PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
ESCUELA DE BIOANÁLISIS

DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCION DEL TÍTULO DE LICENCIADA EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA Y APLICADA

"EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO VEGETAL DE *Azospirillum* sp. EN PLANTAS DE MAÍZ (*Zea mays* L.)"

María Esther Cortez Pazmiño
Directora: Ing. Jeniffer Yánez

Quito, 2012

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS ..... **I**
CARTA DE AUTORIZACIÓN ..... **III**
DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN ..... **IV**
DEDICATORIA ..... **V**
AGRADECIMIENTOS ..... **VI**
LISTA DE ABREVIACIONES ..... **VII**
ÍNDICE DE FIGURAS ..... **VIII**
INDICE DE TABLAS ..... **X**
ÍNDICE DE ANEXOS ..... **XI**
RESUMEN ..... **XII**
ABSTRACT ..... **XIII**

CAPÍTULO 1 - ASPECTOS PRELIMINARES
1.1 INTRODUCCIÓN 1
1.2 OBJETIVOS 4
1.2.1 Objetivo General 4
1.2.2 Objetivos Específicos 4

CAPÍTULO 2 - MARCO TEÓRICO
2.1 Agricultura Sostenible- Interacción Planta Microorganismos 5
2.2 PGPR-Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) 7
2.2.1 Ecología 7
2.2.2 Mecanismos de Acción 7
2.3 Género *Azospirillum* 8
2.3.1 Historia 8
2.3.2 Generalidades 9
2.3.3 Identificación 11
2.3.4 Requerimentos Nutricionales 12
2.3.5 Mecanismos de Estimulación del Crecimiento Vegetal 15
2.3.6 Utilización de *Azospirillum* spp., en la Agricultura 19
2.4 Maíz (*Zea mays* L.) 20
2.4.1 Morfología 20

2.4.2 Siembra 21
2.4.3 Requerimientos Ambientales 21
2.4.4 Distribución y Zonas de Cultivo 22
2.4.5 Variedades 22
2.4.6 Usos 22

CAPÍTULO 3 - MATERIALES Y MÉTODOS
3.1 Recolección de las Muestras 24
3.2 Metodología de Laboratorio 25
3.2.1 Aislamiento y Purificación de Cepas 25
3.2.2 Preservación 28
3.2.3 Identificación 28
3.2.4 Curva de Crecimiento Bacteriano: Siembra a Profundidad. 32
3.3 Preparación del Inóculo 35
3.3.1 Inoculación de las Semillas, Siembra y Seguimiento de las Plantas. 36
3.4 Diseño Experimental 38

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN
4.1 Aislamiento e Identificación. 39
4.2 Curva de Crecimiento Bacteriana. 42
4.3 Análisis Estadísticos del Ensayo en Plantas. 46
4.3.1 Germinación de Semillas 48
4.3.2 Masa Húmeda de la Parte Aérea 49
4.3.3 Altura de la Planta 50
4.3.4 Masa Húmeda de las Raíces 51

CAPÍTULO 5 - CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES……..54

BIBLIOGRAFÍA……57

ANEXOS……68

CARTA DE AUTORIZACIÓN

Lic. Lucía Ulloa

Directora de la Escuela de Bioanálisis

Certifico que la Tesis para la obtención del título en la Licenciatura en Microbiología Clínica y Aplicada "EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO VEGETAL DE *Azospirillum* sp. EN PLANTAS DE MAÍZ (*Zea mays* L.)" por María Esther Cortez Pazmiño con CI 1713152047 ha sido terminada.

Ing. Jeniffer Yánez
Directora
Quito, Octubre 2012

PARA GRADOS ACADÉMICOS DE LICENCIADOS (TERCER NIVEL)
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, María Esther Cortez Pazmiño, CI: 1713152047 autora del trabajo de graduación intitulado: **"EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO VEGETAL DE *Azospirillum* sp. EN PLANTAS DE MAÍZ (*Zea mays* L.)"** previa a la obtención del grado académico de **LICENCIADA EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA Y APLICADA** en la **Escuela de Bioanálisis:**

Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, Octubre 2012

Nombre: María Esther Cortez Pazmiño
CI: 1713152047

DEDICATORIA

A mis padres Víctor Hugo Cortez Landázuri y Catalina del Rocío Pazmiño Ruíz, mis hermanas Shirley Cortez y Regina Cortez, a mis amigos con patas quienes son mi mayor alegría y mi motivación principal para cada día querer ser una persona mejor.

A todos los que siempre me apoyaron y creyeron en mí a pesar de cualquier circunstancia, gracias a todos ellos hoy estoy aquí porque probablemente la adversidad me hubiese derrotado.

A todos los seres que amo, porque gracias a ese amor soy feliz y lucho para que pueda hacer de este un mundo mejor.

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

Agradezco a la Ing. Jeniffer Yánez por haber confiado en mí, por la paciencia y por la dirección de este trabajo. Al Ing. Carlos Yánez del Programa del Maíz en el INIAP por haber colaborado a la realización del presente trabajo. Al Ing. Patricio Yánez por sus recomendaciones en el proceso de análisis estadístico.

Gracias también a mis queridos tíos, Lucía Pazmiño, Silvia Pazmiño y Jorge Poveda y mi amada abuelita Emma Ruíz que me apoyaron y me ayudaron con la logística de la evaluación de las plantas.

A mis queridos profesores de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, en especial a la Lic. Lucía Ulloa, M. Sc. Sandra Andrade, Dra. Josefina Egas, Lic. Elena Granda, Sra. Silvia Benalcázar y TM. María de Lourdes Almeida, además a mis amigas y amigos, que me acompañaron y me apoyaron en esta aventura que significó mi carrera y que, de forma incondicional, entendieron mis malos momentos y me acompañaron en los buenos.

Gracias a todos.

LISTA DE ABREVIACIONES

NFB:	Nitrogen Free Broth.
PHB:	Poli ß hidroxibutirato
g/l:	Gramos por litro
UFC/mL:	Unidades formadoras de colonia por mililitro
ºC:	Grados centígrados
pO_2:	Presión parcial en oxígeno de un medio
pH:	Potencial Hidrógeno.
CIP:	Centro Internacional de la Papa
INIAP:	Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias
SENESCYT:	Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación.
TSB:	Triptone Soy Broth. Medio Digerido de Soya y Caseína.
PUCE:	Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
O_2	Oxígeno molecular
NO_3	Nitrato
rpm	Revoluciones por minuto

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de las rizobacterias benéficas para el crecimiento y desarrollo de plantas de acuerdo a los mecanismos involucrados en la interacción..... 8
Figura 2. Centro Internacional de la Papa en la Estación Experimental Santa Catalina 23
Figura 3. Cultivo de *Zea mays* L., del que se extrajeron las muestras..... 24
Figura 4. Cooler con muestras de suelo. 24
Figura 5. Materiales para el procesamiento de las muestras de suelo 25
Figura 6. Medio NFB con cambio de color y velo blanco según Döbereiner, 1995 26
Figura 7. Tubos con Medio Libre de Nitrógeno (NFB) semisólido positivos y negativo..... 27
Figura 8. Caja Petri con Agar Libre de Nitrógeno (NFB) a pH neutro…….....27
Figura 9. Colonias de *Azospirillum* spp., en Agar Libre de Nitrógeno (NFB)…….....28
Figura 10. Prueba de oxidasa positiva en PCA. …….…….....29
Figura 11. Prueba catalasa positiva en la izquierda…….....29
Figura 12. Tinción Gram de *Azospirillum* spp. Lente 100 x. ……...30
Figura 13. Gránulos poli ß hidroxibutirato…….……...30
Figura 14. Materiales para recuento en caja. 33
Figura 15. Toma de muestra del cultivo 33
Figura 16. Cultivo con *Azospirillum* spp. 34
Figura 17. Medición de ph..... 34
Figura 18. Cambio de turbidez en el medio Dygs por fermentación de *Azospirillum* sp..... 35
Figura 19. Recuento en placa del proceso fermentativo……...35
Figura 20.“FERTIBACTER” 36
Figura 21. Disposición de las macetas en el invernadero..... 37
Figura 23. Pruebas bioquímicas para *Azospirillum* sp., con MicrogenTM GnA+B-ID System. 40
Figura 22. Gránulos poli ß hidroxibutirato de *Azospirillum* sp 40
Figura 24. Identificación de la especie más probable de *Azospirillum* sp., con PIBWIN 41
Figura 25. UFC Log 10/mL de *Azospirillum doebereinerae* en Medio Dygs..... 44
Figura 26. Evaluación de las plantas de *Zea mays* L. 48
Figura. 27. Promedio germinación de semillas. 49
Figura. 28. Promedio de masa húmeda de la parte aérea por planta. 50

Figura. 29. Promedio de altura de la parte aérea 51
Figura. 30. Promedio de masa húmeda de raíces por tratamiento 52

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Identificación bioquímica y morfológica del género *Azospirillum* spp 11
Tabla 2. Características bioquímicas de las especies de *Azospirillum* spp..... 12
Tabla 3. Pruebas bioquímicas en el Sistema Microgen GN ID..... 31
Tabla 4. Esquema del ANOVA 38
Tabla 5. Tabla de resultados de *Azospirillum* sp..... 39
Tabla 6. Resultados de las pruebas bioquímicas para identificación de la especie De *Azospirllum* sp 41
Tabla 7. Parámetros de fermentación de *Azospirillum doebereinerae* en el medio Dygs…42
Tabla 8. Tabla de la Datos del Crecimiento de *Azospirillum doebereinerae* 43
Tabla 9. Costo de Producción de 1 L de *Azospirillum* sp., en medio Dygs en el Ecuador al año 2012..... 45
Tabla 10. Croquis de la distribución de las macetas en el invernadero..... 47
Tabla 11. Análisis de varianza de una vía para germinación 49
Tabla 12. Análisis de varianza de una vía para masa húmeda de la parte aérea 50
Tabla 13. Análisis de varianza de una vía para altura de la parte aérea..... 51
Tabla 14. Análisis de varianza para el masa de las raíces 52
Tabla 15. Plantas germinadas por maceta 85
Tabla 16. Matriz de resultados brutos..... 87
Tabla 17. Peso de raíces por maceta..... 94
Tabla 18. Tabla para el análisis de varianza..... 95

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Medio Libre de Nitrógeno (NFB 68
Anexo 2. Medio Digerido de Soja y Caseína (*Tryptic Soy Broth*) 69
Anexo 3. Agar Cuenta Estandar (*Plate Count Agar* o PCA 70
Anexo 4. Tinción Gram 71
Anexo 5. Caldo Nutritivo 72
Anexo 6. Inserto de Microgen Gn – Id (Gn A + B 73
Anexo 7. Medio Dygs 82
Anexo 8. Carta de autorización 83
Anexo 9. Cuadro de costos de elaboración del Agar NFB 84
Anexo 10. Tabla 15. Plantas germinadas por maceta 85
Anexo 11. Tabla 16. Matriz de resultados brutos 87
Anexo 12. Tabla 17. Peso de raíces por maceta 94
Anexo 13. Tabla 18. Tabla para el análisis de varianza 95

RESUMEN

Se evaluó la promoción del crecimiento vegetal en plantas de maíz (*Zea mays* L.) inoculadas con un grupo de las bacterias pertenecientes a las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR): *Azospirillum* sp.

Se muestrearon cultivos de maíz (*Zea mays* L.) de la zona oriental de la ciudad de Quito – Ecuador. Las muestras recolectadas de la rizósfera de los cultivos fueron analizadas en el laboratorio con el propósito de aislar, purificar, identificar y preservar *Azospirillum* spp. Posteriormente se fermentó la cepa aislada *Azospirillum dobereinerae* CM015., en el medio de referencia Dygs con el cual se alcanzó una concentración de $4{,}6x10^{10}$ UFC/mL a un bajo costo de producción.

Se inocularon las semillas de maíz (*Zea mays* L.) con *Azospirillum dobereinerae* CM015*.,* y se cultivaron en un invernadero dentro del Centro Internacional de la Papa (CIP) ubicado en la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), en Cutuclagua.

Se realizó el ensayo con un control blanco sin inocular, con la cepa *Azospirillum doebereinerae* CM015 y con *Azospirillum* sp., comercial "FERTIBACTER". Las plantas fueron evaluadas a los cuarenta días después de su siembra. Se produjeron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0{,}05$) con respecto a la altura de la parte aérea pero no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0{,}05$) en las variables germinación, masa húmeda de raíces y masa húmeda de la parte aérea del maíz (*Zea mays* L.)

ABSTRACT

We evaluated the effect of inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) *Azospirillum sp.,* in the growth of corn (Z*ea mays* L).

Samples from the rizosphere of corn plant (*Zea mays* L) cultivated in the eastern side of Quito, Ecuador were processed to isolate *Azospirillum sp.,* CM015. Cultures of CM015 were used later to confirm the identity of the *Azospirillum doebereinerae* strain and to increase and preserve it, after this CM015 was fermented in a Dygs reference medium. The culture was increased to a concentration of $4{,}6x10^{10}$ CFU/mL

The culture of CM015 was then inoculated to seeds of corn (*Zea mays* L) in selected treatments of a pot study in a greenhouse of the International Potato Center (CIP) facility in the southern side of Quito.

The experiments was carried out three treatments, namely a control with non-inoculated seeds, the isolated CM015 *Azospirillum* and a commercial *Azospirillum sp.* Forty days after planting the plants were evaluated for shoot height, germination, fresh root and shoot weight. There were significant ($p < 0.05$) for the height of the shoot, but there were no differences ($p > 0.05$) for germination, fresh root and shoot weight.

CAPÍTULO 1

ASPECTOS PRELIMINARES

1.1 INTRODUCCIÓN

El sector agropecuario y pesquero en el Ecuador tiene un papel fundamental para el crecimiento y desarrollo económico y social. Estas actividades son el corazón de la dinámica de varios sectores productivos del país como el manufacturero, comercio y servicios relacionados. La importancia del sector agropecuario se evidencia por la participación en el producto interno bruto (PIB), el cual alcanzó el 10.7% en el año 2008, y ocupó el segundo lugar como productor de bienes luego del petróleo. Además, el sector agropecuario tiene una participación significativa en el comercio exterior del Ecuador, el cual alcanza el 28% del total de las exportaciones y el 9.3% durante el año 2008.

El aporte del sector agropecuario a la economía es amplio, llegando a contribuir con el 26% al ingreso nacional. La orientación de las importaciones agropecuarias se enfoca principalmente en aceites, grasas y cereales (Ministerio de Agricultura, 2012).

Ecuador es un país principalmente agrícola, y como ha sido tendencia mundial en las últimas cinco décadas, los agroquímicos se han convertido en la base de este sector productivo. La erosión de los suelos es la más grave amenaza que tendrá que enfrentar la agricultura del Ecuador (Winckell, 1992). Hoy en día, por aumentar la capacidad de producción, se ha perdido la calidad tanto de los suelos como de los productos agrarios (Flores del Posso, 1979). Justamente esta necesidad de aumentar la productividad agrícola a través del manejo intensivo de fertilizantes de síntesis química, va generando alteraciones en las condiciones de vida de la microbiota del suelo, se alteran asociaciones microbianas normales y esto conlleva a cambios en su funcionalidad y en su actividad, lo cual produce la degradación paulatina de la fertilidad de los suelos, disminuye su productividad y el control natural de patógenos (Bayan & Levanovy, 1996); obligando al

agricultor a utilizar fertilizantes y pesticidas cada vez más fuertes, con lo cual se contamina más el medio ambiente y se obtiene productos con menor calidad para el consumo humano y animal (Chaboussou, 1984).

Las consecuencias debidas al uso y abuso de pesticidas y fertilizantes químicos, se puede palpar en la salud tanto de plantas como de seres humanos. En humanos estas sustancias químicas son predisponentes de enfermedades como el cáncer, las intoxicaciones, las alteraciones genéticas, la esterilidad y la muerte. 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 del mismo lo que desencadena en la disminución de la producción.

Estamos en la obligación de desarrollar nuevas tecnologías para transformar la agricultura química en una agricultura orgánica donde se presentan nuevos productos con un impacto mínimo para el ambiente y que permitan mantener o aumentar los rendimientos de los cultivos (Porta, y otros, 2003). *Azospirillum* spp.*,* son bacterias que han sido objeto de numerosos estudios por su capacidad de promover el crecimiento vegetal de diversos cultivos de importancia agronómica (Dobbelaere, y otros, 2001). Se le asocia con la capacidad de incrementar la cantidad de agua y minerales disponibles; la acumulación de materia seca, el área superficial de las raíces, el diámetro radical, la densidad y largo de los pelos radicales gracias a la producción de fitohormonas (Itzigsohn, y otros, 2000).

En diversos estudios alrededor del mundo *Azospirillum* spp.*,* se reportan como un microorganismo de vida libre o asociado con las raíces de los cereales, poáceas, pastos y plantas tuberosas (Dobereiner, Marriel, & Nery, 1976). Además, existen revisiones donde se indica el uso de *Azospirillum* spp.*,* como controlador biológico debido a que tiene la capacidad de producir sustancias antibacteriales (Vázquez-Cruz, Tapia-Hernández, Macarúa-Esparza, Caballero-Mellado, & Baca, 1992) además de reproducirse en grandes cantidades bajo condiciones de alta humedad relativa; por competencia desplaza a los patógenos y dotado de fortaleza fisiológica a la planta (Bashan Y. , 1999).

En el Ecuador se han realizado investigaciones en diferentes entidades universitarias, tanto estatales como particulares, sobre los efectos que tiene *Azospirillum* sp.*,* en gramíneas arrojando resultados que han demostrando mejoras en la producción agrícola (Bayan & Levanovy, 1996).

En el año 2010, el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), efectuó talleres sobre el manejo de cultivo de maíz (*Zea mays* L.) y se recomendó el uso de *Azospirillum* sp.*,* como complemento a la fertilización de dicho cultivo.

En el año 2008, el INIAP a través de la SENESCYT, ejecutó un proyecto de uso y conservación de la biodiversidad de cepas de *Azospirillum* spp., para la producción y validación de un biofertilizante para el cultivo de *Zea mays* L., en la sierra del Ecuador, y como resultado, se obtuvo el biofertilizante comercial registrado, FERTIBACTER, y puesto a disposición de los agricultores y otros usuarios participantes del proyecto (INIAP, 2012).

En el año 2010 se realizó la tesis "Selección de Cepas Nativas de *Azospirillum* sp.*,* como promotoras del crecimiento vegetal a partir de cultivos de arroz *(Oriza sativa)* en las provincias de Guayas y Manabí" (Muriel, 2010) utilizando como inoculante el Medio Libre de Nitrógeno (NFB) semisólido en el cual no se indica el tamaño de la población microbiana. Del estudio realizado por Muriel, 2010 se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las cepas de *Azospirillum* spp., aisladas e inoculadas en las plantas de *Oriza sativa*.

En el año 2011 Reyes realizó la tesis "Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp., y evaluación de su capacidad para suplir las necesidades de nitrógeno en el cultivo de *Zea mays* L.*,* semihidropónico con dos sustratos diferentes bajo invernadero. Quito, Cayambe, Ecuador 2011". (Reyes, 2011)

En este estudio se aisló e identificó una cepa de *Azospirillum* spp., pero no la especie a partir de la rizósfera de *Zea mays* L. El *Azospirillum* sp.*,* aislado se aplicó en un sustrato comercial inerte (Klassman TS1 100%+ H_2O destilada). Como resultado se obtuvo que, *Azospirillum* sp.*,* reemplazó una parte de las necesidades de Nitrógeno de la planta en las condiciones mencionadas y que los cultivos inoculados con la bacteria no presentaron un mayor desarrollo significativo, aunque no se realizó ANOVA, frente al tratamiento con el fertilizante químico. Finalmente, los costos de producción de la fermentación de la bacteria fueron elevados (Reyes, 2011).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General

Evaluar el desarrollo y crecimiento vegetal de plantas de *Zea mays* L. inoculadas con bacterias del género *Azospirillum* sp.*,* bajo invernadero.

1.2.2 Objetivos Específicos

Aislar, purificar e identificar cepas de *Azospirillum* sp.*,* de suelos con cultivos de *Zea mays* L. cercanos a la zona del ensayo.

Preservar cultivos puros de *Azospirillum* sp.

Determinar el tiempo óptimo de crecimiento de *Azospirillum* sp., en el medio de referencia Dygs.

Propagar *Azospirillum* sp.*,* para obtener inóculos con población mínima de $1x10^8$ UFC/mL en el medio de referencia Dygs.

Comparar el desarrollo de plantas de *Zea mays* L. inoculadas con *Azospirillum* sp.*,* CM015 frente a *Azospirillum* sp.*,* comercial “FERTIBACTER” en macetas y en condiciones de invernadero.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1 Agricultura Sostenible- Interacción Planta Microorganismos

Por sostenibilidad se entiende la utilización de los recursos disponibles de forma que puedan satisfacer las necesidades de una población tanto humana como animal en crecimiento, respetando el estado del medio ambiente y conservando los recursos naturales. En los países ricos la sostenibilidad agrícola se identifica con la sostenibilidad económica. En los países pobres la sostenibilidad agrícola se manifiesta en la mejora social conservando los recursos básicos (Florez, 2009).

La agricultura sostenible permite la conservación de los recursos naturales y protección del medio ambiente manteniendo una producción continua de manera que no se resienta el sistema y que permita utilizar los recursos endógenos gestionándolos de tal manera que no se agoten y consigan el mantenimiento económico de quien los maneja en el tiempo (Labrador M. , 2001).

El suelo es uno de los factores de producción más importantes. La razón de fertilidad del suelo se encuentra en los microorganismos que alberga y que son los causantes de todas las reacciones bioquímicas que se producen en él siendo responsables por su fertilidad. La fertilidad del suelo es la capacidad que tiene para proveer de los nutrientes necesarios para que la planta pueda desarrollarse (López Fando & Bello, 1997).

Para el cuidado de la vida del suelo debemos tener en cuenta dos tipos de factores: los factores intrínsecos que dependen de los propios microorganismos del suelo para sobrevivir y los factores extrínsecos que dependen de las condiciones del medio sobre los microorganismos debido a que la calidad y estabilidad del suelo es mayor cuanto mayor diversidad de organismos sustenta (Bello, 1988). La fertilidad del suelo está relacionada

con la capacidad que tiene para albergar la vida y mantenerla a lo largo del tiempo (Vandermeer, 1995).

