



DETERMINACIÓN DE LA INFLUENCIA DE AZOTOBACTER NATIVOS EN CULTIVOS DE RAPHANUS SATIVUS COMO BIOFERTILIZANTE

DETERMINATION OF THE INFLUENCE OF NATIVE AZOTOBACTER ON RAPHANUS SATIVUS CROPS AS A BIOFERTILISER


JEANFRANCO ALFREDO IBARRA KOCFÚ¹

 <https://orcid.org/0000-0003-2122-2609>

WILFREDO REYNALDO LLICA FLORES²

 <https://orcid.org/0000-0002-1584-6645>

RICHARD SABINO LAZO RAMOS³

 <https://orcid.org/0000-0002-7878-7486>

Información del artículo:

Recibido: 21/01/2021

Aceptado: 01/06/2021

Publicado: 28/06/2021

^{1,2} Escuela de Ingeniería Ambiental, Universidad Privada de Tacna

³ Docente en la Escuela de Ingeniería Ambiental, Universidad Privada de Tacna

E-mail: ¹jeanfrancotoons1@gmail.com, ²wilfredollicaflo@gmail.com, ³ozalsomar@gmail.com

Resumen

Se estudió la influencia del *Azotobacter* nativos en cultivos de *Raphanus sativus*, en dos fases: fase de laboratorio y fase de campo, en las cuales se realizaron los siguientes procesos: Muestreo de Suelo, Selección de Medios de Cultivo, Aislamiento, sembrado y purificación de las cepas de *Azotobacter* nativos, y Pruebas fisicoquímicas para la identificación, caracterización y aplicación de las cepas de *Azotobacter* idónea. El 100% de cepas no produjo AIA, el 100% no solubilizó fosfato tricálcico, el 45% aumentó significativamente la germinación de las semillas de rábano con respecto al control y a su vez, registró un crecimiento límite de 6×10^8 UFC.ml⁻¹ en la prueba de crecimiento en MMSN, para su posterior uso como biofertilizante en cultivos de *Raphanus sativus* en comparación con los tratamientos con 3 repeticiones de cada uno (Tratamiento 1: Control, Tratamiento 2: Tierra esterilizada, Tratamiento 3: Bioinoculante de 106 UFC/ml, Tratamiento 4: Bioinoculante de 107 UFC/ml, Tratamiento 5: Bioinoculante de 108 UFC/ml, Tratamiento 6: Úrea). Evaluando indicadores referentes al Tiempo de germinación, Longitud de la planta, Longitud de la raíz y Peso fresco. Finalmente, se seleccionaron 8 cepas idóneas, donde la cepa M19 presentó un mayor porcentaje de ponderación (59.73%), la cepa M12 (58.81). la eficiencia significativa estuvo en los tratamientos 1, 5 y 6 tales como: reducción en el tiempo de germinación de 7 a 3 días, aumento en la longitud de la planta de 4.9cm a 13.7cm y aumento en el peso fresco de 18.9gr a 48.9gr; determinándose la eficiencia significativa y positiva en la aplicación de *Azotobacter*.

Palabras Claves: *Azotobacter*, *Raphanus Sativus*, Biofertilizante, Agroquímico, Control, Tiempo de Germinación, Longitud de la planta, Longitud de la raíz, Peso fresco.

Abstract

The influence of native *Azotobacter* on *Raphanus sativus* crops was studied in two phases: laboratory phase and field phase, in which the following processes were carried out: soil sampling, selection of culture media, isolation, seeding and purification of the native *Azotobacter* strains, and physicochemical tests for the identification, characterisation and application of the suitable *Azotobacter* strains. 100% of strains did not produce AIA, 100% did not solubilise tricalcium phosphate, 45% significantly increased the germination of radish seeds compared to the control and recorded a growth limit of 6×10^8 CFU. ml⁻¹ in the MMSN growth test, for subsequent use as a biofertiliser in *Raphanus sativus* crops compared to the treatments with 3 replicates of each (Treatment 1: Control, Treatment 2: Sterilised soil, Treatment 3: Bioinoculant of 106 CFU/ml, Treatment 4: Bioinoculant of 107 CFU/ml, Treatment 5: Bioinoculant of 108 CFU/ml, Treatment 6: Úrea). Indicators concerning germination time, plant length, root length and fresh weight were evaluated. Finally, 8 suitable strains were selected, where strain M19 presented a higher percentage of weighting (59.73%), strain M12 (58.81). The significant efficiency was in treatments 1, 5 and 6 such as: reduction in germination time from 7 to 3 days, increase in plant length from 4.9cm to 13.7cm and increase in fresh weight from 18.9gr to 48.9gr; determining the significant and positive efficiency in the application of *Azotobacter*.

