

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

FACUTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICA

E. A. P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**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

para optar al título profesional de Biólogo con Mención en Biología Celular  
y Genética

AUTOR

Marvic Angélica Rico Gallegos

ASESORES

Jorge León Quispe

Lima-Perú

2009

Dedicada a mis  
adorados padres  
Ceferino y Rosa  
por su amor  
incondicional y a  
mi hermano Angel,  
a quien admiro  
mucho, siempre

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por iluminar siempre mi camino.

A mis padres por todo su amor, por estar ahí en todo momento de mi vida aprendiendo juntos lo maravilloso de ser una familia unida, fuerte y feliz, por sus enseñanzas valiosas y por confiar en mí, todo esto es por ustedes.

A mi hermano Angel, por sus oraciones, ocurrencias y ánimos en todo momento.

Al Mg. Jorge León Quispe, mi asesor, por todo su apoyo, conocimientos y paciencia.

Al Dr. Andreas Oswald por su apoyo al brindarme la oportunidad de realizar el presente trabajo de investigación.

A Pamela Calvo, asistente de investigación, por su invaluable apoyo durante todo el desarrollo de mi trabajo de tesis, por su paciencia y amistad tanto dentro como fuera del campo y laboratorio.

A Dennis Marquez, una persona muy especial que conozco de antes, por estar ahí siempre, con sus bromas, ocurrencias, palabras de aliento y apoyo hasta el último momento del desarrollo de mi tesis, tanto dentro como fuera del laboratorio,

A todos los nuevos amigos que hice en el CIP en este último año, en especial a Ccori y Mercy, con quienes compartí largas conversaciones, momentos de desesperación, presión, alegrías y satisfacciones, entre invernaderos, cámaras de flujo y campos de papa.

Al Centro Internacional de la Papa (CIP), por las instalaciones brindadas, el apoyo y la acogida para el desarrollo de mi tesis.

A Fredy, Elvis, Julita y Evita, por su sentido del humor y consejos, haciendo mas ligeros los días de trabajo en el laboratorio.

A todas las personas que me apoyaron de alguna manera a culminar la tesis, pues cada granito de arena cuenta.

## CONTENIDO

I. RESUMEN / ABSTRACT	1
II. INTRODUCCIÓN	5
III. ANTECEDENTES	
3.1 La papa ( <i>Solanum tuberosum</i> )	9
3.2 El suelo y sus componentes microbianos	14
3.3 La rizósfera	15
3.4 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)	16
3.5 Capacidades promotoras del crecimiento vegetal	17
3.6 Características generales del género <i>Azotobacter</i>	23
3.7 Características generales del grupo Actinomiceto	25
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1 Muestras biológicas	28
4.2 Métodos	
4.2.1 Lugar de toma de muestras y muestreo de rizósfera	29
4.2.2 Lugar de procesamiento de muestras y trabajo de laboratorio	29
4.2.3 Tratamiento de las muestras	29
4.2.4 Cuantificación de microorganismos de la rizósfera de <i>Solanum tuberosum</i>	29
4.2.5 Selección de colonias de <i>Azotobacter</i> y Actinomicetos: pruebas diferenciales	32
4.2.6 Caracterización fenotípica de las cepas aisladas	33
4.2.7 Pruebas para capacidades promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) <i>in vitro</i>	33
4.2.8 Pruebas a nivel de invernadero para promotoras del crecimiento vegetal	38
4.2.9 Experimento en invernadero	39
4.2.10 Análisis de resultados de invernadero	41
V. RESULTADOS	
5.1 Conteo de poblaciones de la rizósfera	43
5.2 Aislamientos de Actinomicetos y <i>Azotobacter</i> spp. de la	

rizósfera de papa, por localidades	43
5.3 Características morfológicas de los aislamientos de <i>Azotobacter</i> spp. y Actinomicetos.	44
5.4 Pruebas de capacidad PGPR de las cepas aisladas	
5.4.1 Prueba de antagonismo	45
5.4.2 Prueba de solubilización de fosfato	46
5.4.3 Producción de Ácido Indol Acético (AIA)	47
5.4.4 Metabolitos volátiles	48
5.4.5 Producción de sideróforos	49
5.5 Caracterización fisiológica y bioquímica de bacterias	49
5.6 Recuento poblacional durante ensayos en invernadero	53
5.7 Ensayos de invernadero	
5.7.1 Experimento 1	55
5.7.2 Experimento 2	59
VI. DISCUSIÓN	62
VII. CONCLUSIONES	74
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
IX. FIGURAS Y TABLAS	90
X. ANEXO	
Medios de cultivo	138

## ABREVIATURAS

%MSP: Porcentaje de Matéria Seca de la Planta

%MSR: Porcentaje de Matéria Seca de Raiz

%MST: Porcentaje de Matéria Seca del Tubérculo

A1: Actinomicetos

A3: *Azotobacter*

AC: Almidón Caseína

AFT: Área Folear Total

AIA: Ácido Indol Acético

AN: Agar Nutritivo

CAS: Cromoazurol S

CE: Conductividad Eléctrica

DCA: Diseño Estadístico Completamente al Azar

IC: Índice de Cosecha

M: Muestra

MMSN: Medio Mineral Sin Nitrógeno

MO: Materia Orgánica

NBRIP : National Botanical Research Institute's Phosphate

NMP: Número Más Probable

NPK: Nitrógeno, Fósforo, Potasio

NT: Número de Tubérculos

PDA: Potato Dextrose Agar

PEH: Peso Específico de las Hojas

PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria

PSP: Peso Seco de la Planta

PST: Peso Seco de Tubérculo

TSA: Trypticase Soy Agar

TSB: Trypticase Soy Broth

Ufc: Unidad formadora de colonia

## I. RESUMEN

El cultivo de papa (*Solanum tuberosum* Linnaeus, 1753), que actualmente se encuentra entre los cuatro alimentos más importantes a nivel mundial y que genera cada año aproximadamente 110,000 puestos de trabajo permanentes, ve disminuir su rendimiento debido a los altos costos de fertilizantes químicos, problemas fitosanitarios y el deterioro de los suelos. En el presente trabajo se buscó evaluar la capacidad promotora del crecimiento vegetal (PGPR) de bacterias del género *Azotobacter* y del grupo Actinomicetos aislados de la rizósfera de plantaciones de papa colectadas en los departamentos de Huancavelica, Junín, Huánuco y Cajamarca. De los 11 campos muestreados, se aislaron 62 cepas de *Azotobacter*, de las cuales, el 42,3% (25) inhibieron el crecimiento del hongo *Fusarium solani*, el 17% (10) el del hongo *Rhizoctonia solani* y el 9% (6) lograron inhibir el crecimiento de ambos hongos evaluados. En el caso de los Actinomicetos, de los 45 aislamientos el 49% (22) resultó antagonista contra *Fusarium solani*, 42% (19) contra *Rhizoctonia solani* y el 38% (17) a ambos hongos. Por otro lado, el 56,5% (36) de *Azotobacter* y el 48,8% (22) de aislamientos de Actinomicetos lograron producir ácido indol acético (AIA). El 46,7% (29) de *Azotobacter spp.* mostró la presencia de halos de solubilización de fosfato mientras que sólo el 11% (5) de Actinomicetos presentaron dicha actividad. Se realizaron también pruebas de producción de metabolitos volátiles donde la cepa A1-19/08 de Actinomicetos fue la que mostró mejores resultados, así mismo, se evaluó la capacidad de producir sideróforos, sin embargo los resultados fueron negativos para ambos tipos de bacterias. Luego de la identificación bioquímica, la mayoría de las cepas aisladas de *Azotobacter* fueron reconocidas como *A. chroococcum* y *A. vinelandii*. Por otro lado, las bacterias del grupo Actinomicetos fueron indentificadas tentativamente como especies del género *Streptomyces*.

Se realizaron dos experimentos a nivel de invernadero, en el primero se evaluaron 17 cepas de Actinomicetos y otros tantos de *Azotobacter*, estas tuvieron un efecto benéfico sobre la planta de papa en cuanto a la promoción del crecimiento de la planta como en la producción de tubérculos.

El efecto de los Actinomicetos se vio reflejado en el incremento del número de tubérculos. En el segundo experimento se determinó el efecto de factores que influyen sobre el cultivo de la papa, como el tipo de semilla utilizada o el tipo de suelo empleado, para lo cual, el uso de suelo estéril o no estéril para el desarrollo de los ensayos de invernadero no fue un factor estadísticamente significativo sobre el efecto de las cepas, mientras que la tendencia general para Actinomicetos y *Azotobacter* mostró que el uso de semillas-tubérculo favorece el efecto benéfico que éstas bacterias ejercen sobre la planta de papa y su producción.

## ABSTRACT

The culturing of potato (*Solanum tuberosum* Linnaeus, 1753), is nowadays among the four most important food worldwide and generates approximately 110,000 permanent working places and its yielding is diminished by factors as costs of fertilizers, phytosanitary issues and the soil deterioration. In this research we evaluate the Plant Growth Promoting (PGPR) of bacterial strains of genus *Azotobacter* and Actinomycetes group, isolated from potato rhizosphere (*S. tuberosum*), gathered up from the departments of Huancavelica, Junín, Huanuco and Cajamarca. Of 11 fields sampled, 62 strains of *Azotobacter* were isolated, from which, 42,3% (25) inhibited the growth of the fungus *Fusarium solani*, 17% (10) against the fungus *Rhizoctonia solani* and 9% (6) inhibited both. In the case of Actinomycetes, 45 strains were isolated, from which, 49% (22) were antagonists against *Fusarium solani*, 42% (19) against *Rhizoctonia solani* and 38% (17) inhibited both fungus. On the other hand, the 56,5% (36) of the strains of *Azotobacter* and the 48,8% (22) of Actinomycetes isolated, were able to produce indole acetic acid (IAA). Of the all *Azotobacter* isolated, 46,7% (29) showed the presence of solubilization phosphate halo, whereas only the 11% (5) of Actinomycetes evaluated, showed such activity. Tests were carried out of production of volatile metabolites in which the A1-19/08 strain of Actinomycetes showed better results; likewise, the capacity to produce siderophores was evaluated, however, the results was negative for both types of bacteria. It was carried out a biochemical identification of the isolates, after that, the majority of *Azotobacter* strains isolated were identified as *A. chroococcum* and *A. vinelandii*. On the other side, the strains of Actinomycetes group isolated were tentatively identified as species of the genus *Streptomyces*. Two experiments were performed at the level of greenhouse, in the first one 17 of the best strains of Actinomycetes and *Azotobacter* were tested; wich had a beneficial effect on the promotion of growth in both the plant and the production of tubers of *S. Tuberosum*. The effect of Actinomycetes was reflected on the increasing in the amount of tubers. In the second experiment, it was determined the effect of such factors as the type of seed used or the type of soil used in the

culture, the use of sterile soil or non-sterile for the development of the tests of greenhouse didn't have a statistically significant factor on the effect of the strains in the cultivation, while the general trend for both Actinomycetes and *Azotobacter* showed that the use of seed tuber favors the beneficial effect that these bacteria have on the potato plant (*S. tuberosum*) and its production.

## II. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la necesidad del hombre por disminuir la contaminación ambiental y mejorar su calidad de vida lo ha llevado a buscar alternativas de mitigación, como en el caso de la agricultura donde este problema se agrava debido al uso indiscriminado de agroquímicos, que si bien tienen un efecto positivo en la producción, al mismo tiempo dañan la calidad del suelo generando pérdidas económicas y sobre todo ecológicas.

Uno de estos cultivos y que es objeto de la presente investigación es el de la papa (*Solanum tuberosum* Linnaeus, 1753), que actualmente se encuentra entre los cuatro alimentos más importantes a nivel mundial después del arroz, trigo y maíz. El crecimiento positivo de la producción de papa se explica básicamente por la capacidad de adaptarse a las condiciones de clima de diferentes regiones del planeta y mejoras tecnológicas en los sistemas de producción y comercialización (Ministerio de Agricultura, 2006).

El Perú ocupa el lugar 23 entre los principales países productores de papa en el mundo. Según los resultados del III Censo Nacional Agropecuario de 1994, 33,8% de los productores agropecuarios se dedican a la producción de *Solanum tuberosum* generando cada año aproximadamente 110,000 puestos de trabajo permanentes (30 millones de jornales). La papa se produce fundamentalmente en la sierra y la costa del Perú. El 85% de ésta se encuentra en la sierra, siendo Puno, Huánuco y Junín los departamentos de mayor producción nacional (Ministerio de Agricultura, 2003).

Desafortunadamente, el cultivo de *Solanum tuberosum* (papa) se encuentra expuesto a una serie de limitaciones, como la baja calidad o el empobrecimiento del suelo, el uso indiscriminado de agroquímicos, así como la presencia de plagas y fitopatógenos los cuales tienen como consecuencia la merma en la productividad y rentabilidad del cultivo. Es por ello que es importante la investigación minuciosa de todas las alternativas que puedan

aumentar la producción y favorecer el cultivo de *Solanum tuberosum* en favor de la economía de nuestro país. Esto ha estimulado el estudio de la posibilidad de disminuir el uso de agroquímicos, complementándolo con fertilización orgánica y el uso de inoculantes microbianos.

Existen microorganismos con efecto benéfico sobre las plantas, los cuales tienen un potencial considerable como biofertilizantes y como agentes de biocontrol. Pueden distinguirse tres grandes grupos: 1) fijadores de nitrógeno; 2) hongos micorrízicos y 3) rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Kloepper *et al.*, 1989). Estas últimas son bacterias de vida libre del suelo que se localizan muy cerca de las raíces de las plantas y que tienen un efecto benéfico sobre el crecimiento de las mismas. Su acción sobre el crecimiento y desarrollo lo ejercen por diferentes mecanismos entre los que podemos citar: la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de fosfato, la producción de quelantes de hierro (sideróforos), de fitohormonas, de antibióticos, etc. (Romero *et al.*, 2003). Es por esta razón, que el estudio de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGRP) es considerado como una alternativa de mitigación a los problemas de contaminación del suelo, ya que nos permite determinar el efecto benéfico de las bacterias sobre el cultivo de *Solanum tuberosum*.

Las bacterias del género *Azotobacter*, están presentes en grandes densidades en el agroecosistema y se asocian al sistema radical de algunas especies vegetales ocasionando una aceleración del desarrollo y un aumento del rendimiento en los cultivos, debido fundamentalmente a su capacidad de sintetizar sustancias biológicamente activas como auxinas, citoquininas, giberelinas, aminoácidos y vitaminas. Esta propiedad unida a la función de fijar el nitrógeno atmosférico, ha despertado el interés de numerosos investigadores por elevar el valor de poblaciones autóctonas de cada suelo (Vancura, 1961; Brown & Walker, 1962; Dibut, 1988; Martínez *et al.*, 1997).

Por otro lado, los Actinomicetos, sobre todo del género *Streptomyces* tienen un papel importante en la ecología de suelos, por su propiedad de degradar sustratos recalcitrantes tales como la quitina y lignina así como su capacidad de producción de antibióticos y actividad antagonista contra hongos fitopatógenos como *Fusarium* y *Rhizoctonia*, sin ocasionar efectos tóxicos a las plantas (Rothrock & Gottlieb, 1981).

Las bacterias del género *Azotobacter* y del grupo Actinomiceto han sido ya consideradas como organismos PGPR por su capacidad de producir sustancias benéficas para el crecimiento de cultivos tales como trigo, maíz, tomate, etc. Es por ello, que en el presente estudio se evaluará la capacidad promotora del crecimiento vegetal de estos microorganismos aislados en nuestro medio, mediante la determinación de su capacidad de producir metabolitos o sustancias promotoras y actividad antifúngica.

### **Objetivo General**

- Evaluar la capacidad promotora del crecimiento vegetal del género *Azotobacter* y bacterias del grupo Actinomicetos, asociada a la rizósfera del cultivo de *Solanum tuberosum* Linnaeus, 1753, seleccionando aquellas que puedan mejorar el rendimiento del cultivo.

### **Objetivos Específicos**

- Determinar cuantitativamente la población de bacterias heterotróficas y hongos mesófilos asociados a la rizósfera de la *Solanum tuberosum* en los lugares muestreados.
- Aislar bacterias del género *Azotobacter* y del grupo Actinomicetos a partir de la rizósfera de *Solanum tuberosum* cultivadas en zonas altoandinas del Perú.

- Seleccionar y evaluar las bacterias aisladas de la rizósfera de *Solanum tuberosum*, que presenten mayores capacidades para ser utilizadas como PGPR, mediante bioensayos de antagonismo frente a *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani*, así como la capacidad de producir Ácido Indol Acético (AIA), solubilizar fosfato, producir sideróforos y metabolitos volátiles.
- Caracterizar fenotípicamente a las bacterias seleccionadas para lograr su identificación.
- Probar a nivel de invernadero la capacidad promotora del crecimiento vegetal de las cepas de *Azotobacter* y Actinomicetos seleccionadas previamente en el laboratorio, así como el efecto del tipo de semilla y suelo utilizado sobre las plantas inoculadas.

### III. ANTECEDENTES

#### 3.1 La papa (*Solanum tuberosum*)

La papa es una planta originaria de los Andes. Los procesos de domesticación y procesamiento artesanal de este cultivo fueron realizados por las culturas prehispánicas, constituyendo la base de su dieta alimenticia. Además, jugó un papel significativo en la tradición y costumbres de los antiguos pobladores de los Andes.

De acuerdo con el Sistema de Clasificación Filogenética de Cronquist (1988) la papa es clasificada de la siguiente manera:

División: Magnoliophyta  
Clase: Magnoliopsida  
Subclase: Asteridae  
Orden: Scrophulariales  
Familia: Solanaceae  
Genero: Solanum  
Especie: *Solanum tuberosum* Linnaeus, 1753

##### 3.1.1 La planta de papa

La papa es una planta dicotiledónea herbácea anual, presenta un sistema aéreo y un sistema subterráneo. El primero esta conformado por el tallo, hojas, flores y frutos, el segundo por raíces, estolones y tubérculos. El tallo es anguloso y grueso con una altura que varia entre 0,5 y 1 m, las hojas son imparipinadas, con nueve o mas foliolos, cuyo tamaño es tanto mayor cuanto más alejado se encuentran del nudo de inserción (Malagamba, 1997). Las flores son pentámeras y los colores son diversos variando desde el blanco a morado, su número varia y depende de la variedad. El fruto es una baya redondeada de color verde que se vuelve amarilla al madurar, su tamaño suele variar entre uno a tres centímetros de diámetro (Arce, 2002).

El tubérculo es un tallo subterráneo modificado, acortado, engrosado y carnoso, provisto de yemas latentes u ojos. Varían mucho en forma y tamaño, mayormente son redondos, acilindrados y alargados. También pueden ser ovalados, achatados, fusiformes, algo enroscados, es decir, adoptan diversas formas irregulares. El color de la piel del tubérculo es muy variable, va desde el blanco al amarillo, de violeta a rojo oscuro y morado, púrpura o negro. Muchos tienen áreas jaspeadas o vetas de colores, que depende de la variedad de la papa (Ministerio de Agricultura, 2006).

### **3.1.2 El cultivo de papa**

El crecimiento fenológico del cultivo de papa se inicia con el brotamiento del tubérculo y finaliza con la madurez fisiológica del cultivo, al iniciarse la cosecha. Durante su crecimiento y desarrollo, sufre una serie de eventos o fases a nivel de órganos vegetativos y reproductivos referidos a la aparición, transformación y caída de estos. El ciclo vegetativo del cultivo puede tener una duración de 3 a 7 meses dependiendo de la variedad. Según la duración del ciclo vegetativo del cultivo las variedades de papa pueden ser precoces, semitardías y tardías. La duración del ciclo vegetativo de una variedad puede ser menor o mayor a su periodo normal debido a condiciones climáticas desfavorables, manejo agronómico inadecuado en las labores de riego (la deficiencia de agua retrasa la emergencia de las plántulas y produce una maduración precoz del cultivo), fertilización (alta fertilización nitrogenada retarda el inicio de la tuberización), entre otras (Ministerio de Agricultura, 2006).

Tradicionalmente el cultivo de la papa ha sido considerado de climas fríos, especialmente en la región andina a altitudes de 2 000 a 4 000 m.s.n.m, que es un ambiente de bajas temperaturas, días cortos y abundante luz solar. Sin embargo, existen diferencias en los requerimientos de temperatura según la variedad y el estado fenológico del cultivo, pero en general las temperaturas máximas o diurnas se encuentran entre 16 a 25 °C y mínimas o nocturnas de 8 a 13 °C (Manrique, 2001).

A su vez este cultivo requiere de humedad abundante y regular pues es particularmente sensible a la sequía. Los rendimientos son mayores cuando la humedad del suelo se mantiene uniformemente por encima del 60 o 70 % de la capacidad de campo. Sin embargo, aunque es muy exigente en agua, un exceso detiene el desarrollo de los tubérculos y favorece el desarrollo de enfermedades (Arce, 2002). Se ha observado que los mayores rendimientos se dan en los suelos franco arenosos, profundos, bien drenados y con un pH de 5,5 a 7,0 (Cutter, 1978). La iluminación también es un requerimiento necesario para el cultivo, pues a mayor intensidad de luz mayor es la fotosíntesis, lo que favorece la formación y distribución de carbohidratos sobretodo en los tubérculos (Arce, 2002).

El tipo de abono, la dosis, el fraccionamiento y el momento de aplicación deben estar en función de los requerimientos de la planta (variedad, edad de la planta), contenido nutricional y características del suelo (textura, pH), sistema de riego, disponibilidad de agua, entre otros factores. Para cumplir con una adecuada fertilización, es importante un estudio previo de los nutrientes y características del suelo. Como norma general y en suelos normales la relación N: P: K (Nitrógeno, Fósforo y Potasio) recomendada es 1:2:2, aunque cada caso puede ser diferente (Arce, 2002). Por otro lado, el cultivo de papa responde muy bien a las aportaciones orgánicas. La dosis óptima se encuentra entre 25 a 30 TM de estiércol por hectárea, si se sobrepasa esta cifra se obtendría un desarrollo de vegetación exagerado (no deseado) y una reducción de la tuberización (Alonso & Méndez, 2001).

Aunque la papa puede propagarse por semillas y esquejes, en la práctica, la multiplicación es siempre vegetativa, por medio de semillas-tubérculo de 40 a 60 g de peso, empleándose de 1333 a 2000 Kg de éstas por hectárea. La profundidad de la plantación puede ir de 5 a 15 cm, dependiendo del tipo de suelo (Corbaoui, 1988).

### **3.1.3 Principales enfermedades del cultivo de papa**

Los hongos son la más importante causa de enfermedades de la papa, pudiendo ocasionar la destrucción total del cultivo. La enfermedad con mayor incidencia en el país es la racha o tizón tardío, producida por el hongo *Phytophthora infestans* que afecta hojas, tallos, bayas y tubérculos (Calderon, 1978).

Existen otros patógenos fúngicos como *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani* que causan daños considerables a la planta y tubérculo. *Fusarium solani* ocasiona la pudrición seca y la marchitez del follaje de la papa, ingresando a la planta directamente por las lenticelas o heridas preexistentes en ésta. Los ambientes húmedos y las temperaturas moderadamente frías constituyen condiciones favorables para la germinación de sus esporas y su posterior penetración en la planta de papa (Calderon, 1978).

La enfermedad causada por *Rhizoctonia solani* Kühn es conocida como “costra negra” o rhizoctoniasis y se transmite de un cultivo a otro mediante rastrojos, por suelo infectado e implementos agrícolas (Fankhauser, 1997). Este hongo mata los brotes subterráneos, ataca estolones y tubérculos de papa, formando en la superficie costras negras llamadas esclerocios, que son las estructuras de reproducción del hongo, causando complejas sintomatologías en los diferentes estados fenológicos de la planta (Hooker, 1980).

### **3.1.4 La papa en el mundo**

La producción de papa a nivel mundial se destina principalmente al mercado interno, exportándose anualmente sólo 2,5% del total producido. A pesar del reducido porcentaje de la producción que se destina al mercado internacional, se registra una tendencia creciente del volumen exportado, pasando de 4 millones de toneladas en 1970, a 8 millones de toneladas comercializadas el año 2001. El principal país exportador es Canadá, con 45% del volumen

exportado, seguido por Estados Unidos (37%), Guatemala (9%), Colombia (4%) y Argentina (2%) (Ministerio de Agricultura, 2003).

Durante el período 1961 a 2004, la producción de papa a nivel mundial presenta una tasa de crecimiento promedio anual de 0,4%, basada en la mayor participación de los países en vías de desarrollo, que presentan una tasa de crecimiento promedio anual de la producción de 3,9% en comparación con la tasa negativa de -0,7% de los países desarrollados. El crecimiento mundial positivo de la producción se explica básicamente por la capacidad del cultivo en adaptarse a las condiciones de clima de diferentes regiones del planeta, mejoras tecnológicas en los sistemas de producción y comercialización de la papa y cambios en la demanda (Ministerio de Agricultura, 2006).

### **3.1.5 La papa en el Perú**

El Perú es el principal centro de origen de la papa, por lo cual posee la mayor diversidad de entradas, sumando actualmente más de 4 000, reconociéndose la existencia de por lo menos mil variedades de papas nativas, las cuales se encuentran por encima de los 3 200 m.s.n.m. Producto del esfuerzo de los campesinos andinos se conserva *in situ* el germoplasma de papas nativas, recurso con un reconocido potencial pero escasamente explotado por los programas de mejoramiento genético en los países de origen Perú y Bolivia (Ministerio de Agricultura, 2003).

La papa es el principal cultivo del país, dada su importancia económica y social. Según los resultados del III Censo Nacional Agropecuario 1994 (III CENAGRO), 33,8% de los productores agropecuarios se dedican a la producción de papa, generando cada año aproximadamente 110 000 puestos de trabajo permanentes (30 millones de jornales) y siendo la base de la alimentación de la población altoandina (Ministerio de Agricultura, 2003).

Durante la campaña agrícola 2001-2002, el área instalada con papa representó 18% del total de siembras, siendo el cultivo con mayor contribución al Valor

Bruto de la Producción (VBP) agropecuaria con 8,6% y 14,7% del VBP agrícola (Ministerio de Agricultura, 2003).

La papa se cultiva en 19 de los 24 departamentos del Perú, existiendo condiciones climáticas favorables para la producción de variedades de interés comercial (consumo fresco y procesamiento) durante todo el año. Más del 90% de los cultivos se instalan en la sierra, concentrándose las unidades agropecuarias dedicadas a este cultivo en las regiones Quechua y Suni, que van desde los 2 300 m.s.n.m. hasta los 4 100 m.s.n.m. Las principales zonas de producción en la sierra son: Huánuco, Junín, Puno (que posee la mayor extensión dedicada al cultivo), La Libertad (principal abastecedor del norte del país), Apurímac, Cusco y Cajamarca. En la costa, destacan la producción de los departamentos de Lima e Ica. El rendimiento del cultivo depende del nivel de tecnología usada, principalmente por el empleo de semilla certificada, variedades mejoradas, fertilizantes, nivel de mecanización, adecuadas prácticas agronómicas, riego tecnificado, ocurrencia de factores abióticos y el control efectivo de plagas y enfermedades (Ministerio de Agricultura, 2003).

### **3.2 El suelo y sus componentes microbianos**

El suelo constituye un habitat bastante complejo, no sólo por la riqueza de componentes que presenta sino por la gran diversidad de organismos presentes en él. Puede contener microorganismos hasta  $10^9$  ufc/gramo de suelo y un estimado de  $10^4$  especies microbianas diferentes por gramo de suelo (Cavaletti *et al.* 2006). Los actinomicetos y hongos son los grupos más numerosos de microorganismos en el suelo, entre  $10^6 - 10^7$  y  $10^4 - 10^6$  ufc/g suelo respectivamente (Sylvia *et al.*, 1999).

La abundancia de bacterias en comparación con otros microorganismos se puede deber a su rápido crecimiento y habilidad de utilizar un amplio rango de sustratos como fuentes de carbono o nitrógeno (Glick, 1995).

La actividad microbiana en el suelo es controlada por diversos factores ambientales tales como la disponibilidad de C, nutrientes minerales, disponibilidad de agua, temperatura y pH favorable, composición de la microflora del suelo e interacciones ecológicas entre los microorganismos. Estos a su vez juegan un importante rol en la fertilidad del suelo pues oxidan materia orgánica y promueven los ciclos biogeoquímicos del C, N, P y S. La actividad enzimática del suelo esta relacionada con el ciclo dinámico de los nutrientes del suelo y la habilidad de las bacterias de catalizar la conversión de los nutrientes de formas no disponibles a otras totalmente asimilables por las plantas y por los mismos microorganismos (Gilbert *et al.*, 1993).

La concentración de bacterias por gramo de suelo que se halla alrededor de las raíces de las plantas en la llamada rizósfera es mucho mayor que en el resto del suelo (Lynch, 1990), esto se podría deber a los altos niveles de nutrientes que se hallan en la zona que rodea a la raíces que permiten el desarrollo de poblaciones microbianas (Glick, 1995).

### **3.3 La rizósfera**

El término rizósfera fue definido en 1904 por Hiltner, como el volumen de suelo influenciado por la presencia de raíces de una planta viva, cuya extensión puede variar de acuerdo al tipo de suelo, la especie de planta, su edad y otros factores. Esta zona se caracteriza por tener un alto nivel de actividad microbiana a causa de los nutrientes secretados por las raíces de las plantas en forma de exudados solubles como aminoácidos, ácidos orgánicos y otros. La rizosfera es relativamente rica en nutrientes pues el 40% de las sustancias producidas en la raíz se pierden en el suelo en forma de exudados solubles. La vasta actividad bacteriana presente en esta zona, determina entonces las propiedades fisicoquímicas del suelo de la rizósfera así como el de la superficie de la raíz (Foster, 1988).

Las comunidades bacterianas de la rizósfera tienen un eficiente sistema de absorción y catabolismo de compuestos orgánicos que se encuentran en los exudados de la raíces. A su vez existen bacterias que tienen la habilidad de adherirse a la superficie de las raíces obteniendo así el máximo beneficio de los exudados radicales (rizoplano). Por ultimo existen otras que penetran el tejido radical (endófitas) y tienen acceso directo a los compuestos orgánicos ahí presentes, evitando de esta forma todo tipo de competencia existente en la rizósfera o en el suelo (Tilak *et al.*, 2005).

### **3.4 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)**

El grupo de bacterias conocido como PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), fue definido por Kloepper *et al.*, en 1989 como bacterias que colonizan la raíz y estimulan significativamente el crecimiento de plantas. El mecanismo por el cual las PGPR promueven el crecimiento de las plantas no esta aun totalmente establecido, pero este comprende: (i) la habilidad de producir o cambiar la concentración de fitohormonas como el Ácido Indol Acético (Mordukhova *et al.*, 1991), ácido giberélico (Mahmoud *et al.*, 1984), citoquinas (Tien *et al.*, 1979), y etileno (Glick, 1995); (ii) fijación asimbiótica de N<sub>2</sub> (Boddey & Döbereiner, 1995); (iii) antagonismo contra microorganismos fitopatógenos (Scher & Baker, 1982), producción de sideróforos (Scher & Baker, 1982); (iv) solubilización de fosfato mineral y otros nutrientes (De Freitas *et al.*, 1997).

Según Kloepper *et al.*, (1989) las PGPR pueden ser: Bioprotectores (supresión de enfermedades de plantas), Biofertilizantes (aumentar la capacidad de adquisición de nutrientes) y Bioestimulantes (producción de fitohormonas).

En cuanto al efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal PGPR, pueden actuar de manera indirecta o directa. (i) Mecanismos indirectos: los metabolitos producidos las PGPR pueden funcionar como determinantes antagónicos, involucran aspectos de

control biológico, suprimen o inhiben el crecimiento de microorganismos perjudiciales para el desarrollo de la planta, vía producción de sideróforos, antibióticos, acción de enzimas líticas o inducción de mecanismos de resistencia. (ii) Mecanismos directos: ocurren cuando los metabolitos producidos por algunas cepas de rizobacterias son utilizados como reguladores de crecimiento o precursores de éstos por parte de la planta (Glick, 1995). La conjunción de ambos mecanismos de acción han dado como resultado la promoción evidente del crecimiento en plantas; observándose un incremento en la emergencia, el vigor y el peso, un mayor desarrollo en sistemas radiculares y un incremento hasta el 30% en la producción de cultivos de interés comercial, tales como papa, rábano, trigo y soja (Dashti *et al.*, 1997).

Dentro de este grupo de bacterias se encuentran los géneros: *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y Actinomicetos (Kloepper *et al.*, 1989; Basham & Levanony, 1990; Okon & Lavandera, 1994; Maier *et al.*, 2004).

### **3.5 Capacidades Promotoras del Crecimiento Vegetal**

#### **3.5.1 Antagonismo - biocontrol de fitopatógenos**

El efecto devastador de los microorganismos patógenos del suelo es altamente conocido en la agricultura. Es por ello que es importante encontrar la forma más efectiva y económica de proteger a las plantas de la gran cantidad enfermedades a las que se encuentran expuestas. En los últimos años, el uso de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) como controladores biológicos contra enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus, ha llegado a ser un importante modo de acción a través del cual las PGPR benefician el crecimiento de las plantas (Liu *et al.*, 1995; Maurhofer, *et al.*, 1998).

Estudios previos revelan que el control biológico realizado por las PGPR involucra la producción de metabolitos bacterianos los cuales reducen la población y la actividad de patógenos o microflora rizosférica deletérea (Glick *et al.*, 1995). Estos metabolitos pueden incluir a los sideróforos, que se unen al Fe haciéndolo menos disponible a ciertos miembros de la microflora patógena natural del suelo (Berthelin *et al.*, 1991; Kloepper *et al.*, 1987). Por otro lado, la producción de antibióticos es uno de los aspectos más estudiados como mecanismo de biocontrol, muchos estudios han demostrado que los inóculos bacterianos que producen antibióticos como la pirrolnitrina, ficocianina, 2,4-diacetilfloroglucinol etc., causan la supresión de fitopatógenos del suelo (Pierson & Thomashow, 1992; Kloepper, 1994; Glick *et al.*, 1995; Thomashow & Weller, 1988). A su vez, Glick (1995) indicó que el mecanismo mas efectivo que una PGPR puede emplear para prevenir la proliferación de fitopatógenos es la síntesis de antibióticos.

Otro mecanismo antagónico es la competencia, que puede definirse como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Existen tres tipos de competencia: por nutrientes, por oxígeno y por espacio. En cuanto a la primera, la competencia por carbono es la más importante con respecto al control de hongos ya que ocasiona la fungistasis, que consiste en la inhibición de la germinación de esporas del hongo en el suelo (Lindemann *et al.*, 1983). Finalmente, existen estudios que demuestran que las bacterias del género *Streptomyces* pertenecientes al grupo Actinomicetos, tienen un alto grado de antagonismo mediante la producción de antibióticos contra diversos patógenos del suelo como *Rhizoctonia solani* (Rothrock & Gottlieb 1981; Dhanasekaran *et al.*, 2005), *Fusarium oxysporum* (Taechowisan, *et al.*, 2005) y *Ralstonia solanacearum* (Moura & Romeiro, 1999). Por otro lado también se han realizado estudios en los se demuestra que las bacterias del género *Azotobacter spp.* poseen capacidad antagonista contra hongos como *Fusarium verticillioides* (Cavaglieri *et al.*, 2005) y *Rhizoctonia solani* (Cupull *et al.*, 2003),

así como bacterias del género *Pseudomonas* y *Bacillus*, las cuales juegan un papel importante también en el control biológico de enfermedades de plantas (Thomashow & Weller 1995; Silo- Suh *et al.*, 1994).

### **3.5.2 Solubilización de fosfato**

El fósforo, después del nitrógeno es el nutriente inorgánico más requerido por las plantas y microorganismos. En el suelo, es el factor limitante del desarrollo vegetal pues las concentraciones de fósforo asimilables son muy bajas, normalmente varían entre 5 y 30 mg/kg. Esto se debe a que el fósforo soluble reacciona con iones como el calcio, el hierro o el aluminio, que provocan su precipitación o fijación, disminuyendo su disponibilidad para las plantas. Los fosfatos inorgánicos aplicados como fertilizantes químicos también son inmovilizados en el suelo y como consecuencia no pueden ser aprovechados totalmente por los cultivos (Alexander, 1980; Atlas, 2002).

Por otro lado, el fósforo es importante por su participación en el proceso de reproducción y en la constitución genética de las plantas por ser un componente de los ácidos nucleicos. Interviene además en muchas reacciones bioquímicas relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas en las que obra como intermediario, donando o aceptando energía en reacciones específicas (Domínguez, 1989). Giaconi & Escaff (1993) afirman que la presencia de este elemento es indispensable para la buena fecundación de las flores, estimula el desarrollo del sistema radical y aumenta la resistencia del vegetal a las enfermedades. Además, es uno de los nutrientes que regula los efectos derivados de la presencia de un exceso de nitrógeno.

Es así que existen bacterias capaces de transformar las formas insolubles del fósforo en formas solubles, a través de reacciones enzimáticas, haciendo al fósforo disponible para las necesidades de las plantas (Sudhansu, 1998). La inoculación de semillas o suelos con bacterias capaces de solubilizar fosfato, mejora entonces la absorción del fosfato del suelo, así como el aplicado de

manera artificial, dando como resultado el aumento del rendimiento de los cultivos (Nautiyal, 1999). Así mismo, muchos autores atribuyen la solubilización de fosfato inorgánico insoluble por los microorganismos, a la producción de ácidos orgánicos y ácidos quelantes de azúcares, la producción de estos ácidos orgánicos resulta en la acidificación de la célula microbiana y el medio que la rodea. El ácido glucónico y el ácido 2-quetoglucónico son los agentes más producidos por bacterias con habilidad para solubilizar fosfato (Yadav & Dadarwal, 1997).

Se conocen géneros bacterianos tales como: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium* y *Erwinia* conocidos por su habilidad para solubilizar fosfato (Nahas, 1996; Kumar *et al.*, 2001).