Para conseguir una adecuada microbiota se debe prescindir de toda práctica que lo empobrezca y haga del suelo un lugar hostil para los microorganismos, para lo cual se tiene que evitar el uso de herbicidas, la aplicación de fitosanitarios y la quema de los restos vegetales (Vásquez & Bautista, 1993).

Se denomina rizósfera al volumen de suelo que rodea a las raíces y en donde se encuentra el mayor porcentaje de los microorganismos del suelo (Florez, 2009). Los microorganismos del suelo se distribuyen de forma variable en función de su proximidad o lejanía a la rizósfera (Cersicola, 1989). Las poblaciones de microorganismos en la rizósfera alcanzan cifras de cientos de millones cm cúbicos, densidad que resulta de diez a mil veces superior a la del suelo no rizosférico (Primaversi, 1992).

En el suelo existen una serie de interacciones entre las plantas y microorganismo lo que da lugar a una serie de relaciones (Press, 1989):

- Saprofitas: Los microorganismos se alimentan de la materia orgánica muerta procedente de las plantas.
- Parásitos: producen enfermedades en las plantas.
- Simbiontes mutualistas: Forman asociaciones basadas en la ayuda mutua (las micorrizas).

La rizósfera sigue el ciclo de las plantas, es decir nace con la semilla, crece con la madurez de la planta, decrece cuando ésta envejece y desaparece cuando muere. Pero mientras dura, entra a formar parte activa de lo que se podría llamar la red alimentaria del suelo (Kolmans, 1991).

2.2 PGPR-Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*)

2.2.1 Ecología

Los microorganismos que tienen potencial considerable como agente de biocontrol y biofertilización en las plantas, pueden distinguirse en tres grandes grupo.

- Microorganismos fijadores de nitrógeno.
- Hongos micorrízicos
- Bacterias promotoras del crecimiento.

Las bacterias promotoras del crecimiento se conocen como el grupo de las PGPRs. Estas bacterias residen en la raíz donde estimulan significativamente el crecimiento de toda la planta (Bello, 1988).

Se han establecido tres características esenciales que definen a este grupo: que no requieran la invasión interna de tejidos en plantas, que tengan elevada densidad poblacional en la zona de la rizósfera una vez que hayan sido inoculados porque una población que decline rápidamente no puede competir con la microbiota nativa del suelo donde se aplicó y que no sea nocivo para el hombre, animales ni otros microorganismos (Lighfoot, 1991). Los mecanismos que producen los cambios morfo fisiológicos que suceden en una planta que ha sido inoculada con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal aún no han sido identificados y se consideran dentro de un modelo de “caja negra” en el cual lo importante es el resultado, es decir la promoción del crecimiento gracias al microorganismo inoculado o alguno de sus metabolitos (Cassan, Sgroy, Perrig, Mascierelly, & Luna, 2008).

2.2.2 Mecanismos de Acción

Existen dos tipos de mecanismos por los cuales las PGPRs interactúan con las plantas:

a) Mecanismo indirectos: los metabolitos producidos por las PGPRs 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 (Boehnert, 1990).

b) Mecanismos directos: Suceden cuando las cepas producen metabolitos reguladoras del crecimiento o precursores de éstos en la planta (Sarabia Ochoa, Martínez Trujillo, Madrigal Pedraza, & Carreón Abad, 2010).

Al unirse estos dos mecanismos sucede la promoción del crecimiento vegetal en las plantas. Se ha podido constatar el incremento en el vigor y en el peso de las plántulas y el mayor desarrollo de los sistemas radiculares (Bashan Y. , 2002). (Figura 1)

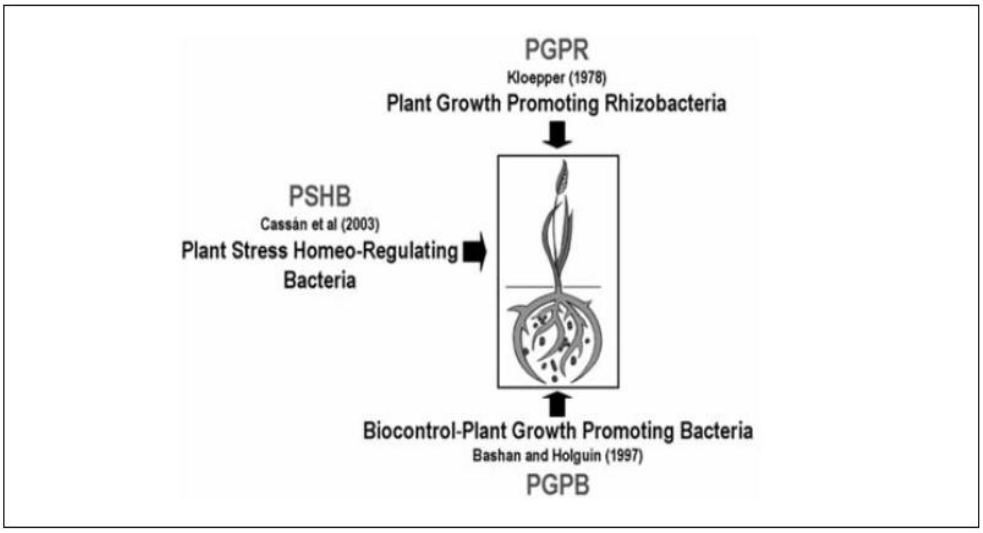

Figura 1. Clasificación de las rizobacterias benéficas para el crecimiento y desarrollo de plantas de acuerdo a los mecanismos involucrados en la interacción. GAUDY, 1981.

2.3 Género *Azospirillum*

2.3.1 Historia

Azospirillum lipoferum fue descrita en sus inicios como *Spirillum lipoferum* en 1925 por Martinus Willem Beijerinck. En 1973 Juan José Peña-Cabriales y Johanna Döbereiner realizaron estudios sobre la bacteria. A partir de los cuales este microorganismo a de vivir una gran notoriedad debido a su capacidad de establecer relaciones simbióticas con plantas tropicales y cereales. Hiltner en 1904, observó por primera vez la acumulación de microorganismos en la zona radical y propuso el término rizósfera. Los exudados radiculares, conformados por sustancias diversas crean alrededor de las raíces, un ambiente nutricional enriquecido que favorece el crecimiento bacteriano. Smith y Martín & Kemp reportaron la presencia de carbohidratos y aminoácidos, y señalan que la

composición y cantidad de exudados varía con la especie presente y las condiciones abióticas, tales como agua y temperatura (Mayz-Figueroa, 2004).

La capacidad de *Azospirillum* sp.*,* para estimular el crecimiento de las plantas y así mismo incrementar el rendimiento de los cereales a los cuales se encuentra generalmente asociado ha promovido numerosos estudios sobre su ecología, fisiología y genética. Actualmente su estudio ha empezado a extenderse por diferentes países (Couillerot, Poirier, Caballero Mellado, Moenne-Loccoz, & Mavingui, 2010).

2.3.2 Generalidades

El género *Azospirillum* es parte de la clase *alfa* de las proteobacterias perteneciente a la familia Rhodospirillaceae, siendo *A. lipoferum* la especie tipo (Creus, Sueldo, & Barassi, 2004). El género *Azospirillum* microscópicamente se caracterizan por ser bacilos Gram negativos en cultivos jóvenes y Gram variable en cultivos envejecidos, gruesos, ligeramente curvos o rectos, y muchas veces con extremos puntiagudos (Casanovas, Barassi, & Andrade, 2003).

Azospirillum spp., es uno de los géneros de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal más estudiados actualmente por su capacidad de inducir el crecimiento, el desarrollo y rendimiento de especies vegetales importantes para la agricultura (Bashan & Holguin, 1994). Esta bacteria es cosmopolita, y puede encontrarse en el suelo especialmente en la rizósfera y en asociación con raíces de gramíneas y de plantas tuberosas. La mayoría de los aislamientos se han obtenido a partir de cereales y de pastos tropicales. Uno de sus principales mecanismos es la capacidad de producir compuestos conocidos como fitohormonas más que su capacidad de fijar nitrógeno en la rizósfera (Okon & Labandera, 1994). Las principales fitohormonas que produce la bacteria son: auxinas, citoquininas y giberlinas (Dobbelaere, y otros, 2001). El mecanismo analizado con mayor amplitud suele ser la producción de auxinas, la cual puede modificar el contenido de fitohormonas de las plantas conduciendo a la estimulación del crecimiento de las mismas (Puente, Perticari, & García, 2007). Los efectos benéficos sobre el crecimiento vegetal están relacionados también a la capacidad para reducir nitrato, solubilizar fosfatos, sintetizar antibióticos y principalmente sustancias promotoras del crecimiento de las plantas (Bashan, Holguin, & Ferrera-Cerrato, 1996). En la inoculación de *Azospirillum* spp.*,* se destaca principalmente la asociación al mejoramiento del desarrollo

de las raíces y el consecuente incremento de la tasa de absorción de agua y de minerales (Dallas, 2004).

Esta bacteria también produce polihidroxialcanoatos (PHA), que son una familia de poliésteres de ácidos alcanóicos, insolubles en agua, biodegradables y no tóxicos, que contienen el grupo funcional hidroxilo en adición al grupo carboxilo. La variabilidad de la posición del grupo hidroxilo, así como la variedad de monómeros y de grado de polimerización, permiten la biosíntesis de muchos polímeros diferentes con propiedades físicas diversas (Dobbelaere, Vanderleyden, & Okon, 2003). La bacteria del género *Azospirillum* produce el elemento más pequeño de los PHA, el poli ß hidroxibutirato (PHB) alrededor de 1,5 g/l, los cuales pueden constituir entre el 25% y el 50% del peso seco en células cultivadas en un medio libre de nitrógeno (Holt, Krieg, & Sneath, 1994).

La producción y acumulación de los gránulos de poli ß hidroxibutirato (PHB) constituye el principal mecanismo de supervivencia ya que son empleados por las células bacterianas como fuentes de carbono y energía durante períodos de inanición e incluso son capaces de formar quistes en condiciones muy desfavorables (Casanovas, Barassi, & Andrade, 2003). La producción de estos gránulos está influenciada negativamente por altos niveles de aireación, bajos niveles de nitrógeno y fósforo (Martínez, 2004).

Azospirillum spp.*,* crece en atmósferas microareofílicas pero también crece bien en presencia de O_2. Las condiciones de baja concentración de oxígeno son las adecuadas para el crecimiento y multiplicación de las bacterias de este género, siendo inhibidas por las altas concentraciones de oxígeno y condiciones anaeróbicas. En el medio de cultivo pero es necesario que esté una fuente nitrógeno fijado (Cattáneo, Creus, Bariffi, Sueldo, & Barassi, 1996).

Su metabolismo es principalmente de tipo respiratorio, utilizando el O_2 y algunas cepas el NO_3. Bajo concentraciones limitantes de oxígeno algunas cepas pueden desnitrificar el NO_3 (Olmedo, Thuar, & Avanzini, 2002).

Al ser cultivadas en un medio líquido o semisólido presentan movilidad con un característico movimiento en forma de espiral, tipo “sacacorchos” gracias a sus flagelos

polares pero en ocasiones cuando se los cultiva en medios sólidos desarrollan flagelos perítricos (Cassan, Sgroy, Perrig, Mascierelly, & Luna, 2008).

La competencia de crecimiento de este microorganismo depende de la disponibilidad de nutrientes disponibles en la rizósfera y que la bacteria necesite para su desarrollo (Rivera Botía, 2008). Existen sustancias de origen microbiano o vegetal que pueden inhibir o incrementar el desarrollo de estas bacterias. Las condiciones ambientales como el clima, tipo de suelo, temperatura y humedad del mismo, influyen en los procesos interactivos que determinan la estructura de la comunidad microbiana, así como también en la asociación *Azospirillum* spp*.,* con la planta y su contribución a la nutrición vegetal. (Dobbelaere, y otros, 2001)

2.3.3 Identificación

En la actualidad se reconocen siete especies en el género *Azospirillum*. Las que primero fueron descritas son: *A. lipoferum* y *A. brasilense*, las cuales así mismo son las especies más estudiadas. Luego fueron descritas *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. doebereinerae.* Se describieron posteriormente cinco nuevas especies: A*. oryzae, A. melinis, A. zeae, A. canadense* y *A. rugosum.* Pocos años después del redescubrimiento de *Azospirillum* spp. y hasta alrededor de 1993, este género fue el más estudiado entre las bacterias asociadas a plantas (Eckert, 2001).

Las características típicas para la identificación morfológica y bioquímica del género *Azospirillum* se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1: Identificación bioquímica y morfológica del género *Azospirillum* spp.

Pruebas Bioquímicas		**Pruebas Morfológicas**	
PRUEBA	**RESULTADO**		
Oxidasa	Positivo	Forma cellular	Bacilos ligeramente curveados o rectos
Catalasa	Positivo	Tinción de Gram	Negativo
		Presencia de gránulos de poli B hidroxibutirato	Positivo
		Movilidad	Positivo tipo sacacorcho

Fuente: Bergey 1994.

Para la identificación de las especies de *Azospirillum* sp*.,* se realizan pruebas bioquímicas que permiten evaluar su capacidad para usar compuestos que contengan fuentes de C y N (Tabla 2).

Tabla 2: Características bioquímicas de las especies de *Azospirillum* spp.

Rasgo fenotípico	*A doebereinerae*	*A lipoferum*	*A largimobile*	*A brasilense*	*A halopraferans*	*A irakense*	*A amazonense*
Solubilización de carbohidratos con API 50CHE y API 20NE (aeróbico)							
N acetylglucosamina	-	+	+	-	ND	+	D
D Glucosa	D	+	+	D	-	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	-	-
D Manitol	+	+	+	-	+	-	-
D Ribosa	-	+	+	-	+	D	+
D Sorbitol	+	+	+	-	-	-	-
Sucrosa	-	-	ND	-	-	+	+
D: 11 +/- 89% DE TODAS LAS MUESTRAS POSITIVAS ND: NO DEFINIDO							

Fuente: Eckert, 2001.

2.3.4 Requerimentos Nutricionales

Azospirillum spp.*,* como fuente de carbono usa para su crecimiento monosacáridos, disacáridos, alcoholes polihidroxilados, y principalmente ácidos orgánicos (málico y succínico) y algunos aminoácidos El metabolismo de compuestos carbonados y nitrogenados es muy versátil y se adapta mejor al entorno rizosférico (Hartmann, Burris, & Fu). Como fuentes nitrogenadas, *Azospirillum* sp., puede utilizar un amplio rango de sustratos como: amonio, nitrato, nitrito, aminoácidos y nitrógeno molecular (Bashan Y. , 1999).

La respuesta quimiotáctica a diferentes fuentes de carbono es variable dependiendo de la especie de *Azospirillum* sp., e incluso es específica (Bashan Y. , 2002). Cuando las bacterias se siembran en un medio óptimo y en condiciones adecuadas, sucede el incremento en el número de células en cortos periodos.

Algunos estudios indican que la quimiotaxis a los exudados de raíz es uno de los factores que influyen en la llegada de los microorganismos a la rizósfera.

Tanto en *A. lipoferum* como en *A. brasilense* se demostró una fuerte actividad quimiotáctica hacia diversos azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos, así como a compuestos aromáticos y exudados radicales (Reinhold, Hurek, & Fendrik, 1985).

Los requerimientos nutricionales están determinados por el tipo de metabolismo celular. Otro factor esencial está determinado por las condiciones del cultivo. Para la producción de biomasa en bacterias del género *Azospirillum* spp., es importante mantener en el sustrato la relación C/N mínima para iniciar el metabolismo microbiano (Rodelas, 1993).

La preparación de medios para el desarrollo de procesos, tanto de fermentación como de aumento de la biomasa de los microorganismos, es la etapa fundamental que asegura la productividad del cultivo (Smith & Madigan, 2009).

Fuentes de carbono**:**

Azospirillum spp*.,* crece en ácidos orgánicos como málico, succínico, láctico y pirúvico. *A. brasilenses* es más exigente ya que no crece en D-glucosa, D-manosa, D-sorbosa ni sacarosa; además no crece ni fija N_2 en medios con en D-fructosa, galactosa, D y L-arabinosa. *A. lipoferum* tiene menos restricciones en cuanto a las fuentes de carbono, debido a que crece en los mismos ácidos orgánicos y carbohidratos usados por *A. brasilense* y también en glucosa, manosa y sorbosa (Rodríguez-Cáceres, 1982).

Fuentes de nitrógeno:

Cuando *Azospirillum* spp*.,* se encuentra en ambientes con baja tensión de nitrógeno expresa la actividad de nitrogenasa. La presencia de cofactores como el hierro y el molidbato ayudan a la fijación de nitrógeno. Para la síntesis de proteínas se requieren en general L-aminoácidos, aunque también son necesarios algunos aminoácidos de la serie D como D-alanina y D-aspártico. *Azospirillum lipoferum* también requiere péptidos de histidina para la fijación de nitrógeno (Hartmann & Burris, 1988).

Fuentes de fósforo:

Es uno de los elementos fundamentales para que *Azospirillum* spp., pueda desarrollarse tanto en suelos como en los medios de cultivo. Este elemento estimula el metabolismo del carbono y la fijación de nitrógeno. La presencia o ausencia del fósforo

puede inhibir el desarrollo del microorganismo. Los requerimientos de otros macronutrientes como el P y S son suministrados en forma de PO_4H, SO_4 o aminoácidos azufrados. El fósforo es incorporado en los ácidos nucleicos y en los polímeros celulares (Okon, Albrecht, & Burris, 1976).

Fuentes de magnesio y potasio:

Son elementos necesarios para la fijación de nitrógeno por parte de *Azospirillum* spp. El potasio se une al ARN aumentando así los factores que influyen en el aumento de la molécula en la célula y la velocidad de crecimiento. El ión magnesio es indispensable para la estabilización de los ribosomas y actúa como cofactor en numerosas reacciones metabólicas (Reinhold, Hurek, & Fendrik, 1985).

Los dos elementos se incorporan a los medios en forma de sales de fosfato y de sulfato. Las cantidades que las bacterias fijadoras de nitrógeno requieren de potasio son bajas ya que en altas cantidades su crecimiento es inhibido (Bashan & Holguin, 1994).

Microelementos:

Son elementos menores que se añaden en la solución de microelementos (1 mL/L) en los medios de cultivo para *Azospirillum* spp., que contribuyen al funcionamiento estructural de varias enzimas (Okon, Albrecht, & Burris, 1976). Se distinguen dos categorías de micronutrientes: los que son usados para el crecimiento de la bacteria: Ca, Mn, Fe, Co, Cu y Zn y los que pocas veces son esenciales: B, Na, Al, Si, Cl, V, Cr, Ni, Se, As, Mo, Sn, I. Los requerimientos de estos componentes pueden aumentar varias veces cuando el cultivo ha estado sujeto a stress como el aumento de temperaturas por encima de un valor óptimo (Estola, Yantorno, & Mignone, 1994).

Vitaminas:

Muchas de ellas forman parte de coenzimas. La mayor parte de los microorganismos son capaces de sintetizar todos los componentes de sus coenzimas, pero algunos no lo son y necesitan que se les suministre ciertas partes de estas coenzimas en forma de vitaminas. Las principales vitaminas requeridas por los microorganismos son tiamina (vitamina B1), biotina, riboflavina, ácido nicotínico, ácido pantoténico y piridoxina (vitamina B6 y B12) (Smith & Madigan, 2009).

Efectos de factores físicoquímicos sobre *Azospirillum* sp.

Cuando las bacterias se siembran en un medio de cultivo óptimo y bajo condiciones adecuadas de incubación, ocurre un incremento en el número de células en períodos muy cortos. (Mark, Peoples, & Craswell, 1992).

pH:

Azospirillum spp., tienen crecimiento óptimo que comprende entre un pH de 6,5 - 7,0. Si el microorganismo no cuenta con el pH correspondiente el desarrollo es inhibido. Los valores de su pH óptimo de algunas especies se detallan a continuación: para *Azospirillum brasilense*: pH 6,0-7,8; *Azospirillum lipoferum*: pH 5,7-6,8; *Azospirillum amazonense*: pH 5,7-6,5; *Azospirillum halopraeferens:* pH 6,0-8,0; *Azospirillum doebereinerae:* pH 6,0-7.0.

Temperatura:

Para la mayoría de *Azospirillum* spp., la temperatura óptima a la que crecen es de 30 ºC, excepto para *Azospirillum largimobile* que se desarrolla a 28 ºC y *Azospirillum halopraeferens* a 41º C. La modificación de la temperatura en la cual las bacterias se encuentran en el medio de cultivo influye negativamente en su crecimiento. Si la temperatura de incubación no es el adecuado, puede disminuir o hasta impedir la formación de un metabolito determinado (Schneider, Tilak, & Schlegel, 1986).

Aireación:

Cuando los niveles de oxígeno se encuentran bajos, las bacterias crecen y se multiplican satisfactoriamente. Para mantener el crecimiento y proliferación adecuados de *Azospirillum* spp., se ha demostrado que la aireación debe ser cercano a 1/5 del volumen del medio de cultivo (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

2.3.5 Mecanismos de Estimulación del Crecimiento Vegetal

La asociación de *Azospirillum* spp., y las raíces de poáceas y plantas tropicales es común, aunque dichas asociaciones carecen de estructuras visibles que indiquen alguna clase de infección en la planta. Los primeros mecanismos que se propusieron para la promoción del crecimiento vegetal estuvo relacionado con la fijación biológica de vida libre de nitrógeno y por el incremento de la actividad nitrato reductasa pero ahora estos

mecanismos tienen menor significancia agronómica debido a la producción de fitohormonas (Vandenhobe, Merck, Steenberg, & Vlassak, 1993).

2.3.5.1 Auxinas

Son compuestos químicos con capacidad fitoreguladora las cuales inducen la elongación de las células del tallo en la región subapical y que logran reproducir el efecto fisiológico del ácido indol 3-acético (AIA). Estos compuestos influyen en el crecimiento de los tallos y las raíces según su respuesta a la luz y gravedad, en la diferenciación de tejidos vasculares, dominancia apical, iniciación de las raíces laterales y adventicias, estimulación de la división celular y elongación de tallos y raíces (Ross, O`Neill, Kerckhoffs, & Elliot, 2000). La producción y el metabolismo de las auxinas tiene su importancia a nivel metabólico, por la capacidad del microorganismo para producir estos compuestos y regular su producción en diferentes condiciones ambientales (Costacurta, Vanderleyden, & Keijers, 1994) y a nivel morfofisiológico por el efecto que ocasiona su producción en asociación con distintas especies vegetales (Falik, Okon, & Goldman, 1999).