Key Words: *Azotobacter*, *Raphanus Sativus*, Biofertilizer, Agrochemical, Control, Germination time, Plant length, Root length, Fresh weight.

1. Introducción

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

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

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

La degradación de tierras es un proceso en el cual logra un deterioro progresivo a afectan en diferentes medidas la calidad del suelo. Los sistemas agrícolas y la aplicación de los agroquímicos han conducido a un deterioro continuo del factor suelo principalmente visto desde lo físico-químico, reduciendo significativamente la productividad del suelo agrícola, entre otros problemas ambientales. Estos diversos procesos de degradación del suelo son bastante habituales en las regiones áridas del mundo, como es el caso de Tacna, Perú (Quiñonez & DalPozzo, 2008). En consecuencia, la implementación de sistemas agrícolas que contemplan el uso de agroquímicos en estos tipos de zonas, ocasionan una degradación química terrestre por el exceso acumulativo de sales solubles, y por ende la degradación fisiológica y estructural de suelos, ocasionando una deficiencia nutricional y a su vez también disminuyen la capacidad productiva de estos suelos según estudio de (Muñoz, Ferreira, Escalante, & López, 2013). Todo ello trae como consecuencia el incremento de las posibilidades de suelos afectados por sales, erosión hídrica (por acción del agua) y eólica (por acción del aire), trayendo como resultando la infertilidad de suelos, disminución de hidrología disponible para los diferentes cultivos, lo que puede generar una pérdida de la biodiversidad de los ecosistemas; esto conduce a la falta de productividad de los recursos naturales que existen en las zonas de trabajo según: (Rodríguez, Florentino, Torres, Yendis, & Zamora, 2009).

En la región de Tacna, hay un bajo porcentaje de aplicación en cuanto a biofertilizantes en cultivos, esto conlleva a la contaminación de suelos por agroquímicos y la acumulación de sales que a largo plazo altera la calidad del suelo haciéndolo infértil. De ahí la pregunta ¿Es factible determinar la influencia de *azotobacter* nativos en cultivos de *Raphanus sativus* como biofertilizante en el distrito de Pachía? En ese afán este estudio busca una alternativa útil con ayuda de la biotecnología, aislar la bacteria *azotobacter* que actúa como un compuesto sensible al oxígeno, estimulando el crecimiento del área radicular contribuyendo con la solubilidad fosfática y de calcio, volviéndose favorable para la producción de un biofertilizante.

Según el estudio de Franco & Dobereiner (1994), el nitrógeno es el elemento perjudicial para el crecimiento de las plantas en el suelo, el incremento anual de uso de agroquímicos, con el fin de elevar

la producción agraria conlleva a la variación en los niveles de nitrógeno que es un elemento vital para los reinos vegetal y animal; existen reportes científicos de diversos compuestos químicos a base de nitrógeno a nivel mundial para el uso exclusivo como fertilizante una amplia variedad de cultivos de relevancia agronómica, entre ellas cereales, tubérculos, legumbres y flores; dejando un impacto negativo en los recursos naturales (agua y el suelo), tal como el exceso de nitratos en aguas subterráneas ocasiona una toxicidad en las plantas, la concentración excesiva de eventualmente conllevará a la extinción de biota del suelo, dejando como consecuencia la desintegración de biogeoquímicos que dejaran un desarrollo insostenible y con ello un alto costo económico, social y ambiental según (Marín, Baldani, Dos Santos, & Baldani, 2003). En el estudio (Borda-Molina, Pardo-García, Martínez-Salgado, & Montaña-Lara, 2009), planteó la metodología para el aislamiento de *Azotobacter* con la técnica de gránulos de suelo la cual promedió un 30% de recuperación de bacterias sensibles al oxígeno. En agar Ashby presenta una formación de halos incoloros rodeando algunos gránulos producto de la solubilización del carbonato de calcio, determinaron la cepa de *Azotobacter* adecuada, que fue empleada como biofertilizante. (Aquilanti, Favilli, & Clemeti, 2004).