### **3.5.3 Producción de Acido Indol Acético (AIA).**

Las fitohormonas tienen un rol muy importante como reguladoras del crecimiento y desarrollo de las plantas. De acuerdo a la clasificación convencional, existen cinco grupos de fitohormonas: auxinas, giberilinas, citoquinas, etileno y ácido absínico. Las fitohormonas contribuyen al funcionamiento de diversos procesos biológicos en las plantas, incluyendo la regulación de la quiescencia y germinación de semillas, la formación de raíces, florecencia y la maduración del fruto. A su vez, incrementan la resistencia de las plantas a factores ambientales y pueden inducir o suprimir la expresión de genes y la síntesis de enzimas, pigmentos y metabolitos (Tsavkelova, *et al.*, 2006).

Un aspecto importante de la interacción planta-bacteria y que esta siendo cada vez más estudiada es la producción bacteriana de auxinas, las cuales son responsables de la división, extensión y diferenciación de las células y tejidos de la planta. Este grupo de fitohormonas estimulan la germinación de las semillas y el tubérculo así como la formación de raíces, controlan el proceso de

crecimiento vegetativo, el tropismo y a su vez influyen en la fotosíntesis, formación de pigmentos y biosíntesis de metabolitos (Tsavkelova *et al.*, 2006).

La auxina típica es el ácido indol acético (AIA), la promoción del desarrollo del sistema radical característico de este tipo de reguladores de crecimiento vegetal, es uno de los parámetros utilizados para determinar la efectividad de determinadas bacterias rizosféricas. El AIA es similar en estructura al aminoácido triptófano y probablemente es éste el precursor del AIA formado en la planta viva, sin embargo, en las bacterias, la producción de AIA ocurre también a partir del triptófano pero por medio de la indol – acetamida (Patten & Glick, 2002).

La habilidad para sintetizar ácido indol acético (AIA) ha sido detectada en diversos géneros bacterianos rizosféricos y epifíticos tales como: *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Xanthomonas* (Tsavkelova *et al.*, 2006), así como algunas especies del género *Streptomyces* (Manulis *et al.*, 1994).

#### **3.5.4 Producción de sideróforos**

Los sideróforos son compuestos producidos por diferentes microorganismos del suelo que basan su actividad en fenómenos de quelación, un fenómeno rutinario en los sistemas biológicos (Neilands, 1995). La gran mayoría de los microorganismos fijadores de nitrógeno producen sideróforos para obtener hierro, elemento necesario para llevar a cabo este proceso, ya que la enzima nitrogenasa, que esta compuesta por varias unidades protéicas, requiere 36 átomos de hierro para su correcto funcionamiento (Sylvia, 2005). A su vez, diversos estudios han demostrado que entre las diferentes clases de sideróforos existentes, los primeros identificados son los del tipo catecol e hidroxamato, a su vez, existen otros como los  $\alpha$ -cetoácidos con características y actividad similar a la de los sideróforos (Neilands, 1995).

Teniendo en cuenta la importancia del hierro en las funciones vitales de los microorganismos en general, se entiende la eficiencia de captación generados por estos mismos. Las bacterias aerobias y anaerobias facultativas tienen una alta afinidad por los sistemas transportadores de hierro, razón por la cual los sideróforos son excretados para auxiliar la toma eficiente de este elemento (Jurkevitch *et al.*, 1992).

Algunas bacterias ambientales capaces de producir sideróforos son: *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Streptomyces* y *Nocardia* (Torres *et al.*, 2000; Knosp *et al.*, 1984; Page & Shivprasad, 1995; Müller & Raymond, 1984).

### **3.5.5 Producción de metabolitos volátiles**

La rizósfera de las plantas es el hábitat de diferentes microorganismos. La mayoría de bacterias del suelo posee características que les permiten actuar como antagonistas pues son capaces de suprimir el efecto de los patógenos del suelo que causan enfermedades por medio de la excreción de metabolitos antifúngicos que colaboran directa o indirectamente con el crecimiento de las plantas (Gupta *et al.*, 2000). Muchos de estos compuestos especializados tales como los antibióticos, pueden ser tanto líquidos como sólidos, pero poco se conoce sobre los que son volátiles es decir aquellos con una masa molecular menor a 300 Da, baja polaridad y alta presión de vapor, los cuales pueden actuar como antibióticos y causar la inhibición del crecimiento o tener un efecto deletéreo para algunos microorganismos (Vespermann *et al.*, 2007). Estos metabolitos pueden ser los terpenos, jasmonatos y los componentes de la clorofila. A su vez existen trabajos previos en los que las bacterias del género *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Serratia* producen compuesto como el 3-hidroxy-2butano (acetoina) y 2,3-butanodiol para promover el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* (Ryu *et al.*, 2003).

## **3.6 Características generales del género *Azotobacter***

### **3.6.1 Clasificación Taxonómica**

Phylum: Proteobacteria  
Clase: Gammaproteobacteria  
Orden: Pseudomonadales  
Familia: Pseudomonadaceae  
Género: *Azotobacter*

(Bergey, 2005)

### **3.6.2 Descripción General**

Estas bacterias fueron descritas por primera vez en 1901 por Beijerinck. La morfología celular de *Azotobacter* es constantemente variable ya que cambia según las condiciones ambientales existentes, es decir, es una bacteria pleomórfica. A su vez, se ha determinado que una de las formas de sobrevivencia de esta bacteria en condiciones desfavorables, es a través de la formación de quistes, que le confieren resistencia.

Según Kennedy (2005), las células bacterianas de *Azotobacter* pueden tener una forma bacilar con bordes romos hasta elipsoidales o cocoides, a su vez, pueden formar ciertos arreglos celulares como cadenas o pares, estas formas dependen del medio o la edad del cultivo. Son Gram negativas y pueden medir de 1.6 – 2.7  $\mu\text{m}$  de diámetro por 3.0 - 7.0  $\mu\text{m}$  de longitud. Son bacterias aerobias de vida libre pero pueden crecer a bajas concentraciones de oxígeno. Fijan nitrógeno hasta en condiciones microaerobias (2% oxígeno). La fijación de nitrógeno depende de la presencia de Molibdeno, Vanadio o enzimas nitrogenasas que contengan Fe. Algunas especies son móviles. Otras pueden producir también pigmentos solubles o insolubles en agua. Pueden utilizar alcoholes, azúcares o sales de ácidos orgánicos como fuentes de carbono.

Crece en un pH mínimo de 4,8 – 6,0 y a un máximo de 8,5, con un pH ideal de 7,0-7,5. La mayoría de aislamientos de *Azotobacter* provienen del suelo, pero existen también algunas especies aisladas de ambientes acuáticos. Las colonias de *Azotobacter* son viscosas, convexas, lisas o arrugadas y poseen pequeñas inclusiones granulares, y el color depende del medio de cultivo, pueden llegar a medir de 2 – 6 mm de diámetro en 5 días a una temperatura de 28 a 30° C.

*Azotobacter* han tenido muy buenos resultados al ser utilizadas para mejorar los cultivos pues no necesariamente son beneficiosas por su capacidad de fijar de nitrógeno sino que además posee propiedades anexas, ya que bajo ciertas condiciones ambientales son capaces de solubilizar fosfatos y sintetizar sustancias estimuladoras del crecimiento en las plantas, entre ellas, vitaminas y hormonas vegetales, como el ácido indol acético (AIA) que intervienen directamente sobre el desarrollo de la planta, lo que hace considerar a este género bacteriano como promotor del crecimiento vegetal (PGPR) (Toro *et al.*, 1997).

El empleo de *Azotobacter* como PGPR en la agricultura se ha dado sobre diversos cultivos como pepino (Kurdish *et al.*, 2008), papa (Imam & Badawy, 1978), maíz (Aly *et al.*, 2003) etc. Así como también su empleo para productos comerciales como TEC-NITRO, TCB (*Azotobacter* + *Clostridium*), BIOSTIN-PLUS (*Azotobacter chroococcum*), NITROSEI, SEIPASA (diferentes cepas de *Azotobacter*) ([www.terralia.com](http://www.terralia.com)).

### **3.7 Características generales del grupo Actinomiceto**

#### **3.7.1 Clasificación Taxonómica**

Phylum: Actinobacteria  
Clase: Actinobacteria  
Orden: Actinomycetales

(Bergey, 1989)

#### **3.7.2 Descripción general**

Los actinomicetos representan un grupo de microorganismos ampliamente distribuido en ecosistemas naturales y tienen gran importancia en la participación de la degradación de la materia orgánica, además de ciertas propiedades fisiológicas que los hacen particulares (Ghanem *et al.*, 2000).

Estos microorganismos son abundantes en el suelo, sin embargo, son encontrados también en ambientes acuáticos, dulces y marinos (Leiva *et al.*, 2004). Dentro de sus características particulares se encuentra la de producir un olor típico a suelo húmedo debido a la producción de un metabolito denominado geosmina, además presenta una actividad metabólica alta, producen terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares con las que son capaces de degradar la materia orgánica de origen vegetal y animal (Ezziyyani *et al.*, 2004).

Los actinomicetos constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos, son bacterias Gram positivas que se caracterizan por su capacidad de formar filamentos ramificados. El orden de los Actinomycetales comprende 63 géneros,

constituyendo aproximadamente del 20 – 60% de la población microbiana del suelo (Ezziyani *et al.*, 2004).

Actualmente, los actinomicetos se encuentran incluidos en el dominio bacteria debido a las siguientes razones: su pared celular esta compuesta por peptidoglicano, el diámetro de sus hifas es inferior al de los hongos (0,5 a 2,0  $\mu\text{m}$ ), son sensibles a los antimicrobianos, pero presentan resistencia a los antifúngicos y la disposición de su material genético es típicamente procariótico (Sylvia, 2005). Estas bacterias son aerobias y algunas anaerobias facultativas, pudiéndose encontrar en el suelo, animales y el hombre. Frecuentemente alcanzan grandes densidades poblacionales en suelos con alto contenido de materia orgánica y amplias reservas de carbono asimilable y humus (Fernández, 1988).

Existen tres factores que influyen en la distribución y en la actividad de muchos actinomicetos en el suelo: el pH, la temperatura y el tipo de suelo, en especial su composición. La mayoría de los actinomicetos son mesófilos y su crecimiento se registra entre 25 a 30° C; en temperaturas inferiores a 5° C el crecimiento es prácticamente nulo y en temperaturas superiores a 55° C sólo algunas especies termófilas de *Streptomyces sp.*, *Thermomonospora sp.* y *Thermoactinomyces sp.*, son capaces de crecer aunque el efecto de la alta temperatura posiblemente sea letal para el microorganismo si está acompañado de humedad (Stanley, 1994)

La adición de materia orgánica a los suelos estimula la multiplicación y actividad de los actinomicetos. Los suelos alcalinos y neutros resultan ser más favorables para el desarrollo de estas bacterias; el rango de pH óptimo se encuentra entre 6,5 y 8,0; en suelos con pH por debajo de 5,0 están frecuentemente ausentes. Los actinomicetos al ser principalmente aerobios se desarrollan favorablemente en suelos bien aireados, suelos con humedades entre 80 y 90% son perjudiciales para su desarrollo (Titus & Pereira, 2007). En

el suelo, se encuentran en casi todos los tipos, su número varia según el caso, pero es común encontrarlos en suelos fértiles con concentraciones de  $10^6$  UFC/g de suelo seco (Tate, 2000).

Los principales géneros aislados a partir de suelos son *Nocardia*, *Streptomyces* y *Micromonospora*, que pueden estar presentes como conidias o como hifas vegetativas. Sin embargo los métodos de aislamiento convencionales muestran que el 95% de los actinomicetos aislados a partir del suelo pertenecen al género *Streptomyces* (Lacey, 1973).

El género *Streptomyces* ha sido descrito como colonizador de la rizósfera, capaz de ejercer biocontrol sobre hongos fitopatógenos, producir sideróforos, sustancias promotoras del crecimiento vegetal *in vitro*, promover la nodulación y ayudar a los bacteroides como *Rhizobium* a la asimilación del hierro en la fijación de nitrógeno en leguminosas, lo cual contribuye indirectamente a la promoción del crecimiento vegetal (PGPR) (Tokala *et al.*, 2002).

En la actualidad existen diversos productos que basados en la capacidad antagónica de los actinomicetos, son utilizados en el mercado agrícola para mejorar la calidad de sus cultivos, tales como Mycostop (*Streptomyces griseoviridis*) ([www.verdera.fi](http://www.verdera.fi)) y Actinovate SP (*Streptomyces lydicus*) ([www.jrjohnson.com](http://www.jrjohnson.com)).

## IV. MATERIALES Y METODOS

### 4.1 Muestra Biológica

#### 4.1.2 Material Vegetal

- Muestras de rizósfera de papa recolectadas de los departamentos de Huánuco, Huancavelica, Cajamarca y Junín, con la finalidad de aislar cepas de *Azotobacter* y Actinomicetos.
- Semillas de *Lactuca sativa* L. (lechuga) para la prueba de producción de metabolitos volátiles.
- Plantas *in vitro* y semillas- tubérculo de papa (*Solanum tuberosum* Linnaeus 1973) de la variedad Unica obtenidas del complejo de Biodiversidad del Centro Internacional de la Papa, para ser inoculadas con las cepas aisladas de *Azotobacter* y Actinomicetos en los ensayos de invernadero.

#### 4.1.3 Bacterias y hongos

Se utilizaron las siguientes cepas referenciales de bacterias y hongos como testigos de las pruebas de antibiosis y antagonismo:

- *Bacillus subtilis* ATCC6633
- *Bacillus subtilis* FZB24- FZB Biotechnik GMBH (Producto Aleman)
- Cepa de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani* aislada de tubérculo de papa (Huancavelica) en el laboratorio de Micología de la División de Manejo Integrado de cultivos (CIP).

## **4.2 Métodos**

### **4.2.1 Lugar de toma de muestras y muestreo de rizósfera**

Los muestreos se realizaron en el mes de Abril del 2008 en 4 departamentos del Perú: en el departamento de Huancavelica en la localidad de San José de Aymará (M1) y Mullaca (M2), en el departamento de Junín en las localidades de La Victoria (M5), Patalá (M3-M4) y Marcavalle (M6) en el departamento de Huánuco en las localidades de Paccha (M7), Huayllacan (M8), Misión Punta (M9) y Mataos (M10); en el departamento de Cajamarca en las localidades de Pampa de la Culebra (M11) y Puyucana (M12); (Tabla 1).

Se muestrearon en total 11 campos de los cuales se tomaron dos plantas de papa al azar de cada uno. La muestra estaba conformada por la raíz y el suelo alrededor de ésta (rizósfera), cada una llegó a pesar 1kg, una vez recolectadas, se enviaron rápidamente al laboratorio para su procesamiento (Figura 1, 2) (Calvo, 2008).

### **4.2.2 Lugar de procesamiento de muestras y trabajo de laboratorio**

El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Micología de la División de Manejo Integrado de Cultivos del Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima - Perú.

### **4.2.3 Tratamiento de las muestras**

Se pesaron las raíces de cada muestra hasta llegar a 1 g luego se colocaron en 9 ml de agua peptona (dilución  $10^{-1}$ ), inmediatamente, se agitó en el vortex para que la raíz desprenda todo el suelo de su superficie, luego se extrajo 1 ml de la suspensión formada y se colocó en 9 ml de agua peptona (dilución  $10^{-2}$ ), se realizaron 8 diluciones decimales sucesivas de cada muestra, tomando las cuatro últimas para el conteo poblacional de microorganismos. Todo este

procedimiento se realizó en completa esterilidad en una cámara de flujo laminar (Calvo, 2008).

#### **4.2.4 Cuantificación de microorganismos de la rizósfera de *Solanum tuberosum***

Para la determinación de la microflora de la rizósfera de papa, se siguió el procedimiento del recuento de microorganismos en placa, que consiste en la realización de diluciones sucesivas de cada muestra.

##### **4.2.4.1 Bacterias mesófilas y hongos**

El conteo de microorganismos se realizó para bacterias y hongos totales presentes en cada muestra, de acuerdo a los métodos citados por APHA – AWWA (1998).

Para determinar el número de bacterias totales y continuando con el método del recuento de microorganismos en placa, se tomó 1 ml de las diluciones  $10^{-5}$  hasta  $10^{-7}$ , y se sembró por el método de incorporación utilizando el Agar Plate Count (PC). Las placas se incubaron por 48 horas a 28° C. Se tomó en cuenta aquellas donde el crecimiento de colonias oscilaba entre 30 a 300 colonias. El número resultante se multiplicó por el factor de dilución de la placa correspondiente. En cuanto al número de hongos totales de cada muestra, se tomó 1ml de las diluciones  $10^{-3}$  hasta  $10^{-5}$ , luego se sembró por el método de incorporación en Agar Papa Dextrosa (PDA) apropiado para el crecimiento de dichos microorganismos, las placas se incubaron por 5 días a 25° C, posteriormente se tomaron en cuenta aquellas en las que se observó un crecimiento entre 8 a 80 colonias, el número resultante del conteo se multiplicó por el factor de dilución correspondiente. Todos los resultados se expresaron en ufc por gramo de suelo.

#### **4.2.4.2 Cuantificación de *Azotobacter***

La población de *Azotobacter* presente en cada muestra se cuantificó siguiendo el método propuesto por Zapater (1975), utilizando tubos de ensayo con 10 ml de Medio Mineral Sin Nitrogeno (MMSN) en caldo a pH 7, suplementado con azul de bromotimol al 0,05% (p/v), a este medio se le agregó 1 ml de cada dilución de  $10^{-2}$  hasta  $10^{-4}$ , por triplicado y se incubó por 5 días a 28° C. El crecimiento de *Azotobacter* se manifestó al virar el color del indicador de azul a amarillo, además de la turbidez y la formación de un velo en la superficie del caldo, los tubos que presentaron estas características fueron considerados positivos. La cantidad de bacterias se expresó como el Número Más Probable/gramo de rizósfera (NMP/g) (Figura 3) (Cochran, 1950).

#### **4.2.4.3 Cuantificación de Actinomicetos**

Para determinar la cantidad de Actinomicetos presentes en cada muestra, se siguió la metodología citada por APHA-AWWA-WPCF (1998). Se tomó 1 ml de cada dilución de  $10^{-3}$  hasta  $10^{-5}$ , luego se sembró por el método incorporación en Agar Almidón Caseína a pH 7 suplementado con Fluconazol al 0,25% (p/v) para evitar el crecimiento de hongos, luego las placas se incubaron a 28° C por 6 días. Pasado el tiempo de incubación, se seleccionaron las colonias según las características morfológicas que permitieron determinar los asilamientos de actinomicetos (textura, coloración del micelio aéreo y del sustrato, forma y tamaño de la colonia) según Locci (1986). Posteriormente se realizó el recuento de microorganismos considerando las placas en las que se observó un crecimiento entre 30 – 300 colonias, éstos se expresaron en ufc/gramo rizósfera (ufc/g).

#### **4.2.5 Selección de colonias de *Azotobacter* y Actinomicetos: Pruebas diferenciales**

Para el aislamiento de *Azotobacter*, se tomaron en cuenta solamente los tubos considerados como positivos para la cuantificación previamente realizada, es decir aquellos que presentaron un velo en la superficie del caldo, turbidez y viraje de color del indicador de azul a amarillo; de cada tubo se tomó una asada de caldo y se estrió en placas con Medio Mineral de Zapater suplementado con púrpura de bromocresol, como indicador de pH. Las placas se incubaron por 5 días a 28 ° C. Luego se realizaron replicas sucesivas de aquellas colonias que presentaban la morfología típica reportada para el género *Azotobacter*, es decir, colonias lisas, brillosas u opacas, convexas y mucoides, hasta obtener colonias puras. Luego de la obtención de colonias puras, cada aislamiento de *Azotobacter* fue sometido a tinción Gram con el objetivo de reconocer las características microscópicas típicas del género. Posteriormente, se realizaron las pruebas bioquímicas para cada aislamiento puro, de cada tipo de microorganismo. Para el caso de los aislamientos del género *Azotobacter* se realizó la prueba de catalasa, oxidasa, utilización de azúcares, producción de pigmentos, formación de quistes y motilidad (Bergey, 2005).

Para el aislamiento de Actinomicetos, de cada placa considerada para el conteo poblacional, se seleccionaron colonias de morfologías diferentes típicas de Actinomicetos, inicialmente de superficie suave, luego al desarrollar micelio, se tornaron de apariencia aterciopelada, granulosa o pulverulenta, además se observó tanto el micelio aéreo como basal en relación a la amplia variedad de pigmentos. Se realizaron replicas sucesivas de dichas colonias hasta lograr cultivos puros. Estas placas fueron sembradas por estriado en Agar Almidón Caseína (AC), y se incubaron por 6 días a 28 °C (Locci, 1986). En el caso de Actinomicetos se realizaron las pruebas de producción de pigmentos difusibles, utilización de azúcares, actividad antibacteriana, y caracterización morfológica (Locci, 1986).

## **4.2.6 Caracterización fenotípica de las cepas aisladas.**

### **4.2.6.1 Crecimiento de bacterias a diferentes temperaturas**

En placas de Agar Tripticasa Soya (TSA) y Agar Nutritivo (AN) se sembraron 15  $\mu\text{L}$  ( $10^6$  ufc/ml) de un cultivo de 24 h de *Azotobacter* y 48 h de Actinomicetos, respectivamente y por duplicado, luego se incubaron a las temperaturas de 4, 10, 15 y 20 °C, usando un control a 28 °C. La evaluación se realizó midiendo el diámetro de las colonias cada 48 horas durante 15 días comprobando así el crecimiento y la adaptabilidad de cada aislamiento a las diferentes temperaturas a las que se enfrenta el cultivo de papa en el Perú (Calvo, 2008).

### **4.2.6.2 Crecimiento de bacterias a diferente pH**

En placas con TSA y Agar Nutritivo regulado a diferentes gradientes de pH se sembraron 15  $\mu\text{L}$  ( $10^6$  ufc/ml) de cultivo de 24 horas de *Azotobacter* y 48 horas de Actinomicetos respectivamente. Ambos medios fueron regulados a pH 4, 5,5 y 7 (control). El crecimiento de las bacterias se evaluó diariamente por 8 días midiendo el diámetro de las colonias con el objetivo de determinar su capacidad adaptativa a suelos de pH bajo que se presentan en algunas zonas alto andinas (Calvo, 2008).

## **4.2.7 Pruebas para capacidades promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) *in Vitro***

Cada cepa aislada de las bacterias del género *Azotobacter* y Actinomicetos fue sometida a algunas pruebas de capacidad PGPR *in vitro*.

#### **4.2.7.1 Prueba de antagonismo contra *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani***

##### **4.2.7.1.1 Aislamiento de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani***

Para el aislamiento de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani* se tomaron muestras de tubérculos infectados recolectados en zonas altoandinas. Para el caso de *Rhizoctonia solani*, la superficie del tubérculo infectado fue lavada y desinfectada sumergiéndolo en hipoclorito de sodio al 5% de 3 a 5 min. Se enjuagó con agua destilada, en completa esterilidad y luego se extrajeron los esclerocios para ser sembrados en Agar Agua al 2% por 5 días a 20 °C, luego de este tiempo, se colocó el hongo en placas con Agar Papa Dextrosa (PDA) igualmente a 20 °C por 5 días. Se observó que el crecimiento del micelio sea parejo y además que no exista presencia de bacterias, para lograrlo se replicó el micelio del hongo hasta obtener un crecimiento uniforme (Anguiz & Martin, 1989). Luego se observó al microscopio para confirmar las estructuras características de cada hongo y por último se almacenó el hongo aislado en tubos con Agar Papa Dextrosa (PDA) en plano inclinado a 4 °C.

Para el aislamiento de *Fusarium solani* se retiró el micelio blanco característico que se encuentra en la superficie de tubérculos afectados por la enfermedad y se procedió a sembrar de la misma manera que *Rhizoctonia solani*. Una vez purificado el hongo se realizó la identificación de las estructuras características al microscopio (Anguiz & Martin, 1989).

##### **4.2.7.1.2 Prueba de antagonismo en placa**

Se reactivaron las cepas aisladas de *Azotobacter* y Actinomicetos, luego fueron sembradas por 2 y 5 días en Caldo Tripticosa Soya (TSB) y Caldo Nutritivo (CN) respectivamente, a 28° C y con una agitación de 150 rpm, hasta obtener una población de 10<sup>8</sup> ufc/ml.

Se utilizaron placas con Agar Papa Dextrosa (PDA) a pH 7, divididas en 3 cuadrantes marcando el punto central de la placa y 3 puntos equidistantes a este en cada centro del cuadrante. En cada uno de estos puntos se sembraron 30  $\mu$ L de cada una de las cepas bacterianas a probar. Luego con un sacabocado de 1 cm de diámetro se retiró una porción del micelio del hongo fitopatógeno previamente aislado y se colocó invertido en el centro de la placa con las bacterias alrededor. Paralelamente se realizaron placas control de hongo sin bacterias. Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Luego se incubaron las placas a temperatura ambiente.

La inhibición de hongo a causa de la bacteria se observó al finalizar el crecimiento total de éste, es decir después de 5 días para *Rhizoctonia solani* y 7 días para *Fusarium solani*. Para calcular el porcentaje de inhibición se midieron las áreas alrededor de cada cepa bacteriana. Tomando en cuenta el radio de la colonia del hongo que creció opuesta a la colonia de las bacterias así como también el radio máximo que en el que creció el hongo en la placa. El resultado se expresó en porcentaje de inhibición siguiendo la técnica propuesta por Ahmed *et al.* (2007).

#### **4.2.7.2 Prueba de producción de Ácido Indol Acético (AIA)**

Para determinar la producción de ácido indol acético (AIA) de cada cepa aislada tanto para *Azotobacter* como para Actinomicetos, se siguió un método de carácter cualitativo y otro de carácter cuantitativo, de la siguiente manera:

##### Prueba cualitativa

Se utilizó un método colorimétrico basado en la reacción del reactivo de Salkoswky al detectar compuestos derivados del Indol. Se sembraron las cepas de *Azotobacter* y Actinomicetos en TSB y Caldo Nutritivo, respectivamente, suplementados con L- triptófano por 6 días para el caso de *Azotobacter* y 7 días en el caso de Actinomicetos a 28 °C y 150 rpm.

Luego se colocaron en cada pocillo de una placa de ELISA por duplicado, 100  $\mu\text{L}$  de cultivo de bacteria y 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de Salkowsky, así como también un control con caldo sin bacteria y reactivo. Se colocó la placa de ELISA en oscuridad por 15 min a fin de que el reactivo reaccione. Pasado el tiempo se observó el viraje de color de cada pocillo de amarillo a diversas tonalidades, desde rosado hasta fucsia encendido, lo que indica la presencia de ácido indol acético (AIA). En base a este resultado se seleccionaron las cepas que fueron sometidas a la prueba cuantitativa (Gordon & Weber, 1950).

### Prueba cuantitativa

Para tener un cálculo más exacto de la cantidad de AIA producido por cada cepa, se realizó una curva de calibración control con los caldos utilizados para el crecimiento de cada microorganismo, es decir TSB y Caldo Nutritivo para *Azotobacter* y Actinomicetos respectivamente. Para realizar dicha curva de calibración se prepararon frascos Stock de TSB y Caldo nutritivo con concentraciones de AIA, de 5 $\mu\text{g/ml}$  a 180 $\mu\text{g/ml}$ , luego se midió la absorbancia de cada concentración a una longitud de onda de 530 nm en el espectrofotómetro (UV – 160 Shimadzu).

Posteriormente para calcular la producción de ácido indol acético (AIA) en los microorganismos, se seleccionaron las cepas de *Azotobacter* y Actinomicetos que resultaron positivas en la prueba cualitativa, éstas fueron activadas y sembradas en 20 ml de TSB y Caldo nutritivo respectivamente, suplementado con L-triptófano. La evaluación se realizó a los 3, 6, 10 y 15 días para *Azotobacter* y a los 4, 8, 12 y 15 días para Actinomicetos.

Se tomó 5 ml de cultivo, y se centrifugó dos veces por 15 y 10 min a 8000 rpm utilizando solo el sobrenadante. Luego se extrajo una alícuota de 1 ml del sobrenadante final y se colocó en tubos de prueba, posteriormente se adicionaron 2 ml de reactivo de Salkowsky, para luego colocarlos en oscuridad por 15 min, transcurrido el tiempo, se realizó la medición de cada muestra en el

espectrofotómetro, utilizando un control sin bacteria. Por último, para calcular la cantidad de AIA producida por cada cepa en µg/ml, se tomó como referencia la curva control realizada anteriormente (Glick, 1995).

#### **4.2.7.3 Prueba solubilización de fosfato**

##### Medio sólido

La metodología a utilizarse para determinar las bacterias solubilizadoras de fosfato fue la empleada por Nautiyal (1999). Se reactivaron las cepas de *Azotobacter* y Actinomicetos en TSB por 2 días y Caldo Nutritivo por 5 días, respectivamente, hasta llegar a una población de  $10^8$  ufc/ml para cada microorganismo. Luego se sembraron 15 µl del cultivo fresco de cada bacteria en placas con medio de cultivo National Botanical Research Institute's Phosphate (NBRIP) con fosfato tricálcico.

Se incubaron por 15 días a 28° C. La evaluación se realizó durante 30 días cada 48 h, desde la formación de un halo transparente alrededor de las colonias, lo que indica la solubilización del fosfato del medio. El cálculo del halo de solubilización se realizó mediante la fórmula matemática de la corona circular como sigue:  $A = \pi(R^2 - r^2)$ , donde R: radio del halo de solubilización y r: radio de la colonia bacteriana.

##### Medio Líquido

Se reactivaron las cepas de *Azotobacter* y Actinomicetos que formaron halos de solubilización en medio sólido, luego éstas fueron sembradas en caldo NBRIP, y se incubaron a 28 °C a 150 rpm, por 12 días, la evaluación se realizó cada 48 h, midiendo el pH del caldo (Chatli *et al.*, 2008).

#### **4.2.7.4 Prueba de producción de sideróforos**

Para la detección de sideróforos se realizó la prueba Chrome Azurol S (CAS), la cual utiliza un complejo hierro – colorante que cambia su color al perder hierro, de azul a anaranjado.

Se sembraron 3 µl de cultivo tanto de *Azotobacter* como de Actinomicetos de 2 y 3 días de crecimiento respectivamente, sobre el agar Chrome Azurol S (CAS). Las placas fueron incubadas a 28 °C durante 2 semanas, la evaluación comenzó al observarse el crecimiento de la bacteria. Para esta evaluación se tomó en cuenta la presencia de halos anaranjados alrededor de las colonias (Payne, 1994).

#### **4.2.7.5 Producción de metabolitos volátiles**

Para evidenciar la producción de metabolitos volátiles tanto de las cepas aisladas del género *Azotobacter* como de Actinomicetos se escogieron 5 cepas al azar de ambos tipos de microorganismos. Luego, se pre germinaron semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) por tres días en medio de cultivo Murashigue & Skoog, pasado este tiempo se colocaron en una misma placa petri partida a la mitad, 20 µL de bacteria en su medio correspondiente y 6 semillas pre germinadas de lechuga en medio Murashigue & Skoog, por placa. Estas fueron colocadas luego en una cámara de crecimiento por 15 días a 12 h de luz y 12 de oscuridad diariamente (Ryu *et al.*, 2003; Vespermann *et al.*, 2007).

#### **4.2.8 Pruebas a nivel de invernadero para promotores de crecimiento vegetal.**

Las mejores cepas seleccionadas *in Vitro* como promotores de crecimiento se probaron a nivel de invernadero. (Tabla 21, 22)

#### **4.2.9 Experimentos en invernadero**

Se instalaron dos ensayos de invernadero en simultáneo, para evidenciar el efecto de la inoculación de *Azotobacter* y Actinomicetos sobre el cultivo de *Solanum tuberosum* teniendo como variables el tipo de sustrato (estéril y no estéril) tanto en plántula como en semilla vegetativa de papa de la variedad Unica, dichos ensayos se realizaron en el cobertor N° 44 en el Centro Internacional de la Papa (CIP), durante los meses de Noviembre a Enero, en los cuales se registro una temperatura promedio de 23 °C y humedad relativa 78,91%.

##### **4.2.9.1 Acondicionamiento de plántulas *in vitro* a Jiffy**

El periodo de acondicionamiento tuvo lugar durante dos semanas, durante las cuales, las plántulas de papa de 1 mes de edad se colocaron en pequeños soportes temporales de suelo, denominados Jiffy, previamente hidratados con agua corriente, luego fueron regadas con una solución nutritiva de NPK (proporción 20:20:20) a una concentración de 3 g/l. El riego se realizó cada 48 horas a 15 ml por planta en el invernadero (Figura 18A, B)

##### **4.2.9.2 Trasplante a macetas**

Luego del periodo de acondicionamiento de las plantas en Jiffy estas fueron trasplantadas a macetas, las cuales contenían sustrato (3/4 de la capacidad de la maceta). La composición del sustrato utilizado consistía en una mezcla de 1: 1: 2 (Tierra: Arena: Turba) que fue preparada y posteriormente esterilizada por calor a 80 °C por 4 horas y con las siguientes características fisicoquímicas: pH 5,43, conductividad eléctrica de 1,07 dS/m, 17,89 % de materia orgánica, 0,29% de N, 0,13% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 0,22% de K<sub>2</sub>O, 1,16% de CaO, 0,60% de MgO y 0,23% de Na (Figura 18C).

#### **4.2.9.3 Preparación del inóculo**

Las cepas seleccionadas fueron sembradas en TSB y Caldo Nutritivo para *Azotobacter* por 2 días y Actinomicetos por 3 días respectivamente, a 28 °C y 150 rpm, alcanzando una población de  $10^8$  ufc/ml; así como también plantas y tubérculos de papa sin inóculo como controles negativos.

#### **4.2.9.4 Instalación de Ensayos**

##### **4.2.9.4.1 Experimento 1:**

En el primer experimento se inocularon plantas *in vitro* de *Solanum tuberosum* var. Unica, con las cepas seleccionadas de *Azotobacter* y Actinomicetos con el objetivo de evaluar el efecto de esta inoculación sobre el cultivo de papa.

Luego del trasplante a maceta, cada planta fue inoculada con 5 ml de caldo con *Azotobacter* y Actinomicetos respectivamente, cerca de las raíces, a los cuales se les llamo tratamientos. Posteriormente las raíces fueron cubiertas con sustrato. En total se probaron 17 tratamientos con 4 repeticiones por cada uno, usando como control negativo caldo sin bacteria (Calvo, 2008) (Figura 18D).

##### **4.2.9.4.2 Experimento 2:**

En el segundo experimento, se sembraron plantas *in vitro* y semillas-tubérculo de *S. tuberosum* var. Unica. Los factores a evaluar fueron: el tipo de bacteria utilizada (tratamiento), el tipo de suelo en el que se sembró (estéril/no estéril) y el tipo de semilla utilizada (*in vitro*/tubérculo).

Luego del periodo de acondicionamiento, las plántulas fueron inoculadas con 5 ml de caldo tanto con *Azotobacter* como con Actinomicetos cerca a las raíces siguiendo el procedimiento del experimento 1; se probaron 3 tratamientos en ambos tipos de sustrato, con 4 repeticiones cada uno. Las semillas tubérculo, de 5 cm de largo por 3 cm de ancho y 16,5 g de peso promedio fueron

embebidas en 30 ml de cada tratamiento durante 30 min, en agitación. Para luego ser colocadas dentro de las macetas (5 cm de profundidad). Las plantas y tubérculos permanecieron en macetas por 11 semanas para luego ser evaluadas (Figura 18E).

#### **4.2.9.5 Tratamiento de plantas en el invernadero y cuidados.**

Después del mes de instalación, se completó el volumen total de la maceta con sustrato (Aporque). Cada tratamiento fue fertilizado con NPK (20:20:20) a la semana de la inoculación. Para controlar una posible población de moscas blancas se colocaron trampas amarillas colgantes en cada mesa donde se ubicaban las macetas.

#### **4.2.9.6 Evaluación de dinámica poblacional de microorganismo de suelo en invernadero.**

Se realizó el seguimiento poblacional de *Azotobacter* y Actinomicetos a partir de dos tratamientos escogidos aleatoriamente de las macetas con planta *in vitro* y el control. Esta evaluación se realizó cada dos semanas, siguiendo los procedimientos descritos anteriormente sobre recuento de microorganismos.

#### **4.2.10 Análisis de Resultados de Invernadero**

Se utilizó un Diseño Estadístico Completamente al Azar (DCA) para ambos experimentos. En el caso del Experimento 1 se evaluó el efecto del tratamiento (bacteria) sobre el cultivo de papa (*S. tuberosum*), para lo cual se tomaron en cuenta 23 parámetros: altura de la planta, número de tallos y hojas, peso fresco, peso seco y porcentaje de materia seca de tallos y hojas, área específica de las hojas, peso específico de las hojas y el área foliar total; en el suelo: número de tubérculos, peso fresco, peso seco y porcentaje de materia seca de tubérculos y raíces; por otro lado se tomo en cuenta también, el peso fresco, peso seco y porcentaje de materia seca de toda la planta así como el

índice de cosecha. Para calcular el área específica de la hoja se tomaron tres folíolos representativos de cada planta inoculada, de la parte baja, media y superior, se pesaron y luego con ayuda de un medidor de área foliar (Leaf area meter CI202), se calculó el área de los tres folíolos, luego ésta fue dividida entre el peso seco de estos tres folíolos ( $\text{cm}^2/\text{g}$ ). El área foliar total de la planta es el producto del área específica de las hojas por el peso seco de hojas de toda la planta ( $\text{cm}^2$ ), el peso específico de las hojas es la inversa del área específica de las hojas multiplicado por 100 ( $\text{g}/\text{dm}^2$ ) y por último el índice de cosecha está dado por el peso seco del tubérculo entre el peso seco de toda la planta, lo que indica, que porcentaje de la planta es productivo (tubérculo) (Calvo, 2008). El análisis estadístico para este experimento se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey, con un nivel de significancia del 5%. Los datos de este experimento fueron analizados en el programa estadístico SPSS 16.0.