Diferentes clases de auxinas se han descrito como producto del metabolismo bacteriano. Para *Azospirillum* sp., además de la forma principal, el ácido indol-3-acético (AIA), también se han logrado identificar otros compuestos indólicos como el ácido indol-butírico (IBA), indol láctico, indol acetamida, indol acetaldehído, indol etanol e indol metanol, triptamina, antranilato y otros compuestos indólicos no caracterizados aún (Crozier, 1988).

En la actualidad sabemos que al menos cuatro vías de síntesis diferentes han sido descriptas para el género *Azospirillum* sp.*,* tres dependientes del triptófano (Trp): Indol 3-pirutato (AIP), Indol 3-acetamida (AIM) y Triptamina (Tam) y una que no utilizaría a este aminoácido como precursor. La magnitud de expresión de cada vía depende fundamentalmente de las condiciones de crecimiento bacteriano y en general se considera que la síntesis mayoritaria depende de la disponibilidad del triptófano (Trp) en el sustrato (Bashan Y. , 2002).

Si bien *Azospirillum* spp.*,* es incapaz de inducir la formación de nódulos propiamente dichos en leguminosas, se ha probado que la aplicación exógena de ciertas auxinas sintéticas en concentraciones suprafisiológicas en raíces de gramíneas, induce la

formación de estructuras tumorales denominadas paranódulos que serían efectivamente colonizados por *Azospirillum* spp.*,* y en ellos la bacteria fijaría N de manera más eficientes (Christiansen-Weniger, 1998). Otros trabajos han demostrado la respuesta benéfica de la inoculación conjunta de *Rhizobium* spp.*,* y *Azospirillum* spp.*,* en leguminosas, a nivel de la respuesta de la fijación biológica del nitrógeno no solo con un aumento en el número de nódulos, sino que adicionalmente con una mayor actividad de la enzima nitrogenasa (Yahalom, Okon, & Dovrat, 1990). El rápido establecimiento de la planta en el suelo, mediado por la elongación de la raíz principal o por la proliferación de las raíces laterales y adventicias, resulta ventajoso desde el punto de vista adaptativo, porque aumenta su capacidad de anclarse al suelo y obtener agua y nutrientes del ambiente durante los estadios críticos de desarrollo vegetal (Baca, Soto-Urzua, Xochiua-Corona, & Cuervo-García, 1994).

2.3.5.2 Giberelinas (GAs)

Son compuestos químicos naturales (ácidos diterpenos tetracíclicos) que regulan diversos procesos como la germinación, el alargamiento caulinar, la floración y la fructificación. Existen por lo menos 130 compuestos esenciales para el normal crecimiento y desarrollo de todas las plantas superiores, producidos tanto por plantas, hongos y bacterias (Cassan, Sgroy, Perrig, Mascierelly, & Luna, 2008).

Desde el punto de vista estructural, las giberelinas libres se dividen en dos grandes grupos: aquellas que poseen un complemento completo de átomos de carbono, (GAs-C_{20}) y aquellas en las que el carbono veinte (C_{20}) se pierde (GAs-C_{19}). Todas las GAs están carboxiladas en el carbono siete, con excepción de GA12-aldehído. Las GAs pueden definirse como productos de la vía de los diterpenos y su síntesis, en plantas superiores se inicia con la producción de un precursor común de veinte moléculas de carbono, el geranilgeranil pirofosfato (GGPP). Este intermediario es sintetizado en los plástidos a partir del ácido mevalónico (AM), isopentenil difosfato proveniente del gliceraldehído 3-fosfato ó bien como se comprobó recientemente a partir del piruvato proveniente de la vía de la deoxixulosa 5-fosfato (Bashan, Holguin, & Ferrera-Cerrato, 1996).

De las 126 GAs estudiadas en la actualidad, 13 son específicas de hongos**,** 100 son exclusivas de plantas y 13 son ubicuas (Bashan & Holguin, 1994).

A pesar de esta amplia distribución y de la cantidad de formas conocidas, solo algunas pocas tienen actividad biológica (Hartmann & Burris, 1988). La evidencia sugiere

que en el caso de los microorganismos, la producción de GAs y auxinas incrementa rápidamente al comienzo de la fase estacionaria de crecimiento (Altieri & Anderson, 1986). Resulta difícil suponer acerca del rol fisiológico de las GAs producidas por el microorganismo a nivel rizosférico y se suele pensar que la promoción del crecimiento vegetal generalizado de las plantas colonizadas podría ser beneficioso para la bacteria desde el punto de vista de la disponibilidad de nutrientes a nivel rizosférico, pero el atribuir esta actividad solo a la producción de una sustancia por parte del microorganismo, es incorrecto, en especial si se toma en cuenta la variabilidad de las respuestas y las numerosas especies que responden positivamente a la inoculación (Bashan Y. , 2002).

La mayor parte de estudios de campo se han enfocado en cuantificar el aumento de la producción vegetal por la inoculación, en especial desde el punto de vista de la incorporación de nitrógeno, y la producción de materia seca (Bashan & Holguin, 1994).

2.3.5.3 Citocininas

Las citocininas son compuestos químicos que regulan la división y diferenciación celular en tejidos no meristemáticos de plantas superiores. Estos compuestos naturales químicamente son purinas, en su mayoría derivadas de la adenina, sustituidas en el N_6. Estas fitohormonas se han asociado a un gran número de procesos fisiológicos y celulares entre los que se detallan el retardo de la senescencia por acumulación de la clorofila, la formación de órganos en una gran variedad de cultivos de tejidos, el desarrollo de la raíz, la formación de pelos radicales, la elongación de la raíz, la iniciación del tallo, la expansión de las hojas (Carlos O. Miller, 1955).

Son compuestos que en presencia de concentraciones óptimas de auxinas, inducen la división celular en cultivos o tejidos vegetales. La primera en ser descubierta fue la cinetina (K) la cual fue considerada como una forma no natural de la hormona, luego en 1963 se identificó una forma natural que denominó zeatina (Z) y desde entonces más de 40 moléculas y sus metabolitos han sido clasificados (Cattáneo, Creus, Bariffi, Sueldo, & Barassi, 1996).

La bioactividad no es uniforme en las formas identificadas y en la mayoría de los casos depende del tipo de anillo aminopurina presente en la molécula; de la sustitución del N_6 con una cadena simple derivada de una unidad isopurina; de la sustitución de las

posiciones 2 y 9 de los anillos. Las formas con mayor actividad biológica descrita sobre tejidos o cultivos vegetales son la Zeatina (Z), la isopentenil-adenina (iP), la cinetina (K) y la benziladenina (BAP) y todas poseen un doble puente alquil en la posición N_6 (Martínez, 2004).

2.3.5.4 Etileno

El etileno es una hormona muy importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Cleland, 1987). Debido a su composición gaseosa en condiciones fisiológicas, por mucho tiempo, no se quiso aceptar como una fitohormona; sin embargo diferentes trabajos, demostraron que su síntesis y acción sobre la planta, es crítica para determinados procesos fisiológicos (Tien, H., & H., 1979.). Existe muy poca información disponible, relacionada a la producción de etileno por *Azospirillum* spp., y su efecto sobre el crecimiento vegetal. Sin embargo, diversos estudios determinaron que la bacteria podía sintetizar etileno y que la producción dependía de la presencia de metionina en el medio de cultivo (Ross, O`Neill, Kerckhoffs, & Elliot, 2000).

El etileno es una molécula muy simple y simétrica, compuesta por dos átomos de carbono (unidos en doble ligadura) y cuatro átomos de hidrógeno, soluble en agua en aproximadamente 140 ppm, 25 C y 760 mm Hg (15 veces más que el oxígeno) (Dobereiner, Marriel, & Nery, 1976). Puede ejercer sus efectos fisiológicos a concentraciones muy bajas en el tejido vegetal (0.1 ppm). En plantas superiores, todos los tejidos tienen capacidad de sintetizar esta hormona, pero en general la magnitud de la expresión, se asocia al estado de crecimiento y al desarrollo de los mismos, siendo más activa en aquellos tejidos en la división celular activa, que se encuentran bajo condiciones de estrés ó en estado de senescencia (Eckert, 2001).

2.3.6 Utilización de *Azospirillum* spp., en la Agricultura

La producción de biofertilizantes a base de PGPRs se ha incrementado en muchos países, ya que se ha reconocido su aplicación y eficacia agronómicas. La utilización de *Azospirillum* spp., como biofertilizante tiene mayor importancia en los sistemas *Azospirillum*-poácea como el mijo (*Panicum miliaceum)*, trigo (*Triticum sativum)* y *Zea mays* L., pero también en las raíces de plantas de otras familias que incluyen al algodón

(*Gossypium)* y tomate (*Solanum lycopersicum)*. (Costacurta, Vanderleyden, & Keijers, 1994).

Cuando *Azospirillum* spp.*,* crece en condiciones que no son las adecuadas para su desarrollo produce altos niveles de gránulos de poli ß hidroxibutirato, por lo cual deben tratar de inducirse durante la fase de producción de biofertilizantes, ya que estos gránulos constituyen un mecanismo que favorece el establecimiento, proliferación y sobrevivencia de estos organismos en ambientes competitivos como el suelo (Okon & Labandera, 1994).

2.4 Maíz (*Zea mays* L.)

REINO:	Plantae
DIVISIÓN:	Magnoliophyta
CLASE:	Liliopsida
SUBCLASE:	Commelinidae
ORDEN:	Poales
FAMILIA:	Poaceae
SUBFAMILIA:	Panicoideae
TRIBU:	Andropogoneae
GÉNERO:	*Zea*
ESPECIE:	(*Zea mays* L.) (Florez, 2009)

2.4.1 Morfología

El *Zea mays* L. pertenece a la familia de las poaceae. El tallo es simple erecto, de elevada longitud pudiendo alcanzar los 4 metros de altura, de grosor >15 mm y macizos. Las hojas son anchas (2 cm -10 cm), con nervio central marcado. Es una planta monoica, con las flores masculinas en panícula terminal (penacho), las flores masculinas están formadas por lema, palea, 2 radículas y 3 estambres, dos en cada espiguilla, también emparejadas, una casi sésil y la otra cortamente pedicelada (Labrador M. , 2001).

Las flores femeninas en inflorescencias axilares (panoja o mazorca), son dos por espiguilla siendo una de ellas estéril, lema y palea muy reducidas; espiguillas sentadas sobre el eje grueso de la mazorca y glumas reducidas (Fernández, 2002). Estilos de gran longitud, exertos por la parte apical de la mazorca, formado la cabellera. El fruto ocupa una cariópside, dura, generalmente amarilla. Las hojas se encuentran abrazadas al tallo y por

el haz presenta vellosidades. Las raíces son fasciculadas y su misión es la de aportar un perfecto anclaje a la planta. En algunos casos sobresalen unos nudos de las raíces generalmente en aquellas raíces secundarias o adventicias (Fernández, 2002).

2.4.2 Siembra

Zea mays L., se adapta a todos los tipos de suelo, pero los que se encuentran entre un pH de 6 -7 son los mejores. Se desarrolla mejor en suelos profundos, ricos en materia orgánica y con buen drenaje. (Méndez & Silvestre, 2009).

En la preparación del terreno se recomienda efectuar una labor de arado al terreno con grada para que quede suelto y sea capaz de tener cierta capacidad de retención de agua sin que se produzcan encharcamientos. En las operaciones de labrado los terrenos deben quedar limpios de restos vegetales (Labrador, Porcuna, & Bello, 2006).

Las semillas se siembran a una profundidad de cinco centímetros a partir de la superficie. La siembra se puede realizar a golpes, en llano o a surcos. La separación de líneas es de 0,8 a 1 m y la separación entre los golpes de 20 – 25 centímetros. El cultivo de *Zea mays* L., es exigente en agua. El riego más empleado es por aspersión. Las necesidades hídricas varían a lo largo del cultivo. Cuando las plantas comienzan a nacer se requiere menos cantidad de agua pero debe haber una humedad constante (Colmenares, Pérez-Sarmentero, & Molina, 1994). La fase de floración es la etapa más crítica debido a que de ella depende el cuajado y la producción obtenido, por lo cual es aconsejable riegos que mantengan la humedad y permitan una eficaz polinización y cuajado. El aclareo es una labor de cultivo que se realiza cuando la planta ha alcanzado un tamaño de 25 – 30 cm de altura el cual consiste en dejar una sola planta por golpe. Otras labores de cultivo son las de romper la costra endurecida del terreno para que las raíces adventicias se desarrollen. (Fernández, 2002).

2.4.3 Requerimientos Ambientales

Su óptimo de crecimiento se encuentra entre los 20 ºC -30 ºC. No tolera el frío ni la sequía. Se adapta a distintas condiciones edáficas, pero resiste mal el encharcamiento (Colmenares, Pérez-Sarmentero, & Molina, 1994).

2.4.4 Distribución y Zonas de Cultivo

Zea mays L., es originaria de la América tropical. En la actualidad es el principal cultivo forrajero de verano en las zonas templadas cálidas y en las zonas húmedas subtropicales del planeta, su cultivo se ha extendido a zonas templadas húmedas gracias a la aparición de variedades de ciclo corto (Florescano, 2003).

2.4.5 Variedades

En el mercado existe una gran oferta de variedades que se agrupan según la duración de su ciclo vegetativo. Las variedades ultra precoces tienen un ciclo menor a 80 días. Las variedades muy tardías son más productivas pero tardan más de 140 días en llegar a su madurez fisiológica (López Fando & Bello, 1997).

2.4.6 Usos

El *Zea mays* L. sirve para producir una gran variedad de productos, por eso es el tercer alimento más cultivado en el mundo. La práctica más habitual es la realización de un único corte con destino a silo en estadio de grano pastoso (contenido de materia seca en la planta entera del 30%) (Perales, Benz, & Brush, 2005).

Se utiliza como cultivo forrajero para los animales, en la obtención de harina, extracción de aceite y se puede obtener combustible, caucho, insecticidas y plásticos debido a que uno de los componentes del *Zea mays* L., es el “furfural”. El *Zea mays* L., es alto en fibras y tiene altos valores de vitaminas B1 y A (Gonzalez, 1997). Es un cultivo muy productivo (puede superar las 20 tm/ha). Presenta alto contenido de azúcares solubles que garantizan un elevado aporte de energía y una adecuada ensilabilidad. Los contenidos proteicos son bajos (6%-9% Proteína Bruta).

En animales la digestibilidad de la planta entera es elevada y relativamente independiente del momento de corte (la producción de grano compensa la pérdida de digestibilidad del resto de la planta). Se utiliza para la alimentación animal tanto el grano (formulación de piensos, alimentación de monogástricos) como la planta entera (alimentación de rumiantes) (Altieri & Anderson, 1986).

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos de laboratorio fueron realizados en los instalaciones del Centro Internacional de la Papa (CIP) ubicado dentro de la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuaria (INIAP) y el laboratorio de microbiología de Vocación Agroecológica en Tumbaco. El ensayo de campo se llevó a cabo en los invernaderos de las instalaciones del CIP. La mencionada Estación se encuentra ubicada en la parroquia Cutuclagua del cantón Mejía en la Provincia de Pichincha. (Figura 2)

Figura 2. Centro Internacional de la Papa en la Estación Experimental Santa Catalina. http://cipotato.org/region-quito/quienes-somos

3.1 Recolección de las Muestras

Para el aislamiento de *Azospirillum* spp., se recolectaron ocho muestras de suelo rizosférico de cultivos de *Zea mays* L. Los cultivos se encontraban ubicados a lo largo de la Av. Simón Bolívar al sur de la ciudad de Quito. Por la ausencia de cultivos de gran extensión de *Zea mays* L., en el sector se realizaron los muestreos en dos cultivos (Figura 3). Luego se transportaron en un cooler el mismo día al laboratorio del CIP para ser procesadas.

Figura 3. Cultivo de *Zea mays* L., del que se extrajeron las muestras.
Fuente: Cortez, 2012.

Se tomaron varias submuestras de suelo de un mismo cultivo, para las cuales se retiraron rocas, plásticos y hojarasca de la superficie, se tomaron las muestras de suelo a 20 cm de profundidad con una pala de plástico aséptica (esterilizada con alcohol), se colocaron en un balde limpio y se las homogeneizaron. Después de recolectar las submuestras se tomaron 4 alícuotas de 20 g cada una y se colocaron en envases estériles (frascos de orina nuevos), debidamente identificados con el número de muestra, lugar del cual fue tomado y la fecha. Los envases con las alícuotas fueron puestos en un cooler con hielo para su transporte al laboratorio. Figura 4.

Figura 4. Cooler con muestras de suelo.
Fuente: Cortez, 2012.

3.2 Metodología de Laboratorio

3.2.1 Aislamiento y Purificación de Cepas

Para aislar *Azospirillum* spp., se utilizó la técnica descrita por Döbereiner, 1995 (Dobereiner, Marriel, & Nery, 1976). Se pesaron 10 g del suelo de las muestras, se colocaron en frascos Schott esterilizados con 90 mL de agua de peptona al 0,1% y se diluyeron en base 10 hasta la dilución 10^{-4}. Las diluciones se realizaron transfiriendo 1 mL de la dilución anterior a un tubo con 9 mL del diluyente. Cada transferencia corresponde a una dilución de 1 en 10. Se repitió el procedimiento de dilución hasta alcanzar la cuarta dilución. Figura 5.

Se sembraron 0,1 mL (100 µl) de cada una de las diluciones en un tubo con 9 mL de Medio Libre de Nitrógeno (NFB), semisólido y se los homogenizó con agitación. El medio NFB no es un medio comercial y por lo tanto se lo preparó según Döbereiner, 1976 (ANEXO 1) (Dobereiner & Pedrosa, 1987). Este medio contiene una fuente de carbono y algunas sales, por lo tanto los únicos microorganismos que se desarrollarán serán aquellos que sean capaces de fijar nitrógeno.

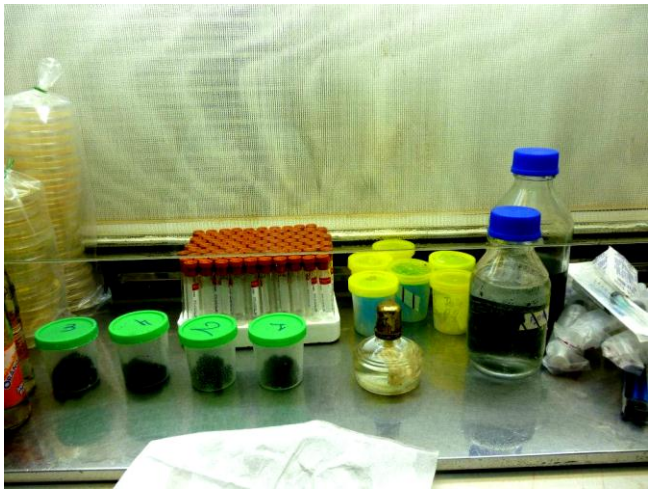

Figura 5. Materiales para el procesamiento de las muestras de suelo.
Fuente: Cortez, 2012.

Se incubaron los tubos con el medio NFB semisólido a 30 ºC por cinco a ocho días (incubadora marca Memmert). Transcurrido el tiempo de incubación se seleccionaron los tubos que presentaron un velo espeso de color blanco con medidas de entre 0,5 y 1,5 mm bajo la superficie del medio NFB semisólido y que viraron el color de este medio de verde

a azul. Mientras *Azospirillum* spp.*,* se multiplica el velo blanco migra hacia la superficie Figura 6 y 7.

El crecimiento de la *Azospirillum* spp.*,* se produce en la zona en la cual existió una presión parcial en oxígeno (pO_2) menor a 0.02% (microaerofilia), debido a que la enzima de la nitrogenasa es sumamente sensible a este gas. Es decir que la bacteria se desarrolló en el punto donde la concentración de oxígeno molecular en el medio está en equilibrio con la tasa respiratoria de las células (Dobereiner & Pedroza, 1987). El cambio de color de verde al azul característico se debe al azul de bromotimol, el cual es un indicador del pH. Cuando el medio se encuentra neutro es de color verde y cambia de color a azul por la oxidación del malato que lo vuelve alcalino (Dobereiner, Marriel, & Nery, 1976). Figura 7.

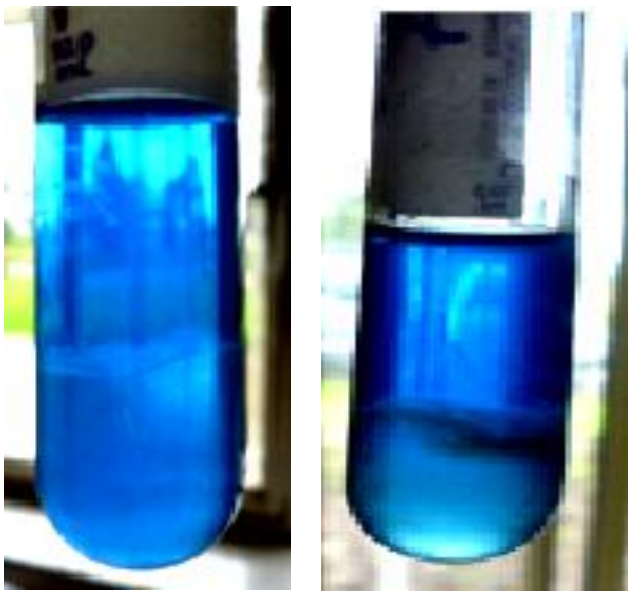

Figura 6. Medio NFB con cambio de color y velo blanco según Döbereiner, 1995.
Fuente: Cortez, 2012.

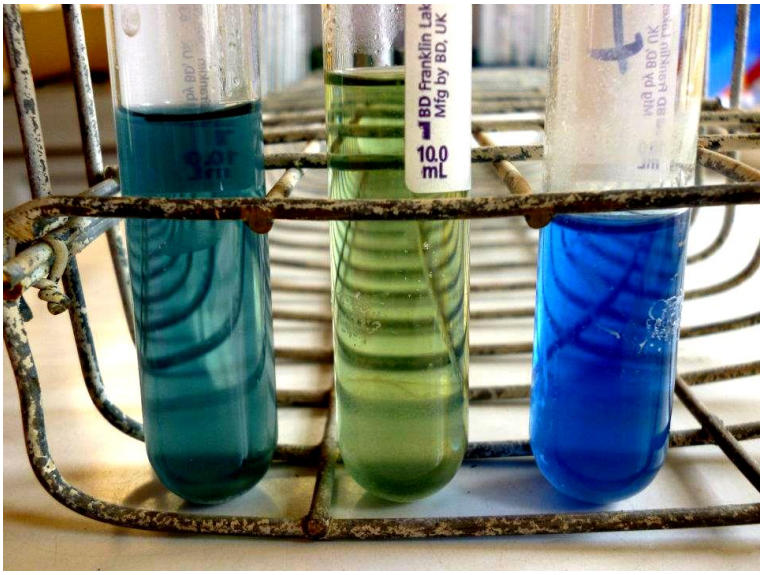

Figura 7. Tubos con Medio Libre de Nitrógeno (NFB) semisólido positivos y negativo.
Fuente: Cortez, 2012.

