



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO IN VITRO DE ALFALFA**  
**(*Medicago sativa* L.) INOCULADAS CON BACTERIAS**  
**DIAZOTRÓFICAS**

**TESIS**

**PRESENTADA POR:**

**Bach. JOSÉ ROBERTO QUISPE PACCO**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PUNO - PERÚ**

**2018**



NOMBRE DEL TRABAJO

**GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO in vitro  
DE ALFALFA (Medicago sativa L.) INOCU  
L ADAS CON BACTERIAS DIAZOTRÓFIC  
AS**

AUTOR

**JOSÉ ROBERTO QUISPE PACCO**

RECuento DE PALABRAS

**12773 Words**

RECuento DE CARACTERES

**70980 Characters**

RECuento DE PÁGINAS

**70 Pages**

TAMAÑO DEL ARCHIVO

**3.5MB**

FECHA DE ENTREGA

**Apr 14, 2024 11:26 PM GMT-5**

FECHA DEL INFORME

**Apr 14, 2024 11:28 PM GMT-5**

### ● 14% de similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 14% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 4% Base de datos de trabajos entregados
- 2% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

### ● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Material citado
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 10 palabras)



Firmado digitalmente por PAURO  
ROQUE Juan Jose FAU  
20145496170 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 14.05.2024 15:48:49 -05:00



## DEDICATORIA

*Con recóndito reconocimiento a mis amados padres Sr. Roberto y Sra. Agripina por su sacrificio, inmenso amor y apoyo incondicional que me ofrecen inmutablemente, sobre todo en mis años de estudiante.*

*A mis hermanos (as) Rosa Luz, José Wilber, Rosmery y Yeny Elizabeth, por su soporte ilimitado en todo momento.*

*A mis sobrinas Kristell, Lía, Haendel y Heder, por alegrarme siempre con sus ocurrencias y carisma de niños.*

*Con personal afecto a mi amada esposa Jesusa, mi compañera de vida, por su comprensión y amor incondicional. A mi tesorito mi hijo Oscar Josué, por su compañía, apoyo, alegría y amor inquebrantable que me dan la fortaleza para trajinar y me motivan a alcanzar mis sueños.*

*A mis abuelos Julián (+), Alberto (+), Juana (+) y Candelaria (+), mi reconocimiento eterno a ellos, con la esperanza de volver a verlos y que el Todopoderoso los cobije en su gloria y a mi abuelita Catalina Pastora por su apoyo incesante.*

**José Roberto**



## AGRADECIMIENTOS

*A la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, mi alma máter por haberme formado profesionalmente.*

*A los catedráticos de la escuela profesional de Biología, por sus sabias enseñanzas durante mis años de formación.*

*Al Dr. Juan José Pauro Roque, por su atinada dirección en la realización del presente trabajo, su excelente asesoramiento en la conducción de la tesis.*

*A todos mis amigos, en especial a Edwin Zea Apaza, que contribuyó a la culminación del estudio concluido en la presente tesis.*

***José Roberto***



# ÍNDICE GENERAL

	Pág.
<b>DEDICATORIA</b>	
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	
<b>ÍNDICE GENERAL</b>	
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	
<b>ÍNDICE DE ACRÓNIMOS</b>	
<b>RESUMEN .....</b>	<b>12</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1.1 OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>15</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b>	
<b>2.1 ANTECEDENTES .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>18</b>
2.2.1 Bacterias diazotróficas .....	18
2.2.2 <i>Azotobacter</i> sp.....	21
2.2.3 Efectos de la inoculación sobre el desarrollo de las raíces .....	24
2.2.4 Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) .....	26
2.2.5 Germinación y crecimiento vegetal .....	28



## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

<b>3.1</b>	<b>ZONA DE ESTUDIO .....</b>	<b>30</b>
<b>3.2</b>	<b>DETERMINACIÓN DEL RECuento DE BACTERIAS DIAZÓTROFAS EN SUELOS DE LA PROVINCIA DE MELGAR.....</b>	<b>31</b>
3.2.1	Frecuencia de muestreo.....	31
3.2.2	Recuento de bacterias diazotróficas en suelos .....	32
3.2.3	Variables analizadas.....	33
3.2.4	Análisis estadístico de datos .....	34
<b>3.3</b>	<b>EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERIANO EN LA GERMINACIÓN IN VITRO Y EL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE ALFALFA .....</b>	<b>34</b>
3.3.1	Frecuencia de muestreo.....	34
3.3.2	Evaluación del efecto de las bacterias diazotróficas en el porcentaje de germinación de semillas de alfalfa.....	35
3.3.3	Evaluación del efecto de las bacterias diazotróficas en el crecimiento de las plántulas de alfalfa.....	35
3.3.4	Variables analizadas.....	36
3.3.5	Análisis estadístico de datos .....	36

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

<b>4.1</b>	<b>CARGA BACTERIANA DIAZÓTROFA EN SUELOS DE LA PROVINCIA DE MELGAR .....</b>	<b>37</b>
<b>4.2</b>	<b>EFECTO DE LAS BACTERIAS EN LA GERMINACIÓN Y EL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE ALFALFA .....</b>	<b>42</b>
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>53</b>



<b>VI. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>54</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>64</b>

**ÁREA:** Ciencias Biomédicas

**SUBLÍNEA:** Diagnóstico y Epidemiología

**FECHA DE SUSTENTACIÓN:** 14 de noviembre del 2018



## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Las bacterias biofertilizantes frecuentes en los campos de cultivo. ....	20
<b>Figura 2.</b> Ubicación de la zona de muestreo en el distrito de Ayaviri (círculo rojo), agosto – octubre 2017.....	30
<b>Figura 3.</b> Ubicación de zonas de muestreo en el distrito de Nuñoa, agosto – octubre 2017. ....	31
<b>Figura 4.</b> Recolección y transporte de muestras de suelo, en el distrito de Ayaviri, agosto – octubre 2017.....	32
<b>Figura 5.</b> Procedimientos de recuento bacteriano en UFC/g de suelo. ....	33
<b>Figura 6.</b> Germinación de semillas de alfalfa en placas Petri con gasa. ....	35
<b>Figura 7.</b> Prueba de T para la comparación de recuentos de bacterias Azotobacter en suelos de la provincia de Melgar, durante los meses agosto – octubre del 2017. ....	38
<b>Figura 8.</b> Prueba de Tukey para los porcentajes de germinación, en semillas de alfalfa inoculadas, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, julio – octubre 2017. ....	43
<b>Figura 9.</b> Prueba de Tukey para las longitudes de tallos, en plántulas de alfalfa inoculadas, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, julio – octubre 2017.....	45
<b>Figura 10.</b> Prueba de Tukey para las longitudes de raíces, en plántulas de alfalfa inoculadas, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, julio – octubre 2017.....	46
<b>Figura 11.</b> Reactivos utilizados para aislar bacterias diazótrofes. ....	64



<b>Figura 12.</b> Vista de costa de las plántulas de alfalfa inoculadas con bacterias diazótrofas. ....	64
<b>Figura 13.</b> Vista aérea de las plántulas inoculadas con bacterias diazótrofas.....	64
<b>Figura 14.</b> Kit de reactivos para tinción Gram.....	65
<b>Figura 15.</b> Procedimiento de tinción de las bacterias diazótrofas.....	65
<b>Figura 16.</b> Preparación de soluciones inoculantes de bacterias diazótrofas mediante la técnica de McFarland.....	65
<b>Figura 17.</b> Soluciones bacterianas estandarizadas para inoculas a las semillas y plántulas de alfalfa.....	66
<b>Figura 18.</b> Mediciones finales de las plántulas luego de 40 días inoculadas con bacterias diazótrofas. ....	66
<b>Figura 19.</b> Resultado final del tamaño de las plántulas inoculadas con bacterias diazótrofas. ....	66
<b>Figura 20.</b> Flujoograma del trabajo de investigación realizada. ....	67



## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Recuento de bacterias <i>Azotobacter</i> sp en dos campos de cultivo de la provincia de Melgar (UFC/g suelo), agosto – octubre, 2017.....	38
<b>Tabla 2.</b> Germinación (%) de semillas de alfalfa pos inoculación de bacterias diazótrofas.....	43
<b>Tabla 3.</b> Mediciones de la longitud de tallos y raíces post inoculación de plántulas de alfalfa con bacterias diazótrofas.....	45



## ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

$\mu\text{g}$ :	Microgramos
et al.:	Colaboradores
g:	Gramos
mg/l:	Miligramos por litro
mm:	Milímetros
n:	Tamaño de muestra
No:	Número
R1, R2 y R3:	Repeticiones 1, 2 y 3
spp:	Especies
UFC/g:	Unidades formadoras de colonia
T:	Prueba de T
P:	Probabilidad
Fc:	Valor de la F calculada
gl:	Grado de libertad
cm:	Centímetros
ha:	Hectárea
m:	Metro



## RESUMEN

El uso de agroquímicos es un factor negativo para la calidad de los suelos, disminuyendo su fertilidad, ante ello se plantea la alternativa del uso de bacterias diazotróficas, que estimulan el crecimiento de las plantas. El objetivo del estudio fue determinar la germinación y crecimiento *in vitro* de alfalfa (*Medicago sativa* L.) inoculadas con bacterias diazotróficas. La determinación de la carga bacteriana diazótropa se determinó mediante la técnica de recuento en placa, la identificación de bacterias diazótropas mediante la tinción Gram, prueba de catalasa, de almidón y del manitol. Se experimentó la inoculación de  $1.5$ ,  $3$  y  $6 \times 10^8$  células bacterianas/ml y un tratamiento sin inoculación bacteriana, para determinar la germinación *in vitro* y en plántulas de alfalfa luego de 30 días se determinó la longitud del tallo y raíz final. Los resultados fueron: las muestras de suelo presentaron recuentos bacterianos de  $5.20 \times 10^6$  UFC/g en Nuñoa y en Ayaviri  $3.47 \times 10^6$  UFC/g suelo, siendo diferentes estadísticamente ( $T=-3.37$ ;  $P=0.0280$ ). Las bacterias diazótropas originaron una germinación de semillas de alfalfa con promedios de 83.33% inoculados con  $6 \times 10^8$  células/ml, siendo mayor a los demás tratamientos y al control con 33.33% ( $F_c=30.55$ ;  $g_l=3$ ;  $P=0.0001$ ), la misma inoculación originó una longitud de tallo de 4.99 cm y una longitud de raíz de 5.81 cm, siendo superiores a los demás tratamientos inoculados y en el control fue de 1.81 y 1.05 cm en tallo y raíz respectivamente ( $F=20.89$ ;  $g_l=3$ ;  $P=0.0004$ ). Se concluye que, a mayor inoculación bacteriana, mayor fueron los porcentajes de germinación, la longitud de tallo y raíces, superando al tratamiento control.

**Palabras clave:** *Chenopodium quinua*, Inoculante, *In vitro*, *Rhizobium* sp, Quinua.



## ABSTRACT

The use of agrochemicals is a negative factor for the quality of the soil, reducing its fertility. Given this, the alternative of using diazotrophic bacteria, which stimulate plant growth, is proposed. The objective of the study was to determine the germination and *in vitro* growth of alfalfa (*Medicago sativa* L.) inoculated with diazotrophic bacteria. The determination of the diazotrophic bacterial load was determined by the plate count technique, the identification of diazotrophic bacteria by Gram staining, catalase, starch and mannitol tests. The inoculation of  $1.5$ ,  $3$  and  $6 \times 10^8$  bacterial cells/ml and a treatment without bacterial inoculation were experimented to determine *in vitro* germination and in alfalfa seedlings after 30 days the length of the stem and final root was determined. The results were: the soil samples presented bacterial counts of  $5.20 \times 10^6$  CFU/g in Nuñoa and in Ayaviri  $3.47 \times 10^6$  CFU/g soil, being statistically different ( $T=-3.37$ ;  $P=0.0280$ ). Diazotrophic bacteria caused germination of alfalfa seeds with averages of 83.33% inoculated with  $6 \times 10^8$  cells/ml, being higher than the other treatments and the control with 33.33% ( $F=30.55$ ;  $gl=3$ ;  $P=0.0001$ ), the same inoculation caused a stem length of 4.99 cm and a root length of 5.81 cm, being superior to the other inoculated treatments and in the control it was 1.81 and 1.05 cm in stem and root respectively ( $F= 20.89$ ;  $df=3$ ;  $P=0.0004$ ); It is concluded that the greater the bacterial inoculation, the greater the germination percentages, stem and root length, surpassing the control treatment.

**Keywords:** *Chenopodium quinoa*, Inoculant, *In vitro Rhizobium* sp, Quinoa.



# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

En la región Puno, sus habitantes en la gran mayoría se dedican a la crianza de animales como son los vacunos mejorados, para la producción de leche y carne, principalmente al norte, en las provincias de Ayaviri, Huancané y Azángaro. La alimentación de estos animales influye en la ulterior producción de leche, los cuales se basan en la alimentación con forraje de buena calidad nutritiva como lo es la alfalfa. Pero en varios distritos de la provincia de Melgar, la producción de alfalfa viene disminuyendo, debido a la carencia de los macro y micronutrientes esenciales en el suelo para el desarrollo vegetal, asimismo se presume de sustancias inorgánicas, el pH del suelo y principalmente la disminución de la diversidad biológica benéfica.

Las bacterias diazótroficas existen en todo campo de cultivo, pero son disminuidos por diferentes actividades antrópicas, principalmente por el uso de agroquímicos. Estas bacterias poseen las siguientes bondades: permiten una producción a bajo costo, protegen el medio ambiente y mantienen la conservación del suelo desde el punto de vista de su fertilidad y biodiversidad, fijan el nitrógeno atmosférico y suministran fósforo a las plantas, producen fitohormonas como el ácido indol acético y citoquininas, descomponen la materia orgánica, son biodegradadores de sustancias orgánicas, crean una barrera protectora de las raíces al ataque de otros microorganismos plagas, entre otras bondades.

