

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**  
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y  
AMBIENTALES  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA



**TÍTULO DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

**TEMA:** EVALUACIÓN DEL EFECTO BIOFERTILIZANTE DE BACTERIAS DE LOS GÉNEROS *Azospirillum* Y *Azotobacter* AISLADAS DE SUELOS CULTIVADOS CON PASTO RYEGRASS (*Lolium multiflorum*)

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO/A EN BIOTECNOLOGÍA

**AUTOR(A):**

HERRERÍA GRIJALVA DAYANA BELÉN

**DIRECTOR(A):**

PhD. Echeverría de Labastida María Cristina

**Ibarra, 2022**

# UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN

CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

ESCUELA DE INGENIERIA EN

BIOTECNOLOGÍA

“EVALUACIÓN DEL EFECTO BIOFERTILIZANTE DE BACTERIAS DE LOS GÉNEROS *Azospirillum* Y *Azotobacter* AISLADAS DE SUELOS CULTIVADOS CON PASTO RYEGRASS (*Lolium multiflorum*)”

Trabajo de grado revisado por el Comité Asesor, por lo cual se autoriza su presentación como requisito parcial para obtener Título de:

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

APROBADO:

PhD María Cristina Echeverría

**DIRECTOR**



FIRMA

MSc Santiago Zarate

**MIEMBRO TRIBUNAL**



FIRMA

Blgo Pedro Barba

**MIEMBRO TRIBUNAL**



FIRMA



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**  
**BIBLIOTECA UNIVERSITARIA**

**AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN**  
**A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

**1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA**

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

<b>DATOS DE CONTACTO</b>			
<b>CÉDULA DE IDENTIDAD:</b>	1750360602		
<b>APELLIDOS Y NOMBRES:</b>	Herreria Grijalva Dayana Belén		
<b>DIRECCIÓN:</b>	El Condado		
<b>EMAIL:</b>	dbherreria@utn.edu.ec		
<b>TELÉFONO FIJO:</b>	223381021	<b>TELÉFONO MÓVIL:</b>	0983530856

<b>DATOS DE LA OBRA</b>	
<b>TÍTULO:</b>	EVALUACIÓN DEL EFECTO BIOFERTILIZANTE DE BACTERIAS DE LOS GÉNEROS <i>Azospirillum</i> Y <i>Azotobacter</i> AISLADAS DE SUELOS CULTIVADOS CON PASTO RYEGRASS ( <i>Lolium multiflorum</i> )
<b>AUTOR (ES):</b>	Dayana Herrería
<b>FECHA:</b> <b>DD/MM/AAAA</b>	14/01/2022
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
<b>PROGRAMA:</b>	<input checked="" type="checkbox"/> <b>PREGRADO</b> <input type="checkbox"/> <b>POSTGRADO</b>
<b>TITULO POR EL QUE OPTA:</b>	Ingeniera en Biotecnología
<b>ASESOR /DIRECTOR:</b>	PhD María Cristina Echeverria

## 2. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrollo, sin los derechos de autores terceros, por lo tanto, la obra es original y es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 14 días del mes de enero del 2022

EL AUTOR



.....

Dayana Belén Herrera Grijalva

## **AGRADECIMIENTO**

Mi agradecimiento primero a Dios, a la Universidad Técnica del Norte y a la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, especialmente a todo el cuerpo docente, administrativo y estudiantil por todo aquello que me enseñaron, ayudaron e inculcaron.

A mi director, Doctora María Cristina Echeverría por su tiempo y conocimientos impartidos durante la carrera y trabajo de titulación, al Magister Gabriel Chimbo por su apoyo constante, por sus consejos, sus palabras de aliento y el tiempo brindado durante la carrera, fuera del aula y todo el desarrollo del estudio. Al Magister Santiago Zárate y Biólogo Pedro Barba, por sus conocimientos y facilidades prestadas para la investigación.

A mis amigos y familiares que siempre estuvieron pendientes de mi salud y bienestar. Especialmente a mis padres, quienes fueron los que inculcaron el gusto por la ciencia y el amor al prójimo.

A Sebastián Lara por su apoyo en todo momento, su ayuda durante mi carrera, por ser mi mano derecha.

A mis colegas y compañeros tesisistas por su amistad, consejos y acompañamiento constante dentro y fuera del laboratorio, quienes me brindaron su respaldo y sincera amistad.

A EcocycleBiotech por su ayuda y financiamiento, en especial a Nathalia Duque y María Fernanda Cevallos por brindarme su apoyo total y conocimiento para la realización del trabajo de titulación y carrera universitaria.

Dayana Herrería

## **DEDICATORIA**

A Dios, por encaminarme a una vida, con retos nuevos a ciudad distinta, por darme salud, fuerza, sabiduría necesaria para cumplir con mis objetivos.

A mis padres Daniel y Paty por darme la confianza, libertad y apoyo necesario para crecer en todos los aspectos personales y profesionales, por confiar y creer en mí y en mis capacidades. Es para mí una gran satisfacción dedicarles a ellos el trabajo de seis años que con mucho esfuerzo, perseverancia y sabiduría me lo he ganado.

A mis abuelos, hermanos, sobrinos, tías y demás familia en general por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad, por ser mi sostén de cada día en el transcurso de mi carrera universitaria.

A mis amigos universitarios por permitirme aprender cada detalle junto a ellos, por su apoyo, cariño, su honestidad y sincera amistad.

A mis maestros quienes fueron los que me impulsaron el gusto por la ciencia y la investigación.

Dayana

## ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	x
ABSTRACT .....	xi
CAPITULO I.....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Problema de investigación.....	3
1.3 Justificación .....	5
1.4 Objetivos.....	7
1.4.1 Objetivo general.....	7
1.4.2 Objetivos específicos .....	7
1.5 Hipótesis .....	7
CAPÍTULO II .....	8
MARCO TEÓRICO.....	8
2.1 El suelo .....	8
2.2 Propiedades del suelo.....	8
2.2.1 Propiedades físicas del suelo .....	8
2.2.2 Propiedades químicas del suelo .....	8
2.2.2.1 Macronutrientes. ....	8
2.2.2.2. Micronutrientes.....	9
2.2.2.3. Materia Orgánica. ....	9
2.2.3 Propiedades biológicas del suelo .....	9
2.2.3.1 Proceso Biológico del nitrógeno.....	9
2.3 Ecología del suelo .....	9
2.3.1 Microbiota.....	9
2.3.1.1 Bacterias.....	10
2.3.2 Microfauna.....	10
2.4 Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal .....	11
2.5 Ecología de las PGPR .....	11
2.6 Mecanismos de acción de los PGPR.....	11
2.6.1 Mecanismos indirectos .....	11
2.6.1.1 Producción de fitoalexinas.....	12

2.6.1.2 Producción de sideróforos .....	12
2.6.1.3 Producción de antibióticos.....	12
2.6.2 Mecanismos directos.....	12
2.6.2.1 Producción de Fitohormonas. ....	12
2.6.2.2 Solubilización de fósforo .....	13
2.6.2.3 Fijación Biológica de Nitrógeno.....	13
2.7 <i>Azospirillum</i> sp .....	14
2.8 <i>Azotobacter</i> sp.....	14
2.9 Efecto de bacterias diazotróficas sobre el crecimiento, fertilidad y desarrollo de las plantas.....	15
2.10 Fertilizantes nitrogenados .....	16
2.11 Fertilizantes biológicos (Biofertilizantes).....	16
2.11.1 Biofertilizantes a partir de bacterias fijadoras de nitrógeno en gramíneas .....	17
.....	17
CAPÍTULO III.....	18
METODOLOGÍA.....	18
3.1 Descripción del área de estudio .....	18
3.2 Fase de Laboratorio .....	18
3.3 Preparación de medios .....	19
3.3.1 Medio libre de Nitrógeno (Nfb).....	19
3.3.2 Nfb rojo Congo (NRc) .....	19
3.3.3 Ashby (S) .....	19
3.4 Recolección de muestras de suelo .....	19
3.5 Aislamiento de bacterias diazotróficas .....	20
3.6 Siembra en medios específicos para <i>Azospirillum</i> sp y <i>Azotobacter</i> sp .....	20
3.7 Selección de cepas .....	20
3.8 Identificación de las cepas aisladas .....	21
3.8.1 Identificación morfológica y bioquímica.....	21
Tinción de Gram .....	21
Citrato Simmons .....	21
Ureasa .....	22

Catalasa.....	22
Oxidasa .....	22
3.8.2 Identificación molecular .....	22
3.9 Evaluación del efecto biofertilizante de las cepas aisladas.....	23
3.9.1 Preparación del inóculo .....	23
3.10 Diseño Experimental.....	23
3.11 Bioensayo.....	24
CAPÍTULO IV.....	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
4.1 Aislamiento de bacterias diazotróficas .....	25
4.1.2 Morfología .....	26
4.1.3 Pruebas bioquímicas .....	27
4.2 Identificación molecular .....	28
4.3 Bioensayo.....	31
4.3.1 Contenido de nitrógeno.....	31
4.3.2 Altura de hojas .....	33
4.3.3 Materia seca de hojas .....	35
4.3.4 Materia seca de raíces .....	37
RECOMENDACIONES .....	40
BIBLIOGRAFÍA.....	41
ANEXOS.....	54

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Valores observados de microorganismos presentes en el suelo</i> .....	10
Tabla 2 <i>Identificación molecular de las 6 cepas seleccionadas</i> .....	29

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 . <i>Uso de fertilizantes y plaguicidas</i> .....	4
Figura 2 <i>Mapa del área donde se tomó la muestra para el estudio</i> .....	18
Figura 3. <i>Macroscopía de las cepas cultivadas en medio NRc (a, b) y S (c,d)</i> .....	21
Figura 4. <i>Tinción de Gram negativa de las cepas aisladas a) medio NRc b) y S</i> .....	21
Figura 5 <i>Identificación de bacterias fijadoras de nitrógeno en suspensión líquida después de 7 días de incubación</i> .....	25

Figura 6 <i>Macroscopía de los aislados</i> .....	26
Figura 7 <i>Pruebas bioquímicas a) Ureasa (+), b) Citrato (+), c) Catalasa (+), d) Oxidasa (+)</i> .....	27
Figura 8. <i>Contenido de nitrógeno (%) después de 20 días de inoculación en los tratamientos. *=diferencias significativas. Barras de error representan la desviación estándar.</i> .....	31
Figura 9 <i>Contenido de nitrógeno (%) en la variable cepas. Letras diferentes representan diferencias significativas. Barras de error representan la desviación estándar</i> .....	32
Figura 10 <i>Altura de hojas después de 20 días de inoculación en los tratamientos. *=diferencias significativas. Barras de error representan la desviación estándar.</i> .....	34
Figura 11 <i>Materia seca de hojas después de 20 días de inoculación en los tratamientos. *=diferencias significativas. Barras de error representan la desviación estándar</i> .....	36
Figura 12. <i>Efecto de las cepas en la producción de materia seca de hojas en la variable cepas. Letras diferentes representan diferencias significativas. Barras de error representan la desviación estándar</i> .....	37
Figura 13. <i>Materia seca de raíces después de 20 días de inoculación en los tratamientos. *=diferencias significativas. Barras de error representan la desviación estándar.</i> .....	38

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. <i>Preparación de las concentraciones <math>1 \cdot 10^6</math>, <math>1 \cdot 10^8</math> y <math>1 \cdot 10^9</math> células/mL</i> .....	57
Anexo 2. <i>Diseño experimental por bloques completos al azar</i> .....	58
Anexo 3. <i>Bioensayos en macetas</i> .....	59
Anexo 4. <i>Anova de normalidad de las variables evaluadas</i> .....	59
Anexo 5. <i>Anova de las variables evaluadas en el bioensayo</i> .....	60
Anexo 6. <i>Valores de contenido de nitrógeno (%) Tukey</i> .....	60
Anexo 7 <i>Tukey de la variable materia seca de hojas(g).</i> .....	61
Anexo 8 <i>Variables evaluadas</i> .....	61

## RESUMEN

Uno de los principales retos para el siglo XXI es lograr la producción de alimento suficiente para satisfacer el aumento de la población, por ello la base de la producción en el Ecuador y en el mundo son los agroquímicos o productos de síntesis química que han provocado pérdida de las propiedades microbiológicas, desertificación y erosión del suelo además afectaciones a la salud humana. Es así como se ha desarrollado una alternativa mediante el uso de microorganismos promotores de crecimiento vegetal (PGPR) contribuyendo al desarrollo sostenible que favorece a los cultivos agrícolas, con mayor productividad y rentabilidad. En esta presente investigación se evaluó la capacidad de biofertilización de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas a partir de suelos cultivados con pasto Ryegrass. Una vez aisladas se caracterizó molecularmente, obteniendo las especies *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus safensis*, *Pseudomonas* spp, *Enterobacter asburiae*, aunque no fueron las bacterias requeridas, igualmente se realizó la evaluación de forma ex situ mediante un bioensayo en pasto por 20 días, aplicando 5 dosis con 3 concentraciones, donde se evaluó contenido de nitrógeno foliar (%), altura de hojas (cm), materia seca de hojas y raíces (g). Todas las bacterias encontradas fijaron nitrógeno, y fueron positivas en todas las variables evaluadas en pasto, a partir de las cuales se puede obtener biofertilizante de síntesis biológica con potencial de reemplazo de fertilizantes químicos nitrogenados transformando así la agricultura intensiva en una agricultura orgánica y ecológica fomentando la conservación del suelo y reduciendo la contaminación del ambiente.

**Palabras clave:** PGPR, Rizósfera, Ryegrass, Diazotróficas, Agrobiotecnología, Biofertilizante

## ABSTRACT

One of the biggest challenges for the XXI century is to approach the production of enough food to satisfy population growth. Accordingly, Ecuador and the world's production base lay on agrochemicals or chemically synthesized products that have provoked losses of microbiological properties, desertification, and soil erosion, besides issues on human health.

Consequently, an alternative has been conceived through the usage of plant growth-promoting microorganisms (PGPR), contributing to sustainable development that enhances crops with higher productivity and profitability.

The current investigation assesses the bio fertilization capacity of nitrogen-fixing bacteria isolated from soils cultivated with Ryegrass.

Once they were isolated, molecular characterization of the species *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus safensis*, *Pseudomonas* spp, *Enterobacter asburiae* was carried out. Despite those being not the bacteria required, equally an ex-situ evaluation thorough a bio essay in the grass for 20 days, applying five doses with three concentrations was done; where the content of foliar nitrogen (%), leaves height (cm), leaves and roots dry matter (g), were considered.

All the bacterias found, fixed nitrogen, and were positive in all the variables evaluated into the grass. Hence, a biofertilizer of biological synthesis could be obtained, holding the potential to replace chemical nitrogenated fertilizers, and transform intensive agriculture into organic and ecological agriculture, promoting soil conservation and reducing the environmental pollution.

**Keywords:** PGPR, Rhizosphere, Ryegrass, Diazotrophic, Agrobiotechnology, Biofertilizer

# CAPITULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

El suelo es un componente esencial del ambiente en el cual se desarrolla la vida. Se caracteriza por ser vulnerable y de difícil y larga recuperación ya que tarda de cientos a miles de años en formarse. Además posee una extensión limitada, por lo que se considera un recurso natural no renovable (Silva y Correa, 2009). Este recurso se utiliza intensivamente con fines agrícolas, ganaderos y mineros debido a su capacidad de almacenar compuestos orgánicos e inorgánicos fundamentales para la existencia de todos los seres vivos. Además la transformación de la materia orgánica presente en el suelo se debe a un gran número de organismos que habitan en él (Bot y Benites, 2005).

El suelo posee macronutrientes para el crecimiento de plantas, entre ellos el nitrógeno es fundamental para la síntesis de clorofila, de aminoácidos y nucleótidos. (Infoagro, 2017). Sin embargo, el nitrógeno es considerado un nutriente que se encuentra disponible en una cantidad mínima para las plantas. La baja disponibilidad de este elemento explica en parte el uso intensivo de químicos nitrogenados en la agricultura con el fin de obtener más y mejores alimentos (Abedon, 2016). El uso continuo de estos productos trae consigo consecuencias al ambiente, el suelo y por ende al ser humano (De Noni y Trujillo, 2010).

Los insumos agrícolas de síntesis química contribuyen con el efecto invernadero, pérdida de biodiversidad, degradación del suelo y su salinización (FAO, 2002). Por ello la agricultura moderna busca alternativas ecológicas, para lograr mejores rendimientos en los cultivos, reduciendo al mismo tiempo los impactos sobre el medioambiente. El uso de biofertilizantes a base de microorganismos benéficos del suelo es una de las alternativas que presenta la biotecnología y se basa en la capacidad que tienen estos organismos para promover el crecimiento de las plantas y actuar como agentes de biocontrol mejorando la nutrición y salud vegetal (Moreno et al., 2018).

En el Artículo 2 del Convenio de la Diversidad Biológica (CBD), (1992) se afirma que la biotecnología es toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados en la alimentación y en la agricultura para beneficio de

la biodiversidad agrícola. Es así, que la FAO ha fortalecido y promovido actividades de manejo sostenible para mantener suelos saludables, entablando una relación con los objetivos del desarrollo sostenible por medio de la agricultura ecológica (FAO, 2003).

Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal, Plant growth promoting rizobacteria o (PGPR por sus siglas en inglés,) son un conjunto de bacterias de vida libre que colonizan y habitan en la rizosfera. Se caracterizan por que producen beneficios (Ruane y Sonnino, 2011). tales como: solubilizar el fosfato, producción de hormonas vegetales que estimulan el crecimiento, mejorar la capacidad de la absorción de agua y minerales, mejorar del desarrollo de la raíz, aumento de la actividad enzimática, y proteger a las plantas del ataque y colonización de organismos fitopatógenos supresión de patógenos que son de gran impacto en la agricultura (Pérez-Montaña et al., 2014).

Las PGPR se localizan en la rizosfera, la cual es una región de intensa actividad microbiana impulsada por la exudación radicular. Los géneros más comunes son: *Azotobacter*, *Arthobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Hydrogenophaga*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, y *Azospirillum*. Destacándose principalmente por su aplicación los géneros: *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Acetobacter*, *Azotobacter*, *Achromobacter*, (Kumar et al., 2015).

Por otro lado, las gramíneas forrajeras tienen gran importancia en las áreas dedicadas a las explotaciones de ganado, el cual debe tener alta palatabilidad y digestibilidad, para que sean las más idóneas en los sistemas de forraje y de ganado, es por ello que se considera fuente alta de microorganismos fijadores de nitrógeno (Castellano et al., 2016).

Se han aislado PGPR a partir de la rizosfera de muchos pastos y cereales en todo el mundo, tanto en zonas tropicales, como en climas templados. Las bacterias del género *Azospirillum* demostraron ejercer mejores beneficios en crecimiento y rendimiento de los pastos tanto en invernadero como en campo (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000). En *Pennisetum clandestinum* (kikuyo) promovieron su crecimiento y se lograron efectos relevantes en producción de biomasa 100 días después de la siembra con eficiencia en la fijación biológica de nitrógeno (Criollo et al., 2013). Por esta razón, la aplicación de

inoculantes o PGPR para la mejora de la producción agrícola sostenible se convirtió en una práctica aceptada en la agricultura en muchas partes del mundo (Majeed et al., 2015).