Basados en la investigación de (Carreño, Escobar, Horna, & Mendoza, 2011), se realizó la tipificación del *Azotobacter* spp., a su vez la ponderación del ácido indolacético resultante, nitrógeno fijado y la solubilidad de roca fosfórica de Bayóvar alcanzada por las cepas nativas, a través de la estimulación del crecimiento se determinan cuatro cepas nativas capaces de producir ácido indolacético, sensibles al oxígeno y con gran solubilidad de fosfato lo cual es un gran aporte evolutivo a los cultivos de invernadero. Según estudios reportados por (Jiménez, 2007); (Borda-Molina, Pardo-García, Martínez-Salgado, & Montaña-Lara, 2009). El 93.33% de las muestras de raíces y suelo adherido de hortalizas resultó positivo para el enriquecimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno, porcentaje superior a 42.5% y 30.0%; Por su parte el resultado favorable de 81.67% de separación de *Azotobacter* spp. (Lozada & Rivas, 2010).

En la investigación de (Clavijo, Chipana, Centeno, Zúñiga, & Guillén, 2012), se tipifican 104 cepas bacterianas diazotróficas nativas de la rizósfera de cultivo de olivo fueron seleccionadas 20 cepas, donde la cepa 11A presentó el porcentaje más alto en el ponderado (69.02%) respecto a las cuatro variables analizadas. 11A (AIA 46.47 µg/ml), cepa 14A (5.84 cm² de área de solubilización de fosfato tricálcico) y cepa 3A (45.83% de porcentaje de germinación).

Clasificación Taxonómica del Rábano

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

Figura 1
Ciclo de crecimiento del Rábano y clasificación taxonómica



Dominio: Plantae
Phylum: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Brassicales
Familia: Brassicaceae
Género: Raphanus
Especies: Raphanus sativus
 Linneo, (1753)

Rábano (*Raphanus Sativus*): Es una raíz carnosa y comestible de la familia Brassicaceae. El rábano tiene una raíz picante y dura al igual que el rabanito. Su ciclo vegetativo de crecimiento oscila entre 3 y 5 semanas después del sembrado. Su raíz presenta un escaso desarrollo de la raíz (zona radicular), las raíces pueden alcanzar profundidades entre los 5 hasta 25 cm. Durante el desarrollo vegetativo, las raíces tuberosas se forman a partir de la parte superior de la raíz y del hipocótilo. Destacan por sus formas diversas (redondas, fusiformes, alargadas, ovaladas, cónicas) y variación de colores como amarillo, negro, rojo, etc. Presenta cuatro subespecies: *Raphanus sativus* var. *Longipinnatus*, *R. sativus* var. *Mougri*, *R. sativus* var. *Niger* y *R. sativus* var. *Sativus*; y tres variedades: Rábano chino, japonés o daikon, Rábano negro o de invierno y Rabanitos.

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

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

2. Objetivo

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

3. Metodología

Investigación experimental por la manipulación de la variable independiente en función a la dependiente, describiendo, analizando y comparando los resultados de la presente investigación para la determinación de la influencia de *Azotobacter* Nativos en cultivos de rábano; apoyados en el trabajo de campo y laboratorio, debido a que dicha investigación tiene que ser descrita y analizada en laboratorio y aplicada en campo para determinar la influencia del *Azotobacter* en su aplicación en cultivos de *Raphanus Sativus*. La presente investigación se realizó en el Distrito de Pachía – Región de Tacna, y en área de estudio fue extraída de propiedad privada 19K Este 376665.15 m. Norte 8019828.27m. Altura: 1034 m.s.n.m. Latitud:-17.898848 y Longitud:-70.16431874474392

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

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

Se seleccionaron y se prepararon los siguientes medios de cultivo más óptimos para el aislamiento del género *Azotobacter*, Andrade M. José. (2009). a) Medio para *azotobacter* (g/100ml); b) Agar Ashby 1 (g/100ml); c) Agar Ashby 2 (g/100ml). Estos medios de cultivo selectivo son óptimos para el género *Azotobacter* debido a que estos medios carecen de nitrógeno. Su beneficio es el crecimiento lento por ser un medio selectivo, es observable que entre los 3 - 5 días de realizar el implique un mayor gasto de energético menciona producción. Se aisló los *Azotobacter* spp. obtenidos del muestreo para el aislamiento en los diferentes medios de cultivo, se aplicó el método de sembrado por agotamiento, de tal manera que al paso de las semanas las cepas se purificó en los medios de cultivo. Se realizó la tinción gram para visualidad la morfología del género *Azotobacter*, para esta actividad se utilizó el microscopio. Se realizó el conteo en la cámara de Neubauer, cuadrante por cuadrante para determinar la Unidades Formadores de Colonias en cada cepa seleccionada para cada medio de cultivo trabajado.

Pruebas fisicoquímicas – Caracterización del *Azotobacter*

- *Cuantificación de la producción de AIA*: Se aplicó la metodología de Naik y Sakthivel (2006), empleando el reactivo de Salkowski.