Con una pipeta, se tomaron 100 µl del velo blanco e inocularon en el agar NFB sólido, se estrío por agotamiento y se incubó a 30ºC en una incubadora (Memmert) de 5-7 días.

Figura 8. Caja Petri con Agar Libre de Nitrógeno (NFB) a pH neutro.

Fuente: Cortez, 2012.

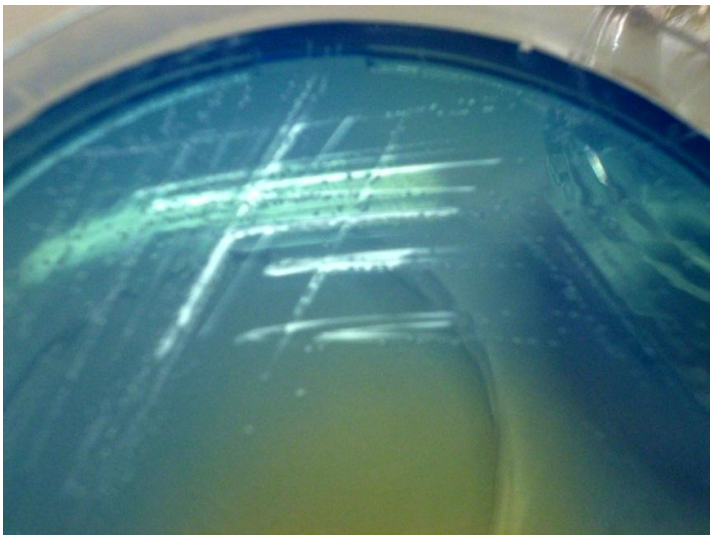

Figura 9. Colonias de *Azospirillum* spp., en Agar Libre de Nitrógeno (NFB). Fuente: Cortez, 2012.

Las pruebas de identificación bioquímica y morfológica se realizaron a partir de las colonias blancas, pequeñas, convexas, mucosas y que viraron el color del medio NFB sólido de azul a verde. Figura 9.

3.2.2 Preservación

Las cepas se aislaron y purificaron por agotamiento en PCA (*Plate count agar*), las posibles cepas positivas del género *Azospirillum* spp., fueron preservadas. A partir del crecimiento algunas colonias fueron suspendidas en TSB (ANEXO 2) más glicerol (20% v/v) y preservadas a -10 ºC.

3.2.3 Identificación

3.2.3.1 Prueba oxidasa y catalasa

Para las pruebas de identificación bioquímicas y morfológicas se aislaron las colonias del medio NFB a cajas Petri con agar cuenta estándar o *plate count agar* (PCA) (ANEXO 3). Para la prueba de oxidasa se colocó en la caja Petri con las colonias puras de las bacterias el disco comercial Taxo N (Becton, Dickinson and Company), impregnado con clorhidrato para-amino-dimetilanilina al 6%. La aparición de una coloración negra constituye una reacción positiva. Figura 10.

Figura 10. Prueba de oxidasa positiva en PCA.
Fuente: Cortez, 2012.

Para la prueba de catalasa se colocó una asada de las posibles colonias sobre un portaobjetos limpio, y sobre cada una de ellas se agregó dos o tres gotas de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) la cual es transformada por la enzima catalasa de la bacteria en agua y oxígeno evidenciándose la reacción positiva por la formación de burbujas. Figura 11.

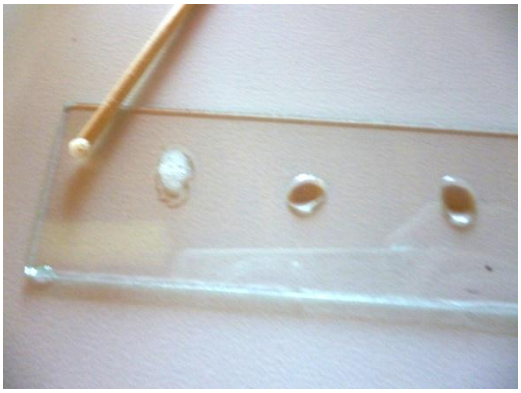

Figura 11. Prueba catalasa positiva en la izquierda.
Fuente: Cortez, 2012.

3.2.3.2 Tinción Gram y forma celular

Se realizó la tinción de Gram (ANEXO 4) utilizando colonias desarrolladas en el medio PCA que habían sido incubadas por 5-7 días en agar PCA a 30 ºC. Se observó al microscopio compuesto con un aumento de 100. Figura 12.

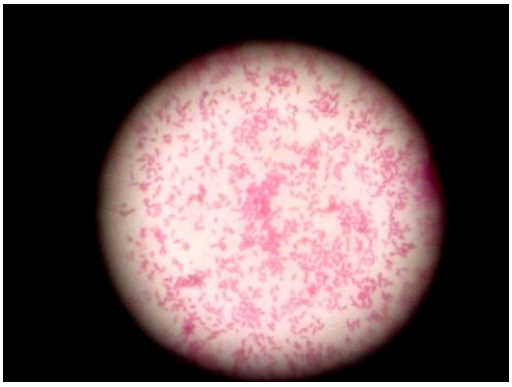

Figura 12. Tinción Gram de *Azospirillum* spp. Lente 100 x.
Fuente: Cortez, 2012.

3.2.3.3 Tinción de gránulos de poli β hidroxibutirato (PHB)

Se utilizaron cultivos que tenían 5 días de incubación en agar NFB semisólido a 30 ºC. Siguiendo el procedimiento propuesto por Bradshaw en el año de 1976 (Bradshaw, 1976). Para esto se realizó un frotis del velo en un portaobjetos limpio, se lo seca al aire y se lo fija a una llama. Se cubre el portaobjetos con negro Sudán B durante diez minutos. Se elimina el exceso de colorante en agua corriente y se deja secar colocando una tira de papel secante sobre el frotis hasta que todo el colorante se absorba. Se debe evitar mover o restregar el papel durante el secado. Luego se lava el frotis con unas gotas de xilol para eliminar el exceso de colorante y se vuelve a secar con papel secante. Para finalizar se coloca safranina acuosa (5% m/v) de 10 a 15 segundos y se lava inmediatamente con agua potable. La preparación se examina con el objetivo de inmersión de un microscopio compuesto con el fin de detectar presencia de los gránulos de poli ß hidroxibutirato, las cuales aparecieron de color azul o negro en contraste con el rojo de la pared de la bacteria. Figura 13.

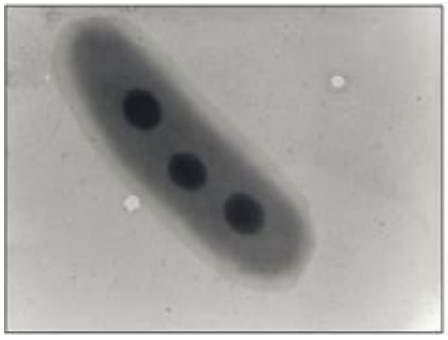

Figura 13. Gránulos poli ß hidroxibutirato.
http://microbioblogia.wordpress.com/polifosfatos/

3.2.3.4 Movilidad

Para observar la movilidad de las bacterias se inocularon las colonias aisladas del PCA en un tubo Ependorff que contenía 0,5 mL de caldo nutritivo (ANEXO 5) y se procedió a incubar a 30ºC durante 4-6 días en agitación constante a 200 rpm (agitador marca Boeco). Luego de transcurrido el tiempo de incubación, se colocaron dos gotas del cultivo en un portaobjetos limpio y se cubrió cada gota con un cubreobjetos. Las preparaciones se observaron al microscopio bajo el objetivo 40x. (Cohen, Okon, Nur, & Henis, 1980).

3.2.2.5 Identificación de la Especie de Azospirillum spp.

Algunas de las pruebas bioquímicas mencionadas en la Tabla 3 se utlizó el sistema de identificación Microgen GN-ID (Bioproducts, 2004) (ANEXO 6). Además, se realizaron las siguientes pruebas: utilización de la N-acetylglucosamina, glicerol y sucrosa.

Tabla 3. Pruebas bioquímicas en el Sistema Microgen GN ID

Pruebas Bioquímicas	
Oxidasa	TDA
Motilidad	Licuefacción Gelatina
Nitratos	Malonato
Lisina decarboxilasa	Inositol
Ornitina decarboxilasa	Sorbitol
Producción de H2S	Rhamosa
Fermentaciónn Glucosa	Sucrosa
Fermentación Manitol	Lactosa
Fermentaciónn Xilosa	Arabinosa
Hidrólisis ONPG	Adonitol
Indol	Rafinosa
Hidrólisis de la Urea	Salicina
VP	Arginina
Citrato	

Fuente: Ficha Técnica Microgen

Luego se introdujeron las matrices de probabilidades de acuerdo a la Tabla 3 en el programa PIB WIN (*Probalistic Identification of Bacteria for Windows*) Identificación Probabilistica de Bacterias para Windows. Programa que proporciona una identificación probabilística de las bacterias desconocidas aisladas por comparación con matrices de identificación de cepas conocidas. El programa fue creado por Trevor Bryant, University of Southampton Reino Unido en el 2004. (Southampton, Probabilistic Identification of Bacteria for Windows, 2012). La cepa de la bacteria aislada se denominará CM015.

3.2.4 Curva de Crecimiento Bacteriano: Siembra a Profundidad.

En este caso se usó como volumen final 250 mL del medio Dygs (ANEXO 7). Se preparó un inóculo al 10% del volumen final de medio Dygs de células vivas de *Azospirillum* spp., donde se realizó un recuento directo en el cual se obtuvo aproximadamente de $6x10^8$ UFC/mL. Entonces se inoculó 25 mL de la bacteria en medio líquido Dygs en 225 mL del medio de cultivo.

Para realizar la curva de crecimiento bacteriana se utilizó agar cuenta estándar para recuento a profundidad se para diluciones y tubos estériles para realizar la toma de muestras. La curva de crecimiento se realizó en medio PCA sembrando a profundidad las diluciones que se realizaron en tubos con solución salina (0,85% v/v). También se evaluó el cambio de pH y la coloración Gram.

Todas las muestras fueron diluidas en solución salina al 0,85% hasta la dilución 10^{-8}, sembradas a profundidad en agar cuenta estándar, incubadas a 35 º C y leídas a las 48 horas. (Figura 17)

La primera toma de muestra se realizó al momento en que se inoculó el volumen inicial, correspondiente al tiempo cero y así se continuó muestreando cada hora por las treinta y seis horas siguientes.

El medio de cultivo Dygs se utilizó como referencia, se incubó a 35 ºC y sin oxigenación. (Figura 14, 15, 16, 18 y 19). Luego de realizarse la primera inoculación, el medio de cultivo fue colocado dentro de la incubadora y se empezó a realizar la toma de muestra durante las 55 horas siguientes.

Figura 14. Materiales para recuento en caja.
Fuente: Cortez, 2012.

Figura 15. Toma de muestra del cultivo.
Fuente: Cortez, 2012.

Figura 16. Cultivo con *Azospirillum* spp.
Fuente: Cortez, 2012.

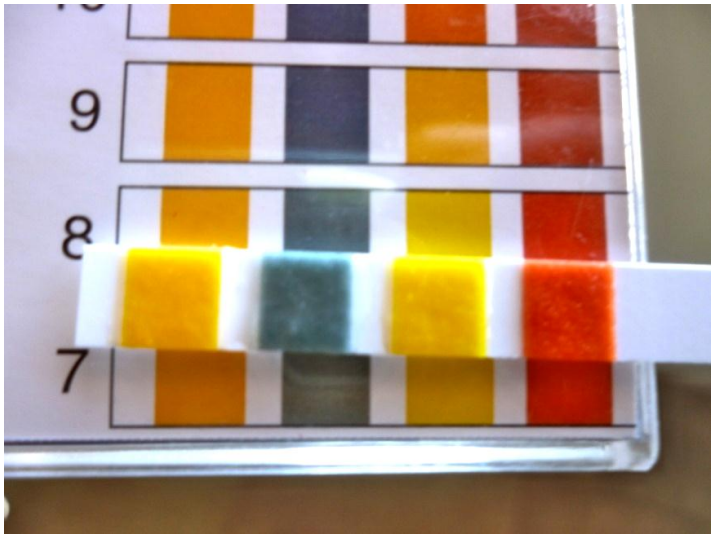

Figura 17. Medición de pH.
Fuente. Cortez, 2012.

.

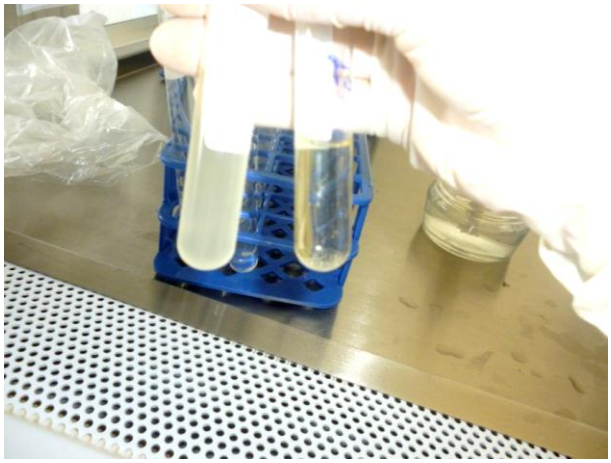

Figura 18. Cambio de turbidez en el medio Dygs por fermentación de *Azospirillum* sp.
Fuente: Cortez, 2012.

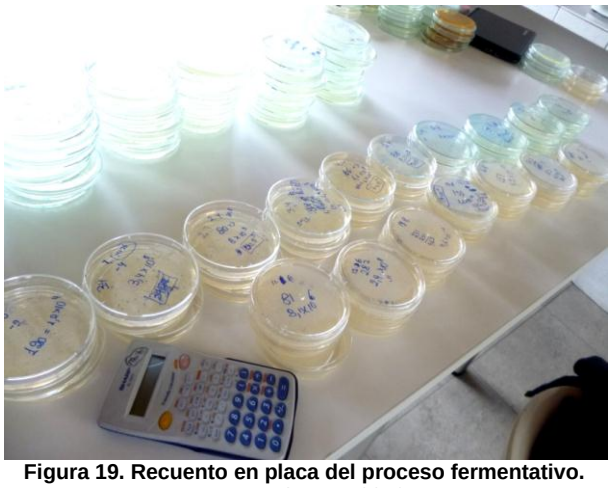

Figura 19. Recuento en placa del proceso fermentativo.
Fuente: Cortez, 2012.

3.3 Preparación del Inóculo

Con la información obtenida de la curva de crecimiento, se preparó el inóculo de *Azospirillum* spp., para la aplicación en las semillas del *Zea mays* L. provistas por Ing. Carlos Yánez del Programa del Maíz del INIAP. (ANEXO 8)

Así mismo, para la realización del ensayo en invernadero, el INIAP entregó 500 mL de su inoculante comercial "FERTIBACTER", cuyo principal componente es la bacteria *Azospirillum* sp., para ser evaluado y cuya especie es confidencial. Figura 20.

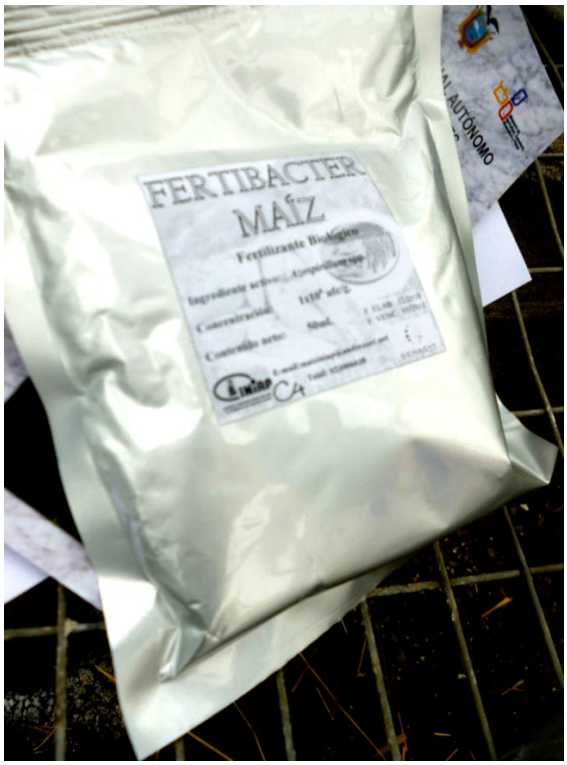

Figura 20. "FERTIBACTER"
Fuente: Cortez, 2012.

3.3.1 Inoculación de las Semillas, Siembra y Seguimiento de las Plantas.

La inoculación y la siembra de las semillas de *Zea mays* L., se realizó el día 30 de Enero del año 2012 en el invernadero número cuatro del CIP, ubicado dentro de la Estación Santa Catalina del INIAP. La temperatura promedio fue de 25ºC y se regaron las macetas pasando un día con agua entubada.

El inoculante se preparó de acuerdo con la información obtenida de la curva de crecimiento bacteriana. Se transportó el inoculante en un envase cerrado de plástico y en refrigeración.

Las semillas de *Zea mays* L., utilizadas en el ensayo no se encontraban tratadas previamente con químicos y fueron preparados siguiendo las instrucciones recomendadas por el INIAP para la aplicación de "FERTIBACTER" tanto para el tratamiento de *Azospirillum* sp. CM015 como del mismo "FERTIBACTER".

En las instrucciones se indica que para 1 Kg de semilla debe usarse 200 mL del inoculante y 20 mL de miel de abeja como adherente. La siembra de las semillas se realizó 10 minutos después de la inoculación con "FERTIBACTER" y *Azospirillum* sp., CM015.

"FERTIBACTER" tenía una concentración de $1 * 10^6\ UFC/ml$ al momento de la aplicación del *Azospirillum* sp., mientras que el inoculante del ensayo presentó una concentración de $1 * 10^{10}\ UFC/ml$.

La siembra se realizó en macetas plásticas de 20 cm de ancho y 30 cm de alto y se llenaron las tres cuartas partes con un sustrato base estéril, empleado en el Centro Internacional de la Papa. El sustrato está constituido por suelo de zanja cernida en un 50%, pomina cernida y lavada 33% y turba 17% más 0,96 Kg de bicarbonato de calcio (Vega, 1999), lo cual indica una composición balanceada para el cultivo de plantas y libre de microorganismos tanto benéficos como fitopatógenos.

Figura 21. Disposición de las macetas en el invernadero
Fuente: Cortez, 2012.

Después de 46 días de la siembra, se recolectaron las plantas, se midió su altura utilizando una cinta métrica en centímetros y se obtuvo la masa de la materia fresca húmeda de raíces y del follaje (materia verde) en gramos utilizando una balanza analítica (marca OHAUS).

3.4 Diseño Experimental

Se realizó, un diseño de bloques completos al azar (DBCA), formado por tres tratamientos cada uno con cuarenta repeticiones distribuidas en cinco unidades experimentales. Cada repetición constituyó una maceta inoculada con diez semillas de *Zea mays* L. que se mantuvieron en el invernadero a 25ºC +/- 3ºC. Al finalizar el período de siembra se midieron las variables dependientes altura de las plantas en centímetros, gramos de materia fresca húmeda de raíz, gramos de materia verde húmeda de la parte aérea y la germinación.

Los tratamientos aplicados fueron los siguientes:

A: Semillas inoculadas con *Azospirillum doebereinerae* CM015

IA: Semillas inoculadas con *Azospirillum* spp., comercial "FERTIBACTER "y

CB: Control Blanco. Semillas sin inoculación

Con la información recopilada se realizó el Análisis de Varianza (Analysis of Variance: ANOVA), para determinar diferencias significativas entre repeticiones y tratamientos y si amerita la prueba de análisis de medias de Tukey al 0,05. A continuación se presenta la Tabla 4 donde se encuentra el esquema del análisis de la varianza a realizarse.

Tabla 4. Esquema del ANOVA

Origen de la Variación	Grados de Libertad (gl)
Diferencias entre los grupos	2
Diferencias entre los sujetos dentro de los grupos	117
Variabilidad Total	119

Fuente: Statistix, 2012.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento e Identificación.

Se sembraron 90 tubos de ensayo de 10 mL con las diluciones de las muestras de suelo de la dilución -1 a la -4, en medio NFB, de los cuales 70 presentaron el velo blanco y viraron el color de verde a azul, dando positivo a la presencia de la bacterias fijadoras de nitrógeno. De estos 70 tubos sólo se identificó una cepa como perteneciente al género *Azospirillum* la cual obtuvo los resultados de la Tabla 5. En la Figura 22 se pueden observar los gránulos de poli ß hidroxibutirato.

Tabla 5. Tabla de resultados de *Azospirillum* sp.

Análisis	Resultado
Colonia en Agar Libre Nitrógeno (NFB) 5—7 días de crecimiento.	Colonias mucosas, 2 mm de ancho y largo, forma redonda, convexa, viraje de color: verde a azul.
Morfología Microscópica (Gram)	Bacilos gruesos, Gram negativos Ligeramente curvos o rectos.
Tinción de Gránulos de poli ß hidroxibutirato.	Se observaron gránulos negruzcos terminales dentro de las bacterias: Positivo
Movilidad	Se observaron bacterias móviles en forma de “sacacorcho”.
Catalasa	Positivo
Oxidasa	Positivo

Fuente: Cortez, 2012.

