



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES
CARRERA DE AGRONOMÍA

Trabajo de Integración
Curricular previo a la
obtención del Grado
Académico de Ingeniero
Agrónomo

Proyecto de Investigación:

“EVALUACIÓN DE *Azospirillum* spp. COMO PROMOTORA DE
CRECIMIENTO Y SU ACTIVIDAD FIJADORA DE NITRÓGENO EN EL
CULTIVO DE MAÍZ (*Zea mays* L.)”

Autor:

Jorge Luis Ponce Aimacaña

Director del Proyecto de Investigación:

Ing. Daniel Federico Vera Avilés, PhD.

Quevedo - Los Ríos – Ecuador

2023



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y SESIÓN DE DERECHOS

Yo, **Jorge Luis Ponce Aimacaña**, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado de calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en el documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondiente a este documento, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

Jorge Luis Ponce Aimacaña
C.C: 1206818609



CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El suscrito, **Ing. Daniel Federico Vera Avilés PhD**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que el estudiante **Jorge Luis Ponce Aimacaña**, realizó el Trabajo de Investigación de Grado titulado “**Evaluación de *Azospirillum* spp. Como promotora de crecimiento y su actividad fijadora de nitrógeno en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.)**”, previo a la obtención del Grado Académico de **Ingeniero Agrónomo**, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Ing. Daniel Federico Vera Avilés, PhD.

DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO

El suscrito, **Ing. Daniel Federico Vera Avilés PhD.**, mediante el presente cumpla en presentar a usted, el informe de proyecto de Investigación titulado “**Evaluación de *Azospirillum* spp. como promotora de crecimiento y su actividad fijadora de nitrógeno en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.)**”, Presentado por el estudiante a **Jorge Luis Ponce Aimacaña**, egresado de la Carrera de Agronomía, que fue revisado bajo mi dirección según resolución del Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, que se ha desarrollado de acuerdo al Reglamento de la Unidad de Integración Curricular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y cumple con el requerimiento de análisis de URKUND el cual avala los niveles de originalidad en un 98% y similitud 2%, del trabajo investigativo. Valido este documento para que el estudiante siga con los trámites pertinentes, de acuerdo como lo establece el Reglamento.

Document Information

Analyzed document	AVANCE_TESIS Final. PONCE Urkund.docx (D179661922)
Submitted	2023-11-23 15:36:00
Submitted by	Vera Aviles Daniel Federico
Submitter email	dvera@uteq.edu.ec
Similarity	2%
Analysis address	dvera.uteq@analysis.arkund.com

Ing. Daniel Federico Vera Avilés, PhD.

DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE AGRONOMÍA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

“Evaluación de *Azospirillum* spp. Como promotora de crecimiento y su actividad fijadora de nitrógeno en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.)”

Presentado al Consejo Directivo de Facultad como requisito previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo.

Aprobado por:

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Luis Tarquino Llerena Ramos, Msc.

INTEGRANTE DEL TRIBUNAL

Ing. Víctor Manuel Guamán Sarango, PhD.

INTEGRANTE DEL TRIBUNAL

Ing. Carlos Luis Sánchez Fonseca, PhD.

QUEVEDO – LOS RÍOS – ECUADOR

2023

AGRADECIMIENTO

Expreso mi agradecimiento primordialmente a Dios sin él no se podría haber hecho este sueño posible, por siempre guiarme y no saltarme de su mano, por siempre tener a mi familia unida.

Agradezco a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo por dirigirme en mi desarrollo completamente como profesional. A los profesores de la facultad por brindarme sus conocimientos en este largo tiempo en la institución. Estoy agradecido por prestarme las instalaciones para desarrollar completamente mi tesis.

Mis cordiales Agradecimientos a mis tutores Ing. Fernando Cabezas y Ing. Daniel Vera, Ing. Ángel Cedeño, a las ingenieras Vanessa Arellano, Daysi Puentes, Génesis Molina, por su dedicación y sus conocimientos en este trabajo de investigación. Sin dejar a un lado a mis amigos por siempre apoyarme y brindarme sus consejos.

DEDICATORIA

A Dios por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida. Por triunfos y momentos difíciles que me han enseñado a valorarte cada día más.

Para mi madre Luisa Esperanza Aimacaña Cedeño por haberme guiado por sus consejos por el amor incondicional por estar siempre conmigo le dedico este logro. Gracias por creer en mí y por estar siempre a mi lado en cada etapa de mi vida.

Les dedico este logro a mis abuelos Lic. Blanca Leonor Cedeño López y Lic. Jorge Raúl Aimacaña Narváez que desde el primer momento me inculcaron el estudio y siempre me apoyaron por su sacrificio y dedicación para mí y poder lograr este triunfo. También para mis hermanas Evelyn y Julexy por su amor incondicional y siempre apoyarme.

En especial esta dedicación va dirigida al cielo donde este el Lic Jorge Raúl Aimacaña Narváez por guiarme desde donde sea que este y cuidarme aconsejarme él decía siempre la mejor herencia que se les puede dejar es el estudio. Té dedico este logro al cielo, sé que estas orgulloso de mí.

A mi Tíos, Tías y a mi familia en general por siempre apoyarme, motivarme, por sus consejos a todos les dedico ese logro, por ayudarme a formarme como persona.

A mi novia Sonia Arteaga por sus consejos, por brindarme su amor y alientos de apoyo incondicional. Este logro va dedicado para todas estas personas importantes en mi vida.

Jorge Luis Ponce Aimacaña

RESUMEN

El maíz (*Zea mays* L.) es una planta ampliamente cultivada a nivel mundial, y como la mayoría de cultivos demanda de fertilizantes para aumentar su rendimiento. Sin embargo, los costos de los fertilizantes nitrogenados han aumentado significativamente. *Azospirillum* spp. es una bacteria que puede fijar nitrógeno y promover el crecimiento de las plantas. El presente estudio se enfocó en evaluar *Azospirillum* spp., como promotora de crecimiento y su actividad fijadora de nitrógeno en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.). La investigación se realizó en el laboratorio de microbiología del Campus “La María” de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Se utilizaron tres cepas en tres medios de cultivo y se empleó un diseño experimental completamente al azar (DCA). Los resultados mostraron variaciones en la densidad óptica de las bacterias a lo largo del tiempo. En cuanto a la germinación de las semillas y las variables agronómicas del maíz con *Azospirillum* spp., hubo diferencias significativas entre los tratamientos. La cepa *Azospirillum* spp.1 tuvo la tasa de germinación más alta y un mayor crecimiento en la altura y la longitud radicular. El número de raíces no mostró diferencias significativas, pero los tratamientos con *Azospirillum* spp.1 y *Azospirillum brasilense* tuvieron más raíces. En las variables peso fresco y seco de la planta, y el contenido de clorofila en las hojas, *Azospirillum* spp.1 también tuvo los valores más altos. Este estudio demostró que *Azospirillum* spp. puede tener un impacto positivo en el crecimiento, lo que podría contribuir a reducir la dependencia de los fertilizantes químicos, ofreciendo una alternativa beneficiosa en tiempos de aumento de costos de fertilizantes.

Palabras claves: Clorofila, fertilizantes, germinación, densidad óptica, fijador de nitrógeno

ABSTRACT

Corn (*Zea mays* L.) is a widely cultivated plant worldwide, and like any crop, it requires synthetic fertilizers to increase its yield. However, nitrogen fertilizer costs have increased in recent years. *Azospirillum* spp. It is a bacterium that can fix nitrogen and promote plant growth. The study focused on evaluate *Azospirillum* spp., as a growth promoter and its nitrogen fixing activity in corn (*Zea mays* L.) cultivation. The research was carried out in the microbiology laboratory of the Campus “La María” of the Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Three strains were used in three culture media and a completely randomized experimental design (DCA) was used. The results showed variations in optical density over time. Regarding seed germination and agronomic variables of corn with *Azospirillum* spp., there were significant differences between treatments. The *Azospirillum* spp.1 strain had the highest germination rate and greater growth in height and root length. The number of roots did not show significant differences, but the treatments with *Azospirillum* spp.1 and *Azospirillum brasilense* had more roots. In the fresh and dry weight of the plant, as well as in the chlorophyll content in the leaves, *Azospirillum* spp.1 also had the highest values. This study demonstrated that *Azospirillum* spp. can have a positive impact on the growth and quality of corn, which could contribute to reducing dependence on chemical fertilizers, offering a beneficial alternative in times of increasing fertilizer costs.

Keywords: Chlorophyll, fertilizers, germination, optical density

TABLA DE CONTENIDO

Portada	i
Declaración de autoría y sesión de derechos	ii
Certificación de culminación del proyecto de investigación.....	iii
Certificado de reporte de la herramienta de prevención de coincidencia y/o plagio académico	iv
Certificado de aprobación de tribunal	v
Agradecimiento	vi
Dedicatoria.....	vii
Resumen.....	viii
Abstract.....	ix
Tabla de contenido	x
Código dublín.....	xvi
Introducción.....	1
CAPÍTULO I. CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	3
1.1. Problema de la investigación	4
1.1.1. Planteamiento del problema.....	4
1.1.2. Formulación del problema	5
1.1.3. Sistematización del problema	5
1.2. Objetivos.....	6
1.2.1. Objetivo general.....	6
1.2.2. Objetivos específicos.....	6
1.3. Justificación	7
CAPÍTULO II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN	8
2.1. Marco conceptual	9
2.1.1. <i>Azospirillum</i> spp.	9
2.1.2. Fijación de nitrógeno.....	9
2.1.3. Sustratos convencionales	9
2.1.4. Maíz (<i>Zea mays</i> L.)	9
2.1.5. Dinámica de crecimiento	10
2.1.6. Interacción planta-microorganismo.....	10
2.1.7. Aplicaciones agrícolas	10
2.2. Marco referencial	10

2.2.1.	Origen del maíz	10
2.2.2.	Clasificación taxonómica del maíz.....	10
2.2.3.	Características del maíz	11
2.2.4.	Género Azospirillum	12
2.2.5.	Mecanismos de acción	13
2.2.6.	Nutrición bacteriana	13
2.2.7.	Clasificación de los microorganismos según la forma de obtener el alimento	14
2.2.8.	Medios de cultivo	15
2.2.9.	Curva de crecimiento microbiano	17
2.2.10.	Ciclo de Crecimiento de Poblaciones	18
2.2.11.	Otras investigaciones relacionadas	18
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN		22
3.1.	Localización	23
3.2.	Tipo de investigación	23
3.3.	Método de investigación	23
3.3.1.	Método deductivo.....	23
3.3.2.	Método analítico.....	23
3.3.3.	Método de observación.....	23
3.4.	Fuentes de recopilación de información	24
3.5.	Diseño de la investigación	24
3.5.1.	Factores en estudio	24
3.5.2.	Tratamientos.....	25
3.5.3.	Diseño experimental	26
3.6.	Instrumentos de investigación	26
3.6.1.	Manejo del experimento	26
3.6.2.	VARIABLES A EVALUAR	29
3.7.	Tratamiento de los datos	30
3.8.	Recurso materiales y humanos	31
3.8.1.	Materiales de Laboratorio	31
3.8.2.	Equipos de Laboratorio.....	32
3.8.3.	Materiales de Oficina.....	32
3.8.4.	Material biológico	32
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		33
4.1.	Resultados	34