En tal sentido, en la presente investigación se planteó la evaluación de la germinación y crecimiento *in vitro* de alfalfa (*Medicago sativa* L.) inoculadas con bacterias diazotróficas, con la finalidad que en el futuro se constituya en una alternativa ecológica aplicando bacterias benefactoras en el agro de la región y el país, parecido a lo



experimentando en diversos países vecinos.

Por tales motivos, la investigación que se presenta, tuvo los siguientes objetivos específicos:

### **1.1 OBJETIVO GENERAL**

- Determinar la germinación y el crecimiento *in vitro* de alfalfa (*Medicago sativa* L.) inoculadas con bacterias diazotróficas.

### **1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar la carga de bacterias diazótroficas en suelos de cultivo de la provincia de Melgar.
- Evaluar la inoculación de bacterias diazótroficas en la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas de alfalfa (*Medicago sativa* L.).



## CAPÍTULO II

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 2.1 ANTECEDENTES

La gallinaza cruda tiene un efecto negativo en *Azotobacter* sp, al contrario sucede con la gallinaza compostada ( $1.0 \times 10^7$  UFC) y en *Azospirillum* sp sin respuesta relevante, sin embargo, fue más abundante que *Azotobacter* sp en cada uno de los tratamientos (Montenegro *et al.*, 2017), la microbiota asociada con la rizósfera desempeña una función importante para la nutrición y el desarrollo de la planta, los aislados originaron que las plantas de cacao tratadas con bacterias incrementaron su crecimiento y N (%) foliar, en comparación con el testigo (Zula *et al.*, 2014), las cepas de rizobacterias en semillas de *Sporobolus cryptandrus* dieron un incremento de la longitud de radícula superior y una germinación al 100% a comparación del 40% del tratamiento testigo (Bécquer *et al.*, 2013), las cepas de *Azotobacter* spp en el desarrollo vegetativo de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate”, determinaron que producen ácido indolacético en cantidades que varían de 7.10 a 57.99 mg/l, las cantidades de nitrógeno fijado como amonio oscila entre 0.13 a 1.64 mg/l y presentan una solubilización de roca fosfórica del 1.61 % de eficiencia por ende incrementan el volumen radicular, la altura, la parte aérea, la materia seca total y de la raíz en comparación con el testigo absoluto (Escobar *et al.*, 2011),

En plántulas de *Carica papaya* variedad Maradol en vivero, se les aplicó tres biofertilizantes aplicados solos o en combinación (*Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum brasilense* y *Glomus intraradices*), incrementaron el porcentaje de germinación a 90.28 y 88.89% respectivamente (Constantino *et al.*, 2017), las bacterias que promueven el incremento del crecimiento en la maca, entre las poblaciones



microbianas se tienen a los diazótrofos, los aerobios psicrófilos y *Pseudomonas* estimulan la germinación de semillas de maca incrementando significativamente el porcentaje de germinación (Zúñiga, 2010), las bacterias beneficiosas de suelo donde se cultivan plátanos se consideran como posibles biofertilizantes, entre ellos *Azospirillum* tuvo un mejor crecimiento inoculando  $15 \times 10^5$  UFC/g de biofertilizante y *Azotobacter* en una concentración de  $63 \times 10^4$  UFC/g, logrando el mayor contenido de nitrógeno en un 5.25% (Córdova *et al.*, 2009). Además, las bacterias *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter vinelandii*, y actinomicetos aislados de cultivos de papa (*Solanum tuberosum*), mostraron capacidad para inhibir al hongo *Fusarium solani* en un 17%, y al hongo *Rhizoctonia solani* en un 9% (Rico, 2009).

Bioensayos en placas Petri, donde se colocó papel de filtro humedecido en la base y sobre ella se sembraron 20 semillas por placa, reportaron porcentajes promedio de germinación del 96.07%, las aguas de las represas no presentaron toxicidad (Lallana *et al.*, 2008). En otro estudio, fue inoculado el pasto angleton (*Dichantium aristatum*) con cepas nativas de *Azotobacter* sp, que son fijadoras de nitrógeno y secretoras de ácido indol acético (AIA), aumentaron los promedios de la altura del tallo, peso seco y contenido de nitrógeno (Lara & Oviedo, 2007), las bacterias aisladas de la rizósfera de las malezas, fijaron 36.03 mg/l de nitrógeno en forma de amonio, 60.75 mg/l de ácido indol acético y 6.06 mg/l de fósforo solubilizado. Fueron antagónicas a *Fusarium verticillioides*, así como también poseen actividad proteolítica y quitinolítica (León & Rojas, 2015). En el cultivo de maíz, al inocular *Azotobacter chroococcum* y *Azotobacter chroococcum* con vermicompost mostraron mejores resultados aplicando 15 l/ha y 2 t/ha, con una germinación de semillas del 98.4%, altura de la planta de 1.14 m, peso fresco aéreo de



40.7 g, peso fresco radical de 20.4 g, peso seco aéreo de 10.1 g y peso seco radical de 5.1 g (Huete et al., 2019).

El efecto del consorcio *Azotobacter- Rhizobium* en *Lupinus mutabilis* Sweet “tarwi”, mostraron el mejor tratamiento con *Azotobacter* sp. con 70% de germinación, la biomasa seca después del tratamiento con la cepa Rizo1 (*Rhizobium* sp. aislado) fue superior al nitrato de potasio (N+) luego de 20 días de evaluación (González et al., 2018), las semillas de trigo inoculadas con *Azospirillum* spp. y *Az. beijerinckii* favoreciendo un aumento en la absorción de la urea en las raíces, y alcanzó un peso seco similar al del trigo fertilizado sólo con 100% de urea, sin inocular (García et al., 2005), cinco géneros bacterianos *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas* y *Beijerinckia*, fueron inoculadas en plantas de maíz y obtuvieron las mayores alturas de plantas con 96.3 y 189.6 cm respectivamente, mayor número de hojas, con una diferencia del 15.38, 23.8 y 27.92% respectivamente frente al control (González, 2015), bacterias aerobias aisladas de la rizósfera de *Pinus patula*, entre ellas *Bacillus macerans* (35.5%), *Pseudomonas* sp (29%), *Enterobacter agglomerans* (22.6%) y *Azotobacter chroococcum* (12.9%), los mejores promedios en casi todos los parámetros vegetales se obtuvo con *A. chroococcum* (Orozco & Martínez, 2009).

## 2.2 MARCO TEÓRICO

### 2.2.1 Bacterias diazotróficas

Las bacterias diazotróficas, son biosintetizadores de amonio a partir del nitrógeno atmosférico, conjuntamente con los actinomicetos y las algas verde azules (cianofíceas) reducen el nitrógeno atmosférico a nitrógeno amoniacal incorporándolo al suelo, entre ellos se mencionan los géneros *Azotobacter*,



*Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Azomonas* y *Oscillatoria* (Madigan & Matinko, 2004), cuando la humedad del suelo sea adecuada y con una fuente de carbono accesible como el material vegetal en descomposición (pajas o subproductos de cosecha), por lo que siempre están acompañadas por bacterias celulolíticas (Frioni, 2011), asimismo necesitan alcoholes, azúcares o ácidos orgánicos que son suministrados por otros microorganismos degradadores, en la rizósfera, el desarrollo de las bacterias es estimulada por las exudaciones que emite la planta está bien nutrida (Coyne, 2000).

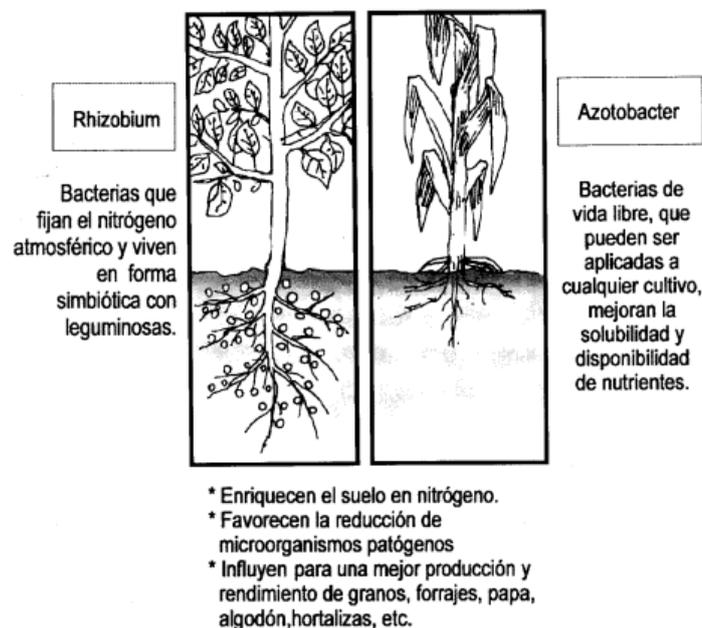
El suelo es un ecosistema con una inmensa riqueza microbiana, a pesar de que existe numerosos estudios basados en microorganismos del suelo, no se ha determinado completamente la biodiversidad de microorganismos para que un determinado suelo agrícola se encuentre en óptimas condiciones para el cultivo de plantas (Escobar *et al.*, 2011), el grupo de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, también conocido como PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), colonizan la raíz y estimulan el crecimiento vegetal, los microorganismos diazotófos (Atlas & Bartha, 2002), capaces de fijar nitrógeno, son objeto no solo de estudio en microbiología de suelos, sino también en el desarrollo de productos biológicos comerciales, para su identificación bacteriana, el análisis del gen del RNA ribosomal 16S se constituye en la herramienta para identificar bacterias diazotróficas asimismo permite establecer las relaciones filogenéticas entre individuos del mismo agroecosistema (Hala & Ali, 2019).

Las bacterias *Azotobacter* tienen movimiento y forman quistes cuando encuentran condiciones adversas, pueden llegar a fijar 40 kg de nitrógeno por hectárea lo que equivale a 200 kg de sulfato de amonio, los suelos deben poseer

pH ácidos (5.5) y alcalinos, pero prefieren los neutros (Coyne, 2000), la carga microbiana de los suelos tiene un efecto indispensable en el logro de cultivos de alto rendimiento y mejora la producción y el control ambiental; además permiten el mantenimiento de la biodiversidad y la sostenibilidad de los ecosistemas (Carvajal & Mera, 2010). Las bacterias de vida libre, o en simbiosis, que habitan la rizósfera pueden estimular el crecimiento de las plantas a través de diferentes procesos, como la síntesis de reguladores del crecimiento vegetal, la fijación de nitrógeno, la solubilización de nutrientes, la producción de sideróforos y el control de fitopatógenos del suelo (Torriente, 2010).

### Figura 1

*Las bacterias biofertilizantes frecuentes en los campos de cultivo.*



Fuente: [http://www.cepes.org.pe/pdf/OCR/Partidos/manejo\\_ecologico\\_de\\_suelos/manejo\\_ecologico\\_de\\_suelos-21.pdf](http://www.cepes.org.pe/pdf/OCR/Partidos/manejo_ecologico_de_suelos/manejo_ecologico_de_suelos-21.pdf).

Las bacterias de los géneros *Azotobacter*, *Stenotrophomonas*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Beijerinckia*, *Pseudomonas*, *Bacillus* entre otros, transforman el nitrógeno atmosférico en amonio (fijación biológica de nitrógeno),



representa un beneficio económico y reduce el impacto negativo en el ambiente, debido al uso de insumos químicos (Bruinsma, 2003), las especies *Azotobacter vinelandii*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia cepacia*, pueden ser identificados mediante técnicas convencionales o basadas en sus propiedades bioquímicas, como la descripción de su morfología celular, la tinción Gram, crecimiento en condiciones aerobias o anaerobias, requerimientos de sustratos especiales para su cultivo (Peña, 2002), llegando a identificarse hasta género y para la caracterización de especies, subespecies, serovariedades o cepas, se precisa de técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que identifica secuencias de ADN (Laura *et al.*, 2013).

### 2.2.2 *Azotobacter* sp

Clasificación taxonómica del género *Azotobacter*:

Dominio	: Bacteria.
Phylum	: Proteobacteria.
Clase	: Gamma proteobacteria.
Orden	: Pseudomonadales.
Familia	: Azotobacteraceae.
Género	: <i>Azotobacter</i> (Ramos, 1992).

*Azotobacter* tienen un tamaño que oscila de 1.5 y 2.0  $\mu\text{m}$ , son pleomórficas, pueden variar de bacilos a forma cocoides, individuales, en pares o formando agregados irregulares, llegando a formar cadenas de tamaño variable. Se reproducen mediante fisión binaria y su desplazamiento es mediante flagelos peritricos (Coyne, 2000). No producen endosporas, pueden formar quistes en



condiciones ambientales adversas, y en el laboratorio se pueden inducir quistes pasando el cultivo de un medio con glucosa a uno con  $\beta$ -hidroxibutirato como única fuente de carbono (Lin & Sadoff, 1968).

