>Azotobacter</i> |
| 4 | A1-M4-PA1 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Sospecha <i>Azotobacter</i> |
| 5 | A1-M5-PA1 | Colonia bacteriana color crema y verde brillante (fosforecente) | Sospecha <i>Azotobacter</i> |
| 6 | A1-M6-PA1 | Colonia bacteriana color crema | Sospecha <i>Azotobacter</i> |
| 7 | A1-M7-PA1 | Colonia bacteriana color crema | Sospecha <i>Azotobacter</i> |
| 8 | A1-M8-PA1 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Sospecha <i>Azotobacter</i> |
| 9 | A1-M9-PA1 | Proliferación negra con hifas | Contaminado |
| 10 | A1-M10-PA1 | Proliferación negra con hifas con puntos rojos | Contaminado |
| 11 | A1-M11-PA1 | Proliferación negra con hifas | Contaminado |
| 12 | A1-M12-PA1 | Colonia bacteriana color crema y verde brillante (fosforecente) | Sospecha <i>Azotobacter</i> |
| 13 | A1-M13-PA1 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Sospecha <i>Azotobacter</i> |
| 14 | A1-M14-PA1 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Sospecha <i>Azotobacter</i> |

| | | | |
|----|------------|--|-----------------------------|
| 15 | A1-M15-PA1 | Colonia bacteriana color blanco mucosa | Sospecha Azotobacter |
| 16 | A1-M16-PA1 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Sospecha Azotobacter |
| 17 | A1-M17-PA1 | Proliferación negra con hifas | Contaminado |
| 18 | A1-M18-PA1 | Proliferación negra con hifas | Contaminado |
| 19 | A1-M19-PA1 | Colonia bacteriana color crema y verde brillante (fosforescente) | Sospecha Azotobacter |
| 20 | A1-M20-PA1 | Colonia bacteriana color crema | Sospecha Azotobacter |
| 21 | A1-M21-PA1 | Colonia bacteriana color blanco mucosa | Sospecha Azotobacter |
| 22 | A1-M22-PA1 | Proliferación negra verdosa con hifas | Contaminado |
| 23 | A1-M23-PA1 | Colonia bacteriana color blanco mucosa | Sospecha Azotobacter |
| 24 | A1-M24-PA1 | Colonia bacteriana color crema | Sospecha Azotobacter |
| 25 | A1-M25-PA1 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Sospecha Azotobacter |
| 26 | A1-M26-PA1 | Colonia bacteriana color crema | Sospecha Azotobacter |
| 27 | A1-M27-PA1 | Proliferación verde con hifas | Contaminado |
| 28 | A1-M28-PA1 | Proliferación negra con hifas | Contaminado |
| 29 | A1-M29-PA1 | Colonia bacteriana color crema y amarilla | Sospecha Azotobacter |
| 30 | A1-M30-PA1 | Proliferación verde con hifas | Contaminado |

Fuente: Elaboración propia.

Luego de tener las 8 cepas seleccionadas se analizaron las características fisiológicas a través de la tinción gram, visualizando dichas características microscópicas en un microscopio a 100X. (Anexo 16 y Anexo 17). Comparando las características macroscópicas con las características microscópicas. (Tabla 6).

Tabla 5. Aislamiento de Azotobacter – Semana 06

| N° de orden | Cepa | Características Macroscópica | Observación |
|-------------|------------|--|--------------------|
| 1 | A1-M2-PA6 | Colonia bacteriana color crema | Azotobacter |
| 2 | A1-M12-PA6 | Colonia bacteriana color crema y verde brillante (fosforescente) | Azotobacter |
| 3 | A1-M13-PA6 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Azotobacter |
| 4 | A1-M15-PA6 | Colonia bacteriana color blanco mucosa | Azotobacter |
| 5 | A1-M16-PA6 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Azotobacter |
| 6 | A1-M19-PA6 | Colonia bacteriana color crema y verde brillante (fosforescente) | Azotobacter |
| 7 | A1-M20-PA6 | Colonia bacteriana color crema | Azotobacter |
| 8 | A1-M25-PA6 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Azotobacter |

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 6. Caracterización fisiológica de las 8 cepas aisladas de la rizósfera de Rábano en Pachía – Tacna.

| CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS | CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS | | | | | | | Total de Cepas |
|-------------------------------|-------------------------------|---|---|---|---|---|---|----------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
| 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 8 |

Fuente: Elaboración propia.

Características microscópicas: 1: Bacilo largo y ovoide, 2: Cocobacilos, 3: Bacilos, 4: Bacilos pequeños, 5: Cocoides, 6: Bacilos grandes, 7: Bacilos ovoide con quiste.

Características macroscópicas: 1: Circular, lisa, crema brillante; 2: Circular, regular, elevada, transparente brillante; 3: Ovalada, irregular, elevada, lisa, crema humo; 4: Circular, regular, elevada, lisa, verde fosforescente; 5: Circular, regular, elevada, lisa, marrón; 6: Circular, regular, elevada, lisa, transparente brillante, con halo; 7: Circular, regular, elevada, lisa, marrón, colonias con halo.

Pruebas fisicoquímicas – Caracterización del Azotobacter

- Cuantificación de la producción de AIA.

De las 8 cepas aisladas el 100% no produjo (ácido indolacético) AIA, dando como resultado que las cepas de Azotobacter no produjeron esta hormona. (Tabla 8).

- Solubilización de fosfato tricálcico.

De las 8 cepas un 100% no solubilizó fosfato tricálcico, no presentaron halos alrededor de las cepas seleccionadas. (Tabla 8).

- Efecto bacteriano en la germinación de semillas de *Raphanus sativus*.

Respecto a las 80 semillas inoculadas con las 8 cepas aisladas, de acuerdo a la prueba de Dunnett se observó que 36 (45%) presentaron un incremento significativo en función a la germinación, incrementando hasta en un 125% (cepa A1-M19-PA5) con respecto al control; seguidamente de la cepa A1-M12-PA5 con 116%. También un total de 44 cepas de bacterias (55%) no se registró ningún efecto significativo con respecto al control (Tabla 9).

- Crecimiento en el MMSN método turbidimétrico de Mc Farland (1907).

Basado a las 8 cepas sometidas al MMSN, en 72 horas a 28°C, se realizó la comparación de la turbidez de cada tubo en la escala turbidimétrica de Mc Farland, presentando que 75% de las cepas obtuvieron un valor de 3 en la escala turbidimétrica de Mc Farland y un 25%, el valor de 2 en la escala turbidimétrica de Mc Farland.

Tabla 7. Valores en la escala turbidimétrica de Mc Farland

| ESCALA TURBIDIMÉTRICA DE MC FARLAND | |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| 0 | <1.5 x 10 ⁸ UFC/ml |
| 1 | 1.5 x 10 ⁸ UFC/ml |
| 2 | 3 x 10 ⁸ UFC/ml |
| 3 | 6 x 10 ⁸ UFC/ml |

Fuente: Elaboración Propia.

Tabla 8. Selección de 8 cepas mediante la valoración de las características fenotípicas, bioquímicas y fisiológicas usando el análisis de ponderados.

| N° de orden | Cepa | Género/es especie | Características Macroscópicas | Características Microscópicas | AIA (ug/ml) | ASP (cm ²) | Crecimiento en MMSN | % de Germinación | Ponderado % |
|-------------|------------|------------------------|--|--|-------------|------------------------|---------------------|------------------|-------------|
| 1 | A1-M2-PA5 | Azotobacter spp | Colonia bacteriana color crema | Gram negativo, bacilo largo ovoide | 0 | 0 | 2 | 35.14 | 43.43 |
| 2 | A1-M12-PA5 | Azotobacter vinelandii | Colonia bacteriana color crema y verde brillante (fosforescente) | Gram negativo, bacilo largo ovoide | 0 | 0 | 3 | 43.21 | 58.81 |
| 3 | A1-M13-PA5 | Azotobacter nigricans | Colonia bacteriana color crema y marrón | Gram negativo, bacilo largo ovoide | 0 | 0 | 3 | 40.12 | 56.75 |
| 4 | A1-M15-PA5 | Azotobacter spp | Colonia bacteriana color blanco mucosa | Gram negativo, bacilo largo ovoide pequeño | 0 | 0 | 2 | 32.81 | 41.87 |
| 5 | A1-M16-PA5 | Azotobacter nigricans | Colonia bacteriana color crema y marrón | Gram negativo, bacilo ovoide con quistes | 0 | 0 | 3 | 39.33 | 56.22 |
| 6 | A1-M19-PA5 | Azotobacter vinelandii | Colonia bacteriana color crema y verde brillante (fosforescente) | Gram negativo, bacilo largo ovoide | 0 | 0 | 3 | 44.6 | 59.73 |
| 7 | A1-M20-PA5 | Azotobacter spp | Colonia bacteriana color crema | Gram negativo, bacilo largo ovoide | 0 | 0 | 2 | 36.05 | 44.03 |
| 8 | A1-M25-PA5 | Azotobacter nigricans | Colonia bacteriana color crema y marrón | Gram negativo, bacilo largo ovoide | 0 | 0 | 3 | 30.19 | 50.13 |

*Crecimiento en el MMSN durante 48h a 28°C. Equivalencia a la Escala Turbidimétrica de Mc Farland.

| Pruebas de selección | Promedio máximo (M) | Ponderación (Pi) |
|---------------------------|----------------------|------------------|
| Producción de AIA | 0.00 ug/ml | 15% |
| Solubilización de fosfato | 0.00 cm ² | 25% |
| Porcentaje de Germinación | 45% | 30% |
| Biomasa Bacteriana | 3 | 30% |

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 9. Efecto de la inoculación de azotobacter nativos en el porcentaje de germinación de rábano (*Raphanus sativus*) a las 48 h de germinación.

| N° | Código | G (%) | I (%) | Sig. |
|----|------------|-------|-------|------|
| 1 | A1-M2-PA5 | 35 | / | ** |
| 2 | A1-M12-PA5 | 43 | 116 | * |
| 3 | A1-M13-PA5 | 40 | 98 | * |
| 4 | A1-M15-PA5 | 32 | / | ** |
| 5 | A1-M16-PA5 | 39 | 96 | * |
| 6 | A1-M19-PA5 | 44 | 125 | * |
| 7 | A1-M20-PA5 | 36 | / | ** |
| 8 | A1-M25-PA5 | 30 | 49 | * |

Fuente: Elaboración propia.

- (1) Se realizó la prueba estadística de Dunnett a nivel de confianza al 95% con un nivel de significación $\alpha = 0.05$, donde se comparó las medias de cada tratamiento con respecto al control sin inocular a: Valor central I: Porcentaje del incremento de la germinación con relación al control.

* Bacterias que incrementan significativamente el porcentaje de germinación con respecto al control.

** No presentan diferencias significativas en el porcentaje de germinación con respecto al control.

*** Disminuyen significativamente el porcentaje de germinación con respecto al control.

Finalmente se realizó el conteo en la Cámara de Neubauer, cuadrante por cuadrante para determinar las Unidades Formadores por mililitro (UFC/ml), previamente se ejecutó el funcionamiento del biorreactor a base un matraz, un motor de pecera, dos ductos de aireación y un medio acuoso rico en nutrientes provenientes del Medio de Cultivo Ashby 1 (Anexo 19), a 28°C por 72 horas (Figura 5), hasta obtener: 3×10^6 UFC/ml, 7×10^7 UFC/ml y 4×10^8 UFC/ml (A3-M19-PA5) y $1,1 \times 10^6$ UFC/ml, 3×10^7 UFC/ml y 6×10^8 UFC/ml (A3-M12-PA5).

4.2. PRUEBAS DE CAMPO

Basado en el proceso de germinación, se pasó a plantar las semillas de Rábano, en las coordinadas zonas 19K Este 376665.15 Norte 8019828.27, en la propiedad del Sr. Ibarra. Se plantó las semillas de rábano por 3 repeticiones por los 6 tratamientos.

Se aplicó una distribución de 50 centímetros por 30 centímetros de distancia entre cada cultivo de rábano en un área de 3 m² por cepa para cada tratamiento por triplicado (Figura 6), aplicando el bioinoculante y la urea solamente una vez como fertilizante. Tener en cuenta que se mantuvo el control (agua) en todos los tratamientos, dos veces por semana por 8 semanas.