4.1.1.	Crecimiento bacteriano.....	34
4.1.2.	Porcentaje de semillas germinadas.....	36
4.1.3.	Altura de planta.....	38
4.1.4.	Longitud radicular.....	41
4.1.5.	Numero de raíces.....	44
4.1.6.	Volumen radicular.....	46
4.1.7.	Peso fresco.....	49
4.1.8.	Peso seco.....	52
4.1.9.	Clorofila.....	54
4.2.	Discusión.....	57
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		62
5.1.	Conclusiones.....	63
5.2.	Recomendaciones.....	64
CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA.....		65
6.1.	Bibliografía.....	66
CAPÍTULO VII. NEXOS.....		71
7.1.	Anexos.....	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía del maíz	11
Tabla 2. Formulación de medio nutritivo.....	16
Tabla 3. Esquema de análisis de varianza	26
Tabla 4. Tratamientos para la cinética de crecimiento.....	26
Tabla 5. Esquema de análisis de varianza para (germinación <i>in vitro</i> – <i>in vivo</i>)	26
Tabla 6. Tratamientos para la (germinación <i>in vitro</i> – <i>in vivo</i>)	27

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1. Densidad Óptica de las bacterias en el medio 1	34
Figura 2. Densidad Óptica de las bacterias en el medio 2	34
Figura 3. Densidad Óptica de las bacterias en el medio 3	36
Figura 4. Porcentaje de germinación de semillas después de aplicar <i>Azospirillum</i> spp. ...	37
Figura 5. Altura de planta de maíz después de la aplicación de <i>Azospirillum</i> spp.....	39
Figura 6. Longitud radicular después de aplicar <i>Azospirillum</i> spp.....	42
Figura 7. Número de raíces después de aplicar <i>Azospirillum</i> spp.	45
Figura 8. Volumen radicular después de aplicar <i>Azospirillum</i> spp.....	47
Figura 9. Peso fresco de la planta después de aplicar <i>Azospirillum</i> spp.	50
Figura 10. Peso seco de la planta después de aplicar <i>Azospirillum</i> spp.....	52
Figura 11. Clorofila de la planta después de aplicar <i>Azospirillum</i> spp.....	55

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A. Aislamiento y replicación de las cepas de <i>Azospirillum</i> spp.....	72
Anexo B. Aplicación de las cepas bacterianas a las semillas de maíz	72
Anexo C. Evaluación de la germinación	73
Anexo D. Siembra de semillas de maíz inoculadas con las bacterias	73
Anexo E. Evaluación de variables agronómicas	74
Anexo F. ADEVA de Curva de crecimiento por densidad Óptica (OD) a 559nm.	74
Anexo G. ADEVA de Número de semillas germinadas.....	75
Anexo H. ADEVA de Altura de planta.	76
Anexo I. ADEVA de Peso fresco.....	76
Anexo J. ADEVA de Peso seco	77
Anexo K. ADEVA de Longitud radicular	77
Anexo L. ADEVA de Volumen radicular	78
Anexo M. ADEVA de Clorofila	78

CODIGO DUBLÍN

Título:	“Evaluación de <i>Azospirillum</i> spp. Como promotora de crecimiento y su actividad fijadora de nitrógeno en el cultivo de maíz (<i>Zea mays</i> L.)”
Autor:	Jorge Luis Ponce Aimacaña
Palabras Clave:	Clorofila, fertilizantes, germinación, densidad óptica
Fecha de publicación:	
Editorial:	Quevedo: UTEQ, 2023
Resumen:	El maíz (<i>Zea mays</i> L.) es una planta ampliamente cultivada a nivel mundial, y los fertilizantes se utilizan para aumentar su rendimiento. Sin embargo, los costos de los fertilizantes nitrogenados han aumentado en los últimos años. <i>Azospirillum</i> spp. es una bacteria que puede fijar nitrógeno y promover el crecimiento de las plantas. El estudio se enfocó en evaluar <i>Azospirillum</i> spp., como promotora de crecimiento y su actividad fijadora de nitrógeno en el cultivo de maíz (<i>Zea mays</i> L.). La investigación se realizó en el laboratorio de microbiología del Campus “La María” de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (...)
Abstract:	Corn (<i>Zea mays</i> L.) is a widely cultivated plant worldwide, and fertilizers are used to increase its yield. However, nitrogen fertilizer costs have increased in recent years. <i>Azospirillum</i> spp. It is a bacterium that can fix nitrogen and promote plant growth. The study focused on evaluate <i>Azospirillum</i> spp., as a growth promoter and its nitrogen fixing activity in corn (<i>Zea mays</i> L.) cultivation. The research was carried out in the microbiology laboratory of the Campus “La María” of the Universidad Técnica Estatal de Quevedo (...)
Descripción:	95 hojas: dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM 6162
URI:	

Introducción

El maíz (*Zea mays* L.), es cultivado desde épocas prehispánicas, y se conoce con el nombre de sara o Kuri sara en México (Piperno, 2003). Es una planta monocotiledónea muy cultivada, siendo un alimento de consumo básico a nivel mundial (Paliwal, 2011). En Ecuador el maíz es el segundo más importante de los cultivos transitorios después del arroz, siendo la principal materia prima para la industria de alimentos balanceados (INEC, 2014). Actualmente se produce para forrajes, granos para la alimentación animal y elaboración de productos derivados para el consumo humano (Jayaram *et al.*, 2004).

La aplicación de fertilizantes tiene como objetivo que el cultivo absorba los nutrientes agregados para incrementar su rendimiento y calidad. (Rimski *et al.*, 2015). Es un factor clave para conseguir un aumento sustancial en las producciones agrícolas (Alexandratos, 2010). El drench es considerada como una técnica de fertilización que consiste en la aplicación de los fertilizantes de uso tradicional mezclado y disuelto en agua (Figuroa, 2012).

El desarrollo de las raíces de las plantas hasta la superficie del suelo se produce principalmente al movimiento o transporte de nutrientes en la solución del suelo. La concentración de estos nutrientes juega un papel crucial en el suministro adecuado de elementos esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta (Marschner, 2012). La utilización de biofertilizantes se considera una opción para sustituir parcial o totalmente el uso de los fertilizantes químicos. Las bacterias que interactúan con plantas son consideradas como una opción viable para desarrollar biofertilizantes (Caballero, 2006).

Actualmente, se dificulta la adquisición de fertilizantes nitrogenados para lograr elevados rendimientos de producción, debido al notable aumento en los costos de los fertilizantes químicos en los últimos años (Avis, 2008). Esta situación ha traído la necesidad de buscar mejoras para la producción agrícola con fertilizantes biológicos que permitan mejorar la producción del maíz, evitando su degradación y contaminación del suelo y acuíferos (Martinez, 2018).

Azospirillum spp., es una bacteria de vida libre, fijadora de nitrógeno, aislada de la rizósfera y productora de fitohormonas capaces de acelerar y potenciar el crecimiento de las plantas (Martinez, 2018). La fitohormona más importante producida por *Azospirillum* spp. es la auxina ácido indol-3-acético (AIA). Las plantas presentan cambios morfológicos en las raíces, así como también una mejor absorción de minerales después de inocularse con *Azospirillum* spp., estos cambios se atribuyen a la liberación de AIA por esta bacteria (Steenhoudt *et al.*, 2000).

Se han descrito las características de las bacterias y microorganismos, además de la importancia de tener un medio ambiente adecuado para su desarrollo y crecimiento. El control de parámetros como pH, temperatura, nutrientes, elementos traza, etc. son determinantes para este fin. Una vez que los microorganismos se han aclimatado y disponen de todos los medios que se requieren para su crecimiento, estos consumen la materia orgánica que se encuentra presentes, como parte de su alimentación (Rocha, 2008).

Cuanto mayor sea el número de microorganismos, mayor es la velocidad a la cual es utilizado el alimento o sustrato. Para óptimos resultados, debe tenerse un control en la velocidad de crecimiento y reproducción de las bacterias, para lo cual es necesario estudiar la cinética de crecimiento biológico (Rocha, 2008).

Ante lo expuesto, esta investigación tendrá como objetivo evaluar *Azospirillum* spp., como promotora de crecimiento y su actividad fijadora de nitrógeno en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.), esperando poder incrementar la producción del microorganismo y la actividad fijadora de nitrógeno que conllevará a una mejora en el estado fisiológico de las plantas

CAPÍTULO I
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1.Problema de la investigación

1.1.1. Planteamiento del problema

El alto costo de los medios de cultivo sintéticos para la producción masiva de *Azospirillum* spp., así como la falta de investigaciones sobre la dinámica de crecimiento de esta bacteria y la escasez de estudios sobre medios de cultivo económicos, son dos factores limitantes para iniciar su producción a mayor escala. Estos factores dificultan la realización de ensayos a nivel de laboratorio y de campo.

Además, considerando los numerosos beneficios de este microorganismo en la estimulación del crecimiento, desarrollo y fijación de nitrógeno en las plantas, así como en la protección contra patógenos y otros factores, su producción a gran escala podría convertirse en una herramienta valiosa para la producción integrada de gramíneas como el maíz. Esto permitiría reducir la dependencia de fertilizantes químicos, que no solo causan contaminación del suelo y el agua, sino que también representan un alto costo económico en la actualidad, aumentando los gastos de producción.

Diagnóstico

El alto costo de los medios de cultivo sintéticos limita la producción a gran escala de *Azospirillum* spp., un microorganismo con beneficios para el crecimiento de plantas y la fijación de nitrógeno. La falta de investigaciones sobre su dinámica de crecimiento y la escasez de estudios sobre medios de cultivo económicos dificultan su producción en grandes cantidades para su posterior uso en ensayos *in vitro*.

Pronóstico

Si no se implementan medidas ecológicas para fertilizar los cultivos y multiplicar *Azospirillum* spp., se pueden generar impactos negativos en el ambiente, como la contaminación del suelo y del agua debido al uso excesivo de fertilizantes químicos. Esto puede resultar en la pérdida de biodiversidad, la degradación del suelo y la dependencia económica de los agricultores hacia los productos químicos. Es importante buscar alternativas más sostenibles, como la producción masiva de *Azospirillum* spp., para

minimizar estos impactos y promover la salud del medio ambiente y la economía agrícola a largo plazo.

1.1.2. Formulación del problema

¿Cómo se comporta la dinámica de crecimiento de *Azospirillum spp.*, en diferentes sustratos convencionales y su actividad fijadora de nitrógeno en maíz (*Zea mays* L.)?

1.1.3. Sistematización del problema

¿Cómo establecer la dinámica de crecimiento de *Azospirillum spp.* en sustratos convencionales y su actividad fijadora de nitrógeno en maíz (*Zea mays* L.)?

¿Cómo evaluar la eficiencia de *Azospirillum spp.* en la germinación de semilla de maíz *in vitro*?

¿Cómo determinar la eficiencia y actividad fijadora de nitrógeno de *Azospirillum spp.* en el crecimiento de maíz estadio V7?

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Evaluar *Azospirillum* spp., como promotora de crecimiento y su actividad fijadora de nitrógeno en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.)

1.2.2. Objetivos específicos

- Establecer la dinámica de crecimiento de *Azospirillum* spp. en sustratos convencionales y su actividad fijadora de nitrógeno en maíz (*Zea mays* L.)
- Evaluar la eficiencia de *Azospirillum* spp. en la germinación de semillas de maíz *in vitro*.
- Determinar la eficiencia y actividad fijadora de nitrógeno de *Azospirillum* spp. en el crecimiento de maíz estadio V7.

1.3. Justificación

El maíz es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial, tanto en términos de seguridad alimentaria como de impacto económico. Mejorar la productividad y la calidad del maíz es fundamental para abastecer la creciente demanda de alimentos y asegurar la sustentabilidad agrícola.