En el Experimento 2, se tuvieron en cuenta tres factores que influyen sobre el cultivo de papa: el tipo de suelo del cultivo (estéril/no estéril), el tipo de semilla utilizada (*in vitro*/ semilla-tubérculo) y el tratamiento con bacteria, cada uno con sus respectivos controles sin bacteria, con el objetivo de determinar cual de estos factores o sus interacciones influyen de forma notable sobre el rendimiento de las plantas de papa. El análisis de los resultados se realizó mediante un análisis factorial y la prueba de Tukey, con un nivel de significancia del 5%. El análisis de los resultados fueron realizados en el programa estadístico R (R Project, 2008).

## V. RESULTADOS

### 5.1 Conteo de poblaciones microbianas de la rizósfera

Luego de haber procesado las muestras, se realizó un análisis de las poblaciones microbianas presentes en cada lugar de muestreo, es decir, poblaciones de *Azotobacter*, Actinomicetos, Bacterias y Hongos Totales.

En cuanto al conteo poblacional de bacterias totales, este se encuentra en un rango de 50 a 90 x 10<sup>6</sup> ufc/g, siendo en la localidad de Misión Punta donde se encontró mayor carga microbiana. Mientras que las poblaciones de hongos en las muestras fluctúan entre 50 a 90 x 10<sup>3</sup> ufc/g, habiendo encontrado en la localidad de Mullaca la mayor población.

Como se puede observar en la Tabla 3, las poblaciones más abundantes de *Azotobacter spp.* se encontraron en la rizósfera de las muestras recolectadas en las localidades de Patalá, La Victoria, Misión Punta con 8 360, 10 802 y 8 228 Número Más Probable de bacterias por gramo respectivamente (NMP/g). De igual forma, se encontraron mayor cantidad de Actinomicetos en las localidades de San Jose de Aymará, Patalá y Pampa de la Culebra, con 3,1 x 10<sup>6</sup>, 3,0 x 10<sup>6</sup>, 3,5 x 10<sup>6</sup> ufc/g. Sin embargo no se encontró una población significativa de Actinomicetos en las muestras M6, M7 y M8, de las localidades de Marcavalle, Paccha y Huayllacan respectivamente.

### 5.2 Aislamientos de Actinomicetos y *Azotobacter spp.* de la rizósfera de papa, por localidades.

Luego de haber realizado el conteo de poblaciones de microorganismos, se realizaron los aislamientos correspondientes a las bacterias del género *Azotobacter* y Actinomicetos por zonas muestreadas.

Estos aislamientos se lograron luego de estriar de 3 a 4 veces las colonias en el medio apropiado hasta lograr colonias puras. Para la identificación de las bacterias del género *Azotobacter* spp. fueron sembradas en medio mineral sin nitrógeno (MMSN), luego se tomo en cuenta la morfología característica del género es decir, colonias de superficie lisa, brillantes u opacas, ligeramente convexas y apariencia mucoide. Es así que la Tabla 4 señala que la localidad con la mayor cantidad de aislamientos fue Paccha (M7) y en la que se encontró menor cantidad fue Mataos (M10) ambas ubicadas en el departamento de Huánuco.

Por otro lado, la identificación de Actinomicetos, luego de 2 a 3 siembras sucesivas de las colonias aisladas hasta conseguir un cultivo puro en agar Almidón Caseína (AC) fueron objetos de caracterización morfológica para tomar en cuenta la presencia de micelio base y micelio aéreo así como la pigmentación así como la textura seca típica en las colonias de Actinomicetos. La Tabla 4 indica que la localidad que presenta la mayor cantidad de aislamientos es Mataos (M10) ubicada en el departamento de Huánuco. Finalmente, de todas las localidades muestreadas, se obtuvieron 62 aislamientos de las bacterias del género *Azotobacter*, y 45 aislamientos de Actinomicetos.

### **5.3 Características morfológicas de los aislamientos de *Azotobacter* spp. y Actinomicetos.**

En la Tabla 5 se puede observar que las colonias aisladas de *Azotobacter* spp. presentan una superficie lisa y coloración crema que varía de opaca a brillante y transparente, en cuanto a la elevación se observa que en la mayoría de las colonias es convexa, el borde es entero, su forma es circular y el diámetro de la colonia se encuentra entre 1 y 5 mm. Por otro lado, se observaron algunas colonias que acidificaron el medio, resultado que se evidenció con el viraje de color del mismo, de morado a amarillo (Figura 4).

Por otro lado, en los aislamientos de Actinomicetos, sembrados en agar Almidón Caseína a 28 °C por 6 días, se observaron las características morfológicas de las colonias. Se observa la presencia de micelio aéreo corto, la pigmentación del mismo y del micelio base así como la textura de la superficie de la colonia (Figura 5). Todos los aislamientos de Actinomicetos presentan micelio aéreo con diversos pigmentos como blanco, amarillo, gris y verde (Tabla 6). En el micelio base se observan también diferentes coloraciones como anaranjadas, marrones, amarillas, gris, verde y azul, sin embargo se observaron algunos aislamientos que no presentaron pigmentos en el micelio base. La textura de la superficie de las colonias es en su mayoría suave, pero también se encontraron algunas rugosas y arenosas.

#### **5.4 Pruebas de capacidad PGPR de las cepas aisladas**

##### **5.4.1 Prueba de antagonismo**

De las 62 cepas del género *Azotobacter*, 29 resultaron positivas (Figura 25), de las cuales, según la Tabla 6, con respecto a la capacidad de inhibición contra *Fusarium solani*, de todas las cepas positivas, 25 fueron antagonistas contra éste hongo llegando a tener un porcentaje de inhibición máximo de 48%, registrado en la cepa A3 -08/08.

En cuanto a la capacidad de *Azotobacter spp.* para inhibir el crecimiento de *Rhizoctonia solani*, de todos los aislamientos positivos, solo 10 fueron antagonistas para este hongo, sin embargo, el porcentaje máximo de inhibición fue de 62,4% (Figura 25), registrado en la cepa A3-01/08; es decir, los porcentajes de inhibición más altos fueron registrados contra *Rhizoctonia solani*. Además como se puede observar en la Tabla 7, los valores de la desviación estándar en los porcentajes de inhibición son pequeños, lo que indica que el ensayo tuvo resultados estables. Por otro lado, de todas las cepas de *Azotobacter spp.* positivas, sólo 6 demostraron ser antagonistas contra ambos hongos (Figura 6).

En cuanto a la capacidad antagonista de Actinomicetos, 25 de los 45 aislamientos evaluados presentaron resultados positivos (Figura 26), de los cuales 22 resultaron antagonistas contra *Fusarium solani*. En la Tabla 8, se puede observar que los porcentajes de inhibición obtenidos varían entre 20 y 45% siendo la cepa A1-07/08 aquella que presentó el porcentaje de inhibición más alto. Por otro lado, con respecto a la capacidad antagónica de Actinomicetos contra el hongo *Rhizoctonia solani*, de todos los aislamientos, 19 resultaron positivos (Figura 26), estos resultados varían entre 28,6 y 72,6% siendo la cepa A1-42/08 aquella que presentó el porcentaje de inhibición más alto (Figura 7).

A diferencia de *Azotobacter spp.*, los aislamientos de Actinomicetos que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de ambos hongos evaluados asciende a 68%, teniendo valores reducidos de desviación estándar lo que indica que los resultados del ensayo son estables.

#### **5. 4. 2 Prueba de Solubilización de Fosfato**

El 46,7% (29) de las 62 cepas evaluadas de *Azotobacter spp.* mostró la presencia de halos de solubilización variando entre 0,11 y 5,43 cm<sup>2</sup>, siendo la cepa A3-39/08 en la que se obtuvo el mayor valor (Tabla 9). En cuanto al comportamiento de las cepas con respecto al crecimiento del halo de solubilización, se observa en la Figura 27, que éste comenzó en el día 4 y continuó incrementándose hasta detenerse entre el día 16 y el día 18, manteniéndose estable hasta el día 30, último día de evaluación (Figura 8).

Por otro lado, para ciertas cepas, tomando en cuenta las áreas de los halos producidas, se realizó un seguimiento de la variación del pH en caldo para solubilizadores de fosfato durante 288 h (12 días), donde se observó que el pH del medio que al inicio era de 7,0 descendió notablemente entre los días 4 y 6 llegando hasta 4,4 para la cepa A3-39/08, volviendo a incrementarse en los

últimos días de evaluación hasta llegar a 6,4 para algunas cepas (Tabla 10) (Figura 10).

Por otro lado, la Tabla 11, señala que de las 45 cepas de Actinomicetos evaluadas, solo el 11% (9) formaron halos de inhibición, los cuales varían entre 0,13 a 0,35 cm<sup>2</sup>, siendo la cepa A1-45/08 la que presentó el valor más alto (Figura 9). Así mismo, las cepas positivas fueron sembradas en caldo solubilizador de fosfato para evaluar el gradiente de pH observándose el pH más bajo en el día 4 para la cepa A1-34/08 el cual llegó a 5,5 mientras que en las otras cepas evaluadas, el pH descendió a 6 hasta el último día de evaluación (Tabla 11). En cuanto al comportamiento de las cepas con respecto al crecimiento del halo de inhibición se observa en la Figura 28 que comenzó en el segundo día de evaluación y se detiene en el día 16, manteniéndose estable hasta el día 30. Entre las dos bacterias evaluadas, se puede observar que *Azotobacter spp.* fue la que presentó mayor capacidad para solubilizar fosfato comparado con Actinomicetos.

#### **5. 4. 3 Producción de Ácido Indol Acético (AIA)**

La capacidad de *Azotobacter spp.* y Actinomicetos para producir esta auxina fue evaluada mediante una prueba de carácter cualitativo y luego mediante una de carácter cuantitativo para todas las cepas. En el caso de *Azotobacter* de las 62 cepas evaluadas, el 56,5% (36) fueron positivas en la prueba cualitativa (Figura 11). Esta prueba se realizó a los 6 días de haber sembrado las cepas de *Azotobacter spp.* en caldo tripticasa soya (TSB) suplementado con L-triptófano. Por otro lado, para la prueba cuantitativa se realizaron mediciones al 3<sup>ro</sup>, 6<sup>to</sup>, 10<sup>mo</sup> y 15<sup>vo</sup> día de crecimiento de las cepas tomando en cuenta aquellas que fueron positivas para la prueba cualitativa y con resultados representativos con respecto a las pruebas anteriores (Tabla 13) (Figura 13).

Como se puede observar en la Figura 29, la cepa A3-57/08 produjo una mayor concentración de ácido indol acético (AIA) llegando hasta 588,6 µg/ml en el día

10 de evaluación, seguida por la cepa A3-34/08 con 323,6  $\mu\text{g/ml}$  y la cepa A3-31/08 con 173,1  $\mu\text{g/ml}$  de AIA ambas en el día 15 de evaluación. La producción de la mayoría de las cepas en este último día, varía entre 7,6  $\mu\text{g/ml}$  y 100,7  $\mu\text{g/ml}$  de AIA. Además, el comportamiento de las cepas en cuanto a la producción de AIA es variado, por ejemplo, la máxima producción de la cepa A3-57/08 se manifiesta al 10<sup>mo</sup> día de crecimiento, mientras que la cepa A3-36/08 presenta su máxima producción en el día 6, con 120  $\mu\text{g/ml}$ , el cual desciende notablemente hasta el día 15. Por otro lado, las cepas A3-04/08, A3-31/08 y A3-34/08 presentan un comportamiento similar, es decir, aumentan su producción de AIA llegando al día 15.

Por otro lado, de las 45 cepas evaluadas de Actinomicetos, 22 fueron positivas, representando el 48,8% de todas las cepas (Figura 12). La prueba cuantitativa se realizó para todas las cepas positivas en la prueba cualitativa y a su vez que presentaron resultados representativos en las pruebas PGPR anteriores. La cepa A1-36/08 fue la que produjo la mayor concentración de AIA con 51,78  $\mu\text{g/ml}$ , seguida de la cepa A1-39/08 con 39,93  $\mu\text{g/ml}$ , y por último la cepa A1-45/08 con 27,84  $\mu\text{g/ml}$  de AIA. La producción de las demás cepas varía de 6,91  $\mu\text{g/ml}$  a 16,63  $\mu\text{g/ml}$  de AIA (Tabla 14). Por otro lado, según la Figura 30, el comportamiento de la mayoría de las cepas en los 15 días de evaluación es bastante similar, comenzando por una mínima producción hasta el 8<sup>vo</sup> día de evaluación elevándose hasta el día 15, siendo el comportamiento de la cepa A1-36/08, el más resaltante.

#### **5. 4. 4 Producción de metabolitos volátiles**

Luego de dos semanas de incubación las placas conteniendo plántulas de lechuga y las bacterias, fueron evaluadas tomando en cuenta el número de plantas germinadas, no germinadas, atrofiadas y finalmente el peso seco de todas las plántulas por placa, así como del control sin bacteria. Según la Figura 31, los metabolitos secundarios producidos por las cepas de *Azotobacter* y las

condiciones dadas en el ensayo tuvieron un efecto negativo sobre las plántulas de lechuga, con un peso fresco inferior al del control sin bacteria.

Por otro lado, en el caso de Actinomicetos, se observaron diferencias entre el peso fresco de las plántulas control y las que crecieron con bacteria, como en el caso de la cepa A1-19/08, la cual llegó a tener 35% más del peso fresco del control (Figura 32). De forma general se podría decir que las bacterias del género *Azotobacter* spp. tuvieron un efecto negativo sobre el crecimiento de las plántulas de lechuga mientras que los metabolitos volátiles producidos por Actinomicetos tuvieron un efecto positivo en el crecimiento de esta planta.

#### **5.4.5 Producción de sideróforos**

Esta prueba se realizó tanto para Actinomicetos como para *Azotobacter* bajo las mismas condiciones. Luego de dos semanas de incubación todas las cepas evaluadas crecieron en el medio señalado anteriormente, sin embargo, ninguna formó el halo anaranjado característico que evidencia la presencia de sideróforos. Por lo tanto esta prueba es negativa para todas las cepas evaluadas de ambos tipos de microorganismos (Figura 15).

#### **5.5 Caracterización fisiológica y bioquímica de bacterias**

Luego de evaluar todos los aislamientos tanto de Actinomicetos como de *Azotobacter* spp. se consideró aquellas cepas que tienen mejor capacidad para producir ácido indol acético (AIA), solubilizar fosfato, e inhibir el crecimiento de hongos patógenos de la papa (*Solanum tuberosum*) como *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani*. De modo que de los 62 aislamientos de *Azotobacter* spp., y de los 45 aislamientos de Actinomicetos se escogieron 20 cepas respectivamente, las cuales fueron identificadas tetativamente mediante pruebas fisiológicas y bioquímicas, para ser empleadas luego en los ensayos de invernadero.

### 5.5.1 Caracterización fisiológica

En la primera prueba fisiológica, se probó la capacidad de crecimiento de las cepas *Azotobacter* spp. y de Actinomicetos a diferente pH. En la Figura 33 se puede observar el crecimiento de las cepas seleccionadas de *Azotobacter* a diferentes pH en 192 h (8 días). La Figura 33A muestra que el 65% de las cepas evaluadas crecieron a pH 4 entre el 90% y 100% con respecto al control a pH 7, a su vez indica que todas las cepas llegaron a crecer como mínimo 50% del tamaño del control. Por otro lado, la Figura 33B indica que a diferencia del crecimiento a pH 4, el 75% de las cepas evaluadas a pH 5,5 llegó a desarrollarse al máximo con respecto al control. Cabe recalcar que todas las cepas, incluyendo el control crecieron a 28 °C (Tabla 15).

Paralelamente, se probó la capacidad del crecimiento de *Azotobacter* spp. a diferentes temperaturas: 4, 10, 15 y 20° C (Figura 34). De las 20 cepas evaluadas, a 4° C, el 35% llegó a crecer menos del 50% del tamaño del control a 28° C, y el 20% no presentó crecimiento (Figura 34A). A 10 °C, de las 20 cepas seleccionadas, solo el 5% no creció, y el resto llegó tener como mínimo el 50% del tamaño del control (Figura 34B). A 15 °C todas las cepas evaluadas crecieron, donde el 37% llegó a tener del 50% al 80% del tamaño del control y el 21% llegó a crecer tanto como el control (Figura 34C). Finalmente a 20° C, el 50% de las cepas evaluadas se desarrollaron totalmente. Observándose una efectividad en el crecimiento de *Azotobacter* a medida que la temperatura se acerca a los 28° C. Esta prueba fue evaluada durante 360h (15 días) (Tabla 16).

Se probó también la capacidad de crecimiento de Actinomicetos a diferente pH, sembrando las bacterias en Agar Nutritivo a 28 °C. Como se observa en la Tabla 17, a pH 4 solo 10 de las 20 cepas probadas lograron crecer representando el 50% de las cepas evaluadas, mientras que a pH 5,5 y 7,0 todas las cepas evaluadas se desarrollaron. En la Figura 35 se observa que el 30% de las cepas llegó tener menos del 50% del tamaño del control y el 20% creció tanto como éste.

Por otro lado, en cuanto a la capacidad de las cepas aisladas de Actinomicetos para adaptarse en diferentes temperaturas, ninguna creció a 4 °C, a diferencia de los resultados obtenidos en las demás temperaturas evaluadas, donde todas las cepas mostraron crecimiento. A 10 °C, el crecimiento comenzó a partir de las 144 h, en el cual el 65% de las cepas llegó a crecer sólo hasta el 50% del tamaño del control a 28 °C (Figura 36A). A 15° C, se observa como el crecimiento de la mayoría de las cepas evaluadas llega hasta el 80% del tamaño del control (Figura 36B), y por último a 20° C se observa que un 30% de las cepas evaluadas lograron crecer tanto como el control (Figura 36C). La evaluación se realizó durante 360 h (15 días) (Tabla 17, 18).

### **5. 5. 2 Pruebas diferenciales de *Azotobacter* y Actinomicetos**

Se realizaron pruebas de caracterización bioquímica y fenotípica de cada microorganismo. Todas las pruebas para la identificación de las cepas de *Azotobacter* spp. y Actinomicetos fueron las más representativas tomadas del Manual de Bergey (1986, 2005), estas pruebas fueron realizadas para todas las cepas seleccionadas luego de haber realizado las pruebas PGPR.

En *Azotobacter* spp. la formación de quistes en condiciones específicas, es determinante para diferenciar este género de otras especies con características similares como *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, y *Azomonas*. De las 20 cepas evaluadas solo la cepa A3-23/08 no produjo quistes. Así mismo se realizó una prueba para determinar la motilidad de las cepas, pues ésta se presenta de manera arbitraria entre las especies del género, teniendo como resultado que la mayoría de las cepas presentó motilidad en distintas intensidades lo que se denominó variable. Otros resultados considerados variables según Bergey (2005) son las pruebas de oxidasa y catalasa, los cuales no fueron determinantes en la identificación de *Azotobacter*, sin embargo fueron realizadas a manera de orientación. Además se realizaron también pruebas para evidenciar la producción de pigmentos, pero los resultados no fueron determinantes, ya que sólo algunas de las cepas

evaluadas lograron producirlos y con mínima intensidad. En cuanto a la prueba de utilización de carbohidratos como fuente de carbono, se utilizaron sólo algunos que establecían la mayor diferencia entre las especies, sin embargo muchos de estos también son considerados variables en el Manual de Bergey (2005).

En la Tabla 19 se observan las características bioquímicas de todas las cepas seleccionadas, de las cuales 13 presentan características que indican que se podría tratar de *Azotobacter chroococcum* lo que representa el 65%. Estas cepas son: A3-04/08, A3-07/08, A3-09/08, A3-11/08, A3-18/08, A3-22/08, A3-23/08, A3-33/08, A3-34/08, A3-35/08, A3-39/08, A3-42/08, A3-48/08. Esta determinación se manifiesta sobre todo por la semejanza en los resultados obtenidos en las pruebas de utilización de azúcares, la ausencia de pigmentos, y la motilidad de las cepas.

Las cepas A3-13/08, A3-16/08 y A3-58/08 han sido consideradas como *Azotobacter vinelandii*; en cuanto a la primera, al igual que *A. vinelandii*, se evidenció la presencia de pigmento verde en el medio apropiado en el que se sembró al igual que la cepa A3-16/08, además de la utilización de la mayoría de azúcares probados. De otro lado, la cepa A3-58/08 se diferencia de *A. vinelandii* solo por la ausencia de pigmentos, sin embargo utiliza los mismos azúcares. Las cepas A3-26/08 y A3-62/08 fueron consideradas como *Azotobacter armeniacus* debido a la utilización de azúcares y la motilidad entre esta especie y las cepas comparadas. Las cepas A3-31/08 y A3-32/08 fueron consideradas como *Azotobacter beijerinckii* puesto que esta especie carece de movimiento al igual que las cepas señaladas, además de la semejanza en cuanto a la utilización de azúcares como fuente de carbono de *A. beijerinckii* (Figura 14).

Para la identificación tentativa de Actinomicetos (Tabla 20), se realizaron en su mayoría, pruebas morfológicas, también se consideró la producción de pigmentos, la antibiosis frente a *Bacillus subtilis* y la utilización de ciertos

carbohidratos como fuente de carbono. Estas pruebas fueron realizadas para las 20 cepas aisladas. Se determinaron tentativamente las especies de cada cepa las cuales fueron caracterizadas previamente dando como resultado el género *Streptomyces*. Las cepas A1-03/08, A1-16/08, A1-21/08, A1-25/08, A1-30/08 y A1-38/08 fueron consideradas como *S. griseoloalbus* debido a sus características morfológicas de la colonia como el color de las esporas y del micelio base así como la producción de pigmentos difusibles. Las cepas A1-05/08 y A1-19/08 fueron consideradas como *S. violaceusniger*, las cepas A1-14/08 y A1-37/08 como *S. olivaceoviridis*, las cepas A1-31/08 y A1-32/08 como *S. violaceus*, la cepa A1-06/08 como *S. aureofaciens*, la cepa A1-33/08 como *S. albus*, la cepa A1-34/08 como *S. griseoflavus*, la cepa A1-36/08 como *S. rochei*, la cepa A1-39/08 como *S. albidoflavus*, la cepa A1-42/08 como *S. filipinensis*, y finalmente la cepa A1-45/08 como *S. lavendulae*.

El elevado número de especies identificadas se debe a que las colonias del género *Streptomyces* poseen una gran variabilidad en cuanto al color de sus esporas y del micelio de la base (Figura 16, 17). En las Tablas 21 y 22 se observa la identificación bioquímica de cada cepa seleccionada y evaluada así como sus propiedades PGPR.

## **5.6 Recuento poblacional durante ensayos en Invernadero**

Durante el ensayo de invernadero se realizó un seguimiento de las poblaciones de dos tratamientos *in vitro* al azar tanto para *Azotobacter spp.* como para Actinomicetos en cual se demostró el comportamiento de cada tipo de microorganismo tanto en sustrato estéril como en sustrato no estéril.

Las cepas de *Azotobacter* evaluadas durante las 10 semanas que duró el ensayo fueron: A3-13/08 y A3-16/08, éstas fueron comparadas con un control sin bacteria. En el tratamiento con sustrato estéril, se puede observar la población del control y de la cepa A3-13/08 en la segunda semana de  $10^5$  ufc/g, sin embargo luego de dos semanas, población del control desciende, mientras que la población de la cepa A3-13/08 aumenta manteniéndose en  $10^5$  ufc/g

hasta el final del ensayo. Otro es el caso de la cepa A3-16/08, que en la segunda semana registró una población de  $10^6$  ufc/g, la cual desciende en la 8<sup>va</sup> semana a  $10^5$  ufc/g y al finalizar el ensayo a la 10<sup>ma</sup> semana tiene una población de  $10^4$  ufc/g.

En cuanto al comportamiento de las cepas evaluadas de *Azotobacter* spp. en sustrato no estéril, la población inicial del control fue de  $10^4$  ufc/g, que aumenta a  $10^5$  ufc/g en la 4<sup>ta</sup> semana, luego para la 6<sup>ta</sup> y 8<sup>va</sup> semana desciende a  $10^4$  ufc/g y finalmente para la 10<sup>ma</sup> semana desciende hasta  $10^3$  ufc/g. Mientras que la población de la cepa A3-13/08 en la segunda semana es de  $10^5$  ufc/g, la cual desciende apenas en la 4<sup>ta</sup> semana manteniéndose hasta el final del ensayo a la 10<sup>ma</sup> semana. Por otro lado, la cepa A3-16/08 comienza el ensayo con una población de  $10^5$  ufc/g, la cual se mantiene hasta la 4<sup>ta</sup> semana, y desciende a  $10^4$  ufc/g hasta el final del ensayo.

Para evaluar comportamiento de las poblaciones de Actinomicetos en el ensayo de invernadero también se tomaron dos tratamientos al azar de todas las cepas evaluadas, que fueron: A1-06/08 y A1-03/08, los cuales, comparadas con el control sin tratamiento tuvieron una mayor población. La población del control es bastante reducida dentro de las  $10^5$  ufc/g, mientras que la población en la cepa A1-03/08 aumenta en la 6<sup>ta</sup> semana y disminuye en al 10<sup>ma</sup> semana manteniéndose en  $10^5$ . Por otro lado la cepa A1-06/08 comienza el ensayo con una población reducida que aumenta en la 6<sup>ta</sup> semana y se mantiene hasta el final del ensayo en  $10^5$  ufc/g.

En cuanto al análisis poblacional de Actinomicetos en sustrato no estéril, el control sin tratamiento tiene una población mayor que la encontrada en el tratamiento estéril, a su vez presenta una población menor que las cepas evaluadas, es decir, la cepa A1-03/08 comienza el ensayo con una población de  $10^5$  ufc/g y aumenta en la 4<sup>ta</sup> semana hasta  $10^6$  ufc/g, la cual vuelve a descender en la 6<sup>ta</sup> semana a  $10^5$  ufc/g, la que se mantiene hasta el final del ensayo, este comportamiento se observa también en la cepa A1-06/08.

## 5.7 Ensayos de invernadero

El ensayo a nivel de invernadero se realizó durante 11 semanas, desde el mes de noviembre del 2008 a enero del 2009. Se realizaron dos ensayos paralelamente para probar diferentes efectos y su influencia sobre el cultivo de papa (*S. tuberosum*).

### 5.7.1 Experimento 1

En este experimento se probaron 17 cepas de *Azotobacter* spp. y Actinomicetos respectivamente, el criterio para la elección de las cepas fueron los resultados obtenidos en las pruebas de promoción del crecimiento vegetal, es decir la capacidad antagónica contra por lo menos uno de los dos hongos probados, producción de ácido indol acético (AIA), así como la capacidad de solubilizar fosfato; fue necesario que las cepas seleccionadas tuvieran resultados positivos en por lo menos dos de las pruebas de promoción de crecimiento vegetal (PGPR), ya que el objetivo fue probar el efecto de las bacterias sobre el desarrollo de las plantas de papa.

Luego de 11 semanas de permanecer en macetas, las plantas fueron cosechadas. El análisis estadístico se realizó para todos los parámetros evaluados, sin embargo se escogieron solo 9 de ellos, los cuales fueron más representativos: el número de tubérculos (NT), peso seco de tubérculos (PST), % materia seca de tubérculo (%MST), % materia seca de raíz (%MSR), peso seco de la planta (PSP), % materia seca de la planta (%MSP), área foliar total (AFT), peso específico de hojas (PEH) e índice de cosecha (IC).

Las Tablas 23 y 24, señalan los resultados del análisis estadístico realizado para las cepas de *Azotobacter* spp. y Actinomicetos respectivamente. Dichas tablas presentan los promedios de las cuatro repeticiones por cada tratamiento y los grupos de significancia. Cada tratamiento fue comparado con el control y entre sí.

Los análisis estadístico señalan que los tratamientos de *Azotobacter* spp. probados en el ensayo, lograron superar al control. La cepa A3-34/08 fue la que presentó un mayor incremento en cuanto a la producción de tubérculo, es decir, produjo tres veces más tubérculos que el control, así como cuatro veces más el peso seco del mismo y por consecuencia según los observado en el Figura 37, el índice de cosecha también fue superior al del tratamiento control en un 100%. Sin embargo el tratamiento que produjo un menor número de tubérculos fue A3-23/08 y el que obtuvo menor peso seco de tubérculo fue la A3-19/08 que la relaciona con el índice de cosecha que también fue el de menor valor a comparación del resto de tratamientos.

En cuanto al porcentaje de materia seca de raíz, el tratamiento A3-18/08 presentó diferencias significativas comparadas al control, aumentando su valor en 25%, mientras que entre el resto de tratamientos, el A3-23 tuvo el porcentaje de materia seca más alto, sin embargo no hubo diferencias significativas entre los demás tratamientos. En cuanto al peso seco de las plantas, los valores del control fueron muy diferentes al de las plantas inoculadas, sin embargo no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, el peso seco de planta para cada tratamiento superó entre 66% y 120% al del control, lo que se puede observar en la Figura 39, donde se compara el peso seco de la planta con el peso seco del tubérculo. De esta figura se desprende entonces que el tratamiento A3-32/08 presentó mayor peso seco de planta mas no un mayor peso seco de tubérculo, el cual fue producido por el tratamiento A3-34/08, como se indica líneas arriba.

En cuanto al área foliar total, solo los tratamientos A3-07/08, A3-09/08, A3-18/08, A3-30/08 y A3-35/08, presentaron diferencias significativas con el control, superando el área de éste entre 120% y 270% (tratamientos A3-18/08 y A3-35/08 respectivamente). Por último, en cuanto al peso específico de las hojas, solo las cepas A3-07/08, A3-11/08, A3-18/08, A3-22/08, A3-26/08, A3-35/08 y A3-57/08 presentaron diferencias significativas con respecto al control, superando su valor en hasta 86% (tratamiento A3-11/09) mientras que el resto

no presentó diferencias entre sí. En la Figura 43 se puede observar que el tratamiento que aumentó el área foliar total de la planta fue A3-35/08, mientras que el A3-11/08 tuvo un mayor efecto sobre el peso específico de la hoja.

La Figura 45 muestra la comparación entre el porcentaje de materia seca tanto de tubérculos, planta y raíz, donde se observa que el efecto de los tratamientos ocasionaron un aumento relativo de los tres parámetros con respecto al control, sin embargo fue en porcentaje de materia seca de raíz donde se observó un mayor efecto de los tratamientos.

Por su parte, los tratamientos de actinomicetos fueron evaluados considerando los mismos parámetros (Tabla 24), de los cuales se obtuvo que solo los tratamientos A1-01/08, A1-05/08, A1-19/05, A1-21/08, A1-33/08, A1-37/08, A1-38/08 y A1-42/08 mostraron diferencias significativas con respecto al control en cuanto al número de tubérculos, siendo la cepa A1-33/08 la que presentó mayor cantidad de tubérculos en la cosecha, cuadruplicando la producción del control. En cuanto al peso seco del tubérculo, las cepas A1-01/08 y A1-14/08 superaron un promedio de 4 veces el peso de éste, mientras que las cepas A1-05/08, A1-32/08 y A1-39/08 mostraron un incremento de 3 veces el peso seco de tubérculo del control y el resto de tratamientos solo duplicó su tamaño. En la Figura 40 se observa que el tratamiento A1-38/08 presentó el mayor peso seco de tubérculos mientras que el tratamiento A1-21/08 mostró el menor valor entre todos los parámetros evaluados. En cuanto al porcentaje de materia seca de tubérculo, el tratamiento A1-14/08 presentó una diferencia significativa con respecto al control superándolo en un 27%, por otro lado los tratamientos A1-01/08, A1-05/08, A1-16/08, A1-21/0, A1-25/08, A1-32/08, A1-37/08 y A1-39/08 no presentan diferencias significativas entre sí, siendo la cepa A1-37/08 la que presentó el mayor porcentaje de materia seca de tubérculo, y comparado con el control, supera su valor en un 22%.

Por otro lado, para el porcentaje de materia seca de raíz, solo el tratamiento A1-37/08 presentó diferencias significativas con respecto al control, superándolo en un 100%, sin embargo el resto de tratamientos no mostraron

diferencias significativas, aunque entre ellos, el tratamiento que presentó mayor porcentaje de materia seca de raíz luego del tratamiento A1-37/08 fue el A1-19/08. En el porcentaje de materia seca de la planta, el tratamiento que presentó mayor diferencia significativa comparada con el control fue también el tratamiento A1-37/08, pues superó su valor en un 14%. Por otro lado, los tratamientos A1-01/08, A1-05/08, A1-14/08, A1-25/08, A1-32/08 y A1-33/08, presentaron a su vez diferencias significativas frente el control, superando el porcentaje de materia seca de la planta producido en un promedio del 9,5%, siendo el tratamiento A1-14/08 el que obtuvo el mayor porcentaje. La comparación entre el porcentaje de materia seca de las tres partes significativas de la planta de papa (*S. tuberosum*) se evidencia en la Figura 46, donde se observa que de todos los tratamientos, el A1-37/08 presentó un mayor porcentaje de materia seca de raíz, sin embargo para los demás tratamientos la proporción del desarrollo del tubérculo, raíz y planta se mantiene, siendo en todos, el porcentaje de materia seca de raíz, el que presenta mayor valor en todos los tratamientos.

En cuanto al peso seco de la planta, solo las cepas A1-31/08 y A1-39/08 presentaron valores significativamente diferentes comparados con el control, diferenciándose de éste en 70 y 100% respectivamente, mientras que en el resto de tratamientos relacionados entre sí no se observaron diferencias significativas, teniendo un valor promedio que supera al del control en 80%.

Por otro lado, en el área foliar total, se observa que el tratamiento A1-42/08 presentó el menor valor comparado con el resto de tratamientos entre si e incluso con el control. Mientras que los tratamientos A1-05/08, A1-14/08, A1-16/08, A1-19/08, A1-21/08, A1-25/08, A1-30/08, A1-31/08, A1-34/08, A1-36/08 y A1-39/08 no presentaron diferencias significativas con respecto al control ni entre ellos. Sin embargo el tratamiento A1-32/08 superó el área foliar de este último en un 100%.

En cuanto al peso específico de hojas, se encontraron 3 grupos significativamente diferentes al control, a excepción de los tratamientos A1-01/08, A1-05/08, A1-14/08, A1-19/08, A1-21/08, A1-36/08 y A1-38/08 los cuales no presentaron diferencias significativas ni comparados con el control, ni entre ellos mismos (Figura 44). Y por último, en cuanto al índice de cosecha, los tratamientos A1-16/08, A1-21/08, A1-25/08, A1-30/08, A1-31/08, A1-33/08, A1-36/08, A1-37/08, A1-39/08 y A1-42/08, no presentaron diferencias significativas respecto al control sin tratamiento y a los demás tratamientos, mientras que A1-14/08 y A1-38/08 presentaron los valores mas altos de índice de cosecha entre todos los tratamientos, duplicando el valor del control (Figura 40).

### **5.7.2 Experimento 2**

Para este experimento se utilizaron tres cepas aisladas tanto de *Azotobacter* spp. (A3-13/08, A3-16/08 y A3-39/08) como de Actinomicetos (A1-03/08, A1-06/08 y A1-45/08), denominadas tratamientos. Las cepas fueron escogidas por sus óptimos resultados en las pruebas de promoción del crecimiento vegetal (PGPR), es decir capacidad de solubilizar fosfato, producción de ácido indol acético y antagonismo.

Para este experimento se tuvieron en cuenta tres factores, que son: el tipo de suelo, el tipo de semilla y el tratamiento (cepa) utilizado, así como las interacciones entre cada uno de ellos comparados con el control y entre sí.

Luego de permanecer en macetas por 11 semanas, las plantas fueron cosechadas. De todas las variables dependientes consideradas, se tomaron en cuenta las consideradas en el Experimento 1. En el caso de Actinomicetos, el tipo de semilla tuvo un efecto significativo, sobre los otros factores considerados pues se observó una mayor producción de tubérculos en las semillas *in vitro*, lo cual fue generado por el tratamiento A1-03/08, sin embargo el tipo de suelo para este parámetro resulta indiferente pues no tuvo resultados estadísticamente significativos sobre el número de tubérculos. De igual forma,

la producción de tubérculos para el caso de *Azotobacter* fue superior en las semillas *in vitro* que las semillas-tubérculo, éste aumento de la producción de tubérculos fue generado por el tratamiento A3-13/08, el cual fue superior tanto sobre el control como entre los demás tratamientos, mientras que el tratamiento A3-39/08 generó la menor cantidad de tubérculos incluso menor que el control. En cuanto al peso seco de tubérculos, el factor que influyó notablemente sobre el tratamiento de actinomicetos utilizado, fue el tipo de semilla, pues el tratamiento A1-03/08 presentó un incremento del peso seco de tubérculos cuando se utilizaron semillas tipo tubérculo creciendo en suelo no estéril. Por otro lado, en el caso de *Azotobacter*, la interacción entre el tratamiento utilizado y el tipo de suelo fue estadísticamente significativa, siendo la cepa A3-16/08 la que obtuvo un mayor peso seco del tubérculo en suelo no estéril y a partir de semillas tipo tubérculo, a pesar que este factor no fue significativo para este parámetro.

Por su parte, el porcentaje de materia seca del tubérculo, en actinomicetos fue influenciado por cada factor de manera diferente, pues todos, incluyendo las interacciones de estos, fueron estadísticamente significativos, sin embargo, la cepa A1-45/08 mostró mayor porcentaje de materia seca del tubérculo en las semillas *in vitro*, en suelo no estéril. Por el contrario, en el caso de *Azotobacter*, el tipo de semilla no fue estadísticamente significativa sobre el porcentaje de materia del tubérculo, sin embargo, el tratamiento A3-13/08 mostró mejores resultados en semillas-tubérculo, en suelo no estéril.