En el ryegrass anual (*Lolium multiflorum*) es importante en el balance de nitrógeno, por ello las investigaciones se han centrado en la búsqueda de PGPR caracterizadas por su capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico. Este tipo de bacterias se conocen como diazotróficas (Castanheira et al., 2014). Estudios realizados en *L. perenne* identificaron 9 géneros: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter*, *Acetobacter*, *Azotobacter*, *Achromobacter*, capaces de producir sideróforos y con potencial en la fijación de nitrógeno (Castellano et al., 2016).

Las PGPR aisladas de *L. perenne* se evaluaron para promover el crecimiento vegetal confirmando la capacidad de producir ácido indol-3-acético y solubilización del fosfato (62%), capacidad para la motilidad (55%), producción enzimas celulíticas (62%), sideróforos (45%), amonio (41%) y cianuro de hidrógeno (38%). En la gramínea conocida como hierba kallar (*Leptochloa fusca*) se ha encontrado una serie de bacterias diazotróficas que se aislaron y caracterizaron de diversas fracciones de la raíz que han sido ampliamente estudiados con respecto a la fijación de nitrógeno como son los géneros *Azospirillum* en el interior de la raíz (Lazarovits, 1997).

Otra gramínea es el trigo (*Triticum aestivum*) donde se han aislado bacterias de la rizosfera, y se encontraron nueve aislados bacterianos entre ellos *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*. Estos microorganismos se purificaron y se evaluó sus efectos benéficos logrando un aumento significativo en la longitud y biomasa de los brotes en contenidos de Nitrógeno (hasta 76%) y raíces hasta 32% (Majeed et al., 2015).

## **1.2 Problema de investigación**

En el Ecuador la base del sector agrícola es el uso de fertilizantes químico sintéticos nitrogenados para mantener altas producciones agrícolas (De Noni y Trujillo, 2010). Sin embargo, no se toma en cuenta los daños que pueden ocasionar, afectando a los ciclos biogeoquímicos de estos nutrientes, contaminando aguas subterráneas y superficiales, incrementando los riesgos de intoxicaciones químicas y aumentando los niveles de gases de efecto invernadero (Olivares, 2018).

Es así, que en el año 2019 el 56,5% aplicaron insumos de síntesis química, mientras que el 3,0 % del área cultivada usaron únicamente insumos orgánicos de la superficie con cultivos permanentes (INEC, 2019).



**Figura 1 . Uso de fertilizantes y plaguicidas**

Fuente: (INEC- ESPAC, 2019)

La afectación como consumidores es alta ya que se obtienen productos con menor calidad, con cantidades altas de químicos, que son peligrosos para el consumo humano y animal, considerando que el mayor porcentaje de la alimentación se compone de productos derivados del campo (Zambrano et al., 2015).

El mayor problema es la erosión, provocando desgaste físico, pérdida de la actividad microbiana, comprometiendo su fertilidad, productividad, saturando el suelo y anulando la eficacia de otros nutrientes. Los suelos degradados, contaminados y empobrecidos provocan desbalances en los agroecosistemas (Majeed et al., 2015; Suquilanda, 2015).

En las plantas producen la aparición de plagas cada vez más resistentes, incrementan la salinidad de los suelos entorpeciendo la absorción de nutrientes y promoviendo la erosión de este lo que desencadena en la disminución de la producción (Cortez, 2012). En humanos estas sustancias químicas son predisponentes de enfermedades. Se estima que cada año ocurren alrededor de tres millones de intoxicaciones por agroquímicos en

el Ecuador, en la Provincia de Imbabura se ha podido evidenciar en los últimos años un incremento de las enfermedades de origen digestivo, dermatológico y respiratorio relacionado íntimamente con el uso de estos (Guerrero, 2012).

Por consiguiente, la soberanía agroalimentaria de la sociedad ecuatoriana, de las actividad campesina y ganadera es muy importante económicamente para la industria alimenticia e industria textil. La producción ganadera depende de la nutrición adecuada y correcta de los animales, requiere alto contenido de nitrógeno en los pastos por ser un elemento importante en la formación de proteínas tanto en lácteos como en cárnicos, aportando a un sector muy importante (Turan et al., 2012).

Los productos orgánicos son desconocidos y no existen suficientes productos orgánicos al alcance de los agricultores, siendo en parte una razón que explica su baja aplicación, es por ello la importancia de trabajar con especies bacterianas nativas para la generación de otros productos que puedan integrarse a otras prácticas más amigables con el ambiente.

### **1.3 Justificación**

El suelo es considerado un recurso natural vital por lo que se debe encontrar la mejor manera de conservarlo. Debido a esto, se busca garantizar la producción de pastos y agrícola en general mediante la agricultura sostenible, que permita desarrollar sistemas que sean productivos, rentables, amigables con el medio ambiente, preservadores de los recursos naturales, sostenibles en el tiempo y que aseguren alimento sano y de calidad y obteniendo pastos con los nutrientes requeridos por los animales (FAO, 2012; Higa y Parr, 2013). Aportando al sector con labor agropecuario más extenso que son áreas cultivadas con pastos con un 38.85% en pastos cultivados y 28.17% en pastos naturales, aportando de gran manera a la producción ganadera.

Por tal razón, los microorganismos se consideren punto de desarrollo como bien estratégico de la agrobiodiversidad de los países megadiversos (FAO, 2002). Este recurso genético de alta importancia en la agricultura y en el cultivo de pasto beneficiando la

productividad, sostenibilidad agrícola, es ambientalmente segura y socialmente aceptable (Fuentes y Caballero, 2005; Hernández et al., 2011; Syed y Prasad, 2019).

En el marco de la necesidad de incrementar la producción agrícola y cultivo de pastos nutritivos junto con la preservación del ambiente, los microorganismos PGPR (Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal) son vistos como una fuente esencial y potencial de nutrientes para los cultivos (McInnes y Haq, 2007). El empleo de bacterias fijadoras de nitrógeno representa una gran oportunidad para la producción de pastos ya que el nitrógeno fijado en el suelo por las bacterias se encuentra disponible directamente justo en el lugar (rizosfera) donde es requerido (Hernández et al., 2011; SIDDIQUI, 2006). Mientras que los fertilizantes inorgánicos aplicados al suelo sufren una pérdida de hasta el 50% debido a procesos naturales de lixiviación y desnitrificación. Además, la excesiva lixiviación de los fertilizantes inorgánicos puede dar lugar a la contaminación de las aguas subterráneas, ríos y lagos causando daños ecológicos, y puede constituir un riesgo para la salud animal y humana. (Aguinaga et al., 2013)

En la actualidad el estudio de otros microorganismos promotores del crecimiento de los cultivos cobra más valor, ya que pueden evitar el uso abusivo de fertilizantes nitrogenados (Lobo Arias, 2008; Richardson, 2007). El desarrollo de nuevas tecnologías a base de microorganismos biológicos, aportando al sector más importante de la matriz productiva del país, enmarcándose dentro de los objetivos del desarrollo sostenible y el Plan toda una vida (FAO, 2019; Instituto Internacional de Nutrición de Plantas (IPNI), 2014; *Plan Nacional de Desarrollo 2017-2021-Toda una Vida*, 2017).

La biofertilización nitrogenada constituye una interesante alternativa al empleo de los fertilizantes minerales tradicionales en la agricultura moderna. Con el uso en suelos agrícolas de bacterias capaces de fijar un nutriente tan esencial como el nitrógeno se conseguirá, por una parte, disminuir los aportes nitrogenados inorgánicos, y por otra, colaborar en la obtención de metodologías no contaminantes y adecuadas desde un punto de vista medioambiental (Reyes, 2011).

De esta forma, se quiere transformar la agricultura intensiva en una agricultura orgánica y ecológica con una amplitud de beneficios para obtener alimentos sanos para el consumo humano y alimento con alto contenido nutricional en los pastos para el ganado y llegando aún más allá obteniendo productos de amplio espectro, utilizándolos en cualquier tipo de cultivo. Generando la oportunidad para la aplicación de la biotecnología que permitiría el acceso a nuevos mercados que prefieren productos orgánicos (Ruane y Sonnino, 2011, 2013).

## **1.4 Objetivos**

### ***1.4.1 Objetivo general***

Evaluar el efecto biofertilizante de bacterias de los géneros *Azospirillum* y *Azotobacter* aisladas de suelos cultivados con pasto Ryegrass (*Lolium multiflorum*) Evaluar el efecto biofertilizante de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de suelos cultivados con pasto Ryegrass (*Lolium multiflorum*)

### ***1.4.2 Objetivos específicos***

- Aislar bacterias de los géneros *Azospirillum* y *Azotobacter* en suelos cultivados con pasto Ryegrass (*Lolium multiflorum*). Aislar bacterias fijadoras de nitrógeno en suelos cultivados con pasto Ryegrass (*Lolium multiflorum*).
- Identificar molecularmente las bacterias aisladas.
- Evaluar el efecto biofertilizante de las cepas de bacterias fijadoras de nitrógeno mediante bioensayos en plántulas de pasto.

## **1.5 Hipótesis**

La inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno en cultivos de pasto promueve el crecimiento.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 El suelo

El término suelo, se define como la capa superior de la tierra, considerada una mezcla de partículas pulverulentas, de agua y aire que provee de los elementos nutritivos necesarios para las plantas y posee una amplia funcionalidad, donde se prioriza la agricultura, que debe poseer las condiciones necesarias para un buen rendimiento y desarrollo (Nadeem et al., 2013).

#### 2.2 Propiedades del suelo

##### 2.2.1 Propiedades físicas del suelo

Las propiedades físicas de los suelos, como son la rigidez y la fuerza de sostenimiento, la facilidad para la penetración de las raíces, la aireación, la capacidad de drenaje y de almacenamiento de agua, la plasticidad y la retención de nutriente determinan la condición física del suelo (Zambrano et al., 2012).

##### 2.2.2 Propiedades químicas del suelo

Las propiedades químicas del suelo dependen de la proporción de los distintos minerales y sustancias orgánicas que lo componen. Al descomponer las plantas y animales muertos, los microorganismos liberan los nutrientes permitiendo que puedan ser utilizados nuevamente por las plantas (Delgado, 2015; Zambrano et al., 2012)

##### 2.2.2.1 Macronutrientes.

Dentro del grupo de los macronutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas en grandes cantidades están N, P, K, Ca, Mg y S, en el que se destaca el:

**Nitrógeno (N).** - Es un nutriente esencial para el crecimiento de los vegetales, ya que es un constituyente de todas las proteínas, es absorbido por las raíces generalmente bajo las formas (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), se estima que alrededor del 98 % del N del suelo se encuentra en forma inorgánica, insoluble en agua y por lo tanto no disponible en forma inmediata para las plantas. El contenido de N en los suelos varía en un amplio espectro, pero valores normales para la capa arable son del 0.2 al 0.7 %. (García y Dorronsoro, 2013; Silva y Correa, 2009)

#### **2.2.2.2. Micronutrientes.**

Son los elementos requeridos en pequeñas cantidades por las plantas o animales, necesarios para que los organismos completen su ciclo vital como Fe-Mn-B-Mo-Cu-Zn-Cl (López et al., 2015).

#### **2.2.2.3. Materia Orgánica.**

La materia orgánica del suelo representa la principal fuente de fitonutrientes en ecosistemas terrestres naturales, tiene efectos importantes en el intercambio iónico, el almacenamiento de humedad, y la capacidad de infiltración del suelo, además es el principal sustrato proveedor de energía para el microbiota del suelo. (Infoagro, 2017).

### **2.2.3 Propiedades biológicas del suelo**

Están relacionadas con la presencia de organismos vivos que habitan en el suelo y que mantienen una relación de dependencia mutua con él mediante varios procesos como son Carbono, Fósforo, entre otros y el que más se destaca en esta investigación el nitrógeno (Infoagro, 2017).

#### **2.2.3.1 Proceso Biológico del nitrógeno**

Los procesos principales que componen el ciclo del son cinco:

1. Amonificación: es la conversión del nitrógeno que en la materia viva aparece principalmente como grupos amino (-NH<sub>2</sub>) o imino (-NH-) a ion amonio.
2. Nitrificación: el amonio es oxidado a nitrato.
3. Asimilación: el nitrógeno es absorbido y asimilado por las plantas.

Los microorganismos, particularmente las bacterias, juegan un importante papel en todas las principales transformaciones del nitrógeno. Como procesos de mediación microbiana, son los más rápidos que otros procesos (Iñon, 2017).

## **2.3 Ecología del suelo**

### **2.3.1 Microbiota**

Los microorganismos presentes en el suelo son bacterias, actinomicetos y hongos (Tabla 1), que favorecen la unión de las partículas del suelo por mecanismos de adsorción, además intervienen en la transformación de la materia orgánica (Prasad et al., 2016).

**Tabla 1**

*Valores observados de microorganismos presentes en el suelo*

GRUPOS FUNCIONALES	UFC*1000/g de suelo
Bacterias	1000-100000
Actinomicetos	100-10000
Hongos	1-100

Fuente: (Albanesi, 2013)

### **2.3.1.1 Bacterias**

Las bacterias son el grupo de microorganismos simples más numeroso, que constan de células individuales, pero debido a su pequeño tamaño (1-10  $\mu\text{m}$ ), se conocen alrededor de 1 600 especies, que representan menos del 10% de la biomasa del suelo, lo puede alcanzar entre 300 y 3.000 Kg/ha-1. Se estima que un gramo de suelo puede contener de 108 a 1010 bacterias, en su mayoría son saprófitas. (Godfrey y Jackson, 2019).

Las funciones bacterianas importantes en los ecosistemas se encuentran distribuidas entre diferentes grupos tróficos e incluyen: formación de humus mediante descomposición de exudados y restos vegetales, síntesis de nuevos compuestos, liberación de nutrientes a partir de formas inorgánicas insolubles, transformación del N<sub>2</sub> atmosférico a N disponible para las plantas, aireación e infiltración de agua, acción antagónica contra insectos, patógenos de plantas y malezas (Glick y Bashan, 2007).

### **2.3.2 Microfauna**

La microfauna se refiere a las formas de vida animal de ancho menor a 0.1 mm, que incluye principalmente protozoarios, rotíferos y nemátodos que son abundantes en el suelo. El principal papel de la microfauna en el suelo es la disgregación de la materia orgánica y la diseminación de la microflora, donde son importantes en el ciclo de los nutrientes en los ecosistemas (Gentili & Jumpponen, 2006).

Son capaces de digerir casi cualquier sustancia orgánica, y algunas sustancias inorgánicas como son los descomponedores desempeñan un papel importante en la descomposición de muchos materiales orgánicos, sobre todo cuando los niveles de humedad son altos (Gentili & Jumpponen, 2006)

## **2.4 Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal**

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés) que promueven el crecimiento de las plantas son simbioses universales de las plantas superiores, estas pueden ser de vida libre o asociativa, aerobias, anaerobias o anaerobias facultativas, que mejoran el potencial de adaptación de sus huéspedes a través de una serie de mecanismos (Kravchenko et al., 2002).

## **2.5 Ecología de las PGPR**

Existen dos tipos de bacterias del suelo que producen beneficios a plantas, aquellas que establecen una relación simbiótica y las que no, denominadas de “vida libre”. Estas últimas a menudo se encuentran cerca, sobre las raíces o dentro de las mismas (endófitas) (Echevarria, 2011).

Por otro lado, las bacterias no simbióticas del suelo que son benéficas para las plantas son conocidas como PGPR que deben cumplir ciertas características: ser capaces de colonizar la raíz y/o su zona de influencia; sobrevivir y multiplicarse en los micro-hábitat asociados a la superficie de la raíz y estimular el crecimiento vegetal (Echevarria, 2011).

Dentro de este grupo encontramos bacterias las bacterias fijadoras de nitrógeno que viven en nódulos de las raíces de leguminosas que extraen el nitrógeno del aire y lo convierten en formas que la planta puede usar *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Gluconobacter*, *Flavobacterium* y *Azotobacter* (Youseif, 2018).

## **2.6 Mecanismos de acción de los PGPR**

### **2.6.1 Mecanismos indirectos**

Los metabolitos producidos pueden funcionar como antagonistas de otras especies, ejerciendo así una actividad de control biológico, ya que evitan la propagación de organismos perjudiciales para las plantas gracias a la producción de sideróforos, antibióticos, acción de enzimas líticas (glucanasas, quitinasas) o inducción de mecanismos de resistencia (Callaghan et al., 2006).

### **2.6.1.1 Producción de fitoalexinas**

Cumplen un papel importante, aportando a las plantas resistencia a enfermedades. En la planta las PGPR incrementan la producción de fitoalexinas, incrementando el fortalecimiento de la pared celular y la producción de proteínas antifúngica (Sanchez et al., 2016). Por ejemplo, algunos pueden sintetizar cianuro de hidrógeno que se ha relacionado con la capacidad de esas cepas para inhibir algunos hongos patógenos y bacterias, obteniendo efectos inmediatos, reducción de las actividades metabólicas de los microorganismos patógenos y así este metabolito puede actuar de en el control biológico (Wu et al., 2005).

### **2.6.1.2 Producción de sideróforos**

El hierro es un nutriente esencial para las plantas, actuando como cofactor en una serie de procesos importantes como respiración, fotosíntesis y la fijación de nitrógeno (Rout y Sahoo, 2015). Es muy abundante por lo general en suelos, pero su especie química predominante es ión  $Fe^{+3}$ , forma que reacciona para dar óxidos e hidróxidos que son insolubles y por tanto inaccesibles para las plantas y los microorganismos (Colombo et al., 2014)

### **2.6.1.3 Producción de antibióticos**

Las PGPR también excretan como metabolitos secundarios sustancias antibióticas como en el género *Pseudomonas* y *Bacillus* presentan una agresiva colonización de estos metabolitos en la rizosfera, desplazando así a otras bacterias y hongos perjudiciales para las plantas (Dawwam et al., 2013).

## **2.6.2 Mecanismos directos**

Las PGPR le proporcionan a la planta compuestos al producir metabolitos reguladores del crecimiento o precursores de éstos, y le producen así un beneficio a la planta (Saharan y Nehra, 2011)

### **2.6.2.1 Producción de Fitohormonas.**

El mecanismo de acción directo de las PGPR es la producción de fitohormonas. Algunas especies de los géneros *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Bacillus* liberan ácido indolacético (AIA), giberelinas o citoquinas en la rizosfera de las plantas,

ejerciendo un efecto estimulador del crecimiento, especialmente en estado de plántulas (Benjumeda, 2017).

La promoción del desarrollo del sistema radical característico de este tipo de reguladores de crecimiento vegetal es uno de los parámetros utilizados para determinar la efectividad de determinadas estas bacterias (Benjumeda, 2017).