Azospirillum spp. es conocida por su capacidad para promover el crecimiento vegetal y la fijación de nitrógeno. Estos microorganismos benéficos pueden colonizar las raíces de las plantas, proporcionarles nutrientes adicionales y compuestos bioactivos que estimulan su desarrollo y resistencia a enfermedades.

Los fertilizantes nitrogenados sintéticos, ampliamente utilizados en la agricultura, son costosos y tienen impactos negativos en el medio ambiente, como la contaminación del agua y la emisión de gases de efecto invernadero. El uso de *Azospirillum* spp. como promotor de crecimiento y fijador de nitrógeno en el maíz podría reducir la dependencia de los fertilizantes químicos, contribuyendo a la sostenibilidad y la reducción de la contaminación ambiental.

Investigar el crecimiento de *Azospirillum* spp. en diferentes sustratos y su efectividad en el cultivo de maíz permite identificar las condiciones óptimas para su producción masiva y aplicación en campo. Esto permitiría maximizar el rendimiento de las cepas de *Azospirillum* spp., optimizar el uso de recursos como el sustrato y mejorar la eficiencia de la fijación de nitrógeno en el maíz.

La promoción del crecimiento y la fijación de nitrógeno por parte de *Azospirillum* spp. pueden ser elementos clave en sistemas agrícolas sostenibles. El uso de este microorganismo como biofertilizante en el cultivo de maíz puede reducir la necesidad de fertilizantes químicos, mejorar la calidad del suelo y promover prácticas agrícolas más respetuosas con el medio ambiente.

CAPITULO II
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco conceptual

2.1.1. *Azospirillum* spp.

Este género de bacterias incluye varias especies, como *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum lipoferum*, que son conocidas por su capacidad de establecer una relación simbiótica con plantas, incluyendo el maíz. Estas bacterias colonizan las raíces de las plantas y pueden influir positivamente en su crecimiento y desarrollo (Aguirre *et al.*, 2014).

2.1.2. Fijación de nitrógeno

Azospirillum spp. son bacterias fijadoras de nitrógeno. Esto significa que tienen la capacidad de convertir el nitrógeno atmosférico (N₂) en una forma que las plantas pueden utilizar, como amonio (NH₄⁺) o nitrato (NO₃⁻). Esta capacidad es beneficiosa para las plantas, ya que el nitrógeno es un nutriente esencial para su crecimiento (Estrada y Bonilla, 2023).

2.1.3. Sustratos convencionales

Se refiere a los suelos de cultivo estándar o convencionales utilizados en la agricultura. Estos suelos pueden variar en contenido de nutrientes, pH y otros factores que afectan el crecimiento de las plantas y la actividad microbiana. La dinámica de crecimiento de *Azospirillum* spp. puede variar en función de las condiciones del suelo (Aguirre *et al.*, 2011).

2.1.4. Maíz (*Zea mays* L.)

El maíz es un cultivo ampliamente cultivado en todo el mundo y es particularmente importante en la agricultura. La capacidad de *Azospirillum* spp. para fijar nitrógeno en las raíces de las plantas de maíz puede mejorar la disponibilidad de nitrógeno para el cultivo y, en última instancia, aumentar el rendimiento (Cortez, 2012).

2.1.5. Dinámica de crecimiento

Se refiere al patrón de proliferación y colonización de *Azospirillum* spp. en las raíces y el suelo circundante. Esto puede depender de factores como la densidad de población bacteriana, la disponibilidad de nutrientes y otros factores ambientales (Tagliaferro, 2021).

2.1.6. Interacción planta-microorganismo

La relación entre *Azospirillum* spp. y el maíz es un ejemplo de interacción planta-microorganismo beneficioso. La planta proporciona un ambiente propicio para el crecimiento de las bacterias y, a cambio, las bacterias ayudan a la planta a adquirir nitrógeno y nutrientes de manera más eficiente (Guzmán et al., 2012).

2.1.7. Aplicaciones agrícolas

La comprensión de la dinámica de crecimiento de *Azospirillum* spp. y su actividad fijadora de nitrógeno en maíz tiene implicaciones prácticas en la agricultura. Los agricultores pueden considerar la inoculación de cultivos con *Azospirillum* spp. como una estrategia para mejorar la nutrición de las plantas y reducir la necesidad de fertilizantes nitrogenados sintéticos.

2.2. Marco referencial

2.2.1. Origen del maíz

El maíz se originó en las tierras altas de México hace 7000 y 10,000 años. Los datos arqueológicos han demostrado que el maíz se cultivó en el año 2000 – 2500 AC. El registro más antiguo del maíz data de 5000 años AC se encontró en los sitios arqueológicos denominados “La Playa” y “Nevada”, ubicados en el valle de Tehuacán. En el occidente de México se encontraron dos tipos de teosintes llamados Chalco y Balsas, ubicados en altitudes altas y bajas, respectivamente (García y Serna, 2009).

2.2.2. Clasificación taxonómica del maíz

Clasificación taxonómica del maíz según (Arca, 2018) (Tabla 1):

Tabla 1

Taxonomía del maíz

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsida
Orden:	Poales
Familia:	Poaceae
Tribu:	Maydeae
Género:	<i>Zea</i>
Especie:	<i>Zea mays</i> L.

Elaborado: Autor

2.2.3. Características del maíz

2.2.3.1. Raíces.

Las raíces son fasciculadas y su misión es la de aportar un perfecto anclaje a la planta. En algunos casos sobresalen unos nudos de las raíces a nivel del suelo y suele ocurrir en aquellas raíces secundarias o adventicias (García y Serna, 2009).

2.2.3.2. Tallo.

El tallo es simple, erecto, de elevada longitud pudiendo alcanzar los 4 metros de altura, robusto y sin ramificaciones. Por su aspecto recuerda al de una caña y presenta una médula esponjosa si se realiza un corte transversal (García y Serna, 2009)

2.2.3.3. Hojas.

Están formadas por la vaina, cuello y lámina foliar; siendo largas, anchas, flexuosas, de bordes y superficies ásperas, con nerviación paralela. La vaina es una estructura cilíndrica, abierta hasta la base, que envuelve el tallo. El cuello es la zona de transición entre la vaina y la lámina, en el que se halla una lígula. La lámina propiamente dicha mide hasta 1,5 m de largo por 10 cm de ancho, terminada en un ápice agudo (García y Serna, 2009).

2.2.4. Género *Azospirillum*

El nombre *Azospirillum* proviene del francés Azote, que significa nitrógeno y del grupo *Spirillum*, pequeña espiral. Su descubrimiento data del año 1925, cuando Beijerinck describió una nueva especie de bacteria, aislada a partir de suelo holandés, a la que primeramente nombró *Azotobacter spirillum* y que posteriormente denominó *Spirillum lipoferum* (Tarrand *et al.*, 1978). *Azospirillum* es considerada como una de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB, por sus siglas en inglés de *Plant Growth Promoting Bacteria*) más importantes (Cassán y Diaz, 2016).

La capacidad de esta bacteria de promover el crecimiento e incrementar la producción de diversas especies vegetales, se debe a la existencia de mecanismos de acción como la producción de fitohormonas, la fijación biológica de nitrógeno (FBN) y la capacidad para limitar el crecimiento de ciertos organismos fitopatógenos, como la antibiosis y la producción de sideróforos (Fukami *et al.*, 2018). *Azospirillum* es capaz de asociarse con 113 especies de plantas, 14 de las cuales son gramíneas y las restantes corresponden a otras 34 familias botánicas (Pereg *et al.*, 2016).

Poseen una amplia distribución ecológica, ya que ha sido posible detectar su presencia en zonas templadas, tropicales y subtropicales (Pazos, 2000), (Velazco, 2001). La morfología de las células depende de las condiciones nutricionales y edad del cultivo. Se observan formas eses y vibroides de 0,8 a 1 x 2 a 5 micrómetros de tamaño; se asocia además la aparición de formas quísticas o en C, como vía de resistencia a las condiciones de estrés y del mismo modo como mecanismo de supervivencia en la rizosfera (Bashan *et al.*, 1991).

La presencia de una respuesta quimiotáctica a diferentes compuestos, asociada a la existencia de vías metabólicas alternativas, convierten a *Azospirillum* en un organismo nutricionalmente versátil, pues le permiten consumir una amplia variedad de ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos y compuestos aromáticos que se encuentran disponibles en la rizosfera (Didonet y Magalhaes, 1997).

2.2.5. Mecanismos de acción

El principal mecanismo por el cual *Azospirillum* influye en el desarrollo y la productividad de las plantas es especulativo y aún motivo de debate. Algunas explicaciones incluyen: fijación de nitrógeno atmosférico, que contribuye al nitrógeno de la planta, efectos hormonales que alteran el crecimiento y metabolismo de la planta, incrementos del desarrollo, en general, del sistema radical que provoca un aumento en la toma de minerales y agua, actividad nitrato reductasa bacteriana en la raíz, que incrementa la acumulación de nitrato en plantas inoculadas y la teoría aditiva que plantea la sucesión de cada uno de estos mecanismos (Bashan *et al.*, 1991).

2.2.6. Nutrición bacteriana

Como nutrición se denomina al conjunto de procesos por los cuales los seres vivos toman del medio las sustancias que necesitan para su desarrollo (nutrientes) que requieren para su catabolismo (mantenimiento) y su anabolismo (crecimiento). De igual forma, las bacterias también realizan biosíntesis de nuevos compuestos celulares, que demandan energía procedente del medio ambiente (Lagier *et al.*, 2015).

Las bacterias reaccionan con una serie de elementos químicos, y de acuerdo con las cantidades en que son requeridos se encuentran macronutrientes como C, H, O, N, P, S, K, Mg y micronutrientes como Co, Cu, Zn y Mo, los cuales se encuentran combinados en la naturaleza, formando parte de sustancias orgánicas y/o inorgánicas (Kumar, 2012).

En las diferentes reacciones en las que intervienen, los elementos anotados anteriormente, forman iones que les permiten aumentar su estabilidad química y transportar electrones. La formación de iones positivos (cationes) o negativos (aniones) depende directamente de la configuración electrónica del elemento en estado basal y del carácter metálico del mismo (Petrucci *et al.*, 2017).

Así mismo, algunos de los nutrientes son incorporados para construir macromoléculas y estructuras celulares; otros, sólo se utilizan para la producción de energía, y no se incorporan directamente como material celular; y finalmente, unos pocos, pueden ejercer

ambos roles (Petrucci *et al.*, 2017).

Las bacterias heterótrofas, aunque no usan el CO₂ como fuente de Carbono ni como aceptor de electrones, necesitan pequeñas cantidades para realizar reacciones de carboxilación en procesos anabólicos y catabólicos. Las reacciones de carboxilación se caracterizan químicamente, por hacer uso de las moléculas de CO₂ como reactivos para producir moléculas más complejas (Karp, 2009).

El carbono es el elemento constituyente más abundante en las bacterias y, por tanto, dichos microorganismos producen, a su vez, biomoléculas como lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos. Normalmente, las bacterias crecen a la concentración de CO₂ atmosférico (0.03%). De tal forma que, la composición del medio de cultivo puede influir sobre diferentes aspectos en la fisiología del microorganismo y por ende en la producción de metabolitos primarios y secundarios (Bernal *et al.*, 2020).

2.2.7. Clasificación de los microorganismos según la forma de obtener el alimento

De acuerdo con la forma como las bacterias obtienen la energía, se clasifican en: Quimiótrofas, cuando la obtienen de sustancias orgánicas y Fotótrofas, cuando la obtienen de la luz (Corrales *et al.*, 2015), mientras que, dependiendo de la ganancia energética, se clasifican en: Litótrofas, cuando requieren sustancias inorgánicas como ácido sulfhídrico (H₂S), azufre elemental (S), amoníaco (NH₃), ion nitrito (NO₂⁻), Hierro (Fe), entre otros y Organótrofas, las que requieren compuestos orgánicos como carbohidratos, hidrocarburos, lípidos y proteínas, entre otros (Lagier *et al.*, 2015; Corrales *et al.*, 2015).