El peso seco de las plantas, en actinomicetos, fue mayor en el tratamiento A1-03/08 a partir de semillas tubérculo en suelo no estéril, el cual presentó un aumento de aproximadamente el 100% del peso seco del control bajo las mismas condiciones; para las interacciones del resto de factores entre si no se encontraron diferencias significativas. Para el caso de *Azotobacter*, el análisis estadístico mostró que el tratamiento y el tipo de semilla utilizado fueron factores estadísticamente significativos, es así que el tratamiento A3-16/08 mostró el mayor peso seco de la planta a partir de semillas tubérculo y suelo no

estéril, sin embargo, este último factor no fue significativo en el análisis estadístico sobre el resultado.

### **5.8. Resultados PGPR – Invernadero**

El Experimento 1 revela directamente el efecto de las cepas tanto de actinomicetos como de *Azotobacter* sobre la planta de papa (*S. tuberosum*), a partir de lo cual se pudieron determinar las cinco mejores cepas de cada tipo de bacteria considerando los resultados de las pruebas de promoción del crecimiento vegetal PGPR y adaptabilidad.

En la Tabla 25, se observan las cinco mejores cepas de *Azotobacter* spp., considerando su desempeño en el invernadero: A3-18/08, A3-32/08, A3-34/08, A3-35/08 y A3-57/08, de las cuales tres fueron identificadas como *Azotobacter chroococcum*. Por otro lado, la Tabla 26, señala las cinco mejores cepas de Actinomicetos considerando también sus resultados de invernadero: A1-33/08, A1-37/08, A1-38/08, A1-39/08 y A1-42/08, todas pertenecientes al género *Streptomyces*.

## VI. DISCUSIÓN

En la primera parte de la presente investigación se lograron obtener una gran cantidad de aislamientos tanto de *Azotobacter* como de Actinomicetos provenientes de la rizósfera de *S. tuberosum*. Persello *et al.* (2003) y Tsavkelova *et al.* (2006) indican que los exudados de las raíces de las plantas atraen por quimiotaxis a bacterias como *Azotobacter* o *Pseudomonas*, estableciendo de esta forma, una relación estrecha no simbiótica de colonización, característica importante de la promoción de crecimiento vegetal directo, mientras que por su parte, Persello *et al.* (2003) y Franco (2008) señalan que los actinomicetos, con énfasis en el género *Streptomyces* poseen otro tipo de relación con las plantas, por medio de su producción de antibióticos así como ciertos metabolitos secundarios razón por la cual son considerados promotores del crecimiento vegetal indirecto.

La capacidad promotora del crecimiento vegetal (PGPR) fue evaluada *in vitro* mediante diversas pruebas fundamentales para determinar microorganismos del suelo con estas propiedades como lo realizan Husen (2003), Joseph *et al.* (2007) en sus investigaciones.

La primera de las pruebas realizadas fue la del antagonismo contra fitopatógenos del suelo. En cuanto a la capacidad de actinomicetos para inhibir el crecimiento del hongo *Fusarium solani*, en el presente trabajo se encontró que de las 45 cepas probadas, 22 fueron antagonistas contra este hongo, lo que representa el 48% de las cepas, mientras que en el trabajo de Ikeda *et al.* (2000), se probó la capacidad antagonista de diversas cepas del género *Streptomyces* contra el hongo *Fusarium* y solo el 27% de las cepas evaluadas fueron positivas. Esto podría deberse a que la cantidad de cepas de *Streptomyces* evaluadas por Ikeda *et al.* (2000) superaba las 4000. Por otro lado las zonas de inhibición obtenidas en el trabajo de Ikeda *et al.* (2000) son equivalentes al promedio de los porcentajes de inhibición resultantes en el presente trabajo, es decir, una zona de inhibición promedio de 1,0 cm,

equivaldría a un porcentaje de inhibición de 25 a 30%, que representan el promedio de los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Por otro lado, en cuanto a la capacidad antagonista de actinomicetos contra *Rhizoctonia solani*, los porcentajes de inhibición obtenidos son congruentes con las zonas de inhibición presentadas por Rothrock & Gottlieb (1981), donde las bacterias del género *Streptomyces*, dieron como resultados medidas de 1 cm a 1,5 cm entre la bacteria y el hongo patógeno sembrados en la misma placa (zona de inhibición), lo que es equivalente al porcentaje más alto presentado en este trabajo que fue alrededor de 72%. Sin embargo, pese a estos resultados, según los trabajos de Ulacio *et al.* (2002) y García *et al.* (2002), el microorganismo antagonista por excelencia contra *Rhizocotonia solani* es *Trichoderma harzianum*, del cual se fabrican productos comerciales.

Por su parte, los resultados obtenidos con respecto a la capacidad antagónica de *Azotobacter* spp. contra el hongo *Fusarium solani* revelan que el mayor porcentaje de inhibición obtenido fue de 48%, en contraste con las investigaciones de Cavaglieri *et al.* (2005), donde se encontraron porcentajes de inhibición de hasta 100% por parte *Azotobacter armeniacus* contra *Fusarium verticillioides*.

Para el caso de la capacidad antagónica de *Azotobacter* spp. contra *Rhizoctonia solani*, sólo un tercio de las muestras positivas inhibieron el crecimiento de este hongo, por el contrario, en este ensayo se encontraron porcentajes de inhibición más altos (62,4%) comparados con los encontrados para *Fusarium solani*, lo que se asemeja a los resultados encontrados en investigaciones como la de Fatima *et al.* (2009), en la cual, las cepas aisladas de *Azotobacter* spp. presentaron un porcentaje de inhibición de 55 a 99%, inhibiendo casi completamente el crecimiento de *Rhizoctonia solani*.

La capacidad que poseen algunas bacterias habitantes de la rizósfera para solubilizar fosfato, les permite ser consideradas como bacterias promotoras del crecimiento vegetal, especialmente aquellas que se encuentran en suelos con grandes cantidades de fosfato precipitado, es decir, no disponible para las plantas. Al evaluar esta característica en las cepas de *Azotobacter* spp. cerca del 50% mostró la capacidad de solubilizar fosfato, lo que favorece la absorción de este nutriente, aumentando el crecimiento de las plantas así como el posible empleo de estas bacterias en la agricultura demostrado en los trabajos de Reyes *et al.* (2006), Kumar *et al.* (2000) y Mrkovacki & Milic (2001), quienes señalan que diversos cultivos como el de tomate o trigo, inoculados con *Azotobacter chroococcum* en suelos con bajas concentraciones de fosfato disponibles, tuvieron un efecto benéfico que los cultivos no inoculados, sin embargo Mrkovacki & Milic (2001) afirman también que se lograría un mayor efecto de absorción del fósforo por las plantas, si *Azotobacter* spp. actuara en compañía del hongo *Glomus fascilatum*.

Por su parte, la capacidad de las bacterias del grupo Actinomicetos de solubilizar fosfato en este trabajo se observa que es deficiente comparada con la de *Azotobacter*, pues solo la décima parte de las 45 cepas evaluadas de actinomicetos mostraron esta capacidad, presentando halos de inhibición de menor tamaño. Franco (2008), señala que si bien obtuvo un porcentaje considerable de cepas de actinomicetos capaces de solubilizar fosfato, éstas no tuvieron el rendimiento deseado, comparado con el de las bacterias del género *Azotobacter* spp. el cual fue utilizado como control positivo en dicho estudio. Lo cual no indica que las cepas que resultaron positivas no sean capaces de solubilizar el fósforo pues las bacterias que no formaron halos en un medio lo pueden hacer en otro, o hasta ser evaluados en caldo de solubilización (Chatli *et al.*, 2008).

Además de las pruebas de solubilización de fosfato en medio sólido, se realizó una prueba en la que se evaluó la producción de ácidos como mecanismo de solubilización midiendo el pH del medio progresivamente, esta prueba se

realizó para todas las cepas que produjeron halos de solubilización, tanto para actinomicetos como para *Azotobacter*. En el caso de actinomicetos, todas las cepas evaluadas disminuyeron el pH neutro del medio hasta un promedio de pH 5,5 independientemente del área del halo de solubilización producida por la bacteria, indicando de esta forma que el mecanismo de las cepas de actinomicetos evaluadas es el de la formación ácidos para lograr la solubilización del fósforo, pues el ácido actúa como agente quelante para el calcio, aumentando la disponibilidad del fósforo (Nautiyal, 1999; Sylvia, 2005). El mismo resultado se obtuvo para las cepas positivas evaluadas de *Azotobacter* spp, lo que se asemeja a las investigaciones realizadas por Chatli *et al.* (2008), donde se evaluó en el mismo medio empleado en el presente trabajo (NBRIP) tanto en agar como en caldo, midiendo también el pH de éste último, donde finalmente se llegó a un pH promedio de 5 a 6. Sin embargo, Franco (2008), realizando también la prueba de acidez en cepas de actinomicetos solubilizadoras de fosfato, obtuvo un 30% incapaces de producir ácidos, es decir el pH del medio que utilizó no presentó ningún cambio, indicando que podrían existir otros mecanismos para lograr dicha solubilización.

Según Tsavkelova *et al.* (2006), los más eficientes productores de auxinas son las bacterias habitantes de la rizósfera de las plantas. El Ácido Indol Acético (AIA) producido por las bacterias representa una capacidad PGPR importante ya que beneficia a la planta contribuyendo con el crecimiento radicular, pues esta auxina es capaz de promover la formación de raíces laterales y adventicias, sin embargo el efecto de ésta sobre la planta depende de su concentración y el tipo de cultivo en el que éste se evalúe. Existen investigaciones donde se reporta a las bacterias del género *Azotobacter* como productoras de ácido indol acético (AIA), una de las auxinas más estudiadas hasta el momento (Tsavkelova *et al.*, 2006; Mrkovacki & Milic, 2001; Ahmad *et al.*, 2005; García & Herraiz, 1987).

A partir de estas investigaciones, en el presente trabajo se evaluaron a las 62 cepas de *Azotobacter* aisladas previamente, dando como resultado un 56% de cepas positivas para la producción de ácido indol acético, es decir, un valor menor al esperado. Posteriormente, se realizó la cuantificación del AIA producido por cada cepa positiva, en el que se obtuvieron resultados en cuatro tiempos continuos, es decir al 3<sup>er</sup>, 6<sup>to</sup>, 10<sup>mo</sup> y 15<sup>vo</sup> día; los resultados obtenidos en el 6<sup>to</sup> día, es decir en la fase estacionaria del cultivo de *Azotobacter*, son congruentes con los datos reportados en el trabajo de Brown & Walter (1970) en el que obtuvieron resultados de hasta 50µg/ml de AIA en el mismo tiempo de incubación, a excepción de la cepa A3-39/08, la cual produjo un exceso de AIA de 120µg/ml, sin embargo estos investigadores aseguran que fue el máximo tiempo y producción de ácido indol acético (AIA) que encontraron. Pese a dicha afirmación, se realizaron mediciones hasta el día 15, las cuales coinciden con las reportadas en el trabajo de Ahmad *et al.* (2005) en el que obtuvo resultados entre 7 y 28,9µg/ml de AIA, en el mismo día de evaluación. Sin embargo, 4 de las cepas de *Azotobacter* evaluadas mostraron resultados elevados no registrados anteriormente y que van de 100 a 588,6 µg/ml entre el día 10 y el día 15 de evaluación. Lo que lleva a pensar que la cantidad de AIA producido por estas bacterias, podría tener un efecto negativo en el desarrollo de las raíces vegetales, pues tal como señalaron Persello *et al.* (2003), las plantas no poseen un sistema regulador que mantenga los niveles fisiológicamente apropiados de ácido indol acético en sus tejidos, por lo tanto, una cantidad abundante de AIA producida por la bacteria, podría inhibir la síntesis de otras sustancias pertenecientes a ruta de síntesis de AIA que sigue la planta, lo que generaría un efecto inhibitor en el desarrollo de esta.

Por otro lado, al evaluar las 45 cepas de Actinomicetos previamente aisladas, se obtuvo como resultado que el 48% de éstas fueron positivas. En el presente trabajo se evaluó la producción de ácido indol acético (AIA) de actinomicetos en el 4<sup>to</sup>, 8<sup>vo</sup>, 10<sup>mo</sup> y 15<sup>vo</sup> día de incubación. Sin embargo, en la investigación realizada por Franco (2008), las mediciones son realizadas en el día 8<sup>vo</sup>, 9<sup>no</sup>, 10<sup>mo</sup> y 11<sup>vo</sup>, es por ello que solo se compraron los resultados obtenidos en el

8<sup>vo</sup> día de evaluación, el cual coincide parcialmente con los presentados en este trabajo, es decir, la producción de ácido indol acético, varía entre 0,99 µg/ml y 13,1 µg/ml de AIA, con excepción de la cepa A1-36/08, la cual obtuvo 15 µg/ml de AIA, producción que se fue incrementando hasta el día 15, llegando a 51,8 µg/ml. La producción promedio de ácido indol acético presentada en el presente trabajo hacia el último día de evaluación (8 µg/ml – 10 µg/ml) coincide también con las investigaciones realizadas por Manulis *et al.* (1994). Así mismo, los altos valores registrados en algunas de las cepas como A1-19/08, A1-36/08 y A1-39/08, podría deberse según Manulis *et al.* (1994) y Silva (2008), a otros productos derivados del indol, pues para la síntesis del ácido indol acético (AIA), participan más de una ruta metabólica, como la ruta Indol-3-acetamida, Indol-3-etanol, ácido Indol-3-láctico, Indol-3-acetaldehído, siendo la primera, la más común entre los microorganismos y plantas.

A su vez Manulis *et al.* (1994) señalan que algunos *Streptomyces* patógenos podrían producir dicha auxina, sin embargo, esta producción no determina del todo la patogenicidad del streptomiceto pues, existen otros factores que lo hacen perjudicial para la planta de papa (*S. tuberosum*). Sin embargo, la capacidad de promover el crecimiento vegetal por parte de los *Streptomyces* es determinante en comparación a la producción de ácido indol acético (AIA) de las especies patógenas de este género, además, esta producción podría hasta optimizar las interacciones microbiana con la planta hospedera (Manulis *et al.*, 1994).

Los ensayos en las pruebas de producción de sideróforos tanto en actinomicetos como en *Azotobacter*, resultaron negativos en este trabajo, sin embargo existen investigaciones como las de Knosp *et al.* (1984) y Page & Shivprasad (1995) que señalan que las especies de *Azotobacter vinelandii* y *Azotobacter salinestris*, producen compuestos como la azotobactina y la azotochelina, los cuales ejercen la función de unirse al Fe.

Por otro lado para el caso de actinomicetos, Franco (2008) encontró la presencia de sideróforos en las cepas de actinomicetos evaluadas, sin embargo estos tuvieron un rendimiento mínimo con respecto al control.

Estos resultados obtenidos podrían llevar a pensar que el método utilizado, que fue el mismo tanto para Actinomicetos como para *Azotobacter*, no fue el conveniente, puesto que en los trabajos antes citados la metodología fue distinta obteniendo resultados positivos, es decir para ambos microorganismos se utilizaron medios líquidos para determinar la presencia de sideróforos. Sin embargo, para el caso de *Azotobacter*, solo se tienen reportes de producción de estos compuestos quelantes en dos especies (*A. vinelandii* y *A. salinestrus*), una de las cuales no ha sido identificada bioquímicamente en el presente trabajo.

La producción de metabolitos volátiles por parte de *Azotobacter*, fue probada en semillas de lechuga, pero tuvo un efecto negativo sobre las mismas puesto que al comparar el peso fresco de las semillas emergentes, éste fue inferior al del control. Pese a que investigaciones previas como la de Ryu *et al.* (2003) demuestran que bacterias como *Pseudomonas*, cercanas taxonómicamente a *Azotobacter*, tuvieron un efecto benéfico sobre semillas de *Arabidopsis thaliana*, así como la capacidad de inhibir el crecimiento de *Rhizoctonia* por el mismo método de cultivo, promoviendo de esta forma su crecimiento. Esto se podría deber a que el efecto benéfico sobre el crecimiento de las plantas por parte de las PGPR depende de la especie de rizobacteria utilizada y la planta sobre la cual se da el efecto. Por otro lado, para el caso de actinomicetos, se observó un efecto benéfico sobre las semillas de lechuga por parte de una sola cepa, que fue la A1-19/08, presentando un 35% más de peso fresco de semilla germinada comparado con el control, además esta cepa tuvo resultados óptimos en las otras pruebas PGPR realizadas anteriormente. Por su parte, los trabajos de Ryu *et al.* (2003) y Vespermann *et al.* (2007), señalan que la producción de metabolitos volátiles podría ser considerado un mecanismo promotor del crecimiento vegetal, es por ello que sería recomendable realizar una investigación más profunda sobre el tipo de metabolitos excretados por actinomicetos y los beneficios que tienen éstos sobre las plantas.

En cuanto a los ensayos de invernadero, en el Experimento 1, los tratamientos de *Azotobacter* spp. tuvieron en general un efecto positivo sobre el cultivo de papa (*S. tuberosum*), lo que se puede observar en cada variable considerada, pues los resultados presentaron diferencias significativas con respecto al control, sin embargo no todos los tratamientos estimularon de manera similar cada parámetro utilizado.

El área específica de la hoja que relaciona el área de la hoja con su peso seco, ha sido empleada durante muchos años por diversos autores para comparar el espesor y/o la densidad de las hojas, es por eso que este índice está influenciado en primer lugar, por la especie de planta, luego el ambiente (disponibilidad de nutrientes, luz y humedad del suelo), así como cambios en la capacidad fotosintética. La variabilidad del área específica de las hojas entre los diferentes tipos dentro de una misma especie de planta puede estar relacionada a la diferente capacidad fotosintética que existe entre hojas jóvenes y adultas o las especies demandantes de luz. Normalmente las hojas juveniles poseen áreas específicas de hoja más altas que las adultas, es por eso que es una de las variables que afectan el crecimiento de la planta, pues está relacionada con la eficiencia fotosintética, es decir, cuanto mayor sea, mayor será la producción de sustancias de reserva como el almidón, lo que favorece el rendimiento de los cultivos como en el caso de la papa, pues se produciría mayor cantidad de tubérculos (Steinbauer, 2000; Wei-xing & Tibitts, 1996). Sin embargo, Landsberg (1990) uso la inversa del área específica de las hojas, nombrado como peso específico de la hoja, como un indicador de la dureza, grosor y/o densidad de ésta, posteriormente Choong *et al.* (1992) mencionaron que la dureza de la hoja estaba relacionada con la materia seca, específicamente, esta dureza exhibía una correlación significativamente negativa con el área específica de las hojas, es decir, que si bien el peso específico de las hojas es la inversa del área específica, este índice por si mismo es un buen indicador del grosor y densidad de las hojas, que puede evidenciar tanto su capacidad fotosintética como la resistencia de éstas a factores ambientales.

En la Figura 37, se compara los resultados del peso específico de las hojas y el índice de cosecha de cada tratamiento, por lo que se puede observar que no necesariamente el tratamiento que produjo un mayor índice de cosecha, mostró un mayor grosor en la hojas (A1-34/08), o viceversa. Pese a que un peso específico de hojas alto signifique una mayor producción y almacén de sustancias en la planta. Por otro lado, al comparar en la Figura 42, el número y peso seco de tubérculos, así como el índice de cosecha, se puede observar que en el tratamiento A1-34/08 se presentan los valores más altos comparados tanto con el control como con el resto de tratamientos, lo que podría evidenciar que esta cepa de *Azotobacter* spp. favorece la producción de tubérculos en papa, esta capacidad de *Azotobacter* spp. ha sido reportada anteriormente en el trabajo de Imam & Badway (1978).

Por su parte, en la Figura 43 se puede observar que una mayor área foliar total no esta relacionada totalmente con el espesor de las hojas, como en el tratamiento A3-35/08, el cual presentó una mayor área foliar comparada con la del control sin embargo las hojas de esta planta resultaron ser más delgadas. En el resto de tratamientos se observa que el grosor de las hojas es superior al área foliar total, es decir que la mayoría de cepas inoculadas de *Azotobacter* promueve la formación de hojas gruesas y capaces de almacenar mayor cantidad de nutrientes, favoreciendo el desarrollo total de la planta.

Por ultimo, en la Figura 45, se puede apreciar que en todas las plantas inoculadas hubo un aumento del porcentaje de la materia seca del tubérculo que muestra en sí la producción neta de nutrientes que genera la planta de papa, siendo el tratamiento A3-18/08 el que produjo un efecto mayor en la planta sobre su capacidad de absorber nutrientes, puesto que a mayor formación de raíces mayor absorción de sustancias nutritivas y beneficiosas para la planta.

Por otro lado, en cuanto al efecto de Actinomicetos sobre el cultivo de papa (*S. tuberosum*) en este primer ensayo, se observa en la Figura 38, que la inoculación de estas bacterias en las plantas, produjo un engrosamiento de las

hojas, es decir un elevado peso específico, lo cual favorece al almacenamiento de nutrientes y sustancias de reserva como el almidón debido a su relación con la capacidad fotosintética. Sin embargo el índice de cosecha, que indica la parte aprovechable comercialmente de la planta (tubérculo), no fue alto en las condiciones en el que se desarrollo el experimento, lo que se evidencia también en la Figura 40, donde se observa un mayor peso seco de planta de que tubérculo.

Así mismo en la Figura 46, se evidencia también la mayor producción de materia seca de raíz, sobre todo por el tratamiento A1-37/08 en actinomicetos, comparado con la materia seca de tubérculo y planta. Estas últimas no presentan mucha diferencia entre si. Este incremento de materia seca de raíz favorece la capacidad de la planta par absorber nutrientes e incrementar su crecimiento, es decir, evidencia la capacidad promotora del crecimiento vegetal en Actinomicetos y *Azotobacter* spp.

Por otro lado, si se compara el efecto de ambos tipos de microorganismos en el ensayo realizado, las Tablas 23 y 24, señalan que la mayor diferencia entre ellos es la producción del número de tubérculos, pues el promedio de tubérculos producidos por actinomicetos varia entre 5 a 8 por planta, mientras que *Azotobacter* solo produjo entre 3 y 6 por planta, esto se podría deber a que los tratamientos de actinomicetos presentaron un peso específico de hojas mayor, lo que se traduce en hojas mas gruesas que aumentan la capacidad fotosintética y la asimilación de nutrientes.

Así mismo, teniendo en cuenta entonces las capacidades de *Azotobacter* y Actinomicetos tanto en las pruebas de promoción del crecimiento vegetal (PGPR) como su efecto sobre *S.tuberosum* en este primer ensayo de invernadero, sería recomendable futuras investigaciones en las que, considerando la capacidad productora de ácido indol acético (AIA) y solubilizadora de fosfato que posee *Azotobacter* así como la capacidad antagonica de Actinomicetos, se realice una interacción entre ambas bacterias

con el objetivo de elaborar productos comerciales agrícolas que promuevan el crecimiento de *S.tuberosum* y a su vez disminuyan la cantidad de fitopatógenos en el suelo de manera orgánica, complementando las practicas agrícolas cotidianas.

Los resultados estadísticos del Experimento 2 indican que la cepa empleada en cada tratamiento tuvo un efecto significativo en todos los parámetro considerados en la evaluación, esto podría deberse a que las bacterias empleadas para cada tratamiento tienen capacidad de colonización tanto en la superficie de las raíces (rizoplano) como en la rizosfera de las plantas de papa (Gholami *et al.*, 2009).

Actualmente, existen investigaciones que señalan la influencia de otros factores sobre la promoción del crecimiento vegetal por acción de las bacterias PGPR y actuando en conjunto con ellas, uno de estos factores es la condición del suelo en el que se desarrolla el cultivo, Gholami *et al.* (2009), probó el efecto de *Pseudomona putida*, una bacteria considerada PGPR, sobre el cultivo de maíz en suelo estéril y no estéril, obteniendo como resultado un mayor rendimiento del cultivo en suelo no estéril. Este resultado es similar al obtenido en el presente experimento. En cuanto a Actinomicetos, la tendencia que mostraron los parámetros analizados indicaron que las plantas desarrolladas en suelo no estéril fueron las más productivas en cuanto al peso seco del tubérculo, el peso seco de la planta y el índice de cosecha, sin embargo el tipo de suelo no fue estadísticamente significativo en los parámetros considerados, lo que impide afirmar rotundamente que el suelo no estéril influye de manera determinante sobre la producción de la planta con respecto al suelo estéril, en todo caso dependería de la bacteria y la relación que ésta tenga con los demás microorganismos de la rizosfera así como con la planta en sí.

Así mismo, Gholami *et al.* (2009) afirma también en sus investigaciones, que al inocular semillas de maíz con *Azospirillum brasilense*, tanto en suelo estéril y no estéril, tuvo un mayor rendimiento de la planta en el suelo estéril,

comparado con el control, lo cual se observa también en los resultados estadísticos de *Azotobacter*, donde, para los parámetros número y peso seco de tubérculos se obtuvieron mejores resultados en el suelo estéril, sin embargo, en la evaluación estadística de los parámetros, el tipo de suelo no fue significativo, es decir, no puede considerarse determinante en el efecto de la tratamiento sobre la planta.

Por otro lado, tanto para Actinomicetos como para *Azotobacter* en este segundo experimento, se observó un mayor rendimiento en los tratamientos inoculados en semillas-tubérculo, lo que se evidencia tanto en el parámetro peso seco del tubérculo como en el peso se seco de la planta, así mismo este factor fue considerado estadísticamente significativo en la evaluación de todos los parámetros considerados, esto se debe a que la semilla tubérculo tiene la capacidad de almacenar sustancias que permiten un mejor desarrollo de la planta, lo que al ser influenciado por la bacteria, se traduce en el mejor desarrollo de la planta, es decir la promoción del crecimiento vegetal, lo cual depende a su vez de factores ambientales, de la variedad de papa utilizada y del inculante bacteriano (Malagamba, 1997). Lo que sugiere que estas bacterias podrían ser empleadas más adelante en cultivos a gran escala en el campo, como un complemento de los productos químicos utilizados cotidianamente, con la finalidad de disminuir el deterioro de los suelos agrícolas y aumentar la producción del cultivo de papa (Adesemoye *et. al.*, 2009).

## VII. CONCLUSIONES

- Se concluye que es posible aislar gran cantidad de bacterias del género *Azotobacter* y del grupo Actinomiceto de la rizósfera de *Solanum tuberosum* Linnaeus, 1753 de las zonas altoandinas.
- *Azotobacter* tiene mayor capacidad antagónica frente a *Fusarium solani* que las bacterias del grupo Actinomicetos; sin embargo, estos inhibieron notablemente el crecimiento de *Rhizoctonia solani*.
- *Azotobacter* mostró mayor capacidad para producir ácido indol acético (AIA) y solubilizar fosfato, en cambio el resultado de Actinomicetos fue moderado con respecto a dichas capacidades.
- De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas de promoción del crecimiento (PGPR), las cepas aisladas de *Azotobacter* son capaces de promover el crecimiento vegetal de manera directa, debido a su mayor capacidad de producir sustancias que estimulan el crecimiento vegetal y los Actinomicetos son promotores del crecimiento vegetal indirectos, pues poseen mayor capacidad antagonista.
- La mayoría de cepas aisladas de *Azotobacter* pertenecen a la especie *A.chroococcum*, y todas las cepas aisladas del grupo Actinomicetos pertenecen al género *Streptomyces*.
- De acuerdo a los resultados de invernadero, la inoculación de *S.tuberosum* con cepas de *Azotobacter*, tuvo un efecto favorable sobre el crecimiento de la planta y la producción de tubérculos. Las cepas de Actinomicetos por su parte, mostraron su efecto sobre la promoción del crecimiento de *S. tuberosum* mediante incremento del número de tubérculos.

- La tendencia general tanto para Actinomicetos como para *Azotobacter* indica que el uso de semillas-tubérculo favorece el efecto promotor del crecimiento de dichas rizobacterias sobre *S. tuberosum* y su rendimiento.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adesemoye, A., Torbert, H. & Kloepper, J.W. 2009. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Allow Reduced Application Rates of Chemical Fertilizers. *Microbial Ecology* 57
- Ahmad, F., Ahmad, I. & Khan, M. 2005. Indole Acetic Acid Production by The Indigenous Isolates of *Azotobacter* and Fluorescent *Pseudomonas* in the Presence and Absence of Tryptophan. *Turkey Journal of Biology* 29: 29-34
- Ahmed, H., Labuschagne, N. & Korsten, L. 2007. Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* and crown root of sorghum in Ethiopia. *Biological control* 40: 97- 106
- Alexander, M. 1980. Introducción a la Microbiología del Suelo. AGT Editores, México. pp. 234-362
- Alonso, J. & Méndez, C. 2001. Mecanismos para incrementar el número de tubérculos. *Boletín de la papa – Vol. 3, No. 4.*
- Aly, M., El-Sabbagh, S., El-Shouny, W. & Ebrahin, M. 2003. Physiological Response of *Zea mays* to NaCl Stress with Respect to *Azotobacter chroococcum* and *Streptomyces niveus*. *Pakistan Journal of Biological Sciencies* 6: 2073-2080
- American Water Works Association (APHA). 1998. Standard Methods for examination of water and waste water. 20 ed. Washington DC
- Anguiz, R. & Martin, C. 1989. Anastomosis groups, pathogenicity, and characteristics of *Rhizoctonia solani* isolated from potatoes in Peru. *Plant Disease* 73: 199-201
- Arce, A. 2002. El cultivo de la patata. 2da Edición. Ed. Mundi-Prensa. España. pp. 41-69
- Atlas, R. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. 4º ed. Pearson Education SA. Madrid, España. pp. 429-430

- Barea, J. Azcón-Aguilar, C., & Azcón, R. 1997. Interactions between mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms within the context of sustainable soil-plant systems. In: Gange, A. & Brown, V. (ed.). Multitrophic interactions in terrestrial systems. Blackwell Science, Cambridge, England. , pp. 65–77
- Bashan, Y., Levanony, H. 1990. Current status of *Azospirillum* as a challenge of agriculture. Canadian Journal of Microbiology 36: 591-608
- Beijerinck, M. W. 1901. Uber Oligonitrophile Mikroben. Zbl. Bakt., Abt.7,561. En: Buchanan, R. E.1925. General Systematic Bacteriology. First edition. William & Wilkins. Co. pp. 194
- Bergey. 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Brenner, J. Ed. Springer. New York, USA. Vol 2
- Berthelin, J., Leyrol, C., Laheurte, F. & Degiudici, P. 1991. Some considerations on the relations between phosphate solubilizing rhizobacteria and their effect on seedling and plant growth related to phosphorus solubilization. In: "Growth Promoting Rhizobacteria: Progress and Prospects" (Keel, C., Koller, B. & Defago, G. Eds.). IOBC. Switzerland. pp. 359–364
- Boddey, R. & Döbereiner, J. 1995. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future. Fertilizer Research 42: 241 -250.
- Brown, E. & Walker, N. 1970. Indol-3-acetic acid formation by *Azotobacter chroococcurn*. Plant and Soil 32: 250-253.
- Brown, M. E., Burlingham, S. K. & Jackson, R. M. 1962. Studies on *Azotobacter* species in soil. II. Population of *Azotobacter* in the Rhizosphere and Effects on Artificial Inoculation. Plant and Soil. 28: p.320-332.
- Calderón, A. 1978. Enfermedades de la papa y su control. Ed. Hemisferio Sur. Argentina. pp. 143
- Calvo, P. 2008. Capacidad PGPR de Bacterias del genero *Bacillus* aisladas de la rizosfera del cultivo de Papa (*Solanum tuberosum*) en los andes del Peru. Tesis para optar el Titulo de Biólogo. Lima – Peru.

- Cavaglieri, L., Andrés, L., Ibañes, M. & Etcheverry, M. 2005. Rhizobacteria and their potential to control *Fusarium verticillioides*: effect of maize bacterization and inoculum density. *Antoine van Leeuwenhoek* 87: 179-187
- Cavaletti, L., Monciardini, P., Bamonte, P. & Schumann, P. 2006. New lineage of filamentous, spore-forming, gram-positive bacteria from soil. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 4360-4369
- Chatli, A., Beri, V. & Sidhu, B. 2008. Isolation and characterisation of phosphate solubilising microorganisms from the cold desert habitat of *Salix alba* Linn. in trans Himalayan region of Himachal Pradesh. *Indian Journal of Microbiology* 48: 267-273
- Choong, M. 1996. What makes a leaf tough and how this affects the pattern of *Castanopsis fissa* leaf consumption by caterpillars. *Functional Ecology* 10: 668-674.
- Cochran, W. 1950. Estimation of bacterial densities by means of the "Most Probable Number." *Biometrics* 6: 105-106.
- Corbaoui, R. 1988. Siembra de papa. Boletín de información técnica – Centro Internacional de la Papa (CIP). 2da Edición. Lima (Perú). pp.20
- Cronquist, A. 1988. Siembra de papa. Boletín de información técnica. Centro Internacional de la Papa (CIP). 2da Edición. Lima (Perú). pp. 17
- Cupull, M., Santana, R., Delgado, Y. & Rodríguez, A. 2003. Efecto de los biopreparados y micorriza en la estimulación de la germinación, el control de *Rhizoctonia solani* y el desarrollo de posturas de *Coffea arabica* L. *Centro Agrícola* 2: 9-13
- Cutter, E. 1978. Structure and development of the potato plant. In: *The potato crop*. Ed. Chapman and Hall, London. pp. 70-152
- Dashti, N., Zhang, F., Hynes, R. & Smith, D. 1997. Application of plant growth-promoting rhizobacteria to soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) increases protein and dry matter yield under short-season conditions. *Plant Soil* 188: 33-41

- De Freitas, J., Banerjee, M. & Germida, J. 1997. Phosphates solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus up take of canola (*Brasica napus* L.). *Biological Fertilizer Soils* 24: 358- 363
- Dhanasekaran, D., Sivamani, P., Panneerselvam, A., Thajuddin, N., Rajakumar, G. & Selvamani, S. 2005. Biological Control of Tomato Seedling Damping off with *Streptomyces* sp. *Plant Pathology Journal* 4: 91-95
- Dibut, B. 1988. Efecto de la aplicación de biofertilizantes a base de *A. chroococcum* sobre el cultivo de la cebolla. Tesis para optar por el Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, La Habana, 101 pp.
- Domínguez, A. 1989. Abonado de hortalizas aprovechadas por sus frutos. Madrid. Ministerio de la Agricultura Pesca y Alimentación. pp. 16
- Ezziyyani, M., Pérez, C., Requena, M., Ahmed, A. & Candela, M. 2004. Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. *Anales de Biología* 26: 61-68
- Fankhauser, C. 1997. Pérdida en el rendimiento debido a la presencia de *Rhizoctonia solani* o *Streptomyces scabies*, daño por gusano blanco en tubérculo semilla. Proyecto 4.3: Control de calidad. EESC, Quito – Ecuador. pp. 13
- Fatima, Z., Saleemi, M., Zia, M., Sultan, T., Asiam, M., Rehman, R. & Chaudhary, M. 2009. Antifungal activity of plant growth-promoting rhizobacteria isolates against *Rhizoctonia solani* in wheat. *African Journal of Biotechnology* 8: 219-225
- Fernández, C. 1988. Vida microbiana en el suelo. Ed. Pueblo y Educación. Habana, Cuba. pp. 306-331
- Food and drug Administration. 2001. *Bacteriological Analytical Manual*. Capítulo 14.
- Foster, R.C. 1998. Microenvironments of soil microorganisms. *Biology and Fertility of Soils* 6: 189 – 203

- Franco, M. 2008. Evaluación de caracteres PGPR en Actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis para optar el Grado de Doctor. Universidad de Granada. Facultad de Ciencias. Granada, España.
- García, F. & Herraiz, T. 1987. Production of 3-indoleacetic acid and 3-indolelactic acid in *Azotobacter vinelandii* cultures supplemented with tryptophan. *Applied Microbiology and Biotechnology* 25: 502-506
- García, R., García, A. & Garnica, C. 2002. Distribución, Incidencia y Alternativas de Control de *Rhizoctonia solani* en el Cultivo de Papa en el Estado Mérida, Venezuela. *Revista Latinoamericana de la Papa* 13: 24-40
- Ghanem, N., Sabry, S., El-sherif, Z. & El-Ela, A. 2000. Isolation and Enumeration of marine Actinomicetes from seawater and sediments in Alexandria. *Applied and Environmental Microbiology* 46: 105-111.
- Gholami, A., Shahsavani, S. & Nezarat, S. 2009. The effect of Plant Growth Promotion Rhizobacteria (PGPR) on Germination Seedling Growth and Yield of Maize. *International Journal of Biological and Life Science* 1:35-39
- Giaconi, M. & Escaff, M. 1993. Cultivo de hortalizas. Santiago de Chile. Editorial Universitaria. pp. 328
- Gilbert, G.S., Parke, J.L., Clayton, M.K. & Handelsman, J. 1993. Effects of an introduced bacterium on bacterial communities on roots. *Ecology* 74, 840-854.
- Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 41: 109-117.
- Glick, B. R., Karaturovic, D. M., & Newell, P. C. 1995. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting *Pseudomonads*. *Canadian Journal of Microbiology* 41: 533–536
- Gordon, S. & Weber, R. 1950. Colorimetric estimation of Indole Acetic Acid. *Plant Physiology* 26: 192-195

- Gupta, A. Gopal, K. & Tikal, R. 2000. Mechanism of plant growth promotion by rhizobacteria. *Indian Journal Experimental Biology* 38: 856-862
- Health Protection Agency (HPA). 2004. Identification of *Bacillus* species. National Standard Method. England
- Hooker, W. J. 1980. Compendio de Enfermedades de Papa. CIP. Lima, Perú. pp. 2 – 7
- Husen, E. 2003. Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities *in vitro*. *Indonesian Journal of Agricultural Science* 4: 27-31
- Ikeda, K., Saito, H., Sato, S. & Kodama, T. 2000. Growth-inhibition effect of *Streptomyces* sp. 39L40C to mulberry twig blight pathogen, *Fusarium lateritium* f. sp. *mori*. *The journal of Sericultural Science of Japan* 69: 163-168
- Imam, M. & Badawy F. 1978. Response of three potato cultivars to inoculation with *Azotobacter*. *Potato Research* 21: 1-8
- J.R. Jonson supply. Ultima visita el 31 de marzo del 2009. [www.jrjohnson.com](http://www.jrjohnson.com)
- Joseph, B., Ranjar, R. & Lawrence, R. 2007. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Plant Production* 2: 141-151
- Jurkevitch, E., Hadar, Y. & Chen, Y. 1992. Differential Siderophore Utilization and Iron Uptake by Soil and Rhizosphere Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 119-124.
- Kennedy, C., Rudnick, P., Mc Donald, M., & Melton, T. 1901. Genus III. *Azotobacter* Beijerinck., 567AL. En: Bergey. 2005. *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. Brenner, J. Ed. Springer. New-York, USA. pp. 384 –402
- Khalid, A. & Arshad, M. 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*. 96: 473-480.