#### **2.6.2.2 Solubilización de fósforo**

El Fósforo (P), es de gran importancia para la planta es siendo uno de los seis macronutrientes esenciales requerido para el crecimiento, desarrollo de las plantas y participación en variados procesos relacionados con el desarrollo y rendimiento (Sanchez et al., 2016).

El propósito principal de las bacterias solubilizadoras de fosfato es optimizar la disponibilidad para las plantas de dicho elemento en el suelo, lo que genera un incremento en el rendimiento de cosechas ya que cambian las formas insolubles del P en el suelo en formas solubles, por lo tanto son fundamentales para asegurar un mejor y mayor uso del fósforo en el suelo (Dawwam et al., 2013).

#### **2.6.2.3 Fijación Biológica de Nitrógeno**

- Fijación simbiótica

La fijación simbiótica se lleva a cabo entre especies de leguminosas y bacterias fijadoras de nitrógeno y están presentes en los nódulos de raíces de leguminosas contribuyendo con la mayor cantidad de nitrógeno fijado en especies agrícolas (Cardinale et al., 2015). La bacteria captura el nitrógeno gaseoso y lo incorpora a su citoplasma, la planta proporciona carbohidratos a la bacteria. Estos carbohidratos posteriormente se oxidan y brindan energía a la bacteria. A cambio, la bacteria proporciona a la planta proteínas y aminoácidos. Esta fijación de nitrógeno es posible solo mediante el intercambio (simbiosis) de la planta y la bacteria (Calvo, 2011).

- Fijación asimbiótica

La fijación asimbiótica del nitrógeno en el suelo es realizada por microorganismos como bacterias de vida libre y algas azul-verdes (Stamenov et al., 2012). Existen bacterias y algas capaces de fijar el nitrógeno atmosférico incorporándolo a su propio organismo y al morir la bacteria o el alga, el nitrógeno se incorpora al suelo. Las bacterias *Clostridium*

y *Azotobacter* son representantes de esta forma no simbiótica de fijar nitrógeno (Flores et al., 2012).

### **2.7 *Azospirillum* sp**

Este género está formado por bacterias gram negativas, que presentan forma de bacilo y cocos con un tamaño de 1-4  $\mu\text{m}$  de vida libre y que son fijadoras de N, y utilizan como fuente de nitrógeno sustratos como nitrato, amonio y aminoácidos poseen un metabolismo versátil, tiene la capacidad de adherirse a las raíces por lo que tiende a colonizar la parte de la elongación celular además de los pelos radiculares (Cassán et al., 2015).

En la actualidad se reconocen siete especies en el género *Azospirillum*. Las que primero fueron descritas son: *A. lipoferum* y *A. brasilense*, que luego fueron descritas como *A. amazonense*, *A. halopraferans*, *A. irakense* y *A. largimobile*. Recientemente, en honor a quien impulsara los estudios con este género bacteriano y descubriera otros diazotrofos, se ha propuesto la especie candidata *A. doebereineriae* y generalmente se han aislado de diferentes tipos de pastos y cereales alrededor del mundo (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

El aislamiento de estos microorganismos se realiza con medios libres de nitrógeno, de los cuáles el más comúnmente usado es el medio NFb en el cual según se modifique el pH se aíslan diversas especies. Generalmente en este medio de cultivo se desarrollan las especies *A. lipoferum* y *A. brasilense*, las cuales adoptan un tono rojo escarlata para diferenciarse en el medio (Gonzalez, 2015; Román et al., 2013).

### **2.8 *Azotobacter* sp**

Las bacterias pertenecientes a este género están formado por bacterias gram negativas, tienen forma de bacilo y cocos con un tamaño de 1-4  $\mu\text{m}$  de vida libre, formando parte de las familias *Azotobacteriaceae*, se destacan por ser fijadoras de N, debido a su asociación de tipo libre que mantiene esta con la planta, la bacteria puede asociarse a diferentes tipos de suelos, aunque su participación se encuentra por lo general en gramíneas (Aguado et al., 2004; Wu et al., 2005). Estas bacterias favorecen el crecimiento vegetal especialmente

en estado de plántula se basa en la liberación de ácido indol-acético considerada una auxina natural reguladora de crecimiento (Medina et al., 2014).

Se describieron por primera vez por Beijerinck en 1901 varias especies: *Azotobacter chroococcum* por Beijerinck en 1901, *A. vinelandii* por Lipman en 1903, *A. agilis* por Beijerinck y Winogradsky en 1938 y *A. paspali* por Döbereiner en 1966; desde este momento hasta nuestros días, estas bacterias han llamado la atención de numerosos investigadores por su importancia agrícola (Ruane & Sonnino, 2013). *Azotobacter* ha sido y es, uno de los estudio más interesantes, la cual se cultiva en medios libres de nitrógeno, siendo el medio Ashby el más usado en esta especie adoptando un tono blanco transparente (Jiménez et al., 2011).

## **2.9 Efecto de bacterias diazotróficas sobre el crecimiento, fertilidad y desarrollo de las plantas.**

La aplicación práctica de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno ha sido positiva, evidenciando notables incrementos en los rendimientos en diferentes cultivos, principalmente en cereales. Estos resultados obtenidos, no deben atribuirse exclusivamente a la ganancia de nitrógeno por las plantas, ya que estos microorganismos solubilizan fosfatos y sintetizan sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal como tiamina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, biotina, ácido indol acético (AIA), ácido giberélico y citoquininas, que intervienen directamente sobre el desarrollo de las plantas (Hernández et al., 2014)

En el cultivo de trigo (*Triticum aestivum*) demostraron que tanto *Azospirillum* spp. y *Azotobacter beijerinckii* transformaron los exudados radicales, en sustancias promotoras del crecimiento vegetal, lo cual favoreció la absorción de urea en las raíces, al mismo tiempo que redujeron el consumo de urea en un 50%. La gramínea alcanzó un peso seco similar al del trigo fertilizado sólo con 100% de urea, sin inocular, obteniendo un ahorro de fertilizante nitrogenado, que permite mantener la fertilidad del suelo, sin causar contaminación ambiental (García, 2010; Syed y Prasad, 2019).

Existen reportes del beneficio del uso de biopreparados con base en *Azotobacter* aporta del 30 al 50 % de las necesidades de nitrógeno en los cultivos, con un mejoramiento de la producción y la disminución de la contaminación ambiental, por lo tanto, se disminuye el consumo de fertilizantes nitrogenados (Price, 2010).

## **2.10 Fertilizantes nitrogenados**

Los fertilizantes nitrogenados son un tipo de sustancia inorgánica u orgánica, natural o sintético, que presenta nutrientes que pueden ser asimilados por las plantas y que se adiciona al suelo para mantener, suplir e incrementar elementos esenciales, aporta al crecimiento y desarrollo vegetativo, ya que la falta de nitrógeno causa el crecimiento lento y desequilibrado, destacando la decoloración de las hojas, existe floración y fructificación deficientes, la planta se debilitan y son más propensas a las plagas y enfermedades (Nicholls y Altieri, 2008).

Sin embargo la contaminación por fertilizantes se produce cuando éstos se utilizan en mayor cantidad de la que pueden absorber los cultivos, o cuando se eliminan por acción del agua o del viento de la superficie del suelo antes de que puedan ser absorbidos ya que se aplican intensamente en muchos países, tanto desarrollados como en desarrollo, lo que provoca la afectaciones con compuestos carcinógenos y otros venenos al ser humano y a muchas formas de vida silvestre, reduciendo la biodiversidad (Flores, 2016).

En los países desarrollados, su uso se restringe cada vez más mediante leyes e impuestos. Además, su uso será frenado por la creciente demanda de cultivos orgánicos, producidos sin la adición de productos químicos. Es probable que en el futuro aumente el uso de plaguicidas "inteligentes", variedades de cultivos resistentes y métodos ecológicos de control de plagas (FAO, 2015)

## **2.11 Fertilizantes biológicos (Biofertilizantes)**

Los biofertilizantes se pueden definir como preparados a base de microorganismos que habitan normalmente en el suelo, estos son capaces de disponer en la planta mediante su actividad biológica, minerales y sustancias para el desarrollo de esta. Son caracterizados por su eficiencia en fijar nitrógeno, solubilizar fósforo y potencializar diversos nutrientes,

o sustancias producidas biológicamente que estimulan el crecimiento y la germinación vegetal (Mishra et al., 2013; Sun et al., 2020).

Los biofertilizantes pueden considerarse como tecnologías “apropiables”, término creado por FAO para las herramientas biotecnológicas que contribuyen al desarrollo sostenible y que proveen beneficios tangibles a los destinatarios, son ambientalmente seguras y socioeconómicas y culturalmente adaptables (FAO, 2002, 2015).

El uso de bacterias fijadoras de nitrógeno como biofertilizantes, se presenta desde la “revolución verde”, hacia el manejo sustentable de los recursos naturales conllevó al desarrollo de actividades más amigables con el suelo, el agua y la biodiversidad de los cultivos agrícolas. Se dio paso a la agricultura orgánica, ecológica o limpia (Fuentes y Caballero, 2005; Gouda et al., 2018)

#### **2.11.1 Biofertilizantes a partir de bacterias fijadoras de nitrógeno en gramíneas**

Las PGPR en gramíneas, más destacadas pertenecen a los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (Loredo et al., 2004). En los biofertilizantes, los microorganismos que pertenecen a los géneros *Azotobacter* sp, *Azospirillum* spp, y *Pseudomonas* spp, han demostrado incrementos en los rendimientos de los cultivos, ahorro de fertilizantes minerales y la disminución de la contaminación ambiental (Granda et al., 2015).

Acerca de investigaciones de biofertilizantes, se destacan los estudios en la Universidad Nacional de México (UNAM) y el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno (CIFN) México, quienes han desarrollado biofertilizantes empleando a *Azospirillum* spp, produciendo altos rendimientos en cosechas de frijol, maíz, cebada, trigo, café y sorgo con incrementos promedio del 26% en los diferentes cultivos comparados con el testigo (Lovaisa et al., 2018; Ruane y Sonnino, 2011).

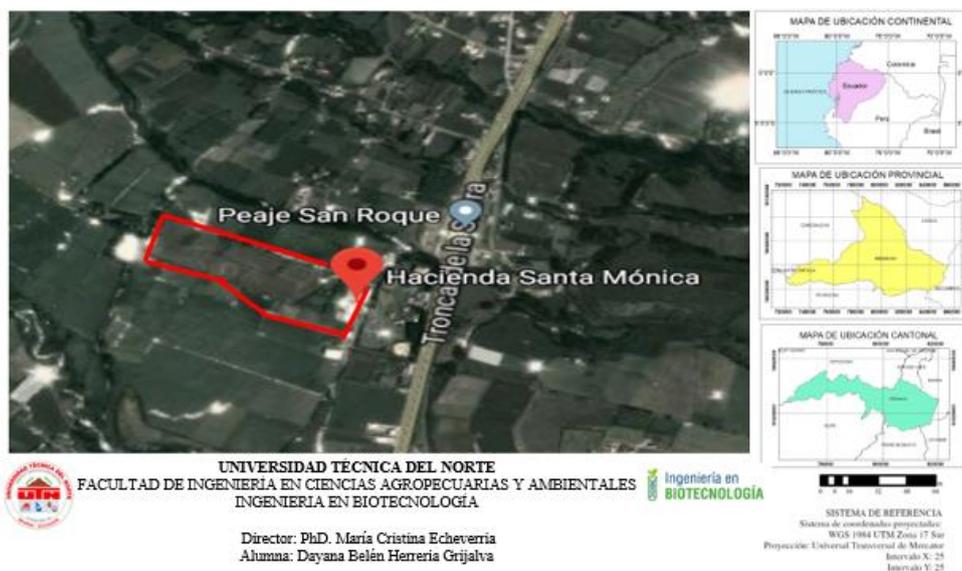
## CAPÍTULO III

### METODOLOGÍA

En el presente capítulo se detallan los métodos utilizados para el aislamiento de los microorganismos, evaluación del efecto biofertilizante y caracterización molecular de los aislados.

#### 3.1 Descripción del área de estudio

Las muestras fueron tomadas en la Hacienda Santa Mónica de la Universidad Técnica del Norte (Figura 1) ubicada en la provincia de Imbabura, cantón Otavalo, en la localidad de San Juan de Ilumán (0.287679, -78.239007).



**Figura 2** Mapa del área donde se tomó la muestra para el estudio

#### 3.2 Fase de Laboratorio

El presente estudio se realizó en el laboratorio de la Empresa ECB (EcoCycleBiotech), ubicado en el sector Bicentenario antiguo aeropuerto, 0.144970, -78.490941, Pje. Amazonas y Río Arajuno, Quito.

### **3.3 Preparación de medios**

#### **3.3.1 Medio libre de Nitrógeno (Nfb)**

Consiste en Ácido DL-málico 0.5 g,  $K_2HPO_4$  0.5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g, NaCl 0.1 g,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.02 g, solución micronutriente 2 ml que se compone de:  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ :0.4 g;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ :0.12 g;  $H_3BO_3$ :1.4 g;  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ :1.0 g;  $MnSO_4 \cdot H_2O$ :1.5 g; Agua destilada 1L, solución de azul de bromotimol (0.5% en 0.2N KOH) 2ml, solución de vitaminas 1 ml que se compone de Biotina 10 mg; Pyridoxol HCL 20 mg; Agua destilada 1 L, agua destilada 1 L.

#### **3.3.2 Nfb rojo Congo (NRc)**

Consiste en Ácido DL-málico 0.5 g,  $K_2HPO_4$  0.5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g, NaCl 0.1 g,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.02 g, solución micronutriente 2 ml que se compone de:  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ :0.4 g;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ :0.12 g;  $H_3BO_3$ :1.4 g;  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ :1.0 g;  $MnSO_4 \cdot H_2O$ :1.5 g; Agua destilada 1L, solución de azul de bromotimol (0.5% en 0.2N KOH) 2ml, solución de vitaminas 1 ml que se compone de Biotina 10 mg; Pyridoxol HCL 20 mg; Agua destilada 1 L, agua destilada 1 L, 15 g de rojo congo.

#### **3.3.3 Ashby (S)**

El medio Ashby se compone de sacarosa 10 g,  $KH_2PO_4$  0.2 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g,  $CaCl_2$  2 g,  $CaSO_4$  0.2 g,  $CaCO_3$  5 g.

### **3.4 Recolección de muestras de suelo**

La recolección de muestras se realizó siguiendo un muestreo aleatorio simple con la metodología zigzag (IPNI, 2014). Las muestras fueron tomadas a una profundidad de 7-10 cm de profundidad utilizando una pala recta. Se tomaron 15 submuestras en una hectárea que posteriormente se mezclaron, empaquetaron y etiquetaron para obtener una muestra significativa del lugar. Aproximadamente se recolectó 1 kg por hectárea (Cooper & Rao, 2006). Por cada muestra tomada se anotaron los siguientes datos: tipo de cultivo, lugar de muestreo, número de muestra, fecha, y hora de muestreo. Se transportó el suelo a una temperatura de 37°C (Carretero et al., 2016).

### **3.5 Aislamiento de bacterias diazotróficas**

Para el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno se pesaron 10 g de suelo rizosférico, y se colocaron en un matraz con 90g de agua destilada estéril para posteriormente ser agitado durante 15 minutos. A continuación, se aplicó la técnica de las diluciones seriadas hasta obtener una *concentración de suelo igual a  $1 \times 10^{-6}$  gr/mL*. Se inocularon 100  $\mu$ l de dilución en tubos, previamente preparados con caldo Nfb y se incubaron a 28°C por 7 días.

Transcurrido el tiempo de incubación se seleccionaron los tubos en los cuales se verificó crecimiento bacteriano y se cultivaron en placas con medio Nfb sólido. Utilizando la técnica de estriado por agotamiento. Se realizaron 3 repeticiones por tubo. Estas placas se llevaron a incubación durante 7 días a una temperatura de 28°C con el fin de obtener colonias claramente separadas.

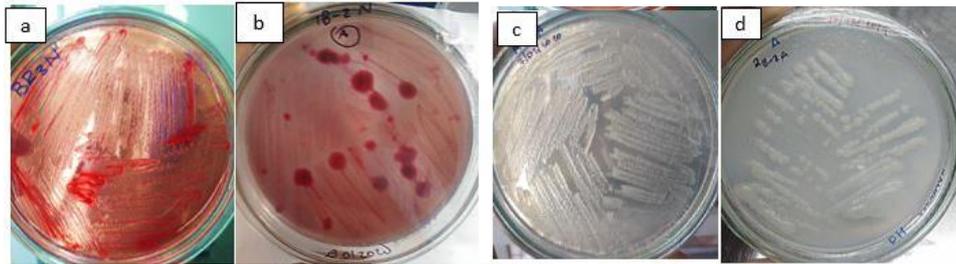
A partir de las colonias separadas se obtuvieron cultivos puros.

### **3.6 Siembra en medios específicos para *Azospirillum* sp y *Azotobacter* sp**

Se procedió a sembrar las colonias formadas de todas las siembras anteriores en medio sólido NRc (específico para *Azospirillum*) y en medio sólido S (específico para *Azotobacter*). Estas placas fueron incubadas a 28°C durante 7 días (Majeed et al., 2015; Perez y Sánchez, 2017).

### **3.7 Selección de cepas**

Las características por considerar para la selección de las cepas bacterianas se basaron en el trabajo de (Franklin; García et al., 2010). En el medio NRc, el género *Azospirillum* forma colonias redondas de color rojo escarlata, rojo opaco o rosa (Figura 3a, 3b). Mientras en el medio S, las bacterias del género *Azotobacter* forman colonias redondas blancas, transparentes, con o sin relieve (Figura 3c, 3d), después de un tiempo de incubación de 6 a 7 días.



**Figura 3.** Macroscopía de las cepas cultivadas en medio NRC (a, b) y S (c,d)

### 3.8 Identificación de las cepas aisladas

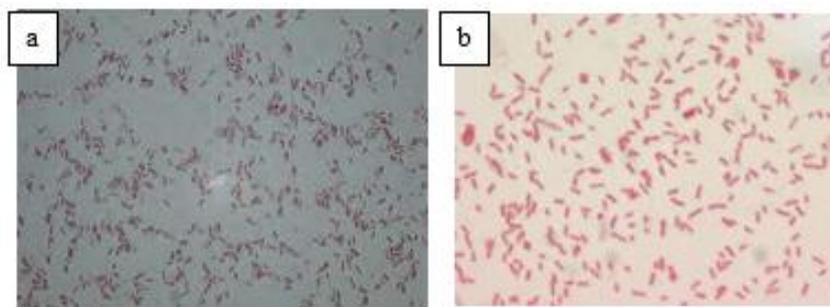
Para la identificación de las cepas se utilizaron dos metodologías:

1. Identificación morfológica y bioquímica que consiste en clasificar a los microorganismos de acuerdo con sus características metabólicas
2. Identificación molecular

#### 3.8.1 Identificación morfológica y bioquímica

##### Tinción de Gram

Para confirmar la morfología, se utilizó el protocolo general que permitió la identificación de los géneros posiblemente *Azospirillum* (Figura 4a) y *Azotobacter* (Figura 4b). Al finalizar el proceso se efectuó una observación en el microscopio (García et al., 2010).



