

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



CARRERA DE INGENIERÍA AGRÓNOMICA

**AISLAMIENTO DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO Y
BIOESTIMULADORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL CON
POTENCIAL EN LA PRODUCCIÓN DE BIOFERTILIZANTES**

DOCUMENTO FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN COMO
REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE INGENIERA AGRÓNOMA

AUTORA:

PILATUÑA QUISHPE MARÍA FERNANDA

TUTORA:

ING. Mg. MARILÚ GONZÁLEZ PARRA

CEVALLOS – ECUADOR

2018

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

La suscrita, PILATUÑA QUISHPE MARÍA FERNANDA, portadora de la cédula de identidad número: 1600948622, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado “AISLAMIENTO DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO Y BIOESTIMULADORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL CON POTENCIAL EN LA PRODUCCIÓN DE BIOFERTILIZANTES” es original, auténtico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mí sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.

.....
MARÍA FERNANDA PILATUÑA QUISHPE

DERECHOS DEL AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “AISLAMIENTO DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO Y BIOESTIMULADORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL CON POTENCIAL EN LA PRODUCCIÓN DE BIOFERTILIZANTES” como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Ingeniera Agrónoma, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.

.....
MARÍA FERNANDA PILATUÑA QUISHPE

**“AISLAMIENTO DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO Y
BIOESTIMULADORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL CON
POTENCIAL EN LA PRODUCCIÓN DE BIOFERTILIZANTES”**

Revisado por:

**Ing. Mg. Marilú González
TUTORA**

**Ing. Mg. Alberto Gutiérrez
ASESOR DE BIOMETRÍA**

APROBADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN:

FECHA

**Ing. Mg. Hernán Zurita
PRESIDENTE TRIBUNAL**

**Ing. Mg. Alberto Gutiérrez
MIEMBRO DE TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN**

**Ing. Mg. Wilfrido Yáñez
MIEMBRO DE TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi padre celestial por ser mi guía, refugio y fuerza, quien me mantiene de pie en todo momento. A mis padres por su apoyo incondicional y su amor infinito, por ser mi motivo por quienes luchar y confiar en mí, los amo tanto viejitos, son mi mayor bendición.

A mis hermanos Cristian por tu gran apoyo moral, William por ser siempre mi mano derecha, mi compañero de los buenos y malos momentos, eres mi luz, mi hombro de desahogo y una gran motivación, Alexandra fuiste y serás como una madre, gracias por todos los valores que me enseñaste, Rosalía por tu apoyo y consejos, son una gran bendición en mi vida.

A Ricardo, gracias por permitirme pasar momentos maravillosos a tu lado y vivir nuevas y grandes experiencias, fuiste, eres y serás mi primer amor, que Dios guíe siempre tu camino.

A mis compañeros de grupo mejor conocidos como la vagancia, fueron como mi segunda familia, porque familia no siempre es de sangre, sino aquella donde compartes, donde descansas, donde simplemente eres alguien especial. A mis dos grandes amigos Alex y Rogelio, por su gran confianza y amistad, Dios les puso en mi camino en el momento exacto.

A mi tutora la Ing. Marilú González, por su gran apoyo, una excelente docente, amiga y madre. Al Ingeniero Wilfrido Yáñez por su amistad y confianza. Al Doctor. Carlos Falconi, por abrirme las puertas de su laboratorio y brindar conocimientos. Al Ing. Yunys Pérez, por la paciencia, sus técnicas y conocimientos aportados. Al Doctor David Risco y Carlos Vásquez por su amistad y colaboración en este proyecto de investigación, Dios los bendiga siempre.

A la Universidad Técnica de Ambato, por abrirme las puertas de la Facultad de Ciencias Agropecuarias por las vivencias, apoyo y conocimiento. A la ciudad de Ambato por recibir a una Paloreña y poder conocer gente maravillosa.

Gracias a todos por ser parte del tren de mi vida.

DEDICATORIA

A mi padre Celestial que sin su presencia en mi vida no hubiese llegado muy lejos.

A mis padres, por ser siempre mi pilar y sustento, mi madre por demostrarme que nunca hay que rendirse y mi padre por hacer las cosas con paciencia y en conjunto me han enseñado que nunca hay que rendirse y esperar las cosas con paciencia y a su debido momento.

A mi querido Palora Edén de la Amazonía, por ser mi motivación desde pequeña.

“La esperanza es desear que algo suceda, la fe es creer que va a suceder y la valentía es hacer que suceda”.

LISTA DE CONTENIDO

CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II	4
REVISIÓN DE LITERATURA O MARCO TEÓRICO	4
2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	4
2.1.1. Fertilizantes biológicos	4
2.1.2. El nitrógeno.....	4
2.1.3. Fijación biológica del nitrógeno (FBN)	5
2.1.3.1. Fijación simbiótica.....	6
2.1.3.2. Fijación no simbiótica.....	6
2.2. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES	6
2.2.1. Variable independiente	6
Bacterias fijadoras de nitrógeno.....	6
Fijadoras de vida libre.....	7
Nitrogenasa	8
2.2.2. Variable dependiente: pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas	9
Medio selectivo Ashby manitol	9
Pruebas morfológicas y fisiológicas	9
Pruebas morfológicas.....	10
- Morfología	10
Pruebas fisiológicas	11
- Temperatura	11
- pH.....	11
- Salinidad	12
Pruebas bioquímicas	13
- Tinción de gram	13
- Reacción del KOH 3%	13
- Catalasa.....	13
- Ureasa	13
Nitrofijación.....	14
Kit Assay amonio.....	14
Screening biológico	14
- Tomate (<i>Lycopersicon esculentum Mill</i>).....	14
- Lechuga (<i>Lactuca sativa L.</i>).....	16
2.2.3. Unidad de análisis	17

- Suelo rizosférico	17
- Raíz	17
CAPÍTULO III.....	18
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	18
3.1. HIPÓTESIS.....	18
3.2. OBJETIVOS	18
3.2.1. OBJETIVO GENERAL.....	18
3.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
CAPÍTULO VI.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS	19
4.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO	19
4.2. CARACTERIZACIÓN DEL LUGAR	19
4.2.1. CLIMA.....	19
TEMPERATURA:.....	19
HUMEDAD:.....	19
4.3. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS	20
4.3.1. EQUIPOS.....	20
4.3.2. MATERIALES	20
4.3.3. REACTIVOS	21
4.4. FACTORES EN ESTUDIO 1 (PARTE 1)	22
4.4.1. Cepas bacterianas aisladas de los cultivos:.....	22
4.4.2. Zonas donde se extrajeron las muestras:.....	22
4.5. MANEJO DEL EXPERIMENTO	23
□ Muestreos de suelos (PARTE 1).....	23
□ Aislamiento de microorganismos.....	23
□ Pruebas morfológica y fisiológica de las cepas.....	24
– Caracterización morfológica.....	24
– Caracterización fisiológica.....	24
o Rango de crecimiento en función a la temperatura.....	24
o Rango de crecimiento en función al pH.....	24
o Rango de crecimiento en función a la salinidad.....	25
□ Pruebas bioquímicas	25
– Caracterización bioquímica.....	25
o Tinción gram.....	25
o KOH 3%.....	26
o Catalasa.....	27

o Ureasa	28
□ Determinación del amonio con el kit Assay	29
□ Conservación con glicerol (criopreservación)	31
□ Medición del crecimiento bacteriano	32
4.6. FACTORES EN ESTUDIO 2 (PARTE 2)	32
TRATAMIENTOS	32
4.7. DISEÑO EXPERIMENTAL	33
□ Prueba de hipersensibilidad	34
□ Screening biológico	34
Preparación de la suspensión bacteriana.....	34
Preparación del sustrato y desinfección de las bandejas	35
Siembra e inoculación de las cepas bacterianas.....	35
4.8. VARIABLE RESPUESTA (indicadores agrónomicos)	37
Días de la germinación.....	37
Altura de la planta (cm)	37
Número de hojas	37
4.9. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN	37
CAPÍTULO V	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
PARTE 1	38
□ Aislamiento de las cepas bacterianas	38
□ Pruebas morfológicas y fisiológicas	40
Caracterización morfológica:	40
Caracterización fisiológica:.....	41
□ Pruebas bioquímicas	42
Tinción gram:.....	42
KOH 3%:	42
Catalasa:.....	42
Ureasa:	43
□ Nitro fijación.....	44
□ Medición del crecimiento bacteriano.....	46
PARTE 2.....	47
Prueba de hipersensibilidad:	47
□ Screening biológico	48
Plántulas de Tomate (<i>Lycopersicon esculentum Mill</i>):	48
Días de la germinación:	48

Altura de la planta:	48
Número de hojas:	49
Plántulas de Lechuga (<i>Lactuca sativa L.</i>):	50
Días de la germinación:	50
Altura de la planta:	50
Número de hojas:	50
CAPÍTULO VI.....	52
CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS	52
6.1. CONCLUSIONES	52
RECOMIENDACIONES	52
6.2. BIBLIOGRAFÍA	53
6.3. ANEXOS	58
CAPÍTULO VII	76
PROPUESTA.....	76
TITULO	76
7.1. DATOS INFORMATIVOS	76
7.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA	76
7.3. JUSTIFICACIÓN	76
7.4. OBJETIVOS	77
7.5. ANALISIS DE FACTIBILIDAD	77
7.6. FUNDAMENTACIÓN	77
7.7. METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO	78
7.8. ADMINISTRACIÓN.....	78
7.9. PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción morfológica de las colonias bacterianas de acuerdo a la forma, elevación y margen.....	10
Tabla 2. Características de los diferentes tipos de morfología de las cadenas de esporas.....	10
Tabla 3. Clasificación de las cepas bacterianas según el rango de crecimiento en función de la temperatura de incubación.....	11
Tabla 4. Clasificación de las cepas bacterianas según el rango de crecimiento en función del pH del medio selectivo donde se aisló.....	12
Tabla 5. Clasificación de las cepas bacterianas según el rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo.....	12
Tabla 6. Clasificación taxonómica del tomate.....	15
Tabla 7. Clasificación taxonómica de la lechuga.....	16
Tabla 8. Tratamientos de las cepas aisladas de los cuatro cultivos muestreados.....	23
Tabla 9. Tratamientos aplicados en plántulas de tomate y lechuga.....	33
Tabla 10. Clasificación de las cepas aisladas del cultivo de amaranto.....	39
Tabla 11. Clasificación de las cepas aisladas del cultivo de mora.....	39
Tabla 12. Clasificación de las cepas aisladas del cultivo de zanahoria.....	40
Tabla 13. Clasificación de las cepas aisladas del cultivo de mashua.....	40
Tabla 14. Caracterización del género <i>Azotobacter</i> según el manual bacteriológico de Bergey's.....	43

Tabla 15. Efecto de la inoculación de las cepas bacterianas en plántulas de tomate.....49

Tabla 16. Efecto de la inoculación de las cepas bacterianas en plántulas de lechuga.....51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. A) Realización de diluciones en tubos con 9 ml de agua destilada estéril. B) Realización de siembra por goteo en el medio selectivo Ashby-Manitol.....	24
Figura 2. A) Cadena de cocos de la cepa ZUTA AS1.1 aislada del cultivo de zanahoria blanca, extraído del suelo rizosférico. B) bacilos de la cepa MUTA AR3, aislada del cultivo de mora, extraído de la raíz.....	24
Figura 3. Cepa MUTA AR2, aislada del cultivo de mora, extraída de la raíz, en el medio selectivo con el 5% de concentración de cloruro de sodio.....	25
Figura 4. A) Aplicación del cristal violeta por un minuto. B) fijación del cristal violeta con lugol por 30 segundos. C) eliminación del exceso del cristal violeta con alcohol-cetona por 15 segundos. D) aplicación de safranina por 2 minutos.....	26
Figura 5. A) Solución preparada del hidróxido de potasio al 3% en 50ml. B) mezcla de la masa bacteriana con el hidróxido de 1 a 3 minutos.....	27
Figura 6. A) Preparación y rotulación de los portaobjetos. B) reacción de la catalasa positiva en placas de cepas aisladas del cultivo de mora. C) burbujeo o reacción positiva en la muestra de una cepa de amaranto AUTA RA6.....	27
Figura 7. A) Suspensión del medio en tubos. B) siembra de las cepas bacterianas en el medio ureasa. C) diferenciación de los tubos 1 y 2, donde 1 es negativa y 2 positiva.....	28
Figura 8. Tabla de mediciones del blanco, estándar y la muestra.....	30
Figura 9. A) Materiales y muestra para la ejecución de la técnica. B) toma de la primera lectura en el espectrofotómetro.....	30
Figura 10. A) Solución bacteriana de 18 horas. B) siembra en estrías.....	31

Figura 11. Medición de la concentración de las UFC en el espectrofotómetro.....	32
Figura 12. A) plantas rotuladas listas para la inoculación. B) inoculación bacteriana en la nervadura de la hoja de tabaco. C) hoja inoculada.....	34
Figura 13. Solución bacteriana lista para la inoculación.....	35
Figura 14. A) Colocación del sustrato en fundas térmicas para la esterilización. B) remojo del sustrato antes de poner las semillas. C) rotulación de cada repetición y tratamiento. D) colocación de las semillas en los alvéolos. E) inoculación bacteriana en semillas de tomate. F) inoculación bacteriana en semillas de lechuga.....	36
Figura 15. Producción de amonio por cepas aisladas de raíces y zonas rizosféricas del cultivo de amaranto.....	44
Figura 16. Producción de amonio por cepas aisladas de raíces y zonas rizosféricas del cultivo de mora.....	44
Figura 17. Producción de amonio por cepas aisladas de raíces y zonas rizosféricas del cultivo de zanahoria.....	45
Figura 18. Producción de amonio por cepas aisladas de raíces y zonas rizosféricas del cultivo de mashua.....	45
Figura 19. Crecimiento de las diferentes cepas de bacterias aisladas en raíces y zona rizosférica de amaranto (a), mora (b), zanahoria (c) y mashua (d).....	47

RESUMEN EJECUTIVO

El aislamiento y la identificación de microorganismos fijadores de nitrógeno con potencial para el desarrollo de biofertilizantes o sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal es un componente vital para la producción agrícola, ya que la agricultura convencional se ha basado en el uso excesivo de fertilizantes inorgánicos, es por ello que una alternativa a estos problemas es el uso de métodos biológicos entre ellos la selección de cepas bacterianas con estas características. El presente trabajo de investigación se realizó con el objetivo de obtener cepas bacterianas nitro fijadoras y estimuladoras del crecimiento vegetal para contribuir con el establecimiento del banco de germoplasma con potencial en la producción de biofertilizantes. Los muestreos se realizaron en áreas de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, en los cultivos de amaranto, mora, zanahoria y mashua de la raíz y suelo rizosférico, donde se obtuvieron 26 aislados en el medio selectivo Ashby manitol, para la identificación se realizaron pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, en el cual las cepas AUTA AR2, AUTA AS5, MUTA AR4, MUTA AR5, MUTA AS6, SHUTA AR2, SHUTA AS3 Y SHUTA AS4 se asemejan al género *Azotobacter*. Según la capacidad de producir amonio, en el cultivo de amaranto las cepas con mayor capacidad fueron AUTA AR6, AUTA AR3, AUTA AS1, AUTA AS4 y AUTA AS6, en mora MUTA AR4, MUTA AR5, MUTA AR1, MUTA AR2 Y MUTA AR3, zanahoria ZUTA AS1.1, ZUTA AS3, ZUTA AS1 Y ZUTA AS2 y en mashua SHUTA AS1, SHUTA AS3, SHUTA AS4, SHUTA AS5 y SHUTA AR2. De acuerdo a la capacidad nitro fijadora y las pruebas realizadas se seleccionó 15 cepas bacterianas para probar la eficiencia en semillero. Se obtuvo como resultados que las cepas AUTA AR6 Y MUTA AR4 fueron las mejores en altura de tallo y número de hojas en comparación al tratamiento testigo. Basado en los resultados estos dos tratamientos podrían ser utilizados para la elaboración de biopreparados, sin embargo, se requiere realizar más estudios como biología molecular para su identificación.

Palabras clave: diazótrofos o bacterias de vida libre, fijación biológica del nitrógeno, capacidad nitro fijadora, screening biológico.

SUMMARY

The isolation and identification of nitrogen fixing microorganisms with potential for the development of biofertilizers or substances that stimulate plant growth is a vital component for agricultural production, since conventional agriculture has been based on the excessive use of inorganic fertilizers. Therefore, an alternative to these problems is the use of biological methods, among them the selection of bacterial strains with these characteristics. The present research work was carried out with the objective of obtaining nitrogen fixing bacterial strains and stimulators of plant growth to contribute with the establishment of the germplasm bank with potential in the production of biofertilizers. The sampling was carried out in areas of the Faculty of Agricultural Sciences of the Technical University of Ambato in the amaranth, blackberry, carrot and mashua cultivation of the root and rhizospheric soil, where 26 isolates were obtained in a selective medium Ashby mannitol, for the identification, morphological, physiological and biochemical tests were performed, in which the strains AUTA AR2, AUTA AS5, MUTA AR4, MUTA AR5, MUTA AS6, SHUTA AR2, SHUTA AS3 and SHUTA AS4 resemble the genus *Azotobacter*. According to the capacity to produce ammonium, in the amaranth culture the strains with greater capacity were AUTA AR6, AUTA AR3, AUTA AS1, AUTA AS4 and AUTA AS6, in carrots MUTA AR4, MUTA AR5, MUTA AR1, MUTA AR2 AND MUTA AR3, carrot ZUTA AS1.1, ZUTA AS3, ZUTA AS1 and ZUTA AS2 and in mashua SHUTA AS1, SHUTA AS3, SHUTA AS4, SHUTA AS5 and SHUTA AR2. According to the nitrogen fixing capacity and the tests carried out, 15 bacterial strains were selected to test the efficiency in the nursery. It was obtained as results that the strains AUTA AR6 and MUTA AR4 were the best in height of stem and number of leaves in comparison to the control treatment. Based on the results, these two treatments could be used for the preparation of biopreparations, however it is necessary to carry out more studies such as molecular biology for its identification.

Key words: diazotrophs or free-living bacteria, biological nitrogen fixation, nitrogen fixing capacity, biological screening.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Las bacterias representan el grupo de microorganismos con mayor diversidad y se encuentran en todos los ambientes vivos, cumplen varias funciones entre ellas tenemos las que fijan nitrógeno en ambientes aeróbicos, entre sus características es que han desarrollado diferentes adaptaciones metabólicas y estructurales para realizar la fijación de nitrógeno en un ambiente oxidante.

Estos microorganismos pueden ser simbióticos o de vida libre. Los de vida libre están asociados a las partículas del suelo e interactúan con las raíces de las plantas al encontrarse en los gránulos de suelo adheridos a las mismas en la zona de la rizósfera, donde son capaces de ejercer un conjunto de interacciones producto de la competencia por nutrientes. Por su parte los microorganismos de la rizósfera estimulan la exudación de la raíz a través de la liberación de variadas sustancias producto de su metabolismo (Peña, H., Reyes, 2007).

Las bacterias de vida libre pueden ser anaeróbicas obligadas o facultativas como *Clostridium*, *Pasteurianum*, *Klebsiella*, *Desulfovibrio*. Aeróbicas obligadas como *Azospirillum*, *Azotobacter*. Fotosintéticas como bacterias púrpuras sulfurosas y no sulfurosas y bacterias verde sulfurosas. Las bacterias pertenecientes a los géneros: *Azotobacter sp*, *Azospirillum sp*, *Pseudomonas sp*, *Xantomonas sp*, *Enterobacter sp*, *Arthrobacter sp*, *Bacillus subtilis*, se destacan por su potencial como biofertilizantes e inciden grandemente en el rendimiento y en la calidad de los cultivos (Aguilar, 2015).

Dentro de las bacterias nitro fijadoras se incluyen múltiples géneros bacterianos, como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum* y *Klebsiella* (Aguilar, 2015).

Estudios han demostrado con microorganismos de los géneros *Azospirillum sp* y *Azotobacter sp* que estas poblaciones además de fijar nitrógeno en forma asimbiótica, también segregan sustancias promotoras de crecimiento (auxinas,

giberelinas, citoquininas), las cuales benefician a la planta de una forma multidimensional (Mantilla, Oviedo, & Betancur, 2011).

Las bacterias del género *Azotobacter* se presentan como una alternativa útil debido a que son fijadoras de nitrógeno de vida libre, promueven el crecimiento de raíces aumentando la concentración de materia seca, contribuyendo con la solubilización de fosfatos y calcio, y se han reportado como eficientes productoras de fitohormonas, sideróforos y sustancias anti fúngicas (Borda Daniel, Pardo Juan, Martínez María, 2009).

El género *Azotobacter*, el cual comprende siete especies a) *A. chroococcum*, b) *A. vinelandii*, c) *A. beijerinckii*, d) *A. paspali*, e) *A. armeniacus*, f) *A. nigricans* y g) *A. salinestrus*, (Page & Shivprasad, 1991). Fijan asimbióticamente nitrógeno y son solubilizadoras de fosfato (Balandreau y col., 1986). En vida libre, fijan al menos 10mg de N₂ por gramo de carbohidrato consumido (Holt, 2000).

El nitrógeno es un elemento fundamental para la nutrición de la planta, se encuentra en abundancia en la atmósfera pero en forma orgánica lo cual no es asimilable por los vegetales, con la ayuda de ciertas bacterias presentes en el suelo y en la rizósfera este es transformado y aprovechado por las mismas.

El nitrógeno molecular (N₂) es la única reserva de nitrógeno (N) accesible en la biosfera, prácticamente ilimitada debido a su triple enlace, esta reserva no es directamente utilizada por los vegetales y animales. Para que el N₂ pueda ser asimilado, es necesario que sea reducido hasta una forma catiónica de amonio (NH⁴⁺) o aniónica de nitrato (NO³⁻). Los únicos seres vivos capaces de realizar esta reacción son las Eubacteria y Archaea, por el proceso denominado fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Baca, B., Soto, L., Pardo, 2004).

Los bancos de germoplasma desempeñan un papel fundamental en la conservación, la disponibilidad y el uso de una amplia diversidad fitogenética, sirven de puente entre el pasado y el futuro, asegurando la disponibilidad continua de los recursos fitogenéticos, para la investigación, la reproducción y la mejora (FAO, 2014).

Al conocer que no se tiene referencia que exista en la provincia de Tungurahua un banco de especies nativas identificadas con estas características para poder desarrollar la producción de biofertilizantes la presente investigación está dirigida a seleccionar cepas bacterianas nitro fijadoras para el establecimiento del banco de germoplasma con potencial en la producción de biofertilizantes.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA O MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

2.1.1. Fertilizantes biológicos

(García, J; Mendoza, A; Makey, N. 2012), señalan que los elevados costos de los fertilizantes reducen la rentabilidad de los cultivos y generan otras alternativas ecológicas y económicas de biofertilización a base de microorganismos biológicos promotores del crecimiento vegetal.

(Dibut, B. 2009), indica que tanto en la agricultura convencional como en la sostenible, incluyendo la urbana, los biofertilizantes y los bioestimuladores han encontrado un espacio único, ya que mediante su aplicación se han logrado efectos beneficiosos sobre los cultivos en grandes superficies, incluyendo la producción de semillas.

(Carvajal, J; Mera, A. 2010), mencionan que los nutrientes esenciales de los fertilizantes biológicos, tienen características fisicoquímicas y biológicas esenciales para el suelo. La fertilización biológica consiste en el uso de insumos naturales, como son: restos de descomposición de materia orgánica, estiércol animal, hongos y bacterias para producir estimulantes de crecimiento vegetal, mejorar la fijación de nutrientes en la rizósfera, la estabilidad del suelo y facilitar el control biológico (Chirinos, Leal, & Montilla, 2006).

2.1.2. El nitrógeno

La supervivencia y el óptimo desarrollo de las especies vegetales dependen principalmente del nitrógeno asimilable disponible del suelo. La importancia de este elemento se fundamenta en su rol metabólico y estructural porque está presente en la composición de proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares como vitaminas, fitohormonas, pigmentos, purinas y pirimidinas (Menezes, 2009).

Las reservas importantes de N se encuentran en la materia orgánica del suelo (MOS), del total de N que hay en el suelo, cerca del 98% se halla formando compuestos orgánicos. Dependiendo de su contenido de materia orgánica, los primeros 20 cm de profundidad de un suelo pueden contener entre 1.000 y 10.000 kg de N por hectárea. Pero las formas químicas identificadas constituyen un 30-35% del total del N orgánico del suelo (Perdomo, C; Barbazán, M; Durán, M. 1992).