- Kloepper J. W., Lifshitz, R. & Zablotowitz, R. M. 1989. Free living bacteria inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology* 7:39-43
- Kloepper, J. W. 1994. Plant growth promoting rhizobacteria (other system). En: *Azospirillum/* plant association (Okon, Y. Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. pp 135-166
- Kloepper, J. W., Hume, D. J., Scher, F. M., Singleton, C., Tipping, B., Lalibert, E. M., Fraulay, K., Kutchaw, T., Simonson, C., Lifshitz, R., Zaleska, I. & Lee, L. 1987. Plant growth-promoting rhizobacteria on canola (rapeseed). *Phytopathology* 71: 42–46
- Knosp, O., Von Tigerstrom, M. & Page, W. 1984. Siderophore – Mediated Uptake of Iron in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* 159: 341-347
- Kumar, V., Aggarwal, N. & Singh, B. 2000. Performance and Persistence of Phosphate Solubilizing *Azotobacter chroococcum* in wheat rhizosphere. *Folia Microbiology* 45: 343-347
- Kumar, V., Rishi, R. & Narula, N. 2001. Establishment of phosphate solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under green house conditions. *Microbiology Research* 156:87-93
- 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. *Applied Biochemistry and Microbiology* 45: 400-404.
- Lacey, J. 1973. Actinomycetes in soils, compost and fodders in Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance, G Sykes, FA Skinner (Eds) Academic Press, London. pp. 231-251
- Landsberg J. 1990. Dieback of rural eucalypts: the effect of stress on the nutritional quality of foliage. *Australian Journal of Ecology* 15: 97-107.
- Leiva, S., Yañez, M., Zaror, L., Rodríguez, H. & García, H. 2004. Actividad Antimicrobiana de actinomycetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. *Revista médica de Chile* 132: 151-159

- Lindemann, R., Moore, L., Baker, F. & Cooksey, D. 1983. Strategies for detecting and characterizing systems for biological control of soilborne plant pathogens. *Plant Disease* 67: 1058-1064
- Liu, L., Kloepper, J. W. & Tuzun, S. 1995. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 85:695–698
- Locci, R. 1986. *Streptomyces* and Related Genera. En: *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. Holt, J.G. Ed. Springer, New-York. pp. 2451 – 2492.
- Lynch, J.M. 1990. *The rhizosphere*. Willey –Interscience, Chichester, England. pp. 55-66
- Mahmoud, S. Ramadan, E., Thabet, F. & Khater, T. 1984. Production of plant growth promoting substances by rhizosphere microorganisms. *Zlb. Mikrobiologiya* 139: 227-232
- Maier, A., Riedlinger, J., Fiedler, H. & Hampp, R. 2004. Actinomycetales bacteria from a spruce stand: characterization and effects on growth of root symbiotic and plant parasitic soil fungi dual culture. *Mycological Progress* 3: 129-136
- Malagamba, P. 1997. Fisiología y manejo de tubérculos-semillas de papa. *Centro Internacional de la Papa*. 2.2: 1-15
- Manrique, K. 2001. Nociones del manejo post-cosecha. *Centro Internacional de la Papa (CIP)* 2: 1-15
- Manulis, S., Shafrir, H., Epstein, E., Lichter, A. & Barash I. 1994. Biosíntesis of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in *Streptomyces* spp. *Microbiology* 140: 1045-1050
- Martínez, R., Dibut, B., Casanova, I. & Ortega, M. 1997. Acción estimuladora de *Azotobacter chroococcum* sobre el cultivo del tomate en suelos Ferralítico Rojo. I. Efecto sobre los semilleros. *Agrotecnia de Cuba*. 27(1): 23-26

- Maurhofer, M., Reimann, C., Sacherer, S. P., Heebes, S., Haas, D. & Defago, G. 1998. Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against necrosis virus. *Phytopathology* 88: 678–684
- Ministerio de Agricultura. 2003. Plan Estratégico de la Cadena de la Papa. OGPA – DGPA. Última visita enero del 2009. [www.minag.gob.pe](http://www.minag.gob.pe)
- Ministerio de Agricultura. 2006. Rentabilidad. Boletín del Estudio de Rentabilidad. La Papa: de los andes para el mundo. Edición Especial. Nro 7
- Mordukhova, E., Skvortsova, V., Kochetkov, A., Dubeikovski, A. & Boronin., A. 1991. Synthesis of the phytohormone indole -3-acetic acid by rhizosphere bacteria of the genus *Pseudomonas*. *Mikrobiologiya* 0: 494-500.
- Moura, A. & Romeiro, R. 1999. Avaliação in vitro do potencial antagônico de actinomicetos contra *Ralstonia solanacearum*, agente causal da murcha bacteriana do tomateiro. *Ciência e Prática* 23:281 – 288
- Mrkovacki, N. & Milic, V. 2001. Use of *Azotobacter chroococcum* as potentially useful in agricultural application. *Annals of Microbiology* 51: 145-158
- Müller, G. & Raymond, K. 1984. Specificity and Mechanism of Ferroxinamine-Mediated Iron Transport in *Streptomyces pilosus*. *Journal of Bacteriology* 160: 304-312
- Nahas, E. 1996. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 12:567-572
- Nautiyal, C. S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate-solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170: 265 – 270.

- Neiland, J. 1995. Siderophores: Structure and function of a microbial iron transport compounds. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 26723-26726
- Okon, Y., Lavandera, C. 1994. Agronomic Applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years world wide field inoculation. *Soil Biology & Biochemistry* 26: 1591- 1601
- Page, W. & Shivprasad, S. 1995. Iron binding to *Azotobacter salinestris* melanin, iron mobilization and uptake mediated by siderophores. *Biometals* 8: 59-64
- Patten, C. & Glick, B. 2002. Role of *Pseudomonas putida* Indol acetic acid in Development of the Host Plant Root System. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3795-3801
- Payne, S. 1994. Detection, Isolation and Characterization of Siderophores. *Methods in Enzimology* 235: 329-344.
- Persello, F., Nussaume, L. & Robaglia, C. 2003. Tales from the underground: molecular plant – rhizobacteria interactions. *Plant, Cell and Environment* 26: 189-199.
- Pierson, L. S. & Thomashow, L. S. 1992. Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic locus from *Pseudomonas aureofaciens*. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 5: 330–339
- Pridham, T. & Gottlieb, D. 1948. The utilization of carbon compounds by some Actinomycetales as an aid for species determination. *Journal of Bacteriology* 56: 107-114.
- R Project for Statistical Computing Version: 2.7.0.2008. R Development Core Team.
- Reyes, I., Valery, A. & Valduz Z. 2006. Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine. *Plant and soil* 287: 69-75
- Romero, A.M., Correa, O. S., Moccia, S. & Rivas, J. G. 2003. Effect of *Azospirillum* mediated plant growth promotion on the development of bacterial diseases on fresh-market and cherry tomato. *Journal of Applied Microbiology* 95: 832-838.

- Rothrock, C. & Gottlieb, D. 1981. Importance of antibiotics production and antagonism of selected *Streptomyces* species to two soil-borne plant pathogens. *The Journal of Antibiotics* 34: 830-835
- Ryu, Ch., Farag, M., Hu, Ch., Reddy, M., Wei, H., Paré, P. & Kloeppel, J. W. 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 4927 – 4932.
- Scher F. & Baker, R. 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* with pathogens. *Phytopathology* 72: 1570 – 1573
- Shirling, E. & Gottlieb, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 16: 331-340
- Silo-Suh, L., Lethbridge, B., Raffel, S., He, H., Clardy, J. & Handelsman, J. 1994. Biological-activities of 2 fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Applied Environmental Microbiology* 60: 2023–2030
- Stanley, Y. 1994. The Family Streptomycetaceae. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore USA: USA: Ed. Williams & Wilkins. pp. 2344-2347
- Steinbauer, M. 2000. Specific leaf weight as an indicator of juvenile leaf toughness in Tasmanian bluegum (*Eucalyptus globules* spp. *globulus*): implications for insect defoliation. *Australian Forestry* 34: 32-37.
- Sudhansu, S. 1998. Interactions of an acid tolerant strain of phosphate solubilizing bacteria with a few acid tolerant crops. *Plant and soil* 198: 169-177
- Sylvia, D. 2005. Principles and applications of soil microbiology. Second Edition. Pearson/Prentice Hall. New Jersey, USA. pp. 259 – 306
- Sylvia, D., Fuhrmann, J., Hartel, P. & Zuberer, D. 1999. Principles and Applications of Soil Microbiology. Prentice Hall, Inc. New Jersey USA. pp. 7-8

- Taechowisan, T., Lu, Ch., Shen, Y. & Lumyong, S. 2005. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc 130 and their antifungal activity. *Microbiology* 151: 1691-1695
- Tate, R. 2000. *Soil Microbiology*. Second Ed. Wiley, New York, USA. pp. 47-56
- TERRALIA. Revista agrícola general. Fitosanitarios, Nutricionales y Ecológicos. Última visita enero 2009. [www.terralia.com](http://www.terralia.com)
- Thomashow, L. & Weller, D. 1988. Role of phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *Tritici*. *Journal of Bacteriology* 170: 3499–3508
- Thomashow, L. & Weller, D. 1995. Concept in the use of introduced bacteria for biological disease control. In “Plant Microbes Interaction” (Stacey, G. & Keen, N. Eds.). Chapman & Hall, New York, USA. pp. 187–235
- Tien, T., Gaskins, M. & Hubbell, D. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Applied Environmental Microbiology* 37: 101-1024
- Tilak, K., Ranganayaki, N., Pal, R., Saxena, K., Nautiyal, S., Mittal, S., Tripathi, A. & Johri, B. 2005. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science* 89: 136-150
- Titus, A. & Pereira, G. 2007. The role of Actinomycetes in coffee plantation ecology. [www.ineedcoffe.com](http://www.ineedcoffe.com). Última visita marzo 2009.
- Tokala, K., Strap, C., Jung, D., Crawford, L., Salove, L., Deobald, F., Bailey, J. & Morra, J. 2002. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2161-2171
- Toro, M., Azcón, R., & Barea, J. 1997. Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (32P) and nutrient cycling. *Applied Environmental Microbiology* 63 : 4408–4412

- Torres, G. Valencia, A., Bernal, P., Castillo, M. & Nieto, 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*. pp. 177-175
- Torres, M., Valencia, S., Bernal, J. & Martinez, 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* 42: 171-176
- Tsavkelova, E., Yu, 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
- Ulacio, D., Salas, J., Querales, P. & Sanabria M. 2002. Microbiota del suelo de zonas productoras del papa del estado de Mérida y su relación con *Rhizoctonia solani*. *Bioagro* 14: 11-16
- Vancura, I. 1961. Detection of gibberellic acid in *Azotobacter* Cultures. *Nature*. 192. p. 89-90
- VERDERA. Biological Solutions. Última visita marzo 2009. [www.verdera.fi](http://www.verdera.fi)
- Vespermann, A., Kai, M., Picchulla, B. 2007. Rhizobacterial Volatiles Affect the Growth of Fungi and *Arabidopsis thaliana*. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5639 – 5641.
- Waksman, S. & Woodruff, B. 1942. Streptothricin, a new selective bacteriostatic and bactericidal agent, particularly active against gram-negative bacteria. *Biology Medical* 49: 207-210.
- Waksman, S. 1967. *The Actinomycetes*. The Ronald Press Company. New York, USA. pp 193-227.
- Wei-xing, C. & Tibbitts, W. 1997. Relationships of starch concentration with specific leaf weight and mineral concentration in potato leaves under varied CO<sub>2</sub> and temperature. *Acta Botanica Sinica* 39: 1118-1128
- Winogradsky, S. 1938. Sur la morphologie et l'écologie des *Azotobacter*. *Annales de l'Institut Pasteur* 60: 351 - 400

- Yadav, K. & Dadarwal, K. 1997. Phosphate solubilization and mobilization through soil microorganisms. In: Biotechnological Approches in Soil Microorganisms for Sustainable Crop Production. Dadarwal, K., Ed. pp. 293-308
- Zapater, J. 1975. Evaluación en el maíz del coeficiente rizósfera - suelo (R/S) referidos a bacterias libres fijadoras de N<sub>2</sub>. Anales científicos de la UNALM 13: 45-57

## **IX. TABLAS Y FIGURAS**

**Tabla 1. Localidad de muestreo y características.**

<b>Provincia</b>	<b>Localidad</b>	<b>Altura (msnm)</b>	<b>Variedad</b>	<b>Cultivo anterior</b>	<b>Agricultor</b>
Huancavelica	San Jose de Aymara	3950	Amarilla del Centro	Terrenos en descanso	Benavides Perez
	Mullaca	3420	Viuda	Terrenos en descanso	Varios
	Patala	4132	Peruanita, Amarilla del Centro	Terrenos en descanso	Cayo Hualpa Romero
Huancayo	La Victoria	3200	Yungay	Terrenos en descanso	Varios
	Marcavalle	3362	Amarilla del Centro	Terrenos en descanso	Varios
	Paccha	3400	Serranita	Terrenos en descanso	Varios
Huánuco	Huayllacan	3500	Tumbay	Terrenos en descanso	Varios
	Mision Punta	3450	Canchan	Terrenos en descanso	Varios
	Mataos	3200	Canchan	Terrenos en descanso	Varios
Cajamarca	Pampa de la Culebra	3020	Perricholi	Terrenos en descanso	Sebastian Lucano
	Puylucana	2800	Yungay	Terrenos en descanso	Andres Sanchez

**Tabla 2. Caracterización fisicoquímica de las muestras analizadas.**

Muestra	Provincia	Localidad	pH	CE (1:1) dS/m	CaCO <sub>3</sub> %	MO %	P ppm	K pmm	N %	Fe ppm	Clase Textural
M1	Huancavelica	San Jose de Aymara	4,06	1,07	0	9,5	52,1	520	0,58	351,6	Franco Arenoso
M2	Huancayo	Mullaca	7,46	0,92	19,5	3,1	62,0	341	0,17	29,6	Franco Arenoso
M3-M4	Huancayo	Patala	4,16	0,77	0	9,5	9,1	295	0,52	301,0	Franco Arenoso
M5	Huancayo	La Victoria	7,21	0,4	0	2,9	29,9	195	0,15	27,5	Franco Arenoso
M6	Huancayo	Marcavalle	7,41	0,79	0	6,3	49,1	365	0,36	289,0	Franco Limoso
M7	Huánuco	Paccha	4.98	0.28	0	3,4	43,7	459	0,26	-	Franco
M8	Huánuco	Huayllacan	4.47	0.32	0	4,7	35,6	356	0,39	-	Franco
M9	Huánuco	Mision Punta	4.71	0.33	0	6,6	59,0	304	0,45	-	Franco arenoso
M10	Huánuco	Mataos	5.11	0.17	0	3,1	49,8	296	0,21	11,5	Franco
M11	Cajamarca	Pampa de la Culebra	5,48	0,39	0	3,6	43,5	363	0,19	75,3	Franco
M12	Cajamarca	Puylucana	7,6	0,2	2,2	3,4	47,9	383	0,26	15,4	Franco

CE: Conductividad Eléctrica. MO: Materia orgánica

**Tabla 3. Densidad poblacional de *Azotobacter spp.*, Actinomicetos, Bacterias totales y Hongos, por zonas muestreadas**

Muestra	Provincia	Localidad	Zona de extraccion	Conteo Azotobacter (NMP/g)	Conteo Actinomicetos (ufc/g)	Bacterias totales (ufc/g)	Hongos Totales (ufc/g)
M1	Huancavelica	San Jose de Aymara	Rizósfera	5 046	$3,1 \times 10^6$	$10 \times 10^5$	$99 \times 10^3$
M2	Huancayo	Mullaca	Rizósfera	5 206	$3,3 \times 10^5$	$51 \times 10^6$	$11 \times 10^2$
M3	Huancayo	Patala	Rizósfera	5 407	$2,8 \times 10^4$	$59 \times 10^6$	$57 \times 10^3$
M4	Huancayo	Patala	Rizósfera	8 360	$3,0 \times 10^6$	$59 \times 10^6$	$57 \times 10^3$
M5	Huancayo	La Victoria	Rizósfera	10 802	$1,9 \times 10^4$	$59 \times 10^6$	$57 \times 10^3$
M6	Huancayo	Marcavalle	Rizósfera	2 696	0	$10 \times 10^7$	$99 \times 10^3$
M7	Huánuco	Paccha	Rizósfera	4 237	0	$37 \times 10^6$	$57 \times 10^3$
M8	Huánuco	Huayllacan	Rizósfera	4 297	0	$37 \times 10^6$	$56 \times 10^3$
M9	Huánuco	Mision Punta	Rizósfera	8 228	$2,7 \times 10^5$	$94 \times 10^6$	$89 \times 10^3$
M10	Huánuco	Mataos	Rizósfera	5 738	$4,7 \times 10^5$	$71 \times 10^6$	$51 \times 10^3$
M11	Cajamarca	Pampa de la Culebra	Rizósfera	5 921	$3,5 \times 10^6$	$75 \times 10^6$	$90 \times 10^3$
M12	Cajamarca	Puylucana	Rizósfera	1 289	$6,2 \times 10^5$	$79 \times 10^6$	$95 \times 10^3$

NMP/g: Número Más Probable por gramo de rizósfera

ufc/g: Unidades formadoras de colonia por gramo de rizósfera

**Tabla 4. Número de cepas de *Azotobacter spp.* y Actinomicetos aisladas de la rizósfera de papa.**

Muestra	Provincia	Localidad	Total de cepas por muestra	
			<i>Azotobacter</i>	Actinomicetos
M1	Huancavelica	San Jose de Aymara	7	5
M2	Huancayo	Mullaca	8	9
M3	Huancayo	Patala	7	5
M4	Huancayo	Patala	3	2
M5	Huancayo	La Victoria	5	4
M6	Huancayo	Marcavalle	4	0
M7	Huánuco	Paccha	9	4
M8	Huánuco	Huayllacan	5	0
M9	Huánuco	Mision Punta	3	1
M10	Huánuco	Mataos	2	12
M11	Cajamarca	Pampa de la Culebra	5	1
M12	Cajamarca	Puylucana	4	2
<b>Total</b>			<b>62</b>	<b>45</b>

**Tabla 5. Características de las cepas de *Azotobacter* spp. aisladas por zona muestreada.**

Código CIP	Provincia	Localidad	Descripción morfológica de colonia					Diámetro (mm)
			Forma	Borde	Elev.	Sup.	Color	
A3-01/08	orcent	Paccha	Circular	Entero	Convexa	Lisa	orcent/brill.	2,0
A3-02/08	orcent	Paccha	Circular	Irregular	Elevada	Lisa	Crema/opaco	1,5
A3-03/08	Huánuco	Paccha	Circular	Irregular	Elevada	Lisa	Crema/opaco	2,0
A3-04/08	Huánuco	Huayllacan	Circular	Irregular	Elevada	Lisa	Crema/opaco	1,0
A3-05/08	Huánuco	Huayllacan	Circular	Entero	Convexa	Lisa	orcent/brill.	1,0
A3-06/08	Huánuco	Paccha	Circular	Entero	Convexa	Lisa	orcent/brill.	1,5
A3-07/08	Huánuco	MP	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/brillante	1,5
A3-08/08	Huánuco	Paccha	Circular	Irregular	Elevada	Lisa	orcent/brill.	1,0
A3-09/08	Huánuco	MP	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/brillante	2,0
A3-10/08	Huánuco	Mataos	Circular	Entero	Convexa	Lisa	orcent/brill.	3,0
A3-11/08	Huánuco	MP	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/opaco	1,5
A3-12/08	Huancayo	Marcavalle	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Crema/brillante	2,0
A3-13/08	Huancavelica	SJA	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/brillante	6,0
A3-14/08	Huancavelica	SJA	Circular	Irregular	Convexa	Lisa	Crema/opaco	1,8
A3-15/08	Huancayo	La Victoria	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/opaco	0,5
A3-16/08	Huancavelica	SJA	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/brillante	7,0
A3-17/08	Huancayo	Marcavalle	Circular	Entero	Convexa	Lisa	orcent/brill.	1,5
A3-18/08	Huancavelica	Mullaca	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/brillante	3,5
A3-19/08	Huancavelica	SJA	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/brillante	7,0
A3-20/08	Huancayo	Patala	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/opaco	2,3
A3-21/08	Huancayo	Patala	Circular	Entero	Convexa	Lisa	orcent/brill.	5,5
A3-22/08	Huancavelica	SJA	Circular	Entero	Convexa	Lisa	orcent/brill.	4,0
A3-23/08	Huancayo	Patala	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/brillante	1,5
A3-24/08	Huancayo	Patala	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/brillante	1,5
A3-26/08	Huancavelica	Mullaca	Circular	Entero	Convexa	Lisa	orcent/brill.	3,0
A3-27/08	Huancayo	La Victoria	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/brillante	2,5
A3-28/08	Huancayo	Marcavalle	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/opaco	1,5
A3-29/08	Huancayo	Patala	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/brillante	3,0
A3-30/08	Huancayo	Patala	Circular	Irregular	Convexa	Lisa	Crema/opaco	1,2
A3-31/08	Huancayo	La Victoria	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/brillante	2,0
A3-32/08	Huancavelica	SJA	Circular	Entero	Convexa	Lisa	orcent/brill.	5,5
A3-33/08	Huancavelica	SJA	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/brillante	3,5
A3-34/08	Huancayo	Patala	Circular	Irregular	Convexa	Lisa	Crema/opaco	2,0
A3-35/08	Huancavelica	Mullaca	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Crema/brillante	1,5
A3-36/08	Huancavelica	Mullaca	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/opaco	3,0
A3-37/08	Huancayo	Patala	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/opaco	2,0
A3-38/08	Huancavelica	Mullaca	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/opaco	1,8
A3-39/08	Cajamarca	PC	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/opaco	1,8
A3-40/08	Huánuco	Huayllacan	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/brillante	2,0
A3-41/08	Cajamarca	PC	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/brillante	1,5
A3-42/08	Huánuco	Paccha	Circular	Irregular	Elevada	Lisa	Crema/opaco	1,8
A3-43/08	Cajamarca	Puylucana	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/opaco	1,5
A3-44/08	Cajamarca	Puylucana	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/opaco	1,0
A3-45/08	Cajamarca	Puylucana	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/opaco	2,0
A3-46/08	Cajamarca	Puylucana	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/opaco	1,5
A3-47/08	Cajamarca	PC	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/opaco	1,0
A3-48/08	Cajamarca	PC	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/opaco	1,0
A3-49/08	Huánuco	Huayllacan	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/brillante	1,5
A3-50/08	Huánuco	Paccha	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/opaco	2,0
A3-51/08	Huánuco	Paccha	Circular	Entero	Elevada	Lisa	orcent/brill.	2,0
A3-52/08	Huánuco	Huayllacan	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/opaco	2,5
A3-53/08	Huánuco	Paccha	Circular	Irregular	Elevada	Lisa	Crema/opaco	2,0
A3-54/08	Cajamarca	PC	Circular	Entero	Convexa	Lisa	orcent/brill.	1,5
A3-55/08	Huánuco	Mataos	Circular	Irregular	Convexa	Lisa	Crema/opaco	1,0
A3-56/08	Huancavelica	Mullaca	Circular	Entero	Concavo	Lisa	Crema/brillante	4,0
A3-57/08	Huancavelica	SJA	Irregular	Irregular	Plana	Lisa	Crema/opaco	3,0
A3-58/08	Huancavelica	Mullaca	Circular	Irregular	Concavo	Lisa	Crema/opaco	2,0
A3-59/08	Huancayo	Patala	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/brillante	2,5
A3-61/08	Huancayo	Patala	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/brillante	3,0
A3-62/08	Huancavelica	Mullaca	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Crema/brillante	2,4
A3-63/08	Huancayo	La Victoria	Circular	Irregular	Convexa	Lisa	Crema/brillante	2,4
A3-64/08	Huancayo	Marcavalle	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema/opaco	2,4

SJA: San José de Aymará. PC: Pampa de la Culebra. MP: Mision Punta. orcent/brill: Transparente/brillante

**Tabla 6. Características de Actinomicetos aislados por zona muestreada.**

Código CIP	Departamento	Localidad	Descripción morfológica de colonia			
			Micelio Aéreo	Color micelio aéreo	Color micelio base	Textura superficie
A1-01/08	Huancayo	Patala	+	Blanco	Marron	Suave
A1-02/08	Huancavelica	Mullaca	+	Amarillo	Amarillo	Suave
A1-03/08	Huancavelica	Mullaca	+	Blanco	Gris	Suave
A1-04/08	Huancayo	Patala	+	Amarillo	-	Suave
A1-05/08	Huancavelica	Mullaca	+	Gris	-	Arenoso
A1-06/08	Huancavelica	SJA	+	Gris	-	Suave
A1-07/08	Huancavelica	Mullaca	+	Gris	-	Arenoso
A1-08/08	Huancavelica	Mullaca	+	Blanco	Anaranjado	Suave
A1-09/08	Huancayo	La Victoria	+	Blanco	Azul	Suave
A1-10/08	Huancayo	Patala	+	Verde	Verde	Suave
A1-11/08	Huancayo	La Victoria	+	Blanco	Marron	Suave
A1-12/08	Huancavelica	SJA	+	Gris	-	Suave
A1-13/08	Huancayo	Patala	+	Amarillo	Marron	Suave
A1-14/08	Huancayo	La Victoria	+	Blanco	Gris	Arenoso
A1-15/08	Huancayo	Patala	+	Verde	Verde	Suave
A1-16/08	Huancavelica	SJA	+	Amarillo	Anaranjado	Suave
A1-17/08	Huancavelica	SJA	+	Blanco	-	Arenoso
A1-18/08	Huancayo	Patala	+	Verde	Verde	Suave
A1-19/08	Huancayo	La Victoria	+	Gris	-	Suave
A1-20/08	Huancavelica	Mullaca	+	Gris	-	Arenoso
A1-21/08	Huancavelica	Mullaca	+	Blanco	Anaranjado	Suave
A1-22/08	Huancayo	Patala	+	Amarillo	Marron	Rugosa
A1-23/08	Huancavelica	Mullaca	+	Blanco	Marron	Suave
A1-24/08	Huancavelica	SJA	+	Gris	-	Suave
A1-25/08	Huancavelica	Mullaca	+	Amarillo	Anaranjado	Suave
A1-26/08	Huánuco	Mataos	+	Blanco	-	Suave
A1-27/08	Huánuco	Mataos	+	Blanco	Marron	Suave
A1-28/08	Huánuco	Paccha	+	Verde	Verde	Rugosa
A1-29/08	Huánuco	Mataos	+	Amarillo	Anaranjado	Suave
A1-30/08	Huánuco	Paccha	+	Gris	Verde	Rugosa
A1-31/08	Huancavelica	SJA	+	Verde	Verde	Rugosa
A1-32/08	Huancavelica	SJA	+	Blanco	-	Rugosa
A1-33/08	Huancavelica	SJA	+	Blanco	Amarillo	Rugosa
A1-34/08	Huánuco	Paccha	+	Gris	-	Suave
A1-35/08	Huánuco	MP	+	Blanco	Anaranjado	Suave
A1-36/08	Huancavelica	SJA	+	Blanco	-	Suave
A1-37/08	Cajamarca	Puylucana	+	Blanco	-	Suave
A1-38/08	Cajamarca	Puylucana	+	Blanco	-	Arenoso
A1-39/08	Cajamarca	PC	+	Amarillo	Marron	Suave
A1-40/08	Huánuco	Mataos	+	Blanco	Marron	Suave
A1-41/08	Huancavelica	SJA	+	Amarillo	-	Arenoso
A1-42/08	Huánuco	Paccha	+	Gris	-	Suave
A1-43/08	Huánuco	Mataos	+	Amarillo	Marron	Suave
A1-44/08	Huánuco	Mataos	+	Blanco	Verde	Suave
A1-45/08	Huánuco	Mataos	+	Blanca	Verde	Suave

SJA: San José de Aymará. PC: Pampa de la Culebra. MP: Mision Punta. orcent/brill: Transparente/brillante

**Tabla 7. Porcentaje de actividad antagónica de cepas aisladas de *Azotobacter* spp. contra *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani***

Código CIP	Porcentaje de actividad antagónica (%)	
	<i>Fusarium solani</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
A3-01/08	0	62,4 ± 0,1
A3-02/08	0	0
A3-03/08	0	0
A3-04/08	0	0
A3-05/08	0	61,2 ± 0,1
A3-06/08	40 ± 0,0	0
A3-07/08	0	0
A3-08/08	48,0 ± 0,0	44,7 ± 0,1
A3-09/08	0	0
A3-10/08	0	0
A3-11/08	0	0
A3-12/08	0	0
A3-13/08	25,5 ± 0,1	37,6 ± 0,1
A3-14/08	0	0
A3-15/08	42,5 ± 0,1	0
A3-16/08	19,0 ± 0,1	41,2 ± 0,1
A3-17/08	0	0
A3-18/08	22,5 ± 0,1	0
A3-19/08	21,3 ± 0,1	0
A3-20/08	37,5 ± 0,1	0
A3-21/08	25,0 ± 0,1	32,4 ± 0,1
A3-22/08	30,3 ± 0,0	0
A3-23/08	31,5 ± 0,1	0
A3-24/08	36,5 ± 0,2	28,8 ± 0,1
A3-26/08	29,0 ± 0,1	0
A3-27/08	30,0 ± 0,0	0
A3-28/08	39,0 ± 0,1	0
A3-29/08	34,0 ± 0,1	0
A3-30/08	43,0 ± 0,0	0
A3-31/08	0	0
A3-32/08	21,5 ± 0,1	40,0 ± 0,1
A3-33/08	0	0
A3-34/08	0	0
A3-35/08	28,0 ± 0,0	0
A3-36/08	0	0
A3-37/08	0	0
A3-38/08	0	30,6 ± 0,1
A3-39/08	0	0
A3-40/08	0	0
A3-41/08	0	0
A3-42/08	33,0 ± 0,4	0
A3-43/08	0	0
A3-44/08	0	0
A3-45/08	0	0
A3-46/08	0	0
A3-47/08	0	0
A3-48/08	0	0
A3-49/08	0	0
A3-50/08	0	40,0 ± 0,1
A3-51/08	0	0
A3-52/08	0	0
A3-53/08	0	0
A3-54/08	0	0
A3-55/08	0	0
A3-56/08	24,0 ± 0,1	0
A3-57/08	0	0
A3-58/08	26,5 ± 0,1	0
A3-59/08	25,0 ± 0,1	0
A3-61/08	0	0
A3-62/08	26,5 ± 0,0	0
A3-63/08	26,5 ± 0,1	0
A3-64/08	0	0

**Tabla 8. Porcentaje de actividad antagónica de cepas de Actinomicetos contra *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani***

Código CIP	Porcentaje de actividad antagónica (%)	
	<i>Fusarium solani</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
A1-01/08	35,0 ± 0,1	51,2 ± 0,2
A1-02/08	0	0
A1-03/08	40,0 ± 0,0	46,4 ± 0,2
A1-04/08	0	47,6 ± 0,1
A1-05/08	27,5 ± 0,1	34,5 ± 0,2
A1-06/08	0	0
A1-07/08	45,0 ± 0,3	40,5 ± 0,2
A1-08/08	41,3 ± 0,1	31,0 ± 0,0
A1-09/08	0	0
A1-10/08	0	0
A1-11/08	0	28,6 ± 0,0
A1-12/08	0	0
A1-13/08	0	0
A1-14/08	0	0
A1-15/08	0	0
A1-16/08	25,0 ± 0,3	36,9 ± 0,1
A1-17/08	0	0
A1-18/08	0	0
A1-19/08	23,8 ± 0,1	34,5 ± 0,1
A1-20/08	0	0
A1-21/08	31,3 ± 0,1	26,2 ± 0,3
A1-22/08	32,5 ± 0,1	28,6 ± 0,1
A1-23/08	0	0
A1-24/08	0	0
A1-25/08	32,5 ± 0,1	33,3 ± 0,1
A1-26/08	0	39,3 ± 0,1
A1-27/08	21,3 ± 0,1	0
A1-28/08	36,3 ± 0,4	56,0 ± 0,1
A1-29/08	36,3 ± 0,1	31,0 ± 0,1
A1-30/08	0	0
A1-31/08	28,8 ± 0,2	59,5 ± 0,3
A1-32/08	0,0	42,9 ± 0,4
A1-33/08	38,8 ± 0,1	0
A1-34/08	35,0 ± 0,1	45,2 ± 0,1
A1-35/08	0	0
A1-36/08	28,8 ± 0,1	53,6 ± 0,1
A1-37/08	0	0
A1-38/08	20,0 ± 0,1	0
A1-39/08	15,0 ± 0,0	0
A1-40/08	38,8 ± 0,2	0
A1-41/08	0	0
A1-42/08	37,5 ± 0,1	72,6 ± 0,1
A1-43/08	20,0 ± 0,1	0
A1-44/08	0	0
A1-45/08	27,5 ± 0,1	52,4 ± 0,1

**Tabla 9. Actividad solubilizadora de fosfatos de cepas de *Azotobacter* aisladas de la rizósfera de *S. tuberosum* en función de la variación de pH durante 288 h.**

Cepas <i>Azotobacter</i>	ASP (cm <sup>2</sup> ) 30 días	pH Inicial	pH					
			48 h	96 h	144 h	192 h	240 h	288 h
A3-01/08	0,20	7,0	4,5	4,5	5,0	6,2	6,0	6,0
A3-04/08	0,25	7,0	4,2	4,6	4,4	6,2	6,1	6,1
A3-07/08	1,48	7,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
A3-09/08	0,22	7,0	5,2	4,8	4,6	6,2	6,2	6,2
A3-10/08	0,28	7,0	5,1	5,1	5,1	6,0	6,2	6,2
A3-13/08	2,57	7,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
A3-16/08	2,10	7,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	6,0
A3-17/08	1,88	7,0	5,4	5,4	5,5	6,0	6,0	6,0
A3-18/08	1,04	7,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	6,0
A3-19/08	2,20	7,0	5,2	5,0	4,6	6,2	6,2	6,2
A3-22/08	1,63	7,0	5,4	5,4	5,4	6,0	6,0	6,0
A3-23/08	1,04	7,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	6,0
A3-28/08	0,13	7,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
A3-31/08	0,11	7,0	6,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
A3-32/08	1,88	7,0	5,8	5,4	4,4	5,0	5,8	6,1
A3-33/08	0,16	7,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
A3-34/08	0,69	7,0	6,0	6,0	5,0	5,0	4,5	5,0
A3-35/08	0,28	7,0	5,6	4,8	4,4	6,0	6,1	6,1
A3-36/08	0,22	7,0	5,8	5,8	6,1	6,4	6,4	6,4
A3-39/08	5,43	7,0	5,2	4,8	4,4	5,4	5,4	5,6
A3-42/08	1,90	7,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
A3-44/08	0,45	7,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
A3-45/08	0,43	7,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
A3-48/08	0,33	7,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
A3-50/08	0,16	7,0	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4
A3-51/08	0,23	7,0	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2
A3-57/08	0,15	7,0	4,8	4,6	6,2	6,4	6,4	6,4
A3-58/08	0,75	7,0	5,0	6,0	5,0	5,0	5,0	5,0
A3-62/08	0,48	7,0	6,0	5,0	5,0	5,0	4,5	5,0

ASP: Área solubilización de fosfato (cm<sup>2</sup>)





**Tabla 13. Evaluación de la producción de ácido indol acético (AIA) por cepas de *Azotobacter* spp durante 15 días de evaluación.**

Cepa <i>Azotobacter</i>	Cualitativa en 6 días	Cuantitativa (µg/ml)			
		3º día	6º día	10º día	15º día
A3-04/08	+	9,4	10,8	15,3	100,7
A3-07/08	+	7,9	16,0	11,5	29,7
A3-09/08	+	8,0	7,7	9,1	13,1
A3-11/08	+	7,5	9,9	8,5	25,8
A3-13/08	+	7,3	45,8	12,2	25,6
A3-16/08	+	7,5	12,3	21,6	63,5
A3-18/08	+	10,8	25,1	53,2	30,4
A3-19/08	+	9,0	8,2	14,9	38,6
A3-23/08	+	7,8	15,0	10,2	28,8
A3-26/08	+	9,8	13,7	16,1	31,1
A3-30/08	+	7,6	10,7	9,0	22,5
A3-31/08	+	8,1	16,2	22,0	173,1
A3-32/08	+	11,1	17,3	78,8	48,6
A3-33/08	+	7,6	9,8	9,4	7,9
A3-34/08	+	7,6	23,7	86,9	323,5
A3-35/08	+	8,0	14,6	8,8	19,9
A3-39/08	+	7,7	120,7	59,0	7,6
A3-42/08	+	8,9	15,8	10,0	16,5
A3-48/08	+	7,7	12,6	83,7	22,8
A3-57/08	+	7,8	23,3	588,6	435,3
A3-58/08	+	9,6	13,4	21,7	29,5
A3-62/08	+	7,3	9,4	8,1	7,6