**Figura 4.** Tinción de Gram negativa de las cepas aisladas a) medio NRC b) y S

##### Citrato Simmons

La prueba citrato simmons se utilizó para diferenciar bacilos entéricos Gram negativos. Para ello se preparó el medio siguiendo el protocolo del envase, se distribuyó en cajas petri, posteriormente se sembró la bacteria por estriado. En su identificación se observó

el cambio en la coloración del medio, estableciendo que los organismos capaces de utilizar citrato como fuente de carbono crecen y producen un cambio de color de verde a azul, caso contrario se mantiene el color del medio después de por 24 a 48 horas de incubación (Alarcón et al., 2010).

### **Ureasa**

La prueba de la urea nos da a conocer que microorganismos reducen los nitratos en nitritos. Para ello se preparó el medio siguiendo el protocolo del envase, se distribuyó en cajas de petri, posteriormente se sembró la bacteria por estriado. Estas placas se incubaron en un tiempo de 24 a 48 horas. Para su identificación se observó el cambio en la coloración del medio estableciendo que los organismos capaces de reducir los nitratos presentan un cambio de color a fucsia, caso contrario el color del medio presenta color amarillo (Koneman y Allen, 2008).

### **Catalasa**

Para determinar la actividad catalasa, se colocó en un portaobjetos la bacteria, utilizando asa de siembra y mechero, adicionando una gota de agua oxigenada y se evidenció su reacción. Si existe la presencia de la enzima catalasa se producen burbujas en la muestra y en el caso contrario no se refleja ninguna reacción (Gonzalez, 2015).

### **Oxidasa**

Para determinar la actividad oxidasa, se utilizó tiras de oxidasa (Merck), donde se sembró la bacteria, con la ayuda de un asa de siembra y mechero, posteriormente se evidenció el cambio de color en la tira. Si la oxidación tiene lugar en la muestra se evidencia una coloración azul o violeta caso contrario la coloración es amarilla (Koneman y Allen, 2008).

### **3.8.2 Identificación molecular**

Se aislaron un total 13 morfotipos bacterianos, se seleccionaron 6 morfotipos con características asociadas a los géneros fijadores de nitrógeno que se identificaron molecularmente.

La identificación molecular se realizó en los laboratorios IDgen, las muestras fueron aislados puros en la caja de petri, el procedimiento de extracción de ADN se realizó por métodos convencionales utilizando aproximadamente 100mg de precipitado bacteriano. Se realizó electroforesis horizontal en gel de agarosa para evaluar la integridad y calidad del ADN. El ADN obtenido se diluyó hasta una concentración de 20ng/uL aproximadamente, para la amplificación de la secuencia del gen 16s ribosomal mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando amplificadores universales (Gonzalez, 2015).

Los productos de PCR fueron purificados, secuenciados mediante el método SANGER. Las secuencias obtenidas fueron procesadas y ensambladas. Se compararon las secuencias ensambladas con la base de datos de nucleótidos GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (Godfrey y Jackson, 2019).

### **3.9 Evaluación del efecto biofertilizante de las cepas aisladas**

Para evaluación del efecto biofertilizante de las cepas aisladas se estableció tres concentraciones de los inóculos, con 3 testigos agua, medio (inóculo sin bacterias) y urea para analizar el contenido de nitrógeno.

#### **3.9.1 Preparación del inóculo**

Se preparó 7 L de medio nutritivo comercializado por la empresa EcoCycleBiotech para preparar el preinóculo, se autoclavó por 1 hora a 30°C, enfrió y colocó en 13 envases plásticos de 500ml, posteriormente se inoculó las bacterias en tres concentraciones  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$  células/mL respectivamente (Anexo 1) posiblemente pertenecientes a *Azospirillum* y *Azotobacter* para el uso en campo.

### **3.10 Diseño Experimental**

El diseño experimental se realizó por bloques completamente al azar con 13 tratamientos (Anexo 2) y 3 repeticiones para cada uno, estableciendo que T1-T7 se inoculará con las 7 cepas que posiblemente pertenecientes a *Azospirillum*, T8-T13 con 6 cepas pertenecientes a *Azotobacter* respectivamente, y tres controles siendo T14 agua y

T15 urea y T16 medio preinóculo obteniendo 144 unidades experimentales con efecto borde para ensayos agronómicos.

### **3.11 Bioensayo**

Se realizó previamente un test de germinación colocando 3g de semillas en 50g de suelo por 7 días obteniendo un resultado de 90%. A partir de esto, se estableció 2 ensayos colocando en cada maceta 100g de suelo estéril, 5g de semilla (2030 semillas) (Anexo 3). Las concentraciones de cada tratamiento fueron preparadas antes de cada aplicación (Anexo 3), y se colocó 60 mL en la unidad experimental correspondiente cada 7 días, al igual que los controles inmediatamente se obtuvo el pesaje con el inóculo y controles, y cada día se pesó la maceta para la colocación de agua, esto se realizó por 20 días.

En base al tiempo y números de tratamientos establecidos se tomaron parámetros como altura, peso de las hojas para escoger 6 tratamientos con mayor altura de hojas (cm), peso húmedo de hojas (g), peso húmedo de raíces (g) y color de hojas. Se seleccionó T1, T3, T5, T10, T12, T13 y 3 testigos (agua, medio, urea) con sus respectivas repeticiones, obteniendo un total de 63 muestras que viables para posteriormente evaluar el contenido de nitrógeno y materia seca, las cuales fueron cosechadas, empacadas en fundas de papel con su identificación (Anexo 4).

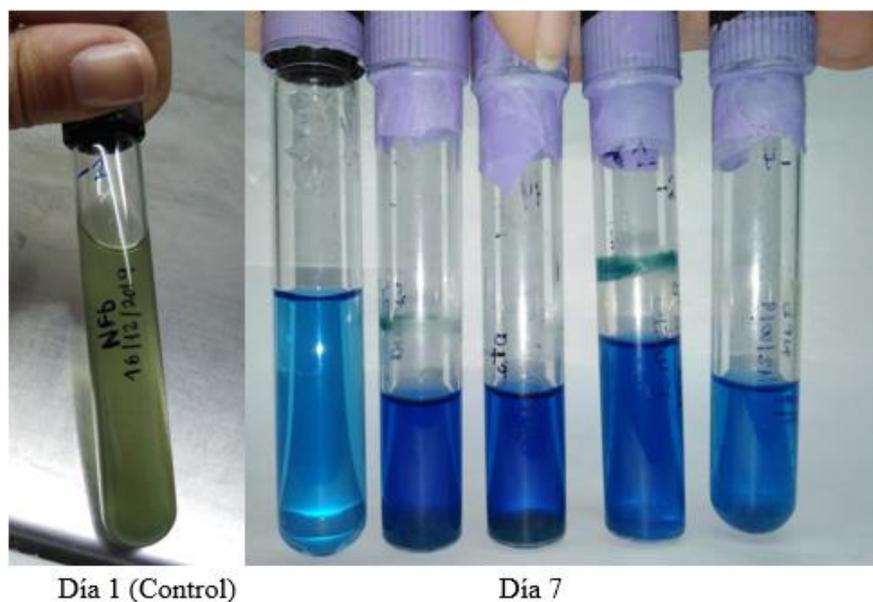
## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente capítulo se presentan los resultados obtenidos en la investigación, de los cuales consta el aislamiento, pruebas bioquímicas, evaluación de las bacterias mediante bioensayos y secuenciación de los aislados.

#### 4.1 Aislamiento de bacterias diazotróficas

De los 6 tubos de ensayo sembrados de la dilución en medio Nfb, 5 presentaron una capa blanquecina con cambio de color del medio verde a azul (Figura 5), esto es un indicador positivo de la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno. La formación de esta capa se debe al crecimiento y desplazamiento de las bacterias, y adicionalmente al comportamiento microaerófilo requerido por la nitrogenasa (Franco, 2008; García y Muñoz, 2010). Garrido, (2007); Peña y Reyes, (2007) explican también el viraje del indicador en el medio Nfb como consecuencia de la actividad metabólica de la bacteria, quien utiliza el ácido málico como sustrato, esto desencadena disminución del pH acompañado del cambio de pH (de 7 a 5) manifestando el cambio de color de verde a azul.

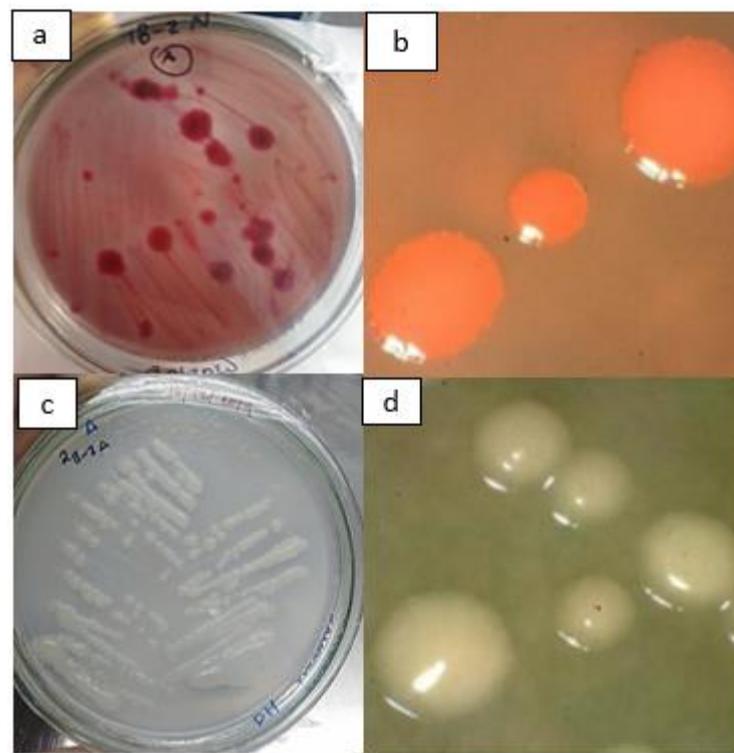


**Figura 5** Identificación de bacterias fijadoras de nitrógeno en suspensión líquida después de 7 días de incubación

#### 4.1.2 Morfología

En consecuencia, se aislaron 13 cepas, de las cuales 7 posiblemente pertenecían al género *Azospirillum* y 6 a *Azotobacter* a partir del suelo rizosférico del pasto Ryegrass (*Lolium multiflorum*).

Se encontraron 13 cepas que presentaron características típicas de microorganismos fijadores de nitrógeno de las cuales 7 posiblemente pertenecen al género *Azospirillum* y 6 al género *Azotobacter*. Las primeras presentaron colonias redondas de color rojo escarlata, rojo opaco o rosa en el medio NRc (Figura 6a, 6b), mientras que las segundas formaron colonias redondas blancas, transparentes, con o sin relieve en medio S (Figura 6c, 6d) (García de Salamone, 2010).



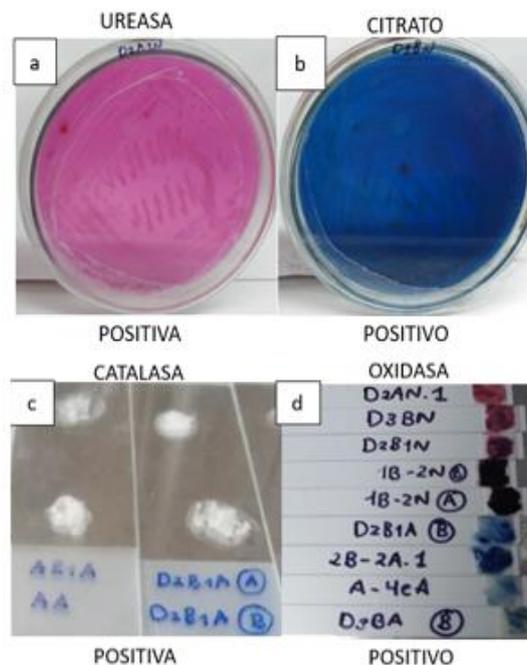
**Figura 6** Macroscopía de los aislados

De acuerdo a la caracterización macroscópica obtenida se observó una estrecha relación con la descripción morfológica proporcionada por Jiménez, (2007) y Aycaya,

(2012) para las bacterias del género *Azotobacter* debido a la presencia de colonias con tinción gram negativa en cuanto a la pigmentación, son colonias blancuzcas, mucosas y de aspecto brillante (Rubio, 2011). En cuanto a *Azospirillum* se utilizó el agar rojo de Congo donde observó que la morfología de las colonias concordaba con la descripción de escarlata de forma circular, opacas, con elevación plana, tamaño de 5 mm, con superficie seca y bordes enteros (López et al., 2015; Sharma, 2013).

#### 4.1.3 Pruebas bioquímicas

En la prueba de la catalasa, citrato simmons, ureasa, catalasa y oxidasa todas las 13 cepas sembradas en NRc y S mostraron reacción positiva (Figura 7). En el trabajo realizado por Radif y Hassan, (2014) para ver la capacidad que tienen bacterias fijadoras de nitrógeno, se obtuvo resultados positivos en oxidasa, catalasa, ureasa y citrato al igual que Jiménez, (2007).



**Figura 7** Pruebas bioquímicas a) Ureasa (+), b) Citrato (+), c) Catalasa (+), d) Oxidasa (+)

#### Ureasa

Las cepas aisladas mostraron reacción en la ureasa debido a la presencia de la enzima ureasa. De acuerdo con Fernández et al., (2010) este medio es usado para realizar identificaciones de microorganismos en base a la acción ureasa, conformado por extracto de levadura siendo la única fuente de carbono, nitrógeno y vitamina (Figura 7a).

### **Citrato Simmons**

En el caso de citrato simmons se mostró la presencia de la enzima, ya que se observó que posee la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono y energía, evidenciando en el cambio de coloración de verde a azul (Figura 7b).

### **Catalasa**

La catalasa mostró reacción positiva en las 13 cepas debido a la presencia de la enzima catalasa peróxido de hidrógeno. Fernández et al., (2010) confirma que 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 (Figura 7c).

### **Oxidasa**

La oxidasa mostró reacción positiva en las 13 cepas debido a la presencia de la enzima citocromo C oxidasa. Fernández et al., (2010) afirma que sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana (Figura 7d).

## **4.2 Identificación molecular**

En el presente estudio luego del proceso de secuenciación no se logró identificar molecularmente las bacterias deseadas *Azospirillum* y *Azotobacter* que son las principales bacterias fijadoras de nitrógeno, debido a que estas especies pueden ser de estado vital pero no cultivables, es decir, estos géneros probablemente no son dominantes ya que composición es minoritaria en la comunidad microbiana obtenida. Además es campo pueden estar presentes, sin embargo en laboratorio probablemente no tienen competitividad con los géneros encontrados y se perdieron las especies deseadas. También probablemente las técnicas moleculares fueron limitadas y permitieron obtener secuencias de baja calidad evidenciando en el ruido presente en las secuencias analizadas,

por lo que no existe la seguridad en la identificación de los géneros y especies encontrados.

Identificando que el aislado T1 corresponde a la especie *Stenotrophomonas maltophilia* con un porcentaje de similitud de 99.4%, el aislado T3 a *Bacillus safensis* con un porcentaje de similitud de 99.7%, el aislado T10 y T13 con un porcentaje de similitud de 99.6% y T12 con un porcentaje de similitud de 99.5%, corresponden al género *Enterobacter asburiae* (Tabla 3).

El aislado T5 a *Pseudomonas* sp. con un porcentaje de similitud de 98,8%, el cual tuvo un porcentaje de identidad menor al 99% con la secuencia más cercana de la base de datos por lo que no se puede asegurar que el aislado corresponde a la especie de referencia. Es posible que se trate de una especie no descrita o una especie para la cual no hay referencias en la base de datos (Tabla 2).

**Tabla 2**

*Identificación molecular de las 6 cepas seleccionadas*

Muestra	Organismo posible	Fragmento secuenciado	% de identidad	N° Accesoión
T1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	16S	99,4	MT779804.1
T3	<i>Bacillus safensis</i>	16S	99,7	MK424279.1
T5	<i>Pseudomonas anguliseptica.</i>	16S	98,8	NR_029319.1
T10	<i>Enterobacter asburiae</i>	16S	99,6	CP011863.1
T12	<i>Enterobacter asburiae</i>	16S	99,5	CP011863.1
T13	<i>Enterobacter asburiae</i>	16S	99,6	MG571729.1

En los lotes de la Hacienda Santa Mónica sembrados con pasto Ryegrass (*Lolium multiflorum*) se aislaron 6 rizobacterias potenciales como biofertilizantes las cuales fueron identificadas como *Enterobacter asburiae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas* sp. y *Bacillus safensis*.

Vacheron et al., (2013) determinó que en la rizosfera de los cultivos se encuentran bacterias diazotróficas o fijadoras de nitrógeno como especies *Azospirillum* sp, *Azotobacter* sp, *Pseudomonas* sp, *Enterobacter* sp, *Bacillus* sp. Siendo las PGPR más referenciadas *Azospirillum* sp., *Bacillus* sp, *Azotobacter* sp., *Herbaspirillum* sp., *Pseudomonas* sp. y *Xanthomonas* sp. Con respecto a *Stenotrophomonas* sp., algunas

especies han sido identificadas como posibles patógenos humanas. Sin embargo, *Stenotrophomonas* sp ha sido aislada de plantas sanas y descrita como una bacteria promotora de crecimiento de varios cultivos de importancia agronómica (Idris y Labuschagne, 2010).

Los géneros *Enterobacter* sp, *Stenotrophomonas* sp, *Azotobacter* sp, *Azospirillum* sp, *Pseudomonas* sp, son eficientes fijadoras asimbióticas de nitrógeno. La actividad y eficiencia de estos microorganismos de vida libre con capacidad de fijar nitrógeno han demostrado un extraordinario potencial para la explotación agrícola. Los resultados de investigaciones sobre la incorporación a los suelos han originado altos rendimientos en las cosechas de una gran diversidad de cultivos, como arroz, maíz, frijol, tomate (Mantilla et al., 2008). Por ello los géneros encontrados se consideran que poseen gran potencial en el ámbito agrícola, destacándose como fijadoras de nitrógeno, por ello se estableció evaluar su efecto biofertilizante en campo y conocer su interacción con el pasto.