La dinámica de este elemento en la biosfera comprende principalmente la fijación de nitrógeno (N₂), la mineralización, la nitrificación, la desnitrificación y la oxidación anaeróbica del amonio (Hayatsu M, 2008). El nitrógeno entra en la biosfera por fijación química y biológica del nitrógeno molecular (N₂) y se remueve de la misma por desnitrificación (Delgado, R; Salas, A. 2006)

2.1.3. Fijación biológica del nitrógeno (FBN)

El desarrollo de la fijación biológica de nitrógeno depende de microorganismos especializados, que son portadores de la enzima nitrogenasa y se encargan de producirla a través de procesos biológicos y fisicoquímicos (Aseri G. et al., 2008). (Taylor et al., 2002), consideran que alrededor del 80% del nitrógeno fijado en el planeta, corresponde a la actividad del género gram-negativo de bacterias del género *Rhizobium*.

En los años 90 Kloepper y Beauchamp utilizaron el termino PGPR (Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal) para las bacterias capaces de provocar un efecto beneficioso a las plantas. Existen diferentes modos por lo que las PGPR pueden afectar de forma positiva a las plantas como: producción de sustancias reguladoras de crecimiento vegetal (fitohormonas, ácidos orgánicos, etc.), fijación de nitrógeno atmosférico, solubilización de fosfatos insolubles y producción de antibióticos que eliminan o controlan microorganismos patógenos (Siquiera O., 1988).

2.1.3.1.Fijación simbiótica

La fijación simbiótica se lleva a cabo entre especies de leguminosas y bacterias fijadoras de nitrógeno como el *Rhizobium* en los nódulos de raíces de leguminosas (Perdomo, C; Barbazán, M; Durán, M. 1992).

2.1.3.2.Fijación no simbiótica

La fijación no simbiótica del nitrógeno en el suelo es realizada por microorganismos como bacterias de vida libre y algas azul-verdes (Perdomo, C; Barbazán, M; Durán, M. 1992).

2.2. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES

2.2.1. Variable independiente

Bacterias fijadoras de nitrógeno

(Banerjee M, 2006), menciona que los microorganismos fijadores de nitrógeno constituyen un grupo de bacterias denominadas diazotroficas, las cuales están incluidas en el grupo conocido como (PGPR) o bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

(Rodriguez C, 2011), señala que de acuerdo la relación que presenten estos microorganismos con las plantas pueden clasificarse en: fijadores de vida libre, asociados, y simbióticos con diferentes requerimientos ambientales, como: temperatura, pH y humedad, así mismo el tipo de respiración, siendo aeróbicas o anaeróbicas facultativas u obligadas, además según la fuente de carbono en autótrofas o heterótrofas, todas estas tienen la capacidad de reducir el nitrógeno atmosférico.

Fijadoras de vida libre

Las bacterias diazótroficas asimbióticas o de vida libre, llevan a cabo el mecanismo de fijación biológica de nitrógeno sin interactuar directamente con ninguna especie vegetal en particular y además proporciona nitrógeno en formas asimilables para todo tipo de especies vegetales (Cassán, et al., 2001).

(Armenta et al., 2010), indican que los géneros más estudiados de bacterias fijadoras de N de vida libre son *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerinckia* y *Klebsiella*. Estas bacterias favorecen el desarrollo de la zona radicular por su producción adicional de fitohormonas como: auxinas, citoquininas y giberelinas (González, T; Campanharo, J; & Lemos, E. 2008).

Con el propósito de encontrar cepas eficientes en la producción de la fitohormona de aislados de los géneros *Azotobacter sp* y *Azospirillum sp*, de suelos en la rizósfera de los cultivos: plátano, maíz, pastos, yuca, algodón y rastrojos, evaluaron las poblaciones en la producción del ácido indolacético (AIA) en presencia de triptófano, descubriendo un aislado del género *Azotobacter* que produjo la mayor concentración de la auxina: 44,726 ppm, localizado en zonas de rastrojos, en el ensayo en semillas de pastos Angleton (*Dychanthium aristatum*) inocularon diferentes concentraciones bacterianas y obtuvieron un mayor promedio de la longitud del tallo y longitud de hojas de las plantas muestreadas (Mantilla et al., 2011).

(Borda, D; Pardo, J; Martínez, M. 2009), evaluaron un aislamiento en bacterias fijadoras de N, donde dos aislamientos identificaron como *Azotobacter nigricans* en base a la caracterización fenotípica y genotípica, escogieron a la cepa A5 para la producción de un biofertilizante ya que demostró mejor estabilidad, pigmentación, velocidad de crecimiento $0,1405 \text{ h}^{-1}$ fase exponencial de 18 horas y producción de AIA de 38,4 mg/ml a las 150 horas. Obtuvieron un biofertilizante en medio leche a base de *Azotobacter nigricans*, con mayor producción de biomasa en el cultivo de *Stevia rebaudiana* en un 15%.

(Frioni, L. 2006), determinó que el nitrógeno fijado por los microorganismos no es entregado directamente a la planta y solo puede ser aprovechado después de la muerte y lisis celular.

Nitrogenasa

(Baca, B., Soto, L., Pardo, 2004), manifiestan que todos los organismos diazotróficos llevan a cabo la fijación biológica de nitrógeno debido a la actividad del complejo enzimático Nitrogenasa.

Con el fin de aislar y caracterizar bacterias diazótropas del género *Azotobacter*, analizaron muestras de suelos, en el aislamiento usaron el medio Ashby-sacarosa, la caracterización molecular lo hicieron mediante la amplificación del ADNr 16S, utilizaron como cepa de referencia a *Azotobacter vinelandii* CDBB B-992, el gen 16S fue amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), comparando la base de datos del GenBank, obtuvieron una similitud del 99% para *Azotobacter vinelandii*, demostrando así técnicas moleculares, convencionales y la bioinformática que son fundamentales para la caracterización de bacterias diazótropas de importancia en la agricultura, biodiversidad, bioprospección y biotecnología (Flores, et al., 2012).

(Jiménez, 2011), menciona que las bacterias del género *Azotobacter*, subclase γ -*Proteobacteria*, poseen una alta capacidad fijadora de nitrógeno como resultado de su asociación libre con la planta, de acuerdo con la FAO en el 2005 la capacidad fijadora del orden es de 0,5 a 1 kg ha⁻¹ año.

(González, Y. et al., 2010), probaron el efecto de biofertilizantes a base de la bacteria fijadora de nitrógeno atmosférico *Azotobacter chroococcum* y su combinación con la bacteria solubilizadora del fósforo del suelo *Bacillus megatherium* var. phosphaticum sobre las características morfológicas de las plántulas de tabaco. Se formaron a partir de la combinación de dos niveles de fertilizante nitrogenado (100 % y 75 % del fertilizante total), tres niveles de fertilizante fosfórico (100 %, 75 % y 50 % del total a aplicar), y dos biofertilizantes Dimargón (*Azotobacter chroococcum*) y Azomeg (*A. chroococcum* + *Bacillus megatherium* var. phosphaticum). Con el uso de los

biofertilizantes mejoraron las características morfo fisiológicas de las plántulas, como la longitud, el diámetro del tallo, la masa fresca y seca y el área foliar.

(Jiménez D. 2011), señalan que la conversión biológica del gas nitrógeno a amonio es catalizado por el complejo metalo-enzimático nitrogenasa, que es codificado por los genes *nifH* y *nifDK*.

(Aguilar, B. 2015) indica que la enzima Nitrogenasa es la encargada de la fijación biológica del nitrógeno, aunque también se le considera inespecífica por su capacidad de reducir otras moléculas dotadas también por un triple enlace como es el caso de los cianuros ($N\equiv C$) y el acetileno ($HC\equiv CH$), están catalogadas como oxidoreductasas, dentro de la clasificación enzimática, por su capacidad de reducir el N_2 a NH_4^+ .

2.2.2. Variable dependiente: pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas

Medio selectivo Ashby manitol

Es un medio usado para el aislamiento de especies de *Azotobacter* las cuales son bacterias fijadoras de nitrógeno no simbióticas, está compuesto principalmente por un azúcar denominado manitol, el cual es utilizado por la bacteria como fuente de carbono y el nitrógeno atmosférico como fuente de nitrógeno (Himedia L. 2015).

Pruebas morfológicas y fisiológicas

(Moreno, L; & Galvis, F. 2013), indican que los individuos de una misma especie no necesariamente presentan las mismas condiciones genéticas, bioquímicas y toxicológicas, y que organismos de diferente especie pueden ser muy similares en los mismos aspectos, además las muestras frescas y el uso de tinciones revela la forma de agruparse, la estructura y el tamaño de las células.

Pruebas morfológicas

- Morfología

En la determinación de la morfología celular a las cepas se las clasifica por tinción de gram, preferible de cultivos frescos, las colonias cuando crecen en medios específicos y en condiciones idóneas se describe por las siguientes características: tamaño, forma y a veces por su color, algunos microorganismos producen colonias pigmentadas lo que ayuda en el proceso de identificación sin embargo en una misma especie puede haber colonias sin pigmentar (Fenandéz, A. et al. 2010).

Tabla 1. Descripción morfológica de las colonias bacterianas de acuerdo a la forma, elevación y margen.

Forma	 Circular	 Irregular	 Lentejuela	 Filamentosa	 Rizoide
Elevación	 Plana	 Convexa	 Umbonada		
Margen	 Entero	 Ondulado	 Lobado	 Filamentoso	 Rizado

Fuente: (Garzón, 2013).

Tabla 2. Características de los diferentes tipos de morfología de las cadenas de esporas.

Símbolo	Tipo	Descripción
S	Espiral	Cadenas de esporas formando espirales abiertas o cerradas en el micelio aéreo.
R	Rectas	Cadenas de esporas rectas, cortas o largas.
RA	Incompletas	Cadenas de esporas en forma de ganchos, espiral incompleta u ondulada.
M	Esporas simples	Esporas individuales aparecen en las hifas del micelio aéreo.

Fuente: (Aguilar, 2015).

Pruebas fisiológicas

- Temperatura

Se clasifican en función a la temperatura para su crecimiento (Fenandéz, A. 2010). La mayoría de estos microorganismos aislados son mesófilos, y es probable que dicha característica esté relacionada con la temperatura del ecosistema (Aguilar, 2015).

Tabla 3. Clasificación de las cepas bacterianas según el rango de crecimiento en función de la temperatura de incubación.

Temperaturas de incubación °C				Clasificación
4	26	37	50	
+	+	+	+	Mesófilo extremo
+	+	+	-	Mesófilo
+	+	-	-	Psicrótrofo
+	-	-	-	Psicrófilo

Fuente: (Garzón, 2013).

- pH

(González, A. et al. 2015), indican que en presencia de nitrógeno combinado el pH para crecer es de 4.8 a 8.5, mientras que el pH óptimo para crecer cuando fijan nitrógeno es de 7 – 7.5.

Tabla 4. Clasificación de las cepas bacterianas según el rango de crecimiento en función del pH del medio selectivo donde se aisló.

pH del medio					Clasificación
4.5	5.5	6.5	7.5	8.5	
+	+	+	-	-	Acidófilo
-	+	+	+	-	Neutrotolerante
-	-	+	+	-	Neutrófilo
-	+	+	+	+	Alcalitolerante
-	-	-	+	+	Alcalófilo

Fuente: (Garzón, 2013).

- Salinidad

(Aguilar, 2015), inoculó 3 µl de las suspensiones bacterianas en la superficie de cajas petri con el medio de cultivo en el que presentaron los mejores resultados de crecimiento al que se añadió 1, 5, 10, 15 y 30% de NaCl.

Tabla 5. Clasificación de las cepas bacterianas según el rango de crecimiento en función a la concentración de NaCl del medio de cultivo.

NaCl (%)			Clasificación
1	5	10	
+	-	-	Halófilo débil
+	+	-	Halófilo
+	+	+	Halófilo extremo

Fuente: (Garzón, 2013).

Pruebas bioquímicas

- Tinción de gram

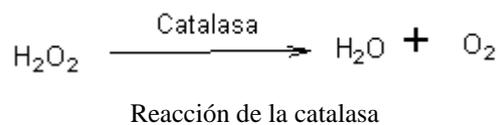
En 1884 el científico danés Hans Christian Gram desarrolló esta técnica la cual es considerada básica para la valoración de muestras microbiológicas, es una tinción diferencial, debido a que usa dos colorantes y gracias a estos clasifica a las bacterias en gram positivas y gram negativas (López et al., 2014).

- Reacción del KOH 3%

En la reacción de la tinción de gram puede este variar por la descoloración mal controlada, obteniendo así resultados engañosos. La reacción del KOH 3% es una alternativa para poder determinar el gram de las bacterias, consiste en usar una solución acuosa de hidróxido de potasio al 3% (Loredo, J. 2008).

- Catalasa

La mayoría de bacterias aerobias y anaerobias facultativas producen una enzima llamada catalasa que degrada el peróxido de hidrógeno obteniendo agua y oxígeno gaseoso el cual es liberado en burbujas (Fenandéz, A. et al. 2010).



- Ureasa

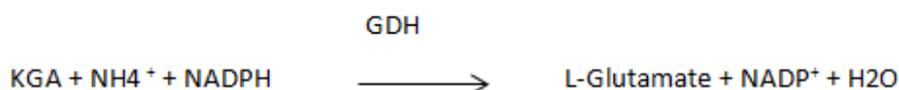
Esta prueba nos ayuda a comprobar la capacidad que tiene un microorganismo en descomponer la urea formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa (Fenandéz, A; et al. 2010).

Nitro fijación

Los microorganismos asociados o de vida libre se favorecen de la FBN al usar el nitrógeno atmosférico como fuente de elemento, e incorporarlo en compuestos esenciales para el desarrollo y crecimiento (Mayz, J. 2004).

Kit Assay amonio

Sirve para la determinación cuantitativa y enzimática del amoniaco en muestras biológicas, ya que el amoniaco reacciona con el ácido α -cetoglutárico (KGA) y reduce el dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina (NADPH) en presencia de la enzima L-glutamato deshidrogenasa (GDH) para formar L-glutamato y oxidinamida adenina nucleótido fosfato (NADP +) (Aldrich, S. 2015).



Screening biológico

El screening es un método para identificar o evaluar la eficiencia de las cepas en plántulas a través de los principales indicadores de crecimiento de la etapa inicial en semillero (Dibut, B. et al., 1990). Se realizó en semillas de dos cultivos hortícolas los cuales son:

- **Tomate** (*Lycopersicon esculentum Mill*)

El tomate es una planta herbácea anual, bianual, de origen centro y sudamericano. Actualmente es cosmopolita, su crecimiento es limitado en variedades determinadas e ilimitadas en las indeterminadas (Guevara, F & Estrella, N. 2008) (Allende, M. et al. 2017).

Tabla 6. Clasificación taxonómica del tomate

Dominio	Eucariota
Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Solanales (Personatae)
Familia	Solanaceae
Subfamilia	Solanoideae
Tribu	Solaneae
Género	<i>Lycopersicon</i>
Especie	<i>L. esculentum</i>
Descriptor	Miller (1788)

Fuente: (Guevara, F & Estrella, 2008).

El aumento de la productividad es importante para la rentabilidad del cultivo pero ésta se ve afectada por factores limitantes como la baja fertilidad del suelo, siendo necesaria la aplicación de nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K), para asegurar el rendimiento adecuado (Allende, M. et al. 2017).

Germinación: requieren entre 6 a 8 días en promedio para la germinación, también se toma en cuenta: la calidad de la semilla, la temperatura, humedad adecuada y la variedad (FAO, 2013).

Días para el trasplante y número de hojas: para el trasplante las plántulas deben tener de 30 a 35 días de edad, dependiendo la temperatura y la iluminación, con una altura de 10 a 12 cm, deberán permanecer en el semillero hasta que hayan desarrollado 2 ó 3 pares de hojas verdaderas, esté cultivo necesita un requerimiento de nitrógeno de 379Kg/ha N (FAO, 2013), (Pérez, J. et al.,2001).

- **Lechuga** (*Lactuca sativa* L.)

La lechuga es una planta herbácea anual, dicotiledónea, autógena, perteneciente a la familia Compositae, de acuerdo con la variedad puede ser cultivada todo el año, por ser un cultivo de ciclo corto, cuando la planta es joven contiene látex que disminuye con la edad de la planta (Jaramillo, J. et al., 2016).

Tabla 7. Clasificación taxonómica de la lechuga

División	Espermatofita
Clase	Angiosperma
Subclase	Dicotiledónea
Familia	Compositae (Asteraceae)
Tribu	Cichorieae
Género	Lactuca
Especie	Sativa
Nombre científico	<i>Lactuca sativa</i> L.

Fuente: (Jaramillo, J. et al. 2016)

Días de la germinación: la nascencia se producirá a los 2 días. A medida que los días son más fríos la nascencia se retrasa hasta 8 días. La germinación de semillas ocurre en un rango óptimo de 18 a 21°C, temperaturas sobre 26°C pueden inhibirla. La humedad relativa para la lechuga es de 60 al 80% (Saavedra, G. et al., 2017)

Días para el trasplante y número de hojas: después los 28 a 30 días de germinación, se trasplanta con 3 a 5 hojas verdaderas o bien con una altura de 5 a 7 cm, este cultivo necesita un requerimiento de N de 80 a 100 Kg/ha (Saavedra, G. et al., 2017).

2.2.3. Unidad de análisis

Las muestras estudiadas fueron aisladas de suelos rizosféricos y raíces en los cultivos de amaranto (*amaranthus claudatus L.*), mora (*Rubus glaucus*), zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza Bancr*) y mashua (*Tropaeolum tuberosum*).

- Suelo rizosférico

La rizósfera es la parte del suelo contigua a las raíces de la planta, en multitud de microorganismos que usan los exudados de la planta como fuente de energía y nutrientes. Provee un complejo y dinámico microambiente en la cual bacterias y hongos en asociación con las raíces de las plantas forman comunidades de biocontrol de patógenos o como fitoestimulantes (Martín, M; & Rivilla, R. 2014).

- Raíz

Se origina a partir de la radícula del embrión, absorbe nutrientes disueltos, y agua, algunas raíces almacenan sustancias de reserva, sintetizan sustancias orgánicas como alcaloides, citoquininas entre otras, fija la planta al sustrato (Ramírez, B; & Acosta, G. 2004).

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

Cepas de bacterias fijadoras de nitrógeno sobreviven en la raíz y la rizósfera de cultivos andinos en los predios de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. OBJETIVO GENERAL

Obtener cepas bacterianas nitro fijadoras y estimuladoras del crecimiento vegetal para contribuir con el establecimiento del banco de germoplasma con potencial en la producción de biofertilizantes.

3.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar y caracterizar cepas de suelo rizosférico y raíces.
- Evaluar y seleccionar cepas bacterianas con posible poder nitro fijador.
- Probar la eficiencia agronómica de las cepas seleccionadas en condiciones de semillero.

CAPÍTULO VI

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO

La investigación se realizó en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, ubicada en el cantón Cevallos, Provincia de Tungurahua, utilizando los laboratorios de investigación de microbiología vegetal, el laboratorio de investigación de la Facultad de Ingeniería en Alimentos, ubicado en el campus Huachi y el laboratorio Plantsphere laboratories, ubicado en la ciudad de Quito.

4.2. CARACTERIZACIÓN DEL LUGAR

Para la realización del screening biológico de las cepas estudiadas se utilizó el área de aclimatación del laboratorio de biotecnología, ubicado en la facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato en el sector el Tambo, perteneciente al Cantón Cevallos, provincia de Tungurahua. Se halla localizado a 2850 msnm, las coordenadas geográficas son: 01° 24' 27" de latitud Sur y 78° 35' 00" de longitud al Oeste, ubicado a 19,31 km, al Sureste de Ambato.

4.2.1. CLIMA

La temperatura y humedad promedio durante el ensayo en el área de aclimatación fueron:

TEMPERATURA:

Mañana: 20,4°C, 7:30 am

Tarde: 22,7°C, 15:30 pm

HUMEDAD:

Mañana: 55%, 7:30 am

Tarde: 52%, 15:30 am

4.3. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

4.3.1. EQUIPOS

- Balanza
- pH-metro
- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Incubadora
- Refrigeradora
- Agitador
- Microscopio
- Espectofotómetro
- Higrotermómetro

4.3.2. MATERIALES

- Pala jardinera
- Fundas siplox
- Placas petri
- Espátula
- Asa de siembra
- Erlenmeyer
- Gradillas
- Tubos de ensayo
- Frascos tapa rosca azul de 250 y 500 ml
- Pipeta de 10 ml
- Perilla de succión
- Micropipetas de 1000 μ l, 200 μ l, 20 μ l y puntas de 400 μ l y 1ml
- Pipeta multicanal
- Placa de 96 pocillos
- Piseta
- Guantes de nitrilo

- Mascarilla
- Parafilm
- Papel aluminio
- Papel craft
- Porta y cubre objetos
- Mechero de alcohol y bunsen
- Eppendorf de 1.5 ml
- Regla graduada
- Bandejas germinadoras
- Turba
- Semillas de tomate, lechuga y tabaco

4.3.3. REACTIVOS

- Manitol 20g/l
- Fosfato de potasio 0,200g/l
- Sulfato de magnesio 0,200g/l
- Cloruro de sodio 0,200g/l
- Sulfato de potasio 0,100g/l
- Carbonato de calcio 5g/l
- Agar microbiológico 15g/l
- KOH 3%
- Urea agar base
- Peróxido de hidrógeno
- Agua peptonada 15g/l
- Cristal violeta
- Lugol
- Alcohol-cetona
- Safranina
- Glicerol
- Kit Assay de amonio

4.4. FACTORES EN ESTUDIO 1 (PARTE 1)

En el trabajo de investigación los factores en estudio fueron las cepas aisladas de las raíces y de la zona rizosférica, en los cuatro cultivos andinos.

4.4.1. Cepas bacterianas aisladas de los cultivos:

- C1: amaranto (*amaranthus claudatus L.*)
- C2: mora (*Rubus glaucus*)
- C3: zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza Bancr*)
- C4: mashua (*Tropaeolum tuberosum*)

4.4.2. Zonas donde se extrajeron las muestras:

- P1: Raíces
- P2: Suelo rizosférico

Descripción de la tabla 8: las muestras se denominan como: C1 (cultivo de amaranto), C2 (cultivo de mora), C3 (cultivo de zanahoria blanca), C4 (cultivo de mashua), las zonas aisladas se denotan con P1 (raíz) y P2 (suelo rizosférico).

Tabla 8. Descripción de los cuatro cultivos muestreados para la extracción de las cepas.

Nº	SIGLAS	DESCRIPCIÓN
1	C1P1	cultivo de amaranto aislada de la raíz
2	C1P2	cultivo de amaranto aislada del suelo rizosférico
3	C2P1	cultivo de mora aislada de la raíz
4	C2P2	cultivo de mora aislada del suelo rizosférico
5	C3P1	cultivo de zanahoria blanca aislada de la raíz
6	C3P2	cultivo de zanahoria blanca aislada del suelo rizosférico
7	C4P1	cultivos de mashua aislada de la raíz
8	C4P2	cultivo de mashua aislada del suelo rizosférico

Elaborado: Pilatuña, 2018.

4.5. MANEJO DEL EXPERIMENTO

- **Muestras de suelos (PARTE 1)**

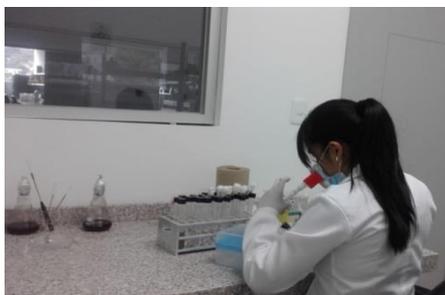
Se ejecutaron en áreas donde anteriormente no hubo aplicaciones de estos microorganismos. Se realizaron cuatro muestreos, uno por cada cultivo seleccionado, en las raíces y la zona rizosférica. La toma de muestras se hizo a una profundidad de 10 a 20 cm y las muestras se colocaron en fundas siplox, llevándolas al laboratorio para realizar el aislamiento.

- **Aislamiento de microorganismos**

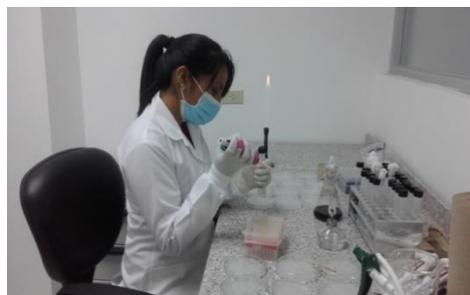
En un Erlenmeyer de 100 ml se diluyeron 10g de suelo rizosférico en 90 ml de agua destilada estéril, se agitaron de 1-3 minutos y se dejó reposar el mismo tiempo.

Se maceraron 10g de raíz en un mortero, la muestra se diluyó en 90ml de agua destilada estéril, se agitó 1 - 3 minutos y se dejó reposar el mismo tiempo.