Según su metabolismo, son catalasa positivas y aerobias, se consideran quimioheterótrofas, por utilizar azúcares, alcoholes y sales inorgánicas para su crecimiento. Pueden desarrollarse en condiciones de baja concentración de oxígeno, y su pH óptimo está de 7.0 a 7.5. Son mesófilas y su temperatura óptima de crecimiento es de 30 °C (Zúñiga, 2010). Fijan hasta 10 mg de nitrógeno por cada g de glucosa metabolizado, y para este proceso requieren molibdeno. Utilizan nitrato, sales de amonio y ciertos aminoácidos como fuentes de nitrógeno. Algunas especies también son capaces de producir alginatos, poli- $\alpha$ -hidroxibutirato (Horan *et al.*, 1983), pigmentos y hormonas vegetales como auxinas, citoquininas y giberelinas (Coyne, 2000).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno o diazótrofes fueron las primeras en ser producidas comercialmente para la biofertilización de suelos, las especies que corresponden al género *Azotobacter*, son *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter beijerinckii*, *Azotobacter paspali*, *Azotobacter salinestrus*, *Azotobacter nigricans* y *Azotobacter armeniacus* (Page & Shivprasad, 1991), fijan asimbióticamente nitrógeno y solubilizan fósforo, además biodegradan agroquímicos como el endosulfan (Balandreau, 1986), el medio selectivo además de poseer microelementos para la fijación del nitrógeno debe poseer  $\text{FeSO}_4$ , los aislamientos poseen dos morfologías diferentes de colonia, de color crema, medianas, irregulares y brillantes y colonias pequeñas, translúcidas y brillantes (Coyne 2000), algunas cepas *Azotobacter* presentan formación de quistes, al



proceder del suelo quienes se encuentran en fase de resistencia ante las condiciones ambientales (Vela, 1974), en un cultivo de laboratorio, también pueden formarse quistes ante condiciones adversas, como la carencia de nutrientes como el  $\beta$ - hidroxibutirato (Hitchins & Sadoff, 1973), debido a la acción de los iones de calcio en el medio (Hitchins & Sadoff, 1970), pero no son formadas exclusivamente por *Azotobacter* y si lo forman se agrupan en pares, ya que también lo forman las bacterias del género *Beijerinckia*, al microscopio *Azotobacter* sp son bacilos Gram negativos, grandes y cortos (Holt, 2000).

La identificación bioquímica de bacterias del género *Azobacter* se realiza empleando técnicas convencionales basándose en la utilización de cuatro azúcares, benzoato y fenol como fuente de carbono, prueba de la catalasa, prueba de Nessler, hidrólisis de almidón y producción de ácido 3- indolacético (Tejera *et al.*, 2005), se toman en cuenta también las observaciones macro y microscópicas (morfología celular y de la colonia) así como la pigmentación en medio Ashby-benzoato para la identificación preliminar (Frioni, 2011), la identificación molecular se realiza en base en el ADNr 16S, mediante la amplificación con los iniciadores FGPL y FGPS los cuales han sido utilizados en la amplificación del ADNr 16S de bacterias diazótrofes (Nour *et al.*, 1994), sin embargo, no son específicos para bacterias del género *Azotobacter*, ante ello se obtuvo un fragmento de 2000 pb aproximadamente, que correspondería al gen 16S y los IGS 16-23S, tal como los reporta Hala & Ali (2019).

La secuenciación de ADN se realizan empleando la herramienta CAP contig del software Bioedit, luego de obtener la secuencia, se compara con las secuencias registradas en la base de datos GenBank utilizando el programa



BLAST 2.2.20 (Basic Local Alignment Search Tool) (Zhang *et al.*, 2000), de esta manera se logra identidad definitiva de especies *Azotobacter vinelandii*, obteniendo así su filogenética agrupados en el mismo clado que *Azotobacter vinelandii*, teniendo como vecino a *A. chroococcum* y *A. salinestrus*, guardando una estrecha relación con *Pseudomonas alcaligenes* (Fialho *et al.*, 1990).

### 2.2.3 Efectos de la inoculación sobre el desarrollo de las raíces

Los efectos de la inoculación vegetal con bacterias originan cambios morfológicos en el sistema radicular, estando directamente relacionados con la concentración del inóculo y cuando es superior a los niveles óptimos origina efectos inhibitorios, sin embargo, a dosis bajas no causan efecto (Madigan *et al.*, 2004), la concentración bacteriana óptima es alrededor de  $10^5 - 10^6$  unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml), mientras que para el maíz es de  $10^7$  UFC/ml, una elevada concentración de  $10^8 - 10^{10}$  UFC/ml generalmente inhibe el desarrollo radicular, estos datos no han revelado cuántas células bacterianas por semilla o plántula se requieren para obtener una respuesta vegetal positiva (Bashan *et al.*, 2004).

Los efectos positivos de la inoculación se reflejan en diversos parámetros morfológicos de la raíz, incremento en la longitud (particularmente en la zona de elongación), en el número y longitud de las raíces laterales, lo cual incrementa el volumen radicular, incremento en el peso seco de la raíz, en el número, densidad y aparición temprana de pelos radiculares (León & Rojas, 2015), en el área de superficie radicular, promoción de la división celular en el meristemo radicular, cambios en los arreglos celulares de la corteza, estimulación de la exudación radicular y cambios en la morfología externa de las raíces (González *et al.*, 2018),



estas observaciones se fundamentaron en estudios microscópicos, pero no pudieron ser confirmadas en un estudio posterior donde se utilizó la misma cepa de *A. brasilense* (Perrig *et al.*, 2007).

En otros cultivos ocurre una disminución en la longitud radicular, masa y volumen, a pesar de que se observa un incremento de los brotes (Huete *et al.*, 2019), serían a consecuencia de la inoculación de plantas con cepas de *Azospirillum*, dichos parámetros morfológicos pueden ser medidos con precisión y se analizaron mediante métodos (Hartmann & Zimmer, 1993), además de afectar positiva o negativamente muchos parámetros en raíces (Montenegro *et al.*, 2017), la inoculación de plantas con bacterias puede afectar parámetros con el follaje, debido a los efectos positivos en la absorción de minerales por la planta como  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  y  $\text{Fe}^{+2}$  inducida por *Azospirillum* es el factor responsable en incrementar la materia seca foliar y la acumulación de minerales en tallos y hojas (García *et al.*, 2010).

El incremento en la absorción de minerales se debe a un incremento general en el volumen del sistema de raíces y no a un mecanismo de absorción de iones más eficaz (Zúñiga, 2010), la inoculación con *Azospirillum* puede provocar que la absorción de iones en el suelo sea más eficiente, explicando así la acumulación de compuestos de nitrógeno en la planta sin existir una aparente biotransformación de nitrógeno (Orozco & Martínez, 2009), la planta puede asimilar el nitrógeno del suelo de manera más eficiente, requiriendo menos fertilización con nitrógeno, la inoculación de frijol yorimón y frijol de soya con *A. brasilense* (Cd) incrementó el flujo de protones de sus raíces y redujo el



potencial de membrana, por lo que se propuso que la membrana celular funciona como un sensor sobre el efecto de *Azospirillum* (Bashan *et al.*, 2004).

#### 2.2.4 Alfalfa (*Medicago sativa*)

Clasificación taxonómica de la alfalfa:

Dominio	: Eucarya.
Reino	: Plantae.
División	: Magnoliophyta.
Clase	: Magnoliopsida.
Subclase	: Rosidae.
Orden	: Fabales
Familia	: Fabaceae.
Subfamilia	: Faboideae.
Tribu	: Trifolieae
Género	: <i>Medicago</i>
Especie	: <i>Medicago sativa</i> L. 1753.

La alfalfa (*Medicago sativa*) es una planta herbácea perenne posee pequeñas flores púrpura creciendo en racimo, posee uso tradicional, medicinal como alimentario, es una plantas comestible nutritiva y se consume los brotes de alfalfa o germinados de alfalfa, las semillas y sus hojas, es una especie de planta herbácea perteneciente a la familia de las Fabáceas (Mostacero *et al.*, 2009), es utilizada ampliamente como pasto o forraje y con este propósito se cultiva intensivamente en el mundo entero, tiene un ciclo vital de entre cinco y doce años, dependiendo de la variedad utilizada, así como del clima (Atlas & Bartha, 2002),



en condiciones benignas puede llegar a veinte años, llega a alcanzar una altura de un m, desarrollando agrupaciones de pequeñas flores púrpuras, sus raíces suelen ser muy profundas, pudiendo medir hasta 4.5 metros. De esta manera, la planta es especialmente resistente a la sequía (Guanopatín, 2012).

Tiene un genoma tetraploide, es una especie que muestra autotoxicidad, por lo que es difícil para su semilla crezca, por lo tanto se deben rotar su cultivo con otras especies como maíz o trigo, antes de resembrar, en Persia tenía el uso para alimentar a los caballos de guerra (Flores *et al.*, 2012), contiene minerales como el calcio, potasio, hierro y fósforo, gran cantidad de aminoácidos, betacaroteno y vitaminas C, D, E y K, mientras que los brotes jóvenes contienen vitamina A, complejo B12, C, D, E, G, K, P y Fe (Brack, 1999).

La alfalfa posee buenos rendimientos y habita suelos de profundidad media a profundos (60 centímetros o más), con un buen drenaje y un rango de pH de 6.5 a 8.5, no debe sembrarse en suelos salinos o sódicos, delgados y con napas freáticas altas, esta planta usa grandes cantidades de nitrógeno (Ballesta, 2007), normalmente fijan desde la atmósfera por las bacterias *Rhizobium meliloti*, localizadas en las raíces formando los nódulos, en tal sentido la inoculación consiste en la implantación de la bacteria en la semilla, luego de que la semilla germina, la bacteria posee la capacidad de infectar las raíces de la plántula, no todos los *Rhizobium* son iguales, existen específicos para arvejas, frejoles, trébol y otras fabáceas (Madigan *et al.*, 2012).



### 2.2.5 Germinación y crecimiento vegetal

Para que la semilla germine es necesario que el embrión origine una plántula capaz de valerse por sí misma, por medio de los mecanismos metabólicos y morfogénéticos, conocidos dentro del proceso de germinación (Azcon & Talón, 1993), el cual posee varias fases: i) absorción de agua por la semilla o imbibición; ii) la activación del metabolismo y proceso de respiración, síntesis de proteínas y movilización de sustancias de reserva y iii) la elongación del embrión y ruptura de la testa a través de la cual se observa salida de la radícula (Suárez & Melgarejo, 2010), dicho proceso está influenciado por factores internos como externos, entre los factores internos se encuentran la viabilidad del embrión, la cantidad y calidad del tejido de reserva y los diferentes tipos de dormancia; mientras que entre los factores externos se mencionan el grosor de la testa, disponibilidad de agua, temperatura y tipos de luz (Abril *et al.*, 2017).

La germinación es el inicio del crecimiento del embrión, el cual estuvo paralizado a finales de la maduración, dichos procesos fisiológicos exigen actividades metabólicas apresuradas y la fase inicial consiste en la activación de los procesos por aumentos en la humedad y actividad respiratoria de la semilla (Obregón, 2007), la absorción de agua por la semilla libera una secuencia de cambios metabólicos entre los que se incluye la respiración, síntesis proteica y movilización de reservas, por otro lado, la división y el alargamiento celular en el embrión provocan la rotura de las cubiertas seminales, que generalmente se produce por la emergencia de la radícula (Chong *et al.*, 2002).

En la fase de hidratación, la absorción de agua es el primer paso para la germinación, caso contrario no se puede realizar dicho proceso fisiológico, en esta



fase se produce la absorción de agua por los tejidos que forman la semilla, a ello se une el aumento proporcional en la actividad respiratoria, la germinación es un proceso en el que se llevan a cabo las transformaciones metabólicas necesarias para desarrollar completamente la plántula (Azcón & Talón, 1993), en esta fase la absorción de agua se reduce considerablemente, llegando incluso a detenerse, el crecimiento es la última fase de la germinación y se asocia con la emergencia de la radícula (cambio morfológico visible), se caracteriza porque la absorción de agua vuelve a aumentar, así como la actividad respiratoria (Koornneef *et al.*, 2002).

Desde el punto de vista fisiobioquímico, la germinación posee las siguientes fases: la rehidratación, el aumento de respiración, la formación de enzimas, la digestión enzimática de reservas, la movilización y transporte de reservas, la asimilación metabólica y el crecimiento y diferenciación de tejidos (Doria, 2010), las condiciones que satisface la germinación son (Baskin & Baskin, 2001): la semilla debe ser viable, las condiciones ambientales para la semilla deben ser favorables: agua, temperatura, oxígeno y luz, las condiciones de la semilla deben ser favorables para la germinación (libre de dormancia) y las condiciones de sanidad deben ser satisfactorias (ausencia de agentes patógenos) (Montenegro *et al.*, 2017).

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 ZONA DE ESTUDIO

El muestreo de suelo se realizó en los campos de cultivo de alfalfa en las localidades de Ayaviri y Nuñoa, un total de 6 campos de cultivo, tres en cada localidad. Los campos de cultivo de la localidad de Ayaviri (Z1) se encuentran localizados entre las coordenadas UTM -14.911718 y -70.596735, -14.912125 y -70.601198, y -14.913597 y -70.595051 (Figura 2); mientras que en la localidad de Nuñoa (Z2) los puntos de muestreo estuvieron ubicados en las coordenadas UTM 323099 y 8390320, 323065 y 8390329, y 323115 y 8390171 (Figura 3).

#### Figura 2

*Ubicación de la zona de muestreo en el distrito de Ayaviri (círculo rojo), agosto – octubre 2017.*



**Fuente:** Googlemap (2016).

### Figura 3

Ubicación de zonas de muestreo en el distrito de Nuñoa, agosto – octubre 2017.



Fuente: Googlemap (2016).

## 3.2 DETERMINACIÓN DEL RECUENTO DE BACTERIAS DIAZÓTROFAS EN SUELOS DE LA PROVINCIA DE MELGAR

### 3.2.1 Frecuencia de muestreo

Se desarrolló la metodología desarrollada por Jiménez (2007), el cual consistió en coleccionar tres muestras de 500 g (Figura 4) a una profundidad entre 10 a 15 cm, en forma orma de zig – zag a lo largo del campo de cultivo (Tejera *et al.*, 2005), las muestras se empacaron en bolsas de papel y luego se pusieron en bolsas de plástico herméticas, posteriormente fueron transportadas en cajas de tecnopor a temperatura ambiente al laboratorio de Microbiología de Alimentos de la FCCBB UNA - Puno.