- *Prueba de solubilización de fosfato tricálcico*: Se aplicó la metodología de Nautiyal (1999).

- *Efecto bacteriano en la germinación de semillas de *Raphanus sativus**: Se utilizó la metodología de Zúñiga (2012) y rRealizar una evaluación del efecto de la cepa de *Azotobacter* en la germinación mediante la prueba de Dunnett, mediante el software Statgrtaphics Centurion XV con un nivel de significancia del 0.05%.

- *Crecimiento en el MMSN método turbidimétrico de Mc Farland (1907)*: Se reactivaron las cepas de *Azotobacter* a partir de cultivos puros en tubos con 10 ml de MMSN por triplicado, se incubó por 72 horas a 28°C. Luego de la incubación se realiza la comparación de la turbidez presentada en cada tubo con los tubos de la escala turbidimétrica de Mc Farland.

- *Producción en masa por medio de un biorreactor*: Se tomó la muestra puro de *azotobacter*, la cual con el asa de Drigalskyde extraer la mayor cantidad de *azotobacter* y se coloca en una placa Petri con 200ml de Solución Salina a un 0.85% de concentración. Después se realizó el conteo por cuadrante en la cámara de Neubauer para ~~de~~ la cantidad de células de *azotobacter* hasta llegar a un 108 UFC/ml. Luego dicha placa se pasa a un matraz el cual con dos ductos de aireación de material INOX ayudado con un motor de pecera para la aireación continua. Finalmente, se incubó en una incubadora casera a 28°C para su producción en biomasa.

- *Aplicación en cultivos de *Raphanus sativus**: Se elabora biopreparados a diferentes concentraciones de bacteria de *Azotobacter* (10^6 UFC/ml, 10^7 UFC/ml y 10^8 UFC/ml) en un medio de cultivo combinado con 500g de tierra esterilizada para cada cultivo de rábano (*Raphanus sativus*). Se utilizó un diseño estadístico inferencial con unavariante respuesta y un factor a 3 niveles: T1, control; T2, semillas con tierra esterilizada; T3, semillas con bioinoculante de 10^6 UFC/ml; T4, semillas con bioinoculante de 10^7 UFC/ml; T5, semillas con bioinoculante de 10^8 UFC/ml; T6, semillas con úrea.

Se evaluaron los siguientes indicadores:

- *Tiempo de germinación, Longitud de la planta, Longitud de la raíz y Pesofresco de toda la planta.*

Para la investigación se seleccionó la cepa de *Azotobacter* mediante la sumatoria de promedios ponderados de las pruebas a realizar. Se establece la ponderación de acuerdo al grado de importancia y se halla el promedio máximo para cada prueba. Luego, seleccionará 8 cepas para obtener las mayores sumatorias de promedios ponderados. (Clavijo, Claudia, 2012). A su vez, en el presente trabajo, se utiliza el análisis de varianza (ANOVA) para comprobar la existencia o no de diferencias significativas entre conjuntos de datos, según Montgomery y Runger (1994). Finalmente, se determina la influencia de *Azotobacter* en cultivos de *Raphanus sativus*, mediante los paquetes estadísticos Minitab y Statgrtaphics Centurion XV; empleando un diseño de experimentos con unavariante y un factor a 3 niveles en el mismo software; se consideró $P < 0,05$ como diferencias significativas, respectivamente. También se aplicará la prueba de Tukey, Dunnett, Método MCB de Hsu y Gamer-Howell confirmándose la significancia.

4 Resultados

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

Tabla 1
Aislamiento de Azotobacter – Semana 01

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

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

Luego de tener las 8 cepas seleccionadas se analizaron las características fisiológicas a través de la tinción gram, visualizando dichas características microscópicas en un microscopio a 100X. Comparando las características macroscópicas con las características microscópicas.

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

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

Pruebas fisicoquímicas – Caracterización del Azotobacter

Cuantificación de la producción de AIA: De las 8 cepas aisladas el 100% no produjo (ácido indolacético) AIA, dando como resultado que las cepas de Azotobacter no produjeron esta hormona. Solubilización de fosfato tricálcico: De las 8 cepas un 100% no solubilizó fosfato tricálcico, no presentaron halos alrededor de las cepas seleccionadas.