**Tabla 14. Producción AIA de cepas de Actinomicetos positivas**

Cepas Actinomicetos	Cualitativa en 6 días	Cuantitativa (µg/ml)			
		4º día	8º día	12º día	15º día
A1-03/08	+	7,6	7,3	8,7	7,9
A1-06/08	+	8,1	12,3	17,7	16,6
A1-14/08	+	7,2	7,5	8,0	8,0
A1-15/08	+	8,7	11,0	10,7	10,2
A1-16/08	+	7,5	7,4	7,6	6,9
A1-19/08	+	8,0	6,4	8,8	18,1
A1-21/08	+	8,4	9,5	9,4	11,3
A1-25/08	+	9,9	9,3	9,5	10,2
A1-31/08	+	7,6	7,8	9,5	9,4
A1-33/08	+	7,2	7,9	9,1	8,6
A1-36/08	+	8,9	13,4	29,0	51,8
A1-37/08	+	8,6	10,0	8,6	9,1
A1-38/08	+	8,7	8,6	10,0	8,9
A1-39/08	+	13,1	15,3	16,3	39,9
A1-42/08	+	7,8	7,7	7,3	6,9
A1-45/08	+	13,1	15,4	16,7	27,8

**Tabla 15. Crecimiento de cepas de *Azotobacter* a pH 4 y 5,5 con respecto al control (pH 7) a las 192 h (8 días)**

Cepa	Crecimiento (%)		
	pH 4	pH 5,5	pH 7
A3-09/08	95,0	100,0	100,0
A3-04/08	95,0	95,8	100,0
A3-07/08	91,7	100,0	100,0
A3-11/08	90,0	100,0	100,0
A3-13/08	88,5	100,0	100,0
A3-16/08	100,0	100,0	100,0
A3-18/08	57,6	81,8	100,0
A3-19/08	100,0	100,0	100,0
A3-22/08	100,0	95,5	100,0
A3-23/08	86,5	67,3	100,0
A3-26/08	100,0	100,0	100,0
A3-30/08	90,0	100,0	100,0
A3-31/08	75,0	78,1	100,0
A3-32/08	100,0	100,0	100,0
A3-33/08	100,0	61,5	100,0
A3-34/08	100,0	100,0	100,0
A3-35/08	84,6	88,5	100,0
A3-39/08	87,5	95,8	100,0
A3-42/08	55,0	95,0	100,0
A3-57/08	100,0	100,0	100,0

**Tabla 16. Crecimiento de *Azotobacter* a diferentes temperaturas con respecto al control (28° C) a las 360 h (15 días)**

Cepa	Temperatura de crecimiento (°C)				
	4°	10°	15°	20°	28°
A3-09/08	35,3	52,9	64,7	70,6	100,0
A3-04/08	64,3	57,1	60,0	84,2	100,0
A3-07/08	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
A3-11/08	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
A3-13/08	10,5	78,9	56,5	87,0	100,0
A3-16/08	0,0	70,8	57,7	79,2	100,0
A3-18/08	33,3	46,7	40,0	100,0	100,0
A3-19/08	53,8	100,0	88,2	78,9	100,0
A3-22/08	0,0	66,7	43,5	76,5	100,0
A3-23/08	12,7	56,4	25,5	86,2	100,0
A3-26/08	80,0	100,0	100,0	100,0	100,0
A3-30/08	46,7	66,7	73,3	92,9	100,0
A3-31/08	16,1	29,0	51,6	58,8	100,0
A3-32/08	0,0	100,0	55,0	100,0	100,0
A3-33/08	0,0	79,5	25,6	100,0	100,0
A3-34/08	60,0	45,0	80,0	94,7	100,0
A3-35/08	100,0	90,9	36,4	57,1	100,0
A3-39/08	57,9	0,0	81,8	80,0	100,0
A3-42/08	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
A3-57/08	26,7	46,7	46,7	100,0	100,0

**Tabla 17. Crecimiento de Actinomicetos a pH 4,0 y pH 5,5 con respecto al control a pH 7 por 144 h (6 días)**

Cepa	Crecimiento (%)		
	pH 4	pH 5,5	pH 7
A1-01/08	0,0	90,0	100,0
A1-03/08	100,0	85,7	100,0
A1-05/08	40,0	73,3	100,0
A1-06/08	44,4	87,5	100,0
A1-14/08	10,3	100,0	100,0
A1-16/08	0,0	75,0	100,0
A1-19/08	20,8	87,5	100,0
A1-21/08	100,0	100,0	100,0
A1-25/08	0,0	88,9	100,0
A1-30/08	0,0	100,0	100,0
A1-31/08	0,0	83,3	100,0
A1-32/08	0,0	100,0	100,0
A1-33/08	0,0	66,7	100,0
A1-34/08	31,6	89,5	100,0
A1-36/08	100,0	100,0	100,0
A1-37/08	0,0	77,3	100,0
A1-38/08	0,0	57,1	100,0
A1-39/08	19,0	54,5	100,0
A1-42/08	30,0	87,5	100,0
A1-45/08	100,0	100,0	100,0

**Tabla 18. Crecimiento de Actinomicetos a diferentes temperaturas con respecto al control a 28° C durante 168 h**

Cepa	Temperatura de crecimiento (°C)				
	4°	10°	15°	20°	28°
A1-01/08	0	63,6	54,5	100,0	100,0
A1-03/08	0	44,4	44,4	55,6	100,0
A1-05/08	0	26,7	100,0	100,0	100,0
A1-06/08	0	42,9	57,1	71,4	100,0
A1-14/08	0	34,5	24,1	37,9	100,0
A1-16/08	0	60,0	66,7	80,0	100,0
A1-19/08	0	4,0	16,0	40,0	100,0
A1-21/08	0	50,0	75,0	87,5	100,0
A1-25/08	0	40,9	45,5	68,2	100,0
A1-30/08	0	50,0	77,8	83,3	100,0
A1-31/08	0	47,1	70,6	94,1	100,0
A1-32/08	0	90,9	72,7	100,0	100,0
A1-33/08	0	41,2	47,1	58,8	100,0
A1-34/08	0	38,9	55,6	72,2	100,0
A1-36/08	0	36,8	42,1	68,4	100,0
A1-37/08	0	60,0	100,0	100,0	100,0
A1-38/08	0	34,8	34,8	52,2	100,0
A1-39/08	0	33,3	42,9	47,6	100,0
A1-42/08	0	35,0	45,0	60,0	100,0
A1-45/08	0	100,0	77,8	100,0	100,0

**Tabla 19. Caracterización de cepas de *Azotobacter* spp. aisladas de la rizósfera de papa.**

Prueba	Cepas																			
	A3-04/08	A3-07/08	A3-09/08	A3-11/08	A3-13/08	A3-16/08	A3-18/08	A3-19/08	A3-22/08	A3-23/08	A3-26/08	A3-30/08	A3-31/08	A3-32/08	A3-33/08	A3-34/08	A3-35/08	A3-39/08	A3-42/08	A3-57/08
<i>Produccion de Quistes</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Motilidad</i>	+	d	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	-	-	+	+	+	d	+	+
<i>Oxidasa</i>	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
<i>Catalasa</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>Produccion de Pigmentos</i>																				
Amarillo - Verde fluorescente	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Verde	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Marron - negro	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Marron-negro a rojo - violeta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rojo Violeta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Utilizacion de Carbohidratos</i>																				
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Caproato	-	-	d	+	-	-	d	+	-	-	-	+	-	-	+	d	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+
Benzoato	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Glicerol	-	+	-	-	+	d	d	-	-	+	d	+	+	d	-	+	-	+	d	d

d: variable

**Tabla 20. Caracterización de cepas de Actinomicetos aisladas de la rizósfera de papa.**

Pruebas	Cepas																			
	A1-01/08	A1-03/08	A1-05/08	A1-06/08	A1-14/08	A1-16/08	A1-19/08	A1-21/08	A1-25/08	A1-30/08	A1-31/08	A1-33/08	A1-32/08	A1-34/08	A1-36/08	A1-37/08	A1-38/08	A1-39/08	A1-42/08	A1-45/08
<b>Morfología - cadena de esporas</b>																				
Recto - flexible	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+
Espirales	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Recto - flexible / espirales	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Reticulada	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
<b>Superficie</b>																				
Liso	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Epinoso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Piloso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rugoso	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<b>Color masa de esporas</b>																				
Amarillo	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Gris	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
Blanco	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
Azul	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rojo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Violeta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Color micelio base</b>																				
Marron	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amarillo - marron	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Verde	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Rojo – naranja	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Azul – violeta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Producción de pigmentos Difusibles</b>																				
	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<b>Antibiosis contra <i>Bacillus subtilis</i></b>																				
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Utilización de:</b>																				
Glucosa	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Manitol	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
Sacarosa	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-

Tabla 21. Capacidad PGPR de las cepas seleccionadas e identificadas de *Azotobacter* spp. aisladas de la rizósfera de papa.

Cepa <i>Azotobacter</i>	% inhibición frente a		Prod. AIA 8 días	AIA (ug/ml) 6 días	AIA (ug/ml) 15 días	Sol P - (cm2) 30 días	Identificación*
	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Fusarium solani</i>					
A3-04/08	0,0	0,0	+	10,80	100,66	0,25	<i>A. chroococum</i>
A3-07/08	0,0	0,0	+	16,03	29,75	1,48	<i>A. chroococum</i>
A3-09/08	0,0	0,0	+	7,66	13,08	0,22	<i>A. chroococum</i>
A3-11/08	0,0	0,0	+	9,86	25,80	0,00	<i>A. chroococum</i>
A3-13/08	37,0	25,5	+	45,80	25,61	2,57	<i>A. vinelandii</i>
A3-16/08	41,0	19,0	+	12,33	63,47	2,10	<i>A. vinelandii</i>
A3-18/08	0,0	22,5	+	25,11	30,41	1,04	<i>A. chroococum</i>
A3-19/08	0,0	21,3	+	8,23	38,58	2,20	<i>A. chroococum</i>
A3-22/08	0,0	14,0	+	0,00	0,00	1,63	<i>A. chroococum</i>
A3-23/08	0,0	31,5	+	15,00	28,81	1,04	<i>A. chroococum</i>
A3-26/08	0,0	29,0	+	13,67	31,09	0,99	<i>A. armeniacus</i>
A3-30/08	0,0	43,0	+	10,67	22,55	0,00	<i>A. vinelandii</i>
A3-31/08	0,0	0,0	+	16,15	173,09	0,11	<i>A. beijerinckii</i>
A3-32/08	40,0	21,5	+	17,26	48,58	1,88	<i>A. beijerinckii</i>
A3-33/08	0,0	0,0	+	9,82	7,85	0,16	<i>A. chroococum</i>
A3-34/08	0,0	0,0	+	23,74	323,52	0,69	<i>A. chroococum</i>
A3-35/08	0,0	28,0	+	14,61	19,89	0,28	<i>A. chroococum</i>
A3-39/08	0,0	0,0	+	120,69	7,64	5,43	<i>A. chroococum</i>
A3-42/08	0,0	33,0	+	15,84	16,51	1,90	<i>A. chroococum</i>
A3-57/08	0,0	0,0	+	23,28	435,30	0,15	<i>A. armeniacus</i>

\* Según Bergey (2005)

Tabla 22. Capacidad PGPR de las cepas seleccionadas e identificadas de Actinomicetos aislados de la rizosfera de papa.

Cepa	% inhibición frente a		Prod. AIA 8 días	AIA (ug/ml) 8 días	AIA (ug/ml) 15 días	Sol P - Agar (cm <sup>2</sup> ) 30 días	Identificación*
	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Fusarium solani</i>					
A1-01/08	51,2	35,0	-	0,0	0,0	0,00	<i>S. exfoliatus</i>
A1-03/08	46,4	40,0	+	7,3	7,9	0,15	<i>S. griseoloalbus</i>
A1-05/08	34,5	27,5	-	0,0	0,0	0,00	<i>S. violaceusniger</i>
A1-06/08	0,0	0,0	+	12,3	16,6	0,31	<i>S. aureofaciens</i>
A1-14/08	0,0	0,0	+	7,5	8,0	0,00	<i>S. olivaceoviridis</i>
A1-16/08	36,9	25,0	+	7,4	6,9	0,00	<i>S. griseoloalbus</i>
A1-19/08	34,5	23,8	+	6,4	18,1	0,00	<i>S. violaceusniger</i>
A1-21/08	26,2	31,3	+	9,5	11,3	0,00	<i>S. griseoloalbus</i>
A1-25/08	33,3	32,5	+	9,3	10,2	0,00	<i>S. griseoviridis</i>
A1-30/08	0,0	0,0	-	0,0	0,0	0,25	<i>S. griseoloalbus</i>
A1-31/08	59,5	28,8	+	7,8	9,4	0,00	<i>S. violaceusniger</i>
A1-32/08	42,9	0,0	-	0,0	0,0	0,00	<i>S. violaceusniger</i>
A1-33/08	0,0	38,8	+	7,9	8,6	0,00	<i>S. albus</i>
A1-34/08	45,2	35,0	-	0,0	0,0	0,13	<i>S. griseoflavus</i>
A1-36/08	53,6	28,8	+	13,4	51,8	0,00	<i>S. rochei</i>
A1-37/08	0,0	0,0	+	10,0	9,1	0,00	<i>S. olivaceoviridis</i>
A1-38/08	0,0	41,3	+	8,6	8,9	0,00	<i>S. griseoloalbus</i>
A1-39/08	0,0	15,0	+	15,3	39,9	0,00	<i>S. albidoflavus</i>
A1-42/08	72,6	37,5	+	7,7	6,9	0,00	<i>S. filipinensis</i>
A1-45/08	52,4	27,5	+	15,4	27,8	0,35	<i>S. lavendulae</i>

\* Según Bergey (1989)

**Tabla 23. Evaluación del efecto de las cepas seleccionadas de *Azotobacter* sobre *S.tuberosum* en invernadero**

Tratamientos	Parámetros <sup>1</sup>								
	NT	PST (g.)	%MST	%MSR	PSP (g)	%MSP	AFT (cm <sup>2</sup> )	PEH (g/dm <sup>2</sup> )	IC
Control	2,25 a	2,00 a	12,94 a	15,20 a	6,33 a	14,36 a	186,79 a	0,40 de	32,0 a
A3-04/08	5,00 ab	5,11ab	14,59 bc	17,27 bc	11,63 b	15,62 bcd	284,95 ab	0,38 cde	44,0 abc
A3-07/08	4,75 ab	6,72 b	15,28 cd	17,58 bc	13,73 b	15,76 cde	451,08 bcd	0,49 fg	49,0 abc
A3-09/08	3,50 ab	5,10 ab	15,90 de	16,88 b	11,96 b	15,20 b	493,32 cd	0,41 de	41,0 ab
A3-11/08	3,75 ab	5,79 ab	15,213 cd	17,18 bc	10,95 b	15,45 bc	261,79 ab	0,54 g	53,0 bc
A3-18/08	3,75 ab	6,33 b	14,10 b	19,11 e	13,08 b	15,44 bc	410,02 bcd	0,32 abc	48,0 abc
A3-19/08	4,75 ab	4,50 ab	15,82 de	16,98 b	11,43 b	16,19 e	345,05 abcd	0,45 ef	38,0 ab
A3-22/08	3,75 ab	6,00 ab	15,83 de	17,33 bc	11,50 b	16,11 de	325,98 abcd	0,31 ab	52,0 bc
A3-23/08	2,50 ab	5,76 ab	14,70 bc	18,64 de	13,59 b	15,86 cde	334,90 abcd	0,452 ef	42,0 abc
A3-26/08	5,00 ab	5,84 ab	14,84 bc	17,65 bc	11,88 b	15,61 bcd	283,81ab	0,50 fg	49,0 abc
A3-30/08	3,75 ab	6,06 ab	15,78 de	17,28 bc	12,60 b	15,37 bc	507,39 d	0,37 bcd	45,0 abc
A3-31/08	5,25 ab	5,73 ab	15,81 de	17,28 bc	12,48 b	16,10 de	307,25 abc	0,49 fg	45,0 abc
A3-32/08	5,50 ab	7,32 b	15,98 de	17,10 bc	14,51 b	16,18 e	273,02 ab	0,39 de	51,0 abc
A3-33/08	3,00 ab	5,04 ab	16,10 de	17,58 bc	10,55 b	16,27 e	260,35 ab	0,39 de	47,0 abc
A3-34/08	7,75 b	8,45 b	16,38 e	17,36 bc	13,71 b	16,30 e	291,48 ab	0,39 de	62,0 c
A3-35/08	5,50 ab	5,31 ab	14,49 bc	16,86 b	12,28 b	15,15 b	689,02 e	0,29 a	42,0abc
A3-42/08	6,00 ab	7,55 b	15,93 de	18,11 cd	13,40 b	16,20 e	314,55 abcd	0,40 de	57,0 bc
A3-57/08	5,25 ab	7,52 b	15,98 de	17,15 bc	12,96 b	16,10 de	309,76 abc	0,49 fg	57,0 bc

<sup>1</sup>Cada valor es el promedio de cuatro repeticiones. Para cada parámetro se realizó la separación en medias. NT= Nro. de tuberculos. PST= Peso seco de tuberculos. %MST= % materia seca de tubérculo. %MSR= % materia seca de raíz. PSP= Peso seco de la planta. %MSP= %materia seca de la planta. AFT= Area foliar total. PEH=Peso específico de hojas. IC= Índice de cosecha.

**Tabla 24. Evaluación del efecto de las cepas seleccionadas de Actinomicetos sobre *S.tuberosum* en invernadero**

Tratamientos	Parámetros <sup>1</sup>								
	NT	PST (g.)	%MST	% MSR	PSP	% MSP	AFT	PEH	IC
Control	2,25 a	2,00 a	12,94 a	15,20 a	6,33 a	14,36 a	186,79 abc	0,40 a	0,32 a
A1-01/08	6,75 bc	7,97 cd	15,97 ef	18,35 ab	13,745 bcd	15,63 cdef	161,29 ab	0,66 abc	0,57 de
A1-05/08	8,00 bc	7,46 bcd	15,90 ef	17,30 ab	13,42 bcd	15,51 bcdef	238,38 abc	0,62 abc	0,55 cde
A1-14/08	6,50 abc	8,36 cd	16,50 f	18,70 ab	13,90 bcd	16,27 ef	223,51 abc	0,57 abc	0,60 e
A1-16/08	6,50 abc	5,09 b	15,69 ef	18,53 ab	13,60 bcd	15,40 abcdef	302,84 bc	0,82 c	0,37 a
A1-19/08	7,25 bc	5,20 b	14,20 bc	18,77 ab	11,53 bc	14,87 abcd	239,85 abc	0,68 abc	0,45 abcd
A1-21/08	3,75 bc	5,00 b	15,53 ef	18,76 ab	12,80 bc	15,35 abcdef	261,02 abc	0,61 abc	0,39 ab
A1-25/08	4,5 abc	6,06 bc	14,80 cd	19,36 ab	14,00 bcd	15,57 bcdef	247,79 abc	0,89 c	0,43 abc
A1-30/08	5,5 abc	5,79 bc	15,20 cde	18,82 ab	14,30 bcd	15,09 abcd	266,72 abc	0,71 bc	0,41 ab
A1-31/08	5,00 abc	4,90 b	13,63 ab	19,02 ab	10,89 b	14,53 ab	184,98 abc	0,80 c	0,45 abcd
A1-32/08	5,00 abc	7,09 bcd	15,92 ef	18,72 ab	13,97 bcd	15,89 def	311,83 c	0,46 ab	0,50 bcde
A1-33/08	8,75 c	5,86 bc	14,90 cde	19,18 ab	12,81 bcd	15,45 bcdef	282,51 bc	0,46 ab	0,46 abcd
A1-34/08	6,50 abc	6,68 bcd	14,26 bcd	17,43 ab	14,22 bcd	14,68 abc	236,24 abc	0,78 c	0,47 bcd
A1-36/08	5,75 abc	5,72 bc	15,31 cdef	16,11 ab	13,45 bcd	15,30 abcde	232,69 abc	0,63 abc	0,43 abc
A1-37/08	7,75 bc	6,76 bcd	16,00 ef	34,35 b	15,36 cd	16,40 f	281,46 bc	0,89 c	0,44 abcd
A1-38/08	7,75 bc	9,20 d	15,44 def	17,53 ab	14,92 cd	15,15 abcd	180,82 abc	0,687 abc	0,62 e
A1-39/08	6,25 abc	6,85 bcd	15,92 ef	17,39 ab	16,66 d	15,11 abcd	308,50 bc	0,85 c	0,41 ab
A1-42/08	5 abc	5,10 b	13,51ab	17,58 ab	11,91 bc	15,22 abcde	128,12 a	1,21 d	0,422 abc

<sup>1</sup> Cada valor es el promedio de cuatro repeticiones. Para cada parámetro se realizó la separación en medias. NT= Nro. de tuberculos. PST= Peso seco de tuberculos. %MST= % materia seca de tubérculo. %MSR= % materia seca de raíz. PSP= Peso seco de la planta. %MSP= %materia seca de la planta. AFT= Area foliar total. PEH=Peso específico de hojas. IC= Índice de cosecha

**Tabla 25. Selección de cepas de *Azotobacter* con mayor efecto sobre *S. tuberosum* en invernadero y sus capacidades PGPR**

Cepa	Antagonismo*	Sol. P (cm <sup>2</sup> )	Prod. AIA (µg/ml)	pH	T <sup>o</sup>	Especie**
A3-32/08	++	1,88	48,6	+	20° C	<i>A. beijerinckii</i>
A3-34/08	-	0,69	323,5	+	Todas	<i>A. chroococcum</i>
A3-35/08	+	0,28	19,9	+	Todas	<i>A. chroococcum</i>
A3-18/08	+	1,04	30,4	+	20° C	<i>A. chroococcum</i>
A3-57/08	-	0,15	435,3	+	20° C	<i>A. armeniacus</i>

\*++:Antagonismo contra ambos hongos. +: Antagonismo contra un hongo.-: No antagonista. \*\* Especie determinada bioquímicamente.

**Tabla 26. Selección de cepas de Actinomicetos con mayor efecto sobre *S. tuberosum* en invernadero y sus capacidades PGPR**

Cepa	Antagonismo*	Sol. P (cm <sup>2</sup> )	Prod. AIA (µg/ml)	pH***	T <sup>o</sup> (*)	Especie**
A1-37/08	-	-	9,1	+	Todas	<i>S. olivaceoviridis</i>
A1-42/08	++	-	6,9	+	Todas	<i>S. filipinensis</i>
A1-39/08	+	-	39,9	+	Todas	<i>S. albidoflavus</i>
A1-33/08	+	-	8,6	+	Todas	<i>S. albus</i>
A1-38/08	+	-	8,9	+	Todas	<i>S. griseoalbus</i>

\*++:Antagonismo contra ambos hongos. +: Antagonismo contra un hongo.-: No antagonista. \*\* Especie determinada bioquímicamente. \*\*\* Ninguna cepa creció a pH 4. (\*) Ninguna cepa creció a 4° C



**Figura 1. Campo de colecta de muestras de rizósfera en San José de Aymará, Huancavelica.**



**Figura 2. Muestra conteniendo suelo, rizósfera y raíces**

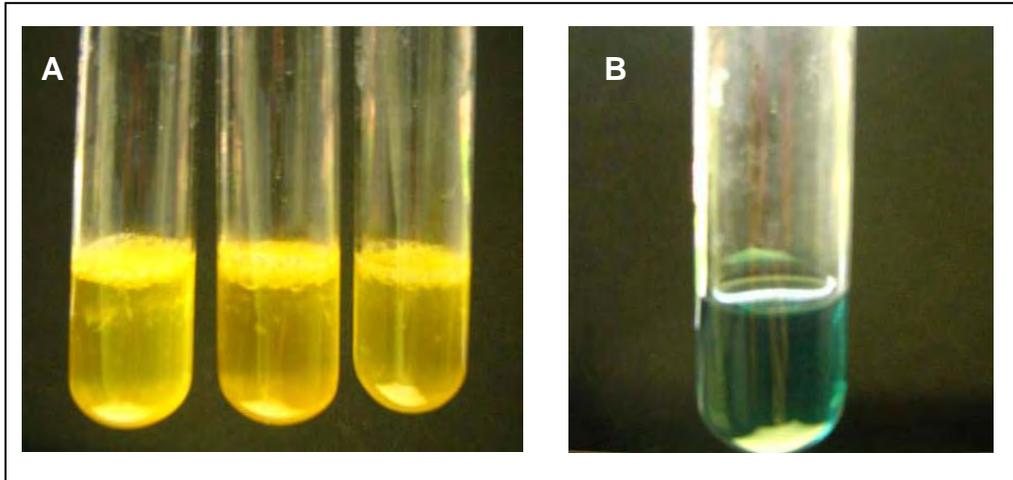


Figura 3. Recuento de *Azotobacter* por el método del Número Más Probable (NMP). A: presencia de *Azotobacter*. B: muestra negativa.

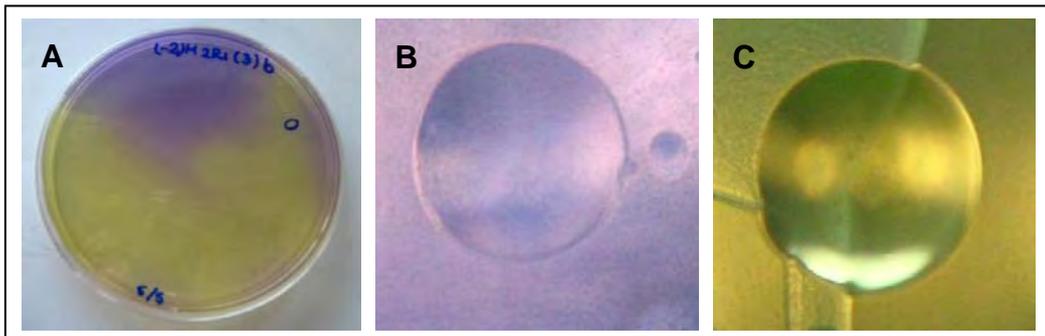


Figura 4. Aislamiento de *Azotobacter* en MMSN. A: placa conteniendo dos tipos de colonias. B: morfología colonia *Azotobacter* sin acidificar el medio. C: morfología colonia *Azotobacter* acidificando el medio.

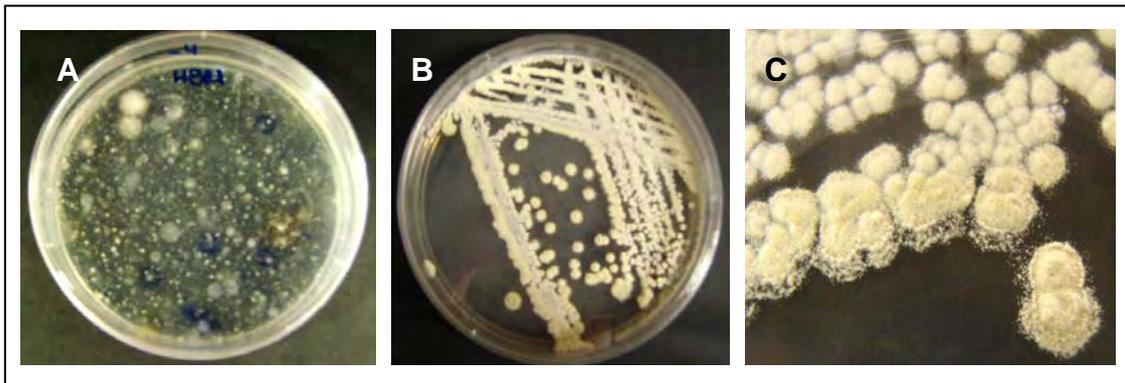


Figura 5. Recuento y aislamiento de Actinomicetos. A: placa para recuento de Actinomicetos. B: aislamiento puro de Actinomicetos. C: colonias de Actinomicetos

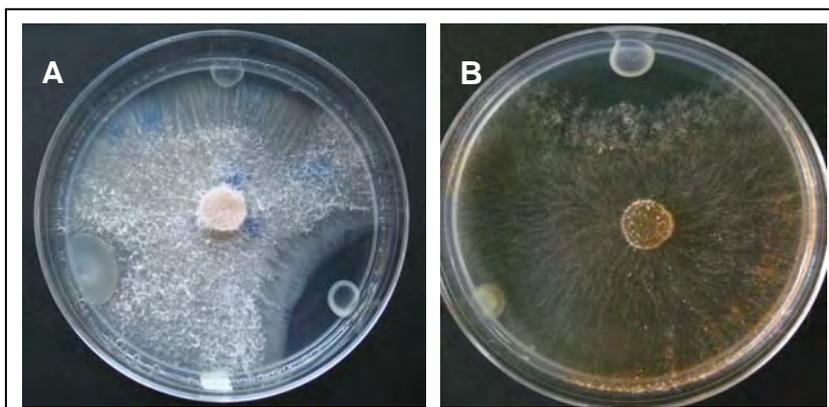


Figura 6. Prueba de Antagonismo de *Azotobacter* spp. A: frente a *Fusarium solani*. B: frente a *Rhizoctonia solani*

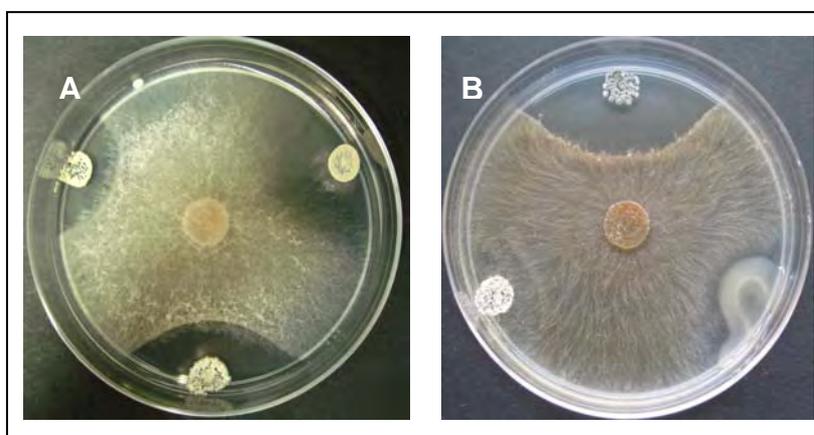


Figura 7. Prueba de Antagonismo de Actinomicetos. A: frente a *Fusarium solani*. B: frente a *Rhizoctonia solani*

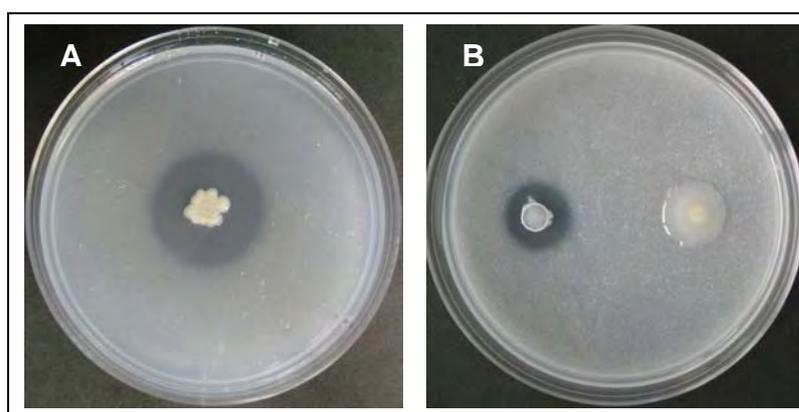
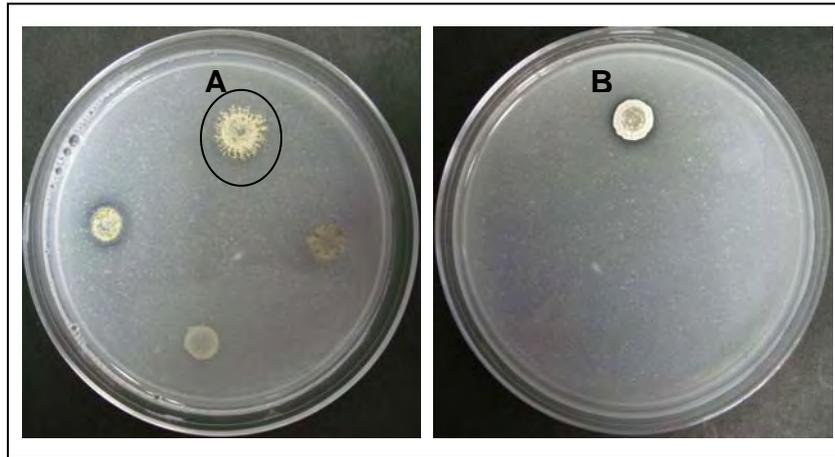
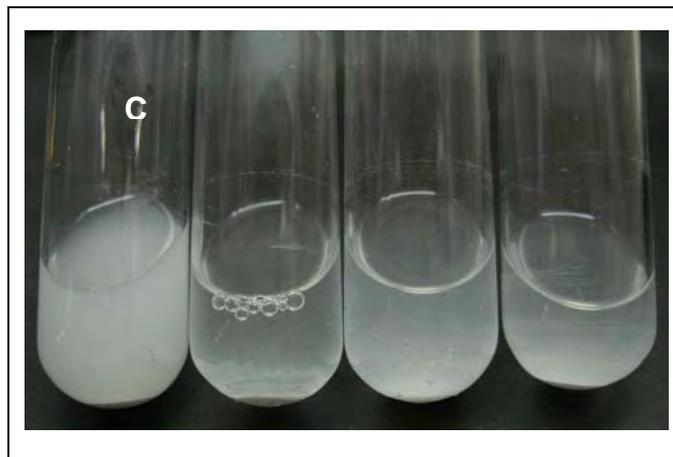


Figura 8. Prueba de solubilización de fosfato de *Azotobacter* spp. en agar NBRIP. A: halo de solubilización de fosfato, cepa A3-39/08. B: izquierda, halo de solubilización, cepa A3-06/08, derecha, cepa negativa.



**Figura 9. Prueba de solubilización de fosfato en agar NBRIP de Actinomicetos. A: cepa A1-01/08 negativa. B: halo de solubilización moderado de cepa A1-45/08**



**Figura 10. Solubilización de fosfato en caldo NBRIP por tres cepas positivas de *Azotobacter* spp. C: control sin bacteria, nótese la turbidez indicando la no solubilización de fosfato a diferencia de los tubos con bacteria.**

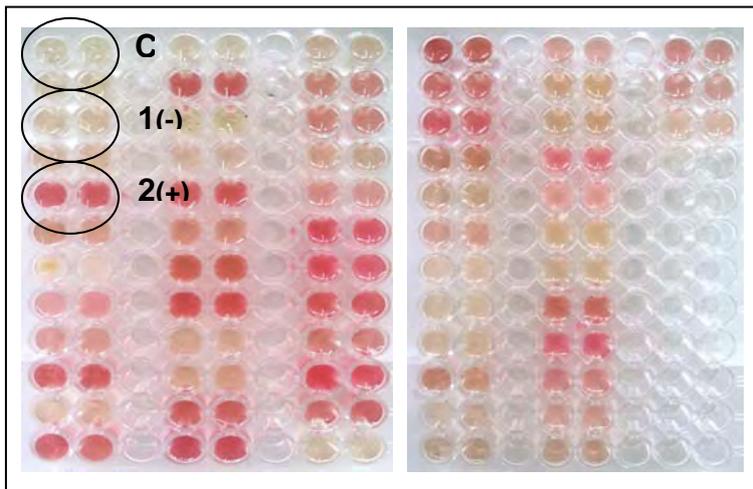


Figura 11. Prueba cualitativa producción de Acido Indol Acético de *Azotobacter* spp. C: control sin bacteria. 1: cepa sin produccion de AIA (-). 2: cepa con producción de AIA (+)

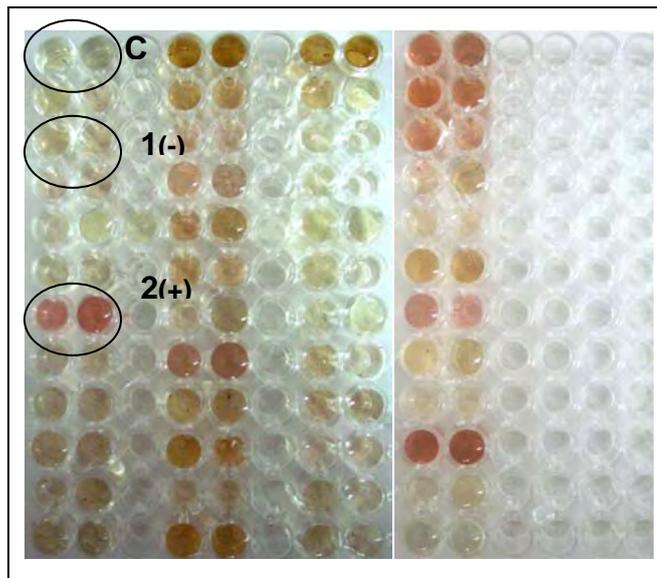
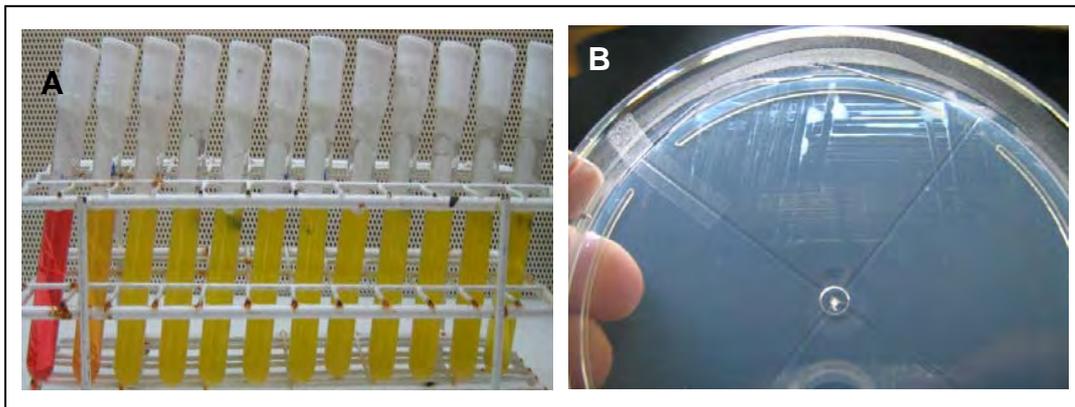


Figura 12. Prueba cualitativa producción de Acido Indol Acético de Actinomicetos C: control sin bacteria. 1: cepa sin produccion de AIA (-). 2: cepa con producción de AIA (+).