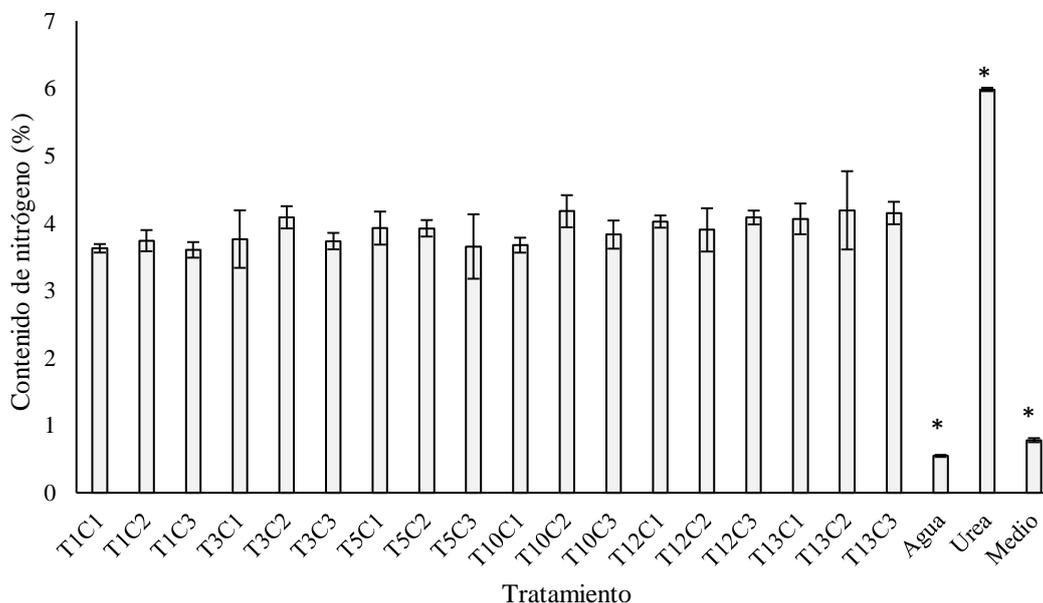
Los géneros encontrados son considerados que poseen patogenicidad, sin embargo, hay que recalcar que no afecta a plantas, solo a personas con un sistema inmune comprometido y en la legislación ecuatoriana basada en la ley orgánica de sanidad agropecuaria no considera aspectos de organismos potencialmente patógenos para la elaboración y comercialización de biofertilizantes (OMG) (*LEY ORGÁNICA DE SANIDAD AGROPECUARIA*, 2017). Para registro y comercialización de inoculantes con microorganismos con bacterias simbióticas y asimbióticas fijadoras de nitrógeno se debe indicar el nombre científico de los microorganismos y su clasificación mencionando familia, género, especie y pureza biológica. Adicionalmente un informe de ensayo interno realizado en el Ecuador que justifique uno de los cultivos a registrar, dosis de aplicación y forma de aplicación en el cultivo y para cultivos adicionales se debe presentar sustentos bibliográficos que justifiquen el uso del productos en dichos cultivos ('Manual Técnico Para El Registro y Control de Fertilizantes, Enmiendas de Suelo y Productos Afines de Uso Agrícola.', 2020). Por ello se recomienda que se coloque en su etiqueta la respectiva rotulación de instrucciones de uso para tomar las medidas de protección y seguridad adecuadas ya que en personas con enfermedades previas podría producir patogenicidad.

### 4.3 Bioensayo

Al realizar evaluación del efecto biofertilizante de bacterias diazotróficas con diferentes concentraciones de fertilizante, las variables evaluadas en pasto Ryegrass son: contenido de nitrógeno (%), altura de hojas (cm), materia seca en hojas (g), materia seca de raíces (g), y relación hojas-raíz (g), que se detallan a continuación:

#### 4.3.1 Contenido de nitrógeno

Después de 20 días de la inoculación, se encontraron diferencias significativas para la comparación del agua ( $F= 273.36$ ;  $gl=1$ ;  $p=0.00$ ), urea ( $F=205.15$ ;  $gl=1$ ;  $p<0.0001$ ) y medio ( $F=458.59$ ;  $gl=1$ ;  $p=0.00$ ) con respecto a los tratamientos. Los tratamientos presentaron ( $F=63.14$ ;  $gl=20$ ;  $p=0.00$ ) (Figura 8) (Anexo 5). Adicionalmente, se identificaron diferencias significativas para el factor cepas ( $F= 3.90$ ;  $gl=5$ ;  $p=0.01$ ) (Figura 9) (Anexo 6). Los factores concentración ( $F=2.51$ ;  $gl=2$ ;  $p=0.09$ ) y la interacción cepas\*concentración ( $F=0.97$ ;  $gl=10$ ;  $p= 0.48$ ) no presentaron diferencias significativas (Anexo 5).



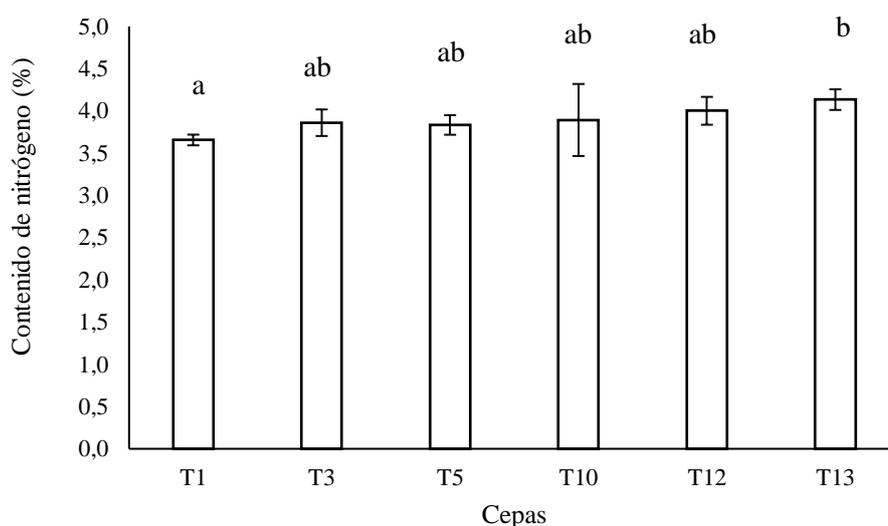
**Figura 8.** Contenido de nitrógeno (%) después de 20 días de inoculación en los tratamientos.

\*=diferencias significativas. Barras de error representan la desviación estándar.

El testigo agua tuvo el valor más bajos de absorción de nitrógeno (0.55%) mientras que el mayor valor fue detectado en el testigo urea (5.68%) (Figura 9) (Anexo 5).

Por otra parte, la cepa con la que se obtuvo la mayor absorción de nitrógeno fue T13 (4.13%) este valor fue similar a los obtenidos por las cepas T3 (3.86%), T5 (3.83%), T10 (3.89%), T12 (4.00%), pero diferente a la cepa T1 (3.66%). No obstante, las cepas T1, T3, T5, T10 y T12 fueron estadísticamente similares entre sí (Anexo 6) (Figura 9).

La producción de hormonas AIA y fijación de nitrógeno, y sus efectos beneficiosos sobre el crecimiento vegetal han sido estudiados en *Pseudomonas* sp. y *Stenotrophomonas maltophilia* (Obando et al., 2010; Sevilla et al., 2001; Shokri y Emtiazi, 2010). El género *Enterobacter asburiae*, han sido frecuentemente aisladas como endófitos y han sido reportadas como fijadora de nitrógeno (Shokri y Emtiazi, 2010; Vassilev et al., 2006).



**Figura 9** Contenido de nitrógeno (%) en la variable cepas. Letras diferentes representan diferencias significativas. Barras de error representan la desviación estándar

Battistoni et al., (2014) evaluó el efecto de la inoculación de aislamientos bacterianos en invernadero con *Stenotrophomonas* sp, *Enterobacter* sp, *Pseudomonas* sp. que presentaron valores similares de contenido en las N. *Stenotrophomonas* sp. presentó un contenido de Nitrógeno notoriamente menor al igual que el presente estudio.

En el mismo estudio los tratamientos con inóculos bacterianos se diferenciaron del control negativo (Agua) (Anexo 8). Por otra parte, el tratamiento que tuvo mayor contenido de nitrógeno fue el fertilizante urea (Battistoni et al., 2014)

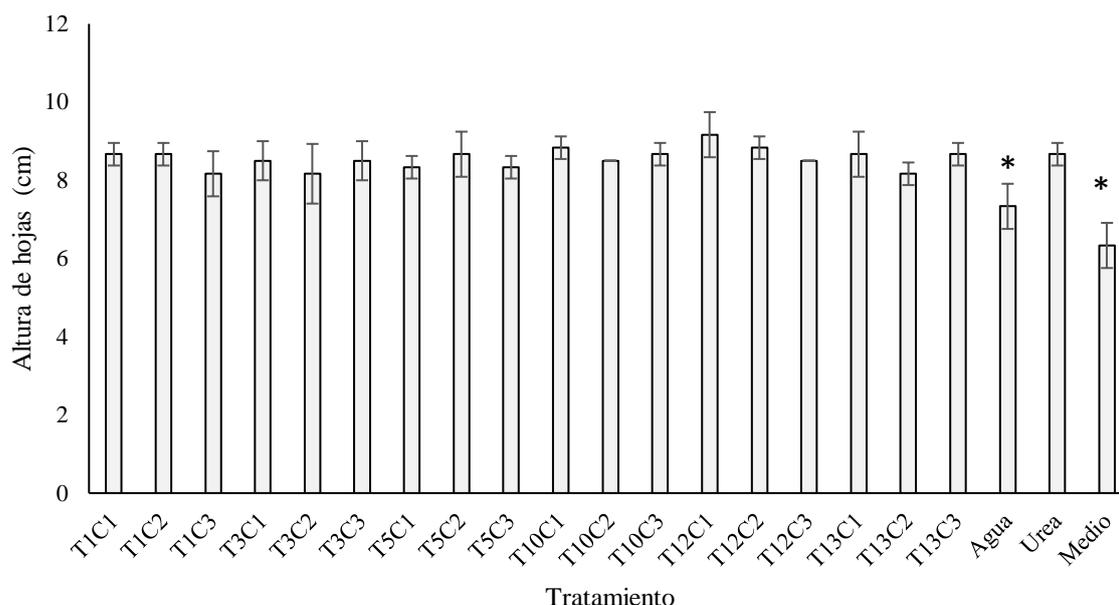
El nitrógeno atmosférico se encuentra en forma molecular ( $N_2$ ) con una disponibilidad del 80%. Sin embargo, las plantas solamente pueden asimilar en forma de nitratos ( $NO_3^-$ ) y en forma de amonio ( $NH_4^+$ ). Por lo tanto, la fijación biológica de nitrógeno se produce mediante la relación asimbiótica para convertir el nitrógeno a una forma asimilable por las plantas (Paredes, 2013). Por ello las bacterias encontradas producen enzimas que toman el nitrógeno en su forma gaseosa de la atmósfera y con los azúcares que obtienen de la planta, fijan el nitrógeno dentro de la biomasa bacteriana, si las bacterias satisfacen sus necesidades de nitrógeno pasan a la planta y pueden absorber niveles elevados de proteína en las plantas (Mamani, 2018; Santana-Aragone et al., 2017).

La elección de fijadores libres o asimbióticos se basa fundamentalmente por su interacción con las gramíneas (Calvo, 2011) teniendo resultados positivos en cuanto a la producción de biomasa vegetal de gramíneas como el maíz y los pastos forrajeros. Los datos indican un 60 – 70% de ocurrencia de éxito con un incremento significativo en las cosechas del orden de 5 – 30% (Ariza Rodríguez et al., 2020)

El aporte de la fijación biológica por medio de *Enterobacter* sp. representa un ahorro del N del suelo. El porcentaje de N acumulado en la planta por fijación biológica presenta una relación inversa a la cantidad de N disponible en el suelo. Entre el 25 y el 75% de las necesidades de N son logrados por fijación biológica. La fijación es un proceso costoso para la planta, en cuanto a energía. Para obtener rendimientos máximos, ambas fuentes de N deben complementarse (Paredes, 2013).

#### **4.3.2 Altura de hojas**

Se encontraron diferencias significativas para las comparaciones agua con tratamientos ( $F= 22.91$ ;  $gl=1$ ;  $p<=0.001$ ) y medio con tratamientos ( $F=75.69$ ;  $gl=1$ ;  $p<0.001$ ). Los tratamientos presentaron ( $F=5.73$   $gl=20$ ;  $p=0,00$ ) (Figura 10) (Anexo 5). Los factores concentración ( $F=1.42$ ;  $gl=2$ ;  $p=0.25$ ) y la interacción cepas\*concentración ( $F=0.94$ ;  $gl=10$ ;  $p=0.51$ ) no presentaron diferencias significativas (Anexo 5).



**Figura 10** Altura de hojas después de 20 días de inoculación en los tratamientos. \*=diferencias significativas. Barras de error representan la desviación estándar.

Cuando se aplicó únicamente el medio de cultivo, se obtuvo el valor más bajo de altura de hojas (6.33 cm) mientras que el mayor valor fue detectado en T12 (8.83 cm) (Figura 10). Sin embargo, todas las cepas fueron estadísticamente similares entre sí.

El testigo agua y medio tuvieron la menor altura, mientras que el tratamiento úrea tuvo mayor altura. Las cepas no presentaron diferencias significativas ya que presentan comportamiento similar T1 *Stenotrophomonas maltophilia*, T3 *Bacillus safensis*, T5 *Pseudomonas angulliseptica*, T10, T12 y T13 pertenecientes al mismo género *Enterobacter asburiae*. Dichos resultados concuerdan con el estudio de Battistoni et al., (2014) que analizó la variable altura observando que solamente los tratamientos inoculados con *Enterobacter* sp. se diferenciaron del control negativo (Anexo 8).

Piscoya, E. y Ugaz, (2016) evaluaron el efecto de las bacterias *Enterobacter* sp frente a un fertilizante químico en el desarrollo vegetativo y rendimiento de maíz, obteniendo el incremento de altura de 0.74 al 19%.

Villa, (2014), menciona que la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno mejoró significativamente el crecimiento y desarrollo de la planta con mayor intensidad en la raíz

y en la altura, debido a que facilita la fijación de nitrógeno atmosférico y del suelo, siendo el elemento responsable del crecimiento de la planta.

Rangel et al., (2014) considera que las cepas inoculadas tienen la capacidad de incrementar el pool de giberelinas con actividad biológica sobre el crecimiento vegetal en las raíces de plantas inoculadas, promoviendo la elongación del tallo-hojas, crecimiento observado en parte aérea y subterránea.

En las gramíneas (pasto) y leguminosas la aplicación de nitrógeno mediante fijación biológica al momento de la siembra, estimula el desarrollo vegetativo y permite que la planta alcance una buena interceptación de la radiación solar y una alta capacidad de producción de asimilados fotosintéticos durante la fase reproductiva, que es indispensable para lograr una fijación eficiente de nitrógeno (Paredes, 2013).

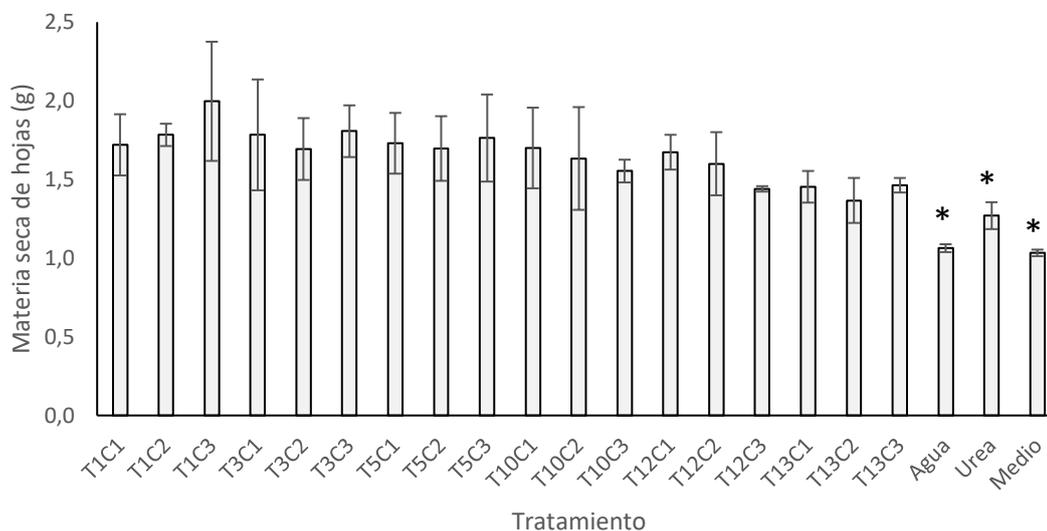
Las bacterias fijadoras de nitrógeno permiten un mayor desarrollo del sistema radical, influyendo de forma significativa en altura de planta y diámetro de tallo, esto es debido a que estas características agronómicas se ven influenciadas por la formación de hormonas reguladoras de crecimiento como giberelinas, citocinas, ácido abscísico y etileno a una concentración suficiente para provocar cambios morfológicos y fisiológicos en las plantas (Jiménez, 2008).

#### **4.3.3 *Materia seca de hojas***

Después de 20 días de la inoculación, se encontraron diferencias significativas entre el agua ( $F= 25.73$ ;  $gl=1$ ;  $p<0.001$ ), urea ( $F=10.96$ ;  $gl=1$ ;  $p=0.00$ ) y medio ( $F=28.28$ ;  $gl=1$ ;  $p=0.00$ ) con respecto a los tratamientos. Los tratamientos presentaron ( $F=4.57$ ;  $gl=20$ ;  $p=0.00$ ) (Figura 11) (Anexo 5). Adicionalmente se identificaron diferencias significativas para el factor cepas ( $F= 4.95$ ;  $gl=5$ ;  $p=0.01$ ) (Figura 12). Los factores concentración ( $F=0.31$ ;  $gl=2$ ;  $p=0.74$ ) y la interacción cepas\*concentración ( $F=0.68$ ;  $gl=10$ ;  $p=0.74$ ) no presentaron diferencias significativas (Anexo 5).

El testigo medio tuvo el valor más bajos de materia seca de hojas (1.03g) mientras que el mayor valor fue detectado en el tratamiento T1 (1.83g) (Figura 12) (Anexo 5).

Por otra parte, la cepa con la que se obtuvo la mayor materia seca de hojas fue T1 (1.83g) este valor fue similar a los obtenidos por las cepas T3 (1.76g), T5 (1.73g), T10 (1.63g), T12 (1.57g), pero diferente a la cepa T13 (1.43g). No obstante, las cepas T5, T10, T12 y T13 fueron estadísticamente similares entre sí (Anexo 7) (Figura 12).