2.2.7.1. Fuente de Carbono.

El carbono interviene en la composición de los seres vivos y forma parte de la atmósfera, hidrosfera y litosfera. En la atmósfera se encuentra mayoritariamente en forma de anhídrido carbónico (CO₂), que constituye el 0,03% de la misma. En la hidrosfera, el carbono se encuentra en forma de ion bicarbonato (HCO₃⁻) y de ion carbonato (CO₃²⁻). En la litosfera se encuentra en tres maneras diferentes: formando rocas carbonatadas, silicatos cálcicos o en forma de combustibles fósiles (Navarro y Navarro, 2000).

El carbono se transfiere por el CO₂ de la atmósfera mediante el proceso de la fotosíntesis y vuelve a ella a través de la respiración de los animales, este compuesto es utilizado como fuente de energía y en la formación de moléculas, en el caso de muchos heterótrofos, difiriendo en la concentración y tipo de compuestos orgánicos que necesitan como fuente de carbono de acuerdo a su metabolismo (Madigan *et al.*, 2011).

Compuestos como los aminoácidos, ácidos grasos y compuestos aromáticos pueden ser usados por los microorganismos como fuente de carbono (Latorre, 2007). Las más empleadas fuentes de carbono las constituyen los carbohidratos que además son fuente de oxígeno, hidrógeno y energía metabólica. Los carbohidratos participan en la biosíntesis del material celular, así como en la formación de productos o metabolitos (Hernández *et al.*, 1988).

2.2.7.2. Importancia del nitrógeno y carbono en el crecimiento del bacteriano.

El diseño de medios de cultivo debe tener en cuenta los requerimientos nutricionales de estos microorganismos mediante la adición de los nutrientes en la forma y la proporción adecuadas. El estudio de las fuentes de carbono que emplean microorganismos heterótrofos como los rizobios permite una mayor comprensión de su ecología y su comportamiento durante la producción industrial de inoculantes (Madigan *et al.*, 2011).

La elección de la fuente de carbono óptima constituye uno de los aspectos fundamentales para elaborar inoculantes con elevada viabilidad y concentración bacterianas. Estos requisitos garantizan la efectividad del inoculante en el campo. Las fuentes de carbono más empleadas son los alcoholes y los hidratos de carbono, fundamentalmente mono y disacáridos. El medio estándar para el cultivo de los rizobios incluye manitol, sacarosa o glicerol como únicas fuentes de carbono (Singleton *et al.*, 2002).

2.2.8. Medios de cultivo

Un medio de cultivo es un sustrato o una solución de nutrientes que permite el desarrollo de microorganismos. En las condiciones de laboratorio para realizar un cultivo, se debe sembrar sobre el medio de cultivo elegido las muestras en las que los microorganismos van

a crecer y multiplicarse para dar colonias (López y Torres, 2006).

2.2.8.1. Medio nutritivos.

Son aquellos que poseen los componentes mínimos para que pueda producirse el crecimiento de bacterias que no necesiten requerimientos especiales. El medio más conocido de este grupo es el agar nutritivo o agar común, que resulta de la adición de agar al caldo nutritivo (Britania, 2021). Su formulación se muestra en la tabla 2.

Tabla 2

Formulación de medio nutritivo

Formulación

Tripteína

Peptona de carne

Fosfato dipotásico

Sulfato de magnesio

Agar

“Ph” FINAL: 7.2 ± 0.2

Elaboración: Autor

2.2.8.2. Medios de cultivo alternativo.

Normalmente se utilizan medios sintéticos de alta pureza y alto costo, los cuales, para la producción masiva de determinado microorganismo de interés resulta en algo no viable económicamente. Esto hace conveniente analizar la sustitución de estas materias primas por equivalente de menor costo, tomándose en cuenta que la menor pureza de los constituyentes del medio puede ocasionar variaciones en el proceso en ocasiones de manera positiva (Quintero y López, 1993).

La importancia de la sustitución de los medios sintéticos por medios de bajo costo radica en que estos suelen representar entre el 50 y el 70% de los costos de producción (Quintero y López, 1993).

2.2.8.3. Melaza de caña de azúcar.

La melaza, subproducto del proceso de refinación del azúcar, constituye una fuente rica de carbono (Osorio *et al.*, 2008). Las melazas, mieles finales o melazas “blackstrap”, suele ser definidas, por muchos autores como los residuos de la cristalización final del azúcar de los cuales no se puede obtener más azúcar por métodos físicos (Fajardo y Sarmiento, 2007).

La melaza contiene componentes fermentables como la glucosa, sacarosa, fructosa y rafinosa, así mismo, contiene componentes no fermentables como los caramelos libres de nitrógeno, que se obtienen por el calentamiento en el proceso de la obtención de azúcar refinada (Fajardo y Sarmiento, 2007).

2.2.9. Curva de crecimiento microbiano

La curva del crecimiento microbiano representa la evolución del número de células viables presente en un cultivo microbiano líquido a lo largo del tiempo de estudio. Se estudia el número de células viables por mililitro de un cultivo de volumen limitado y con una cantidad de nutrientes limitada, como por ejemplo un medio de cultivo líquido en un matraz que ha sido inoculado con una cantidad inicial de microorganismos o inóculo. En la curva de crecimiento se diferencian cuatro fases, la fase de retraso (a veces llamada fase de latencia), la fase de crecimiento exponencial o logarítmico, la fase estacionaria y la fase de muerte celular (Castillo y Ruiz, 2005).

Por métodos turbidimétricos, el fundamento de estos métodos radica en la interacción de la luz con un cultivo bacteriano. Las suspensiones bacterianas dispersan la luz, al igual que cualquier partícula "relativamente" pequeña suspendida en agua, por lo tanto, dicha dispersión es proporcional a la masa del cultivo. Esta medición se puede realizar con dos tipos de equipos (Georgiou *et al.*, 2020).

2.2.9.1. Espectrofotómetro.

Mide la densidad óptica (D.O.), es decir la absorbancia. En esta técnica hay que realizar una curva estándar para relacionar los valores de A (absorbancia) con la masa bacteriana en la muestra problema (Georgiou *et al.*, 2020).

2.2.10. Ciclo de Crecimiento de Poblaciones

En un medio líquido se pueden diferenciar cuatro fases en la evolución del crecimiento bacteriano:

2.2.10.1. Fase de adaptación.

Las bacterias acomodan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales y de nutrientes para iniciar el crecimiento exponencial (Kim *et al.*, 2016).

2.2.10.2. Fase exponencial o logarítmica.

Tanto la velocidad de crecimiento como el consumo de nutrientes son máximos, las bacterias tienen un tiempo de generación mínimo y corresponde a la fase de infección y multiplicación del agente infeccioso dentro del organismo (Kim *et al.*, 2016).

2.2.10.3. Fase estacionaria.

No se incrementa el número de bacterias y estas presentan un metabolismo diferente al de la fase exponencial; se observa acumulación y liberación de metabolitos secundarios que tienen importancia en el curso de las infecciones o intoxicaciones. Esta fase sucede porque se agotan uno o varios nutrientes esenciales en el medio, bien ser porque, los productos de desecho liberados en la fase de crecimiento exponencial convierten el medio en inhóspito para el crecimiento microbiano o por la presencia de competidores que limitan su crecimiento (Kim *et al.*, 2016).

2.2.10.4. Fase de muerte.

Se produce una reducción del número de bacterias viables del cultivo (Kim *et al.*, 2016).

2.2.11. Otras investigaciones relacionadas

La investigación realizada por (Rubiños 2019) tenía como objetivo examinar los efectos de

la inoculación de *Azospirillum* spp. en dos momentos diferentes en el desarrollo vegetativo de *Zea mays* bajo condiciones de invernadero. Los resultados indicaron que la inoculación de *Azospirillum* spp. en las semillas antes de la siembra y durante la emergencia del maíz condujo a un incremento significativo en el desarrollo vegetativo. Se observaron los mayores índices de efectividad en términos de altura (IE máximo=23,01%), biomasa aérea (IE máximo=57,14%), y radicular (IE máximo=97,07%) cuando las bacterias se inoculaban en las semillas antes de la siembra. Este estudio destacó el potencial de *Azospirillum* spp. como promotores del desarrollo vegetativo en el maíz.

En el trabajo de (García *et al.* 2005), cuyo propósito era analizar la colonización de *Azospirillum* spp. y *Azotobacter beijerinckii* en las raíces del trigo, se encontró que ambas bacterias transformaron los exudados radicales, favoreciendo la absorción de urea en las raíces. La aplicación de estas bacterias en el trigo mostró resultados comparables en peso seco al trigo fertilizado solo con urea al 100%, sin inoculación. Este enfoque podría ser considerado como una alternativa para reducir y optimizar la dosis de fertilizantes nitrogenados en el cultivo de trigo.

(Galeote *et al.* 2022) llevaron a cabo un estudio con el objetivo de evaluar el comportamiento de genotipos de chile Huacle negro, rojo y amarillo en condiciones de invernadero bajo dos sistemas de producción: orgánico e inorgánico, con y sin aplicación de rizo-bacterias *Azospirillum* sp. Se observaron valores más altos en diversas variables, como altura de planta, número de hojas por planta, peso verde y seco de la parte aérea y raíz, y número de frutos por planta, en el sistema de producción convencional con sustrato de arena al 100% y solución nutritiva inorgánica. El rendimiento en seco y la calidad del fruto fueron superiores en el sistema de producción orgánico con compost y aplicaciones de *Azospirillum*. En resumen, los genotipos de chile Huacle, especialmente el genotipo negro, mostraron una adaptación positiva al sistema de producción orgánico con dosis específicas de compost y aplicaciones de *Azospirillum*.

(Tagliaferro 2021) realizó un estudio sobre la persistencia, capacidad endofítica y efecto promotor del crecimiento de cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus* y *Azospirillum brasilense* aplicadas al follaje de Rye Grass anual. A los 11 días de la aplicación, ambos géneros bacterianos demostraron actividad endofita, con recuentos en un rango específico. La aplicación foliar de ambas cepas generó aumentos significativos en materia seca y altura

de las plantas en comparación con el grupo de control sin aplicación. Los resultados sugieren que estas cepas pueden tener un impacto positivo en el crecimiento de Rye Grass anual.

En el estudio de (Guzmán *et al.* 2012), se aislaron bacterias diazotróficas de los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum* de la rizósfera de cultivos de algodón en el Espinal (Tolima). Se observaron diferencias significativas en la prueba de reducción de acetileno y en la producción de índoles, y se seleccionaron cepas específicas por su eficiencia en la promoción del crecimiento vegetal. Estas cepas podrían considerarse como candidatas para futuros inoculantes en el cultivo de algodón en la región del Tolima (Guzmán *et al.*, 2012).

(Estrada y Bonilla 2023) llevaron a cabo una investigación con el objetivo de evaluar la respuesta productiva del pasto kikuyo y la dinámica del fósforo en el suelo mediante la co-inoculación de bacterias promotoras del crecimiento con diferentes fuentes de fósforo. Se encontró que la co-inoculación con bacterias solubilizadoras de fósforo mejoró la disponibilidad de este en el suelo, junto con un aumento en la actividad enzimática y la productividad del pasto kikuyo. La co-inoculación con aplicación de materia orgánica también aumentó la disponibilidad del fósforo inorgánico en la reserva del fósforo lábil. En conclusión, la co-inoculación de estas bacterias mostró eficiencia en la solubilización y mineralización de fuentes de fósforo de baja solubilidad, lo que mejoró la disponibilidad del fósforo inorgánico en el suelo y aumentó la producción del pasto kikuyo.