**Figura 13.** Prueba cuantitativa producción de Acido Indol Acético (AIA) en *Azotobacter* spp. De izq. a der. niveles de producción de AIA en forma ascendente.



**Figura 14.** Pruebas bioquímicas de *Azotobacter* spp. A: utilización de azúcares. B: producción de pigmentos.



Figura 15. Crecimiento de cepas de *Azotobacter* spp. en medio Cromoazurol S (CAS) para Sideróforos. Negativa.

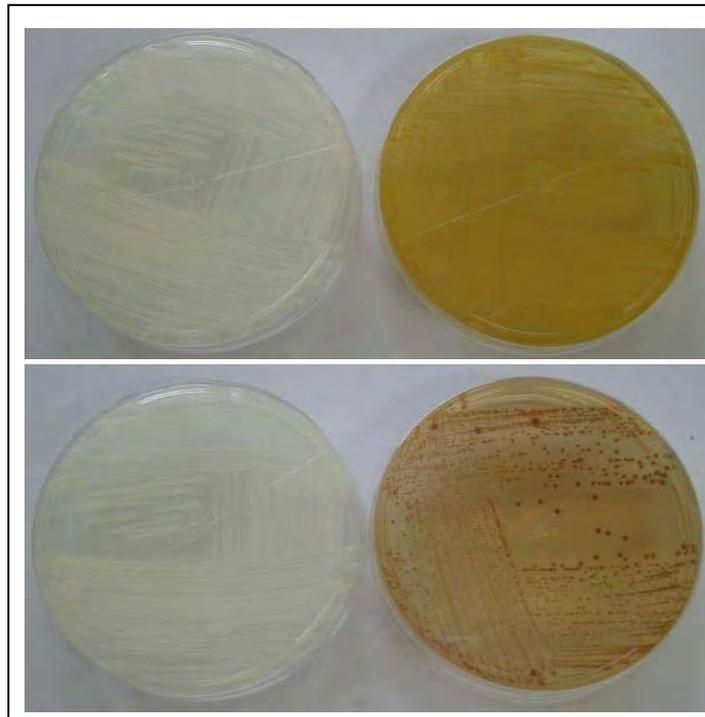
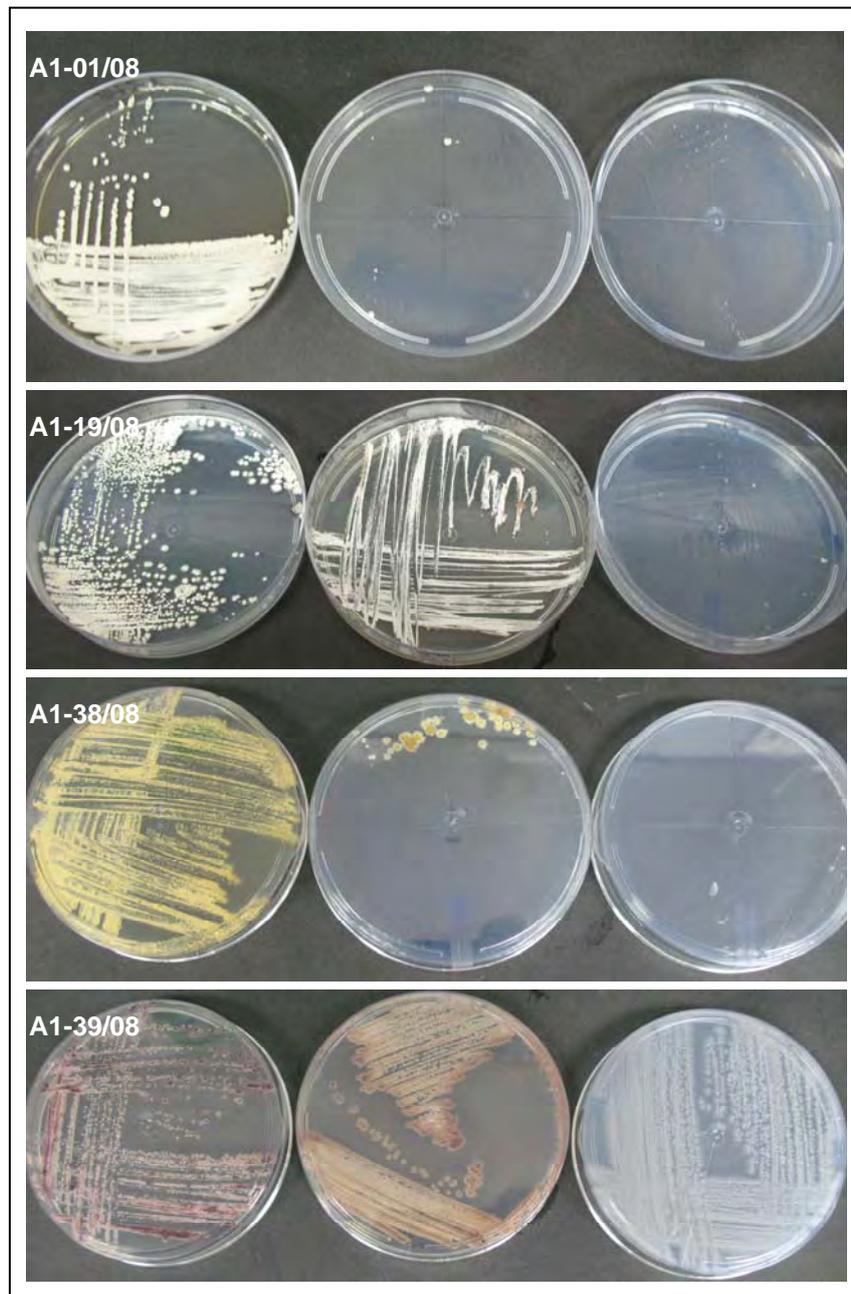


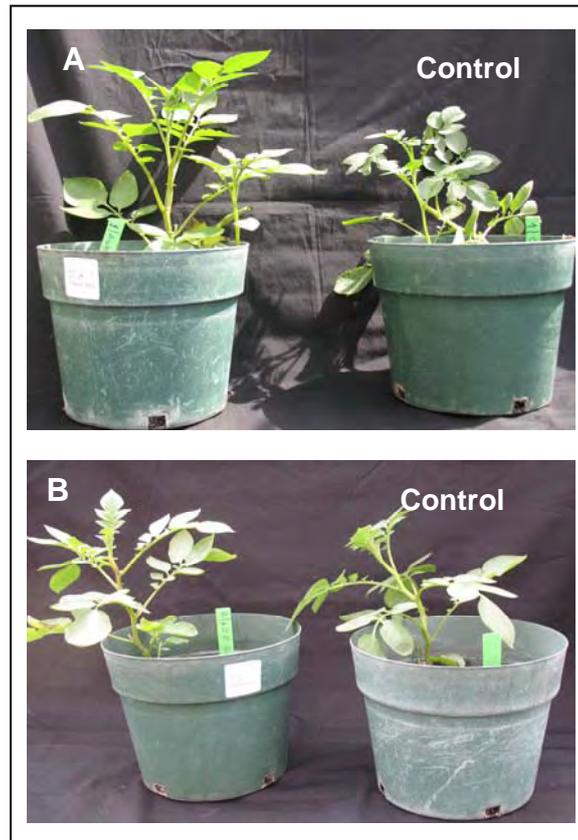
Figura 16. Prueba bioquímica Actinomicetos: producción de pigmentos difusibles. Izquierda: control, derecha: cepas de Actinomicetos productoras de pigmentos.



**Figura 17. Utilización de azúcares por 4 cepas de Actinomicetos. Izq. a der: glucosa, manitol y sacarosa.**



**Figura 18. Instalación de invernadero. A: plantas de *S. tuberosum in vitro*. B: plantas de *S. tuberosum* con jiffy. C: traslado de plantas *in vitro* a maceta. D: inoculación de plantas de *S. tuberosum* con bacteria. E: siembra de semillas-tuberculo de *S. tuberosum* en maceta.**



**Figura 19. Plantas en invernadero a las 4 semanas de instalación. A: *Azotobacter* spp. B: Actinomicetos. Izq. Plantas inoculadas. Der. Planta control sin inóculo.**



**Figura 20. Plantas de papa a las 11 semanas de tratamiento en el invernadero**



Figura 21. Der. *S. tuberosum* inoculada con Actinomicetos, izq. Planta sin inóculo.



Figura 22. Der. *S. tuberosum* inoculada con *Azotobacter* spp., izq. Planta sin inóculo.



Figura 23. Plantas de *S. tuberosum* inoculadas con Actinomicetos. C: control. 1: *S. tuberosum in vitro* sembrada en suelo estéril. 2: semilla-tubérculo de *S. tuberosum* sembrada en suelo estéril. 3: semilla-tubérculo de *S. tuberosum* sembrada en suelo no estéril.



Figura 24. Plantas de *S. tuberosum* inoculadas con *Azotobacter* spp. C: control. 1: *S. tuberosum in vitro* sembrada en suelo estéril. 2: semilla-tubérculo de *S. tuberosum* sembrada en suelo estéril. 3: semilla-tubérculo de *S. tuberosum* sembrada en suelo no estéril.

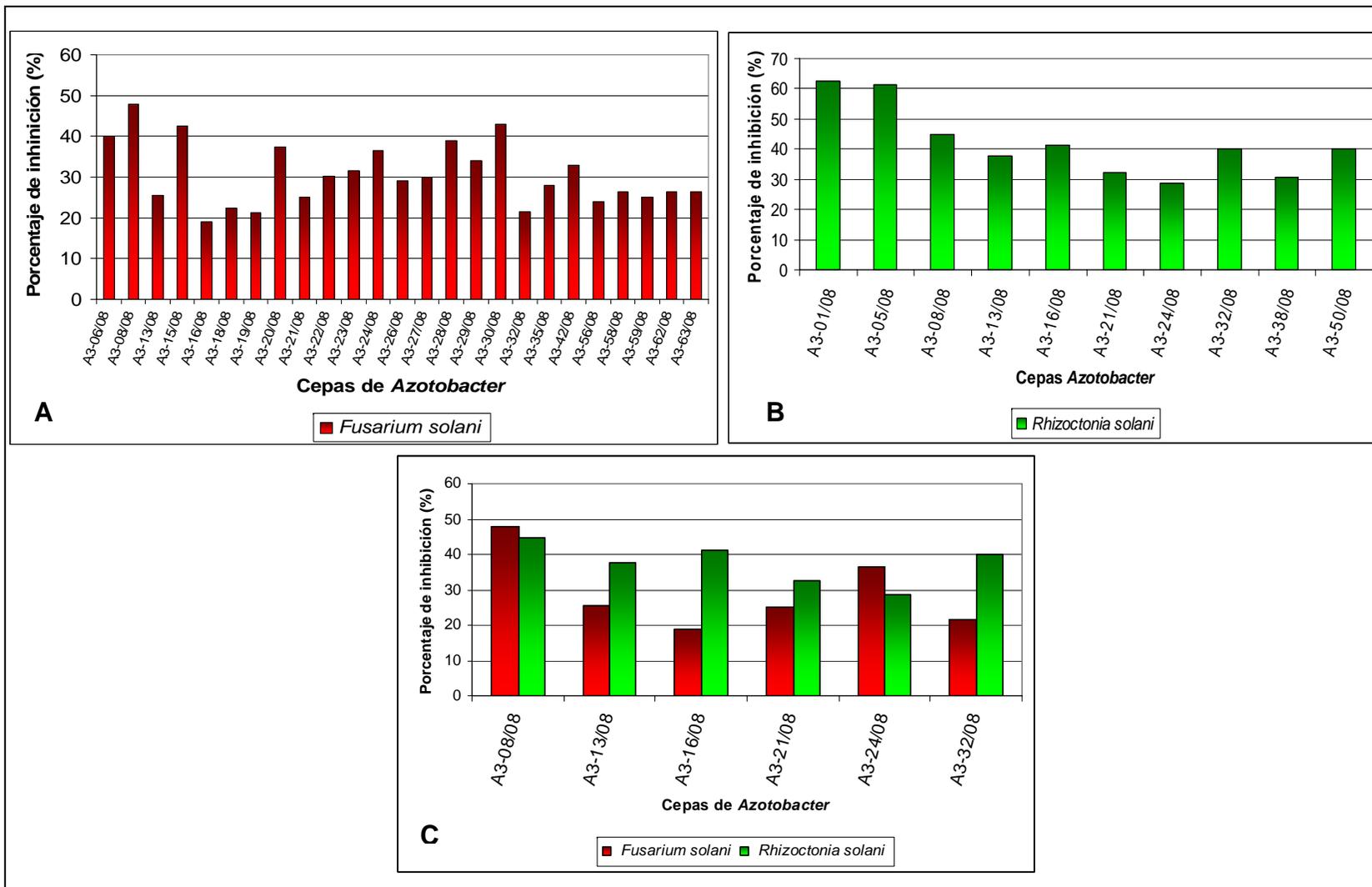


Figura 25. Porcentaje de inhibición del crecimiento por *Azotobacter spp.* A: frente a *F.solani*. B: frente a *R. solani*. C: frente a *F.solani* y *R.solani*

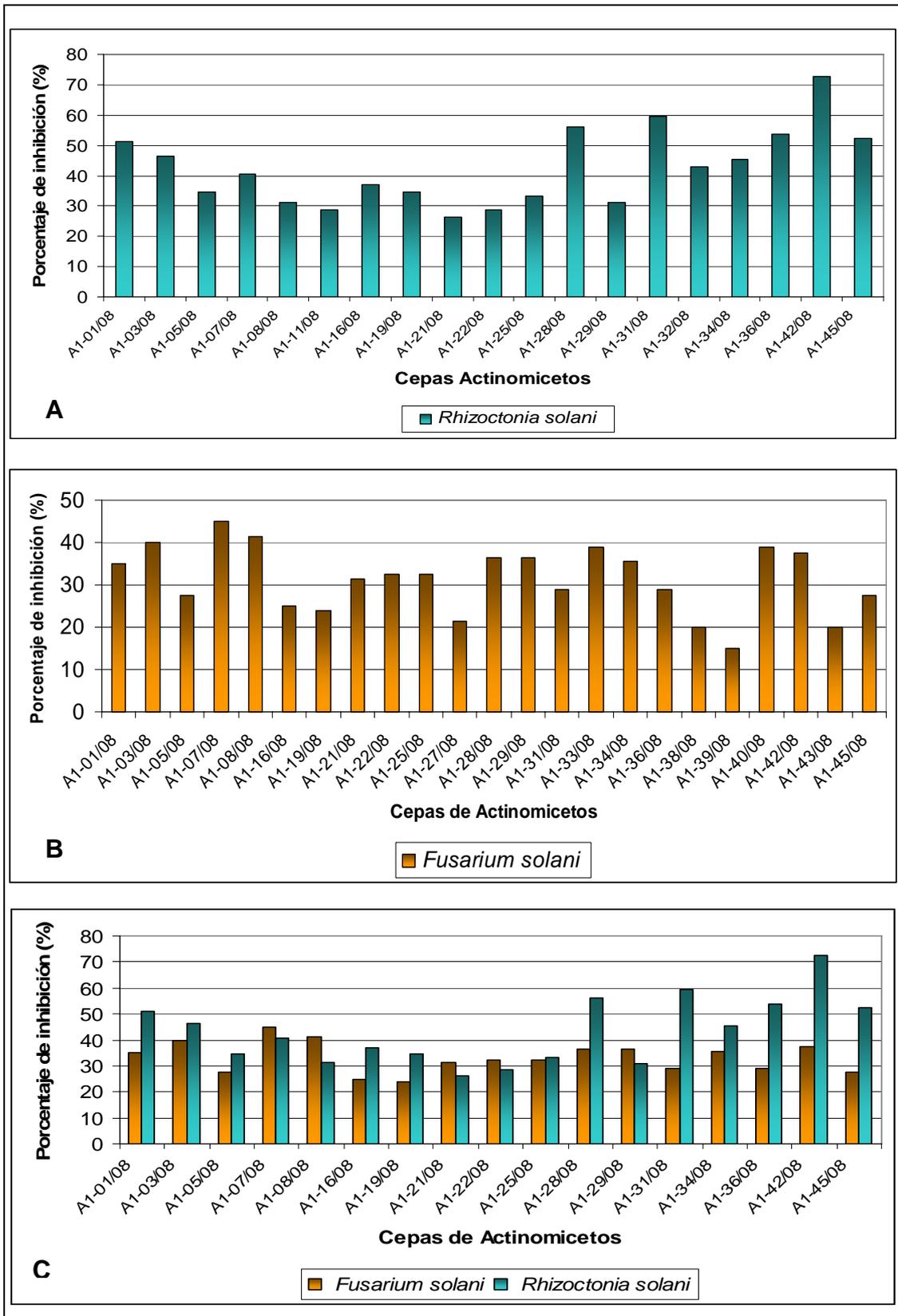


Figura 26. Porcentaje de inhibición del crecimiento por Actinomicetos. A: frente a *F.solani*. B: frente a *R. solani*. C: frente a *F.solani* y *R.solani*

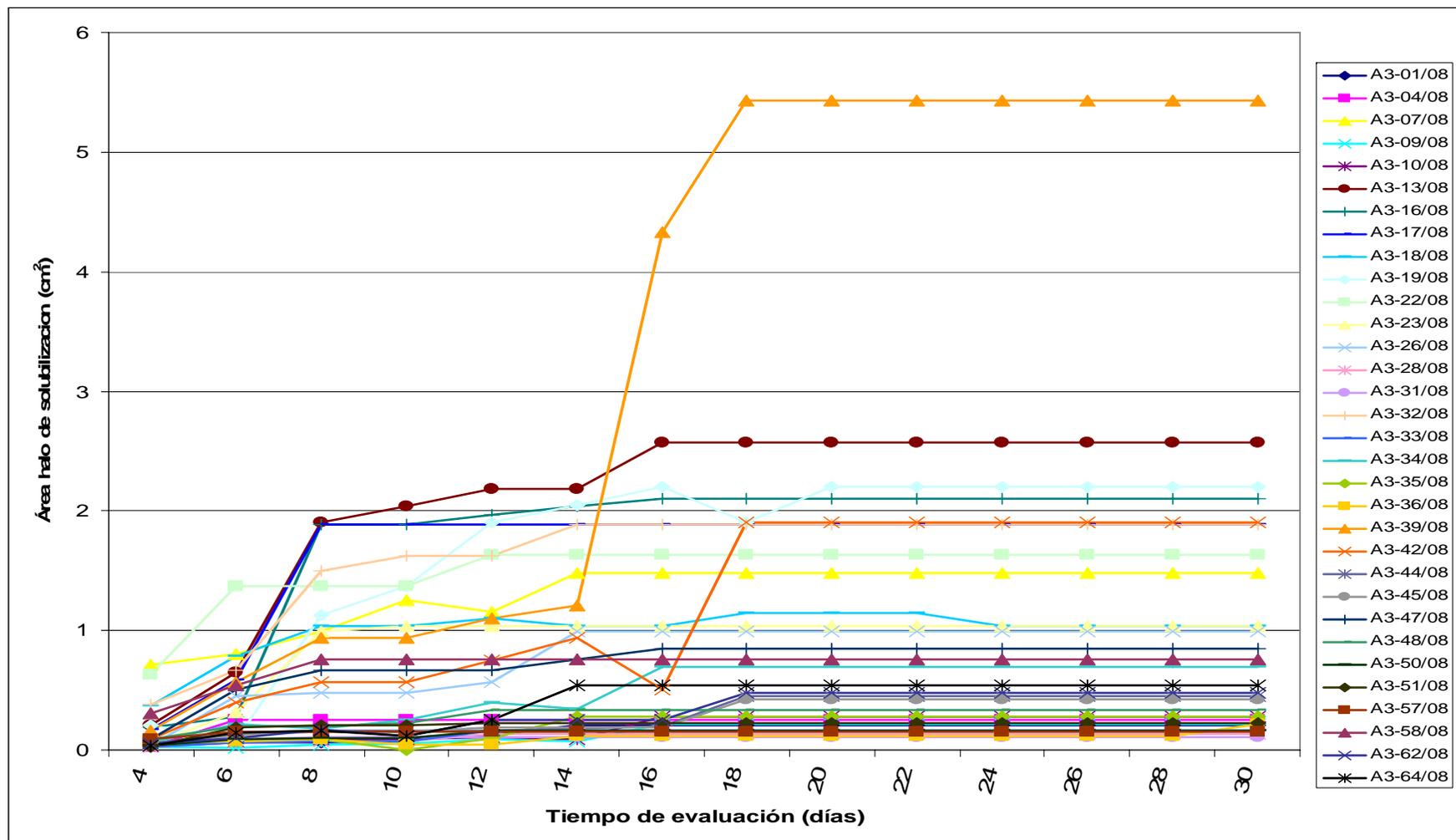


Figura 27. Solubilización de fosfato de las cepas de *Azotobacter* durante 30 días.

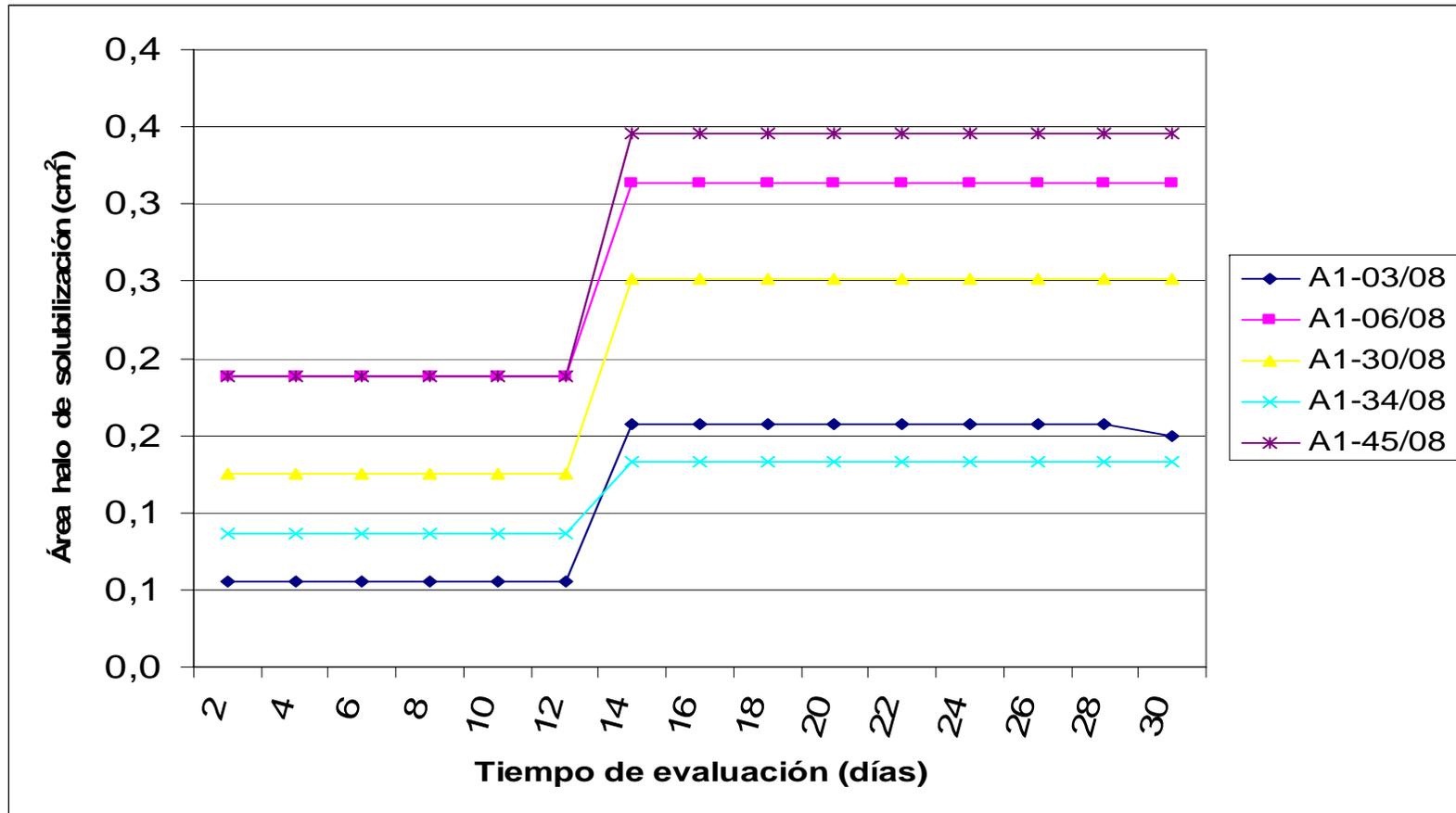


Figura 28. Solubilización de fosfato de las cepas de Actinomicetos durante 30 días

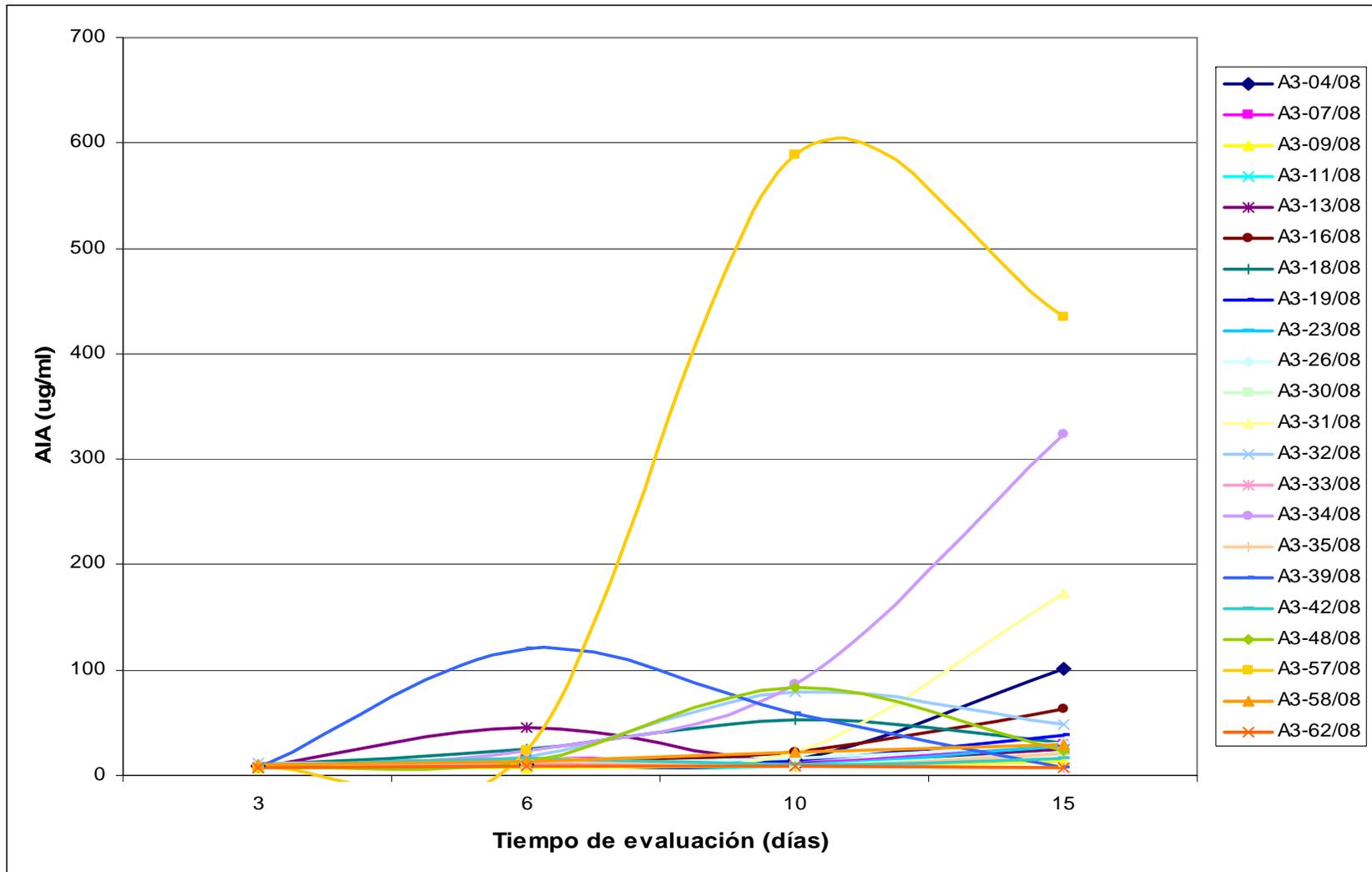


Figura 29. Producción del Acido Indol Acético (AIA) por cepas de *Azotobacter* en 15 días de evaluación.

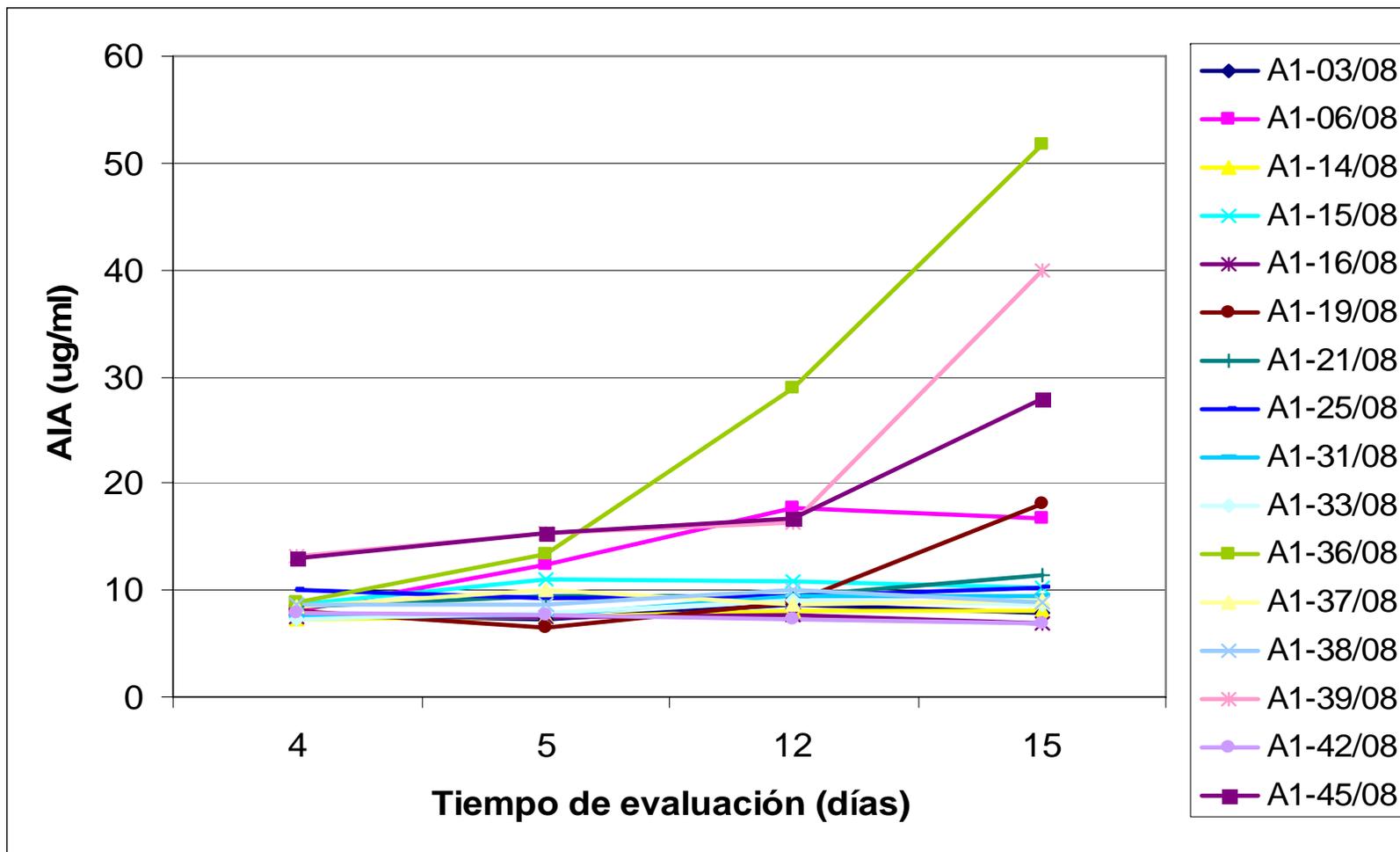


Figura 30. Producción de Acido Indol Acético (AIA) de cepas de Actinomicetos en 15 días de evaluación.

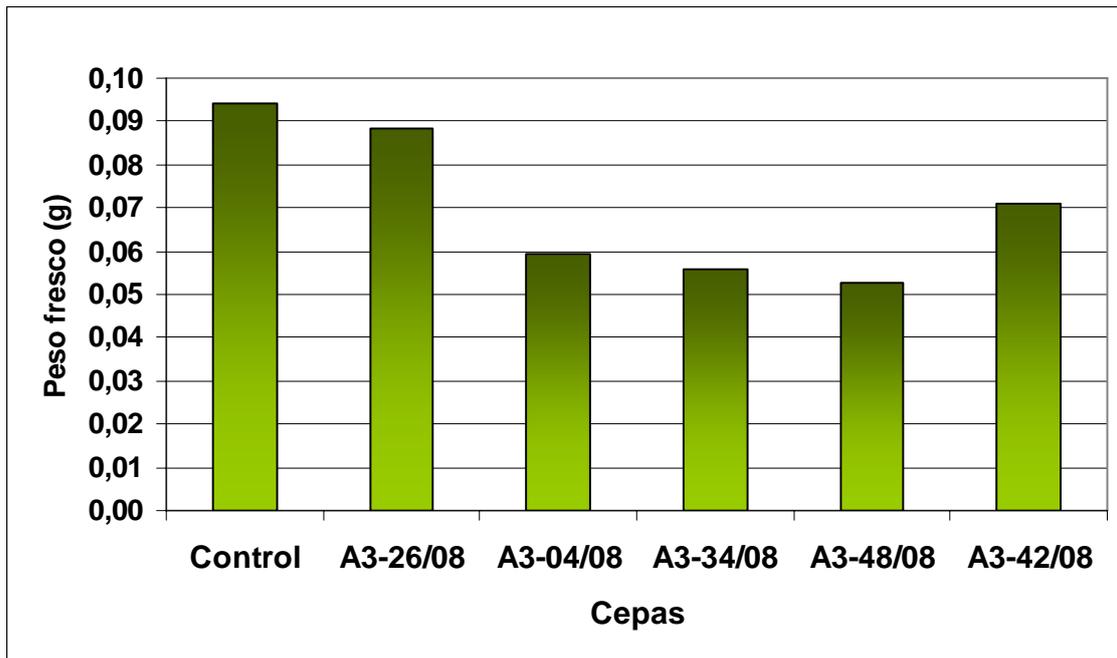


Figura 31. Efecto de la producción de metabolitos volátiles por cinco cepas de *Azotobacter* spp. sobre el peso fresco (g) de *Lactuca sativa* L. (lechuga).