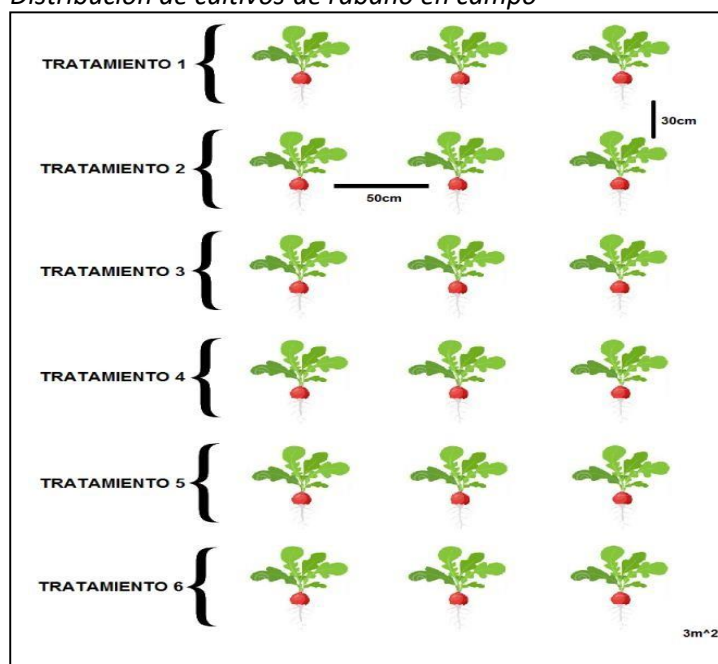
Efecto bacteriano en la germinación de semillas de raphanus sativus: Respecto a las 80 semillas inoculadas con las 8 cepas aisladas, de acuerdo a la prueba de Dunnett se observó que 36 (45%) presentaron un incremento significativo en función a la germinación, incrementando hasta en un 125% (cepa A1-M19-PA5) con respecto al control; seguidamente de la cepa A1-M12-PA5 con 116%. También un total de 44 cepas de bacterias (55 %) no se registró ningún efecto significativo con respecto al control. Crecimiento en el MMSN método turbidimétrico de Mc Farland (1907): Basado a las 8 cepas sometidas al MMSN, en 72 horas a 28 °C, se realizó la comparación de la turbidez de cada tubo en la escala turbidimétrica de Mc Farland, presentando que 75 % de las cepas obtuvieron un valor de 3 en la escala turbidimétrica de Mc Farland y un 25 %, el valor de 2 en la escala turbidimétrica de Mc Farland.

Pruebas De Campo

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

Se aplicó una distribución de 50 cm por 30 cm de distancia entre cada cultivo de rábano en un área de 3 m² por cepa para cada tratamiento por triplicado (Figura 1), aplicando el bioinoculante y la úrea solamente una vez como fertilizante. Tener en cuenta que se mantuvo el control (agua) en todos los tratamientos, dos veces por semana por 8 semanas.

Figura 1
Distribución de cultivos de rábano en campo



Nota: Se tuvieron en cuenta 4 indicadores: Tiempo de Germinación (TG), Longitud de la Planta (LP), Longitud de la Raíz (LR) y Peso en Fresco (PF)

Para la cepa M12 con los factores:

Tabla 2

Resultados de los Tratamientos en cultivos de Rábano de la cepa: A1-M12-PA6 según Tiempo de Germinación, peso fresco, longitud de planta y raíz.

Tratamientos	Tiempo de germinación		
Control	6	6	6
Bioinoculante de 10 ⁸	5	4	4
Úrea	4	4	5
Tratamientos	Longitud de la planta		
Control	7,1	6,3	5,6
Bioinoculante de 10 ⁸	9,2	10,3	8,7
Úrea	11,5	13	10,4
Tratamientos	Longitud de la raíz		
Control	14,6	14,3	13,8
Bioinoculante de 10 ⁸	11,9	13,4	12,4
Úrea	9,9	14,5	10,9
Tratamientos	Peso Fresco		
Control	25,7	24,1	21,9
Bioinoculante de 10 ⁸	29,4	35,3	30,7
Úrea	36,7	46,2	37,7

Para la cepa M19 con los factores:

Tabla 3.