Se realizaron las diluciones seriadas de 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} y 10^{-7} , en 8 tubos de ensayo con tapa de rosca rotulados, donde se añadieron 9ml de agua destilada estéril. Se realizaron las siembras por goteo con la ayuda de la asa Drigalsky en placas de petri utilizando al medio selectivo Ashby manitol (Himedia L. 2015). Las cuales se incubaron a 29°C por 5 días, con un pH de 7. Finalmente se realizaron varias purificaciones hasta obtener el cultivo puro.



A)



B)

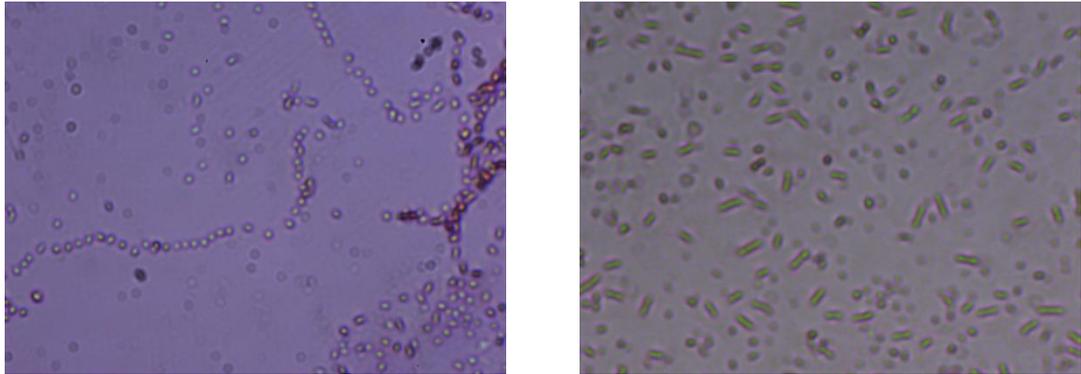
Figura 1. A) Realización de diluciones en tubos con 9ml de agua destilada estéril. B) Realización de siembra por goteo en el medio selectivo Ashby-Manitol

Elaborado: Pilatuña, 2018.

- **Pruebas morfológica y fisiológica de las cepas**

- **Caracterización morfológica**

Se determinó la morfología celular de las cepas bacterianas por tinción de gram. Para cada tinción se prepararon frotis de los cultivos, de 24 horas de crecimiento.



A)

B)

Figura 2. **A)** cadena de cocos de la cepa ZUTA AS1.1 aislada del cultivo de zanahoria blanca, extraído del suelo rizosférico. **B)** bacilos de la cepa MUTA AR3, aislada del cultivo de mora, extraído de la raíz.

Elaborado: Pilatuña, 2018.

- **Caracterización fisiológica**

- **Rango de crecimiento en función a la temperatura**

La temperatura de incubación de las cepas aisladas fue de 28,5°C - 29,5°C, ya que es propio de los diazotrofos que se desarrollan entre 26 a 28°C (Aguilar, B. 2015).

- **Rango de crecimiento en función al pH**

El crecimiento en función al pH del medio selectivo fue ajustado a 7 ya que estas en pH ácidos no se desarrollan (Aguilar, B. 2015).

- **Rango de crecimiento en función a la salinidad**

Se aplicaron tres concentraciones diferentes de cloruro de sodio al 5, 10 y 15% en el medio selectivo de las cepas en cajas petri. Donde equivale 16,6 g al 5%, 33,3 g al 10% y 49,9 g al 15%. Las cepas fueron inoculadas en el medio e incubadas por 10 días, para su evaluación (Aguilar, B. 2015).

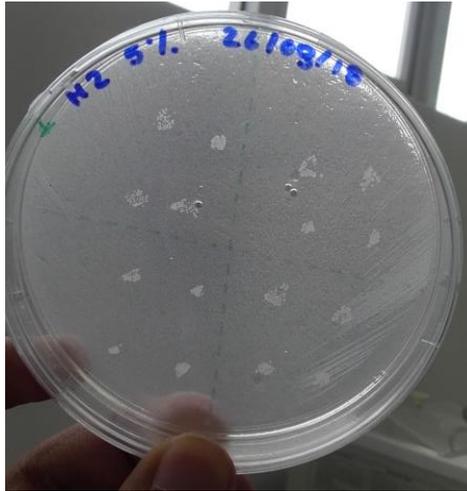


Figura 3. Cepa MUTA AR2, aislada del cultivo de mora, extraída de la raíz, en el medio selectivo con el 5% de concentración de cloruro de sodio.

Elaborado: Pilatuña, 2018.

- **Pruebas bioquímicas**
 - **Caracterización bioquímica**
- **Tinción gram**

Se realizaron las tinciones en placas portaobjetos para el reconocimiento de las bacterias gram negativas y gram positiva, las muestras fueron llevadas al microscopio y observadas con los lentes de 10X y S40X (López et al., 2014).



A)



B)



C)



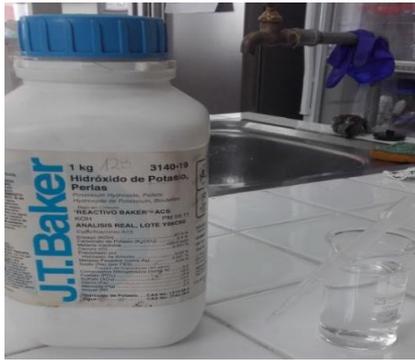
D)

Figura 4. A) aplicación del cristal violeta por un minuto. B) fijación del cristal violeta con lugol por 30 segundos. C) eliminación del exceso del cristal violeta con alcohol-cetona por 15 segundos. D) aplicación de safranina por 2 minutos.

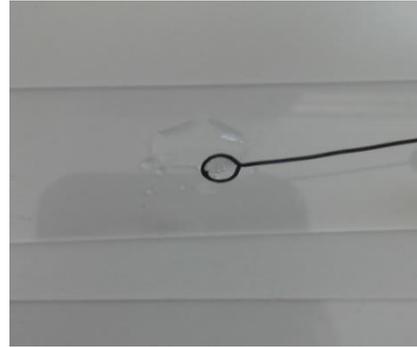
Elaborado: Pilatuña, 2018.

○ **KOH 3%**

Se empleó el hidróxido de potasio al 3% de concentración lo cual equivale 1,72 g de KOH, en 50ml de agua destilada (Loredo, J. 2008). En un portaobjetos se añadió una gota del KOH al 3%. Después se tomó una muestra de masa bacteriana y se mezcló la muestra con el hidróxido de 1 a 3 minutos con movimientos giratorios. Al finalizar el tiempo se levantó lentamente el asa para observar la reacción.



A)



B)

Figura 5. A) Solución preparada del hidróxido de potasio al 3% en 50ml. B) mezcla de la masa bacteriana con el hidróxido de 1 a 3 minutos.

Elaborado: Pilatuña, 2018.

○ **Catalasa**

Se preparó peróxido de hidrógeno al 30% en 100ml de agua destilada. Con el asa de siembra se tomó una porción de masa bacteriana de una colonia y se colocó en un portaobjetos, después se le agregó una gota de peróxido de hidrógeno (Fenandéz, A. et al. 2010).

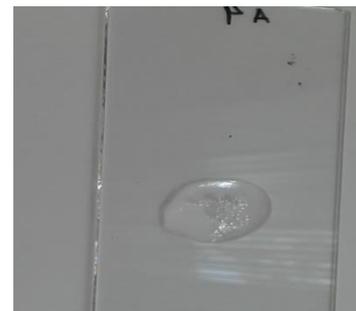
Se esperó unos segundos y se observó la reacción, al haber burbujeo intenso quiere decir que hay presencia de oxígeno, es decir hay presencia de la enzima catalasa.



A)



B)



C)

Figura 6. A) preparación y rotulación de los portaobjetos. B) reacción de la catalasa positiva en placas de cepas aisladas del cultivo de mora. C) burbujeo o reacción positiva en la muestra de una cepa de amaranto AUTA RA6.

Elaborado: Pilatuña, 2018.

○ **Ureasa**

Se suspendió 14.5g del polvo base para el agar urea en 50ml de agua destilada, se mezcló bien y se esterilizó. Luego se suspendió 7.5g de agar en 450ml de agua destilada y se llevó a esterilizar. Se dejó enfriar el agar hasta 50°C y se agregaron los 50ml de la base para el agar de urea, se mezcló y se distribuyó en tubos. Una vez distribuido el medio en los tubos se dejó enfriar en posición parcialmente inclinada. Después de 20 minutos se procedió a la inoculación de las cepas bacterianas en cada tubo. Finalmente se llevó a incubar por 46 horas a una temperatura de 35°C (Fenandéz, A; et al. 2010).

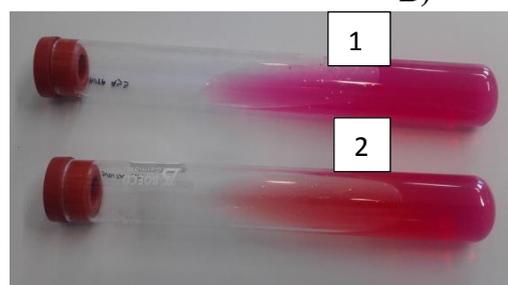
Si el medio cambia a un color rojizo, se considera positivo, es decir son microorganismos que hidrolizan la urea. Pero si el medio permanece del mismo color, es negativa, son microorganismos que no hidrolizan la urea.



A)



B)



C)

Figura 7. A) suspensión del medio en tubos. B) siembra de las cepas bacterianas en el medio ureasa. C) diferenciación de los tubos 1 y 2, donde 1 es negativa y 2 positiva.

Elaborado: Pilatuña, 2018.

- **Determinación del amonio con el kit Assay**

En un frasco de tapa azul de 500 ml se diluyó 7.5 g de peptona en agua destilada y se lo llevó a autoclavar a 121°C por una hora. Una vez estéril el agua peptonada y a temperatura ambiente se distribuyó en tubos rotulados y estériles con la ayuda de una pipeta de 10ml, donde se colocaron 5 ml en cada tubo.

Con un asa de siembra se tomó una porción de masa bacteriana y se inoculó en el tubo cerca del mechero para evitar la contaminación, flameando la boca del tubo al abrir y cerrar, dando una leve agitación con el fin de que la bacteriana se distribuya en la solución homogéneamente.

Se llevó a incubar la solución bacteriana por 18 horas. Luego esta solución en la cámara de flujo laminar se pasó a tubos eppendorfs de 1.5µl con la micropipeta de 1000µl.

Las muestras fueron llevadas a la centrifuga por 15 minutos en 10.000 revoluciones por minuto (RPM) y luego con la micropipeta de 1000µl se sacó el sobrenadante y se pasó a otro tubo eppendorf. Todos los sobrenadantes fueron llevados a congelación (-19°C).

Para la medición del amonio se utilizó la técnica de amonio Assay (Aldrich, 2015). Las muestras fueron descongeladas. Primeramente para la preparación del reactivo Amonia Assay Reagent, se colocaron 10 ml de agua destilada en el frasco del reactivo y se mezcló hasta que el reactivo se diluyó.

Se calibró el espectrofotómetro con agua destilada a 340 nm, luego se midió con el estándar el cual fue disuelto en una cubeta con 1 ml del reactivo de amonio y 50µl del estándar, se dejó reposar dos minutos y se tomó la primera lectura, seguidamente se le añadió 10µl de la enzima, se dejó reposar 5 minutos y se procedió la segunda lectura.

Para la medición del blanco en una cubeta se añadió 1 ml del reactivo de amonio y 100µl de agua destilada, se dejó reposar dos minutos y se procedió a la lectura.

En cuanto a la medición de las muestras, en una cubeta se añadió 1 ml del reactivo de amonio más 100µl de las muestras bacterianas o sobrenadantes, se dejó reposar dos minutos y se realizó la primera lectura, seguidamente se añadió 10µl de la enzima dejando reposar 5 minutos y se tomó la segunda lectura (Aldrich, 2015).

Cuvette	Ammonia Assay Reagent	Ammonia Standard Solution	Sample Volume	Water
Reagent Blank	1.0 ml			100 µl
Test	1.0 ml		100 µl	
Standard	1.0 ml	0.05 ml		

Figura 8. Tabla de mediciones del blanco, estándar y la muestra.

Fuente: (Aldrich, 2015).



A)



B)

Figura 9. A) materiales y muestra para la ejecución de la técnica. B) toma de la primera lectura en el espectrofotómetro.

Elaborado: Pilatuña, 2018

- **Conservación con glicerol (criopreservación)**

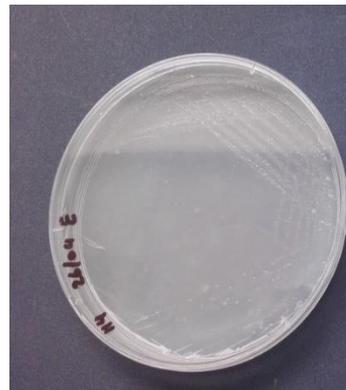
Se rotularon tubos estériles los cuales fueron colocados en una gradilla de metal.

Con una pipeta de 10ml se tomaron 5ml de agua peptona estéril al ambiente y se añadió a cada tubo, flameando o esterilizando los bordes de los tubos al abrir y cerrar para evitar posibles contaminaciones. Luego fue añadido una porción de masa bacteriana en los tubos y llevado a incubación por 18 horas y luego de este tiempo fueron llevadas al frío para evitar mayor crecimiento.

Para saber si no hay contaminación se efectuaron siembras de cada muestra en cajas de petri en forma de estrías escocesas, incubándolas por 3 días. Se rotularon los tubos eppendorfs y se enumeraron, colocándolos en la gradilla, para realizar el procedimiento de la criopreservación, donde con una micropipeta de 1000µl se aplicaron 300µl de glicerol y se añadieron a los tubos eppendorfs. Después se tomaron 700µl de solución bacteriana, los cuales fueron añadidos a los tubos eppendorfs, agitándose hasta homogenizar las mezclas. Finalmente las muestras fueron almacenadas en cajas de tubos eppendorfs y llevadas al congelador a - 20°C para su conservación (Aquilanti et al., 2004).



A)



B)

Figura 10. A) solución bacteriana de 18 horas. B) siembra en estrías

Elaborado: Pilatuña, 2018

- **Medición del crecimiento bacteriano**

Se realizaron diluciones bacterianas a una concentración de 10^{-1} en agua peptonada, incubándose a 29°C por 18, 36, 54 y 72 horas. Sabiendo que ya existe presencia de crecimiento bacteriano a las 18 horas.

El crecimiento bacteriano fue monitoreado por turbidimetría, donde se registró la absorbancia a 540 nm a las 18, 36, 54 y 72 horas en el espectrofotómetro UV visible, con el propósito de obtener la concentración de UFC/ml, en el tiempo (Martínez, M; & Montaña, J. 2009).



Figura 11. Medición de la concentración de las UFC en el espectrofotómetro.

Elaborado: Pilatuña, 2018

4.6. FACTORES EN ESTUDIO 2 (PARTE 2)

Los factores en estudio son las cepas seleccionadas de acuerdo a las pruebas realizadas (morfológicas, fisiológicas, bioquímicas), el poder nitrógeno evaluado y la medición de crecimiento, para probar la eficiencia agronómica en condiciones de semillero en plántulas de tomate y lechuga.

TRATAMIENTOS

Los tratamientos son el número de cepas seleccionadas de cada cultivo de acuerdo a la zona extraída e inoculadas en semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) híbrido Yuval-810 y lechuga (*Lactuca sativa* L.) iceberg.

Descripción de la tabla 13: la nomenclatura de las cepas fueron asignadas de acuerdo al cultivo: amaranto (A), mora (M), zanahoria blanca (Z), y mashua (SH), el lugar donde se obtuvieron las muestras se puso el nombre de la institución donde se realizó el trabajo, UTA (Universidad Técnica de Ambato), de acuerdo a las zonas donde se extrajeron las muestras se denotan como Raíz (R) y suelo rizosférico (S) en tanto al testigo se le designa T1.

Tabla 9. Tratamientos aplicados en plántulas de tomate y lechuga independientemente.

N°	TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN
1	AUTA RA2	Amaranto, Universidad Técnica de Ambato, Raíz, Ashby, número 2
2	AUTA RA6	Amaranto, Universidad Técnica de Ambato, Raíz, Ashby, número 6
3	AUTA SA4	Amaranto, Universidad Técnica de Ambato, Suelo, Ashby, número 4
4	AUTA SA5	Amaranto, Universidad Técnica de Ambato, suelo, Ashby, número 5
5	MUTA RA1	Mora, Universidad Técnica de Ambato, Raíz, Ashby, número 1
6	MUTA RA2	Mora, Universidad Técnica de Ambato, Raíz, Ashby, número 2
7	MUTA RA4	Mora, Universidad Técnica de Ambato, Raíz, Ashby, número 4
8	MUTA RA5	Mora, Universidad Técnica de Ambato, Raíz, Ashby, número 5
9	MUTA SA6	Mora, Universidad Técnica de Ambato, Suelo, Ashby, número 2
10	ZUTA SA1	Zanahoria, Universidad Técnica de Ambato, Suelo, Ashby, número 1
11	ZUTA SA1.1	Zanahoria, Universidad Técnica de Ambato, Suelo, Ashby, número 1.1
12	SHUTA RA2	Mashua, Universidad Técnica de Ambato, Raíz, Ashby, número 2
13	SHUTA SA1	Mashua, Universidad Técnica de Ambato, Suelo, Ashby, número 1
14	SHUTA SA3	Mashua, Universidad Técnica de Ambato, Suelo, Ashby, número 3
15	SHUTA SA4	Mashua, Universidad Técnica de Ambato, Suelo, Ashby, número 4
16	T1	Testigo en plántulas sin inoculación de cepas

Elaborado: Pilatuña, 2018.

4.7. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un diseño experimental en bloques completamente al azar con cuatro repeticiones para cada cultivo; además se realizó una prueba de Tukey al 5% para analizar diferencias significativas.

- **Prueba de hipersensibilidad**

Se emplearon plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), en las nervaduras de las hojas se inocularon 100µl de solución bacteriana, con una jeringa de 29 pulgadas, donde se mantuvieron desde las 24 horas hasta 5 días para observar la reacción de hipersensibilidad (Ríos, J. 2008), (Pérez E at al., 2004).



A)



B)



C)

Figura 12. A) plantas rotuladas listas para la inoculación. B) inoculación bacteriana en la nervadura de la hoja de tabaco. C) hoja inoculada.

Elaborado: Pilatuña, 2018.

- **Screening biológico**

Preparación de la suspensión bacteriana

En 15 tubos de ensayos fueron distribuidos 20ml de agua peptonada estéril a temperatura ambiente. Los tubos fueron rotulados y se inocularon las cepas bacterianas, incubándose las mismas por 36 horas.



Figura 13. Solución bacteriana lista para la inoculación.

Elaborado: Pilatuña, 2018.

Preparación del sustrato y desinfección de las bandejas

En fundas térmicas siplox de aluminio se agregó el sustrato para su esterilización. La esterilización del sustrato se llevó a cabo en una autoclave durante una hora a 120°C, esterilizando tres veces por tindalización durante tres días consecutivos.

Se utilizaron bandejas de 162 alveolos para las semillas de tomate y bandejas de 312 alveolos para las semillas de lechuga. Las bandejas para su desinfección fueron llevadas al UV en una cámara de flujo laminar por 10 minutos.

Siembra e inoculación de las cepas bacterianas

Se colocó el sustrato (turba) en los alveolos de las bandejas, para el caso de las semillas de tomate cada bandeja fue un tratamiento, mientras que para las semillas de la lechuga una bandeja llevo dos tratamientos.

La siembra fue manual se dio un leve remojo al sustrato antes de colocar la semilla para que este tuviera humedad. En las bandejas de 162 alveolos se colocó una semilla de tomate hibrido yuval-810 en cada alveolo, distribuido en 25 celdas por cada repetición, se hizo lo mismo en las bandejas de 312 alveolos pero con semillas de lechuga Iceberg.

Las semillas de tomate se colocaron a la profundidad de 1 cm, mientras que las semillas de lechuga se sembraron a una profundidad de 0,5 cm y se rotularon los tratamientos y repeticiones.

Finalmente para la inoculación se aplicó 100 μ L de solución bacteriana en cada semilla, se cubrió con el sustrato y se dio un segundo riego para que se mantenga la humedad en el mismo.

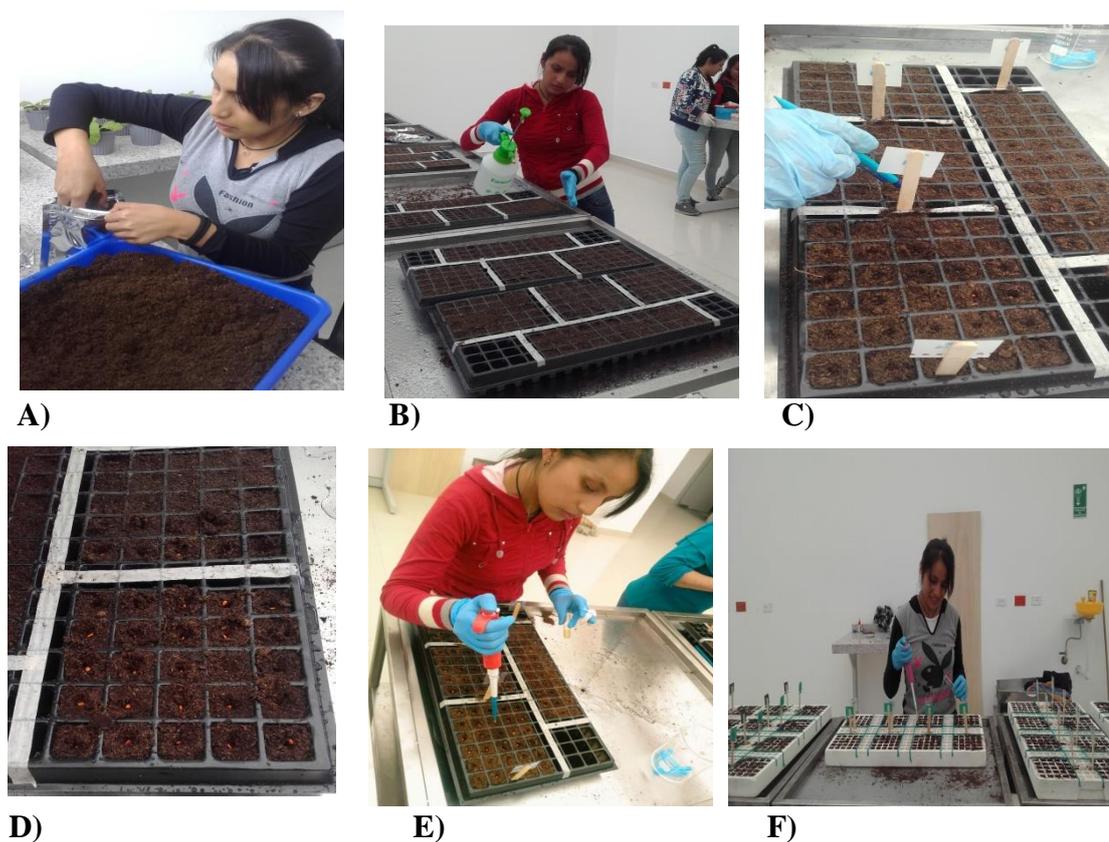


Figura 14. A) colocación del sustrato en fundas térmicas para la esterilización. B) remojo del sustrato antes de poner las semillas. C) rotulación de cada repetición y tratamiento. D) colocación de las semillas en los alvéolos. E) inoculación bacteriana en semillas de tomate. F) inoculación bacteriana en semillas de lechuga.

Elaborado: Pilatuña, 2018.

4.8.VARIABLE RESPUESTA (indicadores agronómicos)

Para determinar la eficiencia de las cepas seleccionadas en plántulas de tomate híbrido yuval-810 y lechuga iceberg se evaluaron los indicadores agronómicos en la fase de semillero, en un periodo de 35 días después de la siembra.

Días de la germinación

Los días de la germinación se determinaron hasta cuando presento un 50% de germinación, donde se realizó un conteo de plántulas de acuerdo con los días después de la siembra, el cual fue llevado a un análisis estadístico (INFOSTAT).

Altura de la planta (cm)

En cada repetición de los tratamientos se midió la altura de la planta cada 8 días, con una regla graduada desde la base del tallo hasta el ápice, con la finalidad de analizar la eficiencia de cada tratamiento.

Número de hojas

Para determinar el tiempo de trasplante de las plántulas se hizo el conteo de hojas después de la germinación hasta que tuvieron de 3 a 4 hojas verdaderas en tomate y de 3 a 5 hojas verdaderas en lechuga.