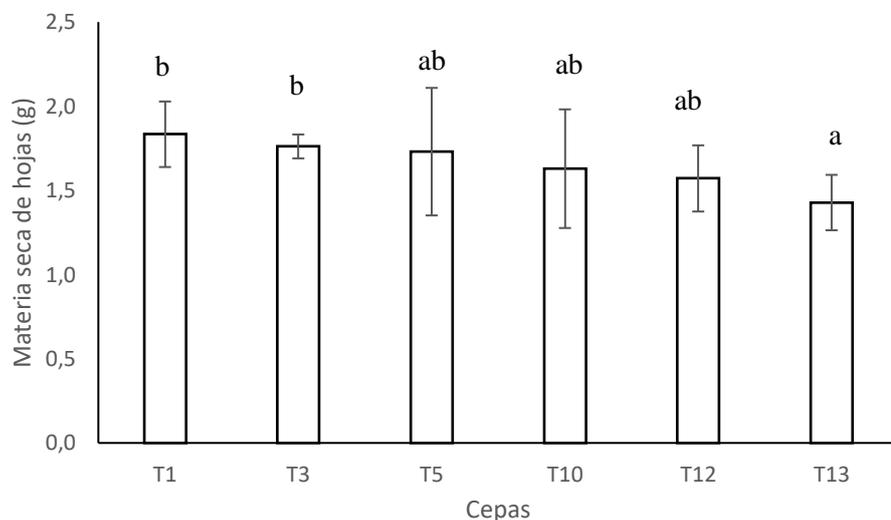


**Figura 11** Materia seca de hojas después de 20 días de inoculación en los tratamientos. \*=diferencias significativas. Barras de error representan la desviación estándar

Cárdenas, (2014) en pasto guinea (*Panicum maximum*) encontró aumentos de 45.67% en la materia seca foliar con inoculación simple con *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Enterobacter* en comparación con fertilización nitrogenada. Las plantas tratadas con fertilización nitrogenada concuerdan con los resultados obtenidos el presente estudio donde *Enterobacter asburiae* T13 es la mejor cepa. Los resultados muestran un efecto positivo de bacterias fijadoras de nitrógeno sobre el crecimiento del pasto en términos del incremento en su peso seco, en comparación con los tratamientos sin inocular y fertilizado con urea presentaron en promedio un 6% de incremento (Anexo 8) (Battistoni et al., 2014; Pérez et al., 2020).

La bacteria ejerce el efecto benéfico de fijar nitrógeno y promover el crecimiento de la planta, mientras que la planta le suministra nutrientes para que ésta pueda vivir. Las bacterias fijadoras de nitrógeno proliferan en y sobre raíces de maíz, trigo, cebada, avena y plantas forrajeras que lleva a un aumento del número de espigas y de biomasa vegetal.

Por otro lado, hay que enfatizar que los efectos de los biofertilizantes en el desarrollo radicular, mayor solubilidad y conductividad de nutrientes, se traducen en un mayor aprovechamiento de la humedad del suelo y, por lo tanto, en el uso más racional del agua y una mayor resistencia a la sequía (Bottini et al., 2004)

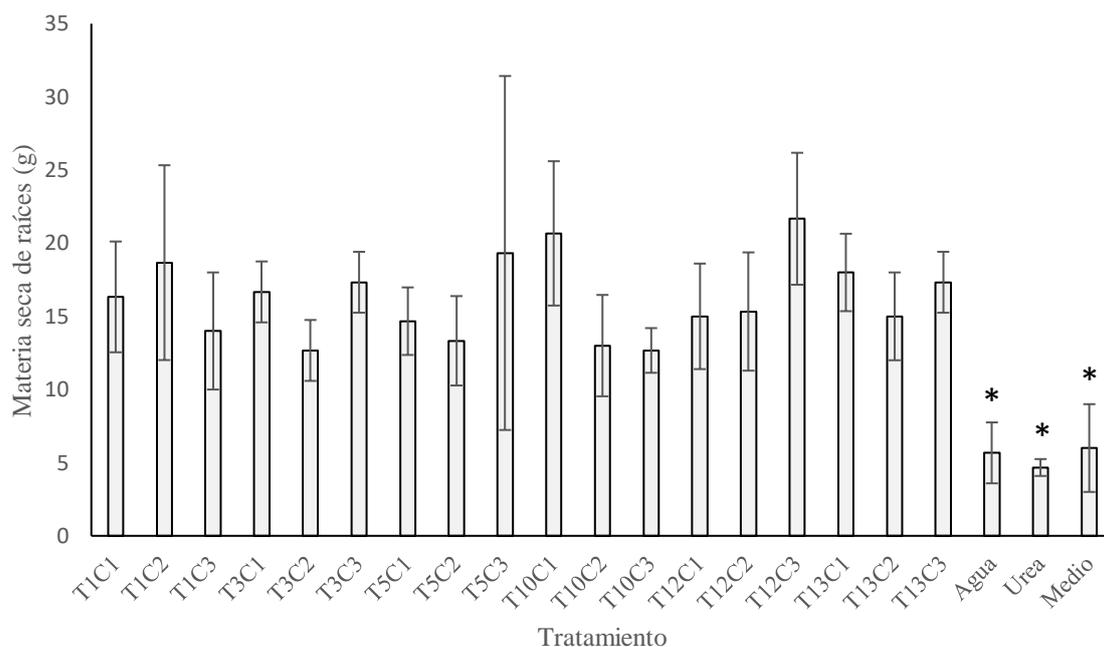


**Figura 12.** Efecto de las cepas en la producción de materia seca de hojas en la variable cepas. Letras diferentes representan diferencias significativas. Barras de error representan la desviación estándar

#### 4.3.4 Materia seca de raíces

Se encontraron diferencias significativas entre el agua ( $F=17.39$ ;  $gl=1$ ;  $p=0.00$ ), urea ( $F=20.85$ ;  $gl=1$ ;  $p=0.00$ ) y medio ( $F=16.31$ ;  $gl=1$ ;  $p=0.00$ ) con respecto a los tratamientos. Los tratamientos presentaron ( $F=3.51$ ;  $gl=20$ ;  $p=0.00$ ) (Figura 13) (Anexo 5). Los factores concentración ( $F=1.76$ ;  $gl=2$ ;  $p=0.18$ ) y la interacción cepas\*concentración ( $F=1.59$ ;  $gl=10$ ;  $p=0.14$ ) no presentaron diferencias significativas (Anexo 5). El testigo urea tuvo el valor más bajo en materia seca de raíces (4.67g) mientras que el mayor valor fue detectado en el tratamiento T13 (16.78g) (Figura 13). Sin embargo, todas las cepas fueron estadísticamente similares entre sí.

Bécquer, (2012) afirma que la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno debido a las fitohormonas se obtuvo un 60% de enraizamiento y un promedio de raíces de 19 cm. (Baca et al., 2010) llevó a cabo experimentos de invernadero probando que la inoculación de *Stenotrophomonas maltophilia* tenía una promoción de aumentar la longitud de la raíz y el peso fresco total de la planta en comparación con las plantas no inoculadas (control).



**Figura 13.** Materia seca de raíces después de 20 días de inoculación en los tratamientos.

\*=diferencias significativas. Barras de error representan la desviación estándar.

Battistoni et al., (2014) evaluó el peso seco radicular donde todos los tratamientos presentaron diferencias significativas con el control negativo. En particular, la inoculación de la cepa, *Enterobacter* sp y *Pseudomonas* sp. no presentaron diferencias con el control positivo (fertilizado con N).

En la presente investigación el testigo urea tuvo menor materia seca de raíces, y mayor materia seca de raíces la tuvo *Enterobacter asburiae* T13. El efecto beneficioso de la asociación es debido mayoritariamente a la capacidad que posee la bacteria de producir fitohormonas principalmente el AIA (ácido indol-3- acético), las cuales aumentan la absorción radical del nitrógeno por estimulación fitohormonal. conduciendo a un incremento en el número de raíces laterales y pelos radicales, aumentando la superficie disponible para la absorción de nutrientes y el flujo de protones en la membrana de la raíz, lo que promueve la captación de agua y minerales. (Paredes, 2013; Pilatuña, 2018).

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES

Los lotes de la Hacienda Santa Mónica sembrados con Rye grass (*Lolium multiflorum*) no se logró identificar los géneros *Azospirillum* y *Azotobacter*, sin embargo, se encontró bacterias fijadoras de nitrógeno identificadas como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus safensis*, *Pseudomonas* sp, y *Enterobacter asburiae* que son géneros poco conocidos, pero pueden tener beneficios y una revolución en la elaboración de fertilizantes.

La inoculación con las bacterias aisladas mostró un efecto promotor de crecimiento vegetal y absorción de nitrógeno. La cepa que obtuvo los mejores resultados con respecto al control negativo fue *Enterobacter asburiae*. estableciéndola como la mejor promotora de crecimiento, evidenciando en *L. multiflorum* al incrementar el desarrollo de la zona aérea y radical, destacando el aumento en altura, peso seco de hojas y de raíces en 20 días. No obstante, las cepas demostraron que no pueden ser consideradas como una alternativa total a la aplicación de nitrógeno en forma mineral, ya que ninguna de ellas logra igualar los resultados del fertilizante sintético.

Actualmente, en el mercado existen variedad de productos, pero se limita su proceso de comercialización debido a que no existen suficientes normativas de control que permitan validar la calidad de los productos. Un ejemplo claro son las normativas que regulan el uso de productos naturales a base de microorganismos, ya que sus procesos de control se limitan a ciertos patógenos que se ha demostrado su efecto dañino.

El mundo de los microorganismos es muy diverso, y cada uno tiene su particularidad; además, de acuerdo con la situación geográfica, tipo de población y calidad ambiental cada microorganismo puede actuar de diferente manera, por lo que establecer normas nacionales basadas en parámetros internacionales sin un criterio adecuado, puede limitar los beneficios que puede traer un microorganismo a la agricultura. Así mismo, no tomar en cuenta el comportamiento de microorganismos nativos, que obviamente no están contemplados en una normativa internacional, puede causar un perjuicio en la calidad de los insumos producidos.

## RECOMENDACIONES

1. Continuar con los estudios de identificación, producción y cuantificación del poder nitro fijador de las cepas evaluadas, así como estudios específicos en diferentes cultivos para determinar los mecanismos promotores del crecimiento y desarrollo en los cultivos.
2. Realizar investigaciones de estas cepas bacterianas en plantas de siembra directa para analizar su persistencia en el tiempo.
3. Realizar más pruebas bioquímicas específicas para estos géneros que permitan tener más seguridad de la posibilidad que sean *Azotobacter* y *Azospirillum*.
4. La secuenciación de bacterias se debería realizar con más genoma para poder validar la secuencia y asegurar que la identificación de las bacterias, debido a que las secuencias obtenidas no eran de buena calidad y tenían mucho ruido.
5. Reconfirmar el análisis molecular, realizando una purificación extra para obtener un genoma de mejor calidad.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abedon, S. (2016). *Limiting Nutrient*.  
[http://www.biologyaspoetry.com/terms/limiting\\_nutrient.html](http://www.biologyaspoetry.com/terms/limiting_nutrient.html)
- Aguado-santacruz, G. A., Rascón, Q., Luis, J., & Hernández, P. (2004). *Manejo biotecnológico de gramíneas forrajeras Biotechnological manipulation of forage grasses*. 42(2), 261–276.
- Aguilar, M. (2015). *Selección de bacterias de vida libre eficientes en fijación biológica de nitrógeno como alternativa sustentable para ecosistemas terrestres*.
- Aguinaga, J. P., Yáñez, C., Valverde, F., & Alvarado, S. (2013). *Evaluación de la metodología de Manejo de Nutrientes por Sitio Específico (MNSE) con dos variedades de maíz (mejorada y local), en la provincia de Imbabura*. 28.  
<http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/853/1/iniapscP.A282e2012.pdf>
- Alarcón, T., Baquero, M., Domingo, D., López-Brea, M., & Royo, G. (2010). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. 1–25. [www.seimc.org](http://www.seimc.org)
- Albanesi, A. (2013). Microbiología Agrícola. In *Microbiología Agrícola. Un aporte de la Investigación en Argentina* (Segunda Ed).
- Almeida. (2011). *FICHA TÉCNICA Cepa Azotobacter chroococcum Clasificación*. 1–3.
- Ariza Rodríguez, S., González Murillo, O., & López Sánchez, J. (2020). Evaluación de fijadores biológicos de nitrógeno libres sobre el crecimiento de gramíneas en suelo degradado. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 22(1), 87–97.  
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v22n1.78019>
- Aycaya, G. (2012). *Influencia de la biofertilización con Azotobacter chroococcum en la producción y calidad de cebolla rosada (Allium cepa L.) en el valle de Locumba*. UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN – TACNA.
- Baca, K., Sánchez, M., Carreño, C., & Mendoza, G. (2010). Polihidroxialcanoatos de cepas de Azospirillum spp. aisladas de raíces de Lycopersicon esculentum Mill. “tomate” y Oryza sativa L. “arroz” en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 1, 213–224.
- Battistoni, F. J., Sicardi, M., Taulé, C., Barlocco, C., Mareque, C., & Hackembruch, F. (2014). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal y su aplicación agronómica a cultivos comerciales. *INIA Serie FPTA-INIA*, 54, 58.
- Bécquer, C; Prévost, D; Juge, Ch; Gauvin, C & Delaney, S. (2012). Efecto de la inoculación con bacterias rizosféricas en dos variedades de trigo. Fase I: condiciones

- controladas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas.*, 3, 973–984.
- Benjumeda, D. (2017). *Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Mecanismos y aplicaciones*. Universidad de Sevilla.
- Bot, A., & Benites, J. (2005). The importance of soil organic matter Key to drought-resistant soil and sustained food production. In *Soil* (Vol. 1, Issue 2). <https://doi.org/10.5194/soil-1-707-2015>
- Bottini, R; Cassán, F; Piccoli, P. (2004). Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 65, 497–503.
- Callaghan, M. O., Lorenz, N., & Gerard, E. M. (2006). Characterization of phylloplane and Rhizosphere Microbial Populations Using PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). In *Handbook for Azospirillum: Technical Issues and Protocols* (pp. 99–115).
- Calvo, S. (2011). *Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno*. 3, 173–186.
- Cárdenas, C. (2014). Inoculación con *Azospirillum* spp y *Enterobacter agglomerans* en Pasto Guinea (*Panicum maximum* Jacq.) en el Departamento de Cesar (Colombia). *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín*, 67, 7271–7280.
- Cardinale, M., Ratering, S., Suarez, C., Zapata Montoya, A. M., Geissler-Plaum, R., & Schnell, S. (2015). Paradox of plant growth promotion potential of rhizobacteria and their actual promotion effect on growth of barley (*Hordeum vulgare* L.) under salt stress. *Microbiological Research*, 181, 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.08.002>
- Carretero, R., Marasas, P. A., Souza, E., & Rocha, A. (2016). Conceptos de utilidad para lograr un correcto muestreo de suelos. *Informaciones Agronómicas de Hispanoamérica*, 21, 1–11. [http://www.ipni.net/publication/ia-lahp.nsf/0/FD759730AFBB24B685257F86006B8078/\\$FILE/AA-15.pdf](http://www.ipni.net/publication/ia-lahp.nsf/0/FD759730AFBB24B685257F86006B8078/$FILE/AA-15.pdf)
- Cassán, F. D., Okon, Y., & Creus, C. (2015). *Handbook for Azospirillum*. Springer International Publishing Switzerland. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-06542-7>
- Castanheira, N., Dourado, A. C., Alves, P. I., Cortés-Pallero, A. M., Delgado-Rodríguez, A. I., Prazeres, Â., Borges, N., Sánchez, C., Barreto Crespo, M. T., & Fareleira, P. (2014). Annual ryegrass-associated bacteria with potential for plant growth promotion. *Microbiological Research*, 169(9–10), 768–779.

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.12.010>

- Castellano-Hinojosa, A., Correa-Galeote, D., Palau, J., & Bedmar, E. J. (2016). Isolation of N<sub>2</sub>-fixing rhizobacteria from *Lolium perenne* and evaluating their plant growth promoting traits. *Journal of Basic Microbiology*, 56(1), 85–91. <https://doi.org/10.1002/jobm.201500247>
- Colombo, C., Palumbo, G., He, J.-Z., Pinton, R., & Cesco, S. (2014). Review on iron availability in soil: interaction of Fe minerals, plants, and microbes. *Journal of Soils and Sediments*. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11368-013-0814-z>
- Convenio de la Diversidad Biológica. (1992). *Convenio sobre la diversidad biológica*. 1–34.
- Cooper, J. E., & Rao, J. R. (2006). *Molecular Approaches to Soil, Rhizosphere and Plant Microorganism Analysis*. CABI. <http://ebookcentral.proquest.com/lib/utn/detail.action?docID=289682>
- Cortez, M. (2012). “ *EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO VEGETAL DE Azospirillum sp . EN PLANTAS DE MAÍZ ( Zea mays L . )* ”. PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR.
- Criollo, P. J., Obando, M., Sánchez M., L., & Bonilla, R. (2013). Efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) asociadas a *Pennisetum clandestinum* en el altiplano cundiboyacense. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 13(2), 189. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol13\\_num2\\_art:254](https://doi.org/10.21930/rcta.vol13_num2_art:254)
- Dawwam, G. E., Elbeltagy, A., Emar, H., Abbas, I., & Hassan, M. (2013). Beneficial effect of plant growth promoting bacteria isolated from the roots of potato plant. *Annals of Agricultural Sciences*, 58(2), 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.aogas.2013.07.007>
- De Bashan, L., Holguin, G., Glick, B., & Bashan, Y. (2007). Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. In *MICROBIOLOGÍA AGRÍCOLA* (Issue January).
- De Noni, G., & Trujillo, G. (2010). Degradación del suelo en el Ecuador: Principales causas y algunas reflexiones sobre la conservación de este recurso. *Revista Cultura*, 383–394.
- Delgado, A. (2015). *EVALUACIÓN DEL EFECTO DE ACTIVIDADES AGROPECUARIAS SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS , QUÍMICAS Y*

*BIOLÓGICAS DE SUELOS EN EL CARMELO, CARCHI.* UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR.