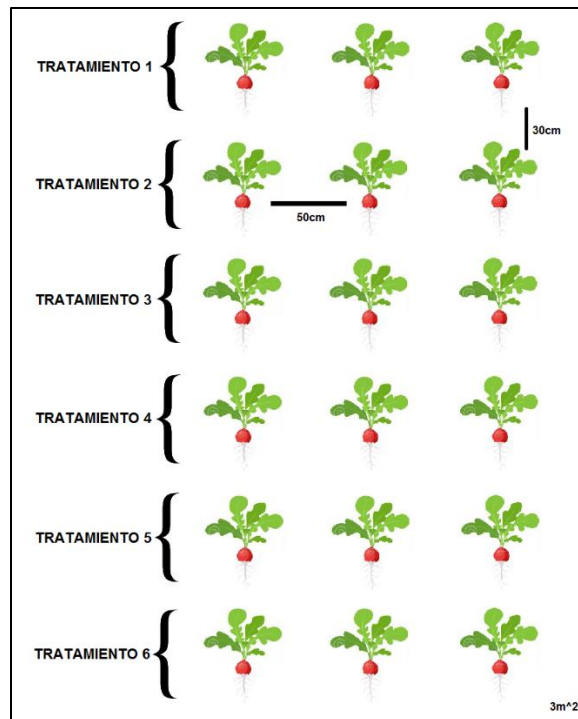


Figura 6. Distribución de cultivos de rábano en campo.
Fuente: Elaboración Propia

Se tuvieron en cuenta 4 indicadores:

- Tiempo de Germinación (TG)
- Longitud de la Planta (LP)
- Longitud de la Raíz (LR)
- Peso en Fresco (PF)

Luego de las 8 semanas se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 10. Resultados de los 6 Tratamientos en cultivos de Rábano (*Raphanus sativus*) de la cepa: A1-M12-PA6. Semana 8

| CEPA: A1-M12-PA6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|-------------------------|---------------|--------|---------|---------|---------------------|--------|---------|---------|---|--------|---------|---------|---|--------|---------|---------|---|---------|---------|---------|---------------|---------|---------|---------|
| N° | Cultivo/Tramiento | Tratamiento 1 | | | | Tratamiento 2 | | | | Tratamiento 3 | | | | Tratamiento 4 | | | | Tratamiento 5 | | | | Tratamiento 6 | | | |
| | | Control | | | | Tierra esterilizada | | | | Bioinoculante de 10 ⁶ UFC/ml | | | | Bioinoculante de 10 ⁷ UFC/ml | | | | Bioinoculante de 10 ⁸ UFC/ml | | | | Urea | | | |
| | | T.G. | L.P. | L.R. | P.F. | T.G. | L.P. | L.R. | P.F. | T.G. | L.P. | L.R. | P.F. | T.G. | L.P. | L.R. | P.F. | T.G. | L.P. | L.R. | P.F. | T.G. | L.P. | L.R. | P.F. |
| 1 | <i>Raphanus sativus</i> | 6 días | 7,1 cm | 14,6 cm | 25,7 gr | N G | NG | NG | NG | 5 días | 7,2 cm | 14,7 cm | 26,8 gr | 5 días | 6,8 cm | 13,8 cm | 24,4 gr | 5 días | 9,2 cm | 11,9 cm | 29,4 gr | 4 días | 11,5 cm | 9,9 cm | 36,7 gr |
| 2 | <i>Raphanus sativus</i> | 6 días | 6,3 cm | 14,3 cm | 24,1 gr | 6 días | 5,2 cm | 11,8 cm | 19,9 gr | 5 días | 6,8 cm | 13,3 cm | 23,8 gr | 6 días | 5,9 cm | 13,0 cm | 22,0 gr | 4 días | 10,3 cm | 13,4 cm | 35,3 gr | 4 días | 13,0 cm | 14,5 cm | 46,2 gr |
| 3 | <i>Raphanus sativus</i> | 6 días | 5,6 cm | 13,8 cm | 21,9 gr | 7 días | 4,9 cm | 9,8 cm | 18,3 gr | 7 días | 6,4 cm | 12,8 cm | 20,3 gr | 5 días | 7,3 cm | 12,5 cm | 27,7 gr | 4 días | 8,7 cm | 12,4 cm | 30,7 gr | 5 días | 10,4 cm | 10,9 cm | 37,7 gr |

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 11. Resultados de los 6 Tratamientos en cultivos de Rábano (*Raphanus sativus*) de la cepa: A1-M19-PA6. Semana 8

| CEPA: A1-M19-PA6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|-------------------------|---------------|--------|---------|---------|---------------------|--------|---------|---------|---|--------|---------|---------|---|--------|---------|---------|---|---------|---------|---------|---------------|---------|---------|---------|
| N° | Cultivo/Tramiento | Tratamiento 1 | | | | Tratamiento 2 | | | | Tratamiento 3 | | | | Tratamiento 4 | | | | Tratamiento 5 | | | | Tratamiento 6 | | | |
| | | Control | | | | Tierra esterilizada | | | | Bioinoculante de 10 ⁶ UFC/ml | | | | Bioinoculante de 10 ⁷ UFC/ml | | | | Bioinoculante de 10 ⁸ UFC/ml | | | | Urea | | | |
| | | T.G. | L.P. | L.R. | P.F. | T.G. | L.P. | L.R. | P.F. | T.G. | L.P. | L.R. | P.F. | T.G. | L.P. | L.R. | P.F. | T.G. | L.P. | L.R. | P.F. | T.G. | L.P. | L.R. | P.F. |
| 1 | <i>Raphanus sativus</i> | 7 días | 4,9 cm | 12,3 cm | 18,9 gr | N G | NG | NG | NG | 5 días | 5,7 cm | 11,3 cm | 19,9 gr | 4 días | 7,0 cm | 14,2 cm | 26,5 gr | 5 días | 9,6 cm | 12,8 cm | 32,7 gr | 3 días | 12,2 cm | 13,2 cm | 42,8 gr |
| 2 | <i>Raphanus sativus</i> | 6 días | 7,1 cm | 15,8 cm | 25,1 gr | N G | NG | NG | NG | 6 días | 6,3 cm | 13,8 cm | 22,1 gr | 4 días | 6,2 cm | 12,9 cm | 23,9 gr | 4 días | 11,4 cm | 15,1 cm | 41,8 gr | 3 días | 11,1 cm | 12,8 cm | 40,1 gr |
| 3 | <i>Raphanus sativus</i> | 6 días | 6,0 cm | 12,9 cm | 22,3 gr | 8 días | 3,9 cm | 10,2 cm | 15,2 gr | 6 días | 6,1 cm | 12,3 cm | 21,2 gr | 6 días | 8,2 cm | 13,3 cm | 30,1 gr | 4 días | 9,9 cm | 13,6 cm | 36,6 gr | 4 días | 13,7 cm | 15,4 cm | 48,9 gr |

Fuente: Elaboración Propia

| | | | | | | | | | |
|----|------------|----|-----------------------|----|-----------------------|----|---------------------|----|-------------|
| NG | No germinó | TG | Tiempo de Germinación | LP | Longitud de la Planta | LR | Longitud de la Raíz | PF | Peso Fresco |
|----|------------|----|-----------------------|----|-----------------------|----|---------------------|----|-------------|

4.3. DESARROLLO ESTADISTICO DE LA INVESTIGACION

Se consideró un diseño de experimentos con una variable respuesta y un factor a 3 niveles.

Además, hay que suponer que para el primer nivel se han obtenido n observaciones de la variable respuesta. Tal y como se muestra en los siguientes cuadros:

PARA LA CEPA M12 CON LOS FATORES:

Tabla 12. Resultados de los Tratamientos en cultivos de Rábano de la cepa: A1-M12-PA6 en base al factor Tiempo de Germinación.

| <i>Tratamientos</i> | <i>Tiempo de germinación</i> | | |
|--|------------------------------|---|---|
| <i>Control</i> | 6 | 6 | 6 |
| <i>Bioinoculante de 10⁸</i> | 5 | 4 | 4 |
| <i>Urea</i> | 4 | 4 | 5 |

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 13. Resultados de los Tratamientos en cultivos de Rábano de la cepa: A1-M12-PA6 en base al factor Longitud de la Planta.

| <i>Tratamientos</i> | <i>Longitud de la planta</i> | | |
|--|------------------------------|------|------|
| <i>Control</i> | 7,1 | 6,3 | 5,6 |
| <i>Bioinoculante de 10⁸</i> | 9,2 | 10,3 | 8,7 |
| <i>Urea</i> | 11,5 | 13 | 10,4 |

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 14. Resultados de los Tratamientos en cultivos de Rábano de la cepa: A1-M12-PA6 en base al factor Longitud de la Raíz.

| <i>Tratamientos</i> | <i>Longitud de la raíz</i> | | |
|--|----------------------------|------|------|
| <i>Control</i> | 14,6 | 14,3 | 13,8 |
| <i>Bioinoculante de 10⁸</i> | 11,9 | 13,4 | 12,4 |
| <i>Urea</i> | 9,9 | 14,5 | 10,9 |

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 15. Resultados de los Tratamientos en cultivos de Rábano de la cepa: A1-M12-PA6 en base al factor Peso en Fresco.

| <i>Tratamientos</i> | <i>Peso Fresco</i> | | |
|--|--------------------|------|------|
| <i>Control</i> | 25,7 | 24,1 | 21,9 |
| <i>Bioinoculante de 10⁸</i> | 29,4 | 35,3 | 30,7 |
| <i>Urea</i> | 36,7 | 46,2 | 37,7 |

Fuente: Elaboración Propia

PARA LA CEPA M19 CON LOS FATORES:

Tabla 16. Resultados de los Tratamientos en cultivos de Rábano de la cepa: A1-M19-PA6 en base al factor Tiempo de Germinación.

| <i>Tratamientos</i> | <i>Tiempo de germinación</i> | | |
|--|------------------------------|---|---|
| <i>Control</i> | 7 | 6 | 6 |
| <i>Bioinoculante de 10⁸</i> | 5 | 4 | 4 |
| <i>Urea</i> | 3 | 3 | 4 |

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 17. Resultados de los Tratamientos en cultivos de Rábano de la cepa: A1-M19-PA6 en base al factor Longitud de la Planta.

| <i>Tratamientos</i> | <i>Longitud de la planta</i> | | |
|--|------------------------------|------|------|
| <i>Control</i> | 4,9 | 7,1 | 6 |
| <i>Bioinoculante de 10⁸</i> | 9,6 | 11,4 | 9,9 |
| <i>Urea</i> | 12,2 | 11,1 | 13,7 |

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 18. Resultados de los Tratamientos en cultivos de Rábano de la cepa: A1-M19-PA6 en base al factor Longitud de la Raíz.

| <i>Tratamientos</i> | <i>Longitud de la raíz</i> | | |
|--|----------------------------|------|------|
| <i>Control</i> | 12,3 | 15,8 | 12,9 |
| <i>Bioinoculante de 10⁸</i> | 12,8 | 15,1 | 13,5 |
| <i>Urea</i> | 13,2 | 12,8 | 15,4 |

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 19. Resultados de los Tratamientos en cultivos de Rábano de la cepa: A1-M19-PA6 en base al factor Peso en Fresco.

| <i>Tratamientos</i> | <i>Peso Fresco</i> | | |
|--|--------------------|------|------|
| <i>Control</i> | 18,9 | 25,1 | 22,3 |
| <i>Bioinoculante de 10⁸</i> | 32,7 | 41,8 | 36,6 |
| <i>Urea</i> | 42,8 | 40,1 | 48,9 |

Fuente: Elaboración Propia

Se desea conocer qué tipo de tratamiento es mejor en cada variable de nuestras dos Cepas elegidas (CEPA M12 y CEPA M19) en el estudio. Además, se quiere descubrir si los tratamientos Bioinoculante de 10⁸ y Urea son mejores que el tratamiento control. En caso afirmativo se establecerá cual o cuales usar para determinar de la influencia de Azotobacter nativos en cultivos.

Se usará el método estadístico ANOVA, se conoce como Análisis de la Varianza, para la obtención del p-valor y ver si las medias de cada variable son iguales o difieren. Una vez construido el ANOVA y haber rechazado la Hipótesis Nula (H_0), es decir, hacer concluido que el factor influye en la variable respuesta, o lo que es lo mismo, que existen por lo menos un par de medias distintas, el próximo paso será determinar cuáles pares de media son distintos y proceder a dar alguna recomendación.

Como es habitual, la hipótesis nula no diferencia entre medias, se rechaza si y solo si el intervalo de confianza no contiene el cero.

La selección del método adecuado de comparación múltiple depende de la inferencia que usted desee. Pues, permiten examinar cuáles medias son diferentes y estimar el grado de diferencia. Así también, evaluar la significancia estadística de las diferencias entre las medias usando un conjunto de intervalos de confianza, un conjunto de pruebas de hipótesis o ambos.