4.9.PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN

Se realizó un muestreo sistemático, la información obtenida se procesó en el programa estadístico INFOSTAT, en el cual se efectuaron Análisis de Varianza (ADEVA) y pruebas de comparación de medias de Tukey $<0,05$.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PARTE 1

- **Aislamiento de las cepas bacterianas**

Se aislaron 26 cepas en los cuatro cultivos evaluados. De acuerdo a las zonas aisladas un 42.3 % de cepas se obtuvieron de la raíz y un 57.7 % de cepas del suelo rizosférico. Del cultivo de amaranto se obtuvieron 8 cepas, de las cuales 4 pertenecen a la zona aislada de la raíz y 4 a la zona rizosférica, del cultivo de mora 6 cepas, 5 pertenecen a la zona aislada de la raíz y 1 a la zona rizosférica, mientras que en el cultivo de zanahoria se obtuvieron 5 cepas, siendo todas aisladas de la zona rizosférica y no teniendo crecimiento de la zona de la raíz, por otro lado en el cultivo de mashua se aislaron 7 cepas, 2 pertenecen a la zona aislada de la raíz y 5 al suelo rizosférico. Tablas: 10, 11, 12, 13.

Los aislamientos de los cuatro cultivos se obtuvieron mayormente en concentraciones desde 10^{-1} , 10^{-3} y 10^{-5} , no obteniéndose presencia de crecimiento bacteriano a concentraciones de 10^{-7} , los mismos que fueron desarrollados en el medio selectivo Ashby manitol. Tablas: 10, 11, 12, 13. Se incubaron en un periodo de 5 a 7 días y a una temperatura de 29°C, donde se obtuvieron cepas bacterianas con pigmentación, además algunas colonias bacterianas presentaban halos transparentes en el medio. De acuerdo con (Borda, D; Pardo, J; Martínez, M. 2009), en agar Ashby obtuvieron aislamientos a partir de gránulos de suelo, incubaron de 3 a 8 días a 32°C, obteniéndose colonias mucoides con pigmentación, que es una característica de *Azotobacter chroococcum* y *Azotobacter nigricans*, pero también observaron la presencia de halos en el medio Ashby como consecuencia de la solubilización del carbonato de calcio.

Tabla 10. Clasificación de las cepas aisladas del cultivo de amaranto.

CEPAS AISLADAS DEL CULTIVO DE AMARANTO EN MEDIO SELECTIVO ASHBY MANITOL				
N°	MEDIO ASHBY	ZONA AISLADA	NOMENCLATURA	CONCENTRACIÓN
1	A	Raíz	AUTA - AR1	10^{-1}
2	A	Raíz	AUTA - AR2	10^{-3}
3	A	Raíz	AUTA - AR3	10^{-3}
4	A	Raíz	AUTA - AR6	10^{-3}
5	A	Suelo	AUTA - AS1	10^{-5}
6	A	Suelo	AUTA - AS4	10^{-5}
7	A	Suelo	AUTA - AS5	10^{-5}
8	A	Suelo	AUTA - AS6	10^{-5}
DESCRIPCIÓN DE LA NOMENCLATURA				
AUTA - AR1 = Amaranto Universidad Técnica de Ambato - Ashby Raíz (número)				
AUTA - AS1 = Amaranto Universidad Técnica de Ambato - Ashby Suelo (número)				

Elaborado: Pilatuña, 2018.

Tabla 11. Clasificación de las cepas aisladas del cultivo de mora.

CEPAS AISLADAS DEL CULTIVO DE MORA EN MEDIO SELECTIVO ASHBY MANITOL				
N°	MEDIO ASHBY	ZONA AISLADA	NOMENCLATURA	CONCENTRACIÓN
1	A	Raíz	MUTA - AR1	10^{-3}
2	A	Raíz	MUTA - AR2	10^{-3}
3	A	Raíz	MUTA - AR3	10^{-3}
4	A	Raíz	MUTA - AR4	10^{-1}
5	A	Raíz	MUTA - AR5	10^{-1}
6	A	Suelo	MUTA - AS6	10^{-1}
DESCRIPCIÓN DE LA NOMENCLATURA				
MUTA - AR1 = Mora Universidad Técnica de Ambato - Ashby Raíz (número)				
MUTA - AS1 = Mora Universidad Técnica de Ambato - Ashby Suelo (número)				

Elaborado: Pilatuña, 2018.

Tabla 12. Clasificación de las cepas aisladas del cultivo de zanahoria.

CEPAS AISLADAS DEL CULTIVO DE ZANAHORIA EN MEDIO SELECTIVO ASHBY MANITOL				
N°	MEDIO ASHBY	ZONA AISLADA	NOMENCLATURA	CONCENTRACIÓN
1	A	Suelo	ZUTA - AS1	10^{-3}
2	A	Suelo	ZUTA - AS1.1	10^{-3}
3	A	Suelo	ZUTA - AS2	10^{-3}
4	A	Suelo	ZUTA - AS3	10^{-3}
5	A	Suelo	ZUTA - AS4	10^{-5}
DESCRIPCIÓN DE LA NOMENCLATURA				
ZUTA - AS1 = Zanahoria Universidad Técnica de Ambato - Ashby Suelo (número)				

*No hubo crecimiento bacteriano de la zona de la raíz del cultivo de zanahoria.

Elaborado: Pilatuña, 2018.

Tabla 13. Clasificación de las cepas aisladas del cultivo de mashua.

CEPAS AISLADAS DEL CULTIVO DE MASHUA EN MEDIO SELECTIVO ASHBY MANITOL				
N°	MEDIO ASHBY	ZONA AISLADA	NOMENCLATURA	CONCENTRACIÓN
1	A	Raíz	SHUTA - AR1	10^{-3}
2	A	Raíz	SHUTA - AR2	10^{-3}
3	A	Suelo	SHUTA - AS1	10^{-3}
4	A	Suelo	SHUTA - AS2	10^{-3}
5	A	Suelo	SHUTA - AS3	10^{-3}
6	A	Suelo	SHUTA - AS4	10^{-1}
7	A	Suelo	SHUTA - AS5	10^{-1}
DESCRIPCIÓN DE LA NOMENCLATURA				
SHUTA - AR1 = Mashua Universidad Técnica de Ambato - Ashby Raíz (número)				
SHUTA - AS1 = Mashua Universidad Técnica de Ambato - Ashby Suelo (número)				

Elaborado: Pilatuña, 2018.

- **Pruebas morfológicas y fisiológicas**

Caracterización morfológica:

En la morfología de forma general en los cuatro cultivos se obtuvieron formas de colonias irregulares y filamentosas, de las cuales AUTA AS1, MUTA AR1, MUTA AR2 Y SHUTA AR2 son colonias filamentosas, en la elevación de las colonias todas fueron planas, de acuerdo al margen de la colonia hubieron 6 colonias con margen filamentosos, 12 con margen lobado y 8 con margen ondulado. Por otro lado tenemos la forma celular de las cuales hay bacilos, diplobacilos y cocos, predominando 20

cepas bacterianas con forma celular de cocos, 3 cepas bacterianas AUTA AR1, AUTA AR3 y SHUTA AS2 en forma de bacilos, dos cepas bacterianas AUTA AR2 Y MUTA AR1 en forma de diplobacilos y 1 cepa bacteriana MUTA AS6 conformada por cocos y bacilos. Anexo 1, 2, 3, y 4. Los tipos de morfología de las cadenas de esporas están conformados por simples, incompletas, individuales, rectas y espirales, de las cuales 11 cepas forman cadenas simples, 9 forman cadenas incompletas, 1 forma cadenas individuales, 3 forman cadenas rectas y 2 forman cadenas espirales. Anexo 1, 2, 3 y 4.

En cuanto a la coloración de las colonias hubo 6 colonias de color blanco, 19 colonias de color crema y 1 colonia de color blanco mucoso. De acuerdo a la pigmentación producida fueron de color amarillo, amarillo claro, crema, crema claro, gris y amarillo oscuro. Anexo 1, 2, 3 y 4. (Borda, D; Pardo, J; Martínez, M. 2009), realizaron un aislamiento de *Azotobacter nigricans* obtenido de un cultivo de *Stevia rebaudiana* Bert, donde las características macro y microscópicas fueron similares para *Azotobacter chroococcum*, *A vinelandii* y *A nigricans* como colonias irregulares, pigmentación, forma bacilar corta y formación de quistes.

Caracterización fisiológica:

Las cepas bacterianas evaluadas de forma general se clasifican como mesófilos ya que todas tuvieron un óptimo crecimiento a una temperatura de 29°C. Anexo 5, 6, 7 y 8. En función al pH las cepas se clasifican como neutrófilos, debido a que todas estas crecieron en el medio selectivo en un pH de 7,5. Anexo 5, 6, 7 y 8. De acuerdo al crecimiento en la concentración de cloruro de sodio del medio, se clasifican como halófilo débil, halófilo y halófilo extremo, de las cuales la cepa SHUTA AR2 se clasifica como halófilo débil debido a que solo creció en una concentración del 5% de NaCl, mientras que las cepas AUTA AR1 Y AUTA AS1 se clasifican como halófilos ya que su crecimiento se dio al 5% y 10% de concentración de NaCl, predominando así 23 cepas como halófilo extremo, creciendo todas ellas en concentraciones de 5%, 10% y 15% de NaCl. Anexo 5, 6, 7, y 8. (Aguilar, M. 2015), Aisló microorganismos cuya caracterización macro y microscópica de las cepas que más se acoplaron a las características fenotípicas propias de los microorganismos diazotrofos obtuvo en su mayoría como bacilos Gram negativos y con alta resistencia osmótica de sales.

- **Pruebas bioquímicas**

Tinción gram:

Según las pruebas realizadas por tinción de gram se clasifican 14 cepas como gram negativas y 12 como gram positivas, de las cuales dentro de las gram negativas se obtuvieron 5 cepas aisladas del cultivo de amaranto (AUTA AR2, AUTA AR3, AUTA AS1, AUTA AS4 Y AUTA AS5), 5 aisladas del cultivo de mora (MUTA AR1, MUTA AR2, MUTA AR4, MUTA AR5 Y MUTA AS6), 2 aisladas del cultivo de zanahoria (ZUTA AS1 Y ZUTA AS1.1) y 3 aisladas del cultivo de mashua (SHUTA AR2, SHUTA AS3 Y SHUTA AS4). Anexo 9 y 10.

KOH 3%:

De acuerdo a las pruebas realizadas con hidróxido de potasio al 3% de concentración para la determinación de gram positivas y gram negativas, se obtuvieron 9 cepas como gram negativas y 17 cepas como gram positivas, dentro de las gram negativas se obtuvieron 3 cepas del cultivo de amaranto (AUTA AR2, AUTA AR3 Y AUTA AS5), 3 del cultivo de mora (MUTA AR4, MUTA AR5 Y MUTA AS6) y 3 del cultivo de mashua (SHUTA AR2, SHUTA AS3 Y SHUTA AS4). Anexo 9 y 10.

En comparación las cepas que coinciden con tinción gram y KOH son 9 dentro de ellas están AUTA AR2, AUTA AR3, AUTA AS5, MUTA AR4, MUTA AR5, MUTA AS6, SHUTA AR2, SHUTA AS3 Y SHUTA AS4. según (López et al., 2014), Hay bacterias de un mismo género que pueden observarse en la misma muestra como Gram positivas y como Gram negativas, a este evento se le llama tinción Gram variable secundaria, debido a alteraciones en nutrientes, temperatura, pH o concentración de electrolitos.

Catalasa:

En función a la reacción de la catalasa 23 cepas bacterianas tuvieron una reacción positiva, mientras que 3 cepas ZUTA AS3, SHUTA AS2 y SHUTA AS5 reaccionaron como negativas, es decir no poseen la enzima catalasa que degrada el peróxido de hidrógeno. (Fenandéz, A. et al, 2010) confirma que la acumulación del

peróxido es muy tóxico por lo cual la gran mayoría de bacterias aerobias y anaerobias producen una enzima llamada catalasa que hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso liberando en formas de burbujas. Anexo 9 y 10.

Ureasa:

Según la capacidad de producir urea, de las 26 cepas aisladas 21 reaccionaron como positivas y 5 de las cuales AUTA AR3, AUTA AS1, AUTA AS6, ZUTA AS3 Y SHUTA AS5 como negativas, es decir no poseen la enzima ureasa por la cual la reacción fue negativa. De acuerdo a (Laboratorios Britania, 2010), este medio es usado para realizar identificaciones de microorganismos en base a la acción ureasa, conformado por extracto de levadura siendo la única fuente de carbono, nitrógeno y vitaminas. Anexo 9 y 10.

De acuerdo a la tabla 14, en función del crecimiento en el medio selectivo Ashby manitol y de los resultados obtenidos de las pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas las cepas AUTA AR2, AUTA AS5, MUTA AR4, MUTA AR5, MUTA AS6, SHUTA AR2, SHUTA AS3 Y SHUTA AS4 se asemejan al género *Azotobacter*.

Tabla 14. Caracterización del género *Azotobacter* según el manual bacteriológico de Bergey's.

PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO AZOTOBACTER
Son pleomórficos que van desde bastones hasta células cocoides
Están solas, en pareja o grupos irregulares y a veces en cadenas
Las células se tiñen gram negativas
Son quimioorganotróficas usando azúcares, alcoholes y sales de ácidos orgánicos para crecer
Fijan nitrógeno
la catalasa es positiva
el pH óptimo para crecer es de 4,5 - 8,5 para fijar nitrógeno es de 7 - 7.5
reaccionan al manitol <i>A. armeniacus</i> , <i>A. chroococcum</i> , <i>A. vinelandii</i>

Fuente: (Holt, J. 1994)

- **Nitrofijación**

Los valores de la concentración del ión amonio NH_4 (mg/ml) producidos por las diferentes cepas en los cultivos evaluados, oscilaron desde 0,01-0,04 mg/ml. Con la ayuda del kit Assay amonio (Ammonia Assay Kit) se logró identificar la capacidad de las cepas para producir amonio en mg/ml.

En la figura 15, dentro de las cepas de amaranto quienes produjeron mayor cantidad de amonio, predominó la AUTA AR6 (A4), seguida por la cepa AUTA AR3 (A3), teniendo un mismo rango las cepas AUTA AS1 (A5), AUTA AS4 (A6) y AUTA AS6 (A8) y en un rango menor las cepas AUTA AS5 (A7), AUTA AR1 (A1) y AUTA AR2 (A2).

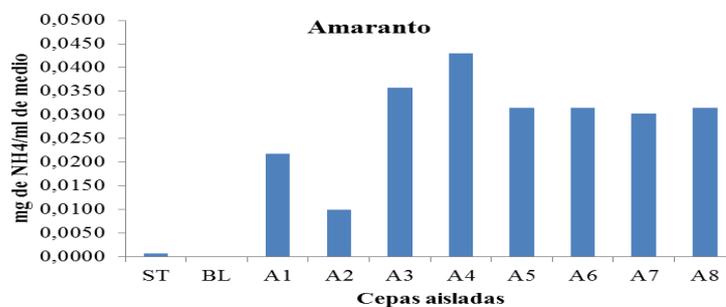


Figura 15. Producción de amonio por cepas aisladas de raíces y suelo rizosférico del cultivo de amaranto.

En la figura 16, se determina las cepas de mora con mayor producción de amonio, las cuales tuvieron un mismo rango MUTA AR4 (M4) Y MUTA AR5 (M5), seguida por MUTA AR1 (M1) y un rango similar entre las cepas MUTA AR2 (M2) y MUTA AR3 (M3).

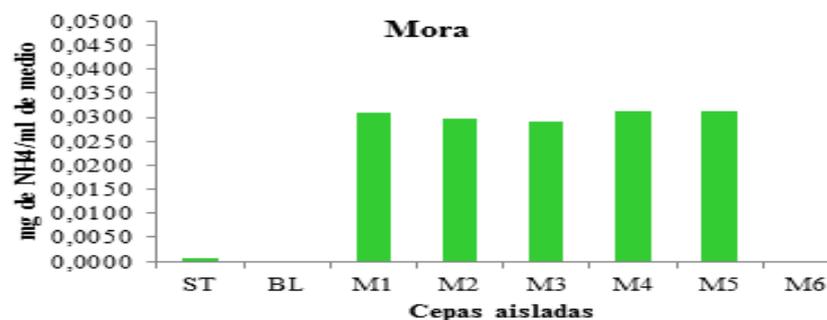


Figura 16. Producción de amonio por cepas aisladas de raíces y suelo rizosférico del cultivo de mora.

En la figura 17, se observa las cepas aisladas del cultivo de zanahoria, según la producción de amonio, las más representativas fueron ZUTA AS1.1 (Z2) Y ZUTA AS3 (Z4), seguidas por las cepas ZUTA AS1 (Z1) Y ZUTA AS2 (Z3), en rango menores ZUTA AS4 (Z5).

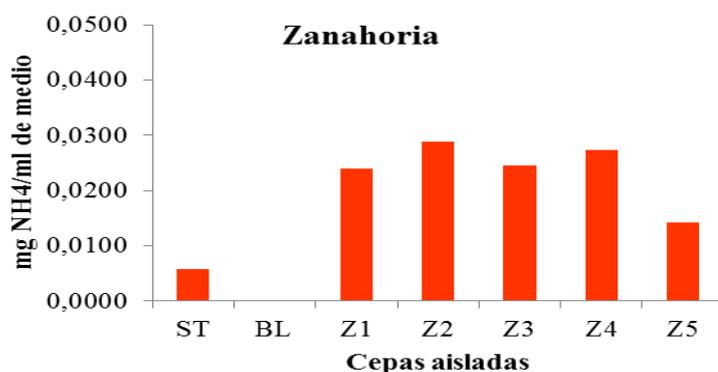


Figura 17. Producción de amonio por cepas aisladas de raíces y suelo rizosférico del cultivo de zanahoria.

En la figura 18, según la capacidad de producir amonio las cepas de mashua que predominó fue SHUTA AS1 (SH3), existiendo una similitud entre SHUTA AS3 (SH5) Y SHUTA AS4 (SH6), seguido por SHUTA AS5 (SH7) Y SHUTA AR2 (SH2) y en rango menor SHUTA AR1 (SH1) Y SHUTA AS2 (SH4).

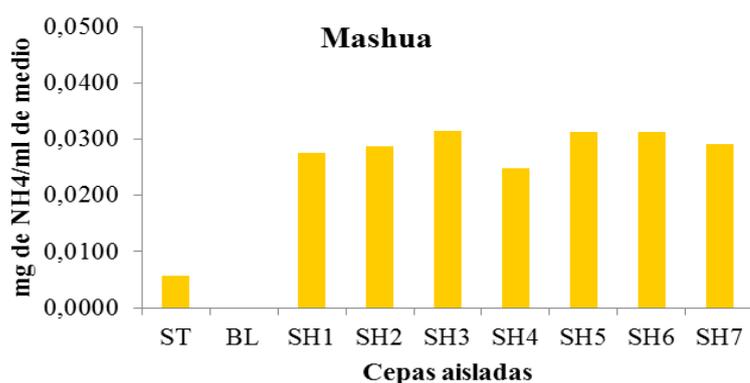


Figura 18. Producción de amonio por cepas aisladas de raíces y suelo rizosférico del cultivo de mashua.

Los resultados obtenidos confirman la capacidad de las bacterias para producir amonio; En el experimento los microorganismos no disponen de otra fuente de nitrógeno para su crecimiento, ya que el medio de cultivo utilizado carece de nitrógeno.

(Mantilla et al., 2007), evaluaron la producción de amonio para géneros de *Azotobacter* y *Azospirillum*, por el método indirecto, empleando la técnica colorimétrica de Berthelot (fenol-hipoclorito) modificado, donde algunos de los aislados produjeron concentraciones desde 0,17 hasta 0,25 mg/l.

La técnica de reducción del acetileno (ARA) (Suberer, 1998), ha sido la más empleada, aunque (Mantilla et al., 2007), señalan que pueden emplearse otros métodos y resultan de utilidad, como lo demostraron en su investigación.

- **Medición del crecimiento bacteriano**

En la figura 19, se observa el crecimiento de las diferentes cepas de bacterias aisladas en raíces y suelos rizosféricos de amaranto (a), mora (b), zanahoria (c) y mashua (d), mostrándose desde las 18 hasta las 72 horas un crecimiento similar, donde se observa un pico de desarrollo mayor a las 54 horas, así mismo en todos los cultivos a las 72 horas se observa el decrecimiento de las cepas.

En el cultivo de amaranto las cepas de mayor crecimiento fueron (AUTA AR1, ASI, AS4); en mora (MUTA AR3, AR2, AR4); zanahoria (ZUTA ASI.I, AS1, AS3); mashua (SHUTA ASI, AS5, ARI). La velocidad de crecimiento también ha sido tomada en cuenta por algunos investigadores entre ellos (Molina et. al 2011), como criterio para la selección de bacterias con potencial para la producción de biofertilizantes.

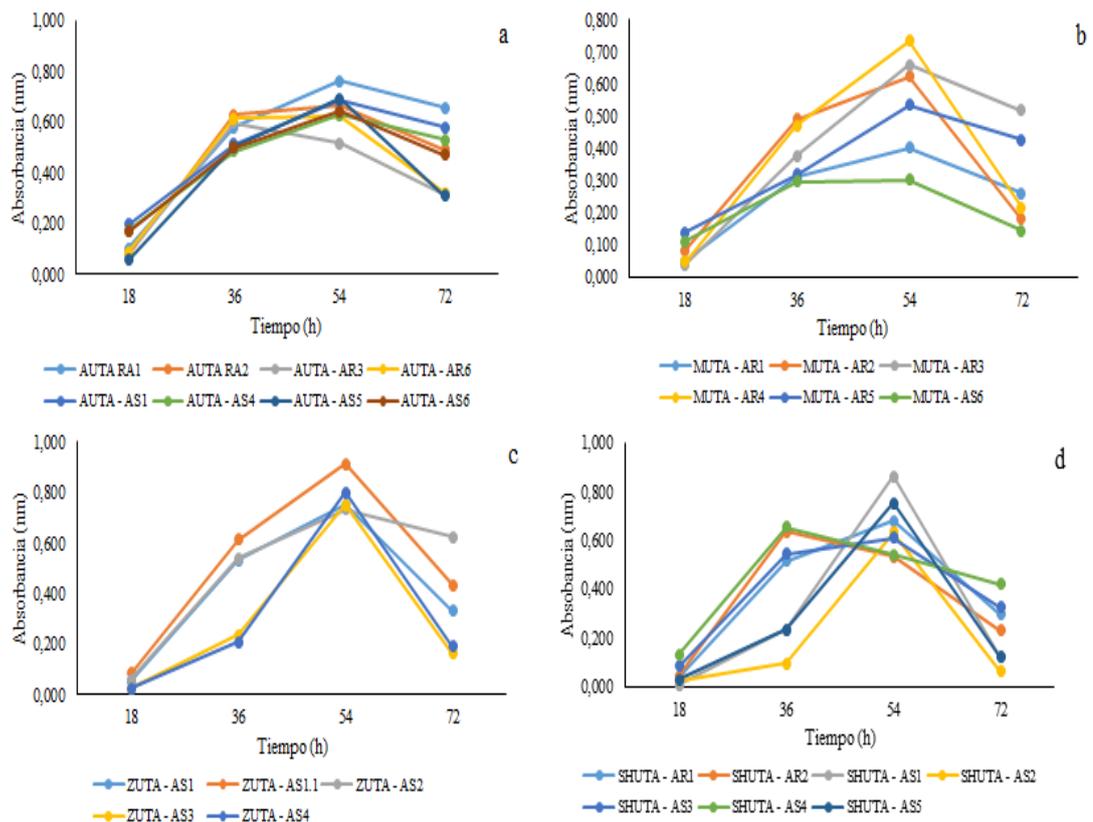


Figura 19. Crecimiento de las diferentes cepas bacterianas aisladas en raíces y zona rizosférica de amaranto (a), mora (b), zanahoria (c) y mashua (d).

PARTE 2

Prueba de hipersensibilidad:

La prueba de hipersensibilidad se aplicó a las 15 cepas bacterianas seleccionadas para la realización del screening biológico, en función a la reacción de la prueba en las hojas de tabaco presentando la cepa SHUTA AS3 poca pérdida de turgencia en el sitio inoculado a los 3 días, mientras que el resto de cepas presentaron una reacción negativa ya que no hubo presencia de ningún síntoma. Según (Ríos, J. 2008), menciona que existe pruebas de patogenicidad como la reacción de hipersensibilidad, ya que permite determinar si una bacteria es fito patógena, inoculando una suspensión bacteriana en las nervaduras de una hoja de tabaco, donde pasado las 24 horas la muestra presenta pérdida de turgencia o necrosis es positiva. (Pérez, E. et al., 2004), realizaron pruebas de hipersensibilidad en tabaco para determinar los síntomas de patogenicidad en plántulas de ajo y cebolla.

- **Screening biológico**

De acuerdo a las pruebas morfológicas, fisiológicas, bioquímicas realizadas, la capacidad de las bacterias de producir amonio y el crecimiento bacteriano, se seleccionaron 15 cepas (AUTA AR2, AUTA AR6, AUTA AS4, AUTA AS5, MUTA AR1, MUTA AR2, MUTA AR4, MUTA AR5, MUTA AS6, ZUTA AS1, ZUTA AS1.1, SHUTA AR2, SHUTA AS1, SHUTA AS3 Y SHUTA AS4) para la realización del screening biológico.