(Rangel *et al.* 2011) llevaron a cabo una investigación para determinar la afinidad y el efecto de cepas de *Azospirillum* en maíz. Aunque se observó la mayor población bacteriana con la cepa aislada de H-28 inoculada en maíces Chalqueño, H-28 y Cónico, los registros más altos de Nitrógeno Asimilable (N'asa) ocurrieron con cepas provenientes de H-28, Palomero Toluqueño y Chalqueño inoculadas en maíz Chalqueño. Se identificó cierto grado de afinidad o efecto de la cepa homóloga entre *Azospirillum* obtenida de maíces H-28 y Chalqueño, y su re-inoculación en estas mismas variedades, al evaluar el número de azospirilas y N'asa. También se observó un reconocimiento de *Azospirillum* de maíces de origen reciente por ancestros del mismo cereal.

(Cortez 2012) evaluó la promoción del crecimiento vegetal en plantas de maíz inoculadas con *Azospirillum* sp. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la altura de la parte aérea, aunque no hubo diferencias significativas en variables como germinación,

masa húmeda de raíces y masa húmeda de la parte aérea del maíz (Cortez, 2012). Aguirre *et al.* (2011) investigaron el efecto de la inoculación con *Azospirillum brasilense* y *Glomus intraradice* en café. Encontraron una respuesta diferencial entre los microorganismos, donde *A. brasilense* indujo un mayor desarrollo radical, y la simbiosis doble *G. intraradices* + *A. brasilense* mejoró el desarrollo del tallo y la lámina foliar. Los contenidos de Nitrógeno, Fósforo y Calcio se presentaron consistentemente con la presencia de *G. intraradices*.

(Terry *et al.* 2005) evaluaron la efectividad de *Azospirillum* sp. en el crecimiento, desarrollo y rendimiento del tomate. Los resultados mostraron que la inoculación artificial de esta rizobacteria tuvo un efecto positivo en el crecimiento de las plántulas y el estado nutricional de las plantas, resultando en un rendimiento agrícola superior en comparación con las plantas no inoculadas (Terry *et al.*, 2005).

(Abril *et al.* 2006) evaluaron el grado de colonización de raíces en 11 ensayos de campo en la Región semiárida central de Argentina. Se observó una alta variabilidad en el grado de colonización entre los casos analizados, con solo 11 de los 32 casos que presentaron diferencias significativas entre el tratamiento inoculado y el control. No se identificó un patrón claro que explicara la heterogeneidad de los resultados, pero se especuló sobre la posible influencia del estrés hídrico y el origen de las cepas del inoculante.

(Grellet *et al.* 2017) evaluaron la cepa *A. brasilense* Az39 como potencial biofertilizante para el cultivo de sorgo azucarado. La inoculación con esta cepa mostró aumentos en la emergencia de plántulas y promovió el crecimiento y desarrollo tanto de la parte aérea como del sistema radicular. Este efecto positivo estuvo asociado a la presencia de la cepa Az39 colonizando el suelo rizosférico y los tejidos de las plántulas de manera endofítica y superficial.

Finalmente, (Aguirre *et al.* 2014) evaluaron el efecto de la inoculación con *Rhizophagus intraradices*, *Glomus* spp., y *Azospirillum brasilense* en la especie maderable primavera en condiciones de vivero. Se observó un mayor aumento de biomasa en las plantas inoculadas con *R. intraradices*, la simbiosis doble *A. brasilense* + *R. intraradices* y *Glomus* sp. en comparación con el grupo de control. Además, se encontró un mayor contenido de nitrógeno en raíces de plantas inoculadas con *R. intraradices* y en el vástago con *A. brasilense*. (Aguirre *et al.*, 2014).

CAPÍTULO III
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización

La investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología del Campus Universitario “La María” de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, localizado en el kilómetro 7,5 de la vía Quevedo - El Empalme, cantón Mocache, provincia de Los Ríos, cuya ubicación geográfica es de 01°04'48.6" de Latitud Sur y 79°30'04.2" de Longitud Occidental, y altitud de 67 msnm.

3.2. Tipo de investigación

El proyecto de investigación fue de tipo experimental, en el cual se evaluó el efecto de *Azospirillum* spp., como promotora de crecimiento y su capacidad de fijar de nitrógeno en el cultivo de maíz. (*Zea mays* L.)

3.3. Método de investigación

En la investigación se empleó métodos deductivos, analíticos y de observación, los cuales se fundamentó en la bibliografía mencionada en este proyecto.

3.3.1. Método deductivo

El método se inicia con el análisis de los teoremas, leyes, postulados y principios de aplicación universal y de comprobada validez, para aplicarlos a soluciones o hechos particulares.

3.3.2. Método analítico

Consiste en descomponer un objeto de estudio separando cada una de las partes del todo para estudiarlas en forma individual.

3.3.3. Método de observación

Consiste en saber seleccionar aquello que queremos analizar.

3.4. Fuentes de recopilación de información

La presente información se recopiló a través del sondeo u observación directa con el proyecto de investigación regido a la metodología planificada y charlas con profesionales en el área de la agricultura (fuentes primarias), así como también se utilizó libros, tesis, artículos de revistas, sitios webs (fuentes secundarias).

3.5. Diseño de la investigación

3.5.1. Factores en estudio

En esta investigación se realizaron tres experimentos, en el primero se analizó la cinética de crecimiento de *Azospirillum* spp. en el segundo se evaluó la germinación de semilla de maíz y en el tercero se examinaron características agronómicas y fisiológicas de plantas de maíz.

El factor A (Tabla 2) corresponde a las diferentes cepas de *Azospirillum* spp., el factor B fue constituido por los medios de cultivos (Tabla 3) y el factor (+ 1) correspondió al control (agua destilada).

Tabla 2

Cepas de Azospirillum spp. usadas

Cepas	Especie	Local de colecta
Cepa 1	<i>Azospirillum</i> spp. 1	Campus “La María” de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo
Cepa 2	<i>Azospirillum</i> spp. 2	Campus “La María” de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo
Cepa 3	<i>Azospirillum brasilense</i>	Producto Comercial (Brazil)

Elaboración: Autor.

Tabla 3*Medios de cultivos usados*

Medio	Descripción
Medio 1	Melaza: 1% (P/V), Agua de arroz: 0,25%, fosfato de potasio Dibásico: 0,75g/L Sulfato de magnesio: 0,75g/L, pH inicial: 6,52
Medio 2	Melaza: 0,5% (P/V), Agua de arroz: 0,50%, sal en grano: 0,50%, glicerina: 15mL/L, pH inicial: 7.5.
Medio 3	Melaza: 5%(P/V), Harina de maíz: 20g/L, Sal en grano: 0,50%, Glicerina: 15ml/l, pH inicial: 6,5

Elaborado: Autor.

3.5.2. Tratamientos

Al combinar ambos factores se generó un total de 4 tratamientos más el control con tres repeticiones cada uno (Tabla 4).

Tabla 4*Tratamientos resultantes de la combinación de los factores en estudio.*

Tratamientos		
1	<i>Azospirillum spp 1</i>	Medio 1
2	<i>Azospirillum spp 1</i>	Medio 2
3	<i>Azospirillum spp 1</i>	Medio 3
4	<i>Azospirillum spp 2</i>	Medio 1
5	<i>Azospirillum spp 2</i>	Medio 2
6	<i>Azospirillum spp 2</i>	Medio 3
7	<i>Azospirillum brasilense</i>	Medio 1
8	<i>Azospirillum brasilense</i>	Medio 2
9	<i>Azospirillum brasilense</i>	Medio 3
10	Control	Agua destilada

Elaboración: Autor.

3.5.3. Diseño experimental

En todos los experimentos se estudiaron tres cepas y tres medios de cultivos bajo un diseño completamente al azar (DCA) en arreglo factorial aumentado ($A \times B + 1$).

Se utilizaron las pruebas de Shapiro-Wilks y Levene para verificar la normalidad y la homogeneidad de las varianzas de los datos, respectivamente. Luego, se procedió al análisis de varianza y, al detectar diferencias significativas, se llevaron a cabo comparaciones de medias utilizando la prueba HSD de Tukey con un nivel de significancia establecido en $p < 0,05$. El esquema de análisis de varianza se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5

Esquema de análisis de varianza

Fuente de variación	Grados de libertad
Factor A	$(a-1) = 3-1 = 2$
Factor B	$(b-1) = 3-1 = 2$
Interacción A x B	$(a-1)(b-1) = 2*2 = 4$
Factorial x control	$(f-1) = 2-1 = 1$
Error	$[(a*b)+1](r-1) = [(3*3)+1](3-1) = 20$
Total	$[(t*r)-1] 30-1 = 29$

Elaborado: Autor.

3.6. Instrumentos de investigación

3.6.1. Manejo del experimento

3.6.1.1. Experimento 1: Determinación de la cinética de crecimiento de *Azospirillum spp.* en distintos sustratos convencionales

a. Preparación de Pre-inóculo en caldo nutritivo.

Para la preparación del pre-inóculo se procedió a tomar con ayuda de una micropipeta de precisión 20 μ l de *Azospirillum spp.*, contenidas en el banco de germoplasma del laboratorio de Microbiología de la UTEQ y se incubó en un matraz Erlenmeyer conteniendo 50 ml

de medio de cultivo, esto se incubó a 150 rpm en agitación constante a 26 °C por 16 horas.

Se realizó una suspensión celular al 10 % del microorganismo en solución salina (NaCl 0,85%). La suspensión fue agregada al medio de cultivo incubándose durante 48 horas, a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ y 120 rpm. Posterior a la incubación se combinó el caldo de fermentación en una proporción de 70:30% (v/v) del inóculo con el glicerol que se utilizó como agente anticoagulante biológico. Se verificó la concentración celular por medio de un recuento en placa por la técnica de microgota (Doyle *et al.*, 2001) a las 48 horas.

b. Cinética crecimiento.

Se realizó la cinética de crecimiento de *Azospirillum spp* en el medio de cultivo descritos en la metodología siguiendo la directriz empleada por Matos *et al.* (2018) y Rivera (2008) Esto constituyó un punto de partida para realizar una comparación entre las curvas de crecimiento del medio de referencia y los medios evaluados. La curva de crecimiento se realizó en un Erlenmeyer de 2 L de capacidad con un volumen de trabajo de 400 mL de medio líquido con una agitación de 120 rpm y $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Se efectuó muestreos desde la hora 0 y posteriormente cada 12 horas hasta completar 48 horas con el fin de determinar los valores óptimos de concentración de *Azospirillum spp*. El ensayo se realizó por triplicado y se utilizó el Espectrofotómetro para registrar las lecturas de absorbancia a 559 nm; al mismo tiempo se realizó recuento en placa por la técnica de microgota. Los parámetros cinéticos evaluados fueron la concentración de biomasa.

La determinación de UFC/mL (biomasa) se realizó por el método de diluciones seriadas en base 10 y recuento en placa por la técnica de microgota (Doyle *et al.*, 2001). Las diluciones decimales se efectuaron desde la dilución 10^{-2} hasta 10^{-9} . Para el recuento en placa se dividió la caja de Petri en cuatro cuadrantes y se inoculó 20 μl de la muestra en la superficie dejando secar las gotas, consecutivamente se incubó a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48 horas para su posterior lectura y recuento.