Para la elección de una prueba utilizaremos la tabla siguiente:

Tabla 20. Características y ventajas de cada método aplicado.

| Método | Datos Normales | Fuerza | Comparación con un control | Comparación en parejas |
|--------------------------|----------------|---|----------------------------|------------------------|
| <i>Tukey</i> | SÍ | La prueba más potente cuando se realizan comparaciones en parejas únicamente. | No | SÍ |
| <i>Dunnett</i> | SÍ | La prueba más potente cuando se compara con un control. | SÍ | No |
| <i>Método MCB de Hsu</i> | SÍ | La prueba más potente cuando usted compara el grupo que representa la media más alta o más baja con los otros grupos. | No | SÍ |
| <i>Gamer-Howell</i> | SÍ | Se utiliza cuando no se parte del supuesto de que las varianzas son iguales. | No | SÍ |

Fuente: <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/anova/supporting-topics/multiple-comparisons/using-multiple-comparisons-to-assess-differences-in-means/>

Dado lo explicado, procederemos a escoger la prueba Dunnett; ya que, se utiliza cuando se quiere comparar la media del grupo de control con la media de los grupos tratamientos. Se utiliza una única diferencia crítica para realizar las comparaciones múltiples y no requiere que la prueba F del análisis de varianza sea significativa para aplicarla.

PARA LA CEPA M12:

1. Tiempo de Germinación:

$$H_0: \mu_{control} = \mu_{bioinoc 10^8} = \mu_{urea}$$

$$H_1: \text{Al menos un } \mu_i \neq \mu_j ; \text{ para } i, j = \text{control, bioinoc } 10^8, \text{urea}$$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Tabla 21. Análisis de varianza para el tiempo de germinación. –
Cepa M12.

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|-----------|------------------|------------------|----------------|----------------|
| Tratamiento | 2 | 5.556 | 2.7778 | 12.50 | 0.007 |
| Error | 6 | 1.333 | 0.2222 | | |
| Total | 8 | 6.889 | | | |

Fuente: Elaboración Propia.

Con un nivel de significancia de 0.05, se concluye que el tiempo de germinación promedio de la planta mediante los tres tratamientos es diferente ($p_{valor}=0.007$).

Tabla 22. Comparaciones múltiples de Dunnett con un control. –
Tiempo de Germinación – Cepa M12.

| Tratamiento | N | Media | Agrupación |
|--|----------|--------------|-------------------|
| Control (control) | 3 | 6.000 | A |
| Bioinoculante de 10⁸ | 3 | 4.333 | |
| Urea | 3 | 4.333 | |

Fuente: Elaboración Propia.

Nivel de confianza de 95%. Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.

Del resultado anterior, se observa que el tiempo de germinación promedio de la planta al aplicar el tratamiento control es diferente que cuando se aplica urea o bioinoculante 10^8 .

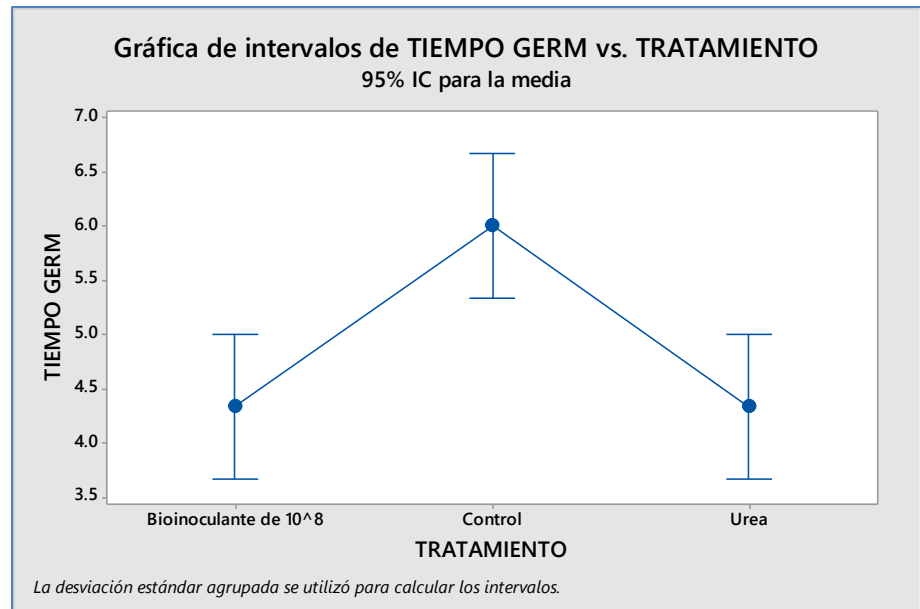


Gráfico 01. Intervalos de Tiempo de Germinación VS. Tratamiento 1, 5 y 6. Fuente: Elaboración Propia. – Cepa M12.

2. Longitud de la Planta:

$$H_0: \mu_{control} = \mu_{bioinoc\ 10^8} = \mu_{urea}$$

$$H_1: \text{Al menos un } \mu_i \neq \mu_j; \text{ para } i, j = \text{control, bioinoc } 10^8, \text{ urea}$$

Tabla 23. Análisis de varianza para la longitud de la Planta. – Cepa M12.

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|-----------|------------------|------------------|----------------|----------------|
| Tratamiento | 2 | 42.482 | 21.2411 | 21.70 | 0.002 |
| Error | 6 | 5.873 | 0.9789 | | |
| Total | 8 | 48.356 | | | |

Fuente: Elaboración Propia.

Con un nivel de significancia de 0.05, se concluye que la longitud promedio de la planta mediante los tres tratamientos es diferente ($p_valor=0.002$).

Tabla 24. Comparaciones múltiples de Dunnet con un control. – Longitud de la Planta. – Cepa M12.

| <i>Tratamiento</i> | <i>N</i> | <i>Media</i> | <i>Agrupación</i> |
|--|----------|--------------|-------------------|
| Control (control) | 3 | 6.333 | A |
| Bioinoculante de 10⁸ | 3 | 11.633 | |
| Urea | 3 | 9.400 | |

Fuente: Elaboración Propia.

Nivel de confianza de 95%. Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.

Se observa que la longitud promedio de la planta es diferente cuando se aplica urea o bioinoculante 10⁸ y cuando se aplica el tratamiento control.

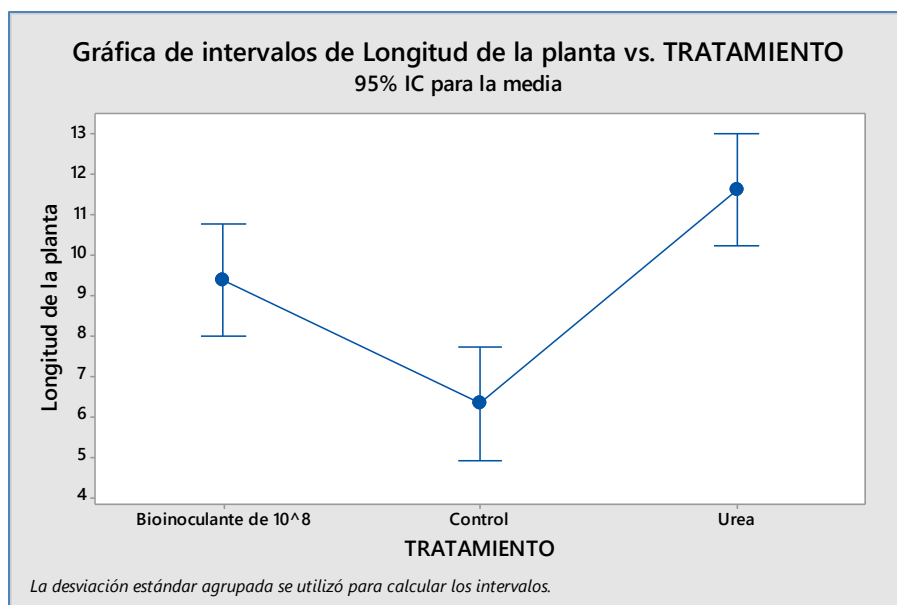


Gráfico 02. Intervalos de Longitud de la Planta VS. Tratamiento 1, 5 y 6. Fuente: Elaboración Propia. – Cepa M12.

En el gráfico anterior, se puede observar que la longitud promedio de la planta es mayor cuando se aplica urea en comparación a la aplicación de bioinoculante o tratamiento control.

3. Longitud de la raíz:

$$H_0: \mu_{control} = \mu_{bioinoc\ 10^8} = \mu_{urea}$$

$$H_1: \text{Al menos un } \mu_i \neq \mu_j ; \text{ para } i, j = \text{control, bioinoc } 10^8, \text{urea}$$

Tabla 25. Análisis de varianza para la longitud de la raíz de la planta. – Cepa M12.

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|-----------|------------------|------------------|----------------|----------------|
| Tratamiento | 2 | 9.502 | 4.751 | 2.16 | 0.197 |
| Error | 6 | 13.200 | 2.200 | | |
| Total | 8 | 22.702 | | | |

Fuente: Elaboración Propia.

Con un nivel de significancia de 0.05, se concluye que la longitud promedio de la raíz de la planta mediante los tres tratamientos es igual ($p_{valor}=0.197$).

Tabla 26. Comparaciones múltiples de Dunnet con un control. – Longitud de la Raíz. – Cepa M12.

| Tratamiento | N | Media | Agrupación |
|--|----------|--------------|-------------------|
| Control (control) | 3 | 14.233 | A |
| Bioinoculante de 10⁸ | 3 | 12.567 | |
| Urea | 3 | 11.77 | |

Fuente: Elaboración Propia.

Nivel de confianza de 95%. Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.

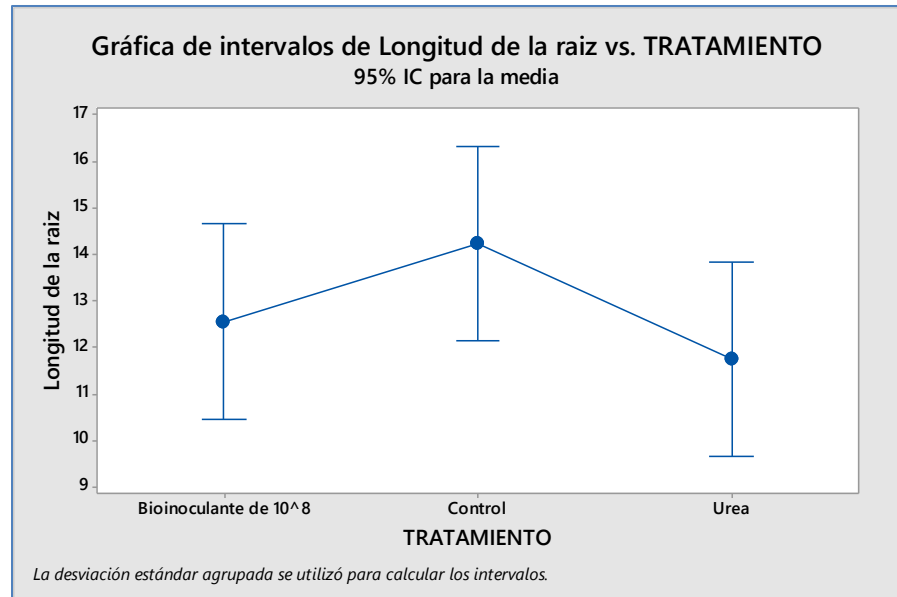


Gráfico 03. Intervalos de Longitud de la Raíz VS. Tratamiento 1, 5 y 6. Fuente: Elaboración Propia. – Cepa M12.

4. Peso fresco:

$$H_0: \mu_{control} = \mu_{bioinoc\ 10^8} = \mu_{urea}$$

$$H_1: \text{Al menos un } \mu_i \neq \mu_j; \text{ para } i, j = \text{control, bioinoc } 10^8, \text{ urea}$$

Tabla 27. Análisis de varianza para el peso en fresco de la planta. – Cepa M12.

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|-----------|------------------|------------------|----------------|----------------|
| Tratamiento | 2 | 398.66 | 199.33 | 14.77 | 0.005 |
| Error | 6 | 81.00 | 13.50 | | |
| Total | 8 | 479.66 | | | |

Fuente: Elaboración Propia.

Con un nivel de significancia de 0.05, se concluye que el peso fresco de la planta mediante los tres tratamientos es diferente (p_valor=0.005).