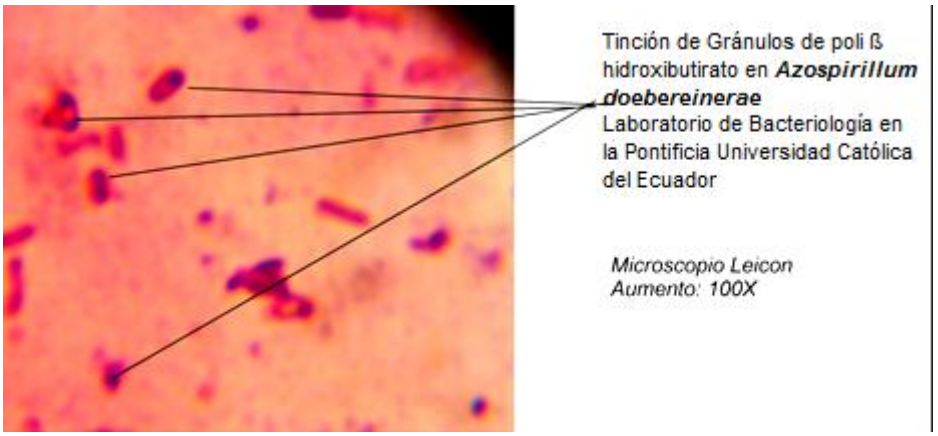

Figura 22. Gránulos poli ß hidroxibutirato de *Azospirillum* sp.
Fuente: Cortez, 2012.

La identificación de la especie mediante el sistema Microgen GND 24 para identificar la especie como se muestra en la Figura 23 y la Tabla 6.

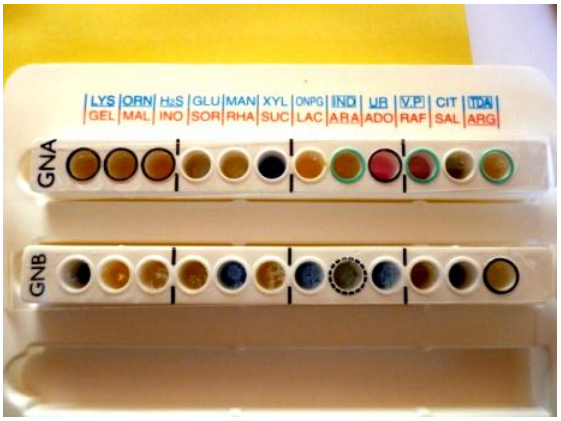

Figura 23. Pruebas bioquímicas para *Azospirillum* sp., con MicrogenTM GnA+B-ID System.
Fuente: Cortez, 2012.

Tabla 6. Resultados de las pruebas bioquímicas para identificación de la especie de *Azospirllum* sp.

Pruebas Bioquímicas	Resultado	Pruebas Bioquímicas	Resultado
Oxidasa	+	TDA	+
Motilidad	+	Licuefacción Gelatina	+
Nitratos	-	Malonato	-
Lisina decarboxilasa	-	Inositol	+
Ornitina decarboxilasa	-	Sorbitol	+
Producción de H2S	-	Rhamosa	-
Fermentaciónn Glucosa	+	Sucrosa	+
Fermentación Manitol	+	Lactosa	+
Fermentaciónn Xilosa	+	Arabinosa	-
Hidrólisis ONPG	+	Adonitol	+
Indol	-	Rafinosa	+
Hidrólisis de la Urea	+	Salicina	+
VP	+	Arginina	-
Citrato	-	N acetil glucosamine	-
Ribosa	+	Glicerol	+

Fuente: Cortez, 2012.

En base a estos resultados el software PIBWIN clasificó al microorganismo como *Azospirillum doebereinerae* con un 98% de probabilidad, la cual de aquí en adelante corresponde a la cepa CM015. Figura 24.

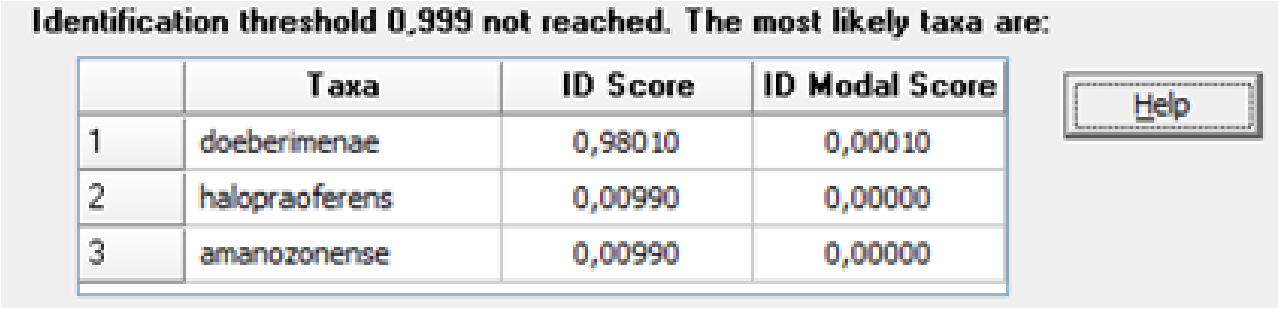

Figura 24. Identificación de la especie más probable de *Azospirillum* sp., con PIBWIN.
Fuente: PIBWIN, 2012.

4.2 Curva de Crecimiento Bacteriana.

En la Tabla 7 se presentan las condiciones y parámetros con los cuales se realizó la curva de crecimiento.

Tabla 7. Parámetros de fermentación de *Azospirillum doebereinerae* en el medio Dygs

Fecha de Inicio	28/12/2011
Fecha de Finalización	30/12/2011
Hora de Inicio	5:30 AM
Hora de Finalización	12:30 PM
pH inicial pH final	7 8
Temperatura de Incubación	35 º C
Ambiente	Aerobio

Fuente: Cortez, 2012.

En la Tabla 8 se presentan los resultados obtenidos luego de que las muestras fueron sembradas e incubadas por 55 horas a 35 º C en una atmósfera aerobia.

Tabla 8. Tabla de la datos del crecimiento de *Azospirillum doebereinerae*

Tiempo	Hora	Tiempo Transcurrido	pH	Recuento Log (UFC/mL)	Recuento UFC/mL
T0	5:30 AM	0	7	4,08	1,20E+04
T1	6:30 AM	1	7	5,53	3,40E+05
T2	7:30 AM	2	7	5,90	8,00E+05
T3	8:30 AM	3	7	5,85	7,00E+05
T4	9:30 AM	4	7	5,85	7,00E+05
T5	10:30 AM	5	7	5,85	7,00E+05
T6	11:30 AM	6	7	5,85	7,00E+05
T7	12:30 PM	7	7	5,85	7,00E+05
T9	2:30 PM	9	7	6,15	1,40E+06
T10	3:30 PM	10	7	6,60	4,00E+06
T11	4:30 PM	11	7	6,91	8,10E+06
T12	5:30 PM	12	7	8,48	3,00E+08
T14	9:30 AM	28	7	10,66	4,60E+10
T15	10:30 AM	29	8	10,70	5,00E+10
T16	11:30 AM	30	8	10,78	6,00E+10
T17	12:30 PM	31	8	10,85	7,00E+10
T18	1:30 PM	32	8	10,85	7,00E+10
T19	2:30 PM	33	8	10,90	8,00E+10
T20	3:30 PM	34	8	10,90	8,00E+10

T21	4:30 PM	35	8	10,91	8,20E+10
T22	5:30 PM	36	8	10,90	8,00E+10
T23	6:30 PM	37	8	10,88	7,60E+10
T24	7:30 PM	38	8	10,90	8,00E+10
T25	8:30 PM	39	8	10,92	8,30E+10
T26	9:30 PM	40	8	10,90	8,00E+10
T27	9:00 AM	51,5	9	9,64	4,40E+09
T28	12:30 PM	55	9	9,60	4,00E+09

Fuente. María Esther Cortez Pazmiño

Utilizando los datos de la Tabla 9 se obtuvieron las curvas de crecimiento de *Azospirillum doebereinerae* con el programa Microsoft Excel (versión 2007), como se observa en la Figura 25.

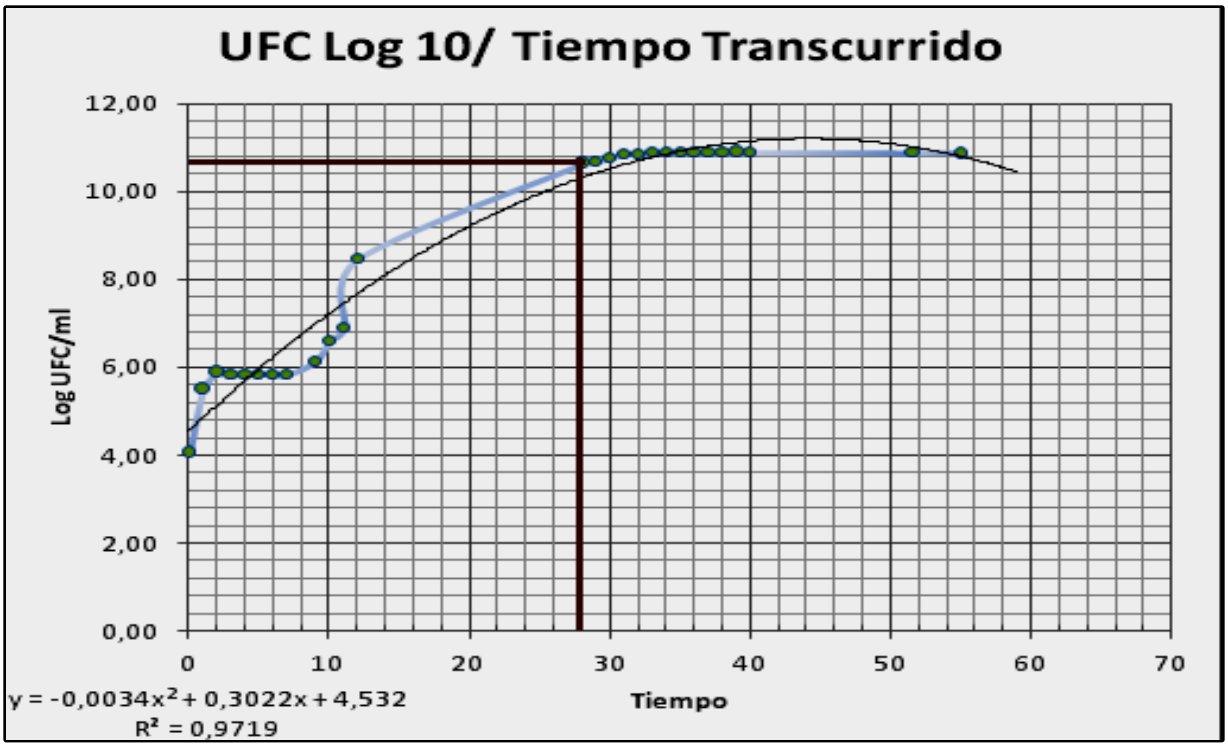

Figura 25. UFC Log 10/mL de *Azospirillum doebereinerae* en Medio Dygs.

Fuente: Cortez, 2012.

El medio Dygs, presentó una concentración de biomasa de $1x10^{10}$UFC/mL, en un tiempo óptimo de fermentación de 28 horas. Lo cual es consistente con el estudio realizado por Rivera 2008, quien usó densidad óptica para la obtención de la curva de crecimiento, en la cual se obtuvo la misma concentración que el presente ensayo pero en un tiempo de 26 horas (Rivera Botía, 2008). Esto puede deberse a que existe un error en la técnica de absorbancia para realizar la curva de crecimiento mientras que la técnica de recuento directo es más exacta (Benitende & Sánchez, 2002).

En el presente estudio se realizó un cambio en el proceso de fermentación ya que no se realizó ningún tipo de agitación. Según la bibliografía consultada, la bacteria tiene preferencia por una atmósfera microaerofílica, por lo cual en este ensayo se obtuvo la misma cantidad de microorganismos ($4,6x10^{10}$ UFC/mL) que con agitación (Rivera Botía, 2008).

El medio de cultivo Dygs fue elegido para el ensayo debido al bajo costo que representa para fermentar *Azospirillum* sp.*,* como se puede apreciar en la Tabla 9, donde el costo de producción de la materia prima sería 85 centavos de dólares americanos en el Ecuador a la fecha del ensayo comparado con el medio NFB (ANEXO 9)

Tabla 9. Costo de producción de 1 L de *Azospirillum* sp., en medio Dygs en el Ecuador al año 2012

Reactivo Químico	Costo en USD del Envase Incluido Iva	Cantidad de g por Envase	Cantidad en g el Medio Dygs 1 L	Costo en USD por Litro Incluido el IVA
K2HPO4	24,00	500	0,5	0,024
MgSO4*7H2O	25,00	250	0,5	0,05
GLUCOSA	25,00	500	2	0,1
PEPTONA UNIVERSAL	75,00	500	1,5	0,225
EXTRACTO DE LEVADURA	45,00	500	2	0,18
ÁCIDO GLUTÁMICO	46,00	500	1,5	0,138
ÁCIDO MÁLICO	32,00	500	2	0,128
			TOTAL	0,845

Fuente: Cortez, 2012

Según Reyes los costos de producción de *Zea mays* L. son muy altos con la aplicación de la bacteria *Azospirillum* sp.*,* ya que los reactivos para la producción del inóculo bacteriano tienen precios elevados y son difíciles de encontrar, a pesar de que no se especifica el medio de cultivo usado ni la concentración del mismo (Reyes, 2011). Estas

conclusiones por parte del autor del ensayo pueden deberse a la falta de información que existe por parte de los proveedores en el mercado con respecto a los reactivos químicos y la falta de oferta.

En el año 2010, Muriel utilizó como inoculante el medio libre de nitrógeno (NFB) semisólido el cual tiene cierta complejidad en su preparación (Muriel, 2010). "FERTIBACTER" es producido a base de melaza pero en este ensayo se pudo comprobar que el medio Dygs logra alcanzar una mayor concentración microbiana que los inoculantes a base de melaza (Yánez, 2012). El inoculante bacteriano "FERTIBACTER" tiene una concentración de $1x10^8$UFC/mL la cual disminuye rápidamente con el tiempo lo que resulta en una concentración muy baja para un inoculante (Senasa, 2010).

Al realizar el recuento de "FERTIBACTER" alcanzó una concentración de $1x10^6$UFC/mL. Por tanto el inoculante a base del medio Dygs podría ser más efectivo que "FERTIBACTER" ($4{,}6x10^{10}$UFC/mL).

4.3 Análisis Estadísticos del Ensayo en Plantas.

En los ANEXOS se presentan las Tablas 15, 16, 17 y 18 con datos del número de semillas germinadas por macetas, la altura de las plantas en centímetros, el peso en gramos de la materia verde fresca y peso en gramos de raíces frescas.

El objetivo principal del análisis consistió en determinar el efecto que tuvieron los tres tratamientos sobre las variables dependientes: peso, altura y germinación de plantas de *Zea mays* L. Figura 26.

En la Tabla 10 se observa un croquis de la distribución de las macetas en el invernadero con su respectivo código.

Tabla 10. Distribución de las macetas en el invernadero

121	91	61	31	1		
122	92	62	32	2	A	*Azospirillum doebereinerae CM015*
123	93	63	33	3	IA	*Azospirillum* sp. INIAP " FERTIBACTER "
124	94	64	34	4	CB	Control Blanco
125	95	65	35	5		
126	96	66	36	6		
127	97	67	37	7		
128	98	68	38	8		
129	99	69	39	9		
130	100	70	40	10		
131	101	71	41	11		
132	102	72	42	12		
133	103	73	43	13		
134	104	74	44	14		
135	105	75	45	15		
136	106	76	46	16		
137	107	77	47	17		
138	108	78	48	18		
139	109	79	49	19		
140	110	80	50	20		
141	111	81	51	21		
142	112	82	52	22		
143	113	83	53	23		
144	114	84	54	24		
145	115	85	55	25		
146	116	86	56	26		
147	117	87	57	27		
148	118	88	58	28		
149	119	89	59	29		
150	120	90	60	30		

Fuente: Cortez, 2012.

Figura 26. Evaluación de las plantas de *Zea mays* L.
Fuente: Cortez, 2012.

4.3.1 Germinación de Semillas

En la Tabla 11 se puede observar que no hay diferencias significativas (Sig mayor a 0,05) en cuanto a número de plantas germinadas, por lo tanto, los tres tratamientos son similares con respecto a esta variable. A pesar de que los tratamientos no son estadísticamente diferentes, al observar el Figura 1 el mejor promedio es el del control blanco, la posible causa de esto puede ser por la aplicación del adherente (miel de azúcar) que tal vez dificultó la germinación de las semillas. No podemos saber si el microorganismo influyó sobre la germinación de la semilla por lo cual se deberían realizar más ensayos para determinar su influencia sobre esta variable. En el Figura 27 se observan los promedios de la germinación por tratamiento.

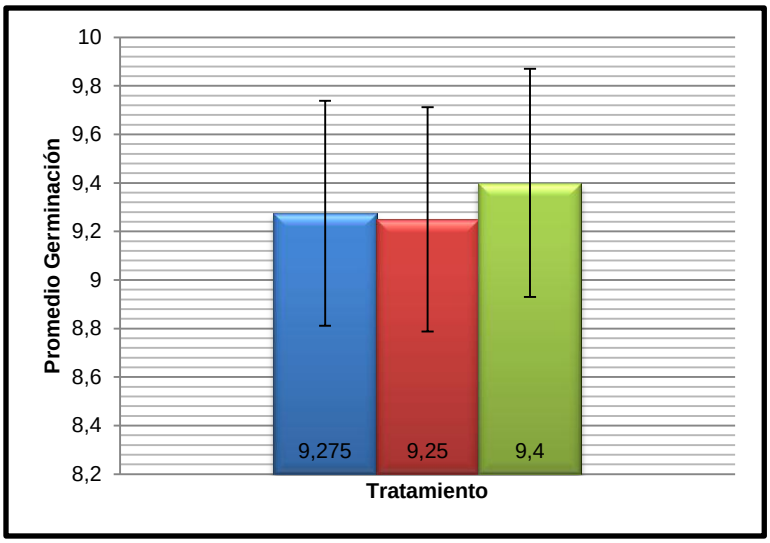

Figura. 27. Promedio germinación de semillas.

Fuente: Cortez, 2012.
Nota: Azul: *Azospirillum dobereinerae*, Rojo: "FERTIBACTER", Verde: Control Blanco

Tabla 11. Análisis de varianza de una vía para germinación.

Origen de la Variación	Grados de Libertad (gl)	Suma de Cuadrados (SC)	Cuadrados Medios	F= CM entre/CM dentro	p ‹ 0,05
Diferencias entre los grupos	2	0.517	0.25833	0.26	0.7695
Diferencias entre los sujetos dentro de los grupos	117	115.075	0.98355		
Variabilidad Total	119	115.592			

Nota: p: Nivel mínimo de significación
Fuente: Cortez, 2012.

4.3.2 Masa Húmeda de la Parte Aérea.

En la Tabla 12 se puede observar que no hay diferencias significativas (Sig mayor a 0,05) en cuanto a peso de la parte aérea de las plantas, por lo tanto, los tres tratamientos son similares con respecto a esta variable. Por lo cual la presencia o ausencia del microorganismo no influye en el peso de la parte aérea de las plantas de *Zea mays* L. En el Figura 28 se puede observar los promedios por tratamiento.

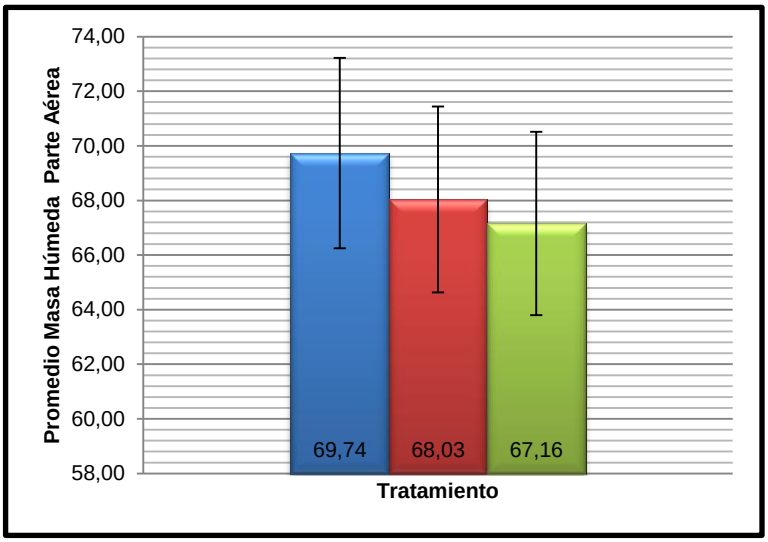

Figura. 28. Promedio de masa húmeda de la parte aérea por planta.

Fuente: Cortez, 2012.
Nota: Azul: *Azospirillum dobereinerae,* Rojo: "FERTIBACTER", Verde: Control Blanco

Tabla 12. Análisis de varianza de una vía para masa húmeda de la parte aérea

Origen de la Variación	Grados de Libertad (gl)	Suma de Cuadrados (SC)	Cuadrados Medios	F= CM entre/CM dentro	p ‹ 0,05
Diferencias entre los grupos	2	138.02	69.0125	2.04	0.1348
Diferencias entre los sujetos dentro de los grupos	117	3960.83	33.8532		
Variabilidad Total	119	4098.85			

Nota: p: Nivel mínimo de significación
Fuente: Cortez, 2012.

4.3.3 Altura de la Planta

En la Tabla 13 se puede observar que hay diferencias significativas (Sig mayor a 0,05) en cuanto a la altura de la parte aérea de las plantas, por lo tanto, los tres tratamientos son diferentes con respecto a esta variable. El mejor tratamiento fue *Azospirillum doebereinerae* frente a "FERTIBACTER" y el control blanco mientras que "FERTIBACTER" fue superior al control blanco. Utilizando el análisis de medias de la prueba de Tukey al 0,05 se presentan las diferencias significativas en el Figura 29 por tratamiento.