- Echevarria, R. (2011). *ESTUDIOS DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO (PGPR) COMO ALTERNATIVA DE APLICACIÓN A SUELOS CON LIMITANTES ABIÓTICAS.* UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA.
- FAO. (2002). Perspectivas para el medio ambiente Agricultura y medio ambiente. *Agricultura Mundial : Hacia Los Años 2015 / 2030*, 75–81.
- FAO. (2003). *Biotechnología Agrícola para Países en Desarrollo.* <http://www.fao.org/3/y2729s/y2729s00.htm>
- FAO. (2012). *Manual de Buenas Prácticas Agrícolas para el Productor Hortofrutícola para la Alimentación y la Agricultura.*
- FAO. (2015). *Healthy soils are the basis for healthy food production.* <http://www.fao.org/soils-2015/news/news-detail/es/c/277721/>
- FAO. (2019). La FAO y los 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible. 'Patrimonio': *Economía Cultural Y Educación Para La Paz (Mec-Edupaz)*, 2(14), 100–117.
- Fernández, A., García, C., Saéz, J., & Valdezate, S. (2010). *Metodos de Identificacion Bacteriana en el Laboratorio de Microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica.* 37. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Flores, Carolina, Contreras, J., Reyes, M., & Rodríguez, R. (2012). Aislamiento e identificación de cepas nativas del suelo mexicano del género *Azotobacter*. In *Acta Química Mexicana* (Vol. 4).
- Flores, Catya. (2016). *La Contaminación Agrícola por el uso de Agroquímicos y su Consecuencia Jurídica en relación a la Soberanía Alimentaria y al Derecho al Buen Vivir en la Comunidad de San Joaquín de la Parroquia Cuellaje , del Cantón Cotacachi , Provincia de Imbabura en el .*
- Florez, Jessica; Leal, Gloria; Ardila, Leidy, Cárdenas, D. (2017). *Aislamiento y caracterización de rizobacterias asociadas a cultivos de arroz del norte de Santander.* 373–391.
- Franco, M. (2008). *Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas.* <https://hera.ugr.es/tesisugr/17716093.pdf>
- Fuentes, L., & Jesus, C. (2005). BACTERIAL BIOFERTILIZERS. In *PGPR: Biocontrol*

- and Biofertilization* (Issue 1622, pp. 143–172).
- García de Salamone, I. E. (2010). Microorganismos Promotores Del Crecimiento. *Horizonte A. Magazine*, 6(23), 14–17.
- García, F., & Muñoz, H. (2010). *Caracterización de cepas nativas de Azospirillum spp. y su efecto como promotoras del desarrollo vegetativo de arroz (Oryza sativa L.)*. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- García, Franklin;, Muñoz, H., Carreño, C., & Mendoza, G. (2010). Characterization of native strains of Azospirillum spp. and its effect on growth of Oryza sativa L. “rice” in Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 1, 107–116. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2010.02.01>
- García, I., & Dorronsoro, C. (2013). *Contaminación del suelo*.
- Garrido, M. (2007). *AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS RIZOSFÉRICAS Y ENDÓFITAS ASOCIADAS A SUELOS Y PASTOS DEL VALLE Y SABANA DEL CESAR EN DOS ÉPOCAS CLIMÁTICAS*. UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA.
- Gentili, F., & Jumpponen, A. (2006). Potential and Possible Uses of Bacterial and Fungal Biofertilizers of Bacterial and Fungal Biofertilizers. In *Handbook of Microbial Biofertilizers*.
- Godfrey, S. A., & Jackson, R. W. (2019). Molecular Characterization of Bacterial Plant Pathogens. In *Molecular Approaches to Soil, Rhizosphere and Plant Microorganism Analysis* (pp. 272–292).
- Gonzalez, R. (2015). *AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS DEL GÉNERO Azotobacter, Y SU EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO EN MAÍZ, VARIEDAD INIAP 182, EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL LA ARGELIA*” [Universidad Nacional de Loja]. <https://www.universidades.com.ec/universidad-nacional-de-loja>
- Gouda, S., Kerry, R. G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H. S., & Patra, J. K. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research*, 206, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016>
- Granda, K., González, R., Alvarado, Y., Robles, A., & Torres, R. (2015). *CHARACTERIZATION OF RHIZOBACTERIA AND STIMULATION OF*

- MORPHOLOGICAL PARAMETERS AND BIOMASS IN CORN (Zea mays) Klever.* 4, 14–22.
- Guerrero, A. (2012). *Conocimiento y uso de medidas preventivas por los agricultores en el manejo de agroquímicos en la comunidad Mojanda Mirador, Canton Otavalo, PERIODO ENERO -OCTUBRE 2012.* UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE.
- Hernández, A., Rives, N., Acebo, Y., Diaz, A., Heydrich, M., & Divan, L. (2014). Potencialidades de las bacterias diazotróficas asociativas en la promoción del crecimiento vegetal y el control de *Pyricularia oryzae* (Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista de Protección Vegetal*, 29(1), 1–10.
- Hernández, L., Munive, J., Sandoval, E., Martínez, D., & Villegas, M. (2011). *Native Bacterial Populations: Sustainable Alternative to Agriculture.* 129–138.
- Higa, T., & Parr F, J. (2013). MICROORGANISMOS BENÉFICOS Y EFECTIVOS PARA UNA AGRICULTURA Y MEDIO AMBIENTE SOSTENIBLE. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Ibarra, C. (2010). *Diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de suelo de Chinampa y su efecto en plantas de interés agrícola.* Tesis de Maestría en Ciencias. 51 Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. México. 85 p.
- Ibiene, A. A., Agogbua, J. U., & Okonko, I. O. (2012). *Plant growth promoting rhizobacteria ( PGPR ) as bio-fertilizer: Effect on growth of Lycopersicum esculentus.* November 2015.
- Idris, A., & Labuschagne, H. N. (2010). *Root colonization and growth enhancement in wheat and tomato by rhizobacteria isolated from the rhizoplane of grasses.* 1837–1846. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0365-z>
- INEC- ESPAC. (2019). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua.* 43. [shorturl.at/lry58](http://shorturl.at/lry58)
- INEC. (2019). *Agricultural Technification Module.* 29. [http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas\\_Ambientales/Informacion\\_ambiental\\_en\\_la\\_agricultura/2017/Principales\\_resultados\\_2017.pdf](http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas_Ambientales/Informacion_ambiental_en_la_agricultura/2017/Principales_resultados_2017.pdf)
- Infoagro. (2017). Nutrientes presentes en el suelo. *Infoagro.*

- <https://mexico.infoagro.com/nutrientes-presentes-en-el-suelo/>
- Instituto Internacional de Nutrición de Plantas. (2014). *Los 4 requisitos en el manejo responsable de la agricultura*.
- Jiménez, D. (2007). *Caracterización Molecular de Cepas Nativas Colombianas de Azotobacter spp. mediante análisis de restricción del DNAr ribosomal 16S*. PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA- BOGOTÁ, COLOMBIA.
- Jiménez, D. J., Montaña, J. S., & Martínez, M. M. (2011). Characterization of free nitrogen fixing bacteria of the genus *Azotobacter* in organic vegetable-grown Colombian soils. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(3), 846–858. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000300003>
- Jiménez, M. (2008). Manejo de cultivos con biofertilización: fijadores biológicos de nitrógeno”. *Importancia de Microorganismos Benéficos En Los Cultivos.*, 8(5), 20–65.
- Koneman, E., & Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnostico Microbiologico*. [https://books.google.com.ec/books?id=jyVQueKro88C&hl=es&source=gbs\\_navlinks\\_s](https://books.google.com.ec/books?id=jyVQueKro88C&hl=es&source=gbs_navlinks_s)
- Kravchenko, L. V, Makarova, N. M., Azarova, T. S., Provorov, N. A., & Tikhonovich, I. A. (2002). Isolation and Phenotypic Characterization of Plant Growth–Promoting Rhizobacteria with High Antiphytopathogenic Activity and Root-Colonizing Ability. *Microbiology*, 71(4), 444–448. <https://doi.org/10.1023/A:1019849711782>
- Kumar Meena, R., Kumar Singh, R., Pal Singh, N., Kumari Meena, S., & Singh Meena, V. (2015). Isolation of low temperature surviving plant growth – promoting rhizobacteria (PGPR) from pea (*Pisum sativum* L.) and documentation of their plant growth promoting traits. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), 806–811. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.08.006>
- Laboratorios Britania S.A. (2015). Simmons Citrato Agar. *Laboratorios Britania*, 84(3), 178. [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_5a29779bd2be8.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a29779bd2be8.pdf)
- Lazarovits, G. (1997). Rhizobacteria for Improvement of Plant Growth and Establishment. *Department of Plant Science*.
- LEY ORGÁNICA DE SANIDAD AGROPECUARIA. (2017).

- Lobo Arias, M. (2008). Agrobiodiversity relevance, at genetic resources level, for the development of sustainable production systems. *Revista Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 9, 19–30.
- López, A., De Bashan, L. E., Jiménez, M., & Bashan, Y. (2015). La investigación en Microbiología Ambiental en Baja California: Importancia y Usos. *Recursos Naturales y Sociedad*. <https://doi.org/10.18846/renaysoc.2015.01.01.01.0007>
- Loredo, O. C., López, R. L., & Espinosa, V. D. (2004). Plant Growth-Promoting Bacteria in Association with Graminaceous Species: A Review. *TERRA Latinoamericana*, 22(2), 225–239. [researchgate.net/publication/258219164\\_Plant\\_Growth-Promoting\\_Bacteria\\_in\\_Association\\_with\\_Graminaceous\\_Species\\_A\\_Review](https://www.researchgate.net/publication/258219164_Plant_Growth-Promoting_Bacteria_in_Association_with_Graminaceous_Species_A_Review)
- Lovaisa, N., Guevara, E., Delaporte, P., Elías, J., Arroyo, J., & Salazar, S. (2018). Efecto de la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal en plantas de maíz (*Zea mays* L.). *Revista Agronómica Del Noroeste Argentino*, 38(1), 33–38.
- Majeed, A., Kaleem Abbasi, M., Hameed, S., Imran, A., & Rahim, N. (2015). Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAR), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00198>
- Mamani, J. (2018). EFECTO DE LA INOCULACIÓN CON BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS EN LA GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE QUINUA (*Chenopodium quinoa* WILD.) EN CONDICIONES CONTROLADAS. *Tesis*, 1–13.
- Mantilla, C. L., Anaya, M. V., & Zumaqué, L. E. O. (2008). Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(2), 6–14. <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/711>
- Mantilla, M. (2007). *Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (Chrysanthemum morifolium var. yoko ono) EN PERÍODO DE ENRAIZAMIENTO*. PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA BOGOTÁ, COLOMBIA.
- Manual técnico para el registro y control de fertilizantes, enmiendas de suelo y productos afines de uso agrícola. (2020). *Registro De Insumos Agropecuarios*, 5, 1–85. <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/ac6.pdf>

- McInnes, A., & Haq, K. (2007). Contributions of rhizobia to soil nitrogen fertility. In *Soil Biological Fertility: A Key to Sustainable Land Use in Agriculture* (pp. 99–128). [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6619-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6619-1_6)
- Medina, J. N., Chimal, C. Y., Gómez, L. B., Juan, J., Aguilar, Z., & Hernández, G. (2014). Bacterial Isolates with Biofertilizer Potential for Tomato Plantlets. *Terra Latinoamericana*, 32(4), 273–281.
- Mishra, D., Rajvir, S., Mishra, U., & Kumar, S. (2013). Role of Bio-Fertilizer in Organic Agriculture: A Review. *Research Journal of Recent ...*, 2(2013), 39–41. [http://isca.in/rjrs/archive/special\\_issue2012/8.ISCA-ISC-2012-1AFS-32.pdf](http://isca.in/rjrs/archive/special_issue2012/8.ISCA-ISC-2012-1AFS-32.pdf)
- Moreno, A., García, V., Reyes, J. L., Vásquez, J., & Cano, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 68–83. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707>
- Nadeem, S. M., Naveed, M., Zahir, Z. A., & Asghar, N. (2013). Plant – Microbe Interactions for Sustainable Agriculture : Fundamentals and Recent Advances Plant Growth Promoting Rhizobacteria : A Novel. In *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances* (pp. 51–103). <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1287-4>
- Nicholls, C. I., & Altieri, M. (2008). *Suelos saludables, plantas saludables: la evidencia agroecológica* (Issue 3).
- Obando, M; Burgos, L; Rivera, D; Garrido, M; Baldani, VL; Bonilla, R. (2010). Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, Cesar. *Acta Biol Colomb*, 15, 105–120.
- Olivares Pascual, J. (2018). *Fijación biológica de Nitrógeno*. Estación Experimental Del Zaidín, CSIC, Granada. <https://www2.eez.csic.es/olivares/ciencia/fijacion/>
- Paredes, M. (2013). *Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas*. <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/fijacion-biologica-nitrogeno-leguminosas.pdf>
- Peña, H., & Reyes, I. (2007). *NITROGEN FIXING BACTERIA AND PHOSPHATE SOLUBILIZERS ISOLATED IN LETTUCE (*Lactuca sativa* L.) AND EVALUATED AS PLANT GROWTH PROMOTERS*.
- Pérez-Montaño, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R. A., Del Cerro, P., Espuny, M. R.,

- Jiménez-Guerrero, I., López-Baena, F. J., Ollero, F. J., & Cubo, T. (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*, *169*(5–6), 325–336. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.011>
- Pérez, René; Oudot, Maxime; Hernández, Ionel; Nápoles, Maria; Pérez, Simón; Sosa, D. (2020). Aislamiento y caracterización de *Stenotrophomonas* asociada a rizosfera de maíz (*Zea Mays L.*). *Cultivos Tropicales*, *41*(2).
- Perez Pazos, J., & Sánchez López, D. (2017). Caracterización y efecto de *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* asociadas a *Ipomoea Batatas* del Caribe Colombiano. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *19*, 35–46. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.69471>
- Pilatuña, M. (2018). AISLAMIENTO DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO Y BIOESTIMULADORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL CON POTENCIAL EN LA PRODUCCIÓN DE BIOFERTILIZANTES BIOFERTILIZANTES (Vol. 3, Issue 2) [UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO]. <http://repositorio.unan.edu.ni/2986/1/5624.pdf>
- Piscocya, E.; Ugaz, Z. (2016). *Efecto de Azospirillum, Azotobacter y Enterobacter spp. nativas con 50% de fertilizante químico en el desarrollo vegetativo y rendimiento de Zea mays L. “maíz” amarillo duro en Lambayeque*. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo.
- Plan Nacional de Desarrollo 2017-2021-Toda una Vida*. (2017). 84. [http://www.planificacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2017/10/PNBV-26-OCT-FINAL\\_OK.compressed1.pdf](http://www.planificacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2017/10/PNBV-26-OCT-FINAL_OK.compressed1.pdf)
- Prasad Vurukonda, S. S. K., Vardharajula, S., Shrivastava, M., & SkZ, A. (2016). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, *184*, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.003>
- Price, J. (2010). Biopreparados para el manejo sostenible de plagas y enfermedades en la agricultura urbana y periurbana. *Ipes/Fao*, 94. <http://www.fao.org/3/a-as435s.pdf>
- Radif, H., & Hassan, S. (2014). Detection of hydrolytic enzymes produced by *Azospirillum brasiliense* isolated from root soil. *World Journal Of Experimental Biosciences*, *2*(2), 36–40. <https://doi.org/2313-3937>

- Rangel, L; José, A; Ramirez, R; Cervántes, F; Mendoza, M; García, E; Rivera, G. (2014). Biofertilización de Azospirillum spp. y rendimiento de grano de maíz, sorgo y trigo. *Scielo*, 231–238.
- Reyes, A. (2011). *Aislamiento e Identificación de Cepas de Azospirillum sp. y Evaluación de su Capacidad para Suplir las Necesidades de Nitrógeno en el Cultivo de Maíz, (Zea Mays) L. Semihidropónico con Dos Sustratos Diferentes Bajo Invernadero* [UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA SEDE QUITO]. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/1813/12/UPS-YT00073.pdf>
- Richardson, A. E. (2007). Making microorganisms mobilize soil phosphorus. *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization, January*, 85–90. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5765-6\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5765-6_10)
- Román C, N., Mamani G, G., & García V, D. (2013). Caracterización molecular de bacteria Azospirillum sp, Azotobacter sp y Pseudomonas sp. promotoras del crecimiento vegetal de cultivos de Solanum tuberosum y Zea mays. *Prospectiva Universitaria*, 10(1), 13–16. <https://doi.org/10.26490/uncp.1990-7044.2013.1.336>
- Rout, G. R., & Sahoo, S. (2015). Role of Iron in Plant Growth and Metabolism. *Reviews in Agricultural Science*, 3(0), 1–24. <https://doi.org/10.7831/ras.3.1>
- Ruane, J., & Sonnino, A. (2011). Agricultural biotechnologies in developing countries and their possible contribution to food security. *Journal of Biotechnology*, 156(4), 356–363. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.06.013>
- Ruane, J., & Sonnino, A. (2013). La innovación en agricultura y las biotecnologías agrícolas como herramientas de las políticas de seguridad alimentaria. *Biotechnologías e Innovación: El Compromiso Social de La Ciencia*, 25–52. <http://www.fao.org/docrep/018/ar635s/ar635s.pdf>
- Rubio, E. (2011). *Caracterización molecular y funcional de bacterias del género Azotobacter aisladas de suelos de la República Argentina. El rol de las auxinas en la respuesta a la inoculación de trigo*. UNIVERSIDAD NACIONAL DE LUJÁN.
- Saharan, B. S., & Nehra, V. (2011). Plant Growth Promoting Rhizobacteria : A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research*, 1–30.
- Sanchez, D. B. L., Pérez, J. V. P., & David Hinestroza, H. A. (2016). PGPB effect on the growth Pennisetum clandestinum under salt stress. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(1), 65–72.