Tabla 28. Comparaciones múltiples de Dunnet con un control. –
Peso en Fresco. – Cepa M12.

| <i>Tratamiento</i> | <i>N</i> | <i>Media</i> | <i>Agrupación</i> |
|--|----------|--------------|-------------------|
| Control (control) | 3 | 23.90 | A |
| Bioinoculante de 10⁸ | 3 | 40.20 | |
| Urea | 3 | 31.80 | |

Fuente: Elaboración Propia.

Nivel de confianza de 95%. Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.

Aquí se observa que el peso fresco promedio de la planta al aplicarle urea es diferente a comparación de la aplicación del tratamiento control y del bioinoculante 10⁸.

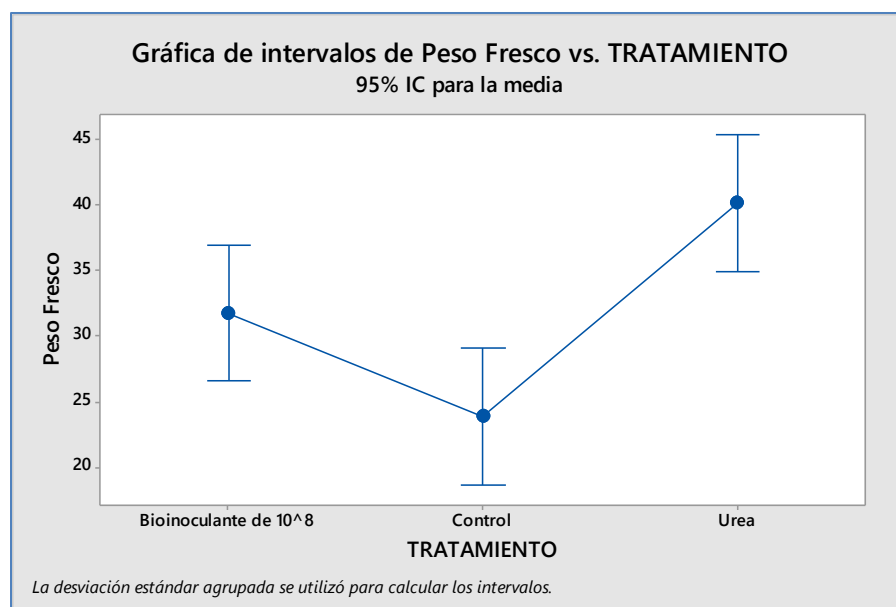


Gráfico 04. Intervalos de Peso en Fresco VS. Tratamiento 1, 5 y 6.

Fuente: Elaboración Propia. – Cepa M12.

En el gráfico anterior, se puede observar que el peso fresco promedio de la planta es mayor cuando se le aplica urea en comparación con el tratamiento control.

PARA LA CEPA M19:**1. Tiempo de Germinación:**

$$H_0: \mu_{control} = \mu_{bioinoc\ 10^8} = \mu_{urea}$$

$$H_1: \text{Al menos un } \mu_i \neq \mu_j; \text{ para } i, j = \text{control, bioinoc } 10^8, \text{urea}$$

Tabla 29. Análisis de varianza para el tiempo de germinación de la planta. – Cepa M19.

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|-----------|------------------|------------------|----------------|----------------|
| Tratamiento | 2 | 14,000 | 7,0000 | 21,00 | 0,002 |
| Error | 6 | 2,000 | 0,3333 | | |
| Total | 8 | 16,000 | | | |

Fuente: Elaboración Propia.

Se rechaza la hipótesis nula (H0) si el p-valor es menor a 0.05. Como el p-valor < 0.05, las diferencias se declaran estadísticamente significativas; es decir, existen por lo menos un par de medias distintas.

Con un nivel de significancia de 0.05, se concluye que el tipo de germinación de la planta mediante los tres tratamientos es diferente (p_valor=0,002).

Tabla 30. Comparaciones múltiples de Dunnet con un control. – Tiempo de Germinación. – Cepa M19.

| Tratamiento | N | Media | Agrupación |
|--|----------|--------------|-------------------|
| Control (control) | 3 | 6,333 | A |
| Bioinoculante de 10⁸ | 3 | 4,333 | |
| Urea | 3 | 3,333 | |

Fuente: Elaboración Propia.

Nivel de confianza de 95%. Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.

Del resultado anterior, se observa que el tiempo de germinación promedio de la planta al aplicar el tratamiento control es diferente que cuando se aplica urea o bioinoculante 10^8 .

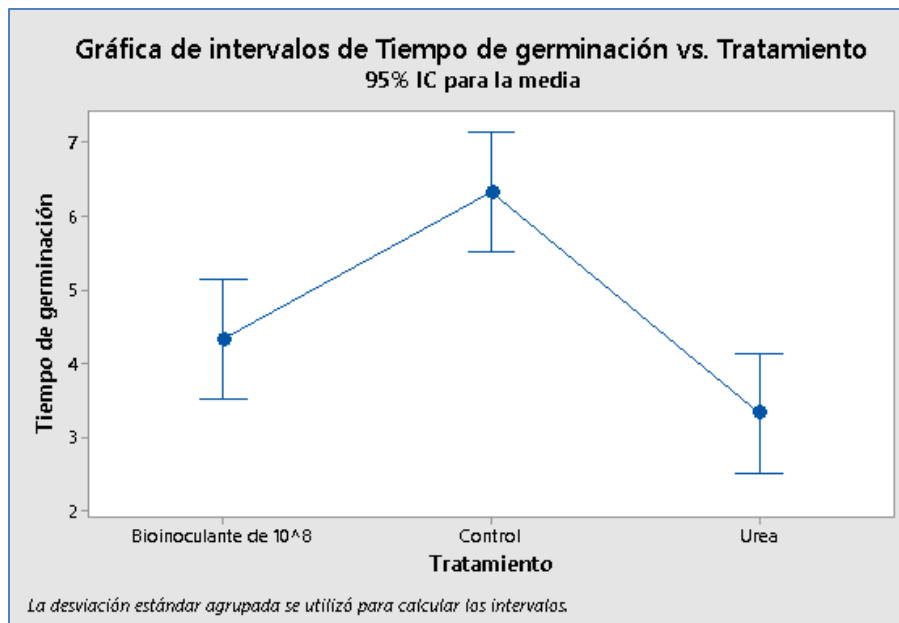


Gráfico 05. Intervalos de Tiempo de Germinación VS. Tratamiento 1, 5 y 6. Fuente: Elaboración Propia. – Cepa M19.

En el gráfico anterior, se puede apreciar que, al aplicar urea o bioinoculante 10^8 se tiene un menor tiempo de germinación.

2. Longitud de la planta:

$$H_0: \mu_{control} = \mu_{bioinoc\ 10^8} = \mu_{urea}$$

$$H_1: \text{Al menos un } \mu_i \neq \mu_j ; \text{ para } i, j = \text{control, bioinoc } 10^8, \text{urea}$$

Tabla 31. Análisis de varianza para la longitud de la Planta. – Cepa M19.

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|-----------|------------------|------------------|----------------|----------------|
| Tratamiento | 2 | 62,736 | 31,368 | 24,48 | 0,001 |
| Error | 6 | 7,687 | 1,281 | | |
| Total | 8 | 70,422 | | | |

Fuente: Elaboración Propia.

Con un nivel de significancia de 0.05, se concluye que la longitud promedio de la planta mediante los tres tratamientos es diferente ($p_{\text{valor}}=0,001$).

Tabla 32. Comparaciones múltiples de Dunnet con un control. – Longitud de la Planta. – Cepa M19.

| <i>Tratamiento</i> | <i>N</i> | <i>Media</i> | <i>Agrupación</i> |
|---|----------|--------------|-------------------|
| Control (control) | 3 | 6,000 | A |
| Urea | 3 | 12,333 | |
| Bioinoculante de 10^8 | 3 | 10,300 | |

Fuente: Elaboración Propia.

Nivel de confianza de 95%. Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.

Se observa que la longitud promedio de la planta es diferente cuando se aplica urea o bioinoculante 10^8 y cuando se aplica el tratamiento control.

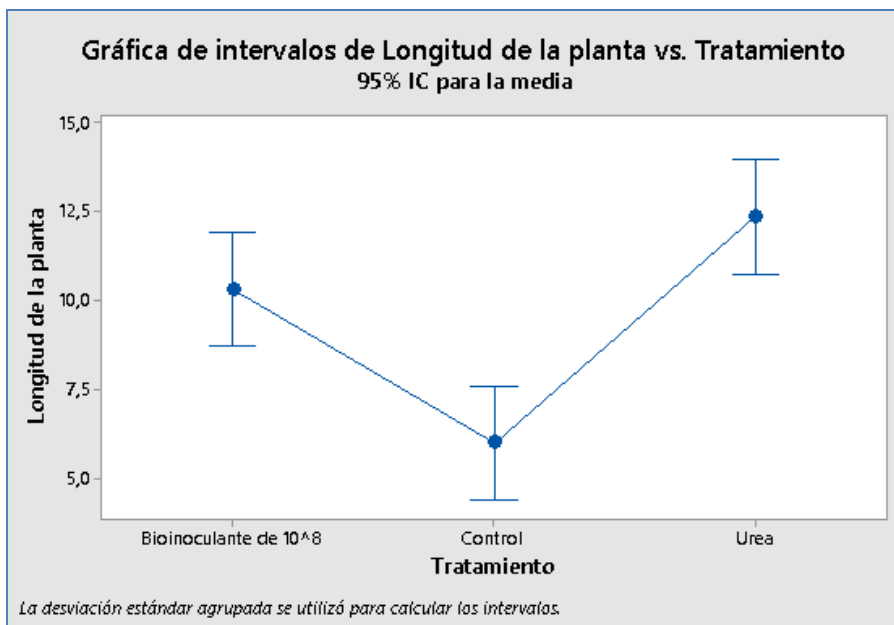


Gráfico 06. Intervalos de Longitud de la Planta VS. Tratamiento 1, 5 y 6. Fuente: Elaboración Propia. – Cepa M19.

En el gráfico anterior, se puede observar que la longitud promedio de la planta es mayor cuando se aplica urea en comparación a la aplicación de bioinoculante o tratamiento control.

3. Longitud de la raíz:

$$H_0: \mu_{control} = \mu_{bioinoc\ 10^8} = \mu_{urea}$$

$$H_1: \text{Al menos un } \mu_i \neq \mu_j; \text{ para } i, j = \text{control, bioinoc } 10^8, \text{ urea}$$

Tabla 33. Análisis de varianza para la longitud de la raíz de la Planta. – Cepa M19.

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|-----------|------------------|------------------|----------------|----------------|
| Tratamiento | 2 | 0,0356 | 0,01778 | 0,01 | 0,992 |
| Error | 6 | 13,7067 | 2,28444 | | |
| Total | 8 | 13,7422 | | | |

Fuente: Elaboración Propia.

Como el p-valor < 0.05, no existe suficientes evidencias muestrales que permiten concluir que se Rechaza la hipótesis Nula. Por tanto, todas las medias son iguales.

Con un nivel de significancia de 0.05, se concluye que la longitud promedio de la raíz de la planta mediante los tres tratamientos es igual (p_valor=0,992).

Tabla 34. Comparaciones múltiples de Dunnett con un control. – Longitud de la raíz de la Planta. – Cepa M19.

| Tratamiento | N | Media | Agrupación |
|--|----------|--------------|-------------------|
| Control (control) | 3 | 13,67 | A |
| Urea | 3 | 13,800 | A |
| Bioinoculante de 10⁸ | 3 | 13,800 | A |

Fuente: Elaboración Propia.

Nivel de confianza de 95%. Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.