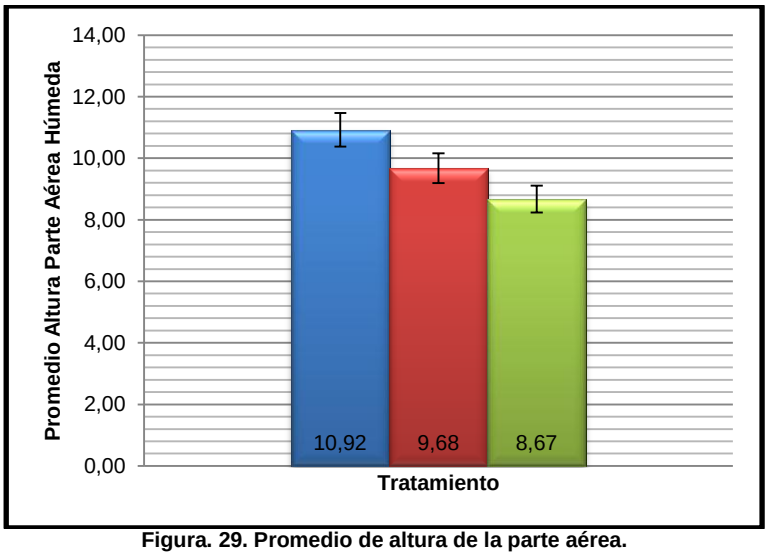

Figura. 29. Promedio de altura de la parte aérea.
Fuente: Cortez, 2012.
Nota: Azul: *Azospirillum dobereinerae,* Rojo: "FERTIBACTER", Verde: Control Blanco

Tabla 13. Análisis de varianza de una vía para altura de la parte aérea.

Origen de la Variación	Grados de Libertad (gl)	Suma de Cuadrados (SC)	Cuadrados Medios	F= CM entre/CM dentro	p ‹ 0,05
Diferencias entre los grupos	2	101.477	50.7387	33.1	0.0000
Diferencias entre los sujetos dentro de los grupos	117	179.326	1.5327		
Variabilidad Total	119	280.803			

Nota: p: Nivel mínimo de significación
Fuente: Cortez, 2012.

4.3.4 Masa Húmeda de las Raíces

En la Tabla 14 se puede observar que no hay diferencias significativas (Sig mayor a 0,05) en cuanto al peso de las raíces, por lo tanto, los tres tratamientos son similares con respecto a esta variable. La presencia o ausencia del microorganismo no mejora el masa húmeda de las raíces. En el Figura 30 se observan el promedio de masa húmeda de las raíces por tratamiento.

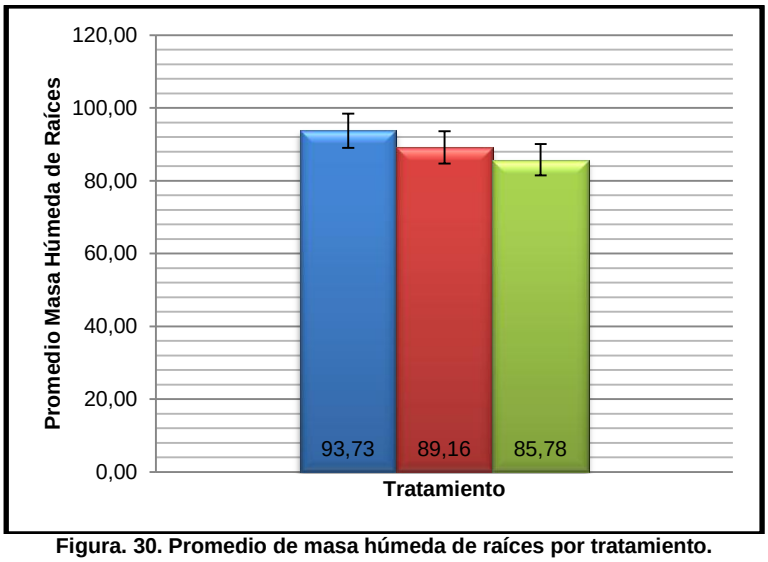

Figura. 30. Promedio de masa húmeda de raíces por tratamiento.
Fuente: Cortez, 2012.
Nota: Azul: *Azospirillum dobereinerae,* Rojo: "FERTIBACTER", Verde: Control Blanco

Tabla 14. Análisis de varianza para la masa de las raíces.

Origen de la Variación	Grados de Libertad (gl)	Suma de Cuadrados (SC)	Cuadrados Medios	F= CM entre/CM dentro	p ‹ 0,05
Diferencias entre los grupos	2	1257.2	637.598	1.04	0.3583
Diferencias entre los sujetos dentro de los grupos	117	72043.1	615.753		
Variabilidad Total	119	73318.3			

Nota: p: Nivel mínimo de significación
Fuente: Cortez, 2012.

Se pudo observar que para las variables de masa húmeda de raíces, masa húmeda de materia verde y de germinación no hubieron diferencias estadísticamente significativas (p › 0,05), aunque el promedio con la aplicación de *Azospirillum doebereinerae* fue mayor. Solamente se obtuvieron diferencias significativas en la altura de las plantas (p ‹ 0,05). Esto posiblemente se puede deber a diferentes causas: como al tipo de fitohormonas presentadas en esta especie de *Azospirillum* sp., se han descrito diferentes estudios donde ciertas especies presentan mejor capacidad de promoción del crecimiento vegetal con respecto a otras (Muriel, 2010), a que no hubo aplicaciones posteriores del inoculante, a que el tiempo de cosecha para la evaluación fue muy corto pues tal vez con un tiempo más

prolongado se podría haber tenido otros resultados y la disponibilidad de nutrientes para que la bacteria pueda producir ciertos metabolitos que podían haber influido en un mejor desarrollo de la planta (Celis Bautista & Gallardo, 2008).

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio nos permiten concluir:

Se aisló una cepa autóctona CM015 del género bacteriano *Azospirillum* sp., de la rizósfera de cultivos de *Zea mays* L., muestreados en la zona periférica al sur – este de la ciudad de Quito- Ecuador.

La cepa CM015 fue identificada como *Azospirillum doebereinerae.*

El proceso de fermentación en el medio Dygs para *Azospirillum doebereinerae* sin agitación usado para este ensayo, obtuvo el mismo número de microorganismos que el recomendado con agitación. La concentración obtenida de biomasa fue de $4{,}6x10^{10}$UFC/mL, en un tiempo óptimo de fermentación de 28 horas, por lo cual este medio de cultivo puede ser usado para prácticas, ensayos y producción a pequeña escala de la bacteria.

La reducción en los costos de producción del inóculo de *Azospirillum doebereinerae* utilizando el medio Dygs es significativo y corresponde a $ 0,84 centavos de dólares americanos por litro para obtener un óptimo crecimiento de la bacteria comparando con el medio NFB y una mayor concentración de microorganismos por mililitro frente a los medios a base de melaza.

La concentración de bacterias obtenidas en este ensayo es de $1x10^{10}$UFC/mL que fue superior a la presentada por el producto comercial “FERTIBACTER” del INIAP mejorando por tanto en calidad y precio a dicho producto.

A nivel de invernadero la altura de la parte aérea de las plantas presentó diferencia estadísticamente significativa (p ‹ 0,05), obteniendo mejores promedios en el tratamiento donde se aplicó *Azospirillum doebereinerae* CM015 seguido por “FERTIBACTER” y finalmente por el Control Blanco, mientras que la masa de la parte aérea húmeda, la masa húmeda de las raíces y la germinación de semillas de *Zea mays* L. no presentaron diferencias estadísticamente significativas (p › 0,05) resultando los tres tratamientos similares.

RECOMENDACIONES:

Se debería opitimizar el medio de cultivo para que se puedan realizar fermentaciones a gran escala y ahorrar aún más los costos de producción, para que los agricultores puedan tener acceso al inoculante.

Sería adecuado evaluar las condiciones que influyen en laboratorio y luego en campo (nutrientes asimilables, presencia de contaminantes químicos, etc.) sobre *Azospirillum* spp., para que pueda presentar su actividad de promotora del crecimiento vegetal.

Repetir el ensayo prolongando el tiempo de evaluación del crecimiento de las plantas a 45 días por lo menos.

Realizar una evaluación con diferentes dosis y etapas de cultivo del microorganismo para verificar su influencia sobre la promoción del crecimiento vegetal.

Se recomienda realizar el ensayo con la misma especie de microorganismo en otras especies vegetales para evaluar su eficacia en la promoción del crecimiento vegetal.

.

Se debe determinar químicamente las fitohormonas presentes en las plantas y en la rizósfera que sean estudiadas para correlacionar con las que son producidas por los microorganismos.

BIBLIOGRAFÍA

Abalde, J., Cid, A., & Torres, E. (1999). *Ensayos microbiológicos.* Coruña: Facultad de Ciencias. Universidade da Coruña.

Altieri, M., & Anderson, M. (1986). *An ecological bsis for the development of alternative agricultural systems for small farms in the third world.* USA: American of Alternative Agriculture.

APHA. (1989). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.* Washington D.C.: American Public Health.

Atlas, R., & Bartha, R. (2002). *Ecología microbiana y Microbiología ambiental.* Madrid: Pearson Educación S.A.

Baca, B., Soto-Urzua, L., Xochiua-Corona, Y., & Cuervo-García, A. (1994). Characterization of two aromatic aminoacid aminotransferases and production of indoleacetic acid in Azospirillum strains. *Soil Biol. Biochem.*, 26: 57-63.

Bashan, Y. (1999). *Interactions of Azospirillum* sp. *in soils.* USA: Biol Fertil Soils.

Bashan, Y. (2002). *Increased acidification in the rhizosphere of cactus seedings induced by Azospirillum brasilense.* USDA: Naturwissenschaften.

Bashan, Y., & Holguin, G. (1994). *Root to root travel of the beneficial bacterium Azospirillum brasilense.* Argentina: Applied and Environmental Microbiology.

Bashan, Y., Holguin, G., & Ferrera-Cerrato, R. (1996). *Interacciones Entre Plantas y Microorganismos Benéficos I. Azospirillum.* Argentina: Terra.

Bayan, Y., & Levanovy, H. (1996). *Current status of Azospirillum inoculation technology: Azospirillum as a challenge for agriculture.* USA: Can. J. Microbiology.

Bello, A. (1988). *Estructura ecológica del suelo y su interés en protección vegetal.* Madrid: Horticultura.

Benitende, S., & Sánchez, C. (2002). *Crecimiento Microbiano.* Entre Ríos: Universidad Nacional Entre Ríos.

Bioproducts, M. (2004). *Instrucciones de Uso.* Londrés: Microgen.

Boehnert, J. (1990). *La agroforestería en la educación agrícola.* Alemania: Josef Margraf.

Bradshaw, J. (1976). *Microbiología de Laboratorio.* México: El Manual Moderno.

Brooks, F. G., Jawetz, E. M., Ornston, L. N., & Alderberg, E. A. (1996). *MICROBIOLOGIA MÉDICA .* México. : Manual Moderno. .

Bryan, A. H. (1982). *Bacteriología, principios y prácticas.* México D.F.: CECSA.

C., F. d. (1979). *Medición de las Características de Erosionabilidad de un Suelo en la Estación Experimental "Santa Catalina".* Quito Ecuador: Facultad de Agronomía y Veterinaria Universidad de Guayaquil.

Carlos O. Miller, F. S. (1955). *KINETIN, A CELL DIVISION FACTOR FROM DEOXYRIBONUCLEIC ACID.* USDA: J. Am. Chem. Soc.,.

Casanovas, E., Barassi, A., & Andrade, F. (2003). *Azospirillum Inoculated Maize plant responses to irrigation restraints imposed during flowering.* Argentina: Cereal Research Communications.

Cassan, F., Sgroy, V., Perrig, D., Mascierelly, O., & Luna, V. (2008). *Producción de Fitohormonas por Azospirillum* sp. *aspecto fisiológico y tenológicos de la promoción del crecimiento vegetal.* Argentina: Asociación Argentina de Microbiología.

Cattáneo, S., Creus, C., Bariffi, H., Sueldo, R. J., & Barassi, C. A. (1996). *Estudios a campo sobre la acción de Azospirillum en trigo sometido a estrés hídrico. II. Rendimiento y sus componentes.* Mendoza: Actas XXI Reunión Nacional de Fisiología Vegetal.

Celis Bautista, L. X., & Gallardo, I. R. (2008). *Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberlinas) en cultivos microbianos.* Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.

Cersicola, C. (1989). *Lecciones de Agricultura Biológica.* Madrid: Mundi Prensa.

Chaboussou, F. (1984). *Influencia de los abonos y plaguicidas en la fisiología de las plantas y su resitencia al ataque de plagas y enfermedades.* Barcelona: Asociación Vida Sana.

Cheryl, P. a. (1996). *Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. .* USA: Can. J. Microbiology.

Christiansen-Weniger, C. (1998). Endophytic establishment of diazotrophic bacteria in auxin-induced tumors of cereal crops. *Crit. Rev. Plant. Sci.*, 17: 55-76.

Cleland, R. (1987). *Auxin and cell elongation. In: Davies, P. (Ed.). Plant Hormones and Their Role in Plant Growrh and Development.* USA: Martinus, Nijhoff, Dordrecht.

Cohen, E., Okon, Y., Nur, I., & Henis, Y. (1980). *Increase in dry weight and total nitrogen content in Zea mays and Setaria italica associated with nitrogen fixing Azospirillum* sp. USA: Plant Physiology.

Colmenares, R., Pérez-Sarmentero, J., & Molina, A. (1994). *La agricultura ecológica: construyendo la agricultura mañana.* México: Servicio de Estudios BBV.

Cook, R., & Baker, K. (1989). *The nature of practice of biological control of plant pathogens .* USA: Cabdirect.

Costacurta, A., Vanderleyden, J., & Keijers, V. (1994). *Molecular cloning and sequence analysis of an Azospirillum brasilense indole-3-pyruvate deccarboxylase.* USA: Mol. Gen. Genet.

Couillerot, O., Poirier, M., Caballero Mellado, J., Moenne-Loccoz, Y., & Mavingui, P. (2010). *Assessment of scar markers to design real time pcr primers for rhizosphere quantification of Azospirillum brasilense.* USA: Journal of Applied Microbiology.

Creus, C. M., Sueldo, R. J., & Barassi, C. A. (2004). *Water relations and yield in Azospirillum inoculated wheat exposed to drought in the field.* Balarce: NRC Research Press.

Crozier, A. P. (1988). *Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from Azospirillum lipoferum and Azospirillum brasilense.* USA: Applied Environmental Microbiology.

Dallas, S. (2004). *Effects of inoculation of Azospirillum* sp. *in maize seeds under field conditions.* Dallas: Food, Agriculture and Environment.

Díaz, R. G.-G. (1999). *. Manual práctico de Microbiología.* Barcelona: Masson, S.A.

Díaz, R., Gamazo, C., & López-Goñi, I. (1995). *. ("Manual práctico de Microbiología". .* Barcelona: Ed. Masson S.A. .

Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., . . . Okon, Y. (2001). *Responses of agronomically important crops to inoculation with Azospirillum* sp. Australia: Australian Journal of Plant Physiology.

Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., . . . Okon, y. (2001). *Responses of agronomically important crops to inoculation with Azospirillum.* Australia: J. Plant Physiology.

Dobbelaere, S., Vanderleyden, Y., & Okon, Y. (2003). *Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere.* USA: Critical Reviews Plant Sciences.

Dobereiner, J., & Pedrosa, F. (1987). *Nitrogen fixing bacteria in non leguminous crop plants.* USA: Science Tech Publishers.

Dobereiner, J., & Pedroza, F. (1987). *Nitrogen Fixing Bacteria in non Leguminous Crop Plants .* USA: Springer-Verlag.

Dobereiner, J., Marriel, I., & Nery, M. (1976). *Ecological distribution of Spirillum lipoferum Beijerinck.* EEUU: Can J Microbiology.

Eckert, B. (2001). *Azospirillum doebereinerae a nitrogen fixing bacterium associated with the C4 grass .* Miscanthus: International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.

Estola, R., Yantorno, O., & Mignone, C. (1994). *Microbiología Industrial. .* México: Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico de la OEA.

Falik, E., Okon, Y., & Goldman, A. (1999). *Identification and quantification of IAA and IBA in Azospirillum brasilense-inoculated maize roots.* USA: Soil Biology Biochemestry.

Fernández, A. R. (2002). *Ecología para la agricultura.* México D.F.: Mundi Prensa.

Fitzpatrick, E. (1984). *Suelos. Su formación, clasificación y distribución.* México D.F.: CECSA.

Flores del Posso, C. (1979). *Medición de las Características de Erosionabilidad de un Suelo en la Estación Experimental "Santa Catalina".* Quito-Ecuador: Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad de Guayaquil.

Florescano, E. (2003). *Imágenes y significados del dios del maíz.* Conaculta, México D.F.: Dirección General de Culturas Populares e Indígenas.

Florez, J. (2009). *Agricultura Ecológica.* Madrid: Mundi Prensa.

Fung, D. (1995). *MICROBIOLOGICAL CONTROL FOR FOODS AND AGRICULTURAL PRODUCTS. .* Inglaterra: VCH.

Gaudy, A., & Gaudy, E. (1981). *Microbiology for environmental scientist and engineers.* Tokyo: Mc Graw Hill.

Gladwin, M., & Trarrler, B. (1999). *Clinical Microbiology.* Miami: MedMaster.

Gonzalez, R. (1997). *Desarrollo sostenible y biodiversidad en la agricultura mediterránea tradicional.* Zaragoza: CSIC, Insituto Pirenaico de Ecologia.

Gonzalez, R. (1997). *Desarrollo sostenible y biodiversidad en la agricultura mediterránea tradicional: El uso múltiple en los sistemas adehesados extremos.* Zaragoza: CSIC.

Grant, W., & Long, P. (1987). *Microbiología ambiental.* Zaragoza: Acribia .

Harrigan, W. F., & McCane, M. E. (1979). *Métodos de Laboratorio en microbiología de alimentos y productos lácteos.* Españña: Acadmia España.

Hartmann, A., & Burris, R. H. (1988). *Influence of amino acids on nitrigen fixation ability and growth of Azospirillum* sp. USA: Applied Environmental Microbiology.

Hartmann, A., Burris, R. H., & Fu, H. (1988). *Influence of amino acids on nitrogen fixation ability and growth of Azospirillum* spp. USA: Applied Environmental Microbiology.

Holt, J., Krieg, N., & Sneath, P. (1994). *Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology.* Baltimore: Williams and Wilkins.

Ingraham. (1998). *Introducción a la microbiología.* Barcelona: Reverté.

INIAP, C. d. (2012). *INIAP EVALÚA BIOFERTILIZANTE PARA EL CULTIVO DE MAÍZ.* Quito: MAGAP.

Itzigsohn, R., Burdman, S., Okon, Y., Zaady, E., Yonatan, R., & Perevolotsky, A. (2000). *Plant growth promotion in natural pastures by inoculation with Azospirillum brasilense under suboptimal growth conditions.* Israel: Hebrew Univ Jerusalem, Dept Plant Pathol & Microbiol, Fac Agr Food & Environm Qual.

Karma, A., & Martín, C. R. (1993). *Chemical properties of organic soils.* Canadá: Lewis Publishers.

Kolmans, E. (1991). *Equilibrio ecológico frente a plagas y enfermedades en Agroquímicos.* Lima: IDMA.

Labrador, J., Porcuna, J. L., & Bello, A. (2006). *Manual de agricultura y ganadería ecológica .* Madrid: Mundi Prensa.

Labrador, M. (2001). *Agroecología y Desarrollo: Aproximación a los Fundamentos Agroecológicos para la Gestión Sustentable de Agrosistemas Mediterráneos.* Madrid: Mundi Prensa.

Lighfoot, C. (1991). *Household, Agroecosystems and Rural Resources Management.* Bari: Manila.

López Fando, C., & Bello, A. (1997). *Agricultura de Conservación: Fundamentos Agronómicos, Medioambientales y Económicos.* Córdova: Asociación Española de Laboreo de Conservación.

Mac FADDIN, J. (1991). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica.* México: Ed. Panamericana. .

Maier, R., & Yerba, C. (1999). *Envioronmental microbiology.* San Diego: Academia Press.

Mark, B., Peoples, T., & Craswell, T. (1992). *Biological nitrogen fixation; investments, expectations and actual contributions to agriculture.* Australia: Australian Centre for International Agricultural Research.

Martens, D., & Jr., F. (1992). *Assimilation of 3´-14C-indole-3-acetic acid and thryptophan by wheat varietis from nutrient media. .* San Francisco: In: Proocedings 19th Annual Meeting Plant Growth Regulator Society of America.

Martínez, J. (2004). *Producción de polihidroxialcanoatos en bacterias diazotrofas y la influencia de la aireación en la síntesis de poli-β-hidroxibutirato en cepas de*

Azospirillum brasilense. La Habana: Facultad de Biología de la Universidad de la Habana.

Mayz-Figueroa, J. (2004). *Fijación biológica de nitrógeno.* Monagas: Revista Científica UDO Agrícola.

Méndez, M., & Silvestre, J. (2009). *Fundamentos de economía para la sociedad del conocimiento.* México: McGraw Hill.

MGAP/MEF. (1999). *Decreto número 7/99.* Urugual: MGAP.

Ministerio de Agricultura, A. G. (Abril de 2012). *Sistema de Información Nacional de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (SINAGAP)*. Obtenido de http://www.magap.gob.ec/sinagap/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=414

Muriel, M. J. (2010). *Selección de Cepas Nativas de Azospirillum* sp.*, como promotoras del crecimiento vegetal a partir de cultivos de arroz (Oriza sativa) en las provincias de Guayas y Manabí.* Manabí-Guayas Ecuador: Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Murray, P. R. (2006). *Microbiología Médica.* España: Elsevier Science.

Okon, Y., & Labandera, G. (1994). *Agronomic applications of Azospirillum: An evaluation of 20 years worlwide field inoculation.* Australia: Soil. Biochem. Vol 26.

Okon, Y., Albrecht, S. L., & Burris, R. H. (1976). *Carbon and ammonia metabolism of Spirillum lipoferum.* USA: J. Bacteriology.

Olmedo, C., Thuar, A., & Avanzini, G. (2002). *Efecto de la inoculación con Azospirillum brasilense en un cultivo a campo.* Chubut: AACS.

PANREAC. (1998). *Manual básico de Microbiología Cultimed. .* Barcelona. : Panreac Química S.A. .

Patten C., a. G. (1996). *Bacterial biosynthesis of indole 3-acetic acid. .* USA: Can. J. Microbiol.

Perales, H., Benz, B. F., & Brush, S. B. (2005). *Maize diversity and ethniliquistic diversitity in Chiapas.* Chiapas: PNAS Volumen 102 Número 3.

Perticari, A., Hungria, M., Ortega, E., Caballero-Mellado, J., Izaguirre, M. L., Labandera, C., & Sanjuan, J. (2008). *Fertilizantes Biológicos para la Agricultura y el Medio Ambiente "Normativa Iberoamericana para Inoculantes Formulados con Bacterias Rizosféricas Promotoras del Crecimiento Vegal PGPR.* Argentina: BIOFAG.