<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.50413>

- Santana-Aragone, D., Colina-Navarrete, E., Castro-Arteaga, C., Cadena-Piedrahita, D., Sotomayor-Morán, A., Galarza-Centeno, E., & López-Villacré, M. (2017). Microorganismos Fijadores De Nitrógeno Y Su Acción Complementaria A La Fertilización Química En El Cultivos De Coffea arabica L. *European Scientific Journal*, 13(3), 211–222. <https://doi.org/10.19044/esj.2016.v13n3p211>
- Sevilla, M; Gunapala, N; Burris, R. K. C. (2001). Enhancement of growth and N content in sugarcane plants inoculated with Acetobacter diazotrophicus. *Plant-Microbe Interact*, 14, 358–366.
- Sharma, D. (2013). *Isolation and Charactetization of plant growth promoting rhizobacteria a dissertation*. THAPAR UNIVERSITY.
- Shokri, D., & Emtiazi, G. (2010). Indole-3-acetic acid (iaa) production in symbiotic and non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria and its optimization by taguchi design. *Curr Microbiol*, 61, 217–225.
- SIDDIQUI, Z. (2006). *PGPR : Biocontrol and Biofertilization*.
- Silva, S. M., & Correa, F. J. (2009). ANÁLISIS DE LA CONTAMINACIÓN DEL SUELO: REVISIÓN DE LA NORMATIVA Y POSIBILIDADES DE REGULACIÓN ECONÓMICA. 12(23), 13–34. <http://www.scielo.org.co/pdf/seec/v12n23/v12n23a2>
- Stamenov, D., Jarak, M., Duric, S., Milosev, D., & Hajnal, T. (2012). *Plant growth promoting rhizobacteria in the production*. 10, 477–480.
- Steenhoudt, O., & Vanderleyden, J. (2000). Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: Genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), 487–506. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(00\)00036-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(00)00036-X)
- Sun, Y., Wang, M., Mur, L. A. J., Shen, Q., & Guo, S. (2020). Unravelling the roles of nitrogen nutrition in plant disease defences. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms21020572>
- Suquilanda, M. (2015). El deterioro de los suelos en el ecuador y la producción agrícola. *XI Congreso Ecuatoriano de La Ciencia Del Suelo XI Congreso Ecuatoriano de La Ciencia Del Suelo*, 29–31. <http://www.secsuelo.org/wp-content/uploads/2015/06/3.-Ing.-Manuel-Suquilanda.pdf>
- Syed, S., & Prasad Tollamadugu, N. V. K. V. (2019). Role of Plant Growth-Promoting

- Microorganisms as a Tool for Environmental Sustainability. In V. B. T.-R. D. in A. M. and B. Buddolla (Ed.), *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry* (pp. 209–221). Elsevier GmbH. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816328-3.00016-7>
- Turan, M., Gulluce, M., & Şahin, F. (2012). Effects of Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria on Yield, Growth, and Some Physiological Characteristics of Wheat and Barley Plants. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 43(12), 1658–1673. <https://doi.org/10.1080/00103624.2012.681739>
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M. L., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dyé, F., & Prigent-Combaret, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, 4(SEP), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356>
- Vassilev, N; Medina, A; Azcon, ; Vassileva, M. (2006). Microbial solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting products on plant growth. *Plant and Soil*, 287, 77–84.
- Villa, L. (2014). *Efecto de la inoculación en maíz con cepas nativas de Azospirillum sp.* 33–38.
- Wu, S. C., Cao, Z. H., Li, Z. G., Cheung, K. C., & Wong, M. H. (2005). Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: A greenhouse trial. *Geoderma*, 125(1–2), 155–166. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.07.003>
- Youseif, S. H. (2018). Genetic diversity of plant growth promoting rhizobacteria and their effects on the growth of maize plants under greenhouse conditions. *Annals of Agricultural Sciences*, 63(1), 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2018.04.002>
- Zambrano Moreno, D. C., Bonilla Buitrago, R. R., Avellaneda, L., & Zambrano, G. (2015). Prospective analysis of agricultural bioinoculants in Colombia: an expert consultation. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2), 103–113. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.48472>
- Zambrano, P. ., Soto, J. ., & Muñoz, D. (2012). *Determinación de la textura de un suelo: Programa Académico de Ingeniería Sanitaria y ambiental.* <https://es.scribd.com/document/97037043/Lab-Textura-Suelo>

## ANEXOS

Tratamientos	Unidad Experimental	Inóculo (mL)	Agua (mL)	Concentración	Concentración inicial
T1	1	0,00428	59,996	1*10 <sup>6</sup>	1,4*10 <sup>10</sup>
T1	2	0,00428	59,996	1*10 <sup>6</sup>	1,4*10 <sup>10</sup>
T1	3	0,00428	59,996	1*10 <sup>6</sup>	1,4*10 <sup>10</sup>
T1	4	0,0043	59,571	1*10 <sup>8</sup>	1,4*10 <sup>10</sup>
T1	5	0,428	59,571	1*10 <sup>8</sup>	1,4*10 <sup>10</sup>
T1	6	0,428	59,571	1*10 <sup>8</sup>	1,4*10 <sup>10</sup>
T1	7	4,285	55,714	1*10 <sup>9</sup>	1,4*10 <sup>10</sup>
T1	8	4,285	55,714	1*10 <sup>9</sup>	1,4*10 <sup>10</sup>
T1	9	4,285	55,714	1*10 <sup>9</sup>	1,4*10 <sup>10</sup>
T2	10	0,00375	59,996	1*10 <sup>6</sup>	1,6*10 <sup>10</sup>
T2	11	0,00375	59,996	1*10 <sup>6</sup>	1,6*10 <sup>10</sup>
T2	12	0,00375	59,996	1*10 <sup>6</sup>	1,6*10 <sup>10</sup>
T2	13	0,375	59,625	1*10 <sup>8</sup>	1,6*10 <sup>10</sup>
T2	14	0,375	59,625	1*10 <sup>8</sup>	1,6*10 <sup>10</sup>
T2	15	0,375	59,625	1*10 <sup>8</sup>	1,6*10 <sup>10</sup>
T2	16	3,75	56,25	1*10 <sup>9</sup>	1,6*10 <sup>10</sup>
T2	17	3,75	56,25	1*10 <sup>9</sup>	1,6*10 <sup>10</sup>
T2	18	3,75	56,25	1*10 <sup>9</sup>	1,6*10 <sup>10</sup>
T3	19	0,00353	59,996	1*10 <sup>6</sup>	1,7*10 <sup>10</sup>
T3	20	0,00353	59,996	1*10 <sup>6</sup>	1,7*10 <sup>10</sup>
T3	21	0,00353	59,996	1*10 <sup>6</sup>	1,7*10 <sup>10</sup>
T3	22	0,353	59,647	1*10 <sup>8</sup>	1,7*10 <sup>10</sup>
T3	23	0,353	59,647	1*10 <sup>8</sup>	1,7*10 <sup>10</sup>
T3	24	0,353	59,647	1*10 <sup>8</sup>	1,7*10 <sup>10</sup>
T3	25	3,529	56,471	1*10 <sup>9</sup>	1,7*10 <sup>10</sup>
T3	26	3,529	56,471	1*10 <sup>9</sup>	1,7*10 <sup>10</sup>
T3	27	3,529	56,471	1*10 <sup>9</sup>	1,7*10 <sup>10</sup>
T4	28	0,00375	59,996	1*10 <sup>6</sup>	1,8*10 <sup>10</sup>
T4	29	0,00375	59,996	1*10 <sup>6</sup>	1,8*10 <sup>10</sup>
T4	30	0,00375	59,996	1*10 <sup>6</sup>	1,8*10 <sup>10</sup>
T4	31	0,375	59,625	1*10 <sup>8</sup>	1,8*10 <sup>10</sup>
T4	32	0,375	59,625	1*10 <sup>8</sup>	1,8*10 <sup>10</sup>
T4	33	0,375	59,625	1*10 <sup>8</sup>	1,8*10 <sup>10</sup>
T4	34	3,75	56,25	1*10 <sup>9</sup>	1,8*10 <sup>10</sup>
T4	35	3,75	56,25	1*10 <sup>9</sup>	1,8*10 <sup>10</sup>
T4	36	3,75	56,25	1*10 <sup>9</sup>	1,8*10 <sup>10</sup>
T5	37	0,004	59,996	1*10 <sup>6</sup>	1,5*10 <sup>10</sup>
T5	38	0,004	59,996	1*10 <sup>6</sup>	1,5*10 <sup>10</sup>
T5	39	0,004	59,996	1*10 <sup>6</sup>	1,5*10 <sup>10</sup>

T5	40	0,4	59,6	1*10^8	1,5*10^10
T5	41	0,4	59,6	1*10^8	1,5*10^10
T5	42	0,4	59,6	1*10^8	1,5*10^10
T5	43	4	56	1*10^9	1,5*10^10
T5	44	4	56	1*10^9	1,5*10^10
T5	45	4	56	1*10^9	1,5*10^10
T6	46	0,00353	59,996	1*10^6	1,7*10^10
T6	47	0,00353	59,996	1*10^6	1,7*10^10
T6	48	0,00353	59,996	1*10^6	1,7*10^10
T6	49	0,353	59,647	1*10^8	1,7*10^10
T6	50	0,353	59,647	1*10^8	1,7*10^10
T6	51	0,353	59,647	1*10^8	1,7*10^10
T6	52	3,529	56,471	1*10^9	1,7*10^10
T6	53	3,529	56,471	1*10^9	1,7*10^10
T6	54	3,529	56,471	1*10^9	1,7*10^10
T7	55	0,00429	59,996	1*10^6	1,4*10^10
T7	56	0,00429	59,996	1*10^6	1,4*10^10
T7	57	0,00429	59,996	1*10^6	1,4*10^10
T7	58	0,429	59,571	1*10^8	1,4*10^10
T7	59	0,429	59,571	1*10^8	1,4*10^10
T7	60	0,429	59,571	1*10^8	1,4*10^10
T7	61	4,286	55,714	1*10^9	1,4*10^10
T7	62	4,286	55,714	1*10^9	1,4*10^10
T7	63	4,286	55,714	1*10^9	1,4*10^10
T8	64	0,003	59,997	1*10^6	2*10^10
T8	65	0,003	59,997	1*10^6	2*10^10
T8	66	0,003	59,997	1*10^6	2*10^10
T8	67	0,3	59,7	1*10^8	2*10^10
T8	68	0,3	59,7	1*10^8	2*10^10
T8	69	0,3	59,7	1*10^8	2*10^10
T8	70	3	57	1*10^9	2*10^10
T8	71	3	57	1*10^9	2*10^10
T8	72	3	57	1*10^9	2*10^10
T9	73	0,00316	59,997	1*10^6	1,9*10^10
T9	74	0,00316	59,997	1*10^6	1,9*10^10
T9	75	0,00316	59,997	1*10^6	1,9*10^10
T9	76	0,316	59,684	1*10^8	1,9*10^10
T9	77	0,316	59,684	1*10^8	1,9*10^10
T9	78	0,316	59,684	1*10^8	1,9*10^10
T9	79	3,158	56,842	1*10^9	1,9*10^10
T9	80	3,158	56,842	1*10^9	1,9*10^10
T9	81	3,158	56,842	1*10^9	1,9*10^10
T10	82	0,004	59,996	1*10^6	1,5*10^10

T10	83	0,004	59,996	1*10^6	1,5*10^10
T10	84	0,004	59,996	1*10^6	1,5*10^10
T10	85	0,4	59,6	1*10^8	1,5*10^10
T10	86	0,4	59,6	1*10^8	1,5*10^10
T10	87	0,4	59,6	1*10^8	1,5*10^10
T10	88	4	56	1*10^9	1,5*10^10
T10	89	4	56	1*10^9	1,5*10^10
T10	90	4	56	1*10^9	1,5*10^10
T11	91	0,00375	59,9963	1*10^6	1,6*10^10
T11	92	0,00375	59,9963	1*10^6	1,6*10^10
T11	93	0,00375	59,9963	1*10^6	1,6*10^10
T11	94	0,375	59,625	1*10^8	1,6*10^10
T11	95	0,375	59,625	1*10^8	1,6*10^10
T11	96	0,375	59,625	1*10^8	1,6*10^10
T11	97	3,75	56,25	1*10^9	1,6*10^10
T11	98	3,75	56,25	1*10^9	1,6*10^10
T11	99	3,75	56,25	1*10^9	1,6*10^10
T12	100	0,00316	59,997	1*10^6	1,9*10^10
T12	101	0,00316	59,997	1*10^6	1,9*10^10
T12	102	0,00316	59,997	1*10^6	1,9*10^10
T12	103	0,316	59,684	1*10^8	1,9*10^10
T12	104	0,316	59,684	1*10^8	1,9*10^10
T12	105	0,316	59,684	1*10^8	1,9*10^10
T12	106	3,158	56,842	1*10^9	1,9*10^10
T12	107	3,158	56,842	1*10^9	1,9*10^10
T12	108	3,158	56,842	1*10^9	1,9*10^10
T13	109	0,004	59,996	1*10^6	1,5*10^10
T13	110	0,004	59,996	1*10^6	1,5*10^10
T13	111	0,004	59,996	1*10^6	1,5*10^10
T13	112	0,4	59,6	1*10^8	1,5*10^10
T13	113	0,4	59,6	1*10^8	1,5*10^10
T13	114	0,4	59,6	1*10^8	1,5*10^10
T13	115	4	56	1*10^9	1,5*10^10
T13	116	4	56	1*10^9	1,5*10^10
T13	117	4	56	1*10^9	1,5*10^10
Agua	118		60		
Agua	119		60		
Agua	120		60		
Agua	121		60		
Agua	122		60		
Agua	123		60		
Agua	124		60		
Agua	125		60		
Agua	126		60		

Urea	127	0,33	60
Urea	128	0,33	60
Urea	129	0,33	60
Urea	130	0,33	60
Urea	131	0,33	60
Urea	132	0,33	60
Urea	133	0,33	60
Urea	134	0,33	60
Urea	135	0,33	60
Medio	136	60	
Medio	137	60	
Medio	138	60	
Medio	139	60	
Medio	140	60	
Medio	141	60	
Medio	142	60	
Medio	143	60	
Medio	144	60	

---

#### **Anexo 1**

*Preparación de las concentraciones  $1 \cdot 10^6$ ,  $1 \cdot 10^8$  y  $1 \cdot 10^9$  células/mL*

112 T13C2	75 T9C1	143 MEDIO3	124 AGUA3	45 T5C3	92 T11C1	103 T12C2	137 MEDIO1	84 T10C1	117 T13C3	120 AGUA1	57 T7C1	125 AGUA3	23 T3C2	20 T3C1	144 MEDIO3	24 T3C2	6 T1C2
69 T8C2	83 T10C1	60 T7C2	80 T9C3	73 T9C1	109 T13C1	81 T9C3	114 T13C2	140 MEDIO	107 T12C3	19 T3C1	101 T12C1	48 T6C1	53 T6C3	132 UREA2	46 T6C1	35 T4C3	11 T2C1
38 T5C1	65 T8C1	115 T13C3	16 T2C3	32 T4C2	70 T8C3	10 T2C1	139 MEDIO2	111 T13C1	18 T2C3	27 T3C3	85 T10C2	106 T12C3	41 T5C2	95 T11C2	128 UREA 1	17 T2C3	138 MEDIO 1
55 T7C1	31 T4C2	108 T12C3	89 T10C3	39 T5C1	110 T13C1	123 AGUA2	50 T6C2	76 T9C2	116 T13C3	14 T2C2	97 T11C3	9 T1C3	119 AGUA1	56 T7C1	87 T10C2	7 T1C3	64 T8C1
54 T6C3	130 UREA2	105 T12C2	4 T1C2	1 T1C1	22 T3C2	77 T9C2	49 T6C2	91 T11C1	122 AGUA2	78 T9C2	2 T1C1	30 T4C1	62 T7C3	131 UREA2	100 T12C1	86 T10C2	33 T4C2
52 T6C3	29 T4C1	71 T8C3	51 T6C2	67 T8C2	126 AGUA3	93 T11C1	90 T10C3	15 T2C2	79 T9C3	104 T12C2	40 T5C2	13 T2C2	36 T4C3	82 T10C1	12 T2C1	43 T5C3	135 UREA3
34 T4C3	127 UREA1	3 T1C1	44 T5C3	98 T11C3	121 AGUA2	96 T11C2	58 T7C2	88 T10C3	5 T1C2	72 T8C3	28 T4C1	47 T6C1	63 T7C3	141 MEDIO2	74 T9C1	99 T11C3	42 T5C2
134 UREA3	21 T3C1	142 MEDIO3	26 T3C3	37 T5C1	94 T11C2	61 T7C3	68 T8C2	102 T12C1	25 T3C3	118 AGUA1	59 T7C2	129 UREA1	136 MEDIO1	133 UREA3	66 T8C1	113 T13C2	8 T1C3

## Anexo 2

*Diseño experimental por bloques completos al azar*



100g suelo estéril



5g semillas



Preparación de concentraciones

### Anexo 3

*Bioensayos en macetas*

Variable	n	w	p
Nitrógeno (%)	63	0,96	0,1945
Altura (cm)	63	0,96	0,2134
Ms Hojas (g)	63	0,96	0,1771
Ms Raíces (g)	63	0,97	0,4013

### Anexo 4

*Anova de normalidad de las variables evaluadas*

	gl	Nitrógeno (%)			Altura (cm)			MS hojas (g)			MS raíces (g)		
		CM	F	p	CM	F	p	CM	F	p	CM	F	p
Total	62	1,25			0,47			0,084			32,52		
Tratamientos	20	3,76	63,14	0,00	1,06	5,726	0,00	0,18	4,57	0,00	63,70	3,51	0,00
Cepa	5	0,23	3,90	0,01	0,24	1,32	0,28	0,19	4,95	0,00	5,04	0,28	0,92
Concentración	2	0,15	2,51	0,09	0,26	1,42	0,25	0,01	0,31	0,74	32,02	1,76	0,18
Cepa*Concentración	10	0,06	0,97	0,48	0,18	0,94	0,51	0,03	0,68	0,74	28,89	1,59	0,14
Repetición	2	0,04	0,58	0,56	0,21	1,11	0,34	0,02	0,52	0,60	8,15	0,45	0,64
Agua vs Tratamientos	1	16,47	273,36	0,00	4,25	22,91	0,00	1,01	25,73	0,00	315,56	17,39	0,00
Urea vs Tratamientos	1	12,36	205,15	0,00	0,04	0,22	0,64	0,43	10,96	0,00	378,29	20,85	0,00
Medio vs Tratamientos	1	27,63	458,59	0,00	14,04	75,69	0,00	1,11	28,28	0,00	295,91	16,31	0,00
Error	40	0,06			0,19			0,039			18,14		

## Anexo 5

*Anova de las variables evaluadas en el bioensayo*

Cepas	Medias	n	E.E		
T1	3,66	9	0,09	A	
T5	3,83	9	0,09	A	B
T3	3,86	9	0,09	A	B
T10	3,89	9	0,09	A	B
T12	4	9	0,09	A	B
T13	4,14	9	0,09		B

## Anexo 6

*Valores de contenido de nitrógeno (%) Tukey*

Cepas	Medias	n	E.E		
T13	1,43	9	0,07	A	
T12	1,57	9	0,07	A	B
T10	1,63	9	0,07	A	B
T5	1,73	9	0,07	A	B
T3	1,76	9	0,07		B
T1	1,83	9	0,07		B

### Anexo 7

Tukey de la variable materia seca de hojas(g).

Tratamientos	Altura (cm)	Diámetro tallo (mm)	Variables evaluadas			Acumulación de N parte aérea
			Peso seco (g) Raíz	Parte aérea	[N] parte aérea (mg N/peso seco)	
Control nitrogenado (+)	22,20a	9,06a	1,83a	4,56a	7,06 a	32,17 a
<i>Pantoea</i> sp UYSO13	16,86b	7,19cd	1,45bcd	2,92b	4,98 ef	14,55 bcd
<i>Achromobacter</i> sp. UYSO02	16,44b	7,56bcd	1,48abc	2,24cde	5,11 def	11,44 ef
MIX	16,43b	7,38bcd	1,10de	2,59bcd	5,09 ef	13,18 de
<i>Stenotrophomonas</i> sp. UYSO27	16,36b	7,03d	1,27cd	2,72bc	5,17 cdef	14,07 d
<i>Shinella</i> sp. UYSO24	16,25b	7,25cd	1,35bcd	2,67bcd	6,10 bc	16,28 bc
<i>Acinetobacter</i> sp. UYSO03	16,25b	7,99b	1,38bcd	2,64bcd	4,89 f	12,90 de
<i>G. diazotrophicus</i> Pal5	16,19b	7,41bcd	1,27cd	2,43bcd	6,84 ab	16,61 b
<i>Enterobacter</i> sp. UYSO10	16,00b	7,72bc	1,67ab	2,36cd	6,06 bcd	14,30 cd
<i>Rhanelia</i> sp. UYSO22	15,57bc	7,58bcd	1,63abc	2,67bcd	5,10 cdef	13,86 d
<i>Pseudomonas</i> sp.UYSO21	14,43cd	7,12cd	1,48abc	2,15de	6,17 ab	13,25 de
Control (-)	13,19d	6,97d	0,75e	1,79e	5,90 bcde	10,57 f

Los valores en cada columna seguidos por distinta letra difieren significativamente ( $p < 0,05$ ) de acuerdo al test LSD Fisher.

### Anexo 8

Variables evaluadas

Fuente (Battistoni et al., 2014)