#### Figura 4

*Recolección y transporte de muestras de suelo, en el distrito de Ayaviri, agosto – octubre 2017.*



Fuente: Elaboración propia.

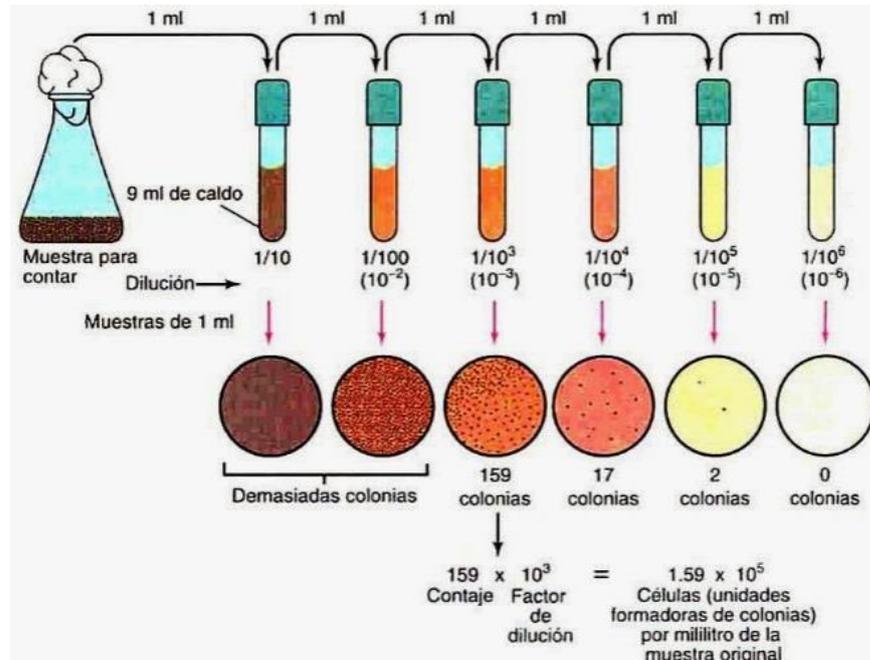
#### 3.2.2 Recuento de bacterias diazotróficas en suelos

- Los procedimientos se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA – Puno.
- En un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de agua destilada, se añadió 1 g de muestra de suelo, así se obtuvo la dilución  $10^{-1}$ .
- Se transfirió 1 ml de la dilución  $10^{-1}$  a otro tubo que contenga 9 ml de agua destilada, obteniéndose así la dilución  $10^{-2}$ , así sucesivamente se llegó a la dilución  $10^{-5}$ .
- Se traspasó 1 ml a dos placas Petri conteniendo agar mineral sin nitrógeno, con las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ , se incubó a 28 °C por 10 días.
- El método de cultivo en las placas fue por extensión, utilizando el aza de Digraalky, el cual previamente fue esterilizado sumergiendo en alcohol y flameando la zona que entrará en contacto con el medio de cultivo.
- El recuento bacteriano se realizó en aquellas placas que contengan entre

30 y 300 colonias, las cuales se multiplican por la dilución, los resultados fueron emitidos en UFC/g de suelo (Figura 5).

**Figura 5**

*Procedimientos de recuento bacteriano en UFC/g de suelo.*



**Fuente:** Madigan *et al.* (2012).

A partir de las colonias formadas en el agar mineral sin nitrógeno, se realizaron pruebas bioquímicas para su identificación, entre ellas la coloración Gram, para observar morfología y tinción, asimismo se realizó la prueba de la catalasa, el metabolismo del manitol, la prueba del almidón.

### 3.2.3 Variables analizadas

- **Variable independiente:** suelos de 2 campos de cultivo.
- **Variable dependiente:** recuento de bacterias diazótrofes.



### **3.2.4 Análisis estadístico de datos**

Los recuentos de bacterias diazótroficas en suelos, se distribuyeron en un diseño completamente aleatorio, el estudio estuvo conformado por tres tratamientos y sus respectivas tres repeticiones. Los datos fueron analizados mediante la prueba T y medias de Tukey ( $P > 0.05$ ), utilizando el software estadístico Infostat versión estudiantil.

## **3.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERIANO EN LA GERMINACIÓN *IN VITRO* Y EL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE ALFALFA**

### **3.3.1 Frecuencia de muestreo**

Para la inoculación de semillas con bacterias diazótroficas, se preparó suero fisiológico que contenían diluciones de  $1.5 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^8$ ,  $6 \times 10^8$  células/ml (estándares 0.5, 1 y 2 de McFarland). La preparación de las diluciones fue: con un asa de siembra se colectó una colonia de bacteria diazótrofa de la placa de agar mineral sin nitrógeno, que fue transferida a un tubo de ensayo con 10 ml de suero fisiológico, esta dilución fue comparada con la escala McFarland correspondiente (estándares 0.5, 1 y 2), en algunas oportunidades se colectaron 2 o 3 colonias, hasta que se logre la misma transparencia (Figura 6).

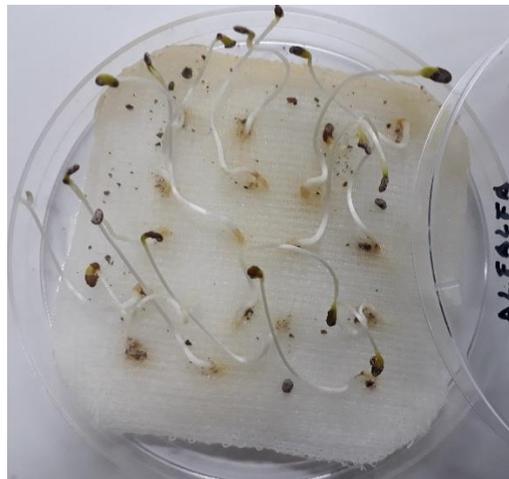
A continuación, se tomaron 20 semillas de alfalfa, las cuales fueron previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio diluido al 3% y se enjuagaron con 25 ml de agua destilada por cinco ocasiones; asimismo se tuvo un tratamiento control en el que se trabajaron con semillas humedecidas o tratada solo en agua destilada (Lara & Oviedo, 2007) (García de Salomone, y otros, 2010).

### 3.3.2 Evaluación del efecto de las bacterias diazotróficas en el porcentaje de germinación de semillas de alfalfa

En una placa Petri, previamente se colocó un segmento de gasa en la base de la placa, posteriormente fue humedecida con agua destilada estéril. A continuación, se depositaron 20 semillas de alfalfa, previamente inoculadas con las bacterias diazótrofes (Hala & Ali, 2019), tal como se observa en la Figura 6.

#### Figura 6

*Germinación de semillas de alfalfa en placas Petri con gasa.*



**Fuente:** Elaboración propia.

El porcentaje de germinación (PG) (González & Orozco, 1996) se determinó luego de 7 días y se calculó mediante la siguiente ecuación matemática:

$$PG = (\text{Semillas germinadas}) / (\text{Número total de semillas de prueba}) \times 100$$

### 3.3.3 Evaluación del efecto de las bacterias diazotróficas en el crecimiento de las plántulas de alfalfa

Los procedimientos fueron los siguientes:

- Primeramente, se disminuyó la carga microbiana de la muestra de suelo



exponiéndolas a la radiación solar por un tiempo de 4 horas entre las 10 am y las 2 pm, exponiéndose las muestras de suelo durante 7 días, sin presencia de nubosidad y durante sol radiante.

- Seguidamente las 20 semillas inoculadas y las semillas control fueron colocadas en frascos de plástico, luego fueron colocadas en andamios metálicos en condiciones ambientales promedio de la ciudad de Puno entre 11 °C y 18 °C y un fotoperiodo de 12 horas de luz solar.
- Los parámetros biométricos, se realizaron a los 30 días de evaluación, en ellos se determinaron las longitudes de tallo y raíz utilizando un vernier, en un total de 5 plántulas colectadas al azar, por cada repetición.

#### 3.3.4 Variables analizadas

- **Variable independiente:** bacterias diazótrofas.
- **Variable dependiente:** Porcentaje de germinación y longitud de plántulas.

#### 3.3.5 Análisis estadístico de datos

Los porcentajes de germinación y el crecimiento de plántulas, se distribuyeron en un diseño completamente aleatorio, el estudio estuvo conformado por tres tratamientos y sus respectivas tres repeticiones. Los datos fueron analizados mediante la prueba T y medias de Tukey ( $P > 0.05$ ), utilizando el software estadístico Infostat versión estudiantil.



## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 CARGA BACTERIANA DIAZÓTROFA EN SUELOS DE LA PROVINCIA DE MELGAR

Las bacterias diazótrofes presentaron un mayor recuento en los suelos procedentes de la localidad de Nuñoa con  $5.20 \times 10^6$  UFC/g suelo, mientras que, en los suelos procedentes de la localidad de Ayaviri, los recuentos tuvieron un promedio de  $3.47 \times 10^6$  UFC/g suelo. El aislamiento de microorganismos en medios libres en nitrógeno, constituye un primer paso hacia la identificación de bacterias con capacidad para fijar nitrógeno, aunque esta actividad está en proceso de ser comprobada mediante el ensayo de reducción de acetileno (Ballesta, 2007) en el laboratorio, el análisis del número y tipo de microorganismos identificados en estos medios brinda información valiosa acerca de la distribución de microorganismos potencialmente fijadores de nitrógeno en los diferentes sitios muestreados (Madigan *et al.*, 2012). La mayor dispersión de recuentos bacterianos se presentó en suelos de la localidad de Ayaviri con 15.32% superior a la dispersión presentada en Nuñoa (Tabla 1).

Luego de realizar la prueba estadística, se obtuvo una T de Student igual a -3.37, y una probabilidad igual a 0.0280, éste último como es menor a 0.05 (nivel de confianza) (Tabla 1), la cual nos induce a afirmar que existe diferencia estadística significativa entre los recuentos de *Azotobacter* sp en suelos de las dos localidades de la provincia de Melgar (Figura 7).

**Tabla 1**

*Recuento de bacterias Azotobacter sp en dos campos de cultivo de la provincia de Melgar (UFC/g suelo), agosto – octubre, 2017.*

Repeticiones	Suelos evaluados (x 10 <sup>6</sup> UFC/g suelo)	
	Ayaviri	Nuñoa
Rep 1	2.8	4.8
Rep 2	3.5	5.9
Rep 3	4.1	4.9
Promedio	3.47	5.20
D. E.	0.53	0.50
C. V. (%)	15.32	9.55
T = -3.37; P = 0.0280		

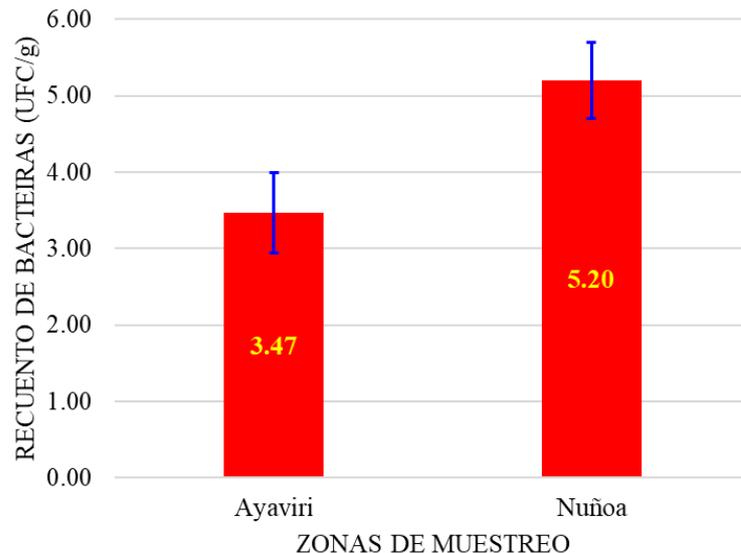
**Fuente:** Elaboración propia.

En este trabajo se realizó el aislamiento de bacterias en medios libres de nitrógeno como un primer paso para la identificación y posterior análisis de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y concuerda con hallazgos anteriores de bacterias diazótrofes en el interior y en la superficie de las raíces de varias gramíneas tropicales como es el caso de bacterias del género *Azospirillum* (Madigan *et al.*, 2012). En ese sentido existe la posibilidad que la permuta de vegetación, de manera específica la permanencia de gramíneas (*Brachiaria* sp), puede lograr favorecer la presencia de bacterias microaerófilas y aerobias. Las gramíneas mantienen un buen crecimiento radical a expensas del crecimiento de la parte aérea, puede adquirir nitrógeno mediante fijación asociativa (Torres *et al.*, 2000), éstas usan ambas formas de nitrógeno (nitrato y

amonio) y, al igual que en otros suelos, toma fósforo y calcio mediante sistemas radicales extensos y asociaciones con micorrizas arbusculares (Ballesta, 2007).