Plántulas de Tomate (*Lycopersicon esculentum Mill*):

Días de la germinación:

De acuerdo a los días en la germinación en las plántulas de tomate el tratamiento 1 (AUTA AR2) tuvo una germinación más rápida en 15 días, en comparación con el testigo (tratamiento 16) el cual tardó 4 días más en germinar, por otro lado el tratamiento 14 (SHUTA AS3) demora más en germinar con 6 días después. Tabla15.

Altura de la planta:

En la altura de la planta de la primera semana el tratamiento 2 (AUTA AR6) y 5 (MUTA AR1), tuvieron una altura de 1,5 cm superando en crecimiento, mientras tanto el testigo y el tratamiento 14 (SHUTA AS3) tuvieron una altura de 0,9 cm y 0,5 cm. En la segunda semana predominó el tratamiento 4 (AUTA AS5) con una altura de 2,8 cm, seguido por el tratamiento 2 (AUTA AR6) con 2,2 cm de altura, en comparación con el testigo que fue de 1,5 cm y el tratamiento 14 (SHUTA AS3) con 1 cm de altura. En la tercera semana el tratamiento 2 (AUTA AR6) llegó a una altura de 2,7 cm, seguido por el tratamiento 7 (MUTA AR4) con una altura de 2,6 cm, es decir son estadísticamente iguales, mientras que el testigo llegó a 1,7 cm, y el tratamiento 14 (SHUTA AS3) a una altura de 1,5 cm. En la cuarta semana quien predominó en la altura fue el tratamiento 2 (AUTA AR6) con 3,3 cm en comparación al testigo el cual llegó a 1,9 cm, y el tratamiento 14 una altura de 1,7cm. Tabla 15.

Número de hojas:

En cuanto al número de hojas en la primera semana no se encontraron diferencia entre los tratamientos. En la segunda semana el tratamiento 7 (MUTA AR4) predominó con 4 hojas en comparación con el testigo y el tratamiento 15 (SHUTA AS4) los cuales tuvieron 2 hojas. En la tercera semana los tratamientos 2 (AUTA AR6) y 7 (MUTA AR4) llegaron a 5 hojas, siendo estadísticamente iguales, mientras tanto el testigo y el resto de tratamientos llegaron a 4 hojas. En la cuarta semana los tratamientos que predominaron son 2 (AUTA AR6) y 7 (MUTA AR4) con 5 hojas, mientras que el testigo con 4 hojas. Tabla 15.

Tabla 15. Efecto de la inoculación de las cepas bacterianas en plántulas de tomate.

Tratamiento	VARIABLES								
	DÍAS DE GERMINACIÓN	ALTURA DE PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS			
		semana 1	semana 2	semana 3	semana 4	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4
1	15 A	1,4 ABC	2,02 ABCD	2,2 BC	2,6 ABC	2a	4 AB	4 B	4 C
2	16 ABC	1,5 A	2,2 AB	2,7 A	3,3 A	2a	4 ABC	5A	5A
3	15 AB	1,5 AB	1,9 ABC	2,2 C	2,4 ABC	2a	3 ABCDE	4 B	4 C
4	17 ABCDEF	1,2 ABCD	2,8 A	2,2 C	2,4 ABC	2a	3 EFG	4 B	4 D
5	15 AB	1,5 A	2,1 ABC	2,2 C	2,4 ABC	2a	3 ABCD	4 B	4 B
6	18 DEF	1,1 ABCDEF	1,6 BC	2,0 CD	2,2 ABC	2a	2 FG	4 B	4 BC
7	17 BCEF	1,3 ABCD	2,1 ABC	2,6 AB	3,0 AB	2a	4A	5A	5A
8	19 DEFG	0,8 DEFG	1,4 BC	1,7 DEF	3,0 AB	2a	2 FG	4 B	4 BC
9	17 ABCDEF	1,2 ABCD	1,9 ABC	2,2 C	2,5 ABC	2a	3 CDEF	4 B	4 BC
10	19 FG	1,0 CDEF	1,6 BC	2,1 C	2,6 ABC	2a	3 EFG	4 B	4 B
11	17 ABCDE	1,2 ABCDE	1,6 BC	1,9 CDE	2,3 ABC	2a	3 BCDEF	4 B	4 BC
12	19 EFG	0,7 EFG1	1,6 BC	2,0 CD	2,4 ABC	2a	2 FG	4 B	4 BC
13	18 DEF	1,1 BCDEF	1,8 ABC	2,3 C	2,6 ABC	2a	3 DEFG	4 B	4 BC
14	21 G	0,5 G	1,0 C	1,5 F	1,7 C	2a	2 FG	4 B	4 C
15	16 ABCD	0,6 FG	1,0 C	1,5 F	1,8 C	2a	2G	4 B	4 C
16	18 CDEF	0,9 DEFG	1,5 BC	1,7 EF	1,9 BC	2a	2 FG	4 B	4 C
p-valor	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0005	sd	<0,0001	<0,0001	<0,0001
E.E.	0,48	0,09	0,23	0,07	0,26	sd	0,17	0,05	0,09

A*Valor estadísticamente iguales.

Martínez et al., (2013), realizaron estudios en plántulas de tomate y pimiento con rizobacterias promotoras del crecimiento encontrándose aumentos en el porcentaje de germinación con respecto al testigo y la biomasa, recomendando este tipo de bacterias para la formulación de biofertilizantes. Según (KRUMPHOLZ, 2003), al evaluar la altura de tallos en plantas de tomate se ha observado que tratamientos inoculados con *A. brasilense* FT 326 superaron en un 20% al tratamiento control.

Plántulas de Lechuga (*Lactuca sativa* L.):

Días de la germinación:

En los días a la germinación en las plántulas de lechuga no se observaron diferencias, lo cual no hubo efecto de los tratamientos en la germinación. Tabla 16.

Altura de la planta:

En cuanto a la altura de las plántulas en la primera semana se obtuvo una altura de 0,7 cm entre los tratamientos 2 (AUTA AR6) y 7 (MUTA AR4), siendo estadísticamente iguales, mientras que el testigo llegó a 0,4 cm y el tratamiento 15 (SHUTA AS4) igualando al testigo. En la segunda semana los tratamientos 2 (AUTA AR6) y 7 (MUTA AR4), tuvieron una altura de 1,6 cm en comparación con el testigo de 1,2 cm, pero también los tratamientos 4 (AUTA AS5), 8 (MUTA AR5), 14 (SHUTA AS3) y 15 (SHUTA AS4), tuvieron un menor crecimiento. En la tercera semana los tratamientos que predominaron son el 2 (AUTA AR6) y 7 (MUTA AR4), con una altura de 2,6 cm, seguido por los tratamientos 3 (AUTA AS4), 9 (MUTA AS6) y 10 (ZUTA AS1), en comparación con el testigo de 1,2 cm y los tratamientos 14 (SHUTA AS3) y 15 (SHUTA AS4), que no tuvieron diferencia respecto al control. En la cuarta semana los tratamientos 2 (AUTA AR6) y 7 (MUTA AR4), tuvieron una altura de 3,4 cm, seguidas por los tratamientos, 3 (AUTA AS4), 9 (MUTA AS6), 10 (ZUTA AS1), 11 (ZUTA AS1.1), 12 (SHUTA AR2) y 13 (SHUTA AS1) en comparación con el testigo de 1,5 cm, y los tratamientos 14 (SHUTA AS3) y 15 (SHUTA AS4) en menor crecimiento. Tabla 16.

Número de hojas:

De acuerdo con el número de hojas en la primera semana no se encontraron diferencias entre los tratamientos. En la segunda semana los tratamientos 2 (AUTA AR6), 5 (MUTA AR1), 6 (MUTA AR2) y 7 (MUTA AR4) tuvieron mayor número de hojas que el tratamiento control. En la tercera semana el tratamiento 2 (AUTA AR6) predominó en el número de hojas en comparación con el testigo, los cuales tienen diferencias significativas, mientras que el tratamiento 11 (ZUTA AS1.1) tuvo un menor número de hojas. En la cuarta semana los tratamientos 2 (AUTA AR6) y 7

(MUTA AR4), predominaron con 5 hojas en comparación con el testigo que fue de 4 hojas y el tratamiento 11 (ZUTA AS1.1) con menor hojas. Tabla 16.

Tabla 16. Efecto de la inoculación de las cepas bacterianas en plántulas de lechuga.

Tratamiento	VARIABLES								
	DÍAS DE GERMINACIÓN	ALTURA DE PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS			
		semana 1	semana 2	semana 3	semana 4	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4
1	18 A	0,5 BCD	1,2 AB	2,0 B	2,5 B	2A	3,0 BC	4,0 ABCD	4,0 BCDEF
2	18 A	0,7 A	1,6 A	2,6 A	3,4 A	2A	4,0 A	5,0 A	5,0 A
3	18A	0,5 ABC	1,2 AB	2,0 B	2,5 B	2A	2,0 CD	3,0 GH	5,0 ABCDE
4	16 A	0,5 BCD	1,0 AB	1,5 CD	2,0 CD	2A	3,0 BC	4,0 DEFGH	5,0 ABCD
5	16 A	0,6 AB	1,2 AB	1,6 CD	2,2 BC	2A	4,0 A	4,0 ABCDE	5,0 AB
6	17 A	0,6 AB	1,2 AB	1,6 CD	2,2 BC	2A	4,0 A	4,0 ABC	5,0 AB
7	17 A	0,7 A	1,5 A	2,6 A	3,4 A	2A	4,0 A	5,0 AB	5,0 A
8	18 A	0,5 CD	0,9 B	1,4 DE	1,8 CDE	2A	2 BCD	3,0 H	4,0 DEF
9	18 A	0,5 BCD	1,2 AB	2,0 B	2,5 B	2A	3,0 B	4,0 CDEFG	5,0 ABCD
10	17 A	0,6 AB	1,2 AB	2,0 B	2,5 B	2A	2,0 CBD	4,0 EFGH	5,0 BCDE
11	18 A	0,5 BCD	1,2 AB	2,0 BC	2,5 B	2A	2,0 BCD	3,0 I	4,0 F
12	18 A	0,5 BCD	1,2 AB	2,0 BC	2,5 B	2A	2,0 CD	4,0 FGH	4,0 BCDEF
13	16 A	0,5 BCD	1,2 AB	2,0 BC	2,5 B	2A	2,0 D	4,0 DEFGH	5,0 ABCDE
14	18 A	0,4 CD	0,7 B	1,2 E	1,5 DE	2A	2,0 BCD	4,0 BCDEF	5,0 ABC
15	16 A	0,4 D	0,8 B	1,1 E	1,5 E	2A	2,30 BCD	4,0 FGH	4,0 CDEF
16	17 A	0,4 D	1,2 AB	1,2 DE	1,5 DE	2A	2,0 BCD	4,0 EFGH	4,0 EF
p-valor	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	sd	<0,0001	<0,0001	<0,0001
E.E.	0,56	0,03	0,1	0,08	0,08	sd	0,12	0,12	0,09

A*Valor estadísticamente iguales.

En función a los resultados del screening biológico los mejores tratamientos en plántulas de tomate y lechuga han sido 2 (AUTA AR6) y 7 (MUTA AR4), y el peor tratamiento en plántulas de tomate ha sido el 14 (SHUTA AS3) y en lechuga los tratamientos 14 (SHUTA AS3) y 15 (SHUTA AS4). Estudios realizados por Díaz et al., (2001) en el plántulas de Lechuga (*Lactuca sativa L.*) en condiciones de laboratorio, con 30 cepas bacterianas, encontraron algunas cepas eficientes y otras que inhibieron la germinación, resultados que concuerdan con los expuesto anteriormente con las cepas evaluadas, tanto en la lechuga como en el tomate. Pérez et al (2017), realizaron estudios de selección y caracterización en los géneros de *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* nativas de la rizósfera del cultivo de *ipomea batata*, las cepas fueron capaces de producir índoles, reducir acetileno y solubilizar fósforo además incrementaron algunos parámetros de crecimiento como altura, longitud radicular, peso seco aéreo entre otros, catalogando a estos microorganismos con potencial para la producción de biofertilizantes. (KAPULNIK et al. 1985) inocularon plantas de trigo con distintas concentraciones de *A. brasilense*, y demostraron que existen ciertas concentraciones bacterianas que promueven mayores respuestas de crecimiento en las plantas.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS

6.1. CONCLUSIONES

Se aislaron 26 cepas bacterianas de los cuatro cultivos evaluados, las cuales 11 se obtuvieron de raíces y 15 de la zona rizosférica.

Los resultados obtenidos confirman la capacidad de las bacterias para producir amonio, en el cultivo de amaranto las cepas con mayor capacidad fueron AUTA AR6, AUTA AR3, AUTA AS1, AUTA AS4 y AUTA AS6, en mora MUTA AR4, MUTA AR5, MUTA AR1, MUTA AR2 Y MUTA AR3, zanahoria ZUTA AS1.1, ZUTA AS3, ZUTA AS1 Y ZUTA AS2 y en mashua SHUTA AS1, SHUTA AS3, SHUTA AS4, SHUTA AS5 y SHUTA AR2.

Las cepas seleccionadas intervinieron en la bio estimulación de las plántulas de tomate y lechuga, destacándose las mejores AUTA AR6 y MUTA AR4 en las plántulas de los cultivos evaluados, recalcando que fueron aisladas de la raíz de amaranto y mora.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo darán las pautas para el desarrollo a futuro de nuevos biopreparados con potencial para la producción de biofertilizantes.

RECOMIENDACIONES

Continuar con los estudios de identificación, producción y cuantificación del poder nitrificante de las cepas evaluadas, así como estudios específicos en diferentes cultivos para determinar los mecanismos promotores del crecimiento y desarrollo en los cultivos.

6.2. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, B. (2015). “*Selección de bacterias de vida libre eficientes en fijación biológica de nitrógeno como alternativa sustentable para ecosistemas terrestres.*”
- Aldrich, S. (2015). Ammonia Assay Kit, 8–9. <https://doi.org/papers3://publication/uuid/F6E783CF-E652-467C-8B28-78E88D9AB158>
- Allende, M; Salinas, L; Rodríguez, F; Olivares, N; Riquelmes, J; Antúnez, A; Martínez, j; corradini, F; Sepúlveda, P; Abacra, P; Guzmán, A; Felmer, S. (2017). Manual de cultivo del tomate bajo invernadero. *INDAP*, 112.
- Armenta, A., Bojórquez, A; García, C., Camacho, R., Sánchez, M., Montoya, L., & Nava, E. (2010). BIOFERTILIZANTES EN EL DESARROLLO AGRÍCOLA DE MÉXICO. *Ra Ximhai*, 6, 51–56.
- Aquilanti, F., Favillib, F., Clementi, A. 2004. Comparison of different strategies for insolation and preliminary identification of Azotobacter from soil samples. Firenze, Italy. *Soil Biology & Biochemistry*. Vol. 36: pp. 1475-1483.
- Aseri, G. K., Jain, N., Panwar, J., Rao, A. V, & Meghwal, P. R. (2008). Biofertilizers improve plant growth , fruit yield , nutrition , metabolism and rhizosphere enzyme activities of Pomegranate (*Punica granatum L .*) in Indian Thar Desert. *ELSEVIER*, 117, 130–135. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.03.014>
- Baca, B., Soto, L., Pardo, M. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista Científica UDO Agrícola*.
- Borda Daniel, Pardo Juan, Martínez María, M. J. (2009). Producción de un biofertilizante a partir de un aislamiento de Azotobacter nigricans obtenido en un cultivo de Stevia rebaudiana Bert. *Universitas Scientiarum*, 14(1), 71–78. <https://doi.org/10.11144/javeriana.SC14-1.pdub>
- Carvajal, J; Mera, A. (2010). Fertilización biológica: técnicas de vanguardia para el desarrollo agrícola sostenible. *Producción + Limpia*, 5(2), 79–95. <https://doi.org/10.1016/j.aqpro.2013.07.003>
- Cassán, F., Bottini, R., Schneider, G., & Piccoli, P. (2001). Azospirillum brasilense and Azospirillum lipoferum hydrolyze conjugates of GA20 and metabolize the resultant aglycones to GA1 in seedlings of rice dwarf mutants. *Plant Physiology*, 125(4), 6. <https://doi.org/10.1104/pp.125.4.2053>

- Chirinos, J., Leal, Á., & Montilla, J. (2006). Uso de Insumos Biológicos como Alternativa para la Agricultura Sostenible en la Zona Sur del Estado Anzoátegui. *Ceniap*, 11, 7. Retrieved from <https://ingenieriadereacciones.files.wordpress.com/2013/02/5-zona-sur-de-anzoatgui-bioproductos.pdf>
- Delgado, R; Salas, A. (2006). Consideraciones para el desarrollo de un sistema integral de evaluación y manejo de la fertilidad del suelo y aplicación de fertilizantes para una agricultura sustentable en Venezuela. *Agronomía Tropical*, 289–323. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2006000300001&lang=pt
- Días, V.P., Ferrera Cerrato, R; Almaraz Suarez, J; y Alcantar González, G. 2001. Inoculación de bacterias promotoras del crecimiento en lechuga. *Terra Latinoamericana*. 19 (4).
- Dibut, B. (2009). *Biofertilizantes como insumos en agricultura sostenible*. Ciudad de La Habana: Editorial Universitaria. Retrieved from <http://www.worldcat.org/title/biofertilizantes-como-insumos-en-agricultura-sostenible/oclc/752610434?referer=di&ht=edition#.W0LfPMm5n5Y.mendeley>
- Dibut, B., Metínez, R., González, R., Delgado, L., Martín, B. 1990. Evaluación de las cepas *Azotobacter Chroococcum* aislados de suelos de Cuba. 1. Actividad estimuladora del crecimiento de plántulas de tomate. *Ciencias de la agricultura*. Pp. 11-16.
- FAO. (2013). *EL CULTIVO DE TOMATE CON BUENAS PRÁCTICAS AGRÍCOLAS EN LA AGRICULTURA URBANA Y PERIURBANA*. Paraguay.
- FAO. (2014). *Normas para bancos de germoplasma de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. Comisión de Recursos genéticos para la Alimentación y la Agricultura*. Retrieved from www.fao.org/publications
- Fernández, A; García, C; Saéz, J; Valdezate, S. (2010). *Metodos de Identificación Bacteriana en el Laboratorio de Microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica* (Vol. 37). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Flores Gallegos, Adriana; Contreras Esquivel, Juan; Reyes Váldez, Humberto; Rodríguez Herrera, R. (2012). Aislamiento e identificación de cepas nativas del suelo mexicano del género *Azotobacter*. *Revista Científica de La Universidad Autónoma de Coahuila*, 4(August), 11.

- Frioni, L. (2006). Microbiología: básica, ambiental y agrícola. <https://doi.org/10.4067/S0071-17132000003500023>
- García, J; Mendoza, A; Makey, N. (2012). Efecto de *Azospirillum brasilense* en el rendimiento del maíz en el norte de Tamaulipas, Mexico. *Centro de Biotecnología Genómica-Instituto Politécnico Nacional*, 28(1), 79–84.
- Garzón, D. (2013). “ *Determinación De La Biodiversidad Bacteriana En Ecosistemas Glaciares De La Antártida* ”. Retrieved from <http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/3179>
- González, Y; Martínez, R; Hernández, J; Cruz, Y. (2010). Efecto de la aplicación de *Azotobacter chroococum* y *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* sobre las características morfológicas de plántas de tabaco cultivadas en semilleros tecnificados. *Instituto de Investigaciones Fundamentales En Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt” (INIFAT)*, 11, 7.
- González, A., Aguilar, V., & Rodríguez, C; Flores, R. (2015). *Azotobacter* : una bacteria con potencial como biofertilizante eco-amigable. *Biofertilizantes Microbianos*, (April 2014), 29.
- González, T., Campanharo, J., & Lemos, E. (2008). Genetic characterization and nitrogen fixation capacity of *Rhizobium* strains on common bean. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 43, 9. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2008000900012>
- Guevara, F; Estrella, N. (2008). *DETERMINACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ENFERMEDADES BACTERIANAS DEL TOMATE RIÑÓN (Lycopersicon esculentum), CULTIVADO BAJO INVERNADERO EN DOCE ÁREAS DE LA CORDILLERA CENTRAL DEL ECUADOR. Previa.*
- HiMedia Laboratories. (2015). Ashbys Mannitol Agar. *Technical Data*, 2.
- Jaramillo, J; Agular, A; Tamayo, P; Arguello, E. G. M. (2016). Modelo tecnológico para el cultivo de lechuga bajo buenas prácticas agrícolas en el Oriente Antioqueño, 147.
- Laboratorios Britania. (2010). Ureasa Medio para la prueba. *Britania*, 1–2. Retrieved from http://www.britanialab.com/productos/604_hoja_tecnica_es.pdf
- López, L., Hernández, M., Colín, A., Ortega, S., Cerón, G., & Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación En Discapacidades*, 3(1), 10–18. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2014/ir141b.pdf>

- Mantilla, C. L., Oviedo, L. E., & Betancur, C. A. (2011). Bacterias nativas con potencial en la producción de ácido indolacético para mejorar los pastos, 29(2), 187–194.
- M. Martínez-Salgado, M. M., & Montaña-Lara, J. S. (2009). Bio-fertilizer production from an isolate of *Azotobacter nigricans* obtained from a plantation of *Stevia rebaudiana* Bert. *Universitas Scientiarum*, 14(1), 71-78.
- Martín, M; & Rivilla, R. (2014). *Colonización de la rizosfera por Pseudomonas*.
- Martínez, L. et al. 2013. caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Rev. Fitotec. rex. Mex.* vol. 36.pp 66-69.
- Mayz, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista Científica UDO Agrícola*, 4(1), 1–20.
- Menezes, A. (2009). *microbiota y la promoción del crecimiento del maíz “ Zea mays ” L . con ...* Retrieved from <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/123456789/1423/1/uy24-14>
- Moreno, L., & Galvis, F. (2013). Potencial biofertilizante de bacterias diazótroficas aisladas de muestras de suelo rizosférico. (Spanish). *Pastos Y Forrajes*, 36(1), 33–37. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=91532603&lang=es&site=ehost-live>
- Page, W. J., & Shivprasad, S. (1991). *Azotobacter salinestris* sp. nov. , a Sodium-Dependent, Microaerophilic , and Aeroadaptive Nitrogen-Fixing Bacterium. *INTERNACIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY*, 41, No. 3(July), 369–376.
- Peña, H., Reyes, I. (2007). Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga.pdf. Venezuela.
- Perdomo, C; Barbazán, M. D. M. (1992). Área de suelos y aguas cátedra de fertilidad. In *Area de suelos y aguas* (p. 74).
- Pérez, J; Hurtado, G; Aparicio, V; Argueta, Q; Larín, M. (2001). Cultivo De Tomate. *Centa*, 1–68.
- Ríos J. 2008. Manual de prácticas de bacteriología. 32p.
- Saavedra, G., Corradini, F., Antúnez, A., Felmer, S., Estay, P., & Sepúlveda, P. (2017). Manual de producción de lechuga. *Instituto de Desarrollo Agropecuario*

- *Instituto de Investigaciones Agropecuarias, N°9, 150. Retrieved from [http://www.inia.cl/wp-content/uploads/ManualesdeProduccion/09 Manual Lechuga.pdf](http://www.inia.cl/wp-content/uploads/ManualesdeProduccion/09_Manual_Lechuga.pdf)*

Taylor, P., Sessitsch, A., Howieson, J. G., Perret, X., Antoun, H., Sessitsch, A., ...
Antoun, H. (2002). Critical Reviews in Plant Sciences Advances in Rhizobium
Research. *Plant Sciences*, 37–41.

6.3.ANEXOS

Anexo 1. Características morfológicas de las cepas aisladas del cultivo de amaranto.

PRUEBAS MORFOLÓGICAS DE LAS COLONIAS "AMARANTO"									
N°	ZONA AISLADA	NOMENCLATURA	DESCRIPCIÓN DE LAS FORMAS						
			FORMA DE LA COLONIA	ELEVACIÓN DE LA COLONIA	MARGEN DE LA COLONIA	FORMA CELULAR	TIPOS DE MORFOLOGÍA DE LAS CADENAS DE ESPORAS	COLOR DE LA COLONIA	PIGMENTACIÓN
1	Raíz	AUTA - AR1	irregular	plana	filamentoso	bacilos	simples	crema	amarillo
2	Raíz	AUTA - AR2	irregular	plana	lobado	diplobacilos	simples	crema	amarillo claro
3	Raíz	AUTA - AR3	irregular	plana	lobado	bacilos	simples	crema	amarillo claro
4	Raíz	AUTA - AR6	irregular	plana	ondulado	cocos	incompletas	blanco	amarillo
5	Suelo	AUTA - AS1	filamentosa	plana	filamentoso	cocos	incompletas	crema	amarillo
6	Suelo	AUTA - AS4	irregular	plana	ondulado	cocos	incompletas	blanco	crema claro
7	Suelo	AUTA - AS5	irregular	plana	ondulado	cocos	incompletas	crema	amarillo
8	Suelo	AUTA - AS6	irregular	plana	ondulado	cocos	individuales	crema	amarillo

Anexo 2. Características morfológicas de las cepas aisladas del cultivo de mora.