Resultados de los Tratamientos en cultivos de Rábano de la cepa: A1-M19- PA6 según Tiempo de Germinación, peso fresco, longitud de planta y raíz,

Tratamientos	Tiempos de germinación		
Control	7	6	6
Bioinoculante de 10 ⁸	5	4	4
Úrea	3	3	4
Tratamientos	Longitud de planta		
Control	4,9	7,1	6
Bioinoculante de 10 ⁸	9,6	11,4	9,9
Úrea	12,2	11,1	13,7
Tratamientos	Longitud e raíz		
Control	12,3	15,8	12,9
Bioinoculante de 10 ⁸	12,8	15,1	13,5
Úrea	13,2	12,8	15,4
Tratamientos	Peso fresco		
Control	18,9	25,1	22,3
Bioinoculante de 10 ⁸	32,7	41,8	36,6
Úrea	42,8	40,1	48,9

Fuente: Elaboración Propia

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

Para La Cepa M12:

Tabla 4

Análisis de varianza para el tiempo de germinación Tiempo de Germinación, peso fresco, longitud de planta y raíz. –Cepa M12.

Tiempo de germinación	<i>GL</i>	<i>SC Ajust.</i>	<i>MC Ajust.</i>	<i>Valor F</i>	<i>Valor p</i>
Tratamiento	2	5,556	2,7778	12,50	0,007
Error	6	1,333	0,2222		
Total	8	6,889			
Longitud de la planta	<i>GL</i>	<i>SC Ajust.</i>	<i>MC Ajust.</i>	<i>Valor F</i>	<i>Valor p</i>
Tratamiento	2	42,482	21,2411	21,70	0,002
Error	6	5,873	0,9789		
Total	8	48,356			
Longitud de raíz	<i>GL</i>	<i>SC Ajust.</i>	<i>MC Ajust.</i>	<i>Valor F</i>	<i>Valor p</i>
Tratamiento	2	9,502	4,751	2,16	0,197
Error	6	13,200	2,200		
Total	8	22,702			
Peso fresco	<i>GL</i>	<i>SC Ajust.</i>	<i>MC Ajust.</i>	<i>Valor F</i>	<i>Valor p</i>
Tratamiento	2	398,66	199,33	14,77	0,005
Error	6	81,00	13,50		
Total	8	479,66			

Con un nivel de significancia de 0.05, se concluye que el tiempo de germinación promedio de la planta mediante los tres tratamientos diferentes (p_valor=0,007), se observa que el tiempo de germinación promedio de la planta al aplicar el tratamiento control es diferente que cuando se aplica úrea o bioinoculante 10⁸.

Que la longitud promedio de la planta mediante los tres tratamientos es diferente (p_valor=0.002), se observa que la longitud promedio de la planta es diferente cuando se aplica úrea o bioinoculante 10⁸ y cuando se aplica el tratamiento control.

Que la longitud promedio de la raíz de la planta mediante los tres tratamientos es igual (p_valor=0,197).

Y que el peso fresco de la planta mediante los tres tratamientos es diferente (p_valor=0.005).

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

Para la Cepa M19:

Tabla 5

Análisis de varianza para el tiempo de germinación Tiempo de Germinación, peso fresco, longitud de planta y raíz. –Cepa M19.

Tiempo de germinación	<i>GL</i>	<i>SC Ajust.</i>	<i>MC Ajust.</i>	<i>Valor F</i>	<i>Valor p</i>
Tratamiento	2	14,000	7,0000	21,00	0,002
Error	6	2,000	0,3333		
Total	8	16,000			
Longitud de la planta	<i>GL</i>	<i>SC Ajust.</i>	<i>MC Ajust.</i>	<i>Valor F</i>	<i>Valor p</i>
Tratamiento	2	62,736	31,368	24,48	0,001
Error	6	7,687	1,281		
Total	8	70,422			
Longitud de raíz	<i>GL</i>	<i>SC Ajust.</i>	<i>MC Ajust.</i>	<i>Valor F</i>	<i>Valor p</i>
Tratamiento	2	0,0356	0,01778	0,01	0,992
Error	6	13,7067	2,28444		
Total	8	13,7422			
Peso fresco	<i>GL</i>	<i>SC Ajust.</i>	<i>MC Ajust.</i>	<i>Valor F</i>	<i>Valor p</i>
Tratamiento	2	747,3	373,65	22,06	0,002
Error	6	101,6	16,94		
Total	8	848,9			

Con un nivel de significancia de 0,05, se concluye que el tipo de germinación de la planta mediante los tres tratamientos es diferente ($p_{\text{valor}}=0,002$), el tiempo de germinación promedio de la planta al aplicar el tratamiento control es diferente que cuando se aplica úrea o bioinoculante 10^8 , al aplicar úrea o bioinoculante 10^8 se tiene un menor tiempo de germinación.

Se concluye que la longitud promedio de la planta mediante los tres tratamientos es diferente ($p_{\text{valor}}=0,001$), la longitud promedio de la planta es diferente cuando se aplica úrea o bioinoculante 10^8 y cuando se aplica el tratamiento control; y que la longitud promedio de la planta es mayor cuando se aplica úrea en comparación a la aplicación de bioinoculante o tratamiento control.