Plaster, E. (2000). *La ciencia del suelo y su manejo.* USA: Parainfo.

Porta, M., Zumeta, E., Ruiz, L., Sunyer, J., Ribas, N., Kogevinas, M., & Jariod, M. (2003). *Persisten toxic substances and public health in Spain.* Madrid: International Journal of Occupational an Environmental Health.

Prescott, L. M., Klein, D. A., & Harley, J. P. (1999). *Microbiologia.* Madrid: Mc Graw Hill Interamericana.

Press, N. A. (1989). *Alternative Agriculture .* Washington D.C.: National Academy of Sciences.

Primaversi, A. (1984). *Manejo ecológico del suelo.* Buenos Aires: El Ateneo.

Primaversi, A. (1992). *Agricultura Sustentable.* Sao Paolo: Nobe.

Prinsen, E. A. (1993). *Azospirillum brasilense indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway.* USA: Mol. Plant Microbiology Interact.

Puente, G. M. (2007). *Respuesta a la inoculación con Azospirillum brasilense sobre la germinación a biomasa en plántulas de maíz (Zea mays L.).* Argentina: Universidad Nacional de Río Cuarto.

Puente, M., Perticari, A., & García, J. (2007). *Respuesta a la inoculación con Azospirillum brasilense sobre la germinación y biomasa en plántulas de maíz (Zea mays L.) .* Córdoba: VI Reunión Nacional Científico Técnica de Biología del Suelo.

Regueiro Varela, B. (1984). *Manual de técnicas microbiológicas.* Santiago de Compostela: U. de Santiago de Compostela .

Reinhold, B., Hurek, T., & Fendrik, I. (1985). *An specific chemotaxis of Azospirillum* sp. USA: J Bacteriology.

Reinhold, B., Hurek, T., & Fendrik, I. (1985). *Strain specific chemotaxis of Azospirillum* sp. USA: J. Bacteriology.

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) semihidropónico con dos sustratos diferentes bajo invernadero.* Cayambe: Universidad Salesiana.

Rivera Botía, D. M. (2008). *OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE Azospirillum brasilense C16.* San José de Cucutá: Universidad Francisco de Paula Santander.

Rodelas, B. (1993). *Production of vitamins by Azospirillum brasilense in chemically defined media.* USA: Plant Soil.

Rodríguez-Cáceres, E. A. (1982). *Improved medium for isolation of Azospirillum* sp. USA: Appplied and Environmental Microbiology.

Roger, J. (1985). *El suelo vivo-manual práctico de agricultura natural.* Madrid: Integral.

Ross, J., O`Neill, D., Kerckhoffs, R., & Elliot, R. (2000). *Evidence that auxin promotes the gibberellin A1 biosynthesis in pea.* USA: Plant Journal.

Rovira, A. (1970). *Plant root exudates and their influence upon soil microorganisms. .* Berkeley: University of California Press.

Sadasivan, L., & Neyra, C. A. (1987). *Cyst production and brown pigment formation in aging cultures of Azospirillum brasilense ATCC.* USA: J. Bacteriology.

Sarabia Ochoa, M., Martínez Trujillo, M., Madrigal Pedraza, R., & Carreón Abad, Y. (2010). *Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones.* San Nicolás de Hidalgo: Biologicas: Laboratorio de Genética y Microbiología. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Campus CU.

Schlegel, H. (1997). *Microbiología General.* Barcelona: Omega.

Schneider, K., Tilak, K., & Schlegel, H. G. (1986). *Autotrophic growth of nitrogenfixing Azospirillum species and partial characterization of hydrogenase from strain CC.* USA: J Bacteriology.

Scott, B. (1989). *Diagnóstico microbiológico.* Argentina: Editorial médica panamericana .

Seeley, H., Vandemark, P., & Lee, J. (1997). *Microbes in action.* New York: W.H.FREEMAN.

Senasa. (2010). *REGLAMENTO PARA EL REGISTRO DE FERTILIZANTES, ENMIENDAS, SUSTRATOS, ACONDICIONADORES, PROTECTORES Y MATERIAS PRIMAS EN LA REPÚBLICA DE ARGENTINA.* Argentina: SENASA.

Smith, D., & Madigan, M. (2009). *Biología de los Microorganismos.* México D.F.: Prentice hispanoamericana.

Smith, D., & Madigan, M. (2009). *Biología de los Microorganismos.* México D.F.: Prentice hispanoamericana.

Southampton, U. o. (15 de Marzo de 2012). *Probabilistic Identification of Bacteria for Windows*. Obtenido de http://www.som.soton.ac.uk/research/sites/pibwin/

Southampton, U. o. (15 de Marzo de 2012). *Probabilistic Identification of Bacteria for Windows*. Obtenido de http://www.som.soton.ac.uk/research/sites/pibwin/

Sparling, G. (1997). *Soil microbial biomass, activity and nutrient cycling as indicators of soil health.* Pankhurst: Wallingford, CAB International.

Stanier, R. Y., & Adelberb, J. L. (1986). *Microbiología.* Barcelona: Reverté.

Steenhoudt, O., & Vanderleyden, J. (2000). *Azospirillum, a free living nitrogenfixing bacterium closely associated with grasses: Genetic, biochemical and ecological aspects.* USA: FEMS Microbilogy.

Tien, T. M., H., G. M., & H., H. D. (1979.). *Plant growth substances produced by Azsopirillum brasilense and their effect on the growth of pearl millet (Pennisetum americanum L.). .* USA: Appl. Environ. Microbiol.

Tortora, G. J., Berdell, R., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Microbiología.* Colombia: Panamericana.

University, S. H. (s.f.). *PIB WIN* .

Vande Broeck, A. L. (1999). *Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in Azospirillum brasilense. .* USA: Journal of Bacteriology.

Vandenhobe, H., Merck, R., Steenberg, K., & Vlassak, K. (1993). *Microcalorimetric characterization physiological satages an survival ability of Azospirillum brasilense.* USA: Soil Biology Biochemestry.

Vandermeer, J. (1992). *The Ecology of Intercropping.* Cambridge: Crambridge University Press.

Vandermeer, J. (1995). *The ecological basis of alternative agriculture.* Cambridge: Cambridge University Press.

Vásquez, A., & Bautista, N. (1993). *Guía para Interpretar el análisis químico de suelo y agua.* Chapingo: Universidad Autónoma de Chapingo.

Vázquez-Cruz, C., Tapia-Hernández, M., Macarúa-Esparza, J., Caballero-Mellado, J., & Baca, B. (1992). *Plasmid profile modification after elimination of bacteriocin activity in Azospirillum brasilense strains.* Habana: Microbios.

Villaroel, J. (1988). *Manual práctico para la interpretación de análisis de suelos en Laboratorio.* México D.F.: Agruco.

Willard, H., Merrit, L., & Dean, J. (1974). *Instrumental methods of analysis.* USSD: Van Nostrand.

Winckell, A. (1992). *Las condiciones generales del medio natural.* Ecuador: Geografía Básica.

Yahalom, E., Okon, Y., & Dovrat, A. (1990). Possible mode of action of Azospirillum brasilense strain Cd on the roots morphology and nodule formation in burr medic (Medicago polymorpha). *Can. J. Microbiol.*, 36: 10-14.

Yánez, I. C. (18 de Enero de 2012). Fermentación de *Azospirillum* sp., en el Programa del Maíz del Iniap. (M. E. Cortez Pazmiño, Entrevistador)

Zemrany, H., Czarnes, S., Hallet, P. D., Alamerecery, S., Bally, R., & Jocteur Monroizer, L. (2007). *Early changes in root characteristics of maiz (Zea mays) following seed inoculation with the PGPR.* USA: CRT1 Plant and Soil.

Netgrafia

Ministerio de Agricultura (15 de Enero de 2012). *Sistema de Información Nacional de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca*. Obtenido de http://www.magap.gob.ec/sinagap/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=414.

Southampton, U. o. (15 de Marzo de 2012). *Probabilistic Identification of Bacteria for Windows*. Obtenido de http://www.som.soton.ac.uk/research/sites/pibwin/

ANEXOS

ANEXO 1

MEDIO LIBRE DE NITRÓGENO (NFB)

COMPONENTES

Ácido Málico	5,00	g/l
Fosfato dipotásico	1,50	g/l
Sulfato de Magnesio	0,20	g/l
Cloruro de Calcio	0,02	g/l
Azul de Bromotimol (0,5% m/v)	0,10	g/l
Sulfato Ferroso	4,00	g/l
Biotina	2,00	g/l
Oligoelementos	1,00	g/l
Hidróxido de Potasio	5,00	g/l

pH 6,8 – 7

PROCEDIMIENTO:

Mezclar los reactivos en las cantidades especificadas en 1 litro de agua destilada o desmineralizada.

Calentar a ebullición hasta completa disolución.

Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C).

Solución Oligoelementos:

Molidbato de potasio	0,05	g
Borato de sodio	0,05	g
Citrato de Fierro 1%	2,00	mL
Nitrato de Cobalto	0,05	g
Sulfato de Cadmio	0,05	g
Sulfato de Cobre	0,05	g
Sulfato de Zinc	0,05	g
Sulfato de Manganeso	0,05	g
Agua destilada	1000	mL

ANEXO 2

MEDIO DIGERIDO DE SOJA Y CASEÍNA (*TRYPTIC SOY BROTH*)

COMPONENTES

Digerido pancreático de caseína	17	g/l
Digerido péptico de harina de soja	3	g/l
Glucosa	2,5	g/l
Cloruro sódico	5	g/l
Fosfato dipotásico de hidrógeno	1,5	g/l

pH final: 7.0 +/- 0.2 a 25 °C.

PROCEDIMIENTO:

Mezclar todos los reactivos en las cantidades especificadas en 1 litro de agua destilada o desmineralizada.

Calentar a ebullición hasta completa disolución.

Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C).

ANEXO 3

AGAR CUENTA ESTANDAR (*PLATE COUNT AGAR* o PCA)

COMPONENTES:

Triptona	5	g/l
Extracto de Levadura	2.5	g/l
Dextrosa (Glucosa)	1	g/l
Agar	15	g/l

pH final: 7.0 +/- 0.2 a 25 °C.

PROCEDIMIENTO:

Mezclar todos los reactivos en las cantidades especificadas en 1 litro de agua destilada o suspender 23,5 g del medio marca DIFCO.

Calentar a ebullición hasta completa disolución.

Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C).

ANEXO 4

TINCIÓN GRAM

MATERIALES:

Portaobjetos

Lámpara de alcohol

Asa

Cristal violeta

Iodo Gram

Alcohol cetona

Safranina.

Microscopio

Aceite de inmersión

PROCEDIMIENTO:

En una placa portaobjetos marcar el lugar donde se va a colocar la muestra para s identificación

Colocar una gota de agua en el porta objetos y la muestra con un asa, homogenizar y fijarla al fuego de una lámpara de alcohol o mechero pasándola tres veces rápidamente.

Añadir 1 ó 2 gotas de cristal violeta a la preparación, hasta que se cubra por completo la muestra y dejar en reposo por un minuto.

Una vez transcurrido el tiempo, lavar la preparación con agua potable.

Agregar 1 ó 2 gotas de solución iodo Gram a la preparación, y dejar actuar 1 minuto.

Transcurrido el tiempo, lavar con agua potable.

Con cuidado, añadir gota a gota el alcohol-acetona lavando la preparación durante 30 segundos.

Añadir 1 o 2 gotas del colorante de contraste, safranina y dejar actuar durante 1 minuto. Lavar con agua potable.

Dejar secar al aire y observar al microscopio, con el objetivo de inmersión.

ANEXO 5

CALDO NUTRITIVO

COMPONENTES

Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g

pH final: 6.8 ± 0.2 a 25 °C.

PROCEDIMIENTO

Mezclar los componentes en las cantidades especificadas en 1 litro de agua destilada o disolver 8 g de medio DIFCO en 1 litro o las cantidades especificadas en agua destilada o desmineralizada.

Calentar a ebullición hasta completa disolución.

Distribuir en tubos.

Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C).

ANEXO 6

INSERTO DE Microgen GN – ID (GN A + B)

ANEXO 7

MEDIO DYGS

Medio de Referencia Dygs (Rodrígues Neto *et al.,* 1986),

COMPONENTES

K2HPO4 * 3H2O:	0,5	g/l
MgSO4*7H2O	0,5	g/l
Glucosa	2	g/l
Peptona Universal	1,5	g/l
Extracto de levadura	2	g/l
Ácido glutámico	1,5	g/l
Ácido málico	2	g/l

pH final ajustado para 6,8.

PROCEDIMIENTO:

Mezclar los reactivos en las cantidades especificadas en 1 litro de agua destilada.

Calentar a ebullición hasta completa disolución.

Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C).

ANEXO 8

CARTA DE AUTORIZACIÓN

INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS
ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN AGROPECUARIA

INIAP/EESC/DIR-005
Santa Catalina, 05 de enero de 2012

Señorita
María Cortéz
Quito

Distinguida señorita:

En respuesta a su comunicación en la cual solicita se le venda fertilizante para realizar pruebas en semillas de maíz, me permito indicarle que se le podría proporcionar la cantidad de 20 ml de fertilizante, la misma que es suficiente para las 1000 semillas.

Atentamente,

Dra. Gioconda García S.
DIRECTORA ESTACION EXP. SANTA CATALINA
I.N.I.A.P.

Panamericana Sur Km. 1, Vía Tambillo, Sector Cutuglagua
Teléfonos: (593) 02 307-6004, Telefax: 307-6002, 2690-991
Correo Electrónico: santacatalina@iniap.gob.ec
Apartado Postal Nº 17-01-340
Quito - Ecuador

ANEXO 9

CUADRO DE COSTOS DE ELABORACIÓN DEL AGAR NFB

MEDIO NFB				
Reactivo Químico	Costo en USD del Envase Incluido Iva	Cantidad de g/mL por Envase	Cantidad en g el Medio Dygs 1 L	Costo en USD por Litro Incluido el IVA
Ácido Málico	35,84	500,00	5,00	0,36
Fosfato dipotásico	42,00	250,00	1,50	0,25
Sulfato de Magnesio	28,00	250,00	0,20	0,02
Cloruro de Calcio	44,69	250,00	0,02	0,00
Azul de Bromotimol (0,5% m/v)	39,20	25,00	0,10	0,16
Sulfato Ferroso	24,64	500,00	4,00	0,20
Biotina	67,20	100,00	2,00	1,34
Oligoelementos	22,40	100,00	1,00	0,22
Hidróxido de Potasio	62,50	250,00	5,00	1,25
			TOTAL	3,81

ANEXO 10

TABLA 15. PLANTAS GERMINADAS POR MACETA

Semillas Sembradas	*Azospirillum doebereinerae*			*Azospirillum* sp., comercial			Control Blanco		
	Maceta No.	Hilera	Semana 6 Germinación Neta	Maceta No.	Hilera	Semana 6 Germinación Neta	Maceta No.	Hilera	Semana 6 Germinación Neta
10	1	1	10	9	1	10	17	1	8
10	2	1	10	10	1	9	18	1	10
10	3	1	10	11	1	10	19	1	10
10	4	1	10	12	1	10	20	1	10
10	5	1	10	13	1	10	21	1	10
10	6	1	8	14	1	8	22	1	9
10	7	1	8	15	1	5	23	1	10
10	8	1	8	16	1	7	24	1	10
10	33	2	10	41	2	10	25	2	9
10	34	2	9	42	2	9	26	2	9
10	35	2	10	43	2	10	27	2	10
10	36	2	10	44	2	10	28	2	10
10	37	2	9	45	2	10	29	2	9
10	38	2	9	46	2	10	30	2	10
10	39	2	10	47	2	10	31	2	10
10	40	2	8	48	2	10	32	2	9
10	65	3	10	49	3	10	57	3	9
10	66	3	6	50	3	10	58	3	9
10	67	3	9	51	3	10	59	3	7
10	68	3	7	52	3	9	60	3	10
10	69	3	9	53	3	10	61	3	9
10	70	3	10	54	3	10	62	3	10
10	71	3	10	55	3	8	63	3	9
10	72	3	10	56	3	9	64	3	8
10	73	4	10	81	4	10	89	4	10
10	74	4	9	82	4	10	90	4	10
10	75	4	9	83	4	7	91	4	10
10	76	4	10	84	4	8	92	4	10
10	77	4	8	85	4	9	93	4	10
10	78	4	9	86	4	9	94	4	10
10	79	4	10	87	4	9	95	4	10

10	80	4	10	88	4	9	96	4	9
10	105	5	8	113	5	9	97	5	10
10	106	5	9	114	5	10	98	5	10
10	107	5	9	115	5	10	99	5	9
10	108	5	10	116	5	8	100	5	8
10	109	5	10	117	5	10	101	5	9
10	110	5	10	118	5	8	102	5	7
10	111	5	10	119	5	10	103	5	10
10	112	5	10	120	5	10	104	5	10
SUMATORIA			371			370			376

Fuente: Cortez, 2012.

ANEXO 11

TABLA 16. MATRIZ DE RESULTADOS BRUTOS

Peso en g			Altura en cm		
Azospirillum doebereinerae	*Azospirillum* sp., commercial	Control Blanco	*Azospirillum doebereinerae*	*Azospirillum* sp., comercial	Control Blanco
18,49	11,56	4,67	72,50	79,80	63,00
9,85	14,50	10,18	64,90	69,00	72,00
15,60	11,02	8,12	64,60	71,90	63,50
8,75	10,66	6,38	76,10	77,00	63,40
17,32	14,15	6,23	93,90	75,00	56,00
18,25	10,46	3,98	66,00	69,60	54,00
13,23	6,18	6,25	85,00	60,60	67,00
14,21	7,17	4,54	72,80	69,50	75,00
17,88	8,59	8,35	70,50	74,10	64,00
9,46	9,02	6,02	74,60	75,10	70,50
12,00	6,34	10,00	69,50	77,10	72,10
10,03	10,31	4,49	73,40	76,00	67,00
9,55	6,95	12,74	65,40	65,30	74,50
9,90	7,41	10,62	71,80	54,00	73,00
5,00	12,15	14,50	82,10	62,60	60,00
8,60	13,52	7,56	73,50	60,60	70,30
15,00	12,08	8,74	80,10	53,70	64,30
7,18	8,50	7,57	58,00	73,90	23,80
6,31	9,48	10,47	76,10	75,20	57,50
11,75	10,99	9,19	63,80	79,00	72,10
12,63	7,89	11,02	62,00	73,50	69,50
10,12	12,03	10,31	61,00	72,50	80,50
11,67	13,80	4,73	76,00	74,00	70,00
12,67	13,89	11,34	82,50	64,00	64,80
9,34	8,88	7,10	71,00	63,50	74,00
8,66	7,88	9,51	65,00	88,00	49,70
13,62	9,14	10,13	82,50	81,50	74,50
9,27	11,10	5,55	74,50	89,50	63,60
15,83	9,94	9,21	73,00	68,50	74,00
18,87	15,22	2,84	92,50	62,00	77,00
8,07	10,48	10,39	71,50	71,00	62,00
9,90	8,86	7,80	60,00	70,00	64,00
8,45	8,05	7,40	73,00	86,50	47,50
7,21	7,90	3,60	64,30	71,00	65,50
7,28	8,29	5,20	74,10	67,00	66,10
15,35	8,05	8,69	68,00	75,50	72,00
11,55	8,92	7,79	75,00	70,00	43,50
16,87	3,66	11,47	60,50	68,50	66,50
12,89	8,70	9,32	65,20	79,40	71,20
10,43	16,96	6,97	75,50	78,50	70,20
15,87	7,11	7,87	69,50	47,00	67,80
9,21	7,00	9,98	75,50	71,80	63,80
12,88	7,03	9,50	72,20	83,50	65,00
8,49	4,40	9,29	51,50	61,10	71,50
8,80	10,30	11,03	59,70	63,00	70,80
9,23	9,86	9,33	76,50	64,10	67,00

16,94	13,37	7,13	68,00	72,00	67,30
5,94	8,74	9,01	62,00	64,10	67,40
8,73	12,21	11,90	65,50	70,00	64,00
7,90	11,60	2,90	67,00	76,50	70,50
12,11	5,82	6,60	61,40	70,50	71,00
13,93	8,61	9,40	72,00	67,50	68,50
14,53	12,62	4,80	65,30	82,40	46,50
9,85	8,37	8,80	85,50	60,30	60,50
7,42	4,49	11,00	77,50	68,10	72,20
9,96	6,37	5,10	79,00	78,90	58,90
13,00	9,19	6,10	81,50	71,20	71,10
15,04	10,72	6,70	68,20	38,90	79,20
14,14	8,16	6,80	84,00	47,50	64,50
13,75	0,42	9,60	77,50	68,10	62,00
11,27	0,46	7,80	77,50	69,50	62,20
12,34	2,76	5,50	81,90	55,50	65,30
14,62	0,62	8,70	54,50	20,00	59,50
11,10	2,78	9,40	75,50	22,00	70,20
8,50	0,09	6,40	87,00	34,00	60,50
7,59	0,04	5,10	87,90	31,00	65,00
13,91	11,33	6,10	74,00	48,00	64,00
4,20	6,26	6,70	59,50	10,00	79,20
10,79	9,01	6,80	61,80	5,00	64,50
10,59	8,26	9,60	78,20	69,20	62,00
14,40	15,02	7,80	52,40	75,90	62,20
8,68	11,74	5,50	76,80	63,10	65,30
10,23	9,53	8,70	71,50	71,90	59,50
9,54	10,97	9,40	77,00	80,00	70,20
11,28	5,07	6,40	77,20	76,20	60,50
11,05	3,76	4,90	66,50	73,50	65,00
11,48	13,97	8,70	72,50	63,90	64,00
11,23	13,45	9,30	74,30	60,50	55,50
10,10	5,23	6,92	73,50	49,50	83,00
9,62	6,63	11,52	80,00	75,50	65,80
10,18	6,72	8,62	78,50	79,00	71,50
8,50	9,65	11,90	68,50	61,50	79,50
12,23	11,55	11,30	65,50	66,50	80,00
12,70	8,54	9,80	68,00	72,50	71,00
11,06	9,38	9,20	60,00	80,20	75,00
14,99	7,06	7,90	66,50	74,70	79,00
11,50	8,22	10,80	72,10	76,70	77,00
13,60	8,74	10,00	79,50	64,50	73,50
10,70	6,42	9,30	75,50	53,00	69,50
10,78	8,69	8,40	80,10	67,00	73,00
8,29	12,75	9,00	84,10	61,00	52,00
10,22	12,44	12,88	76,10	56,00	62,00
11,60	7,62	8,01	72,50	57,50	70,00
9,06	6,10	7,20	65,00	66,00	72,00
9,79	6,66	5,30	70,00	80,20	60,00
10,50	13,40	6,57	66,00	77,00	74,80
9,15	8,15	4,57	60,00	57,00	69,40
13,50	13,35	10,70	61,50	56,20	69,50
8,15	12,97	10,90	68,00	77,00	68,60
10,30	9,89	6,90	61,20	58,00	69,00
9,95	11,20	7,60	69,00	67,50	77,20
8,06	15,53	6,70	61,50	77,00	66,00
17,77	7,83	10,80	72,00	70,00	69,80
12,03	9,75	7,80	69,90	60,30	64,70
9,16	10,52	8,60	63,00	80,50	83,90