### Figura 7

*Prueba de T para la comparación de recuentos de bacterias Azotobacter en suelos de la provincia de Melgar, durante los meses agosto – octubre del 2017.*



**Fuente:** Elaboración propia.

Los suelos cultivados mostraron recuentos disminuidos de bacterias microaerófilas y aerobias que posean capacidad de fijar nitrógeno, lo que está relacionado con el cambio de cobertura natural. Para el establecimiento de un suelo para cultivo, se tala y quema los vegetales y este incremento de la temperatura elimina indistintamente muchos de los microorganismos del suelo (Fialho *et al.*, 1990). Según Ogata *et al.* (Ogata *et al.*, 2008) obtuvieron recuentos de bacterias presuntivas de *Azotobacter* spp. llegando a 70 NMP/g y 102 NMP/g en suelos de olivo, dichas bacterias diazotróficas se aislaron en suelos con pH de 5.76-7.45, un contenido de materia orgánica de 0.2 – 1.2%, una concentración de fosfato entre 13.59 a 107.53 ppm, en tal sentido se afirma que existe una relación directa de los recuentos bacterianos con la cantidad de bacterias ubicadas en



el suelo, así como la profundidad que llegan las raíces y la aplicación del tipo de riego, lográndose mayores recuentos bacterianos a mayor profundidad; por otro lado, en relación al pH, las bacterias tienen preferencia por pH neutros hacia ligeramente alcalinos, frente al fosfato resultaron con una correlación positiva, debido a que usan la sal en su metabolismo, lo cual concuerda con Madigan *et al.* (2012) quienes afirman que la fijación biológica de nitrógeno requiere de una gran cantidad de energía y lo obtienen de la cantidad de materia orgánica presente en la rizósfera.

*Azotobacter* sp. fue la bacteria aislada y se caracteriza por ser de alta motilidad y poseer metabolismo versátil para la obtención de fuentes de C y N, contribuyéndole adaptación para establecerse en el entorno competitivo de la rizósfera y cambios rápidos en las condiciones ambientales (Hartmann & Zimmer, 1993), sus recuentos en el tratamiento T2 (gallinaza compostada, fertilizante foliar líquido quelatado y complejo de aminoácidos) con  $1.0 \times 10^7$  UFC y la densidad más baja  $2.0 \times 10^5$  en T4 (fertilizante de síntesis química), siendo alta según Córdova *et al.* (Córdova *et al.*, 2009), quienes indican que este género rara vez excede varios miles de células por g de suelo, principalmente en suelos de regiones tropicales donde no es común encontrar cifras mayores de  $10^3$  UFC, por tanto son consideradas como bioindicadoras en alteraciones ambientales (Cassetari *et al.*, 2016).

Los suelos colectados en la localidad de Ayaviri presentaron los menores recuentos de *Azotobacter* sp., este resultado se debería a que Cu, elemento tóxico para estas bacterias incluso en muy bajas concentraciones (Gul, 2003). El tratamiento de semillas con inoculantes microbianos o biofertilizantes también ha sido empleado para promover y acelerar la germinación de semillas. Para obtener una alta producción y homogeneidad de plántulas de papaya en vivero es importante incrementar y acelerar el



proceso de la germinación de semillas y el establecimiento de las plántulas (Constantino *et al.*, 2017).

El mecanismo íntimo que explica la actividad antibacteriana del cobre no está totalmente dilucidado, un elemento crucial en la actividad antibacteriana es la capacidad del cobre para ceder y aceptar electrones en un proceso continuo, algunos estudios sugieren que el cobre, en concentraciones elevadas, tiene un efecto tóxico sobre las bacterias debido a la liberación de radicales de hidroperóxido, los iones de cobre potencialmente podrían sustituir iones esenciales para el metabolismo bacteriano como el hierro, interfiriendo inicialmente con la función de la membrana celular y luego a nivel del citoplasma alterando la síntesis proteica, ya sea inhibiendo la formación de proteínas o provocando la síntesis de proteínas disfuncionales, alterando la actividad de enzimas esenciales para el metabolismo bacteriano (Gordon *et al.*, 1994) (Prado *et al.*, 2012).

En la presente investigación se logró aislar microorganismos en medios de cultivo carentes de nitrógeno, este fue el primer paso para identificar a las bacterias fijadoras de nitrógeno. Este resultado es interesante porque contrasta con la mayor riqueza en vegetación que se encuentra en los bosques, y concuerda con hallazgos anteriores de bacterias diazótroficas en el interior y en la superficie de las raíces de varias gramíneas tropicales como es el caso de bacterias del género *Azospirillum* (Dobbelaere *et al.*, 1999). Es posible, por consiguiente, que el cambio de vegetación, y en especial la presencia de gramíneas (*Brachiaria* sp.), pueda favorecer el establecimiento de bacterias aerobias y microaerófilas (Hala & Ali, 2019). Las gramíneas mantienen un buen crecimiento radical a expensas del crecimiento de la parte aérea, puede adquirir nitrógeno mediante fijación asociativa, éstas usan ambas formas de nitrógeno (nitrato y amonio) y, al igual que en



otros suelos, toma fósforo y calcio mediante sistemas radicales extensos y asociaciones con micorrizas arbusculares (Flores *et al.*, 2012).

Para el establecimiento de un suelo para cultivo, se tala y quema los vegetales y este incremento de la temperatura elimina indistintamente muchos de los microorganismos del suelo (Guanopatín, 2012). Este proceso de sucesión microbiana es seguido por actinomicetos, los cuales se han reportado como productores de sustancias antimicrobianas (García *et al.*, 2010) que podrían inhibir el crecimiento de bacterias, entre éstas las fijadoras de nitrógeno. Finalmente, llegan otras bacterias a terminar de transformar bioquímicamente las moléculas residuales (González & Orozco, 1996). Con base en esto, es posible que el proceso de establecimiento de las poblaciones bacterianas en estos suelos tome más tiempo y solamente se establezca eficazmente en cultivos de mayor edad, en los cuales la oferta de nutrientes sea más alta (Martínez *et al.*, 1988).

#### **4.2 EFECTO DE LAS BACTERIAS EN LA GERMINACIÓN Y EL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE ALFALFA**

Los más altos porcentajes de germinación se determinaron al inocular una concentración bacteriana diazótropa de  $6 \times 10^8$  células/ml con promedios de 83.33%, a continuación, se ubica la concentración de  $3 \times 10^8$  células/ml con 53.33%, mientras tanto que con concentración de  $1.5 \times 10^8$  células/ml se logró el 43.33%, todos fueron superiores al tratamiento control. Los porcentajes de germinación presentaron valores entre 6.66% en semillas inoculadas con una concentración bacteriana de  $1.5 \times 10^8$  células/ml y 22.91% en el tratamiento control (semillas sin inoculación bacteriana), los cuales sugieren una dispersión leve (Tabla 2).

**Tabla 2**

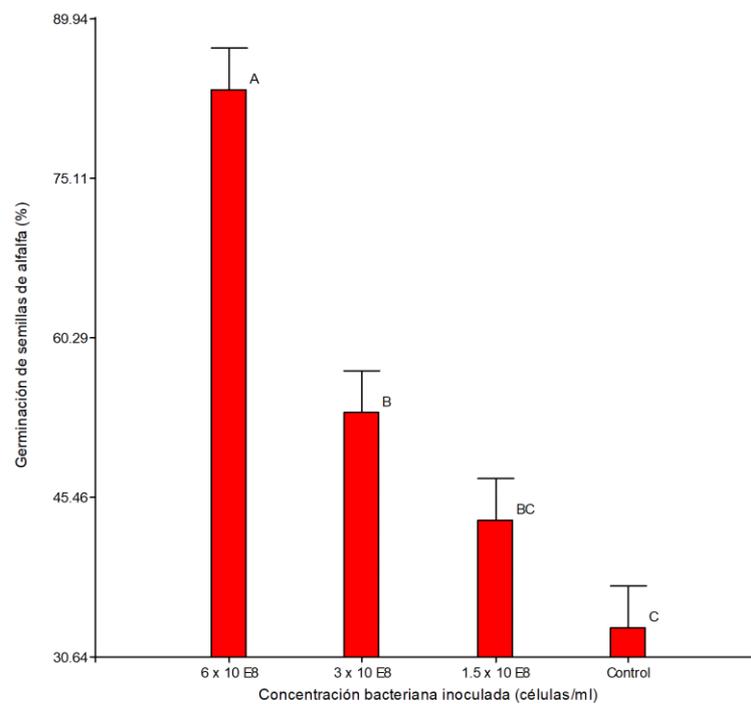
*Germinación (%) de semillas de alfalfa pos inoculación de bacterias diazótrofes.*

<b>Concentración bacteriana (células/ml)</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>Promedio</b>	<b>C. V. (%)</b>
<b>1.5 x 10<sup>8</sup></b>	40	45	45	43.33	6.66
<b>3 x 10<sup>8</sup></b>	55	60	45	53.33	14.32
<b>6 x 10<sup>8</sup></b>	90	75	85	83.33	9.16
<b>Control</b>	35	40	25	33.33	22.91

**Fuente:** Elaboración propia.

**Figura 8**

*Prueba de Tukey para los porcentajes de germinación, en semillas de alfalfa inoculadas, Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, julio – octubre 2017.*



**Fuente:** Elaboración propia.



La germinación (%) de las semillas de alfalfa, resultaron con diferencia estadística significativa según la concentración bacteriana inoculada ( $F=30.55$ ;  $gl=3$ ;  $P=0.0001$ ), y según la prueba de contraste de Tukey, el mayor promedio de germinación (83.33%) se presentó al inocular  $6 \times 10^8$  células/ml, seguido de las semillas inoculadas con  $3 \times 10^8$  células/ml con el 53.33% de germinación, a continuación, con la concentración  $1.5 \times 10^8$  células/ml con el 43.33% de germinación y el tratamiento control (semillas no inoculadas), con una germinación del 33.33%.

Los mejores promedios de crecimientos de tallo se lograron al inocular  $6 \times 10^8$  células/ml de bacterias llegando a promedios de longitud de 4.99 cm, con  $3 \times 10^8$  células/ml se obtuvo 4.28 cm, con  $1.5 \times 10^8$  células/ml una longitud de 2.55 cm; mientras tanto, en el tratamiento control (sin inoculación bacteriana) fue de 1.81 cm; de similar forma sucedió con las longitudes de las raíces, con longitudes de 5.81 cm, 3.07 cm, 1.48 cm y 1.05 cm con  $6$ ,  $3$ ,  $1.5 \times 10^8$  células/ml y el tratamiento control respectivamente. Los coeficientes de variación también estuvieron por debajo del 39.42%, indicando una dispersión de datos leve (Tabla 3).

Las longitudes de tallo en las plántulas de alfalfa, presentaron diferencia estadística significativa según la concentración bacteriana inoculada ( $F=20.89$ ;  $gl=3$ ;  $P=0.0004$ ), y según la prueba de contraste de Tukey, la mayor longitudes de tallo (4.99 y 4.28 cm) se presentaron al inocular  $6$  y  $3 \times 10^8$  células/ml, entre ambas no presentó diferencia estadística significativa, seguido de las semillas inoculadas con  $1.5 \times 10^8$  células/ml y el tratamiento control con 2.55 y 1.81 cm, entre estos dos tratamientos también no existió diferencia estadística (Figura 9).

**Tabla 3**

*Mediciones de la longitud de tallos y raíces post inoculación de plántulas de alfalfa con bacterias diazótrofes.*

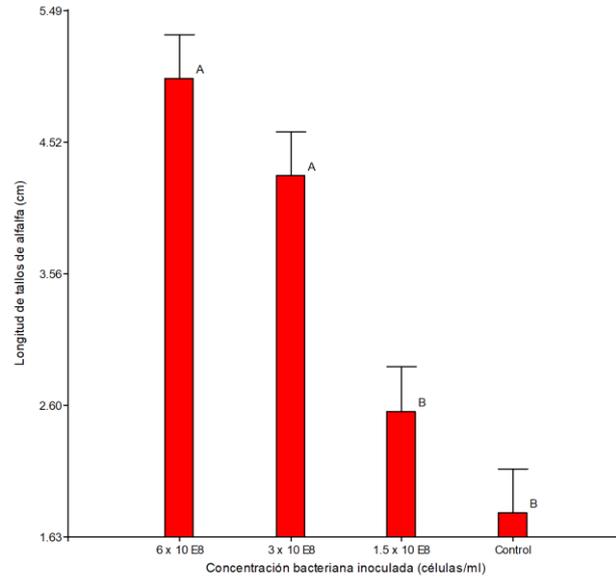
<b>Concentración bacteriana</b>		<b>Parámetro</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>Promedio</b>	<b>C. V. (%)</b>
<b>(células/ml)</b>							
1.5 x 10 <sup>8</sup>	Longitud de tallo	3.46	1.99	2.21	2.55	31.05	
	Longitud de raíz	1.72	1.12	1.60	1.48	21.45	
3 x 10 <sup>8</sup>	Longitud de tallo	4.64	4.30	3.89	4.28	8.78	
	Longitud de raíz	2.94	3.12	3.15	3.07	3.70	
6 x 10 <sup>8</sup>	Longitud de tallo	4.45	4.84	5.68	4.99	12.60	
	Longitud de raíz	5.96	6.89	4.57	5.81	20.11	
Control	Longitud de tallo	2.14	1.56	1.72	1.81	16.58	
	Longitud de raíz	1.52	0.89	0.74	1.05	39.42	

**Fuente:** Elaboración propia.

Las longitudes de las raíces en las plántulas de alfalfa, presentaron diferencia estadística significativa según la concentración bacteriana inoculada ( $F=33.75$ ;  $gl=3$ ;  $P=0.0001$ ), y según la prueba de contraste de Tukey, la mayor longitudes de raíz (5.81 cm) se presentó al inocular  $6 \times 10^8$  células/ml, luego se obtuvo una longitud de raíz de 3.07 cm, 1.48 cm y 10.5 cm con inoculaciones bacterianas de  $3$ ,  $1.5 \times 10^8$  células/ml y el tratamiento control respectivamente, existiendo diferencia estadística significativa entre todos los tratamientos (Figura 10).