PRUEBAS MORFOLÓGICAS DE LAS COLONIAS "MORA"									
N°	ZONA AISLADA	NOMENCLATURA	DESCRIPCIÓN DE LAS FORMAS						
			FORMA DE LA COLONIA	ELEVACIÓN DE LA COLONIA	MARGEN DE LA COLONIA	FORMA CELULAR	TIPOS DE MORFOLOGÍA DE LAS CADENAS DE ESPORAS	COLOR DE LA COLONIA	PIGMENTACIÓN
1	Raíz	MUTA - AR1	filamentosa	plana	filamentoso	diplobacilos	simples	crema	gris
2	Raíz	MUTA - AR2	filamentosa	plana	filamentoso	cocos	simples	crema	gris
3	Raíz	MUTA - AR3	irregular	plana	lobado	cocos	rectas	blanco	crema
4	Raíz	MUTA - AR4	irregular	plana	lobado	cocos	espiral	crema	amarillo
5	Raíz	MUTA - AR5	irregular	plana	ondulado	cocos	rectas	crema	amarillo claro
6	Suelo	MUTA - AS6	irregular	plana	lobado	cocos-bacilos	incompletas	crema	amarillo claro

Anexo 3. Características morfológicas de las cepas de zanahoria.

PRUEBAS MORFOLÓGICAS DE LAS COLONIAS "ZANAHORIA"									
N°	ZONA AISLADA	NOMENCLATURA	DESCRIPCIÓN DE LAS FORMAS						
			FORMA DE LA COLONIA	ELEVACIÓN DE LA COLONIA	MARGEN DE LA COLONIA	FORMA CELULAR	TIPOS DE MORFOLOGÍA DE LAS CADENAS DE ESPORAS	COLOR DE LA COLONIA	PIGMENTACIÓN
1	Suelo	ZUTA - AS1	irregular	plana	ondulado	cocos	simples	crema	amarillo
2	Suelo	ZUTA - AS1.1	irregular	plana	lobado	cocos	espiral	crema	amarillo oscuro
3	Suelo	ZUTA - AS2	irregular	plana	lobado	cocos	simples	blanco	crema
4	Suelo	ZUTA - AS3	irregular	plana	filamentoso	cocos	simples	crema	amarillo claro
5	Suelo	ZUTA - AS4	irregular	plana	lobado	cocos	simples	blanco	crema

Anexo 4. Características morfológicas de las cepas de mashua.

PRUEBAS MORFOLÓGICAS DE LAS COLONIAS "MASHUA"									
N°	ZONA AISLADA	NOMENCLATURA	DESCRIPCIÓN DE LAS FORMAS						
			FORMA DE LA COLONIA	ELEVACIÓN DE LA COLONIA	MARGEN DE LA COLONIA	FORMA CELULAR	TIPOS DE MORFOLOGÍA DE LAS CADENAS DE ESPORAS	COLOR DE LA COLONIA	PIGMENTACIÓN
1	Raíz	SHUTA - AR1	irregular	plana	lobado	cocos	simples	crema	amarillo claro
2	Raíz	SHUTA - AR2	filamentoso	plana	filamentoso	cocos	rectas	crema	amarillo
3	Suelo	SHUTA - AS1	irregular	plana	lobado	cocos	incompletas	blanco	crema
4	Suelo	SHUTA - AS2	irregular	plana	lobado	bacilos	incompletas	crema	amarillo oscuro
5	Suelo	SHUTA - AS3	irregular	plana	ondulado	cocos	incompletas	crema	amarillo
6	Suelo	SHUTA - AS4	irregular	plana	ondulado	cocos	incompletas	crema	amarillo oscuro
7	Suelo	SHUTA - AS5	irregular	plana	lobado	cocos	simples	blanco mucoso	crema

Anexo 5. Caracterización fisiológica de las cepas bacterianas aisladas del cultivo de amaranto.

PRUEBAS FISIOLÓGICAS DEL CRECIMIENTO BACTERIANO "AMARANTO"								
N°	ZONA AISLADA	NOMENCLATURA	DESCRIPCIÓN					
			TEMPERATURA °C	CLASIFICACIÓN DE ACUERDO A LA TEMPERATURA	PH	CLASIFICACIÓN DE ACUERDO AL Ph	SALINIDAD	CLASIFICACIÓN DE ACUERDO A LA SALINIDAD
1	Raíz	AUTA - AR1	28.5 - 29.5	mesófilo	7-7.5	Neutrófilo	5%, 10%	Halófilo
2	Raíz	AUTA - AR2	28.5 - 29.5	mesófilo	7-7.5	Neutrófilo	5%, 10%, 15%	Halófilo extremo
3	Raíz	AUTA - AR3	28.5 - 29.5	mesófilo	7-7.5	Neutrófilo	5%, 10%, 15%	Halófilo extremo
4	Raíz	AUTA - AR6	28.5 - 29.5	mesófilo	7-7.5	Neutrófilo	5%, 10%, 15%	Halófilo extremo
5	Suelo	AUTA - AS1	28.5 - 29.5	mesófilo	7-7.5	Neutrófilo	5%, 10%, 15%	Halófilo extremo
6	Suelo	AUTA - AS4	28.5 - 29.5	mesófilo	7-7.5	Neutrófilo	5%, 10%	Halófilo
7	Suelo	AUTA - AS5	28.5 - 29.5	mesófilo	7-7.5	Neutrófilo	5%, 10%, 15%	Halófilo extremo
8	Suelo	AUTA - AS6	28.5 - 29.5	mesófilo	7-7.5	Neutrófilo	5%, 10%, 15%	Halófilo extremo

Anexo 6. Caracterización fisiológica de las cepas bacterianas aisladas del cultivo de mora.

PRUEBAS FISIOLÓGICAS DEL CRECIMIENTO BACTERIANO "MORA"								
N°	ZONA AISLADA	NOMENCLATURA	DESCRIPCIÓN					
			TEMPERATURA °C	CLASIFICACIÓN DE ACUERDO A LA TEMPERATURA	PH	CLASIFICACIÓN DE ACUERDO AL Ph	SALINIDAD	CLASIFICACIÓN DE ACUERDO A LA SALINIDAD
1	Raíz	MUTA - AR1	28.5 - 29.5	mesófilo	7-7.5	Neutrófilo	5%, 10%, 15%	Halófilo extremo
2	Raíz	MUTA - AR2	28.5 - 29.5	mesófilo	7-7.5	Neutrófilo	5%, 10%, 15%	Halófilo extremo
3	Raíz	MUTA - AR3	28.5 - 29.5	mesófilo	7-7.5	Neutrófilo	5%, 10%, 15%	Halófilo extremo
4	Raíz	MUTA - AR4	28.5 - 29.5	mesófilo	7-7.5	Neutrófilo	5%, 10%, 15%	Halófilo extremo
5	Raíz	MUTA - AR5	28.5 - 29.5	mesófilo	7-7.5	Neutrófilo	5%, 10%, 15%	Halófilo extremo
6	Suelo	MUTA - AS6	28.5 - 29.5	mesófilo	7-7.5	Neutrófilo	5%, 10%, 15%	Halófilo extremo

Anexo 7. Caracterización fisiológica de las cepas bacterianas aisladas del cultivo de zanahoria.

PRUEBAS FISIOLÓGICAS DE LAS COLONIAS "ZANAHORIA"								
N°	ZONA AISLADA	NOMENCLATURA	DESCRIPCIÓN					
			TEMPERATURA °C	CLASIFICACIÓN DE ACUERDO A LA TEMPERATURA	PH	CLASIFICACIÓN DE ACUERDO AL Ph	SALINIDAD	CLASIFICACIÓN DE ACUERDO A LA SALINIDAD
1	Suelo	ZUTA - AS1	28.5 - 29.5	mesófilo	7-7.5	Neutrófilo	5%, 10%, 15%	Halófilo extremo
1.1	Suelo	ZUTA - AS1.1	28.5 - 29.5	mesófilo	7-7.5	Neutrófilo	5%, 10%, 15%	Halófilo extremo
2	Suelo	ZUTA - AS2	28.5 - 29.5	mesófilo	7-7.5	Neutrófilo	5%, 10%, 15%	Halófilo extremo
3	Suelo	ZUTA - AS3	28.5 - 29.5	mesófilo	7-7.5	Neutrófilo	5%, 10%, 15%	Halófilo extremo
4	Suelo	ZUTA - AS4	28.5 - 29.5	mesófilo	7-7.5	Neutrófilo	5%, 10%, 15%	Halófilo extremo

Anexo 8. Caracterización fisiológica de las cepas bacterianas aisladas del cultivo de mashua.

PRUEBAS FISIOLÓGICAS DE LAS COLONIAS "MASHUA"								
N°	ZONA AISLADA	NOMENCLATURA	DESCRIPCIÓN					
			TEMPERATURA °C	CLASIFICACIÓN DE ACUERDO A LA TEMPERATURA	PH	CLASIFICACIÓN DE ACUERDO AL Ph	SALINIDAD	CLASIFICACIÓN DE ACUERDO A LA SALINIDAD
1	Raíz	SHUTA - AR1	28.5 - 29.5	mesófilo	7-7.5	Neutrófilo	5%, 10%, 15%	Halófilo extremo
2	Raíz	SHUTA - AR2	28.5 - 29.5	mesófilo	7-7.5	Neutrófilo	5%	Halófilo débil
3	Suelo	SHUTA - AS1	28.5 - 29.5	mesófilo	7-7.5	Neutrófilo	5%, 10%, 15%	Halófilo extremo
4	Suelo	SHUTA - AS2	28.5 - 29.5	mesófilo	7-7.5	Neutrófilo	5%, 10%, 15%	Halófilo extremo
5	Suelo	SHUTA - AS3	28.5 - 29.5	mesófilo	7-7.5	Neutrófilo	5%, 10%, 15%	Halófilo extremo
6	Suelo	SHUTA - AS4	28.5 - 29.5	mesófilo	7-7.5	Neutrófilo	5%, 10%, 15%	Halófilo extremo
7	Suelo	SHUTA - AS5	28.5 - 29.5	mesófilo	7-7.5	Neutrófilo	5%, 10%, 15%	Halófilo extremo

Anexo 9. Pruebas bioquímicas de las cepas aisladas de los cultivos de amaranto (a) y mora (b).

a)

PRUEBAS BIOQUIMICAS								
AMARANTO ASHBY								
PRUEBAS	AUTA AR1	AUTA AR2	AUTA AR3	AUTA AR6	AUTA AS1	AUTA AS4	AUTA AS5	AUTA AS6
	1	2	3	4	5	6	7	8
TINCIÓN GRAM	+	-	-	+	-	-	-	+
KOH 3%	+	-	-	+	+	+	-	+
CATALASA	+	+	+	+	+	+	+	+
UREASA	+	+	-	+	-	+	+	-
ASHBY MANITOL	+	+	+	+	+	+	+	+

b)

PRUEBAS BIOQUIMICAS						
MORA ASHBY						
PRUEBAS	MUTA AR1	MUTA AR2	MUTA AR3	MUTA AR4	MUTA AR5	MUTA AS6
	1	2	3	4	5	6
TINCIÓN GRAM	-	-	+	-	-	-
KOH 3%	+	+	+	-	-	-
CATALASA	+	+	+	+	+	+
UREASA	+	+	+	+	+	+
ASHBY MANITOL	+	+	+	+	+	+

Anexo 10. Pruebas bioquímicas de las cepas aisladas de los cultivos de zanahoria (a) y mashua (b).

a)

PRUEBAS BIOQUIMICAS					
ZANAHORIA ASHBY					
PRUEBAS	ZUTA AS1	ZUTA AS1.1	ZUTA AS2	ZUTA AS3	ZUTA AS4
	1	2	3	4	5
TINCIÓN GRAM	-	-	+	+	+
KOH 3%	+	+	+	+	+
CATALASA	+	+	+	-	+
UREASA	+	+	+	-	+
ASHBY MANITOL	+	+	+	+	+

b)

MASHUA ASHBY							
PRUEBAS	SHUTA AR1	SHUTA AR2	SHUTA AS1	SHUTA AS2	SHUTA AS3	SHUTA AS4	SHUTA AS5
	1	2	3	4	5	6	7
TINCIÓN GRAM	+	-	+	+	-	-	+
KOH 3%	+	-	+	+	-	-	+
CATALASA	+	+	+	-	+	+	-
UREASA	+	+	+	+	+	+	-
ASHBY MANITOL	+	+	+	+	+	+	+

Anexo 11. Datos en semanas de los indicadores agronómicos de los tratamientos 1, 2 y 3 en plántulas de tomate.

PLÁNTULAS DE TOMATE												
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS	INDICADORES AGRONÓMICOS									
			GERMINACIÓN (DÍAS)	ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS				
				S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	
1 AUTA AR2	1	1	15	1,5	2,3	2,4	2,6	2	4	4	4	4
		2	17	1,5	2,1	2,5	2,7	2	4	4	4	4
		3	13	1,5	2,1	2,5	2,7	2	4	4	4	4
		4	16	1,2	1,7	2,1	2,4	2	2	4	4	4
		5	14	1,5	1,9	2,3	2,6	2	4	4	4	4
	2	1	17	1,5	2	2,2	2,5	2	4	4	4	4
		2	17	1,3	1,8	2,1	2,4	2	4	4	4	4
		3	16	1,2	1,9	2,3	2,6	2	4	4	4	4
		4	17	1,2	1,6	2	2,3	2	4	4	4	4
		5	18	0,5	1	1,5	2	2	4	4	4	4
	3	1	14	2,2	2,5	2,5	2,8	2	4	4	4	4
		2	12	1,8	2,2	2,4	2,7	2	4	4	4	4
		3	16	1,5	2,2	2,4	2,6	2	4	4	4	4
		4	19	0,6	1,5	1,9	2,4	2	2	4	4	4
		5	17	1,4	2	2,2	2,6	2	4	4	4	4
	4	1	12	1,8	2,5	2,5	2,8	2	4	4	4	4
		2	13	2	2,3	2,3	2,6	2	4	4	4	4
		3	12	2	2,5	2,5	2,7	2	4	4	4	4
		4	13	2,1	2,3	2,5	3	2	4	4	4	4
		5	18	0,5	2	2,5	2,8	2	2	4	4	4
Suma		306	29	40,4	46	51,8	40	74	80	80	80	
Promedio		15	1,4	2,0	2,3	2,6	2	4	4	4	4	

PLÁNTULAS DE TOMATE												
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS	INDICADORES AGRONÓMICOS									
			GERMINACIÓN (DÍAS)	ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS				
				S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	
2 AUTA ARG	1	1	17	2,1	2,9	3,1	3,5	2	4	5	5	5
		2	13	2	2,3	2,7	2,9	2	4	5	5	5
		3	16	2	2,3	2,5	2,8	2	4	5	5	5
		4	14	2,2	2,4	2,7	3,1	2	4	5	5	5
		5	19	0,6	1,9	2,7	3	2	4	5	5	5
	2	1	14	2,2	2,6	3,1	3,8	2	4	5	6	6
		2	16	2,2	2,6	3,1	3,5	2	4	5	6	6
		3	17	2,2	3	3,6	4,2	2	4	5	6	6
		4	18	0,5	1,2	2	2,5	2	2	4	5	5
		5	17	0,8	1,2	1,6	2,3	2	4	4	5	5
	3	1	17	1,2	1,5	2,2	2,7	2	2	4	5	5
		2	16	1,3	2	2,5	3,1	2	4	5	5	5
		3	19	0,6	2	2,6	2,9	2	2	4	5	5
		4	19	0,5	1,7	1,8	2,4	2	2	4	5	5
		5	17	1,2	2,1	2,5	2,9	2	4	5	5	5
	4	1	13	2,2	3	3,5	3,9	2	4	5	6	6
		2	14	2,1	2,6	3,4	4,1	2	4	5	6	6
		3	17	1,8	2,5	3,1	3,7	2	4	5	5	5
		4	15	1,7	2,6	3	3,7	2	4	5	5	5
		5	16	1,8	2,3	3	3,7	2	4	5	5	5
Suma		324	31	44,7	55	64,7	40	72	95	105	105	
Promedio		16	2	2	3	3	2	4	5	5	5	

PLÁNTULAS DE TOMATE												
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS	INDICADORES AGRONÓMICOS									
			GERMINACIÓN (DÍAS)	ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS				
				S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	
3 AUTA AS4	1	1	15	1,7	2,2	2,3	2,5	2	4	4	4	4
		2	14	1,7	2,2	2,3	2,5	2	4	4	4	4
		3	13	1,6	2,2	2,3	2,5	2	4	4	4	4
		4	13	1,7	2,2	2,3	2,5	2	4	4	4	4
		5	14	1,5	2	2	2,2	2	4	4	4	4
	2	1	18	1,4	2	2,3	2,5	2	2	4	4	4
		2	17	1,6	2	2,5	2,7	2	4	4	4	4
		3	13	1,7	2,1	2,2	2,4	2	4	4	4	4
		4	20	0,6	1,1	1,7	1,9	2	2	4	4	4
		5	18	1,1	1,8	2	2,3	2	2	4	4	4
	3	1	16	0,9	1,2	1,6	1,8	2	2	4	4	4
		2	18	1,4	1,7	1,7	2	2	2	4	4	4
		3	14	2	2,1	2,3	2,5	2	4	4	4	4
		4	16	1,6	1,7	2	2,3	2	4	4	4	4
		5	20	1,5	1,7	2	2,2	2	2	4	4	4
	4	1	15	2,1	2,6	2,6	3	2	4	4	4	4
		2	15	1,7	2,3	2,3	2,6	2	4	4	4	4
		3	16	1,6	2,1	2,3	2,5	2	4	4	4	4
		4	14	2	2,5	2,5	2,7	2	4	4	4	4
		5	19	0,5	1,5	1,9	2,3	2	2	4	4	4
Suma		318	30	36,6	43	47,9	40	66	80	80	80	
Promedio		16	1,5	1,8	2,2	2,4	2	3,3	4	4	4	

Anexo 12. Datos en semanas de los indicadores agronómicos de los tratamientos 4, 5 y 6 en plántulas de tomate.

PLÁNTULAS DE TOMATE											
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS	INDICADORES AGRONÓMICOS								
			GERMINACIÓN (DÍAS)	ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS			
				S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
4 AUTA AS5	1	1	21	0,5	1,5	1,6	2	2	2	4	4
		2	17	1,5	2	2,1	2,3	2	2	4	4
		3	20	0,5	1,3	1,8	2	2	4	4	4
		4	18	0,9	1,7	1,8	2	2	2	4	4
		5	19	0,5	2,1	2,6	2,7	2	2	4	4
	2	1	17	1,3	2,3	2,3	2,5	2	4	4	4
		2	14	2	2,5	2,9	3	2	4	4	4
		3	19	0,6	1,7	1,8	2	2	2	4	4
		4	18	1,2	1,6	2	2,1	2	2	4	4
		5	15	1,7	2,1	2,3	2,5	2	4	4	4
	3	1	18	1,2	2,1	2,5	2,6	2	2	4	4
		2	17	1,4	2	2,3	2,5	2	2	4	4
		3	18	1,3	2,1	2,3	2,5	2	2	4	4
		4	17	1,4	2	2,3	2,4	2	2	4	4
		5	18	1,3	2,1	2,3	2,5	2	2	4	4
	4	1	17	1,4	2	2,3	2,5	2	4	4	4
		2	18	1,3	2,5	2,6	2,7	2	3	4	4
		3	17	1,4	1,9	2,5	2,6	2	2	4	4
		4	17	1,5	2	2,1	2,5	2	3	4	4
		5	17	1,4	2,5	2,5	2,7	2	2	4	4
Suma		352	24	57,1	45	48,6	40	52	80	80	
Promedio		18	1,2	2,9	2,2	2,4	2	3	4	4	

INDICADORES AGRONÓMICOS											
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS	GERMINACIÓN (DÍAS)	ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS			
				S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
				5 MUTA AR1	1	1	14	2	2,5	2,6	2,9
2	15	2,1	2,5			2,6	2,9	2	4	4	5
3	14	2	2,6			2,6	2,8	2	4	4	5
4	17	1,6	2,2			2,3	2,6	2	3	4	4
5	18	1,5	2,1			2,3	2,6	2	4	4	4
2	1	14	1,8		2,5	2,5	2,6	2	3	4	4
	2	13	1,8		2,4	2,5	2,7	2	4	4	5
	3	15	1,5		1,9	1,9	2,2	2	4	4	5
	4	12	2,5		2,6	2,6	2,8	2	4	4	4
	5	16	1		1,7	2,1	2,5	2	4	4	5
3	1	19	0,5		1,9	2	2,1	2	2	4	4
	2	14	1,8		2,1	2,2	2,4	2	4	4	4
	3	14	1,3		1,9	2	2,2	2	4	4	5
	4	18	0,9		1,4	1,6	1,9	2	2	4	4
	5	18	1		1,9	2,1	2,2	2	2	4	5
4	1	17	1,2		2	2,1	2,2	2	2	4	4
	2	17	1		2	2,1	2,3	2	4	4	5
	3	14	2		2,3	2,3	2,6	2	4	4	5
	4	14	1,6		1,9	2	2,2	2	4	4	4
	5	16	1,5		2	2,1	2,3	2	3	4	4
Suma		309	31	42,4	45	49	40	69	80	89	
Promedio		15	1,5	2,1	2,2	2,5	2	3	4	4	

PLÁNTULAS DE TOMATE											
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS	INDICADORES AGRONÓMICOS								
			GERMINACIÓN (DÍAS)	ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS			
				S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
6 MUTA AR2	1	1	19	1,2	2	2,3	2,4	2	2	4	4
		2	19	1	1,3	1,8	2	2	2	4	4
		3	18	1,1	1,7	1,8	2,1	2	2	4	4
		4	18	1,1	1,7	2	2,2	2	2	4	4
		5	18	1,3	1,6	2	2,2	2	2	4	4
	2	1	18	1,2	1,5	1,8	2	2	2	4	4
		2	18	1,1	1,5	1,8	2	2	4	4	4
		3	23	1	1,3	1,7	1,8	2	2	4	4
		4	18	1,1	1,6	2	2,3	2	2	4	4
		5	19	1	1,3	1,9	2	2	2	4	4
	3	1	20	1	1,5	1,8	2	2	2	4	4
		2	18	1,3	1,8	2	2,3	2	2	4	4
		3	19	0,8	1,3	2,8	2	2	2	4	4
		4	19	1,2	1,4	2	2,3	2	3	4	5
		5	15	1,6	2,5	2,5	3	2	4	4	5
	4	1	18	1,2	1,9	2,5	2,6	2	4	4	5
		2	19	0,5	1,5	2	2,1	2	2	4	4
		3	18	1,1	1,8	2	2,3	2	4	4	5
		4	19	0,8	1,5	2	2,3	2	2	4	4
		5	19	1,1	1,9	2	2,2	2	2	4	4
Suma		372	22	32,6	41	44	40	49	80	84	
Promedio		19	1,1	1,6	2	2,2	2	2	4	4	

Anexo 13. Datos en semanas de los indicadores agronómicos de los tratamientos 7, 8 y 9 en plántulas de tomate.