11,67	7,45	12,23	69,50	65,00	60,00
7,96	8,88	10,70	70,50	66,50	66,10
10,11	7,65	9,70	66,00	70,00	69,00
11,67	6,62	6,20	69,10	74,20	77,00
10,34	7,47	8,70	72,20	69,50	77,30
14,90	9,06	9,80	76,70	75,00	66,30
11,20	5,01	8,00	73,20	71,00	65,50
9,50	8,80	5,90	71,50	59,10	74,50
9,90	8,21	6,60	82,00	66,50	69,00
12,02	8,50	12,10	80,00	60,50	69,00
12,00	9,60	10,22	62,00	79,50	66,50
10,40	12,14	11,00	66,00	61,50	69,50
9,50	9,89	9,60	82,50	66,50	76,50
7,00	7,79	9,10	82,00	55,00	79,10
9,05	9,63	13,23	80,00	76,20	66,80
13,48	4,85	10,05	73,50	59,00	71,30
10,30	14,22	11,17	61,50	58,00	81,40
9,91	4,85	6,74	62,00	65,40	62,10
14,24	8,05	5,70	77,00	54,00	69,50
9,32	11,01	10,77	84,50	75,40	61,80
9,00	14,51	10,10	61,50	51,00	65,00
10,81	13,19	7,95	81,00	50,40	75,00
9,59	9,13	8,15	75,10	75,00	72,50
9,00	12,42	11,15	65,00	69,30	57,50
16,80	11,57	10,01	77,90	69,90	62,00
10,25	6,77	11,75	65,00	57,40	69,00
7,89	10,00	8,18	68,00	76,20	65,70
12,50	6,35	9,30	57,50	72,50	67,50
9,80	9,39	9,00	68,00	57,00	70,50
9,80	7,50	8,15	60,10	69,40	74,50
10,00	10,49	8,20	77,20	60,00	60,20
11,85	14,49	9,00	64,50	71,50	70,30
7,93	6,87	9,01	67,80	70,50	70,50
10,13	12,78	8,02	66,80	70,50	71,00
14,75	9,60	8,03	82,50	66,50	72,00
12,73	8,70	8,00	72,50	77,50	72,00
14,65	11,71	8,57	64,20	65,50	69,00
9,73	6,81	11,03	75,20	81,20	63,50
10,69	6,21	10,26	71,50	75,10	71,00
9,34	16,35	8,57	72,50	60,90	74,50
10,32	12,02	10,79	68,00	76,20	71,80
13,00	10,68	11,48	74,00	61,90	62,80
7,50	8,67	5,90	65,00	47,20	67,50
14,05	12,93	4,61	68,00	70,00	70,50
12,06	10,62	5,46	74,50	83,00	75,80
9,80	8,81	5,58	58,50	65,50	58,00
11,85	9,70	9,39	74,00	61,50	64,50
8,84	13,36	8,72	61,50	80,00	71,20
13,50	10,04	9,30	69,50	72,80	68,00
8,97	10,39	8,29	69,00	67,50	65,50
8,55	18,20	8,56	71,50	71,40	67,50
6,26	9,58	9,20	74,55	78,00	77,40
15,23	13,18	10,24	71,50	67,80	64,00
14,24	10,70	10,21	60,00	66,50	67,00
6,28	10,81	9,47	55,50	90,50	65,00
5,74	8,95	7,27	52,20	72,00	66,00
13,09	8,21	7,69	54,00	74,20	68,00
15,96	9,84	7,91	48,20	77,50	63,50
13,83	6,96	6,10	47,00	77,50	73,50

14,69	7,99	6,06	40,50	66,50	75,50
13,83	9,60	7,81	40,50	72,50	66,00
9,80	10,11	7,69	61,00	71,00	64,00
9,33	8,99	6,03	38,50	62,20	70,50
10,00	10,59	7,20	52,50	69,00	76,10
13,55	9,69	14,97	61,50	65,00	75,10
13,23	8,50	7,87	58,00	67,00	69,00
13,53	9,40	10,46	62,00	64,00	77,50
14,45	7,61	10,36	62,50	81,50	64,90
13,50	9,11	16,28	33,50	81,00	75,50
11,73	10,21	9,81	48,60	71,00	64,90
15,77	9,30	14,45	51,50	83,50	87,10
5,06	8,23	8,26	44,00	57,00	77,50
12,93	7,70	9,01	36,50	69,00	77,90
16,63	10,43	8,73	30,90	80,00	78,80
15,22	9,03	10,93	53,50	71,00	75,50
13,62	13,80	5,91	53,50	73,00	73,00
6,24	12,40	8,85	33,50	63,00	70,50
15,70	7,57	8,41	55,00	67,00	61,00
6,15	6,63	5,26	52,00	74,00	67,90
4,38	10,98	7,73	42,50	72,00	67,90
3,33	7,64	8,53	61,00	81,00	55,00
6,50	10,23	11,21	50,50	69,50	76,20
9,78	12,71	11,73	47,30	54,60	66,00
9,35	15,41	7,17	54,50	71,50	68,80
9,80	15,33	11,29	41,20	71,20	77,00
9,51	13,14	10,81	56,00	78,50	58,20
9,94	10,57	7,39	65,00	72,30	67,50
10,69	14,40	7,38	71,60	85,00	75,00
8,06	7,37	8,84	49,00	87,30	57,20
7,33	8,25	8,75	61,20	74,00	67,30
11,83	11,08	4,28	67,00	78,50	78,00
12,27	12,10	6,42	69,50	80,50	68,20
9,39	7,51	10,44	66,50	62,00	63,20
10,97	11,19	3,01	70,00	78,20	79,20
9,32	10,02	8,75	69,00	72,50	70,20
8,53	17,68	9,24	83,00	75,50	47,80
8,18	7,34	7,25	69,90	73,50	73,00
11,04	11,71	9,06	72,90	82,00	74,00
8,96	12,41	9,63	75,70	66,00	71,00
9,02	13,06	7,60	71,50	83,50	79,00
8,19	12,70	6,36	75,50	63,00	75,00
5,42	11,19	2,17	82,50	73,50	68,00
14,30	10,78	4,57	79,10	79,50	51,00
7,78	8,95	0,67	66,50	76,20	31,00
16,06	9,97	0,84	65,50	76,40	42,00
11,67	4,75	12,78	68,50	76,50	31,00
8,46	10,30	5,19	75,00	79,30	77,00
9,91	5,85	2,06	60,30	70,90	44,00
12,41	8,76	0,57	72,00	80,50	33,00
12,75	12,07	10,18	66,00	52,50	25,00
7,84	10,49	9,00	60,00	68,00	79,00
12,49	10,97	8,30	71,00	50,00	68,00
8,85	8,70	9,20	64,50	60,00	69,00
8,44	15,19	9,00	76,50	83,50	71,00
10,21	10,94	8,05	61,50	64,00	62,90
8,96	7,98	7,12	67,40	66,00	63,50
7,82	8,81	4,10	67,30	59,00	60,00
10,71	8,51	8,55	73,30	63,00	50,00

10,99	7,08	9,80	76,30	68,00	57,10
13,62	8,18	9,39	81,20	64,50	63,40
9,58	7,44	5,96	60,50	65,20	64,80
10,73	7,21	7,03	73,50	63,00	53,00
10,56	10,09	7,59	68,50	64,50	50,00
10,81	9,17	10,93	82,70	60,50	60,30
18,20	8,59	5,57	73,40	72,50	60,00
9,49	8,49	1,68	71,50	56,80	45,90
12,35	10,39	0,40	72,00	71,10	29,80
12,60	8,15	9,74	70,50	68,50	10,00
11,30	7,34	9,41	75,00	65,10	72,00
10,50	7,37	11,65	65,50	79,80	71,50
10,50	9,21	4,09	74,00	60,50	76,50
11,23	8,30	12,27	74,50	68,20	47,50
10,84	7,33	15,42	72,00	66,70	70,50
9,32	8,85	9,83	69,00	65,10	76,50
9,72	4,07	9,26	72,50	67,20	69,50
12,46	5,94	9,10	74,00	67,20	62,80
9,13	6,62	14,42	85,00	57,70	63,80
11,29	5,20	5,99	67,00	71,90	70,50
9,62	6,12	5,33	70,00	60,30	54,00
16,01	5,37	7,11	72,00	51,50	64,50
9,17	7,38	6,41	71,40	49,90	59,00
9,76	7,91	8,94	78,00	52,90	51,00
9,13	7,94	4,48	75,50	58,90	66,50
9,95	2,69	4,24	72,20	42,40	63,00
6,11	4,98	1,67	62,00	45,20	65,00
10,08	2,83	2,63	68,00	61,50	46,00
10,65	6,00	5,13	68,00	46,00	51,00
13,80	5,22	10,90	70,00	36,00	54,00
11,51	0,62	9,37	62,00	42,40	82,50
9,19	2,32	10,05	59,70	36,50	61,50
11,14	9,99	6,73	64,80	49,50	72,30
10,70	10,94	11,72	75,00	48,70	60,00
9,15	11,90	13,65	74,00	20,80	70,00
9,60	8,79	11,95	65,00	33,00	71,50
11,95	10,75	10,19	73,50	75,50	64,20
11,21	12,72	7,61	55,00	66,50	67,00
9,43	6,53	8,47	67,00	73,50	89,30
15,89	10,82	8,80	68,50	64,50	64,50
10,05	11,76	7,39	72,00	64,50	73,50
9,27	7,81	9,83	78,50	63,30	63,20
8,09	8,39	11,04	54,00	66,50	70,40
13,55	8,44	11,30	65,00	67,50	67,40
10,20	7,29	7,63	76,00	65,50	76,50
8,30	4,98	7,93	76,70	67,50	69,00
11,65	6,54	5,63	69,00	71,00	67,00
10,23	6,31	7,32	68,50	70,50	52,70
11,26	3,82	10,44	72,00	81,40	56,00
9,90	9,26	7,36	63,50	63,00	64,00
9,10	13,58	8,60	75,00	73,50	68,10
9,11	13,04	13,23	74,80	64,50	72,10
8,90	12,18	9,34	79,00	61,00	71,10
10,45	6,93	9,12	79,50	71,50	66,20
13,93	10,22	11,45	71,50	72,00	68,30
11,80	10,17	8,47	70,00	79,00	68,00
11,90	12,24	9,82	56,00	71,00	60,90
9,30	7,48	12,39	59,50	58,50	53,50
8,90	10,65	8,35	71,50	67,00	66,80

10,45	13,13	9,88	74,50	75,00	67,50
13,93	11,41	7,17	76,50	71,00	62,60
11,25	12,68	8,99	77,00	63,50	54,00
10,13	13,89	6,16	79,80	72,00	57,00
9,90	11,09	5,40	67,20	67,00	51,00
8,37	11,85	6,03	84,30	68,00	54,50
12,02	14,13	6,05	67,80	66,00	51,10
11,04	11,89	11,03	63,50	66,00	52,30
10,73	10,81	16,24	63,50	69,00	65,50
9,70	5,10	9,33	69,50	67,00	65,50
8,74	10,21	10,24	71,10	71,00	52,30
8,94	11,12	13,08	7,10	72,00	68,10
6,03	14,37	4,71	69,50	72,00	77,40
14,14	11,00	4,75	76,50	36,00	38,10
9,93	15,89	8,23	61,00	68,50	54,50
8,96	15,48	16,31	68,50	67,30	65,80
4,48	18,01	8,46	61,70	76,50	77,50
9,39	8,58	12,85	76,00	72,30	52,40
12,74	7,16	12,56	72,00	71,00	62,80
15,10	8,41	9,20	61,00	86,80	70,70
9,09	9,83	7,12	50,00	65,80	73,50
10,99	10,55	5,96	67,00	64,20	63,50
10,10	6,76	11,26	86,10	62,00	64,50
11,25	10,62	7,76	85,60	71,50	80,00
15,87	8,10	9,29	69,50	67,50	80,00
11,81	9,99	11,97	81,90	75,50	74,00
12,50	13,86	7,90	58,50	55,50	75,00
10,23	11,79	12,20	76,10	69,20	72,00
15,25	6,25	11,04	84,90	64,40	70,00
13,00	9,66	12,67	66,40	79,50	71,50
11,83	5,14	9,69	76,90	88,20	76,50
11,00	6,15	10,92	65,00	69,90	75,20
12,77	10,47	13,72	90,20	61,00	70,50
12,05	11,10	12,27	87,50	63,20	86,50
12,19	15,71	14,37	88,00	49,00	77,50
10,31	12,90	8,81	48,50	56,00	76,10
7,51	11,49	8,81	67,50	61,00	69,50
10,70	11,26	10,14	82,40	67,00	73,50
9,87	10,70	8,07	82,30	69,00	65,50
11,79	6,28	8,56	74,00	77,50	64,50
12,15	10,81	7,71	69,00	72,00	72,50
14,87	10,65	12,57	75,30	66,50	76,10
12,32	8,00	9,94	72,00	72,00	82,70
18,15	2,38	12,10	69,30	64,00	80,90
18,16	9,70	16,25	70,00	74,00	83,50
7,59	3,90	11,03	80,60	73,00	84,50
12,81	2,90	9,99	75,60	68,00	83,20
8,33	10,50	4,55	77,20	48,00	77,30
10,31	11,40	7,50	68,50	73,80	59,50
11,19	5,92	7,33	66,00	52,50	72,00
8,96	6,85	10,00	73,00	40,00	70,00
16,16	8,45	5,86	68,00	68,00	75,50
12,61	11,45	11,36	63,00	73,50	60,00
6,83	9,60	10,45	77,00	53,00	73,50
17,21	13,11	8,70	63,50	64,00	74,50
10,64	14,64	10,08	80,00	70,00	76,00
13,79	2,90	10,43	87,00	59,00	81,00
8,38	10,50	6,99	67,00	88,00	77,00
11,41	11,40	9,62	88,00	80,00	60,50

10,03	5,92	13,02	82,00	76,00	72,00
8,53	6,85	8,65	78,00	72,00	77,00
13,20	8,45	14,68	61,00	64,00	71,90
11,42	11,45	10,60	67,00	74,00	81,50
15,40	9,60	9,03	62,00	73,00	82,00
14,46	13,11	9,21	60,50	68,00	79,00
8,55	14,64	13,81	68,90	48,00	79,00
9,44	16,43	12,28	66,00	73,80	73,00
9,28	5,45	9,87	76,50	52,50	84,50
4,18	12,23	9,27	74,00	70,20	83,10
11,10	9,78	9,85	69,90	57,00	70,80
12,04	7,38	10,99	64,30	68,00	96,10
10,68	8,19	10,59	62,00	68,00	95,30
5,15	6,31	4,60	46,50	50,00	86,50
11,13	15,89	9,85	66,50	71,50	55,60
10,92	11,45	5,98	70,50	57,30	71,40
8,55	8,03	10,49	65,50	79,50	72,00
9,44	1,29	5,19	56,10	75,30	57,00
9,28	14,06	8,28	68,50	77,50	73,00
4,18	8,73	6,52	75,50	26,50	69,00
11,10	11,49	11,91	75,50	71,00	81,00
12,04	13,82	13,29	76,30	61,50	70,50
10,68	6,08	10,78	77,40	64,70	71,50
15,15	14,67	15,31	99,00	69,00	73,00
11,13	10,28	6,33	79,50	58,00	73,50
10,92	10,09	10,44	53,00	78,00	70,50
18,20	15,33	11,48	78,00	65,50	75,50
15,00	11,00	9,19	59,40	70,50	76,30
12,49	13,04	9,80	79,60	74,50	77,40
13,50		18,04	70,50		99,00
		14,32			79,50
		4,41			53,00
		14,87			78,00
		7,51			59,40
		12,49			79,60

Fuente: Cortez, 2012.

ANEXO 12

TABLA 17. PESO DE RAÍCES POR MACETA.

Numeración	Tratamiento A Peso en g	Tratamiento AI Peso en g	Tratamiento CB Peso en g
1	88,74	64,48	91,25
2	81,86	86,82	61,29
3	101,33	87,37	71,39
4	99,69	96,05	75,79
5	102,62	79,40	87,80
6	80,06	80,91	78,69
7	97,05	40,01	70,92
8	81,88	37,45	79,80
9	71,52	78,70	97,00
10	124,47	92,48	94,07
11	120,40	93,84	82,17
12	101,27	170,92	107,74
13	130,28	110,42	76,10
14	100,73	83,42	87,29
15	136,23	91,96	95,07
16	86,61	76,90	72,30
17	62,02	103,15	82,80
18	49,60	130,52	101,75
19	58,92	115,47	80,54
20	46,19	107,74	102,63
21	74,67	101,75	85,95
22	117,49	86,74	96,85
23	86,30	80,30	45,30
24	57,31	72,24	65,74
25	97,56	142,00	52,21
26	151,68	105,87	96,42
27	110,03	43,03	107,32
28	161,50	42,81	11,64
29	100,60	98,34	105,93
30	120,00	105,95	79,04
31	92,55	96,57	87,49
32	143,76	93,40	75,06
33	67,40	87,48	87,44
34	92,59	83,64	133,32
35	66,79	75,42	96,38
36	86,29	87,96	107,02
37	72,86	76,17	96,04
38	66,90	76,00	115,54
39	85,99	78,86	81,66
40	75,63	103,88	108,42

Fuente: Cortez, 2012.

ANEXO 13

TABLA 18. TABLA PARA EL ANÁLISIS DE VARIANZA

TRATAMIENTO	*Azospirillum doebereinerae*	FERTIBACTER	CONTROL BLANCO	*Azospirillum doebereinerae*	FERTIBACTER	CONTROL BLANCO	*Azospirillum doebereinerae*	FERTIBACTER	CONTROL BLANCO
VARIABLE DEPENDIENTE	Masa Húmeda de Raíces			Promedio Altura Parte Aérea Húmedo			Promedio Masa Húmeda Parte Aérea		
1	88,74	64,48	91,25	14,30	10,33	6,29	74,09	72,16	64,24
2	81,86	86,82	61,29	9,53	9,64	9,06	71,37	66,49	63,95
3	101,33	87,37	71,39	12,27	10,55	8,94	74,00	75,40	67,62
4	99,69	96,05	75,79	10,80	8,81	7,44	68,71	72,09	63,81
5	102,62	79,40	87,8	10,40	9,70	8,94	66,74	67,51	68,20
6	80,06	80,91	78,69	11,98	8,38	7,40	73,80	71,93	64,80
7	97,05	40,01	70,92	11,66	9,68	7,21	78,23	68,03	65,24
8	81,88	37,45	79,8	10,29	9,68	7,45	68,90	68,03	65,24
9	71,52	78,70	97	10,84	9,70	9,61	72,45	68,37	73,37
10	124,47	92,48	94,07	11,42	8,50	8,99	74,04	72,34	67,67
11	120,4	93,84	82,17	10,62	9,56	8,11	65,42	63,09	71,29
12	101,27	170,92	107,74	10,85	10,17	8,99	70,16	69,18	69,37
13	130,28	110,42	76,1	10,41	8,53	9,65	74,39	68,33	71,41
14	100,73	83,42	87,29	10,99	9,72	9,64	72,11	61,94	66,65
15	136,23	91,96	95,07	10,74	9,59	8,83	68,49	67,37	69,40
16	86,61	76,90	72,3	11,16	10,35	7,83	69,80	68,25	68,51
17	62,02	103,15	82,8	10,93	11,68	8,91	68,46	71,75	67,60

18	49,6	130,52	101,75	10,92	9,22	7,96	69,74	73,04	70,36
19	58,92	115,47	80,54	12,36	9,03	8,67	52,22	70,80	67,16
20	46,19	107,74	102,63	10,92	9,86	8,73	69,74	72,28	69,18
21	74,67	101,75	85,95	7,91	12,04	8,04	48,61	75,34	68,58
22	117,49	86,74	96,85	9,93	11,48	7,35	64,48	72,97	70,04
23	86,3	80,30	45,3	9,75	8,93	5,10	74,21	73,98	45,89
24	57,31	72,24	65,74	10,30	9,85	8,02	67,53	64,61	62,69
25	97,56	142,00	52,21	11,20	8,51	6,77	72,41	65,17	50,92
26	151,68	105,87	96,42	10,90	6,90	9,74	71,56	66,46	66,31
27	110,03	43,03	107,32	10,70	9,68	6,09	73,93	68,03	60,25
28	161,5	42,81	11,64	10,23	6,97	9,66	67,57	39,11	69,38
29	100,6	98,34	105,93	10,69	9,39	8,71	66,69	67,48	65,43
30	120	105,95	79,04	10,37	8,52	9,92	71,17	69,32	65,70
31	92,55	96,57	87,49	11,08	11,32	9,26	71,50	69,89	57,13
32	143,76	93,40	75,06	9,56	11,17	9,35	64,33	68,67	63,63
33	67,4	87,48	87,44	10,48	11,66	9,97	65,84	67,60	72,70
34	92,59	83,64	133,32	12,33	8,83	10,34	75,11	70,32	73,13
35	66,79	75,42	96,38	10,91	11,14	10,14	76,48	64,22	77,74
36	86,29	87,96	107,02	12,65	6,84	9,23	73,15	65,66	73,44
37	72,86	76,17	96,04	11,72	9,48	11,21	73,25	67,15	75,10
38	66,9	76,00	115,54	10,45	10,75	8,67	69,59	65,66	67,16
39	85,99	78,86	81,66	9,25	9,46	9,41	64,53	67,43	71,19

40	75,63	103,88	108,42	13,02	11,45	11,26	74,82	63,92	74,82
PROMEDIO	93,73	89,16	85,78	10,92	9,68	8,67	69,74	68,03	67,16