Se calculó el número de UFC/mL aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/mL} = \text{N} \times \text{D} \times 50$$

N= Número de colonias en caja

D= Factor de dilución

50= Factor de corrección

3.6.1.2. Experimento 2: Germinación de las semillas de maíz inoculadas con *Azospirillum spp*

Se emplearon semillas de maíz híbrido “Trueno”. Las mismas fueron lavadas con agua destilada estéril (ADE) hasta eliminar los restos de fungicida. Luego se embebieron en ADE, agitándolas a 100 rpm durante 20 min, y se desinfectaron con hipoclorito de sodio 1,5 % por 15 min.

Posteriormente, se lavaron repetidamente con ADE por tres ocasiones y se colocaron en caja Petri (10 semillas/caja) preparadas con dos círculos de papel filtro, separados por una capa de algodón, impregnados con ADE. Cada semilla se inoculó con 10 μL ($\sim 10^8$ UFC $\cdot\text{mL}^{-1}$) de los cultivos bacterianos de las cepas de *Azospirillum spp.* a evaluar, más un control sin inocular (agua destilada).

3.6.1.3. Experimento 3: Inoculación de *Azospirillum spp.* in vivo.

Se sembraron dos semillas por vasos de 34 onzas en invernadero en un sustrato constituido por tierra negra, perlita y tamo de arroz en proporción 2:1:1, a los 10 días de emergencia se ralearon que dando una planta por vaso. El riego se realizó pasando un día y como fertilización se utilizaron las bacterias. La inoculación se realizó a la siembra, manualmente distribuyendo uniformemente el inoculante y procurando que todas las semillas queden inoculadas. Se utilizó 10 ml del inoculante de cada cepa de *Azospirillum spp.* por cada 0,2 kg de semilla de maíz Trueno con una concentración de 1×10^9 UFC/mL.

Los inoculantes se suspendieron en 1 L de ADE y se colocaron uniformemente (aproximadamente 3 mL por sitio) a cada tratamiento según la cepa, con la ayuda de un aspersor manual estéril, antes de colocar las semillas para que la cantidad de bacterias disponibles que infecten las raíces de maíz se encuentren en un número mayor, esta acción se realizó cada 8 días, hasta finalizar el experimento.

3.6.2. Variables a evaluar

3.6.2.1. Curva de crecimiento por densidad Óptica (OD) a 559nm.

Se determinó la cinética de crecimiento de la cepa de *Azospirillum* spp en tres medios de cultivo, se realizó una curva de calibración de los parámetros D.O. y UFC/mL en medio sintético, con la utilización de un espectrofotómetro.

3.6.2.2. Número de semillas germinadas.

Se procedió a tomar datos de esta variable una sola vez realizando el conteo de 10 semillas separando las semillas germinadas y no germinadas de cada tratamiento y repetición, a partir de las 72 horas de iniciado el experimento, se identificó por la aparición del coleóptilo.

3.6.2.3. Altura de planta.

Esta variable se determinó hasta llegar al estadio V7, midiendo en unidades de cm, con una regla graduada la longitud de las 15 plantas por tratamiento, desde la superficie del suelo, hasta la parte apical de las hojas más largas.

3.6.2.4. Peso fresco.

En este estudio, se midió el diámetro del tallo utilizando un calibrador y expresándolo en unidades de centímetro. La medición se realizó de manera manual en cada etapa del proceso de investigación, desde el inicio hasta su conclusión. Esta metodología nos permitió obtener datos precisos y consistentes sobre el crecimiento y desarrollo del tallo en relación con los diferentes tratamientos evaluados.

3.6.2.5. Peso seco.

Se contabilizó el número de raíces de 15 plantas por tratamiento, se consideró todas las raíces que estén adheridas a la planta y en perfecto estado.

3.6.2.6. Longitud radicular.

Esta variable se determinó, midiendo en unidades de cm, con una regla graduada la longitud radicular de las 15 plantas por tratamiento, desde la base del tallo hasta la raíz mas larga presente.

3.6.2.7. Volumen radicular.

Para obtener el volumen radicular se realizó la medición de la raíz de cada planta por medio del método volumétrico, que consistió en sumergir las raíces en una probeta graduada con 30 una cierta cantidad de agua y en la cual la cantidad de líquido desplazado hacia arriba al realizar la sumersión de la raíz da como resultado al volumen de esta.

3.6.2.8. Clorofila.

Para la obtención de este dato se ocupó el método de (Wintermans y De Mots 1965), en el que dividen dos secciones de la misma muestra con un tamaño de 1.3 cm x 1 cm, en forma de disco por cada tratamiento al llegar las plantas al estado fenológico V7. Luego se pesaron las secciones y una de ellas se llevaron a una estufa con temperaturas de 106° durante 48 h. Ya obtenidos los discos foliares fueron macerados en frío en un mortero con 8 ml de solución fría de MgCO₃ (0.5 g/L) en etanol al 98%.

El extracto obtenido fue transferido a un tubo Eppendorf y centrifugado a 8.000 RCF durante 5 minutos. La absorbancia (A) del extracto etanólico se midió y visualizó a longitudes de onda de 645 y 663 nm utilizando un espectrofotómetro.

3.7. Tratamiento de los datos

Todas las variables fueron sometidas a un análisis de varianza y, al detectar diferencias significativas, se llevaron a cabo comparaciones de medias utilizando la prueba HSD de Tukey con un nivel de significancia establecido en $p < 0,05$.

3.8. Recursos materiales y humanos

3.8.1. Recursos humanos

Docente: Ing. Daniel Federico Vera Avilés PhD.

Estudiante: Jorge Luis Ponce Aimacaña

3.8.2. Materiales de Laboratorio

- Agua ultra pura
- Papel toalla
- Botellas esterilizables de 500 mL
- Puntas blancas de micropipeta
- Puntas amarillas de micro-pipeta
- Puntas azules de micro-pipeta
- Vidrio de reloj
- Papel parafilm
- Vasos de precipitación (50 mL, 250 mL y 500 mL)
- Cajas petri
- Guantes quirúrgicos talla M
- Pipeta de 500 mL
- Tijeras quirúrgicas
- Melaza
- Agua de arroz
- Harina de maíz
- Sal en grano
- Fosfato de potasio Dibásico
- Sulfato de magnesio
- Vaso de 34 onzas

3.8.3. Equipos de Laboratorio

- Balanza de 0,001 g
- Cámara de flujo Laminar
- Microscopio
- Microondas
- Nevera
- Vortex
- Destilador de agua
- Autoclave
- Estufa
- Centrifuga
- Incubadora
- Foto documentador
- Espectrofotómetro MARCA “UNICO” modelo 1205

3.8.4. Materiales de Oficina

- Cuaderno
- Computador Lapicero
- Lápiz
- USB
- Pendrive
- Impresora
- Papel

3.8.5. Material biológico

- Cepas de *Azospirillum* spp.
- Semillas de maíz variedad Trueno

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

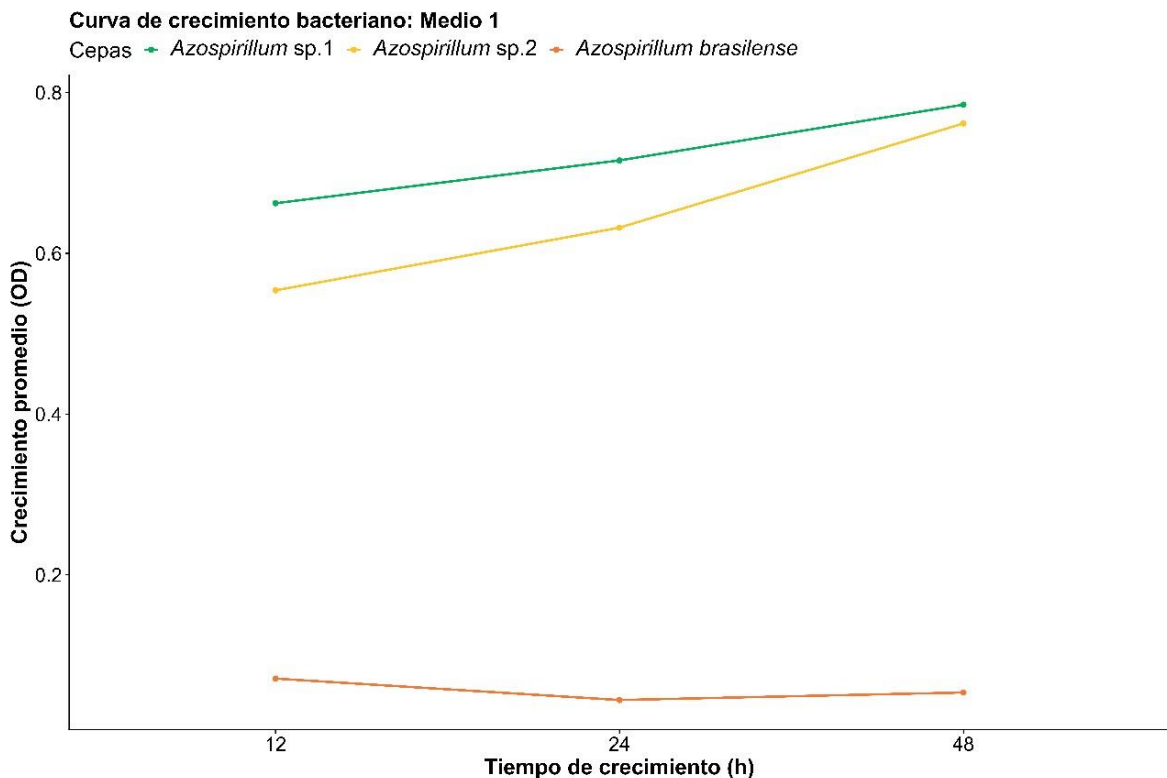
4.1. Resultados

4.1.1. Crecimiento bacteriano

A las 12 horas, los valores de densidad óptica (DO) para *Azospirillum* sp. 1, *Azospirillum* sp. 2 y *Azospirillum brasilense* fueron 0.66, 0.55 y 0.07, respectivamente. Estos valores representan la cantidad de luz absorbida por las cepas en ese momento específico. A las 24 horas, los valores de densidad óptica mostraron un cambio en la dinámica, donde *Azospirillum* sp. 1 tuvo una densidad óptica de 0.72, *Azospirillum* sp. 2 de 0.63 y *Azospirillum brasilense* de 0.04. Finalmente, a las 48 horas, se observaron incrementos en los valores de DO, *Azospirillum* sp. 1 alcanzó 0.79, *Azospirillum* sp. 2 registró 0.76 y *Azospirillum brasilense* mantuvo un valor de 0.05 (Figura 1).