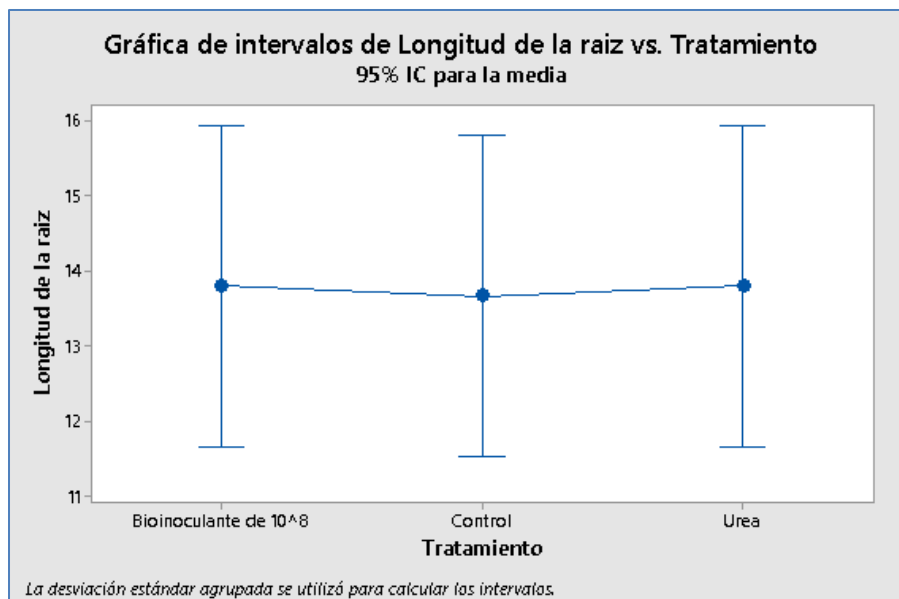


Gráfico 07. Intervalos de Longitud de la Raíz de la Planta VS. Tratamiento 1, 5 y 6. Fuente: Elaboración Propia. – Cepa M19.

En el gráfico anterior, se puede observar que la longitud de la raíz promedio de la planta es igual cuando se le aplica urea en comparación con el tratamiento de bioinoculante o tratamiento control.

4. Peso Fresco:

$$H_0: \mu_{control} = \mu_{bioinoc\ 10^8} = \mu_{urea}$$

$$H_1: \text{Al menos un } \mu_i \neq \mu_j; \text{ para } i, j = \text{control, bioinoc } 10^8, \text{ urea}$$

Tabla 35. Análisis de varianza para el peso en fresco de la planta. – Cepa M19.

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------------------|-----------|------------------|------------------|----------------|----------------|
| Tratamiento | 2 | 747,3 | 373,65 | 22,06 | 0,002 |
| Error | 6 | 101,6 | 16,94 | | |
| Total | 8 | 848,9 | | | |

Fuente: Elaboración Propia.

Con un nivel de significancia de 0.05, se concluye que el peso fresco de la planta mediante los tres tratamientos es diferente ($p_{\text{valor}}=0,002$).

Tabla 36. Comparaciones múltiples de Dunnet con un control. –
Peso en Fresco. – Ceba M19.

| <i>Tratamiento</i> | <i>N</i> | <i>Media</i> | <i>Agrupación</i> |
|--|----------|--------------|-------------------|
| Control (control) | 3 | 22,10 | A |
| Urea | 3 | 43,93 | |
| Bioinoculante de 10⁸ | 3 | 37,03 | |

Fuente: Elaboración Propia.

Nivel de confianza de 95%. Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.

Aquí se observa que el peso fresco promedio de la planta al aplicarle urea es diferente a comparación de la aplicación del tratamiento control y del bioinoculante 10⁸.

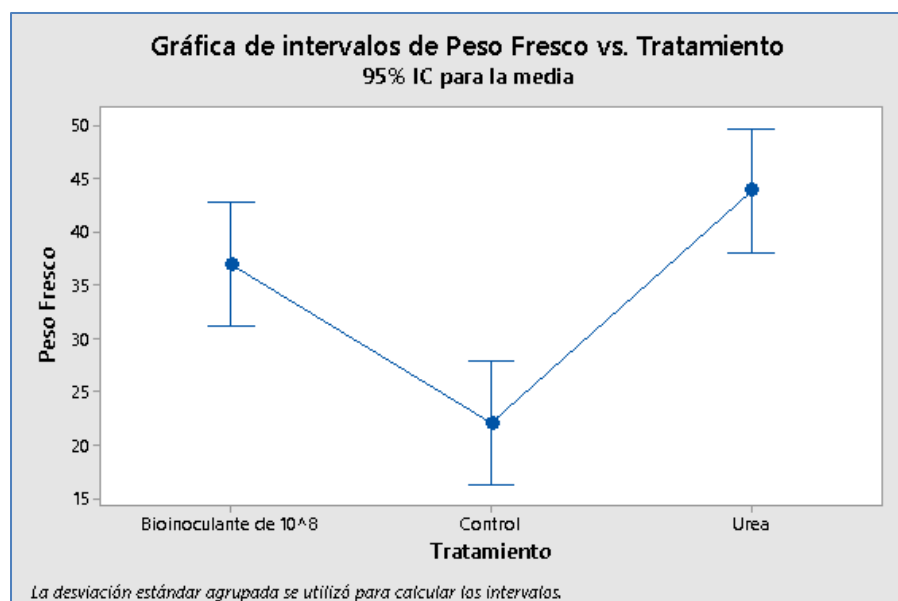


Gráfico 08. Intervalos de Peso en Fresco VS. Tratamiento 1, 5 y 6.

Fuente: Elaboración Propia. – Ceba M19.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

Según la Tabla 5, se han agrupado 8 cepas de acuerdo a sus características macroscópicas y microscópicas comunes, que guardan relación con cepas típicas de *Azotobacter*, lográndose identificar como: *Azotobacter spp*, *Azotobacter vinelandii* y *Azotobacter nigricans*. Tras la aplicación de pruebas físico-químicas se determinó que el 100% de las cepas no produjeron AIA, ni solubilizaron fosfato tricálcico en laboratorio, asimismo otras investigaciones afirman que ésta bacteria produce la fitohormona AIA (ácido indolacético) y de igual manera solubiliza fosfatos, para lo cual, según resultados en laboratorio no se validó dicha función.

Para validar el porcentaje de germinación, se emplearon semillas de rábano en las que se aplicó el inóculo de *Azotobacter* de las diversas cepas, que tuvieron una respuesta más rápida a los exudados celulares producidos por la interacción con estos microorganismos. Respecto al efecto bacteriano en la germinación de las semillas de rábano se encontró que la cepa A1-M19-PA5, no produce AIA, ni solubiliza el fosfato tricálcico, asimismo se determinó a través de la metodología aplicada, se tiene una relación estrecha con la bacteria *Azotobacter*, encontrándose que, el 45% de las cepas de *Azotobacter* aisladas presentaron un incremento significativo en el porcentaje de germinación con respecto al control en 48 horas de incubación llegando hasta un 125% de incremento de la germinación (Tabla 8). Validando un incremento en la germinación.

Para la evaluación del crecimiento en el MMSN se designó un valor a partir de 0 a 3 de acuerdo a las equivalencias con los tubos de la escala de Mc Farland, de las 8 cepas aisladas sólo el 62.5% obtuvo crecimientos equivalentes a 6×10^8 UFC/ml (escala 3) (datos no mostrados). No obstante, el 37.5% de las cepas seleccionadas presentó un crecimiento equivalente a la escala 2 (Tabla 7). Esta variable fue importante para estimar la capacidad de cepas con potencial para la producción de inoculantes.

En la Tabla 7 se observa la ponderación aplicada a las cuatro variables, se reporta que la cepa A1-M19-PA5 obtuvo la mayor sumatoria de ponderados 59.73%, destacando que no produce la fitohormona de AIA, no solubiliza el fosfato tricálcico, la germinación de semillas y el crecimiento en el MMSN estuvo en la escala 3 de Mc Farland.

Para la parte experimental de la presente investigación se aplicaron 6 tratamientos en cultivos de *Raphanus sativus*, los cuales fueron: Tratamiento 1: Control (Riego con agua), Tratamiento 2: Tierra Esterilizada, Tratamiento 3: Bioinoculante 10^6 , Tratamiento 4: Bioinoculante 10^7 , Tratamiento 5: Bioinoculante 10^8 y Tratamiento 6: Urea, evaluados los resultados comparativos entre los Tratamientos 1: Control (Riego con agua), 5: Bioinoculante 10^8 y 6: Urea, que tuvieron resultados significativamente eficientes el Tiempo de Germinación que disminuyó de 7 días (Tratamiento 1) a 5 días (Tratamiento 5) a 3 días (Tratamiento 6), Longitud de la Planta que aumentó de 4.9cm (Tratamiento 1) a 11.4cm (Tratamiento 5) a 13.7cm (Tratamiento 6) y Peso en Fresco que aumentó de 18.9cm (Tratamiento 1) a 41.8cm (Tratamiento 5) a 48.9cm (Tratamiento 6), siendo la Longitud Promedio de la Raíz igual en todos los tratamientos: 15.8cm (Tratamiento 1), 15.1cm (Tratamiento 5) y 15.4cm (Tratamiento 6). Determinándose así, la influencia significativa y positiva en cultivos de *Raphanus sativus* fertilizados por *Azotobacter* nativos del distrito de Pachía y a su vez, siendo comparado con la aplicación del agroquímico urea y el tratamiento control (agua).

Cabe resaltar que el Tratamiento 2: Tierra Esterilizada, afectó significativamente en la producción de *Raphanus sativus*, de tal manera que no se tomó en cuenta para el análisis estadístico, debido a la esterilizada de las condiciones físicas, químicas y biológicas para el cultivo de la misma. También se obvió el desarrollo estadístico del Tratamiento 3: Bioinoculante 10^6 y el Tratamiento 4: Bioinoculante 10^7 , por los resultados significativamente menores al del Tratamiento 5: Bioinoculante 10^8 , tomándose en cuenta para el análisis este último por sus resultados que semejan al Tratamiento 6: Urea.

CONCLUSIONES

- Se logró determinar que los *Azotobacter* nativos influyen significativamente y positivamente a los cultivos de *Raphanus sativus* observados en los indicadores: Tiempo de Germinación, Longitud de la Planta y Peso Fresco del cultivo, teniendo mayores resultados en la aplicación de urea y a su vez presentando similitudes en el crecimiento de la raíz de la planta.
- Las cepas seleccionadas de *Azotobacter* presentan características comunes tales como: forma (bacilar, ovoide, alargada, etc), color (marrón, crema, blanco humo, verde fosforescente, etc) y presentan formaciones de quistes típicos del género, a su vez, analizando 8 cepas de *Azotobacter* resultantes según sus características macroscópicas y microscópicas comunes, se lograron identificar como: *Azotobacter spp*, *Azotobacter vinelandii* y *Azotobacter nigricans* que guardan relación con el género *Azotobacter*; en cuanto a las pruebas fisicoquímicas aplicadas, se concluyó que la bacteria no produce la fitohormona AIA (ácido indolacético) y de igual manera, no solubiliza el fosfato tricálcico, en un 100%.
- Se encontró que la cepa A1-M19-PA6, presentaron un incremento significativo en el porcentaje de germinación con respecto al control en 48 horas de incubación, llegando hasta un 125% de incremento de la germinación, esto indica un potencial como inoculantes microbianos para el cultivos de rábano.
- Finalmente, se concluye que las cepas seleccionadas de *Azotobacter*, para su aplicación en campo fueron la cepa A1-M12-PA6 y la cepa A1-M19-PA6, las cuales tuvieron resultados en base a los indicadores: tiempo de germinación, longitud de la planta y peso en fresco, son más eficientes que el tratamiento control, siendo la longitud promedio de la raíz, igual entre los tratamientos 1, 5 y 6; validando que en la presente investigación se puede observar la eficiencia significativa entre los tratamientos 1, 5 y 6 tales como: reducción en el tiempo de germinación de 7 a 3 días, aumento en la longitud de la planta de 4.9cm a 13.7cm y aumento en el peso fresco de 18.9gr a 48.9gr; concluyendo que la longitud promedio de la raíz de la planta mediante los tres tratamientos es igual, oscilando entre los 12.3cm y 15.8cm, según al diseño de experimentos unifactorial aplicando.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar un análisis genético utilizando el kit de extracción de ADN y posteriormente la identificación molecular para determinar con similitud >99% el género y la especie de la bacteria trabajada en la presente investigación.
- Utilizar otros medios alternativos para la producción en biomasa de Azotobacter para una posterior investigación es recomendable para economizar costos.
- Realizan pruebas de germinación en diferentes cultivos como recomendación para comparar la eficiencia del género Azotobacter según el tipo de planta.
- Es recomendable evitar esterilizar la tierra para aplicaciones posteriores, debido a que la esterilización ocasiona la pérdida de propiedades y nutrientes del suelo.
- Se recomienda analizar el área del sembrado en campo y evaluar la calidad del suelo y los efectos positivos y negativos en el suelo.
- Finalmente, es recomendable promover la producción de Azotobacter en el sector agroindustrial, incentivando el desarrollo sostenible y natural de los diversos cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