Con un nivel de significancia de 0,05, se concluye que la longitud promedio de la raíz de la planta mediante los tres tratamientos es igual ($p_{\text{valor}}=0,992$), la longitud de la raíz promedio de la planta es igual cuando se le aplica úrea en comparación con el tratamiento de bioinoculante o tratamiento control.

Con un nivel de significancia de 0,05, se concluye que el peso fresco de la planta mediante los tres tratamientos es diferente ($p_{\text{valor}}=0,002$), el peso fresco promedio de la planta al aplicarle úrea es diferente a comparación de la aplicación del tratamiento control y del bioinoculante 10^8 .

6. Discusión

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

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

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

La ponderación aplicada a las cuatro variables, se reporta que la cepa A1-M19-PA5 obtuvo la mayor sumatoria de ponderados 59,73 %, destacando que no produce la fitohormona de AIA, no solubiliza el fosfato tricálcico, la germinación de semillas y el crecimiento en el MMSN estuvo en la escala 3 de McFarland.

Para la parte experimental de la presente investigación se aplicaron 6 tratamientos en cultivos de *Raphanus sativus*, los cuales fueron: Tratamiento 1: Control (Riego con agua), Tratamiento 2: Tierra Esterilizada, Tratamiento 3: Bioinoculante 10^6 , Tratamiento 4: Bioinoculante 10^7 , Tratamiento 5: Bioinoculante 10^8 y Tratamiento 6: Úrea, evaluados los resultados comparativos entre los Tratamientos 1: Control (Riego con agua), 5: Bioinoculante 10^8 y 6: Úrea, que tuvieron resultados significativamente eficientes el Tiempo de Germinación que disminuyó de 7 días

(Tratamiento 1) a 5 días (Tratamiento 5) a 3 días (Tratamiento 6), Longitud de la Planta que aumentó de 4.9cm (Tratamiento 1) a 11.4cm (Tratamiento 5) a 13.7cm (Tratamiento 6) y Peso en Fresco que aumentó de 18.9cm(Tratamiento 1) a 41,8cm (Tratamiento 5) a 48,9cm (Tratamiento 6), siendo la Longitud Promedio de la Raíz igual en todos los tratamientos: 15,8cm (Tratamiento 1), 15.1cm (Tratamiento 5) y 15.4cm (Tratamiento 6). Determinándose así, la influencia significativa y positiva en cultivos de *Raphanus sativus* fertilizados por *Azotobacter* nativos del distrito de Pachía y a su vez, siendo comparado con la aplicación del agroquímico úrea y el tratamiento control (agua).

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

7. Conclusiones

Se logró determinar que los *Azotobacter* nativos influyen significativamente y positivamente a los cultivos de *Raphanus sativus* observados en los indicadores: Tiempo de Germinación, Longitud de la Planta y Peso Fresco del cultivo, teniendo mayores resultados en la aplicación de úrea y a su vez presentando similitudes en el crecimiento de la raíz de la planta.

Las cepas seleccionadas de *Azotobacter* presentan características comunes tales como: forma (bacilar, ovoide, alargada, etc), color (marrón, crema, blanco humo, verde fosforescente, etc) y presentan formaciones de quistes típicos del género, a su vez, analizando 8 cepas de *Azotobacter* resultantes según sus características macroscópicas y microscópicas comunes, se lograron identificar como: *Azotobacter* spp, *Azotobacter vinelandii* y *Azotobacter nigricans* que guardan relación con el género *Azotobacter*; en cuanto a las pruebas fisicoquímicas aplicadas, se concluyó que la bacteria es no produce la fitohormona AIA (ácido indolacético) y de igual manera, no solubiliza el fosfato tricálcico, en un 100 %.

Se encontró que la cepa A1-M19-PA6, presentaron un incremento significativo en el porcentaje de germinación con respecto al control en 48 horas de incubación, llegando hasta un 125% de incremento de la germinación, esto indica un potencial como inoculantes microbianos para el cultivos de rábano.