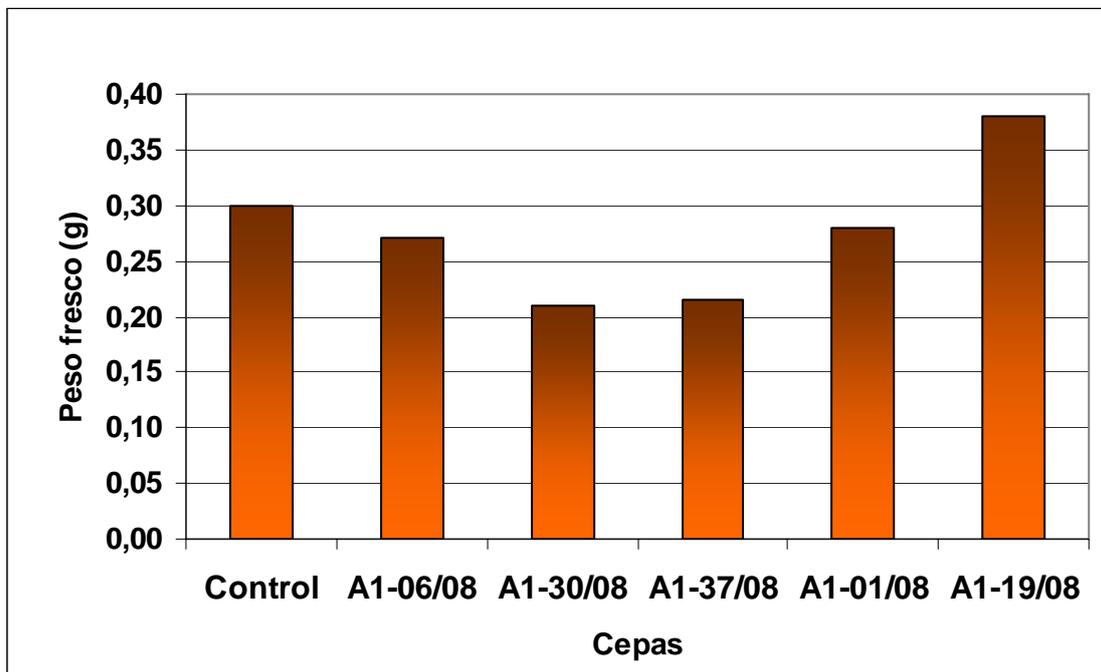
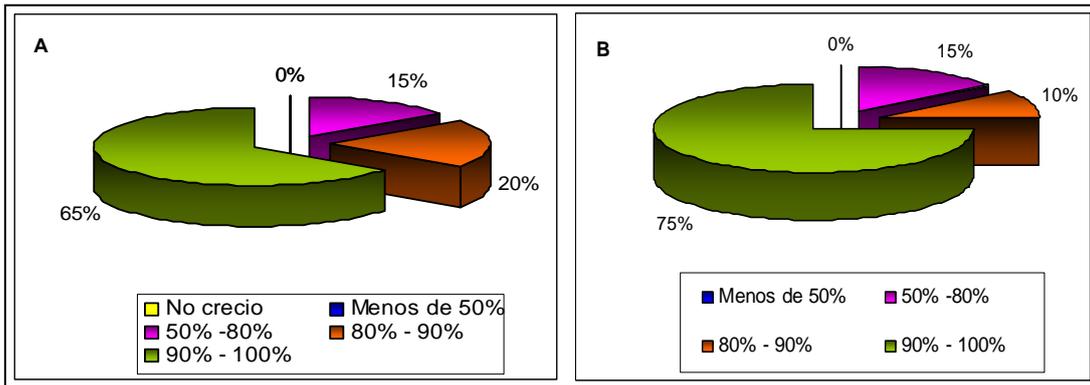
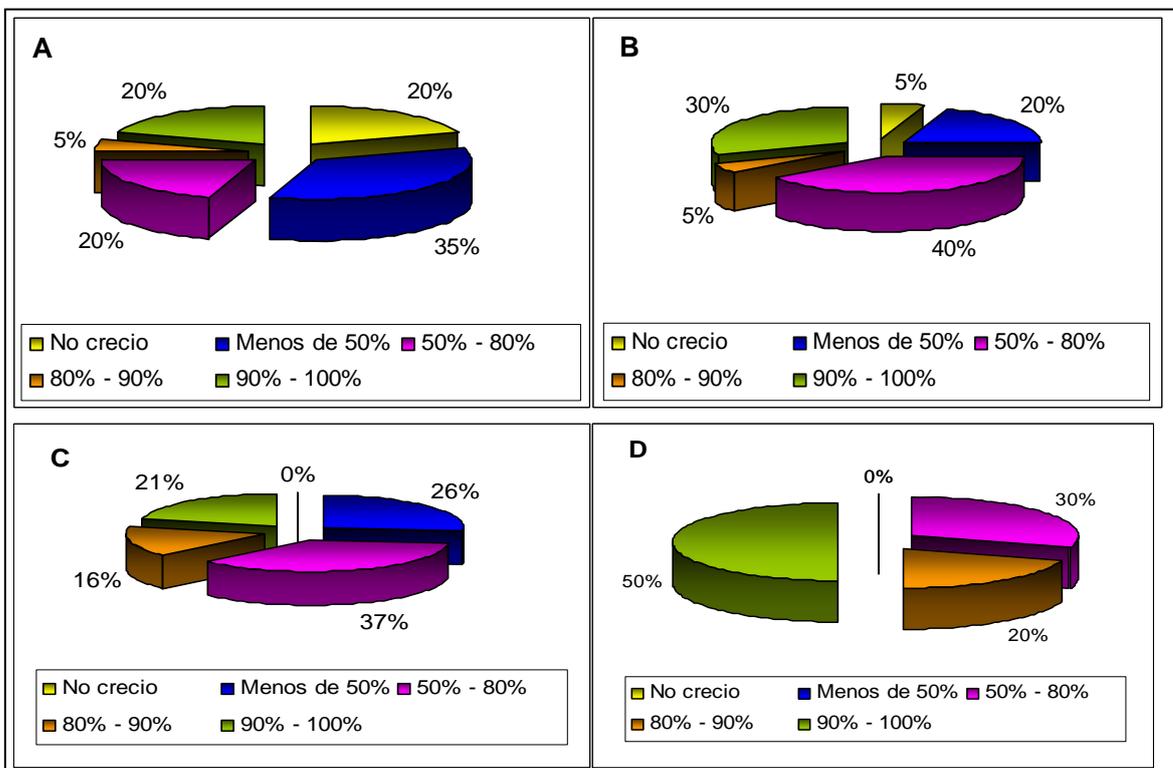


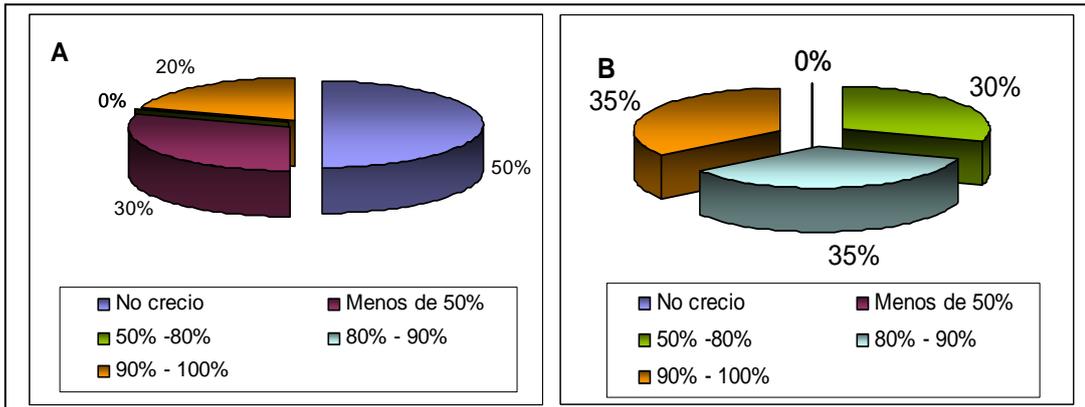
Figura 32. Efecto de la producción de metabolitos volátiles por cinco cepas de Actinomicetos sobre el peso fresco (g) de *Lactuca sativa* L. (lechuga).



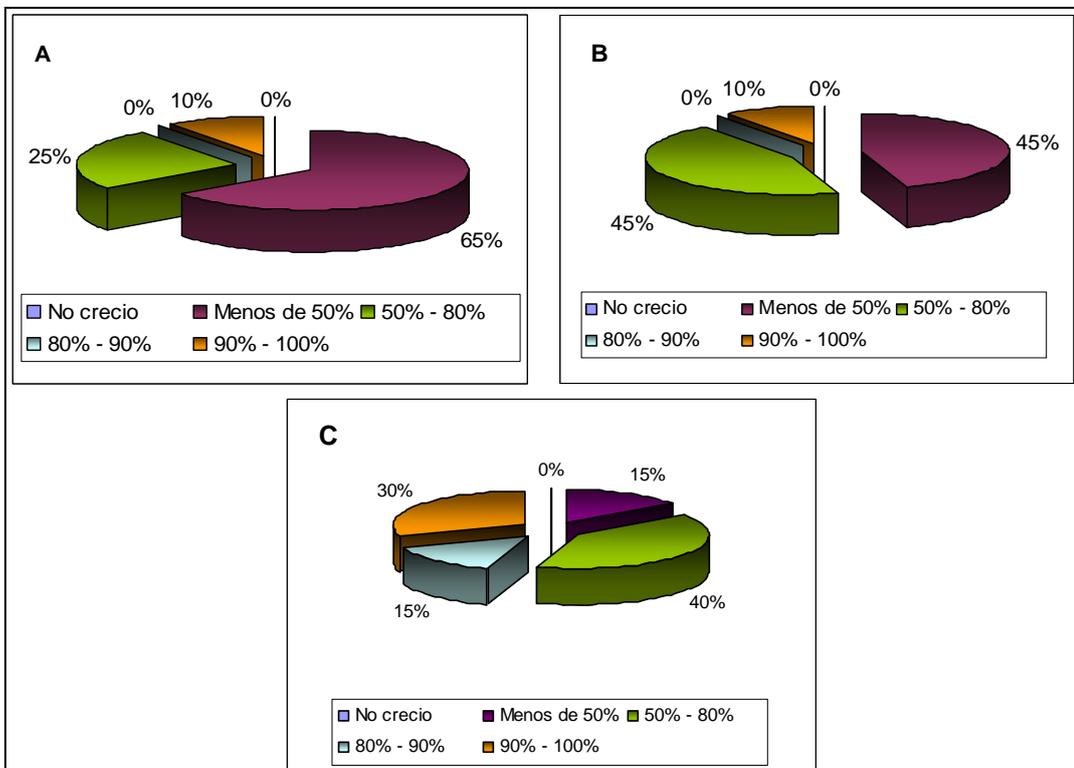
**Figura 33. Porcentaje de crecimiento de cepas seleccionadas de *Azotobacter* con respecto al control (pH 7). A: pH 4,0. B: pH 5,5**



**Figura 34. Crecimiento de cepas seleccionadas de *Azotobacter* a diferentes temperaturas, con respecto al control a 28° C. A: a 4° C. B: a 10 °C. C: a 15 °C. D: a 20 °C.**



**Figura 35. Porcentaje de crecimiento de cepas seleccionadas de Actinomicetos con respecto al control (pH 7). A: pH 4,0. B: pH 5,5**



**Figura 36. Crecimiento de cepas seleccionadas de Actinomicetos a diferentes temperaturas, con respecto al control a 28° C. A: a 10 °C. B: a 15 °C. C: a 20°C.**

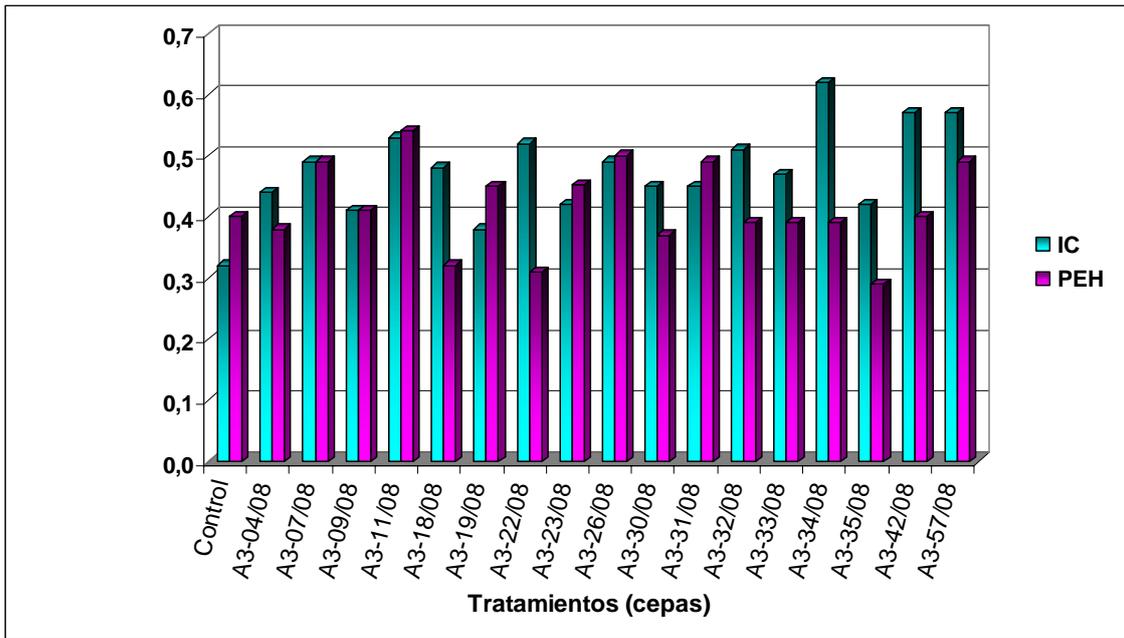


Figura 37. Evaluación del índice de cosecha (IC) y el peso específico de las hojas (PEH) para cada tratamiento con *Azotobacter* spp.

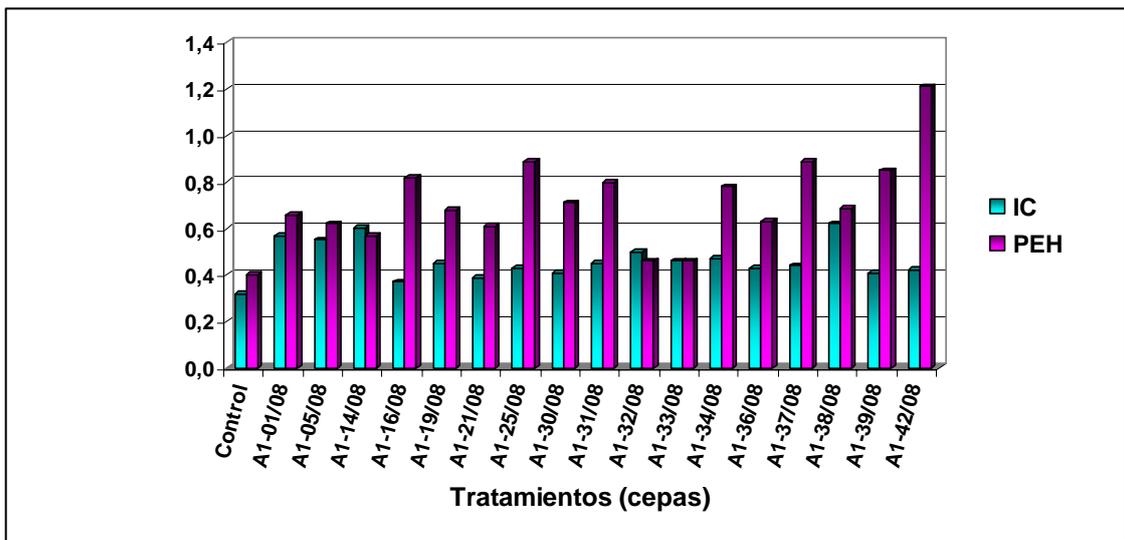


Figura 38. Evaluación del peso específico de las hojas (PEH) y el índice de cosecha (IC) para cada tratamiento con Actinomicetos.

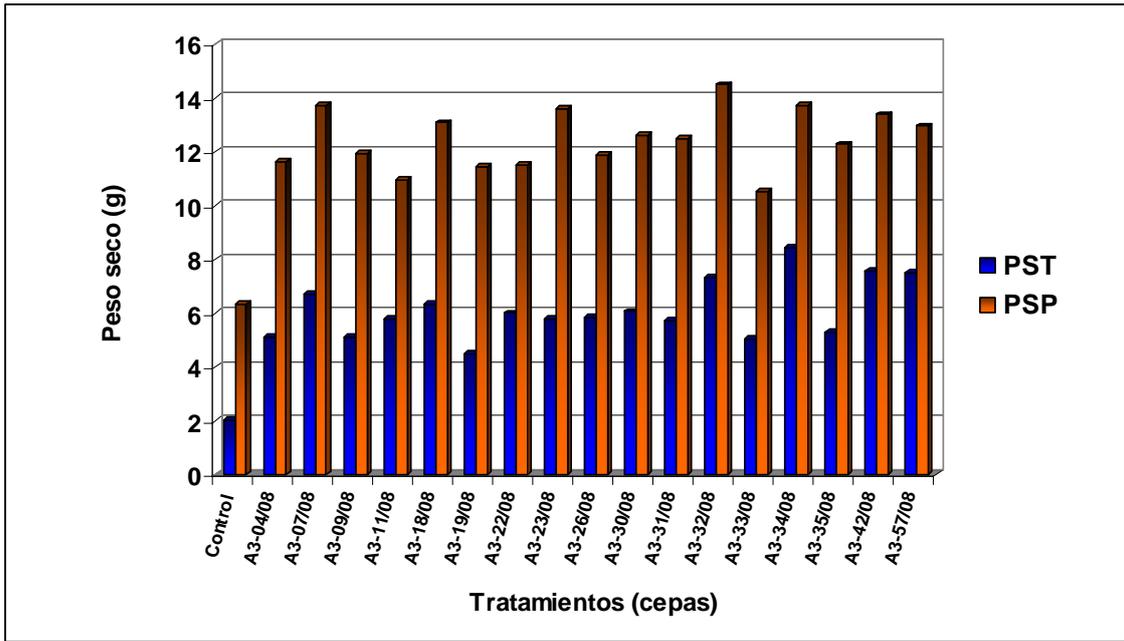


Figura 39. Evaluación del peso seco del tubérculo (PST) y el peso seco de la planta (PSP) para cada tratamiento con *Azotobacter* spp.

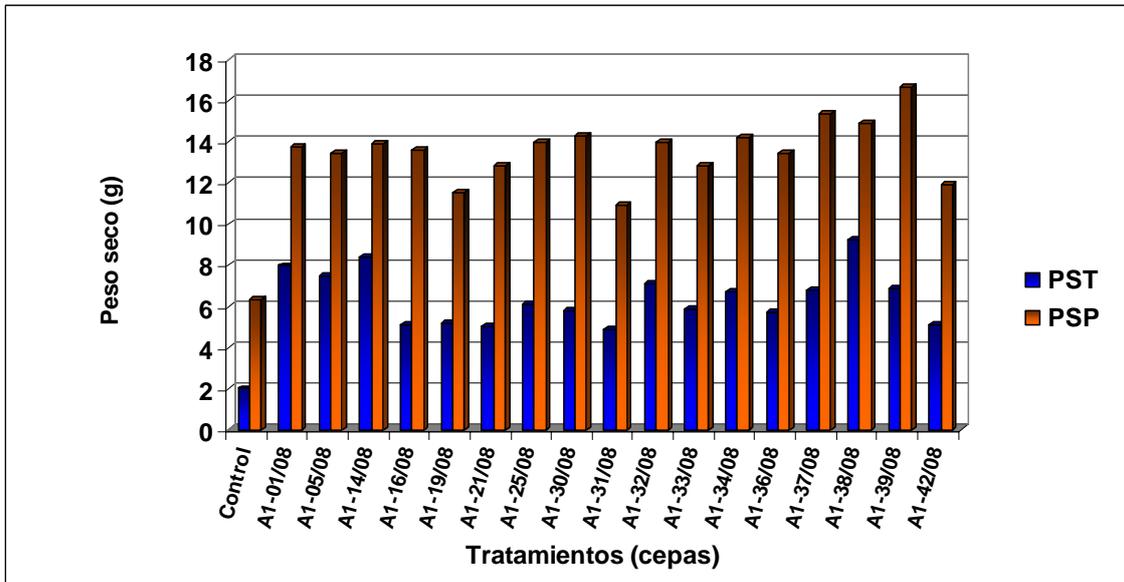


Figura 40. Evaluación del peso seco del tubérculo (PST) y el peso seco de la planta (PSP) para cada tratamiento con Actinomicetos.

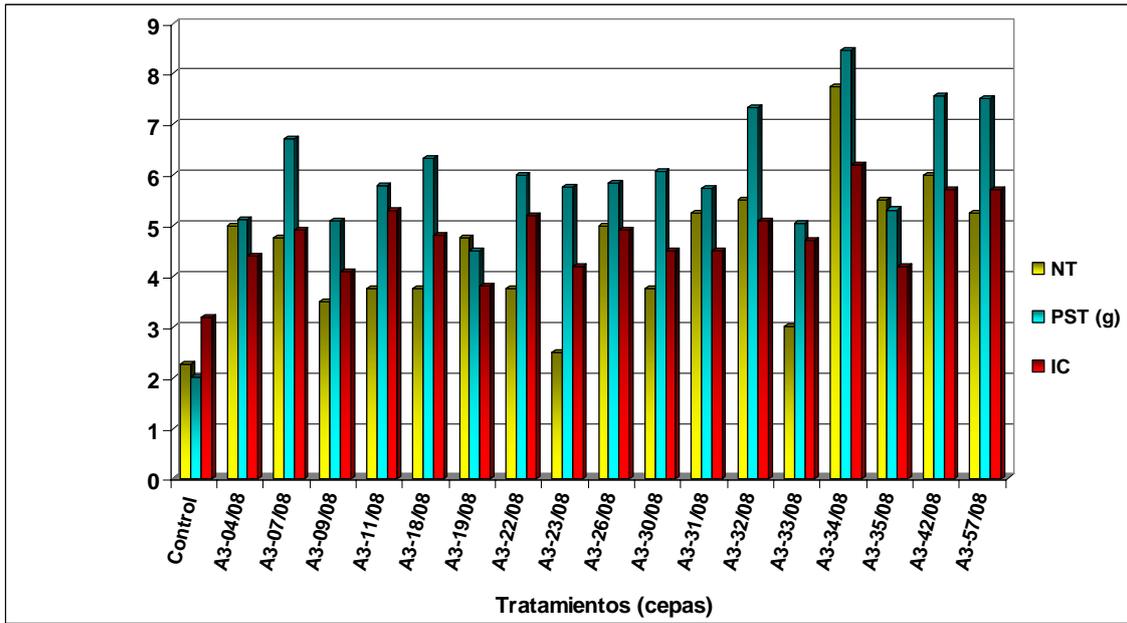


Figura 41. Evaluación del número de tubérculos (NT), peso seco de tubérculo (PST) e índice de cosecha (IC) para cada tratamiento con *Azotobacter* spp.

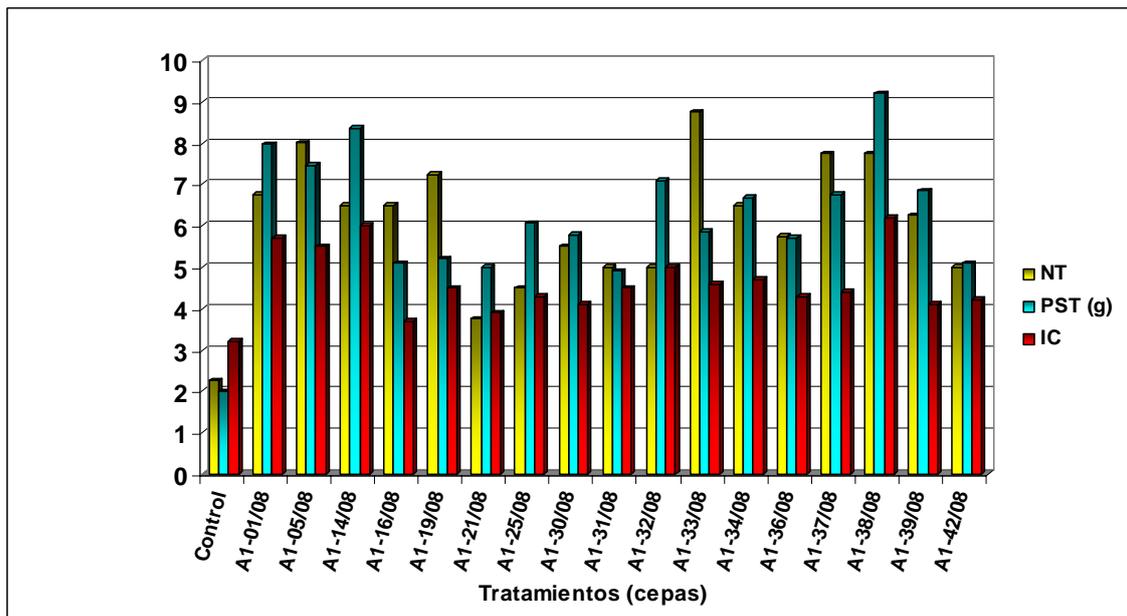


Figura 42. Evaluación del número de tubérculos (NT), peso seco del tubérculo (PST) y el índice de cosecha (IC) para cada tratamiento con Actinomicetos

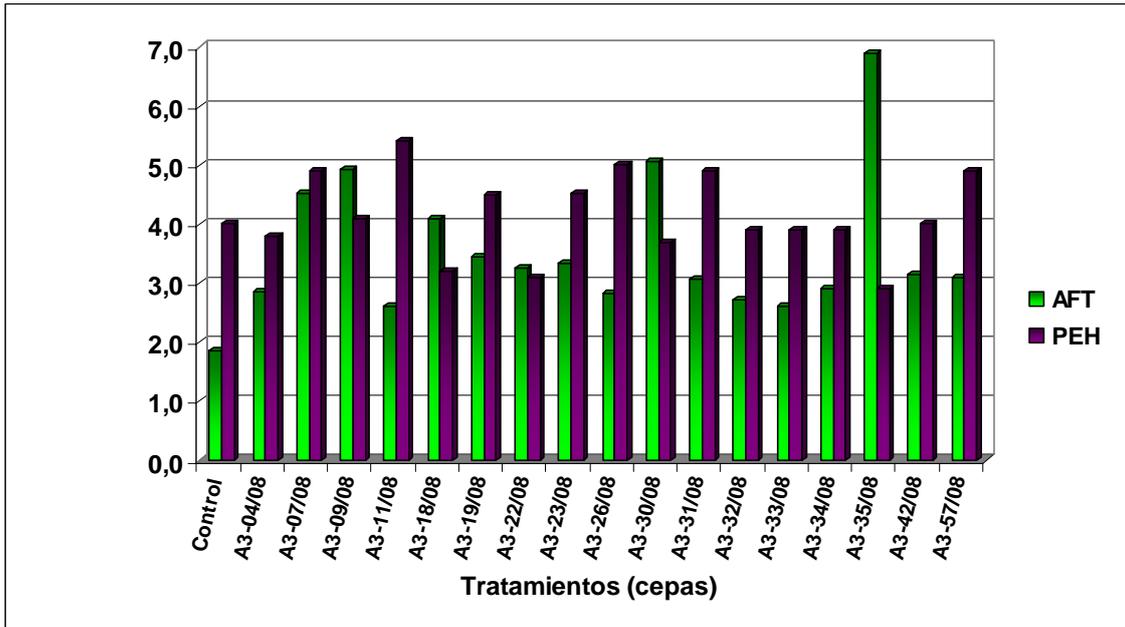


Figura 43. Evaluación del área foliar total (AFT) y el peso específico de las hojas (PEH) para cada tratamiento con *Azotobacter* spp.

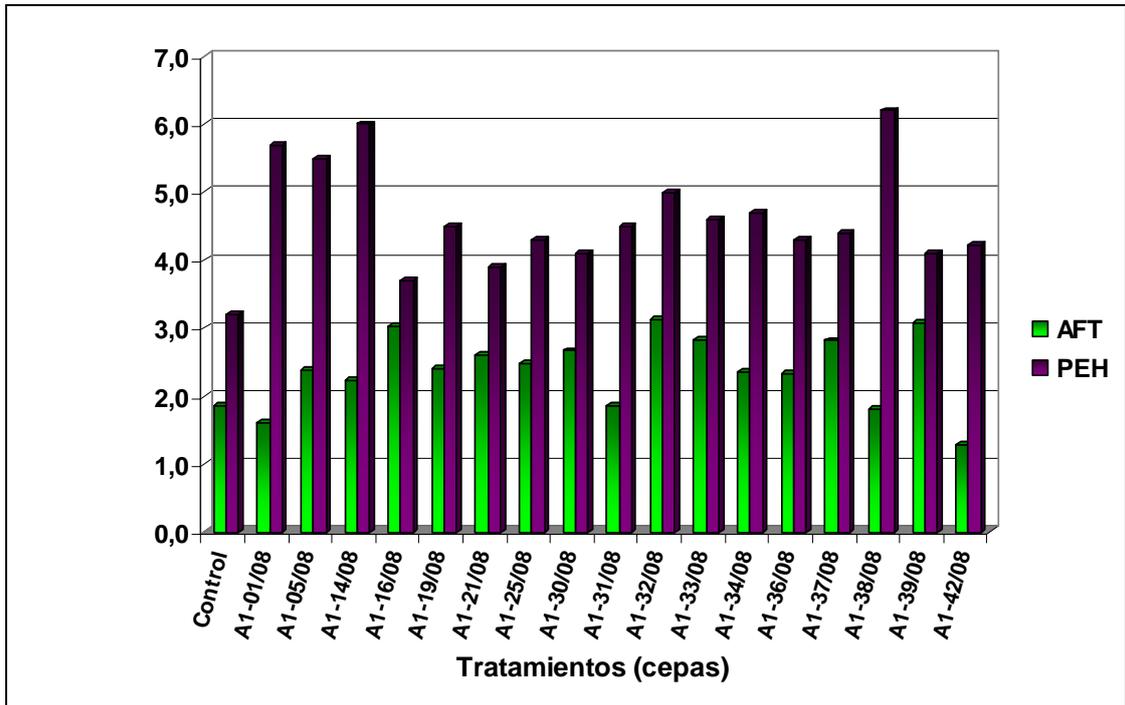


Figura 44. Evaluación del peso específico de las hojas (PEH) y el área foliar total (AFT) para cada tratamiento con Actinomicetos

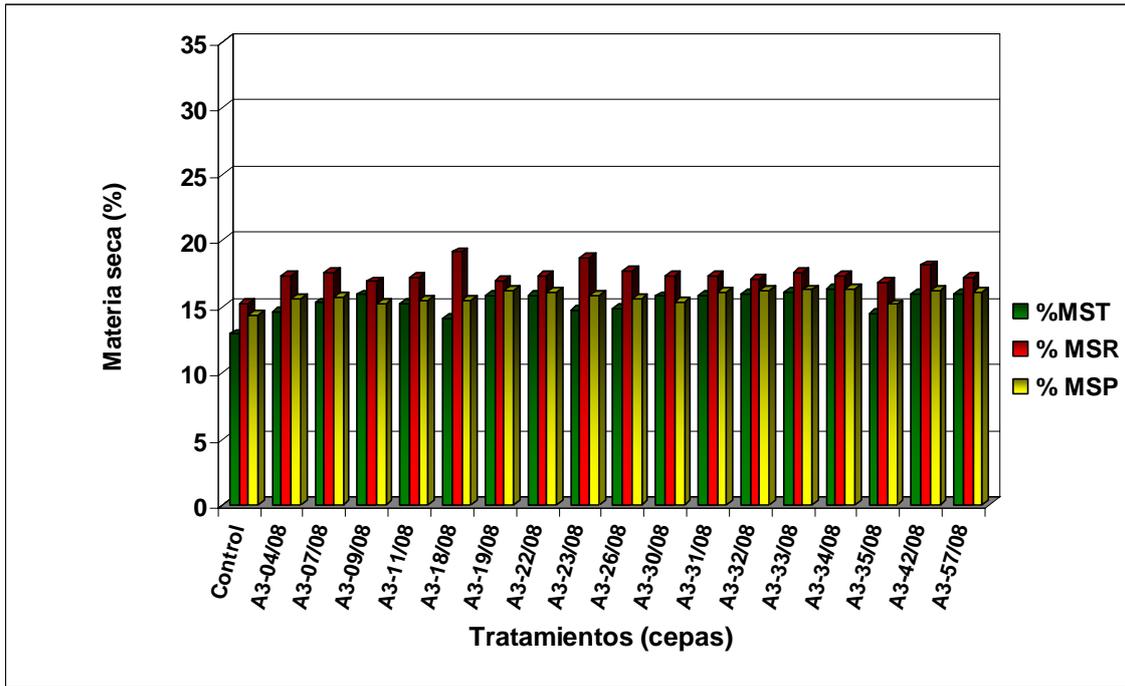


Figura 45. Comparación de los porcentajes de materia seca de tubérculo (MST), raíz (MSR) y planta (MSP) para cada tratamiento con *Azotobacter* spp.

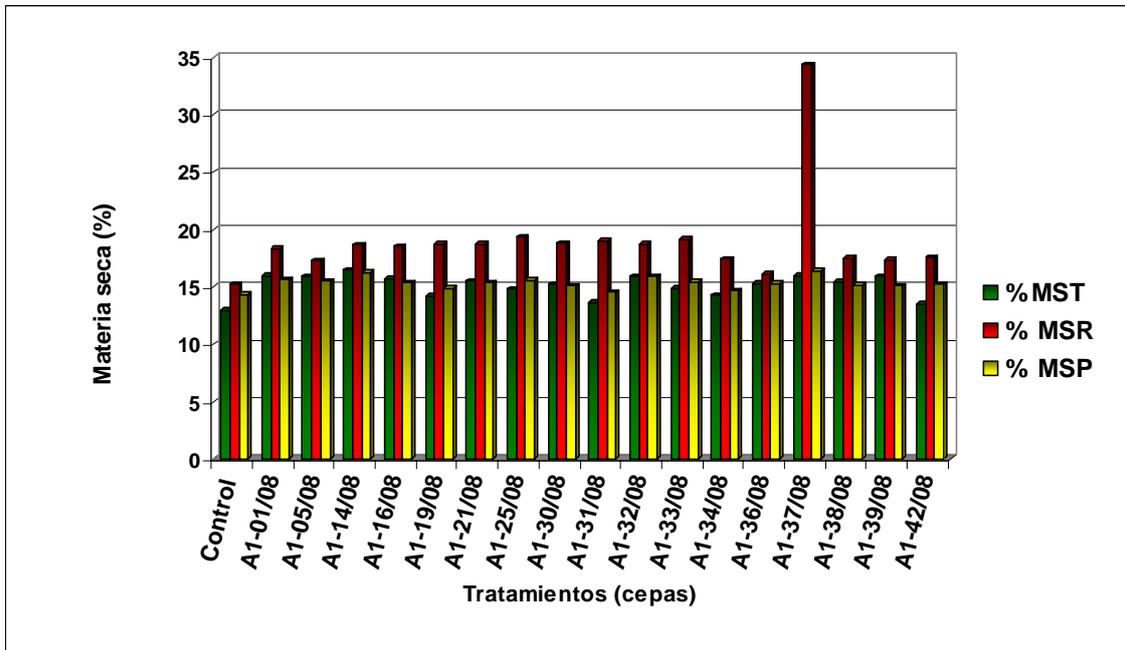


Figura 46. Comparación de los porcentajes de materia seca del tubérculo (MST), raíz (MSR) y planta (MSP) para cada tratamiento con Actinomicetos.

## ANEXO. MEDIOS DE CULTIVO

### 1. MEDIO MINERAL SIN NITROGENO (MMSN) – g/L

---

---

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,655
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,20
NaCl	0,02
CaCl <sub>2</sub>	0,01
Cl <sub>3</sub> Fe (0.1% en solución)	3,40 ml
NaMoO <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O)	0,0108
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,15
Manitol	10,0
Agar	15,0
Sacarosa	10,0
*Azul de bromotimol 5%	5,0 ml
**Púrpura de bromocresol	0,04
Agua destilada	1000 ml
pH	7

---

---

Crecimiento de *Azotobacter*

\* En caldo. \*\* En agar

### 2. AGAR PAPA DEXTROSA (PDA) – g/L

---

---

Infusión de papa (200g de papa)	4,0 ml
D-glucosa	20,0
Agar	15,0
Agua destilada	1000 ml
pH	5,6±0,1

---

---

### 3. AGAR ALMIDON CASEINA – g/L

---

---

Almidón	10,0
Caseína	0,30
Nitrato de Potasio	2,00
NaCl	2,00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,00
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,05
CaCO <sub>3</sub>	0,02
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01
Agar	15,0
Agua destilada	1000 ml
pH	7

---

---

### 4. MEDIO PLATE COUNT (BACTERIAS) – g/L

---

---

Triptona	5,0
Extrato de carne	2,5
Dextrosa	1,0
Agar	15,0
Agua destilada	1000 ml
pH	7

---

---

## 5. MEDIO DE CULTIVO NATIONAL BOTANICAL RESEARCH INSTITUTE'S PHOSPHATE (NBRIP)

---

---

Glucosa	10,0
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> )	5,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>2</sub>	0,1
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25
KCl	0,2
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	5,0
Agar	15,0
Agua Destilada	1000 ml
pH	7

---

---

## 6. SOLUCIÓN DE SALKOWSKY

---

---

2% de FeCl<sub>3</sub> 0,05M en 35% de Ácido Perclórico

---

---

## 7. AGAR WINOGRADSKY – g/L

---

---

Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1.0
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	1.0
CaCO <sub>3</sub>	0.1
Glucosa	10.0
Agar	15.0
N – butanol	0.2 (ml/100)

- Solución Stock (g/200ml)

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50.0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	25.0
NaCl	25.0
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1.0

---

---

Formación de quistes en *Azotobacter*

## 8. AGAR ASHBY – g/L

---

---

Benzoato	5,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,005
NaCl	0,2
CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	0,2
Agar	15,0
pH	7

---

---

Produccion de pigmentos *Azotobacter*

## 9. MEDIO BASE PARA UTILIZACION DE CARBOHIDRATOS – g/L

---

---

(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	2,64
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,38
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,65
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,00
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0064
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,0011
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,007
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,0015
Agar	15,0
Carbohidratos	10,0

---

---

Utilización de carbohidratos – Actinomicetos

## 10. AGAR GLICEROL – ASPARAGINA – g/L

---

---

L-asparagina	1,0
Glicerol	10,0 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0
Agua destilada	1000 ml
Agar	20,0
Solucion de sales	1,0 ml

- Solución de Sales (g/100ml)

FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,0
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,0
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1
Agua destilada	100 ml

---

---

Producción de pigmentos solubles – Actinomicetos

## 11. AGAR TRIPTICASA SOYA (TSA) – g/L

---

---

Tripticasa	17,0
Peptona	3,0
Cloruro de sodio	5,0
Fosfato dipotásico	2,5
Dextrosa	2,50
Agua destilada	1000 ml

---

---

Crecimiento de *Azotobacter*

## 12. AGAR NUTRITIVO – g/L

---

---

Extracto de carne	1,0
Extracto de levadura	2,0
Peptona	5,0
Cloruro sódico	5,0
Agar	15,0
Agua destilada	1000 ml

---

---

Crecimiento de Actinomicetos

### 13. AGAR Cromoazurol S (CAS) – g/L

---

---

#### Solución 1: CAS – HDTMA

Chrome azurol S	60,5 mg (1.21 mg/ml)
Agua bidestilada	50,0 ml
Sol. 1mM FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O (en 10 mM HCl)	100 ml

#### Solución 2: 10 x MM9

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0
NaCl	5,0
NH <sub>4</sub> Cl	10,0
Agua destilada	1000 ml

#### Solución 3: CAS Agar

NaOH	6,0
PIPES	30,24
10xMM9	100 ml
Agar	15,0

#### Solución 4: Casaminoácidos

Casaminoácidos	10 g
Agua destilada	100 ml

---

---

Producción de Sideróforos