PLÁNTULAS DE TOMATE												
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS	INDICADORES AGRONÓMICOS									
			GERMINACIÓN (DÍAS)	ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS				
				S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	
7 MUTA AR4	1	1	16	1,7	2,2	2,7	3,3	2	4	5	5	
		2	16	1,5	2,1	2,7	3,2	2	4	5	6	
		3	18	1,2	2	2,6	3,2	2	4	5	5	
		4	18	1,4	2,1	2,6	3,2	2	3	5	5	
		5	17	1,5	2,2	2,7	3,2	2	4	5	6	
	2	1	18	1,4	2	2,3	2,7	2	4	4	4	
		2	21	0,3	1,7	2,3	2,7	2	4	4	5	
		3	19	0,5	1,6	2,3	2,5	2	4	4	5	
		4	19	0,5	1,6	2,2	2,5	2	4	4	4	
		5	19	1,2	2	2,5	2,8	2	3	5	5	
	3	1	18	1,1	2,1	2,3	2,8	2	3	5	5	
		2	17	1,8	2,8	3,3	3,5	2	4	5	5	
		3	17	1,7	2,3	2,7	3,2	2	3	5	6	
		4	18	1,2	2,4	2,7	3,3	2	4	4	5	
		5	18	1,3	2,3	2,7	3,2	2	4	5	5	
	4	1	19	1	2,3	3,1	3,3	2	4	5	5	
		2	13	1,8	2,3	2,5	3	2	4	5	5	
		3	19	0,9	2	2,5	3,2	2	4	5	5	
		4	17	1,6	2,1	2,5	3	2	3	4	4	
		5	17	1,5	2,3	3	3,8	2	4	5	5	
Suma		354	25	42,4	52	62	40	75	94	100		
Promedio		18	1,3	2,1	2,6	3,1	2	4	5	5		

PLÁNTULAS DE TOMATE												
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS	INDICADORES AGRONÓMICOS									
			GERMINACIÓN (DÍAS)	ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS				
				S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	
8 MUTA AR5	1	1	17	1,2	1,9	2,3	2,6	2	4	4	4	
		2	18	0,5	1,4	1,7	2	2	4	4	4	
		3	18	1	1,6	1,9	2,2	2	2	4	4	
		4	17	1,2	1,9	2,1	2,5	2	2	4	5	
		5	21	0,6	1,5	1,8	2,2	2	2	4	4	
	2	1	19	0,7	1,4	1,7	1,9	2	2	4	4	
		2	19	0,5	1	1,6	1,8	2	4	4	4	
		3	19	0,6	1,4	2	2,3	2	2	4	4	
		4	20	0,9	1,5	1,8	2,2	2	2	4	4	
		5	20	0,9	1,3	1,6	2,1	2	2	4	4	
	3	1	26	0,6	1	1,5	2	2	2	4	4	
		2	19	0,7	1,3	1,7	2,1	2	2	4	4	
		3	17	1,2	1,6	1,9	2,2	2	2	4	4	
		4	17	1,2	1,6	1,7	2,2	2	2	4	4	
		5	19	0,7	1,6	1,7	2,1	2	2	4	4	
	4	1	18	1	1,6	1,7	2,1	2	2	4	4	
		2	18	1	1,5	1,6	1,8	2	4	4	4	
		3	21	0,5	1	1,4	1,7	2	2	4	4	
		4	21	0,5	1,2	1,5	1,7	2	2	4	4	
		5	19	1	1,5	1,9	2,2	2	2	4	4	
Suma		383	17	28,8	35	62	40	48	80	81		
Promedio		19	0,8	1,4	1,8	3,1	2	2	4	4		

PLÁNTULAS DE TOMATE												
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS	INDICADORES AGRONÓMICOS									
			GERMINACIÓN (DÍAS)	ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS				
				S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	
9 MUTA AS6	1	1	17	1,3	2,2	2,5	2,9	2	2	4	4	
		2	17	1,3	2	2,1	2,4	2	4	4	4	
		3	19	1	1,9	2,3	2,5	2	2	4	4	
		4	18	1	1,7	2,2	2,6	2	4	4	4	
		5	17	1,7	2,5	2,7	2,9	2	4	4	4	
	2	1	18	1	2	2,3	2,5	2	4	4	5	
		2	18	1,2	1,9	2,1	2,5	2	2	4	4	
		3	18	1,2	1,9	2	2,3	2	2	4	4	
		4	20	0,9	1,9	2,3	2,6	2	2	4	4	
		5	17	1,2	1,6	1,9	2,3	2	2	4	4	
	3	1	17	1,3	1,9	2	2,4	2	4	4	5	
		2	16	1,2	1,4	1,8	2,2	2	2	4	4	
		3	19	0,8	1,7	1,8	2	2	2	4	4	
		4	18	1,1	1,7	2	2,3	2	2	4	4	
		5	21	0,5	1,3	1,8	2,1	2	2	4	4	
	4	1	17	1,1	1,9	2	2,4	2	2	4	4	
		2	15	2,1	2,5	2,6	2,9	2	4	4	5	
		3	16	1,8	2,3	2,5	3	2	4	4	5	
		4	14	1,4	2,3	2,5	2,9	2	4	4	5	
		5	17	1,4	2,3	2,5	3	2	3	4	4	
Suma		349	25	38,9	44	51	40	57	80	85		
Promedio		17	1,2	1,9	2,2	2,5	2	3	4	4		

Anexo 14. Datos en semanas de los indicadores agronómicos de los tratamientos 10, 11 y 12 en plántulas de tomate.

PLÁNTULAS DE TOMATE													
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS GERMINACIÓN (DÍAS)	INDICADORES AGRONÓMICOS										
			ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS						
			S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4			
10 ZUTA AS1	1	1	18	1	1,6	1,9	2,4	2	2	4	4		
		2	18	1,1	1,9	2	2,5	2	2	4	5		
		3	20	0,9	1,7	2,2	2,7	2	2	4	5		
		4	21	0,5	1,8	2	2,4	2	2	4	4		
		5	19	1	1,5	2	2,5	2	2	4	5		
	2	1	22	0,6	1,3	2	2,4	2	2	4	4		
		2	20	0,5	1,2	2	2,4	2	2	4	4		
		3	22	0,6	1	1,8	2,3	2	2	4	4		
		4	20	0,8	1,5	1,8	2,4	2	2	4	4		
		5	19	1	1,6	2	2,4	2	2	4	5		
	3	1	14	2,2	2,5	3	3,5	2	4	5	5		
		2	18	1,3	2	2,4	3	2	4	5	5		
		3	23	1	1,6	2,2	2,7	2	2	4	4		
		4	28	1,4	2,6	2,7	3	2	4	5	5		
		5	28	1,3	2	2,6	3,1	2	4	5	5		
	4	1	19	1	1,6	2,1	2,5	2	2	4	4		
		2	18	1	1,5	2	2,4	2	3	4	4		
		3	14	1,4	1,5	2	2,3	2	3	4	4		
		4	14	1,6	1,5	1,9	2,3	2	4	4	5		
		5	19	0,5	1,5	2	2,4	2	2	4	4		
Suma		394	20,7	33	43	52	40	52	84	89			
Promedio		20	1,0	1,7	2,1	2,6	2	3	4	4			

PLÁNTULAS DE TOMATE													
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS GERMINACIÓN (DÍAS)	INDICADORES AGRONÓMICOS										
			ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS						
			S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4			
11 ZUTA AS1.1	1	1	17	1,3	2,2	2,3	2,5	2	3	4	4		
		2	13	1,7	2,2	2,3	2,5	2	4	4	5		
		3	22	1	1,5	2,1	2,3	2	2	4	4		
		4	21	0,5	1,7	2	2,3	2	2	4	4		
		5	15	1,2	2	2,1	2,4	2	3	4	4		
	2	1	18	1	1,7	1,9	2,3	2	3	4	4		
		2	17	1,1	1,6	1,8	2,2	2	2	4	4		
		3	19	0,9	1,5	1,8	2,3	2	3	4	4		
		4	15	1,5	1,7	1,9	2,3	2	4	4	4		
		5	17	1,4	1,7	1,9	2,3	2	3	4	4		
	3	1	20	1	1,5	1,7	2	2	2	4	4		
		2	15	1,3	1,6	1,8	2,2	2	4	4	4		
		3	16	1,5	2	2,2	2,6	2	4	4	5		
		4	20	1	1,6	2	2,3	2	2	4	4		
		5	16	1,5	1,7	2,1	2,4	2	4	4	4		
	4	1	15	1,3	1,5	1,7	1,9	2	2	4	4		
		2	15	1,3	1,5	2	2,4	2	4	4	4		
		3	17	1,2	1,5	1,7	2	2	2	4	4		
		4	19	0,8	1,5	2	2,2	2	3	4	4		
		5	19	0,7	1,4	1,8	2,1	2	2	4	4		
Suma		346	23,2	34	39	46	40	58	80	82			
Promedio		17	1,2	1,7	2	2,3	2	3	4	4			

PLÁNTULAS DE TOMATE													
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS GERMINACIÓN (DÍAS)	INDICADORES AGRONÓMICOS										
			ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS						
			S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4			
12 SHUTA AR2	1	1	17	1,8	2,5	2,9	3,5	2	4	5	6		
		2	17	1,6	2	2,4	3	2	4	5	6		
		3	19	0,5	2,1	2,4	2,7	2	2	4	5		
		4	21	0,3	2	2,5	3	2	2	4	5		
		5	19	0,5	1,8	2,2	2,6	2	2	4	4		
	2	1	18	0,5	1,3	1,8	2	2	2	4	4		
		2	18	0,6	1,3	1,8	2,1	2	2	4	4		
		3	19	1,2	1,5	2,1	2,4	2	2	4	4		
		4	20	0,9	1,8	2	2,3	2	2	4	4		
		5	19	0,5	1,3	1,9	2,3	2	2	4	4		
	3	1	22	0,6	1,3	1,6	1,9	2	2	4	4		
		2	19	0,5	1,9	2,1	2,3	2	2	4	4		
		3	18	1,2	1,8	2	2,4	2	2	4	4		
		4	18	1,2	1,8	2,1	2,5	2	4	4	5		
		5	18	1,2	1,7	2,1	2,4	2	4	4	5		
	4	1	21	0,3	1,6	2	2,4	2	2	4	4		
		2	18	0,5	1,3	1,8	2,3	2	2	4	4		
		3	20	0,3	1	1,7	2	2	2	4	4		
		4	23	0,5	1,5	1,7	2	2	2	4	4		
		5	24	0,3	1	1,8	2,4	2	2	4	4		
Suma		388	15	33	41	48,5	40	48	82	88			
Promedio		19	0,8	1,6	2	2,4	2	2	4	4			

Anexo 15. Datos en semanas de los indicadores agronómicos de los tratamientos 13, 14 y 15 en plántulas de tomate.

PLÁNTULAS DE TOMATE											
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS	INDICADORES AGRONÓMICOS								
			GERMINACIÓN (DÍAS)	ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS			
				S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
13 SHUTA AS1	1	1	17	1,5	2,2	3	3,5	2	4	5	5
		2	16	2	2,7	3,5	4	2	4	5	6
		3	16	1,7	2,5	3	3,5	2	4	5	6
		4	18	1,6	2,2	2,7	3,2	2	4	5	5
		5	19	0,5	1,9	2,6	3,2	2	2	4	5
	2	1	18	1	1,5	2	2,5	2	4	4	4
		2	19	0,5	1,7	2,3	2,6	2	2	4	4
		3	21	0,8	1,4	2	2,5	2	2	4	4
		4	18	1	1,5	1,9	2,1	2	2	4	4
		5	18	1	1,6	2,2	2,5	2	2	4	4
	3	1	20	0,3	1,4	1,7	1,9	2	2	4	4
		2	22	0,5	1,6	2	2,2	2	2	4	4
		3	22	0,5	1	1,8	2	2	2	4	4
		4	25	0,6	1	1,7	1,9	2	2	4	4
		5	18	1,2	2	2,3	2,5	2	4	4	5
	4	1	18	1,5	2,2	2,3	2,5	2	3	4	4
		2	14	2,3	2,8	2,1	3,3	2	4	4	4
		3	19	1	2,1	2,3	2,5	2	2	4	4
		4	19	1	1,9	2	2,3	2	2	4	4
		5	19	1	1,7	2	2,4	2	2	4	4
Suma		376	22	37	45	53,1	40	55	84	88	
Promedio		19	1,1	1,8	2,3	2,7	2	3	4	4	

PLÁNTULAS DE TOMATE											
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS	INDICADORES AGRONÓMICOS								
			GERMINACIÓN (DÍAS)	ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS			
				S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
14 SHUTA AS3	1	1	24	0,5	1	1,8	2,2	2	2	4	4
		2	21	0,4	0,8	1,3	1,7	2	2	4	4
		3	20	0,9	1	1,5	1,8	2	2	4	4
		4	22	0,6	1,3	1,7	2	2	2	4	4
		5	17	1,3	1,7	1,8	2	2	2	4	4
	2	1	19	0,3	0,9	1,3	1,5	2	2	4	4
		2	24	0,4	0,9	1,3	1,5	2	2	4	4
		3	24	0,5	1,2	1,3	1,5	2	2	4	4
		4	20	0,4	1	1,4	1,6	2	2	4	4
		5	21	0,5	0,9	1,4	1,7	2	2	4	4
	3	1	22	0,4	0,9	1,4	1,6	2	2	4	4
		2	20	0,5	1	1,6	1,8	2	2	4	4
		3	21	0,4	1	1,3	1,5	2	2	4	4
		4	21	0,4	0,8	1,3	1,5	2	2	4	4
		5	21	0,9	1	1,5	1,7	2	2	4	4
	4	1	24	0,5	1	1,2	1,4	2	2	4	4
		2	21	0,4	0,8	1,3	1,6	2	2	4	4
		3	21	0,3	1,2	1,5	1,8	2	2	4	4
		4	21	0,4	0,8	1,3	1,7	2	2	4	4
		5	20	0,8	1,4	1,9	2,2	2	4	4	4
Suma		424	11	21	29	34,3	40	42	80	80	
Promedio		21	0,5	1	1,5	1,7	2	2	4	4	

PLÁNTULAS DE TOMATE											
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS	INDICADORES AGRONÓMICOS								
			GERMINACIÓN (DÍAS)	ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS			
				S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
15 SHUTA AS4	1	1	18	0,4	0,8	1,2	1,5	2	2	4	4
		2	18	0,4	0,9	1,2	1,5	2	2	4	4
		3	18	0,3	0,8	1,6	1,9	2	2	4	4
		4	19	0,5	0,7	1,3	1,5	2	2	4	4
		5	18	0,5	0,7	1,3	1,5	2	2	4	4
	2	1	20	0,4	0,6	1,3	1,5	2	2	4	4
		2	18	0,3	0,8	1,2	1,6	2	2	4	4
		3	13	1	1,5	1,7	2	2	2	4	4
		4	19	0,6	1	1,5	1,8	2	2	4	4
		5	14	1	1,5	1,7	2	2	2	4	4
	3	1	14	0,9	1,5	1,8	2,2	2	2	4	4
		2	15	0,8	1,3	1,7	2,1	2	2	4	4
		3	19	0,5	1	1,5	1,8	2	2	4	4
		4	13	1	1,5	1,7	2	2	2	4	4
		5	18	0,8	1,5	1,7	2	2	2	4	4
	4	1	15	0,8	1,3	1,6	2,1	2	2	4	4
		2	20	0,6	1	1,4	1,7	2	2	4	4
		3	21	0,3	0,9	1,5	1,7	2	2	4	4
		4	12	1	1,2	1,4	1,8	2	2	4	4
		5	15	0,8	1	1,3	1,7	2	2	4	4
Suma		337	13	22	30	35,9	40	40	80	80	
Promedio		17	0,6	1,1	1,5	1,8	2	2	4	4	

Anexo 16. Datos en semanas de los indicadores agronómicos del tratamiento 16 en plántulas de tomate.

PLÁNTULAS DE TOMATE											
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS	INDICADORES AGRONÓMICOS								
			GERMINACIÓN (DÍAS)	ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS			
				S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
16 T1	1	1	18	1	1,5	1,6	2	2	2	4	4
		2	18	1,1	1,5	1,6	2	2	2	4	4
		3	17	1,2	1,5	1,8	2	2	3	4	4
		4	17	1,5	1,9	2	2,4	2	3	4	4
		5	18	1	1,3	1,3	1,7	2	2	4	4
	2	1	19	0,9	1,5	1,6	1,8	2	2	4	4
		2	17	1,3	1,5	1,6	1,8	2	2	4	4
		3	19	0,5	1,5	1,6	1,8	2	2	4	4
		4	18	1	1,6	1,8	2	2	3	4	4
		5	18	1	1,6	1,7	2	2	3	4	4
	3	1	18	1	1,5	1,7	1,9	2	2	4	4
		2	14	1,5	2	2,1	2,4	2	3	4	4
		3	19	0,8	1,5	1,6	1,9	2	2	4	4
		4	19	0,8	1,5	1,6	1,8	2	2	4	4
		5	20	0,8	1,6	1,8	2	2	2	4	4
	4	1	19	0,8	1,6	1,7	2,1	2	2	4	4
		2	19	0,8	1,6	1,7	2	2	2	4	4
		3	19	0,8	1,5	1,6	1,8	2	2	4	4
		4	20	0,7	1,5	1,7	2,1	2	2	4	4
		5	24	0,8	1,1	1,5	1,8	2	2	4	4
Suma			370	19	30,8	33,6	39	40	45	80	80
Promedio			19	1	1,5	1,7	2	2	2	4	4

Anexo 17. Datos en semanas de los indicadores agronómicos de los tratamientos 1, 2 y 3 en plántulas de lechuga.

PLÁNTULAS DE LECHUGA												
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS	INDICADORES AGRONÓMICOS									
			GERMINACIÓN (DÍAS)	ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS				
				S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	
1 AUTA AR2	1	1	17	0,8	1,5	2,3	2,9	2	2	4	4	4
		2	16	0,8	1,7	2,5	3	2	4	5	5	5
		3	20	0,5	1	1,8	2,5	2	3	5	5	5
		4	18	0,6	1	1,5	2,2	2	2	4	4	4
		5	16	0,8	1,5	2,3	2,8	2	4	4	4	5
	2	1	19	0,6	1,1	1,8	2,4	2	2	4	4	4
		2	17	0,7	1,5	2,3	2,8	2	2	4	4	4
		3	16	0,8	1,6	2,5	3,1	2	4	4	5	5
		4	19	0,5	1,1	1,8	2,4	2	2	4	4	4
		5	16	0,8	1,7	2,5	3	2	3	4	4	4
	3	1	18	0,5	1	1,5	2,2	2	2	4	4	4
		2	17	0,6	1,5	2,2	2,7	2	3	4	5	5
		3	17	0,8	1,5	2,2	2,9	2	3	4	4	4
		4	16	0,8	1,7	2,4	2,9	2	4	4	4	4
		5	19	0,6	1,2	2	2,5	2	2	4	5	5
	4	1	18	0,6	1,1	1,9	2,4	2	2	4	4	4
		2	17	0,8	1,5	2	2,5	2	3	4	4	4
		3	17	0,8	1,5	2,1	2,7	2	2	4	4	4
		4	16	0,8	1,6	2,3	2,9	2	4	5	5	5
		5	16	0,7	1,5	2	2,7	2	4	5	5	5
Suma		345	14	27,8	42	53,5	40	57	84	88		
Promedio		17	0,7	1,4	2,1	2,7	2	3	4	4		

PLÁNTULAS DE LECHUGA												
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS	INDICADORES AGRONÓMICOS									
			GERMINACIÓN (DÍAS)	ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS				
				S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	
2 AUTA AR6	1	1	22	0,5	1,5	2,4	3	2	3	5	5	5
		2	17	0,8	1,7	2,5	3,5	2	4	5	5	5
		3	17	0,8	1,8	2,6	3,5	2	4	5	5	5
		4	16	1	1,7	2,5	3,6	2	4	5	5	5
		5	19	0,6	1,3	2,8	3,4	2	4	5	5	5
	2	1	18	0,9	1,7	2,7	3,6	2	4	5	5	5
		2	15	1	1,8	2,7	3,6	2	4	5	5	5
		3	17	0,8	1,7	2,6	3,6	2	4	5	5	5
		4	15	1	1,9	2,7	3,6	2	4	5	5	5
		5	19	0,6	1,4	2,7	3,5	2	4	4	5	5
	3	1	19	0,5	1,4	2,5	3,4	2	4	4	5	5
		2	22	0,5	1,6	2,5	3,1	2	3	4	5	5
		3	21	0,6	1,5	2,5	3	2	3	5	5	5
		4	17	0,8	1,7	2,4	3,5	2	4	5	5	5
		5	20	0,6	1,2	2,7	3,3	2	4	4	5	5
	4	1	19	0,6	1,3	2,7	3,3	2	4	4	5	5
		2	17	0,7	1,5	2,4	3,4	2	5	5	5	5
		3	17	0,8	1,5	2,5	3	2	5	5	5	5
		4	18	0,7	1,3	2,4	3,3	2	4	4	5	5
		5	16	0,8	1,8	2,5	3,6	2	5	5	5	5
Suma		361	15	31,3	49	67,8	40	80	94	100		
Promedio		18	0,7	1,6	2,4	3,4	2	4	5	5		

PLÁNTULAS DE LECHUGA												
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS	INDICADORES AGRONÓMICOS									
			GERMINACIÓN (DÍAS)	ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS				
				S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	
3 AUTA AS4	1	1	22	0,5	1,3	2,4	2,8	2	2	3	4	4
		2	13	1	1,7	2,8	3,5	2	3	3	4	4
		3	16	0,8	1,3	2,7	3,1	2	2	4	5	5
		4	17	0,6	1,1	2,5	3	2	2	3	5	5
		5	19	0,3	0,9	1,5	2	2	2	3	5	5
	2	1	17	0,7	1,4	2,3	2,8	2	2	3	4	4
		2	18	0,5	1,3	2,4	2,7	2	2	3	4	4
		3	18	0,6	1,1	2,3	2,7	2	2	3	5	5
		4	20	0,5	1	1,5	2	2	2	3	4	4
		5	21	0,5	1	1,4	1,8	2	2	3	4	4
	3	1	17	0,6	1,1	1,9	2,4	2	2	4	5	5
		2	16	0,8	1,3	2,5	3	2	3	4	5	5
		3	21	0,3	1	1,4	2,7	2	2	3	5	5
		4	15	0,8	1,5	2,4	3	2	4	4	5	5
		5	21	0,4	0,9	1,4	1,9	2	2	3	4	4
	4	1	20	0,5	1	1,4	1,9	2	2	3	4	4
		2	19	0,4	0,9	1,5	1,8	2	2	4	5	5
		3	17	0,6	1,5	2,1	2,6	2	2	4	5	5
		4	15	0,7	1,2	2,4	2,9	2	3	4	5	5
		5	21	0,4	1	1,4	1,7	2	2	3	4	4
Suma		363	12	23,5	40	50,3	40	45	67	91		
Promedio		18	0,6	1,18	2	2,52	2	2	3	5		

Anexo 18. Datos en semanas de los indicadores agronómicos de los tratamientos 4, 5 y 6 en plántulas de lechuga.

PLÁNTULAS DE LECHUGA											
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS	INDICADORES AGRONÓMICOS								
			GERMINACIÓN (DÍAS)	ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS			
				S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
4 AUTA AS5	1	1	23	0,3	0,9	1,5	1,7	2	2	3	4
		2	16	0,5	0,8	1,4	1,8	2	3	4	5
		3	14	0,5	0,9	1,5	1,8	2	3	4	5
		4	20	0,3	0,8	1,4	1,6	2	2	3	4
		5	13	0,7	1,3	1,8	2,4	2	3	4	5
	2	1	18	0,6	1,2	1,7	2	2	3	3	4
		2	17	0,5	1,2	1,6	1,9	2	3	4	5
		3	14	0,5	1	1,5	1,9	2	3	4	5
		4	13	0,6	1	1,4	1,8	2	3	4	5
		5	14	0,6	1	1,5	1,8	2	3	4	5
	3	1	17	0,5	1	1,5	2	2	3	4	4
		2	20	0,4	0,7	1	1,5	2	2	3	4
		3	19	0,5	1	1,5	2	2	2	3	4
		4	18	0,6	1	1,5	1,9	2	3	4	5
		5	18	0,5	1,1	1,7	2	2	3	4	5
	4	1	17	0,6	1,1	1,5	1,8	2	3	4	5
		2	17	0,5	1	1,4	1,7	2	3	4	5
		3	20	0,3	0,9	1,4	1,8	2	3	3	4
		4	15	0,7	1,4	1,9	2,3	2	3	4	5
		5	15	0,7	1,5	1,9	2,3	2	3	4	5
Suma			338	10	20,8	31	38	40	56	74	93
Promedio			17	0,5	1,0	1,5	1,9	2	3	4	5

PLÁNTULAS DE LECHUGA											
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS	INDICADORES AGRONÓMICOS								
			GERMINACIÓN (DÍAS)	ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS			
				S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
5 MUTA AR1	1	1	13	0,8	1,2	1,7	2,5	2	4	5	5
		2	14	0,8	1,4	1,8	2,6	2	4	5	5
		3	18	0,6	1,2	1,8	2,4	2	4	5	5
		4	20	0,5	1	1,5	2	2	4	4	5
		5	23	0,3	0,9	1,4	1,8	2	3	4	5
	2	1	15	0,7	1,3	1,7	2,5	2	4	4	5
		2	18	0,7	1,3	1,2	2,5	2	4	4	5
		3	18	0,7	1,2	1,5	2,3	2	4	4	5
		4	17	0,6	1,2	1,7	2,1	2	3	4	5
		5	15	0,6	1,3	1,7	2,1	2	3	4	5
	3	1	17	0,6	1,3	1,5	2	2	4	4	5
		2	20	0,5	1	1,4	1,8	2	3	4	4
		3	14	0,7	1,1	1,6	2,2	2	4	4	5
		4	15	0,7	1,3	1,7	2,4	2	4	4	5
		5	15	0,7	1,2	1,5	2,1	2	4	4	5
	4	1	13	0,8	1,2	1,7	2,5	2	4	4	5
		2	20	0,5	1,1	1,6	2	2	3	4	4
		3	22	0,6	1	1,5	1,9	2	3	4	5
		4	14	0,7	1,2	1,5	2,2	2	4	4	5
		5	21	0,4	1	1,5	1,9	2	3	4	4
Suma			342	13	23,4	32	44	40	73	83	97
Promedio			17	0,6	1,2	1,6	2,2	2	4	4	5

PLÁNTULAS DE LECHUGA											
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS	INDICADORES AGRONÓMICOS								
			GERMINACIÓN (DÍAS)	ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS			
				S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
6 MUTA AR2	1	1	13	0,8	1,2	1,7	2,4	2	4	5	5
		2	14	0,9	1,5	1,9	2,6	2	4	5	5
		3	18	0,6	1,2	1,8	2,4	2	4	5	5
		4	20	0,5	1,1	1,5	2,1	2	4	4	5
		5	23	0,3	0,9	1,4	1,8	2	3	4	5
	2	1	15	0,7	1,3	1,7	2,5	2	4	5	5
		2	18	0,6	1,2	1,5	2,3	2	4	4	5
		3	18	0,7	1,2	1,5	2,3	2	4	4	5
		4	17	0,6	1,2	1,6	2,3	2	3	4	5
		5	15	0,7	1,3	1,7	2,4	2	3	4	5
	3	1	17	0,7	1,3	1,5	2,1	2	4	4	5
		2	20	0,5	1,1	1,5	1,8	2	3	3	4
		3	14	0,7	1,3	1,6	2,4	2	4	5	5
		4	15	0,7	1,3	1,7	2,4	2	4	5	5
		5	15	0,7	1,2	1,5	2,2	2	4	5	5
	4	1	13	0,8	1,2	1,8	2,4	2	4	4	5
		2	20	0,5	1,1	1,5	2	2	3	4	4
		3	22	0,6	1	1,3	1,9	2	3	4	5
		4	14	0,7	1,2	1,5	2,2	2	4	4	5
		5	21	0,4	1	1,4	1,9	2	3	4	4
Suma			342	13	23,8	32	44	40	73	86	97
promedio			17	0,6	1,2	1,6	2,2	2	4	4	5

Anexo 19. Datos en semanas de los indicadores agronómicos de los tratamientos 7, 8 y 9 en plántulas de lechuga.