- Allan, D., & Graham, P. (2002). *Soil Biology and Fertility: Symbiotic Nitrogen Fixation, other N₂ - fixing symbiosis*. Minnesota: Dep. of Soil, Water, and Climate.
- Aquilanti, L., Favilli, F., & Clemenati, F. (2004). Amplified ribosomal DNA restriction analysis for the characterization of Azotobacteraceae: a contribution to the study of these free-living nitrogen-fixing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 197-206.
- Bishop, P. (1986). Nitrogen fixation by azotobacter vinelandii strains having deletions in structural genes for nitrogenase. *Science*, 92+.
- Borda-Molina, D., Pardo-García, J., Martínez-Salgado, M., & Montaña-Lara, J. (2009). Producción de un biofertilizante a partir de un aislamiento de Azotobacter nigricans obtenido en un cultivo de Stevia rebaudiana Bert. *Universitas Scientiarum*, 71-78. Obtenido de <https://doi.org/10.11144/javeriana.SC14-1.pdub>
- Carreño, C., Escobar, C., Horna, Y., & Mendoza, G. (2011). Caracterización de cepas nativas de Azotobacter spp. y su efecto en el desarrollo de Lycopersicon esculentum Mill. "tomate" en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria* 2, 39 – 49.
- Clavijo, C., Chipana, V., Centeno, J., Zúñiga, D., & Guillén, C. (2012). Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias diazotróficas de la rizósfera del cultivo de Olea europea "olivo" en Tacna-Perú. *Ecología Aplicada*, 89-102. Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v11n2/a06v11n2.pdf>
- Crossman, S., & Hill, W. (1987). Inoculation of sweet potato with Azospirillum. *Hort. Sci.*, 420-422.
- Dobereiner, J., & Day, J. (1975). Nitrogen fixation in rhizosphere of grasses. En E. W. Russell, *Nitrogen Fixation by Free-Living Microorganisms* (págs. 39–56). Cambridge: Editions Stewart, W.
- Dugan, M. (2004). *Field Training Manual for Laboratory Analysts*. Córdoba: Universidad de Córdoba.
- Espin, G. (2002). Biología de Azotobacter vinelandii. Instituto de Biotecnología. *Universidad Nacional Autónoma de México*, 1-71.
- Franco, A., & Dobereiner, J. (1994). Biología do solo e a sustentabilidade de dois solos tropicais. *Summa Phytopathologica*, 68-74.
- Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, P. (2003). *Metodología de la Investigación - Tercera Edición*. México: Mc Graw Hill Interamericana Editores S.A.

- Hiltner, L. (1904). Über neue Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Boden Bakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arbeiten Deutscher Landwirtschafts Gesellschaft*, 59–78.
- Holt, J. (2000). *Bergey's manual to determinative bacteriology*. Maryland: Novena Edicion. Baltimore.
- Hussein, Z. (1999). Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbial Molecular Miology reviews*, 63, 968-989.
- Jiménez, D. (2007). *Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de Azotobacter spp. mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal 16S*. Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.
- Kennedy, A., & Smith, L. (1995). Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soil. *Plant and soil*, 75-86.
- Lee, K., & Pankhurst, C. (1992). Soil organism and sustainable productivity. *Austr J Soil Res.*, 855-892.
- Lozada, L., & Rivas, C. (2010). *Evaluación del efecto de la inoculación de Azotobacter spp. en plantas de ají dulce (Capsicum frutescens)*. Trujillo: Universidad de los Andes.
- Lung-tung. (1997). *Analecta Algológica: Observación de la especie Gelidium almansii*. Taipei, Taiwan: AlgaeBase.
- Marin, V., Baldani, V., Dos Santos, R., & Baldani, I. (2003). Fixacao biologica de nitrogenio; Bacterias fijadoras de nitrógeno de importancia para la agricultura tropical. *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria*, 1-44.
- Martinez, V.R. y Dibut, A.B. (1996). La experiencia cubana en el uso de los biofertilizantes. *Instituto de Investigaciones fundamentales*, 18-32.
- Muñoz, D., Ferreira, M., Escalante, I., & López, J. (2013). Relación entre la cobertura del terreno y la degradación física y biológica de un suelo aluvial en una región semiárida. *Terra*, 201-210.
- Nogales, B. (2005). Microbiología del suelo en la era de la biología molecular: Descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas*, 44, 203-215.
- Ortega, P et al. (2012). *Emergencias médicas por productos fitosanitarios*. Santa Fe: CASAFE.
- Page, W., & Shivprasad, S. (1991). *Azotobacter salinestris* sp. nov., a sodiumdependent, microaerophili, and aeroadaptive nitrogen fixing bacterium. *Journal. Systemic. Bacteriology.*, 369– 376.

- Pandey, A., & Kumar, S. (1990). Inhibitory effects of *Azotobacter chroococcum* and *Azospirillum brasiliense* on a range of rhizosphere fungi. *Indian Journal of Experimental Biology*, 52–54.
- Pandey, A., Sharma, E., & Palni, L. (1998). Influence of bacterial inoculation on maize in upland farming systems of the Sikkim Himalaya. *Soil Biology & Biochemistry*, 379-384.
- Peniche, H. (2005). Aislamiento y evaluación de rizobacterias del género *Azotobacter* con importancia en la mejora de suelos de producción de tomate (*Lycopersicon esculentum*) bajo invernadero. *Pontificia Universidad Javeriana*, 45-50, 62-69.
- Pritchett, L., Gay, C., Besser, T., & Hancock, D. (1991). Management and production factors influencing immunoglobulin G1 concentration in colostrum of Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 74-2336.
- Quiñonez, E., & DalPozzo, F. (2008). Degradación Química de Suelos Agrícolas en la Península de Paraguaná. *Suelos Ecuatoriales*, 22-28.
- Ramírez, M., Ferrera, R., Alarcón, A., Almaráz, J., Ramírez, G., & De Bashan, L. (2014). Identification of culturable microbial functional groups isolated from the rhizosphere of four species of mangroves and their biotechnological potential. *Applied Soil Ecology*, 1-10.
- Rodriguez, D., Urrego, L., Martinez, P., & Bernal, J. (2003). Evaluación preliminar de dos matrices para la inmovilización de bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fósforo aislado de bosque alto andino Cundinamarqués. *Pontificia Universidad Javeriana*, 1-28.
- Rodríguez, N., Florentino, A., Torres, D., Yendis, H., & Zamora, F. (2009). Selección de indicadores de calidad de suelo en tres tipos de uso de la tierra en la planicie de Coro estado Falcón. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 340-361.
- Rueda, E., Ortega, J., Barrón, J., López, J., Murillo, B., & Hernández, L. (2015). Los fertilizantes biológicos en la agricultura. *INVURNUS* 10, 10-17.
- Sabra, W., Zeng, A., & Deckwer, W. (2001). Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Applied Microbiology Biotechnology*, 315–325.
- Saribay, G. (2003). Growth and nitrogen fixation dynamics of *Azotobacter chroococcum* nitrogen-free and own containing médium. *The Middle East Technical University*, 1-45.
- Sawyer, C., & Mc Carty, P. (1978). *Chemistry For Environmental Engineering*. 3th Edition. New York: Mc. Graw - Hill Book.
- Tchan, Y. (1984). Family II *Azotobacteraceae*. En Bergey, *Manual of Systematic Bacteriology* (págs. 219–220). Baltimore: Krieg. N. Holt, J. Editions.

- Tchan, Y., & New, P. (1984). Genus I Azotobacter. En Bergey, *Manual of Determinative Bacteriology* (págs. 220–229). Baltimore: Krieg. N. Holt. J. Editions.
- Tchan, Y., & New, P. (1984). Genus II Azomonas. En Bergey, *Manual of Determinative Bacteriology* (págs. 230–234). Baltimore: Krieg. N. Holt, J. Editions.
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología. 9a Edición*. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.

ANEXOS

Anexo 01: Composición Química del Medio para azotobacter (g/100ml)

2 gramos de Sacarosa; 0,005 gramos de fosfato dipotásico; 0,015 gramos de fosfato monopotásico; 0,001 gramos de cloruro de calcio; 0,02 gramos de sulfato de magnesio heptahidrato; 0,0002 gramos de molibdato de sodio; 0,001 gramos de cloruroférico; 0,2 mililitros de azul de bromotimol (al 0,5% p/v en etanol); 0,1 gramos de carbonato de calcio; 1.5 gramos de agar agar o agar powder; 100 mililitros de agua destilada.

Anexo 02: Composición Química del Agar Ashby 1 (g/100ml)

0,75 gramos de Manitol; 0,01 gramos de fosfato dipotásico; 0,01 gramos de sulfato de magnesio heptahidratado; 0,01 gramos de cloruro de sodio; 0,005 gramos de sulfato de calcio dihidratado; 0,25 gramos de carbonato de calcio; 1,5 gramos de agar agar o agar powder; 0,5 gramos de Benzoato de sodio; 100 mililitros de agua destilada.

Anexo 03: Composición Química del Agar Ashby 2 (g/100ml)

0,5 gramos de Sacarosa; 0,5 gramos de manitol; 0,1 gramos de fosfato dipotásico; 0,02 gramos de sulfato de magnesio; 0,005 gramos de sulfato de hierro II heptahidratado; 0,02 gramos de cloruro de sodio; 0,02 gramos de cloruro de calcio dihidratado; 1,5 gramos de agar agar o agar powder; 100 mililitros de agua destilada.

Anexo 04: Instrumentación para el muestreo de suelo.



Anexo 05 y 06: Muestreo en cultivos de *Raphanus Sativus* y *Beta Vulgaris*



Anexo 07: Cavado en zig-zag para toma de muestras.



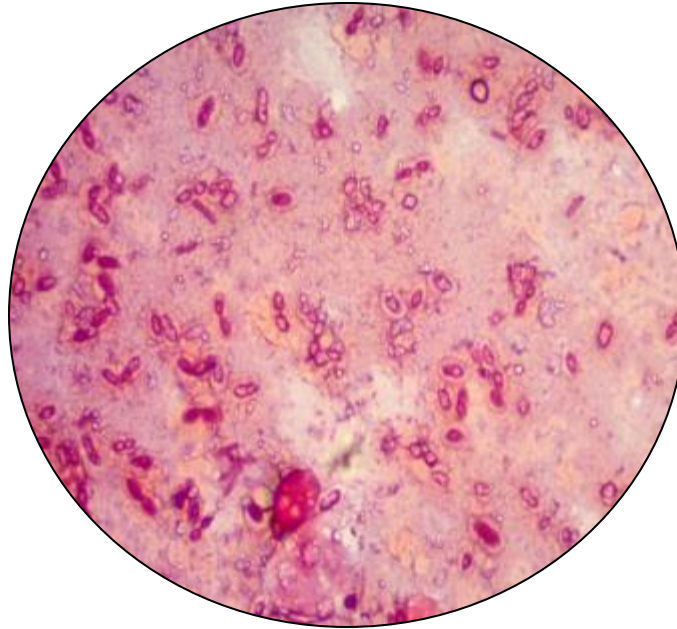
Anexo 08: Empaquetado, Preservado y Transporte de Muestras.**Anexo 09: Preparación de Medios de Cultivo.**

Anexo 10: Sembrado de terrones de tierra en Agar.**Anexo 11: Crecimiento bacteriano en Agar.**

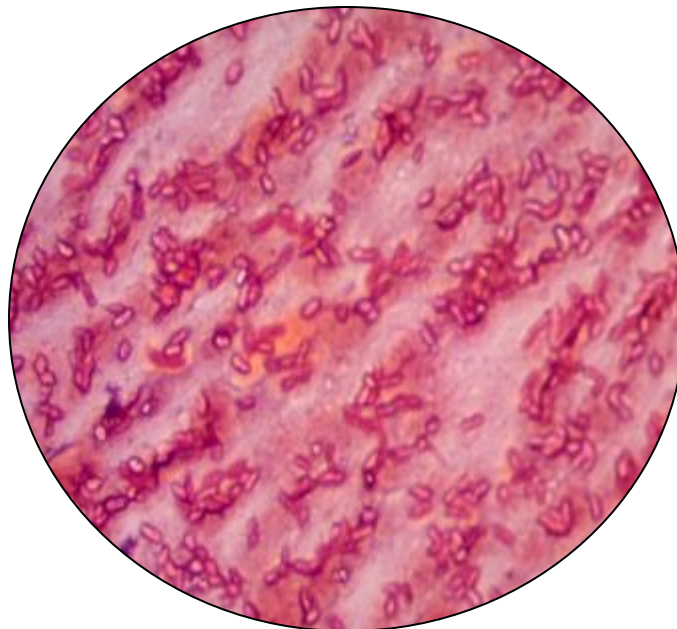
Anexo 12: Técnica de aislamiento por agotamiento.**Anexo 13: Replicación en medios de cultivos para purificación**

Anexo 14: Tinción Gram de las cepas seleccionadas.**Anexo 15: Visualización en Microscopio de la cepas seleccionadas.**

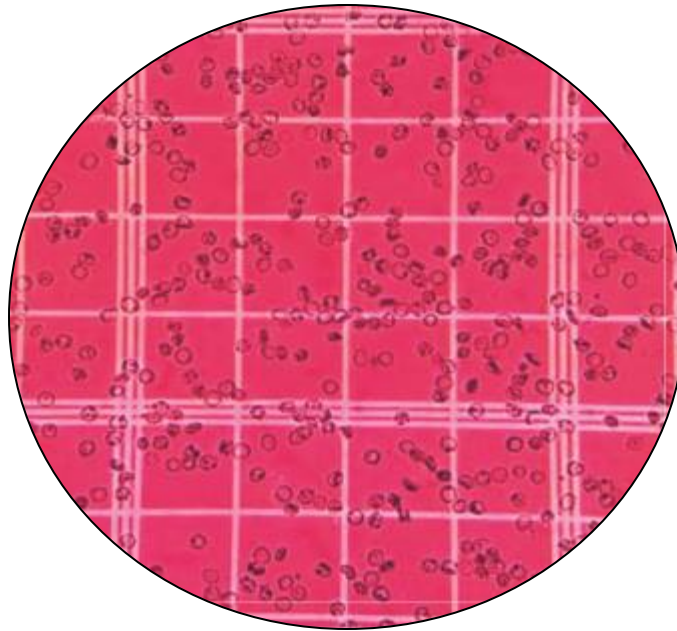
Anexo 16: Presencia de Quistes en Muestra 12.