Figura 1

Densidad Óptica de las bacterias en el medio 1

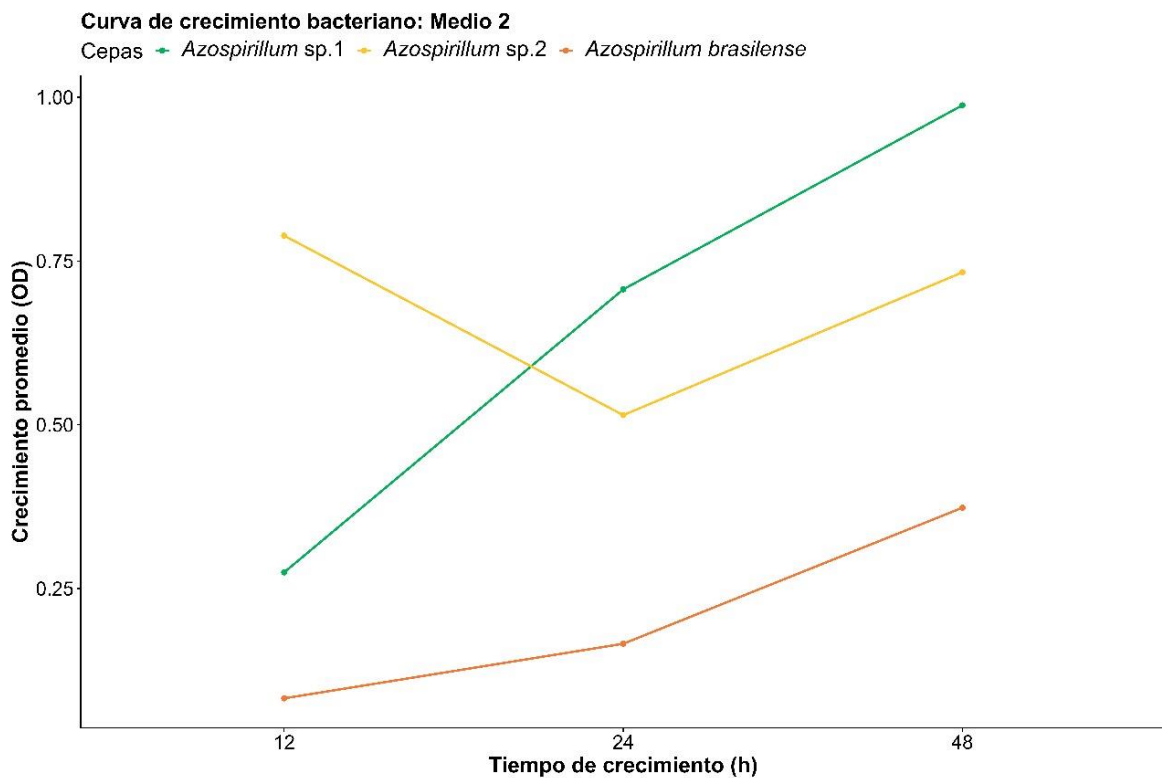


Nota: Las líneas expresan la curva de crecimiento bacteriano en el primer medio de cultivo

En el medio 2, a las 12 horas, los valores de DO para *Azospirillum* sp. 1, *Azospirillum* sp. 2 y *Azospirillum brasilense* fueron 0.27, 0.78 y 0.08, respectivamente. A las 24 horas, los valores de densidad óptica mostraron un cambio en la dinámica, la *Azospirillum* sp. 1 registró un valor de 0.71, la *Azospirillum* sp. 2 0.51 y *Azospirillum brasilense* 0.17 de DO. Finalmente, a las 48 horas, se observaron nuevos valores de densidad óptica, la *Azospirillum* sp. 1 alcanzó 0.98, la *Azospirillum* sp. 2 registró 0.73 y la *Azospirillum brasilense* un valor de 0.37 (Figura 2).

Figura 2

Densidad Óptica de las bacterias en el medio 2



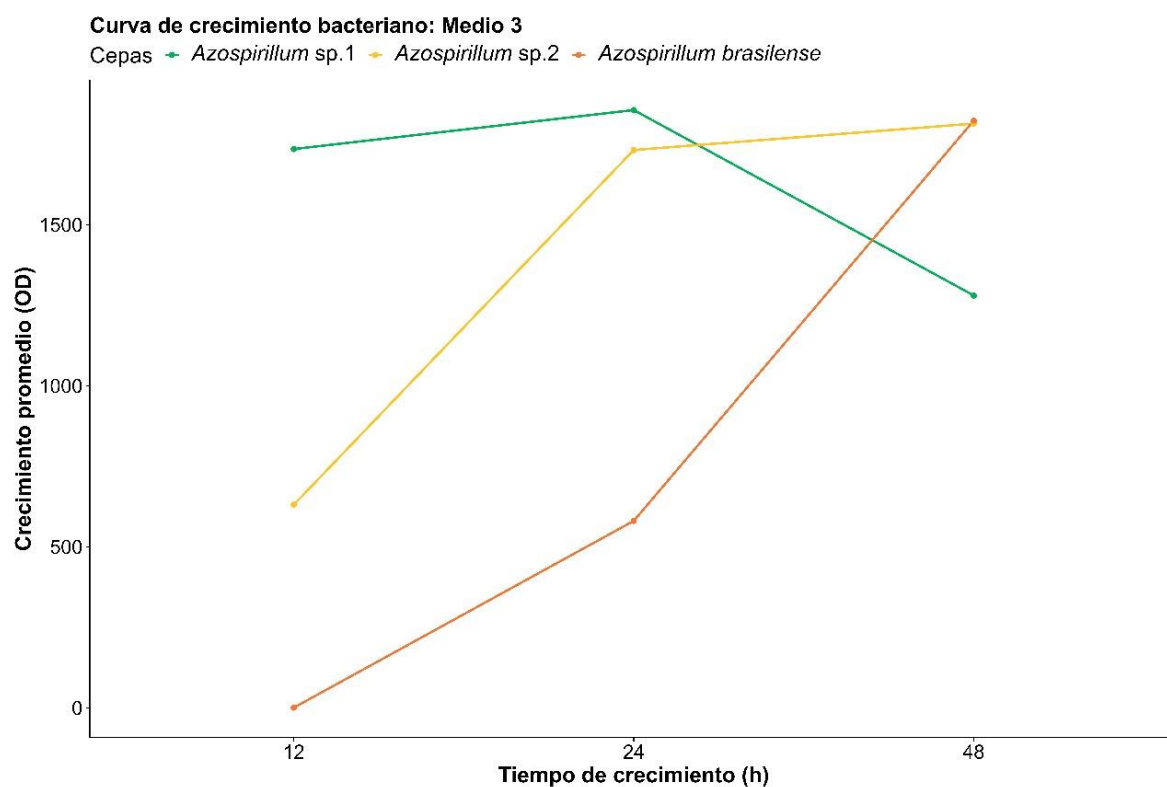
Nota: Las líneas expresan la curva de crecimiento bacteriano en el segundo medio de cultivo

En el medio 3, a las 12 horas, los valores de OD para *Azospirillum* sp. 1 son notables, con un valor de 1735.00, *Azospirillum* sp. 2, por otro lado, tuvo un valor más bajo con 630.58, mientras que *Azospirillum brasilense* registró la DO más baja con 0.50. A las 24 horas, se observó un cambio en la dinámica, *Azospirillum* sp. 1 aumentó su valor a 1856.00, mientras que *Azospirillum* sp. 2 experimentó un aumento sustancial a 1732.00, y *Azospirillum brasilense* registró un aumento con 580.53 de DO. Finalmente, a las 48 horas, se registraron cambios en la dinámica de crecimiento, *Azospirillum* sp. 1 mostró un valor de 1280.29,

Azospirillum sp. 2 alcanzó 1814.00 y *Azospirillum brasilense* registró el mayor valor de DO con 1823.33.

Figura 3

Densidad Óptica de las bacterias en el medio 3



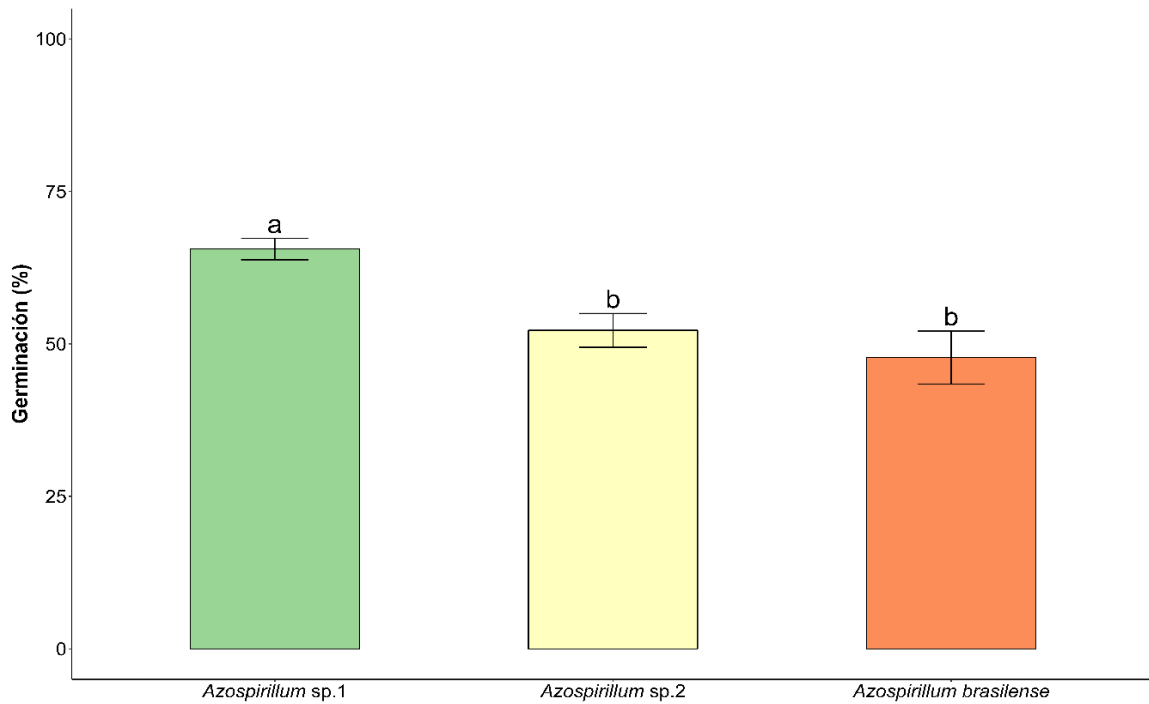
Nota: Las líneas expresan la curva de crecimiento bacteriano en el tercer medio de cultivo

4.1.2. Porcentaje de semillas germinadas

En la variable de número de semillas germinadas se encontraron diferencias estadísticas entre cepas ($p < 0.001$) donde *Azospirillum* spp.1 con 66% fue superior significativamente a *Azospirillum* spp. 2 y *A. brasilense* 52 y 48% de semillas germinadas, respectivamente (Figura 4). El medio 1 con 63% fue significativamente mayor ($p < 0.01$) a los medios 1 y 2, ambos con 52% de germinación (Figura 5). La interacción cepas por medios no presentó diferencias significativas ($p = 0.06$) (Figura 6). El contraste entre factorial (55%) y el control (30%) fue significativo ($p < 0.001$).