### Figura 9

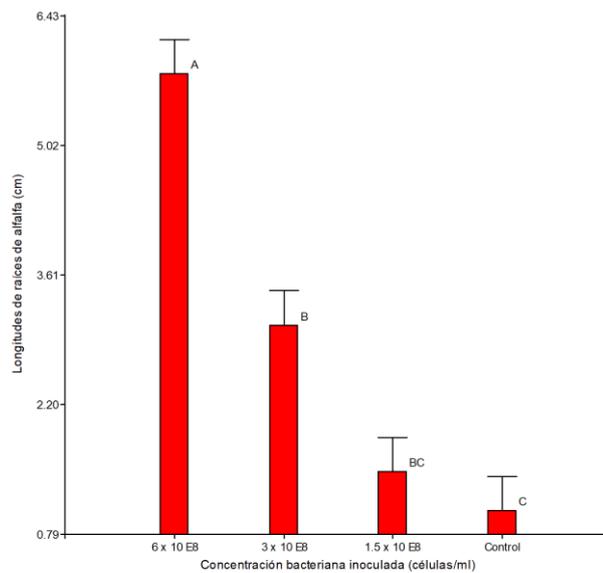
*Prueba de Tukey para las longitudes de tallos, en plántulas de alfalfa inoculadas,  
Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, julio – octubre 2017.*



**Fuente:** Elaboración propia.

### Figura 10

*Prueba de Tukey para las longitudes de raíces, en plántulas de alfalfa inoculadas,  
Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, julio – octubre 2017.*



**Fuente:** Elaboración propia.



Los tratamientos bacterianos, originaron los mejores resultados en la emergencia de las plantas, en la longitud y diámetro de los tallos y hojas, presentando diferencia estadística con las semillas testigo. El efecto beneficioso de las rizobacterias radica en diferentes mecanismos, tales como: la producción de sustancias estimuladoras del crecimiento, sideróforos y antibióticos; así como la inducción de resistencia en la planta y la fijación del nitrógeno (Torriente, 2010). El aislamiento de bacterias diazótroficas, su identificación a través de métodos confiables y la evaluación de la capacidad de promover del crecimiento vegetal representan una excelente opción en investigaciones agrícolas, ya que contribuye a mejorar la nutrición y la calidad de los cultivos, beneficiando el sistema planta – suelo – microorganismo. La elongación de las raíces está influenciada por el genotipo bacteriano y el genotipo de la planta; sin embargo, para confirmar esta hipótesis, se necesitarían más repeticiones de los ensayos. El crecimiento de la raíz principal y de las raíces laterales conlleva un incremento en la superficie de absorción de las plantas, lo que favorece el intercambio de nutrientes.

El crecimiento de las raíces se atribuye a la producción bacteriana del ácido indol acético (AIA). En las condiciones experimentadas, la inoculación bacteriana no logró provocar un crecimiento significativo en la longitud de la radícula en referencia a las semillas que no fueron inoculadas. Las bacterias inoculadas si deberían tener la capacidad de producir AIA, pero por algún efecto desconocido no estaría siendo expresada. La capacidad de producir fitohormonas como auxinas es una característica deseable de un PGPR (Vessey, 2003), un 58.65% de las 104 cepas aisladas produjo AIA, de las 20 cepas seleccionadas produjeron AIA entre 2.42 hasta 46.47  $\mu\text{g/ml}$ , estos resultados concuerdan con Celis & Gallardo (Celis & Gallardo, 2008), que obtuvieron en el medio BT a los 6 días un máximo de 60  $\mu\text{g/ml}$  de AIA con una cepa de *Azotobacter vinelandii*. Se han



reportado bacterias *Azotobacter* como productoras de AIA, una de las auxinas más estudiadas hasta el momento (Tsavkelova *et al.*, 2006). Las bacterias evaluadas con características presuntivas para *Azotobacter* no produjeron AIA, este grupo de bacterias estarían dentro del 44% de cepas de *Azotobacter* evaluadas por Rico (2009) que no dieron una reacción positiva para la producción de AIA. Obando *et al.* (2010) en un trabajo sobre bacterias diazotróficas del eucalipto, encontraron un máximo 49.57 µg/ml de AIA, valor que es similar al obtenido en esta investigación.

Las bacterias rizosféricas también pueden solubilizar fosfato, que estimula el crecimiento vegetal. De 104 aislamientos, el 25.96% logró solubilizar fosfato tricálcico; donde 20 bacterias solubilizaron entre 0.31 cm<sup>2</sup> y 5.84 cm<sup>2</sup>. Similares resultados fueron obtenidos por Rico (2009) donde las cepas de *Azotobacter* originaron halos solubilización entre 0.11 cm<sup>2</sup> y 5.43 cm<sup>2</sup>. En nuestra investigación el género *Azotobacter* no solubilizó el fosfato tricálcico, mientras que los géneros que sí solubilizaron fueron: *Burkholderia*, *Erwinia*, *Raoultella* y *Klebsiella* (Clavijon, 2012).

El efecto bacteriano en la germinación de semillas de alfalfa se determinó en una cepa que no produce AIA, como la cepa *Novosphingobium* sp, quien originó una germinación máxima de 45.83%, razón por la cual se presume que existiría otras hormonas que estarían afectando la germinación. Además, se registró que el 45.2% de los aislamientos de las bacterias diazotróficas, incrementaron significativamente la germinación respecto del control llegando al 129%. En contraste a los resultados reportados por Ogata *et al.* (Ogata *et al.*, 2008) que evaluaron el efecto de diferentes bacterias diazotróficas aisladas de la rizósfera de árboles de Tara y evaluadas a las 24 horas en semillas de alfalfa, mostraron que el 50% de los tratamientos incrementaron significativamente la germinación de estas semillas, obteniendo hasta un incremento del



porcentaje de germinación de 214% con respecto al control. Esto es mayor a los resultados del presente trabajo.

Para evaluar el crecimiento en el MMSN se designó un valor a partir de 0 a 3 de acuerdo a las equivalencias con los tubos de la escala de Mc Farland, de las 104 cepas aisladas sólo el 12.5% obtuvo crecimientos equivalentes a  $6 \times 10^8$  UFC/ml. No obstante, el 40% de las 20 cepas seleccionadas presentó un crecimiento equivalente a la escala 3. Esta variable fue importante para estimar la capacidad de cepas con potencial para la producción de inoculantes.

La capacidad de estos microorganismos para estimular la germinación y mejorar el desarrollo de las plantas se ha adaptado desde condiciones *in vitro* hasta *in vivo* en plantas de importancia agrícola y ornamental (Tsavkelova *et al.*, 2007). Los microorganismos útiles, entre los que se incluyen las bacterias rizosféricas, promueven el crecimiento vegetal, ya que poseen un número determinado de propiedades fisiológicas que resultan importantes para la colonización de la superficie radical y el mejoramiento del crecimiento y la salud de las plantas (Cassán *et al.*, 2009). Entre estas propiedades, la producción de ácido indolacético se considera el mecanismo principal relacionado con la promoción del crecimiento vegetal (Mehnaz *et al.*, 2010).

En ninguna de las cepas aplicadas, que tuvieron efecto altamente positivo en la germinación de *Sporobolus cryptandrus*, se descarta que la producción de giberelina sea una de las causas más probables en este resultado. Cassán *et al.* (2009) consideraron esta premisa como típica para explicar el incremento de la germinación de soya y maíz inoculados con *A. brasilense* y *B. japonicum*. La baja respuesta de las semillas en la germinación en el resto de los tratamientos inoculados se pudiera atribuir a la competencia por el oxígeno por parte de las células bacterianas y las semillas (Harper & Lynch, 1979).



Esto puede estar determinado por la concentración celular que se utilizó. Kurdish *et al.* (2008) plantearon que la respuesta de las semillas a la bacterización con *A. vinelandii* depende también de la especie vegetal utilizada.

La hormona giberelina (ácido giberélico) es la responsable de la elongación del tallo en las plantas (Davies, 1995). Precisamente algunas de las cepas que se destacaron en su efecto en esta variable pertenecen al grupo de microorganismos que la producen, como *Azotobacter* spp. (Martínez *et al.*, 1988) y *Azospirillum brasilense* (Janzen *et al.*, 1992). La elongación del tallo en semillas de arroz, al ser inoculadas con diferentes cepas de rizobios y bacterias dinitro fijadoras de vida libre, se debe a la producción de giberelina por parte de las bacterias de ambos grupos (Mia *et al.*, 2012). Al igual que en la variable anterior, la influencia de hormonas específicas que se producen por las bacterias inoculadas puede ser el mecanismo principal de estimulación radicular, y no la fijación del nitrógeno atmosférico. El efecto de la fijación de nitrógeno de *Azospirillum* en la planta se realiza solo cuando esta alcanza estadios fenológicos más avanzados (Bashan *et al.*, 2004). El efecto hormonal de *Azospirillum*, y no el nitrógeno fijado mejoró la eficiencia de absorción de N en arroz (García *et al.*, 2010).

Los valores inferiores del tratamiento inoculado con *A. chroococcum* fueron inferiores al de otros tratamientos inoculados, como del testigo. En un experimento con *A. chroococcum* inoculado en semillas de *Panicum maximum* y *Cenchrus ciliaris*, se determinó que la germinación y altura de las plántulas decrecieron con la aplicación de esta bacteria (Tang, 1995). Este resultado pudiera indicar una deficiente producción de hormonas estimuladoras por parte de la bacteria. También se pudiera atribuir a la regulación de la morfogénesis radicular por el AIA bacteriano (Dobbelaere *et al.*, 1999). En la cepa ATCC9039 (*B. indica*), los altos valores obtenidos en los tratamientos



inoculados con esta cepa en las variables longitud de la radícula y longitud de la plúmula se pudieran deber, no solo a las hormonas que también produce esta especie, sino a la alta producción de aminoácidos, como glutamina y alanina (Thuler *et al.*, 2003). Estos compuestos, además de mantener bajos los niveles de N intracelular en la bacteria para una mejor fijación del N<sub>2</sub>, quedan a disposición de la planta para su desarrollo vegetativo.

El tratamiento con *Azotobacter chroococcum* registró el mayor porcentaje de germinación (90.28%), pero resultó significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) al tratamiento control (15.28%) en semillas de papaya (Constantino *et al.*, 2017), este autor indica que la alternancia de la temperatura fue el principal factor que influyó en la superación de la dormancia y en la promoción de la germinación, más que la aplicación de biofertilizantes y el AG<sub>3</sub>. Asimismo, la aplicación de *Azotobacter* a semillas antes de la siembra, mejora los porcentajes de germinación y el crecimiento de las plantas, debido a que las bacterias, no solo fijan nitrógeno atmosférico, también sintetizan sustancias biológicamente activas entre ellos aminoácidos, vitaminas, ácido indol acético (AIA) y giberelinas en cultivos puros (Perrig *et al.*, 2007), al aplicar un consorcio de rizobacterias entre ellas *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* a semillas de maíz, se logró incrementar el porcentaje de germinación (Nezarat & Gholami, 2009).

La doble inoculación en semillas y a nivel foliar con bacterias *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum brasilense*, y la aplicación de *G. intraradices* solos o en combinación, estimulan la producción de valores de biomasa fresca y seca mayores con respecto al tratamiento testigo (Constantino *et al.*, 2017). Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas cuando se aplicó *A. chroococcum* simple, por lo que al parecer sus efectos serían mejores con combinación con otros microorganismos. Por otro lado, la



biofertilización foliar con *Azotobacter* en cultivos como el arroz, han sido reportados con incrementos en el rendimiento en grano (Kannaiyan *et al.*, 1980).



## V. CONCLUSIONES

- Las bacterias diazótrofes en la provincia de Melgar (Ayaviri – Nuñoa), presentaron los mayores recuentos bacterianos con un promedio de  $5.20 \times 10^6$  UFC/g en suelos de la localidad de Nuñoa, mientras que en los suelos de la localidad de Ayaviri los recuentos tuvieron un promedio de  $3.47 \times 10^6$  UFC/g suelo presentando diferencia estadística significativa ( $T=-3.37$ ;  $P=0.0280$ ).
- Las bacterias diazótrofes estimularon el proceso de germinación de semillas de alfalfa obteniéndose promedios de germinación del 83.33% al inocular una concentración de  $6 \times 10^8$  células/ml, siendo superior al tratamiento control (33.33%) ( $F=30.55$ ;  $gl=3$ ;  $P=0.0001$ ); y los mejores crecimientos de tallo y raíces se obtuvieron con una inoculación de  $6 \times 10^8$  células/ml con un promedio de longitud de 4.99 cm, siendo superiores al tratamiento control (1.81 cm) ( $F=20.89$ ;  $gl=3$ ;  $P=0.0004$ ).



## VI. RECOMENDACIONES

- A los investigadores, realizar recuentos de bacterias diazótrofes en diferentes provincias de la región Puno, posteriormente lograr la identificación molecular de las especies de bacterias diazótrofes.
- A los futuros tesis de pre y postgrado, realizar inoculaciones experimentales en diferentes concentraciones y durante todo el proceso de cultivo de la alfalfa hasta la producción de semilla.
- A los futuros tesis de pre y postgrado, realizar experimentos de doble inoculación en semillas a nivel foliar de *Azotobacter* sp y otras bacterias y/o micorrizas, o en combinación y así evaluar los valores de biomasa fresca y seca.



## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abril, R., Ruíz, T., Alonso, J., & Génova C. (2017). Germinación, diámetro de semillas y tratamientos pregerminativos en especies con diferentes finalidades de uso. *Agron. Mesoam.*, 28(3), 703 - 717.
- Atlas R. & Bartha R. (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Editorial Cuarta edición. Addison Wesley. Madrid – España. 677 p.
- Azcón J. & Talón M. (1993). *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Primera reimpresión. Editorial McGraw – Hill Interamericana. Madrid – España. 337 p.
- Balandreau, J. (1986). Ecological factors and adaptative processes in N<sub>2</sub> - fixing bacterial populations of the plant environment. *Plant Soil*, 90, 73.
- Ballesta, A. (2007). Efecto de la alfalfa (*Medicago sativa* L.) y del abonado nitrogenado en el maíz (*Zea mays* L.) y el trigo (*Triticum aestivum* L.) en una rotación Alfalfa - Maíz - Trigo en regadío. España: Universidad de Lleida.
- Bashan, Y., Holguin, G., & De Bashan, L. (2004). *Azospirillum* - plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances. *Can. J. Microbiol.*, 50, 521.
- Baskin, C., & Baskin, M. (2001). *Seeds: Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination*. San Diego - USA: Academic Press.
- Bécquer, C., Salas, B., Slaski, J., Archambault, D., & Anya, A. (2013). Influencia de bacterias rizosféricas en la germinación y crecimiento inicial de *Sporobolus cryptandrus* (Torr.) A. Gray. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 47(4), 431 - 436.
- Brack A. (1999). *Diccionario enciclopédico de plantas medicinales del Perú*. Editorial PNUD y Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas. Cusco – Perú. 550 p.
- Bruinsma, J. (2003). *World agriculture: Towards 2015/2013 en FAO perspective*. . Rome: FAO.



- Carvajal, J., & Mera, A. (2010). Fertilización biológica: técnica de vanguardia para el desarrollo agrícola sostenible. *Producción + Limpia.*, 5(2), 77.
- Cassán, F., Perriga, D., Sgroya, V., Pennab, C., & Luna, V. (2009). *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European J. Soil Biol.*, 45, 28.
- Cassetari, A., Montenegro, S., & Pinheiro, M. (2016). Fixacao biológica de nitrogenio asociativa e de vida livre. *Microbiología*, 134 - 147.
- Celis, L., & Gallardo, I. (2008). Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) en cultivos microbianos. Tesis Microbiólogo Agrícola y Veterinario, PUJ.
- Chong, C., Bible, B., & Hak - Yoon, J. (2002). Germination and emergence. En M. Pessarakli, *Handbook of plant and crop physiology* (págs. 85 - 146). New York: Marcel Dekker Inc.
- Clavijo, C., Chipana, V., Centeno, J., Zúñiga, D., & Guillén, C. (2012). Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias diazotróficas de la rizósfera del cultivo de *Olea europea* "olivo" en Tacna Perú. *Ecol. Apl.*, 11(2).
- Constantino, M., Gómez, R., Álvarez, J., Pat, J., & Espín, G. (2017). Efecto de la biofertilización y los biorregulares en la germinación y el crecimiento de *Carica papaya* L. *Rev. Colomb. Biotecnol.*, XII(2), 103 - 115.
- Córdova, Y., Rivera, M., Ferrera, R., Obrador, J., & Córdova, V. (2009). Detección de bacterias benéficas en suelo de banano (*Musa* AAA Simmonds) cultivar Gran enano y su potencial para integrar un biofertilizante. *Revista Publicaciones Uciencia - México*, 25(3).
- Coyne, M. (2000). *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio*. Madrid - España: Paraninfo.



- Davies, P. (1995). The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. En D. Davies, PLant hormones: physiology, biochemistre and Molecular Biology. The Netherlands: Kluwer Academic Press.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Vande, A., & Vanderleyden, J. (1999). Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil*, 212, 155.
- Doria, J. (2010). Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales*, 31(1), 74 - 85.
- Escobar, C., Horna, Y., Carreño, C., & Mendoza, G. (2011). Caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* spp. y su efecto en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill. "tomate" en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria - Universidad Nacional de Trujillo*, 2.
- Fialho, A., Zielinski, N., Fett, W., Chakrabarty, A., & Berry, A. (1990). Distribution of alginate gene sequenses in the *Pseudomonas* rRNA homology grupo I - *Azomonas* - *Azotobacter* lineage of superfamilia B procariotes. *Appl. Environ. Microbiolog.*, 56, 436 - 443.
- Flores, J., Vásquez, R., Solano, J., Aguirre, V., Flores, F., Bahena, M., Orihuela, A. (2012). Efecto de fertilizante orgánico, inorgánico y su combinación en la producción de alfalfa y propiedades químicas del suelo. *Terra Latinoamericana*, 30(3).
- Frioni L. (2011). *Microbiología: básica, ambiental y agrícola*. Primera edición. Orientación Gráfica Editora. Buenos Aires – Argentina. 744 p.
- García de Salomone, I., Di Salvo, L., Escobar, J., Boa, P., Urquiaga, S., & Teixeira, K. (2010). Field response of rice paddy crop to *Azospirillum* inoculation: physiology of rhizosphere bacterial communities and the genetic diversity of endophytic bacteria in different parts of the plants. *Plant. Soil.*, 336, 351.
- García M., Farías R., Peña J., Sánchez J. (2005). Inoculación del trigo var. Pavon con *Azospirillum* spp. y *Azotobacter beijerinckii*. *Terra Latinoamericana*. Vol. 23 (1): 65-72.



- González E., Alcarraz M., Castro A. & Casas Sh. (2018). Efecto del biofertilizante *Azotobacter – Rhizobium* en tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.), como alternativa a la fertilización química. Rev. Ciencia e Investigación. Vol. 21 (2): 7 – 12.
- González R. (2015). Aislamiento y caracterización de bacterias diazotróficas del género *Azotobacter* y su efecto sobre el crecimiento y desarrollo en maíz, variedad INIAP 182, en la estación experimental la Argelia. Tesis de Ing. Agrónomo, Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, Universidad Nacional de Loja. Loja – Ecuador. 102 p.
- González, L., & Orozco, A. (1996). Métodos de análisis de datos en la germinación de semillas, un ejemplo: *Manfreda brachystachya*. Bol. Soc. Bot. - Perú, 58.
- Gordon, A., Howell, L., & Harwood, V. (1994). Responses of diverse heterotrophic bacteria to elevated copper concentrations. Can J. Microbiol., 40(408 - 411).
- Guanopatín, M. (2012). Aplicación de biol en el cultivo establecido de alfalfa (*Medicago sativa*). Cevallos - Ecuador: Facultad de Ingeniería Agronómica, Universidad Técnica de Ambato.
- Gul, F. (2003). Growth and nitrogen fixation dynamics of *Azotobacter chroococcum* in nitrogen - free and OMW containing medium. The middle east technical university.
- Hala Y. & Ali A. (2019). Isolation and characterization of *Azotobacter* from Neems Rhizosphere. Journal of Physics: Conf. Series. 5 p.
- Harper, S., & Lynch, J. (1979). Effects of *Azotobacter chroococcum* on Barley Seed Germination and Seedling Development. J. General Microbiol., 110, 45.
- Hartmann, Z., & Zimmer, W. (1993). Physiology of *Azospirillum*. In: *Azospirillum/plant Associations*. Boca Ratón: CRC Press.
- Hitchins, V., & Sadoff, H. (1970). Morphogenesis of cyst in *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol, 104, 492 - 498.
- Hitchins, V., & Sadoff, H. (1973). Sequential metabolic events during encystment of *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol., 113, 1273 - 1279.



- Holt, J. (2000). *Bergey's manual to determinative bacteriology*. Baltimor, Maryland, USA: Williams y Wilkins.
- Horan, N., Jarman, T., & Dawes, E. (1983). Studies of some enzymes of aliginic acid biosynthesis in *Azotobacte vinelandii* grown in continuous culture. USA.
- Huete Y., Torres J. & Domínguez D. (2019). Comportamiento morfológico del maíz inoculado con *Azotobacter chroococcum* a dosis reducida de fertilizante nitrogenado. *Revista Avances Centro de Información y Gestión Tecnológica*. Vol. 22 (2): 166 – 178.
- Janzen, R., Rood, S., Dormar, J., & McGill, W. (1992). *Azospirillum brasilense* produces gibberellins in pure culture and chemically medium and in co-culture on straw. *Soil Biol Biochem*, 24, 1061.
- Jiménez, D. (2007). Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de *Azotobacter* spp mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal 16S. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Javeriana, Microbiología Industria, Facultad de Ciencias Básicas, Bogotá - Colombia.
- Kannaiyan, S., Govindarajan, K., & Lewin, H. (1980). Effect of foliar spray of *Azotobacter chroococcum* on rice crop. *Plant and soil*, 6, 487 - 490.
- Koornneef, M., Bentsink, L., & Hilhorst, S. (2002). Seed dormancy and germination. *Plant Biol.*, 5, 33 - 36.
- Kurdish, I., Bega, Z., Gordienko, A., & Dyrenko, D. (2008). The effect of *Azotobacter vinelandii* on plant seed germination and adhesion of these bacteria to cucumber roots. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya*, 4, 442.
- Lallana, M., Billard, C., Elizalde, J., & Lallana, V. (2008). Bioensayo de germinación de *Lactuca sativa* (L.): determinación de calidad de agua en represas para riego. *Rev. FCA UNCuyo*, Tomo XL(1), 29-38.
- Lara, C., & Oviedo, L. (2007). Evaluación de bacterias nativas de la zona de Córdoba, con capacidad fijadora de nitrógeno y secetora de ácido indoacético (AIA), en pasto Angletón (*Dichantium aristatum*). Informe final de Investigación,



Universidad de Córdoba, Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias,  
Córdoba - Colombia.

- Laura, Y., Moreno, Y., & Galvis, F. (2013). Potencial biofertilizante de bacterias diazótroficas aisladas de muestra de suelo rizosférico. *Pastos y Forrajes*, 36(1).
- León L. & Rojas L. (2015). Determinación del potencial promotor del crecimiento vegetal de *Azotobacter* spp. aislados de la rizósfera de malezas en cultivos de maíz (*Zea mays* L.). *Rev. Scientia Agropecuaria*. Vol. 6 (4).
- Lin, L., & Sadoff, H. (1968). Encystment and polymer production of *Azotobacter vinelandii* in the presence of B - hidroxibutirato. Londres.
- Madigan M., Martinko J. & Parker J. (2004). *Biología de los Microorganismos*. Décima edición. Editorial Pearson Prentice Hall. Madrid – España. 1011 p.
- Madigan, M., Martinko, T., Dunlap, P., & Clark, D. (2012). *Biología de los microorganismos*. (Duodécima Ed. ed.). Madrid - España: Pearson.
- Marín, V., Baldani, V., Dos Santos, K., & Baldani, J. (1998). Fijación biológica de nitrógeno: bacterias fijadoras de nitrógeno de importancias para la agricultura tropical. Río de Janeiro - Brasil: Embrapa - Agroecología.
- Martínez, M., De la Rubia, T., Moreno, J., & Gonzáles, J. (1988). Root exudates of *Zea mays* and production of auxins, gibberelins and cytokinins by *Azotobacter chroococcum*. *Plant Soil*, 110, 149.
- Mehnaz, S., Kowalik, T., Reynolds, B., & Lazarovits, G. (2010). Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field condition. *Soil Biol & Biochem*, 42, 1848.
- Mia, M., Shamsuddin, Z., & Mahmood, M. (2012). Effects of rhizobia and plant growth promoting bacteria inoculation on germination and seedling vigor of lowland rice. *African J. Biotechnol.*, 16, 3758.
- Montenegro, S., Gómez, S., & Barrera, S. (2017). Efecto de la gallinaza sobre *Azotobacter* sp., *Azospirillum* sp. y hongos micorrízicos arbusculares en un cultivo de cebolla (*Allium fistulosum*). *Rev. Entramado*, 13(2), 250 - 257.



- Mostacero, J., Mejía, F., & Gamarra, O. (2009). *Fanerógamas del Perú: Taxonomía, utilidad y ecogeografía*. Trujillo - Perú: Graficart SRL.
- Nezarat, S., & Gholami, A. (2009). Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving seed germination seedling growth and yield of maize. *Pakistan Journal of Biological Science*, 12, 26 - 32.
- Nour, S., Cleyet, J., Beck, D., Effosse, A., & Fernandez, M. (1994). Genotypic and phenotypic diversity of Rhizobium isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Can. J. Microbiol.*, 40, 345 - 354.
- Obando, D., Burgos, L., Rivera, D., Rubiano, M., Diván, D., & Bonilla, R. (2010). Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, César (Colombia). *Acta Biológica Colombiana*, 15, 107 - 120.
- Obregón, P. (14 de enero de 2007). La germinación. Obtenido de Agricultura y ganadería: [www.monografias.com/trabajos59/bioquimicagerminacion/bioquimicagerminaci\\_on2.shtml](http://www.monografias.com/trabajos59/bioquimicagerminacion/bioquimicagerminaci_on2.shtml)
- Ogata, K., Arellano, C., & Zúñiga, D. (2008). Efecto de diferentes bacterias aisladas de rizófera de *Caesalpinia spinosa* en la germinación de diferentes especies vegetales cultivados. *Zonas Áridas*, 12, 137 - 153.
- Orozco C. & Martínez P. (2009). Evaluación de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno asimbióticos aislados de la rizósfera de *Pinus patula* en Colombia. *Revista Bosque*. Vol. 30 (2): 70 – 77.
- Page, W., & Shivprasad, D. (1991). *Azotobacter salinestrus* sp nov., a sodium - dependent, microaerophilic, and aerotolerant nitrogen fixing bacterium. *J. Syst. Bacteriol.*, 41, 369 - 376.
- Peña G. (2002). *Biotechnología, clonación e ingeniería genética*. Concytec. Lima – Perú. 368 p.
- Perrig, D., Boiero, L., Masciarelli, O., Penna, C., Ruíz, O., Cassan, F., & Luna, V. (2007). Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important



- strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75, 1143 - 1150.
- Prado, V., Vidal, R., & Durán, C. (2012). Aplicación de la capacidad bactericida del cobre en la práctica médica. *Rev. Med. Chile*, 140(1325 - 1332).
- Ramos, F. (1992). Genética de la regulación de la asimilación de nitrato en *Azotobacter vinelandii*. Sevilla - España.
- Rico, M. (2009). Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género *Azotobacter* y Actinomicetos aislados de cultivos de *Solanum tuberosum* Linnaeus, 1753 (papa) cultivados en zonas altoandinas del Perú. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de San Marcos, E. P. de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Biológicas, Lima - Perú.
- Suárez, D., & Melgarejo, L. (02 de setiembre de 2010). Biología y germinación de semillas. Obtenido de ResearchGate: [https://www.researchgate.net/publication/258627099\\_BIOLOGIA\\_Y\\_GERMINACION\\_DE\\_SEMILLAS](https://www.researchgate.net/publication/258627099_BIOLOGIA_Y_GERMINACION_DE_SEMILLAS)
- Tang, M. (1995). Efecto de la inoculación con *Azotobacter chroococcum* en la germinación y altura de las plántulas en dos leguminosas y dos gramíneas. *Pastos y forrajes*, 18, 145.
- Tejera, N., Lluch, C., Martínez, M., & González, J. (2005). Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant and Soil*, 27.
- Thuler, D., Floh, E., Handro, W., & Barbosa, H. (2003). *Beijerinckia dextrii* releases plant growth regulators and amino acids in synthetic media independent of nitrogenase activity. *J. Appl. Microbiol.*, 95, 799.
- Torres, M., Valencia, S., Bernal, J., & Martínez, P. (2000). Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter* sp and *Pseudomonas* sp, producers of indole - 3 - acetic acid and Siderophores, from Colombian Rice Rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiología - México*, 42.