Anexo 17: Presencia de formas bacilares alargadas ovoides en Muestra 25.

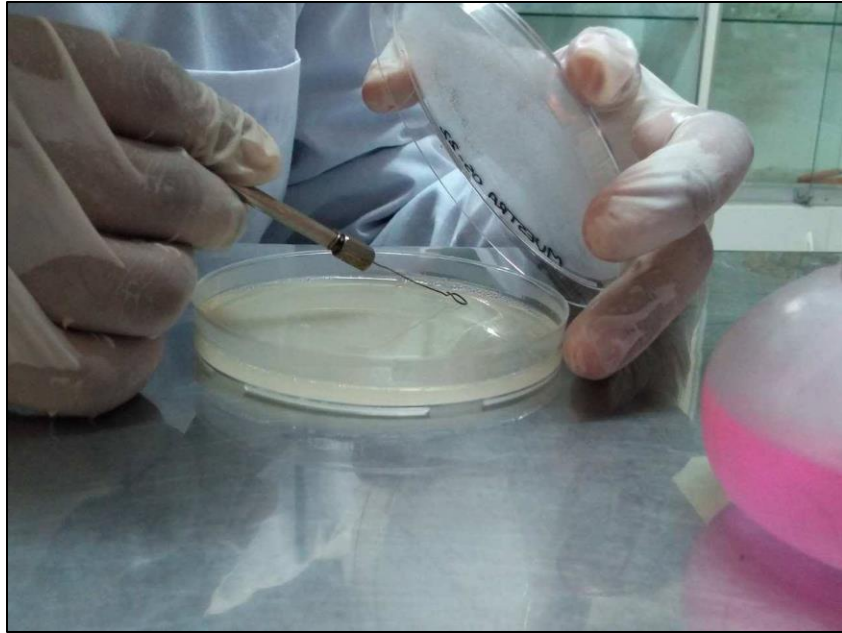


Anexo 18: Conteo en la Cámara de Neubauer



Anexo 19: Medio Ashby 1 para funcionamiento del biorreactor



Anexo 20: Proceso de Solubilización de Fosfato Tricálcico**Anexo 21: Prueba de germinación de Rábano I**

Anexo 22: Prueba de germinación de Rábano II



Anexo 23: Sembrado de cultivos de Rábano



Anexo 24: Riego por goteo de cultivos de Rábano



Anexo 25: Cosecha de cultivo de rábano

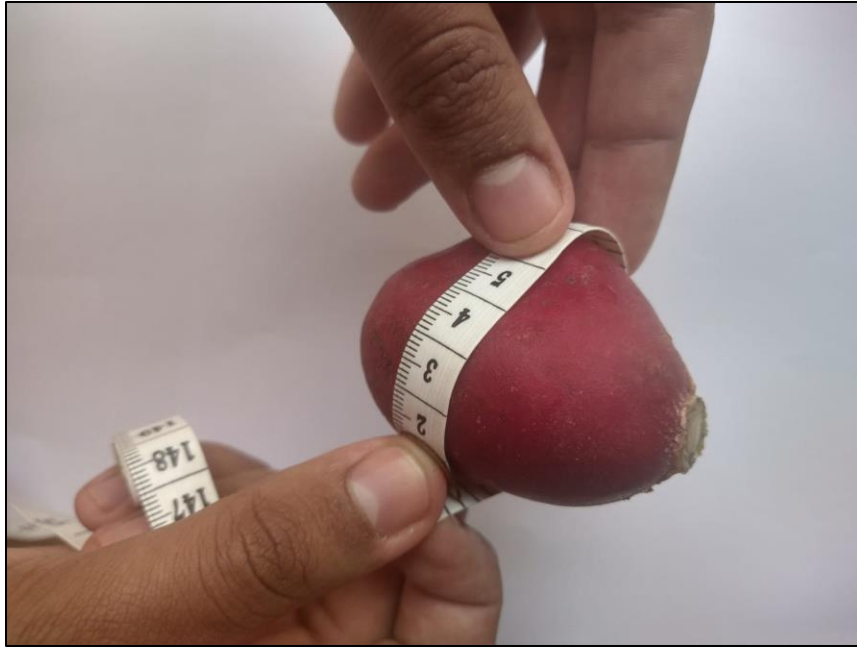


Anexo 26: Cultivo de Rábano



Anexo 26: Cultivo de Rábano con hoja



Anexo 28: Medición de la longitud de la raíz de rábano**Anexo 29: Peso en fresco del cultivo de Rábano**

Anexo 30: Aislamiento de Azotobacter – Semana 01

| N° de orden | Cepa | Características Macroscópica | Observación |
|-------------|------------|--|----------------------|
| 1 | A1-M1-PA1 | Proliferación negra con hifas | Contaminado |
| 2 | A1-M2-PA1 | Colonia bacteriana color crema | Sospecha Azotobacter |
| 3 | A1-M3-PA1 | Colonia bacteriana color crema y amarilla | Sospecha Azotobacter |
| 4 | A1-M4-PA1 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Sospecha Azotobacter |
| 5 | A1-M5-PA1 | Colonia bacteriana color crema y verde brillante (fosforescente) | Sospecha Azotobacter |
| 6 | A1-M6-PA1 | Colonia bacteriana color crema | Sospecha Azotobacter |
| 7 | A1-M7-PA1 | Colonia bacteriana color crema | Sospecha Azotobacter |
| 8 | A1-M8-PA1 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Sospecha Azotobacter |
| 9 | A1-M9-PA1 | Proliferación negra con hifas | Contaminado |
| 10 | A1-M10-PA1 | Proliferación negra con hifas con puntos rojos | Contaminado |
| 11 | A1-M11-PA1 | Proliferación negra con hifas | Contaminado |
| 12 | A1-M12-PA1 | Colonia bacteriana color crema y verde brillante (fosforescente) | Sospecha Azotobacter |
| 13 | A1-M13-PA1 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Sospecha Azotobacter |
| 14 | A1-M14-PA1 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Sospecha Azotobacter |
| 15 | A1-M15-PA1 | Colonia bacteriana color blanco mucosa | Sospecha Azotobacter |
| 16 | A1-M16-PA1 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Sospecha Azotobacter |
| 17 | A1-M17-PA1 | Proliferación negra con hifas | Contaminado |
| 18 | A1-M18-PA1 | Proliferación negra con hifas | Contaminado |
| 19 | A1-M19-PA1 | Colonia bacteriana color crema y verde brillante (fosforescente) | Sospecha Azotobacter |
| 20 | A1-M20-PA1 | Colonia bacteriana color crema | Sospecha Azotobacter |
| 21 | A1-M21-PA1 | Colonia bacteriana color blanco mucosa | Sospecha Azotobacter |
| 22 | A1-M22-PA1 | Proliferación negra verdosa con hifas | Contaminado |
| 23 | A1-M23-PA1 | Colonia bacteriana color blanco mucosa | Sospecha Azotobacter |
| 24 | A1-M24-PA1 | Colonia bacteriana color crema | Sospecha Azotobacter |
| 25 | A1-M25-PA1 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Sospecha Azotobacter |
| 26 | A1-M26-PA1 | Colonia bacteriana color crema | Sospecha Azotobacter |
| 27 | A1-M27-PA1 | Proliferación verde con hifas | Contaminado |
| 28 | A1-M28-PA1 | Proliferación negra con hifas | Contaminado |
| 29 | A1-M29-PA1 | Colonia bacteriana color crema y amarilla | Sospecha Azotobacter |
| 30 | A1-M30-PA1 | Proliferación verde con hifas | Contaminado |

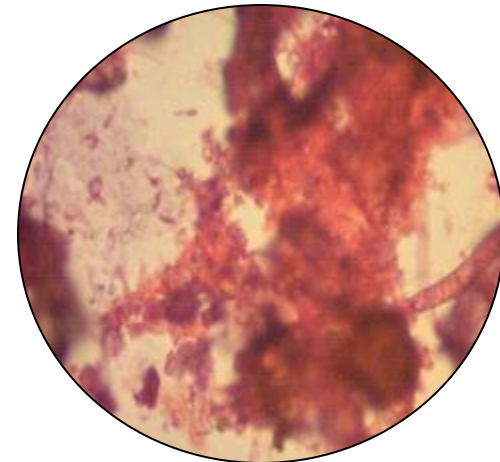
Fuente: Elaboración Propia.

Anexo 31: Aislamiento de Azotobacter – Semana 02

| N° de orden | Cepa | Características Macroscópica | Observación |
|-------------|------------|--|----------------------|
| 1 | A1-M2-PA2 | Colonia bacteriana color crema | Sospecha Azotobacter |
| 2 | A1-M3-PA2 | Colonia bacteriana color crema y amarilla | Sospecha Azotobacter |
| 3 | A1-M4-PA2 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Sospecha Azotobacter |
| 4 | A1-M5-PA2 | Colonia bacteriana verde brillante (fosforescente) + hongo | Contaminado |
| 5 | A1-M6-PA2 | Colonia bacteriana color crema + hongo | Contaminado |
| 6 | A1-M7-PA2 | Colonia bacteriana color crema | Sospecha Azotobacter |
| 7 | A1-M8-PA2 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Sospecha Azotobacter |
| 8 | A1-M12-PA2 | Colonia bacteriana color crema y verde brillante (fosforescente) | Sospecha Azotobacter |
| 9 | A1-M13-PA2 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Sospecha Azotobacter |
| 10 | A1-M14-PA2 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Sospecha Azotobacter |
| 11 | A1-M15-PA2 | Colonia bacteriana color blanco mucosa | Sospecha Azotobacter |
| 12 | A1-M16-PA2 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Sospecha Azotobacter |
| 13 | A1-M19-PA2 | Colonia bacteriana color crema y verde brillante (fosforescente) | Sospecha Azotobacter |
| 14 | A1-M20-PA2 | Colonia bacteriana color crema | Sospecha Azotobacter |
| 15 | A1-M21-PA2 | Colonia bacteriana color blanco mucosa | Sospecha Azotobacter |
| 16 | A1-M23-PA2 | Colonia bacteriana color blanco mucosa | Sospecha Azotobacter |
| 17 | A1-M24-PA2 | Colonia bacteriana color crema + hongo | Contaminado |
| 18 | A1-M25-PA2 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Sospecha Azotobacter |
| 19 | A1-M26-PA2 | Colonia bacteriana color crema | Sospecha Azotobacter |
| 20 | A1-M29-PA2 | Colonia bacteriana color crema y amarilla + hongo | Contaminado |

Fuente: Elaboración Propia.

Anexo 32: Presencia de bacilos ovoides con hifas de hongos.