PLÁNTULAS DE LECHUGA											
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS	INDICADORES AGRONÓMICOS								
			GERMINACIÓN (DÍAS)	ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS			
				S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
7 MUTA AR4	1	1	20	0,5	1,3	2,4	3,1	2	4	4	5
		2	17	0,8	1,7	2,5	3,3	2	4	5	5
		3	18	0,8	1,8	2,6	3,5	2	4	5	5
		4	16	1	1,7	2,5	3,6	2	3	4	5
		5	18	0,6	1,3	2,8	3,4	2	4	5	5
	2	1	18	0,9	1,7	2,5	3,5	2	4	5	5
		2	16	1	1,8	2,7	3,6	2	3	4	5
		3	17	0,8	1,7	2,6	3,5	2	4	4	5
		4	15	1	1,9	2,7	3,6	2	4	5	5
		5	18	0,6	1,4	2,7	3,5	2	4	4	5
	3	1	19	0,5	1,4	2,5	3,4	2	4	4	5
		2	22	0,5	1,6	2,5	3,1	2	4	4	5
		3	21	0,6	1,5	2,5	2,9	2	4	5	5
		4	17	0,8	1,7	2,6	3,4	2	4	5	5
		5	20	0,6	1,2	2,7	3,3	2	4	4	5
	4	1	19	0,6	1,3	2,7	3,3	2	4	4	5
		2	17	0,8	1,4	2,5	3,4	2	4	5	5
		3	16	0,8	1,4	2,4	3,1	2	4	5	5
		4	18	0,7	1,3	2,4	3,3	2	4	4	5
		5	16	0,8	1,8	2,5	3,6	2	3	5	5
Suma		358	15	30,9	49	67	40	77	90	100	
Promedio		18	0,7	1,5	2,4	3,4	2	4	5	5	

PLÁNTULAS DE LECHUGA											
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS	INDICADORES AGRONÓMICOS								
			GERMINACIÓN (DÍAS)	ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS			
				S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
8 MUTA AR5	1	1	15	0,5	1	1,5	2	2	3	4	5
		2	20	0,3	0,6	1,1	1,5	2	2	3	4
		3	24	0,3	0,7	1,2	1,7	2	2	3	4
		4	20	0,3	0,6	1,2	1,4	2	2	3	4
		5	21	0,4	0,7	1,2	1,5	2	2	3	4
	2	1	14	0,6	1,2	1,7	2,1	2	3	4	5
		2	16	0,5	1,1	1,5	1,9	2	3	4	5
		3	22	0,3	1,7	1,1	1,6	2	3	4	4
		4	16	0,5	1,1	1,6	2,1	2	3	4	5
		5	18	0,6	1,2	1,7	2,3	2	2	3	4
	3	1	20	0,3	0,7	1,2	1,4	2	2	3	4
		2	21	0,5	0,8	1,3	1,6	2	2	3	4
		3	21	0,4	0,7	1,2	1,4	2	2	3	4
		4	17	0,6	1	1,5	2	2	2	3	4
		5	15	0,6	1,1	1,6	2,1	2	3	4	5
	4	1	20	0,4	0,8	1,2	1,8	2	2	3	4
		2	18	0,7	1,3	1,8	2,3	2	2	3	4
		3	17	0,7	1,2	1,5	1,9	2	2	3	4
		4	20	0,3	0,8	1,4	1,8	2	2	3	4
		5	17	0,4	0,9	1,5	1,9	2	2	3	4
Suma		372	9,2	19,2	28	36	40	46	66	85	
Promedio		19	0,5	1,0	1,4	1,8	2	2	3	4	

PLÁNTULAS DE LECHUGA											
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS	INDICADORES AGRONÓMICOS								
			GERMINACIÓN (DÍAS)	ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS			
				S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
9 MUTA AS6	1	1	15	0,6	1,2	1,7	2,2	2	4	4	5
		2	20	0,3	0,6	1,1	1,5	2	2	4	5
		3	24	0,4	0,9	1,5	1,9	2	2	3	4
		4	20	0,3	0,6	1,2	1,4	2	2	3	4
		5	21	0,6	1	1,5	1,9	2	3	4	5
	2	1	14	0,9	1,5	2	2,5	2	4	5	5
		2	16	0,5	1,1	1,5	1,9	2	4	5	5
		3	22	0,9	1,5	2	2,5	2	2	3	4
		4	16	0,5	1,1	1,6	2,1	2	4	5	5
		5	18	0,6	1,2	1,7	2,3	2	3	4	5
	3	1	20	0,6	1,2	1,7	2,2	2	2	3	4
		2	21	0,3	0,6	1,1	1,5	2	2	3	4
		3	21	0,4	0,9	1,5	1,9	2	2	3	4
		4	17	0,3	0,6	1,2	1,4	2	4	5	5
		5	15	0,6	1	1,5	1,9	2	4	5	5
	4	1	20	0,4	0,8	1,2	1,8	2	2	3	4
		2	18	0,7	1,3	1,8	2,3	2	3	4	5
		3	17	0,7	1,2	1,5	1,9	2	3	4	5
		4	20	0,3	0,8	1,4	1,8	2	2	3	4
		5	17	0,4	0,9	1,5	1,9	2	4	5	5
Suma		372	10	20	30	39	40	58	78	92	
Promedio		19	0,5	1	1,5	1,9	2	3	4	5	

Anexo 20. Datos en semanas de los indicadores agronómicos de los tratamientos 10, 11 y 12 en plántulas de lechuga.

PLÁNTULAS DE LECHUGA												
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS GERMINACIÓN (DÍAS)	INDICADORES AGRONÓMICOS									
			ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS					
			S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4		
10 ZUTA AS1	1	1	22	0,5	1,3	2,5	3	2	2	3	4	
		2	13	0,9	1,7	2,8	3,5	2	4	5	5	
		3	16	0,8	1,4	2,7	3	2	2	4	5	
		4	17	0,6	1,1	2,4	2,9	2	2	4	5	
		5	19	0,3	1	1,5	2	2	2	4	5	
	2	1	17	0,7	1,5	2,3	2,9	2	2	3	4	
		2	18	0,6	1,3	2,4	2,7	2	2	3	4	
		3	18	0,6	1	2,3	2,7	2	2	3	5	
		4	20	0,5	1,1	1,5	2,1	2	2	4	4	
		5	21	0,5	1	1,4	1,8	2	2	4	4	
	3	1	17	0,6	1,1	1,9	2,4	2	2	4	5	
		2	16	0,8	1,4	2,5	2,9	2	3	4	5	
		3	21	0,3	0,9	1,4	2,7	2	2	3	4	
		4	15	0,7	1,5	2,5	3	2	4	4	5	
		5	21	0,4	0,8	1,4	1,9	2	2	3	4	
	4	1	20	0,3	0,9	1,4	1,8	2	2	3	4	
		2	19	0,4	1	1,5	1,9	2	2	3	4	
		3	17	0,6	1,5	2,2	2,6	2	2	4	5	
		4	15	0,7	1,3	2,4	3	2	3	4	5	
		5	21	0,4	0,9	1,3	1,8	2	2	3	4	
Suma		363	11,2	24	40	51	40	46	72	90		
Promedio		18	0,56	1,2	2	2,5	2	2	4	5		

PLÁNTULAS DE LECHUGA												
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS GERMINACIÓN (DÍAS)	INDICADORES AGRONÓMICOS									
			ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS					
			S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4		
11 ZUTA AS1.1	1	1	18	0,6	1,3	2,5	3	2	2	2	4	
		2	17	0,6	1,7	2,8	3,5	2	2	3	4	
		3	16	0,7	1,4	2,7	3	2	3	3	4	
		4	17	0,5	1,1	2,4	2,9	2	2	3	4	
		5	18	0,6	1	1,5	2	2	3	3	4	
	2	1	17	0,7	1,5	2,3	2,9	2	3	3	4	
		2	18	0,6	1,3	2,4	2,7	2	2	2	4	
		3	18	0,6	1	2,3	2,7	2	2	2	4	
		4	16	0,5	1,1	1,5	2,1	2	2	3	4	
		5	16	0,5	1	1,4	1,8	2	2	3	4	
	3	1	17	0,7	1,1	1,9	2,4	2	3	3	4	
		2	15	0,7	1,4	2,5	2,9	2	2	2	4	
		3	19	0,6	0,9	1,4	2,7	2	2	2	4	
		4	17	0,7	1,5	2,5	3	2	2	2	4	
		5	20	0,6	0,8	1,4	1,9	2	3	3	4	
	4	1	17	0,6	0,9	1,4	1,8	2	3	3	4	
		2	17	0,7	1	1,5	1,9	2	2	3	4	
		3	18	0,6	1,5	2,2	2,6	2	2	2	4	
		4	16	0,7	1,3	2,4	3	2	2	3	4	
		5	20	0,7	0,9	1,3	1,8	2	3	3	4	
Suma		347	12,5	24	40	51	40	47	53	80		
Promedio		17	0,6	1,2	2	2,5	2	2	3	4		

PLÁNTULAS DE LECHUGA												
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS GERMINACIÓN (DÍAS)	INDICADORES AGRONÓMICOS									
			ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS					
			S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4		
12 SHUTA AR2	1	1	15	0,5	1,3	2,5	3	2	3	4	4	
		2	16	0,9	1,6	2,7	3,3	2	3	4	5	
		3	16	0,8	1,4	2,7	3	2	2	3	4	
		4	18	0,6	1,1	2,4	2,9	2	2	4	5	
		5	19	0,3	1	1,5	2,1	2	2	4	5	
	2	1	20	0,7	1,5	2,3	3	2	2	3	4	
		2	21	0,6	1,3	2,4	2,8	2	2	3	4	
		3	18	0,4	0,9	1,3	1,8	2	2	3	4	
		4	20	0,5	1,1	1,6	2,1	2	2	4	5	
		5	22	0,4	1	1,4	1,8	2	2	4	5	
	3	1	20	0,5	1	1,5	1,9	2	2	3	4	
		2	15	0,8	1,4	2,5	2,9	2	3	4	5	
		3	24	0,3	0,9	1,4	2,7	2	2	3	4	
		4	16	0,7	1,5	2,5	3	2	3	4	5	
		5	23	0,4	0,8	1,4	2	2	2	3	4	
	4	1	21	0,3	0,9	1,5	1,9	2	2	4	4	
		2	19	0,4	1	1,5	2	2	2	3	4	
		3	18	0,6	1,5	2,1	2,6	2	2	3	4	
		4	15	0,7	1,3	2,4	2,9	2	3	4	5	
		5	20	0,4	0,9	1,3	1,8	2	2	3	4	
Suma		376	11	23	39	49,5	40	45	70	88		
Promedio		19	0,5	1,2	1,9	2,5	2	2	4	4		

Anexo 21. Datos en semanas de los indicadores agronómicos de los tratamientos 13, 14 y 15 en plántulas de lechuga.

PLÁNTULAS DE LECHUGA												
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS	INDICADORES AGRONÓMICOS									
			GERMINACIÓN (DÍAS)	ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS				
				S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	
13 SHUTA AS1	1	1	14	0,5	1,3	2,4	2,8	2	2	4	5	
		2	13	0,9	1,6	2,7	3	2	3	4	4	
		3	13	0,8	1,4	2,6	3	2	3	4	5	
		4	25	0,5	1,1	2,4	2,9	2	2	3	4	
		5	15	0,3	1	1,5	2	2	2	4	5	
	2	1	22	0,7	1,5	2,3	2,9	2	2	3	4	
		2	15	0,6	1,3	2,5	3	2	2	4	5	
		3	17	0,4	0,9	1,3	1,8	2	2	4	4	
		4	17	0,4	1	1,5	2,3	2	2	4	5	
		5	19	0,4	1,1	1,4	1,7	2	2	3	5	
	3	1	20	0,5	1	1,5	2	2	2	3	4	
		2	15	0,8	1,4	2,5	2,8	2	2	4	5	
		3	15	0,3	0,9	1,4	2,7	2	2	4	5	
		4	13	0,7	1,4	2,4	3	2	3	4	4	
		5	14	0,4	0,8	1,4	2,1	2	2	4	5	
	4	1	17	0,3	0,9	1,5	1,9	2	2	4	4	
		2	18	0,4	1,1	1,5	2,1	2	2	4	5	
		3	17	0,6	1,5	2,2	2,6	2	2	3	4	
		4	20	0,7	1,4	2,4	3	2	2	4	5	
		5	19	0,4	0,9	1,3	1,9	2	2	3	4	
Suma		338	11	24	39	49,5	40	43	74	91		
Promedio		17	0,5	1,2	1,9	2,5	2	2	4	5		

PLÁNTULAS DE LECHUGA												
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS	INDICADORES AGRONÓMICOS									
			GERMINACIÓN (DÍAS)	ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS				
				S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	
14 SHUTA AS3	1	1	22	0,3	0,7	1,3	1,5	2	2	3	4	
		2	25	0,3	0,6	1,2	1,4	2	2	3	4	
		3	16	0,5	1	1,4	1,8	2	3	4	5	
		4	20	0,3	0,7	1,2	1,5	2	2	3	4	
		5	20	0,4	0,8	1,3	1,6	2	2	3	4	
	2	1	17	0,4	0,7	1,1	1,4	2	3	5	5	
		2	18	0,2	0,6	0,9	1,3	2	2	3	4	
		3	18	0,3	0,7	0,8	1,4	2	2	4	5	
		4	17	0,4	0,8	1,3	1,6	2	3	5	5	
		5	20	0,3	0,6	1	1,2	2	2	4	5	
	3	1	17	0,4	0,8	1,1	1,5	2	3	4	5	
		2	15	0,6	0,9	1,4	1,7	2	3	5	5	
		3	15	0,6	0,8	1,3	1,5	2	3	5	5	
		4	17	0,5	0,7	0,9	1,4	2	2	4	5	
		5	17	0,6	0,8	1,1	1,5	2	2	4	5	
	4	1	16	0,5	0,9	1,3	1,7	2	3	4	5	
		2	19	0,4	0,7	1	1,5	2	2	4	5	
		3	17	0,5	0,9	1,3	1,6	2	2	4	5	
		4	18	0,4	0,7	1,2	1,4	2	2	4	5	
		5	19	0,5	0,9	1,3	1,5	2	2	4	5	
Suma		363	8,4	15	23	30	40	47	79	95		
Promedio		18	0,4	0,8	1,2	1,5	2	2	4	5		

PLÁNTULAS DE LECHUGA												
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS	INDICADORES AGRONÓMICOS									
			GERMINACIÓN (DÍAS)	ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS				
				S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	
15 SHUTA AS4	1	1	17	0,3	0,7	1,2	1,5	2	2	3	4	
		2	18	0,3	0,7	1	1,3	2	2	3	4	
		3	14	0,5	1	1,4	1,8	2	3	4	5	
		4	14	0,5	0,8	1,3	1,6	2	2	3	4	
		5	20	0,4	0,6	1,2	1,6	2	2	3	4	
	2	1	15	0,4	0,9	1,1	1,3	2	3	4	5	
		2	15	0,3	0,7	1	1,3	2	2	3	4	
		3	13	0,3	0,7	0,8	1,2	2	2	4	5	
		4	17	0,4	0,8	1	1,5	2	3	4	4	
		5	19	0,3	0,6	1	1,2	2	2	3	4	
	3	1	20	0,4	0,9	1,1	1,5	2	2	3	4	
		2	17	0,6	1	1,4	1,7	2	3	4	5	
		3	18	0,3	0,8	1,3	1,5	2	3	4	4	
		4	14	0,5	0,7	0,9	1,4	2	2	4	5	
		5	13	0,6	0,8	1,1	1,5	2	2	4	5	
	4	1	17	0,5	0,9	1,3	1,7	2	3	4	4	
		2	19	0,3	0,7	1,1	1,5	2	2	4	4	
		3	20	0,5	0,9	1,3	1,6	2	2	3	4	
		4	21	0,3	0,7	1,2	1,4	2	2	3	4	
		5	14	0,5	0,9	1,1	1,5	2	2	4	5	
Suma		335	8,2	16	23	29,6	40	46	71	87		
Promedio		17	0,4	0,8	1,1	1,5	2	2	4	4		

Anexo 22. Datos en semanas de los indicadores agronómicos del tratamiento 16 en plántulas de lechuga.

PLÁNTULAS DE LECHUGA											
TRATAMIENTO	REPETICIÓN	PLÁNTULAS	INDICADORES AGRONÓMICOS								
			GERMINACIÓN (DÍAS)	ALTURA DE LA PLANTA EN cm				NÚMERO DE HOJAS			
				S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
16 T1	1	1	18	0,3	8	1,3	1,5	2	2	3	4
		2	18	0,3	1,7	1,2	1,5	2	2	3	4
		3	17	0,6	1	1,4	1,7	2	3	4	4
		4	15	0,3	0,7	1	1,5	2	2	3	4
		5	16	0,4	0,8	1,3	1,6	2	2	4	4
	2	1	18	0,4	0,7	1,1	1,4	2	3	4	5
		2	19	0,2	0,6	1	1,3	2	2	3	4
		3	14	0,3	0,7	1,1	1,4	2	2	4	4
		4	18	0,3	0,8	1,3	1,6	2	3	4	5
		5	18	0,3	0,6	1	1,2	2	2	3	4
	3	1	17	0,4	0,8	1,1	1,5	2	3	4	4
		2	15	0,4	0,9	1,4	1,7	2	2	4	4
		3	19	0,6	1	1,3	1,5	2	3	4	4
		4	19	0,5	0,7	1	1,4	2	2	4	4
		5	17	0,6	0,8	1,1	1,5	2	2	3	4
	4	1	17	0,5	0,9	1,3	1,6	2	3	4	4
		2	14	0,3	0,7	1	1,5	2	2	3	4
		3	18	0,5	0,9	1,3	1,6	2	2	3	4
		4	15	0,4	0,8	1,2	1,6	2	2	4	4
		5	19	0,5	0,9	1,3	1,6	2	2	4	4
Suma			341	8,1	24	23,7	30	40	46	72	82
Promedio			17	0,4	1,2	1,2	1,5	2	2	4	4

CAPÍTULO VII

PROPUESTA

TITULO

Uso de bacterias fijadoras de nitrógeno y bioestimuladoras para la elaboración de un biofertilizante.

7.1. DATOS INFORMATIVOS

La propuesta está enfocada en el uso de un biofertilizante o estimulante a partir de las cepas promisorias del desarrollo vegetal (AUTA AR6 Y MUTA AS4), en la provincia de Tungurahua, en las zonas del cantón Quero y Cevallos, el cual será asesorado por la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.

7.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA

En la provincia de Tungurahua existe una gran incidencia de uso de agroquímicos en el sector agropecuario, lo que implica negativamente en la sostenibilidad ambiental y en la salud humana. De tal manera se hace necesario promover y dar a conocer un plan alternativo del uso de un biofertilizante que resulte sustentable y no dañe la salud de los agricultores y el medio ambiente, pero asegurando una buena rentabilidad y productividad para los agricultores de la provincia de Tungurahua. Contribuyendo así a la concientización de los productores sobre el impacto del uso excesivo de agroquímicos, reduciendo sus efectos en el medio ambiente y conservando los recursos naturales.

7.3. JUSTIFICACIÓN

Debido al uso excesivo de fertilizantes inorgánicos de origen industrial en la provincia de Tungurahua, en los cantones mencionados, se ha reflejado un deterioro progresivo de los recursos naturales y como consecuencia la disminución de la productividad de los suelos y el rendimiento de los cultivos, los biofertilizantes

representan un componente vital constituyendo un medio ecológicamente aceptable y permitiendo disminuir los insumos externos. Ya que estos microorganismos del suelo debidamente seleccionados son capaces de aportar a los cultivos nitrógeno fijado de la atmósfera y además sustancias activas estimuladoras del desarrollo vegetal. Este trabajo se basa en la idea de la producción de un biofertilizante de producción nacional con buenos estándares de calidad y bajos costos de manera que la tecnología sea adoptada por parte de los productores, disminuyendo los daños ambientales.

7.4.OBJETIVOS

Obtener un biofertilizante a base de cepas bacterianas nitro fijadoras y bioestimuladoras del crecimiento vegetal.

7.5. ANALISIS DE FACTIBILIDAD

Teniendo en cuenta que las cepas fueron aisladas en suelos pertenecientes a las zonas donde están ubicados los predios de la facultad y toda la investigación fue realizada en los laboratorios de la Universidad Técnica de Ambato, con los costos de un proyecto aprobado por la DIDE (Dirección de Investigación y Desarrollo), existen la infraestructura científico-técnica que respondan a la perspectiva de producción de los biofertilizantes y bioestimulantes. Se necesitará de estudios para formular el producto que va a ser utilizado. Conociendo a través de la bibliografía consultada que dosis desde 0,5 a 1 litro por hectárea son eficientes para obtener resultados positivos, no siendo así en aplicaciones de dosis de nitrógeno que en su mayoría superan para suplir déficits de este elemento.

7.6. FUNDAMENTACIÓN

Aunque en el Ecuador se han realizado investigaciones realizados al tema de estudio aún no se llega superar la estrategia de producción masiva con estos microorganismos. No existe en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de Universidad Técnica de Ambato un banco de cepas nativas identificadas con estas características, lo cual es de mucha importancia para la producción de biofertilizantes y bioestimuladores, siendo de vital importancia potenciar el uso de los mismos para desarrollar una agricultura limpia.

7.7. METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO

- a. Producción del biofertilizante/ o estimulador de crecimiento vegetal a partir de las cepas:
 - Con las cepas promisorias realizar la producción del biofertilizante en medio nutritivo por fermentación discontinua inoculando al microorganismo y llevando a incubación a temperaturas óptimas para la fermentación.
 - El inóculo obtenido llevar a un biorreactor con agitación de 120 rpm por 24 horas.
 - Evaluar diferentes concentraciones de inóculos (UFC/mL) cada 4 horas
 - Ejecutar el control de calidad del producto obtenido.
- b. Estudios en condiciones de campo:
 - Evaluar en condiciones de campo las dosis y momento de aplicación del producto obtenido en diferentes cultivos.
- c. Socialización y recomendación de los mejores resultados:
 - De acuerdo a los resultados obtenidos podrán recomendarse dosis que minimicen el uso de fertilizantes nitrogenados, en un programa bioorgánico eficiente.

7.8. ADMINISTRACIÓN

Se trabajará con los señores productores y conjuntamente con la asistencia técnica de profesionales de la Universidad Técnica de Ambato de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

7.9. PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN

Se socializará con los productores de los cantones Cevallos y Quero acerca de los beneficios y el uso del producto y se recomendara su uso una vez estandarizada la tecnología para su aplicación.