- Torriente, D. (2010). Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de la caña de azúcar. *Perspectivas de su uso en Cuba*, 31, 19.
- Tsavkelova, E., Cherdyntseva, T., Botina, S., & Netrusov, A. (2007). Bacteria associated with orchid roots and microbial producción of auxin. *Microbiol. Res.*, 95, 69.
- Tsavkelova, E., Klimova, S., Cherdyntseva, T., & Netrusov, A. (2006). Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42, 117 - 126.
- Vela, G. (1974). Survival of *Azotobacter* in dry soil. *Appl. Microbiol.*, 28, 77 - 79.
- Vessey, J. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*, 255, 571 - 586.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol*, 7, 203 - 214.
- Zula, A., Navarro, A., & Moreno, L. (2014). Evaluación del potencial biofertilizante de bacterias diazotróficas aisladas de suelos con cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta Agronómica - Colombia*, 63(3).
- Zúñiga D. (2012). *Manual de Microbiología Agrícola*. Primera edición. Q & P Impresores. Lima – Perú. 112 p.
- Zúñiga, D. (2010). Caracterización y selección de bacterias promotoras de crecimiento en el cultivo orgánico de maca como herramienta biotecnológica para mejorar su calidad productiva. Lima - Perú: Perúbiodiverso.

## ANEXOS

**Figura 11**

*Reactivos utilizados para aislar bacterias diazótroficas.*



**Fuente:** Elaboración propia.

**Figura 12**

*Vista de costa de las plántulas de alfalfa inoculadas con bacterias diazótroficas.*



**Fuente:** Elaboración propia.

**Figura 13**

*Vista aérea de las plántulas inoculadas con bacterias diazótroficas.*



**Fuente:** Elaboración propia.

## Figura 14

*Kit de reactivos para tinción Gram.*



**Fuente:** Elaboración propia.

## Figura 15

*Procedimiento de tinción de las bacterias diazótroficas.*



**Fuente:** Elaboración propia.

## Figura 16

*Preparación de soluciones inoculantes de bacterias diazótroficas mediante la técnica de McFarland.*



**Fuente:** Elaboración propia.

### Figura 17

*Soluciones bacterianas estandarizadas para inoculas a las semillas y plántulas de alfalfa.*



**Fuente:** Elaboración propia.

### Figura 18

*Mediciones finales de las plántulas luego de 40 días inoculadas con bacterias diazótrofas.*



**Fuente:** Elaboración propia.

### Figura 19

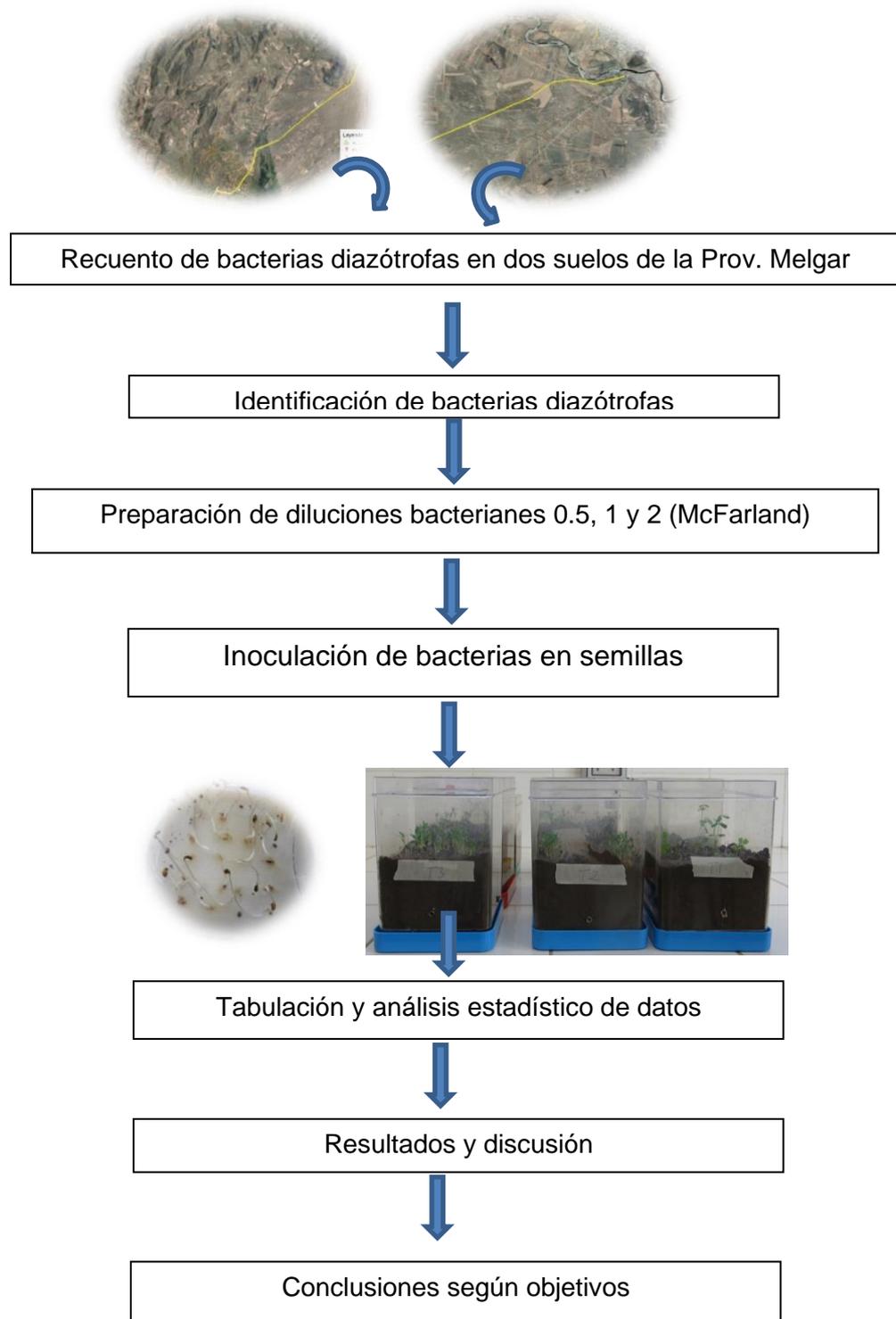
*Resultado final del tamaño de las plántulas inoculadas con bacterias diazótrofas.*



**Fuente:** Elaboración propia.

**Figura 20**

*Flujograma del trabajo de investigación realizada.*



**Fuente:** Elaboración propia.



*Universidad Nacional del Altiplano de Puno*

Facultad de Ciencias Biológicas  
Escuela Profesional de Biología  
Programa Académico de Microbiología y Laboratorio Clínico  
Laboratorio de Microbiología de los Alimentos



## CONSTANCIA

LA QUE SUSCRIBE, JEFE DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNA – PUNO.

HACE CONSTAR:

Que el Bachiller **JOSÉ ROBERTO QUISPE PACCO**, egresado de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, ha realizado su trabajo de investigación titulado: “**GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO *in vitro* DE ALFALFA (*Medicago sativa* L.) INOCULADAS CON BACTERIAS DIAZÓTROFAS**”, en el laboratorio de Microbiología de los Alimentos, del Programa Académico de Microbiología y Laboratorio Clínico de la Escuela Profesional de Biología, entre los meses de julio a octubre del 2017.

Se le expide la presente Constancia a solicitud del interesado para los fines que se estime por conveniente.

Puno, 17 de julio del 2019.



Biól. M. Sc. EVA LAURA CHAUCA DE MEZA  
Jefe de Laboratorio de Microbiología de los Alimentos  
FCCBB – UNA Puno



### AUTORIZACIÓN PARA EL DEPÓSITO DE TESIS O TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Por el presente documento, Yo JOSE ROBERTO QUISPE PAECO,  
identificado con DNI 42562711 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional,  Programa de Segunda Especialidad,  Programa de Maestría o Doctorado

DE BIOLOGÍA  
informo que he elaborado el/la  Tesis o  Trabajo de Investigación denominada:

"GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO IN VITRO DE ALFALFA  
(Medicago sativa L.) INOCULADAS CON BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS"

para la obtención de  Grado,  Título Profesional o  Segunda Especialidad.

Por medio del presente documento, afirmo y garantizo ser el legítimo, único y exclusivo titular de todos los derechos de propiedad intelectual sobre los documentos arriba mencionados, las obras, los contenidos, los productos y/o las creaciones en general (en adelante, los "Contenidos") que serán incluidos en el repositorio institucional de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno.

También, doy seguridad de que los contenidos entregados se encuentran libres de toda contraseña, restricción o medida tecnológica de protección, con la finalidad de permitir que se puedan leer, descargar, reproducir, distribuir, imprimir, buscar y enlazar los textos completos, sin limitación alguna.

Autorizo a la Universidad Nacional del Altiplano de Puno a publicar los Contenidos en el Repositorio Institucional y, en consecuencia, en el Repositorio Nacional Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de Acceso Abierto, sobre la base de lo establecido en la Ley N° 30035, sus normas reglamentarias, modificatorias, sustitutorias y conexas, y de acuerdo con las políticas de acceso abierto que la Universidad aplique en relación con sus Repositorios Institucionales. Autorizo expresamente toda consulta y uso de los Contenidos, por parte de cualquier persona, por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales de autor y derechos conexos, a título gratuito y a nivel mundial.

En consecuencia, la Universidad tendrá la posibilidad de divulgar y difundir los Contenidos, de manera total o parcial, sin limitación alguna y sin derecho a pago de contraprestación, remuneración ni regalía alguna a favor mío; en los medios, canales y plataformas que la Universidad y/o el Estado de la República del Perú determinen, a nivel mundial, sin restricción geográfica alguna y de manera indefinida, pudiendo crear y/o extraer los metadatos sobre los Contenidos, e incluir los Contenidos en los índices y buscadores que estimen necesarios para promover su difusión.

Autorizo que los Contenidos sean puestos a disposición del público a través de la siguiente licencia:

Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. Para ver una copia de esta licencia, visita: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

En señal de conformidad, suscribo el presente documento.

Puno 15 de ABRIL del 20 24

  
FIRMA (obligatoria)



Huella



### DECLARACIÓN JURADA DE AUTENTICIDAD DE TESIS

Por el presente documento, Yo JOSE ROBERTO QUISPE PACCO,  
identificado con DNI 42562711 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional,  Programa de Segunda Especialidad,  Programa de Maestría o Doctorado  
DE BIOLOGIA

informo que he elaborado el/la  Tesis o  Trabajo de Investigación denominada:  
" GERMINACION Y CRECIMIENTO IN VITRO DE ALFALFA  
(Medicago sativa L.) INOCULADAS CON BACTERIAS BIAZOTRÓFICAS "

Es un tema original.

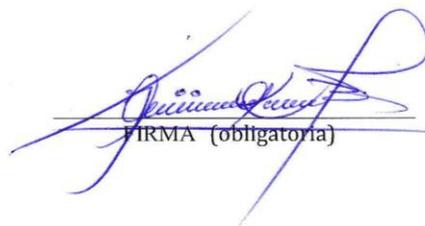
Declaro que el presente trabajo de tesis es elaborado por mi persona y **no existe plagio/copia** de ninguna naturaleza, en especial de otro documento de investigación (tesis, revista, texto, congreso, o similar) presentado por persona natural o jurídica alguna ante instituciones académicas, profesionales, de investigación o similares, en el país o en el extranjero.

Dejo constancia que las citas de otros autores han sido debidamente identificadas en el trabajo de investigación, por lo que no asumiré como tuyas las opiniones vertidas por terceros, ya sea de fuentes encontradas en medios escritos, digitales o Internet.

Asimismo, ratifico que soy plenamente consciente de todo el contenido de la tesis y asumo la responsabilidad de cualquier error u omisión en el documento, así como de las connotaciones éticas y legales involucradas.

En caso de incumplimiento de esta declaración, me someto a las disposiciones legales vigentes y a las sanciones correspondientes de igual forma me someto a las sanciones establecidas en las Directivas y otras normas internas, así como las que me alcancen del Código Civil y Normas Legales conexas por el incumplimiento del presente compromiso

Puno 15 de ABRIL del 20 24

  
FIRMA (obligatoria)



Huella