Anexo 33: Aislamiento de Azotobacter – Semana 03

| N° de orden | Cepa | Características Macroscópica | Observación |
|-------------|------------|--|----------------------|
| 1 | A1-M2-PA3 | Colonia bacteriana color crema | Sospecha Azotobacter |
| 2 | A1-M3-PA3 | Colonia bacteriana color crema y amarilla + Hongo | Contaminada |
| 3 | A1-M4-PA3 | Colonia bacteriana color crema y marrón + Hongo | Contaminada |
| 4 | A1-M7-PA3 | Colonia bacteriana color crema | Sospecha Azotobacter |
| 5 | A1-M8-PA3 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Sospecha Azotobacter |
| 6 | A1-M12-PA3 | Colonia bacteriana color crema y verde brillante (fosforescente) | Sospecha Azotobacter |
| 7 | A1-M13-PA3 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Sospecha Azotobacter |
| 8 | A1-M14-PA3 | Colonia bacteriana color crema y marrón + Hongo | Contaminada |
| 9 | A1-M15-PA3 | Colonia bacteriana color blanco mucosa | Sospecha Azotobacter |
| 10 | A1-M16-PA3 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Sospecha Azotobacter |
| 11 | A1-M19-PA3 | Colonia bacteriana color crema y verde brillante (fosforescente) | Sospecha Azotobacter |
| 12 | A1-M20-PA3 | Colonia bacteriana color crema | Sospecha Azotobacter |
| 13 | A1-M21-PA3 | Colonia bacteriana color blanco mucosa | Sospecha Azotobacter |
| 14 | A1-M23-PA3 | Colonia bacteriana color blanco mucosa + Hongo | Contaminada |
| 15 | A1-M25-PA3 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Sospecha Azotobacter |
| 16 | A1-M26-PA3 | Colonia bacteriana color crema | Sospecha Azotobacter |

Fuente: Elaboración Propia.

Anexo 34: Aislamiento de Azotobacter – Semana 04

| N° de orden | Cepa | Características Macroscópica | Observación |
|-------------|------------|--|----------------------|
| 1 | A1-M2-PA4 | Colonia bacteriana color crema | Sospecha Azotobacter |
| 2 | A1-M7-PA4 | Colonia bacteriana color crema + Hongo | Contaminada |
| 3 | A1-M8-PA4 | Colonia bacteriana color crema y marrón + Hongo | Contaminada |
| 4 | A1-M12-PA4 | Colonia bacteriana color crema y verde brillante (fosforescente) | Sospecha Azotobacter |
| 5 | A1-M13-PA4 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Sospecha Azotobacter |
| 6 | A1-M15-PA4 | Colonia bacteriana color blanco mucosa | Sospecha Azotobacter |
| 7 | A1-M16-PA4 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Sospecha Azotobacter |
| 8 | A1-M19-PA4 | Colonia bacteriana color crema y verde brillante (fosforescente) | Sospecha Azotobacter |
| 9 | A1-M20-PA4 | Colonia bacteriana color crema | Sospecha Azotobacter |
| 10 | A1-M21-PA4 | Colonia bacteriana color blanco mucosa + Hongo | Contaminada |
| 11 | A1-M25-PA4 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Sospecha Azotobacter |
| 12 | A1-M26-PA4 | Colonia bacteriana color crema + Hongo | Contaminada |

Fuente: Elaboración Propia.

Anexo 35: Aislamiento de Azotobacter – Semana 05

| N° de orden | Cepa | Características Macroscópica | Observación |
|-------------|------------|--|----------------------|
| 1 | A1-M2-PA5 | Colonia bacteriana color crema | Sospecha Azotobacter |
| 2 | A1-M12-PA5 | Colonia bacteriana color crema y verde brillante (fosforescente) | Sospecha Azotobacter |
| 3 | A1-M13-PA5 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Sospecha Azotobacter |
| 4 | A1-M15-PA5 | Colonia bacteriana color blanco mucosa | Sospecha Azotobacter |
| 5 | A1-M16-PA5 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Sospecha Azotobacter |
| 6 | A3-M19-PA5 | Colonia bacteriana color crema y verde brillante (fosforescente) | Sospecha Azotobacter |
| 7 | A1-M20-PA5 | Colonia bacteriana color crema | Sospecha Azotobacter |
| 8 | A1-M25-PA5 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Sospecha Azotobacter |

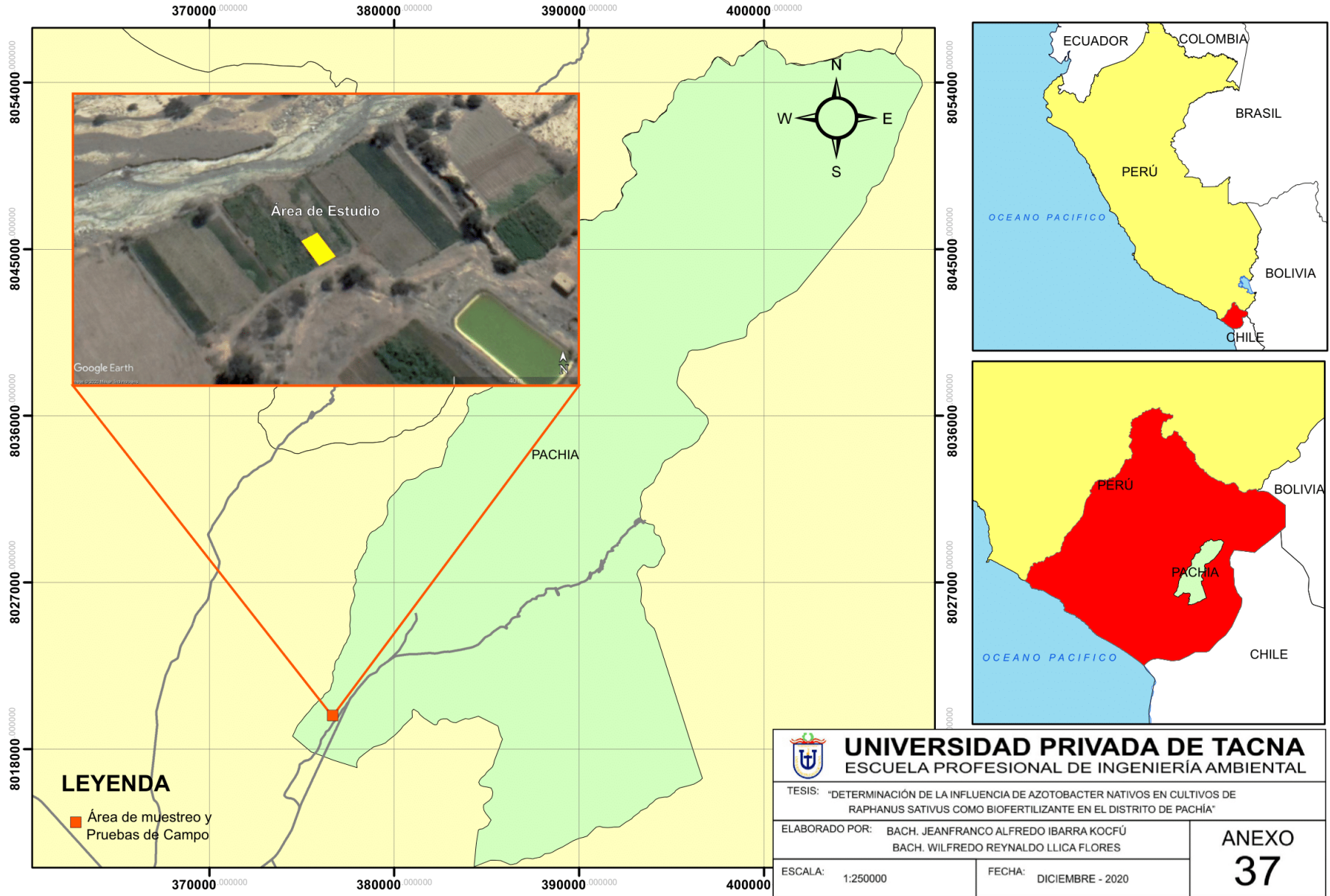
Fuente: Elaboración Propia.

Anexo 36: Aislamiento de Azotobacter – Semana 06

| N° de orden | Cepa | Características Macroscópica | Observación |
|-------------|------------|--|-------------|
| 1 | A1-M2-PA6 | Colonia bacteriana color crema | Azotobacter |
| 2 | A1-M12-PA6 | Colonia bacteriana color crema y verde brillante (fosforescente) | Azotobacter |
| 3 | A1-M13-PA6 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Azotobacter |
| 4 | A1-M15-PA6 | Colonia bacteriana color blanco mucosa | Azotobacter |
| 5 | A1-M16-PA6 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Azotobacter |
| 6 | A1-M19-PA6 | Colonia bacteriana color crema y verde brillante (fosforescente) | Azotobacter |
| 7 | A1-M20-PA6 | Colonia bacteriana color crema | Azotobacter |
| 8 | A1-M25-PA6 | Colonia bacteriana color crema y marrón | Azotobacter |

Fuente: Elaboración Propia.

MAPA DE UBICACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO



MATRIZ DE CONSISTENCIA

| TÍTULO "DETERMINACIÓN DE LA INFLUENCIA DE AZOTOBACTER NATIVOS EN CULTIVOS DE RAPHANUS SATIVUS COMO BIOFERTILIZANTE EN EL DISTRITO DE PACHÍA" | | | | | | |
|---|--|--|---|---|--|---|
| PROBLEMA | OBJETIVO | HIPÓTESIS | VARIABLES | INDICADORES | MÉTODOLOGÍA | PRUEBAS ESTADÍSTICAS |
| Problema General | Objetivo General | Hipótesis General | Variable Independiente | <ul style="list-style-type: none"> - Medios de cultivo (UFC/ml). - Morfología de la cepa. - Conteo de UFC/ml de la cepa seleccionada. - Lectura por espectrofotometría en una absorbancia de 530 nm. - Diámetro de las colonias y halos (cm/placa) - Germinación mediante la incubación de semillas a 25°C por 48h. - Conteo de UFC/ml hasta llegar a un 10⁸. | <p>Método Muestreo de Suelo.</p> <p>Selección de Medios de Cultivo.</p> <p>Aislamiento, sembrado y purificación.</p> <p>Tinción gran.</p> <p>Conteo en la cámara de Neubauer.</p> <p>Pruebas físicoquímicas- Caracterización del Azotobacter spp nativos.</p> <p>Producción en masa por medio de un biorreactor.</p> <p>Aplicación en cultivos de <i>Raphanus sativus</i>.</p> | <p>Diseño de experimentos con una variable respuesta y un factor a 3 niveles, sumatoria de promedios ponderados de las pruebas.</p> <p>ANOVA</p> <p>Prueba de Dunnet.</p> |
| <p>¿Es factible determinar la influencia de Azotobacter nativos en cultivos de <i>Raphanus sativus</i> como biofertilizante en el distrito de Pachía?</p> | <p>Determinar la influencia de Azotobacter nativos en cultivos de <i>Raphanus sativus</i> como biofertilizante en el distrito de Pachía.</p> | <p>El azotobacter nativo como biofertilizante tiene una influencia positiva en la producción cultivos de <i>Raphanus sativus</i> en el distrito de Pachía</p> | <p>Influencia Azotobacter spp.</p> | | | |
| Problema Específico | Objetivo Específico | Hipótesis Específico | Variable Dependiente | <ul style="list-style-type: none"> - Crecimiento/mes - Cm de la planta/mes. - Cm de la raíz/mes. - Gr de la planta/mes. | | |
| <p>¿Es posible aislar azotobacter nativos con características fisiológicas de biofertilizantes en la zona de Pachía?</p> | <p>Aislar y seleccionar cepas de Azotobacter nativos del Distrito de Pachía con características biofertilizantes mediante la evaluación de sus características Fisiológicas.</p> | <p>Se logrará aislar y seleccionar cepas de Azotobacter nativos en la zona de Pachía con características fisiológicas óptimas para ser utilizado como biofertilizante.</p> | <p>Producción de <i>Raphanus sativus</i>.</p> | | | |

| | | |
|--|---|---|
| ¿Cuál es el porcentaje de germinación de las semillas aplicando azotobacter? | Determinar el porcentaje de germinación aplicando inóculo. | El porcentaje de germinación aumenta en comparación con agua destilada |
| ¿Qué tan significativa sería la influencia de Azotobacter nativos en comparación con la urea y el tratamiento control de cultivos de <i>Raphanus sativus</i> aplicando? | Determinar la eficiencia de la cepa de Azotobacter en comparación con el agroquímico urea y el tratamiento control en cultivos de <i>Raphanus sativus</i> . | La eficiencia aplicando la fertilización química y biológica bajo tratamiento de control en base a los factores de producción se incrementa en base a los factores de producción. |