Finalmente, se concluye que las cepas seleccionadas de *Azotobacter*, para su aplicación en campo fueron la cepa A1-M12-PA6 y la cepa A1-M19-PA6, las cuales tuvieron resultados en base a los indicadores: tiempo de germinación, longitud de la planta y peso en fresco, son más eficientes que el tratamiento control, siendo la longitud promedio de la raíz, igual entre los tratamientos 1, 5 y 6; validando que en la presente investigación se puede observar la eficiencia significativa entre los tratamientos 1, 5 y 6 tales como: reducción en el tiempo de germinación de 7 a 3 días, aumento en la longitud de la planta de 4,9cm a 13,7cm y aumento en el peso fresco de 18,9 g a 48,9g; concluyendo que la longitud promedio de la raíz de la planta mediante los tres tratamientos es igual, oscilando entre los 12,3cm y 15,8cm, según al diseño de experimentos unifactorial aplicando.

Se recomienda realizar un análisis genético utilizando el kit de extracción de ADN y posteriormente la identificación molecular para determinar con similitud >99% el género y la especie de la bacteria trabajada en la presente investigación. Utilizar otros medios alternativos para la producción en biomasa de *Azotobacter* para una posterior investigación es recomendable para economizar costos.

Realizan pruebas de germinación en diferentes cultivos como recomendación para comparar la eficiencia del género *Azotobacter* según el tipo de planta. Es recomendable evitar esterilizar la tierra

para aplicaciones posteriores, debido a que la esterilización ocasiona la pérdida de propiedades y nutrientes del suelo. Finalmente, es recomendable promover la producción de Azotobacter en el sector agroindustrial, incentivando el desarrollo sostenible y natural de los diversos cultivos.

8. Referencias Bibliográficas

- Aquilanti, L., Favilli, F., & Clemeti, F. (2004). Amplified ribosomal DNA restriction analysis for the characterization of Azotobacteraceae: a contribution to the study of these free-living nitrogen-fixing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 197-206.
- Borda-Molina, D., Pardo-García, J., Martínez-Salgado, M., & Montaña-Lara, J. (2009). Producción de un biofertilizante a partir de un aislamiento de Azotobacter nigricans obtenido en un cultivo de Stevia rebaudiana Bert. *Universitas Scientiarum*, 71-78. Obtenido de <https://doi.org/10.11144/javeriana.SC14-1.pdub>
- Carreño, C., Escobar, C., Horna, Y., & Mendoza, G. (2011). Caracterización de cepas nativas de Azotobacter spp. y su efecto en el desarrollo de Lycopersicon esculentum Mill. "tomate" en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria* 2, 39 — 49.
- Clavijo, C., Chipana, V., Centeno, J., Zúñiga, D., & Guillén, C. (2012). Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias diazotróficas de la rizósfera del cultivo de Olea europea "olivo" en Tacna-Perú. *Ecología Aplicada*, 89-102. Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v11n2/a06v11n2.pdf>
- Crossman, S., & Hill, W. (1987). Inoculation of sweet potato with Azospirillum. *Hort. Sci.*, 420-422.
- Dobereiner, J., & Day, J. (1975). Nitrogen fixation in rhizosphere of grasses. En E. W. Russell, *Nitrogen Fixation by Free-Living Microorganisms* (págs. 39–56). Cambridge: Editions Stewart, W.
- Franco, A., & Dobereiner, J. (1994). Biología de los solos y la sustentabilidad de los suelos tropicales. *Summa Phytopathologica*, 68-74.
- Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, P. (2003). *Metodología de la Investigación -Tercera Edición*. México: Mc Graw Hill Interamericana Editores S.A.
- Jiménez, D. (2007). *Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de Azotobacter spp. mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal 16S*. Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.
- Lozada, L., & Rivas, C. (2010). *Evaluación del efecto de la inoculación de Azotobacter spp. en plantas de ají dulce (Capsicum frutescens)*. Trujillo: Universidad de los Andes.
- Lung-tung. (1997). *Analecta Algológica: Observación de la especie Gelidium almansii*. Taipei, Taiwan: AlgaeBase.
- Marin, V., Baldani, V., Dos Santos, R., & Baldani, I. (2003). Fijación biológica de nitrógeno; Bacterias fijadoras de nitrógeno de importancia para la agricultura tropical. *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria*, 1-44.
- Muñoz, D., Ferreira, M., Escalante, I., & López, J. (2013). Relación entre la cobertura del terreno y la degradación física y biológica de un suelo aluvial en una región semiárida. *Terra*, 201-210.
- Quiñonez, E., & Dal Pozzo, F. (2008). Degradación Química de Suelos Agrícolas en la Península de Paraguaná. *Suelos Ecuatoriales*, 22-28.
- Rodríguez, N., Florentino, A., Torres, D., Yendis, H., & Zamora, F. (2009). Selección de indicadores de calidad de suelo en tres tipos de uso de la tierra en la planicie de Coro estado Falcón. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 340-361.