Figura 4

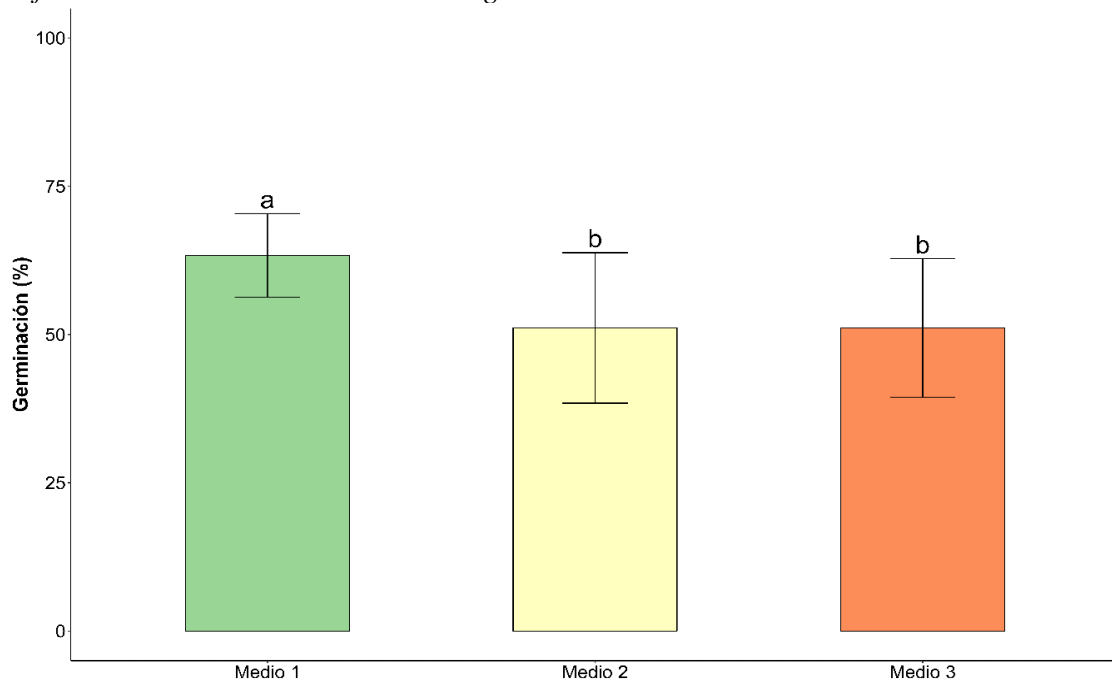
Efecto de la inoculación con cepas de Azospirillum spp. sobre la germinación de semillas de maíz.



Nota: Las barras expresan la media y las líneas verticales sobre la media muestran la desviación estándar. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$).

Figura 5

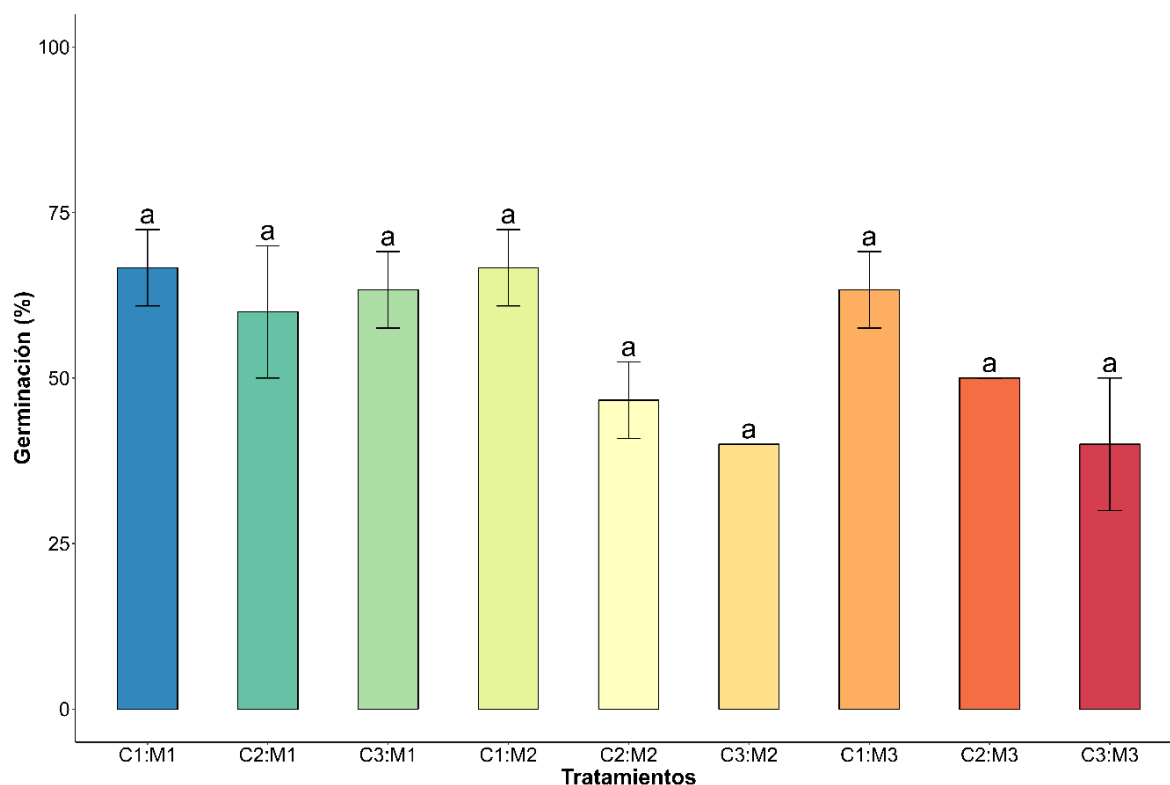
Efecto del medio de cultivo sobre la germinación de semillas de maíz.



Nota: Las barras expresan la media y las líneas verticales sobre la media muestran la desviación estándar. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$).

Figura 6

Efecto de la interacción de cepas de Azospirillum spp. y medios de cultivo sobre la germinación de semillas de maíz.



Nota: C1 = *Azospirillum* sp. 1; C2 = *Azospirillum* sp. 2; C3 = *Azospirillum brasilense*; M1 = Medio 1; M2 = Medio 2; M3 = Medio 3.

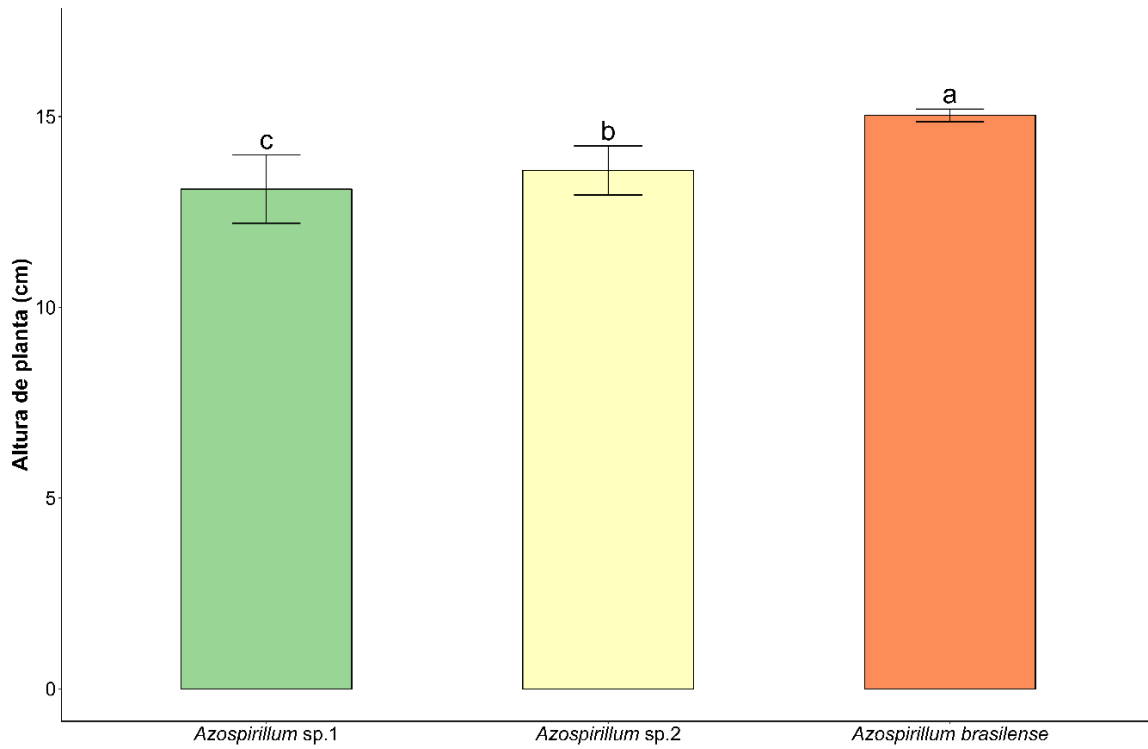
4.1.3. Altura de planta

En la variable de altura de planta se encontraron diferencias estadísticas entre cepas ($p < 0.001$) donde *A. brasilense* con 15.03 cm fue superior significativamente a *Azospirillum* spp. 2 y *Azospirillum* spp. 1, con 13.58 cm y 13.10 cm de altura de planta, respectivamente (Figura 7). El medio 1 con 14.42 cm fue significativamente mayor ($p < 0.001$) a los medios 2 y 3, con 13.66 y 13.63 cm de altura de planta, respectivamente (Figura 8). La interacción cepas por medios presentó diferencias significativas ($p < 0.001$), donde M1:C3, M3:C3, M2:C3 fueron mayores con 15.06, 15.03 y 15.00 cm de altura, respectivamente, en

comparación al control que alcanzó los 11.03 cm (Figura 9). El contraste entre factorial (13.90 cm) y el control (11.03) fue significativo ($p < 0.001$).

Figura 7

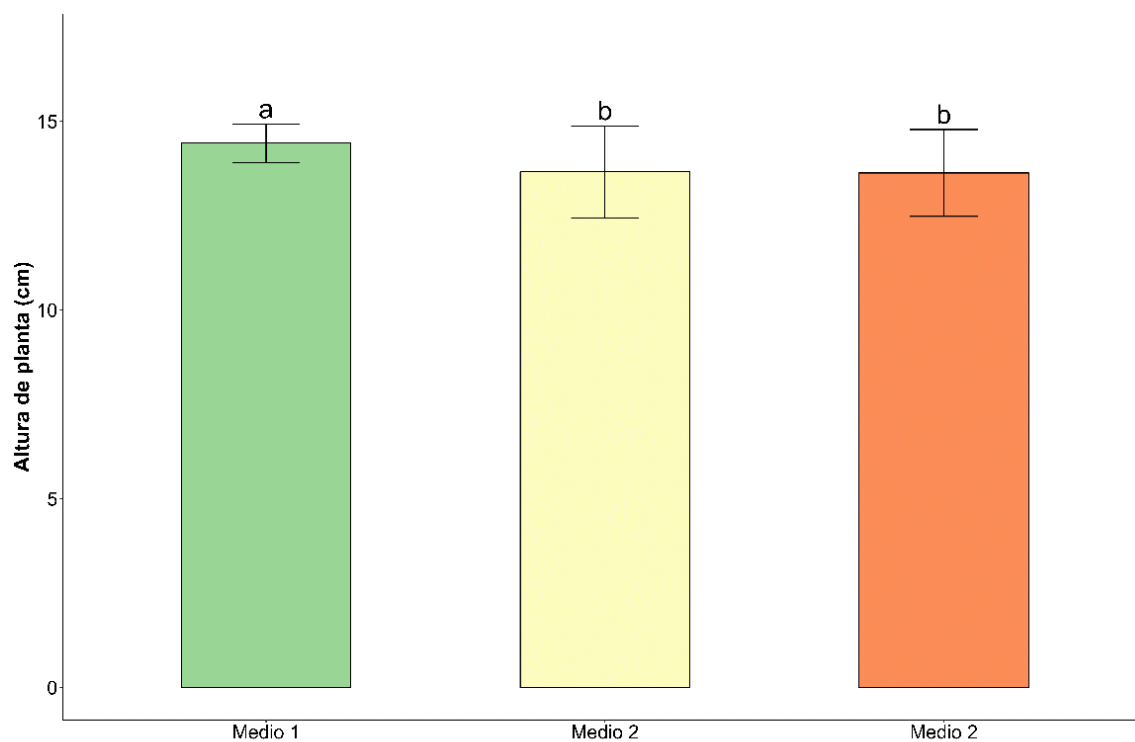
Efecto de la inoculación con cepas de Azospirillum spp. sobre la altura de planta de maíz.



Nota: Las barras expresan la media y las líneas verticales sobre la media muestran la desviación estándar. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$).

Figura 8

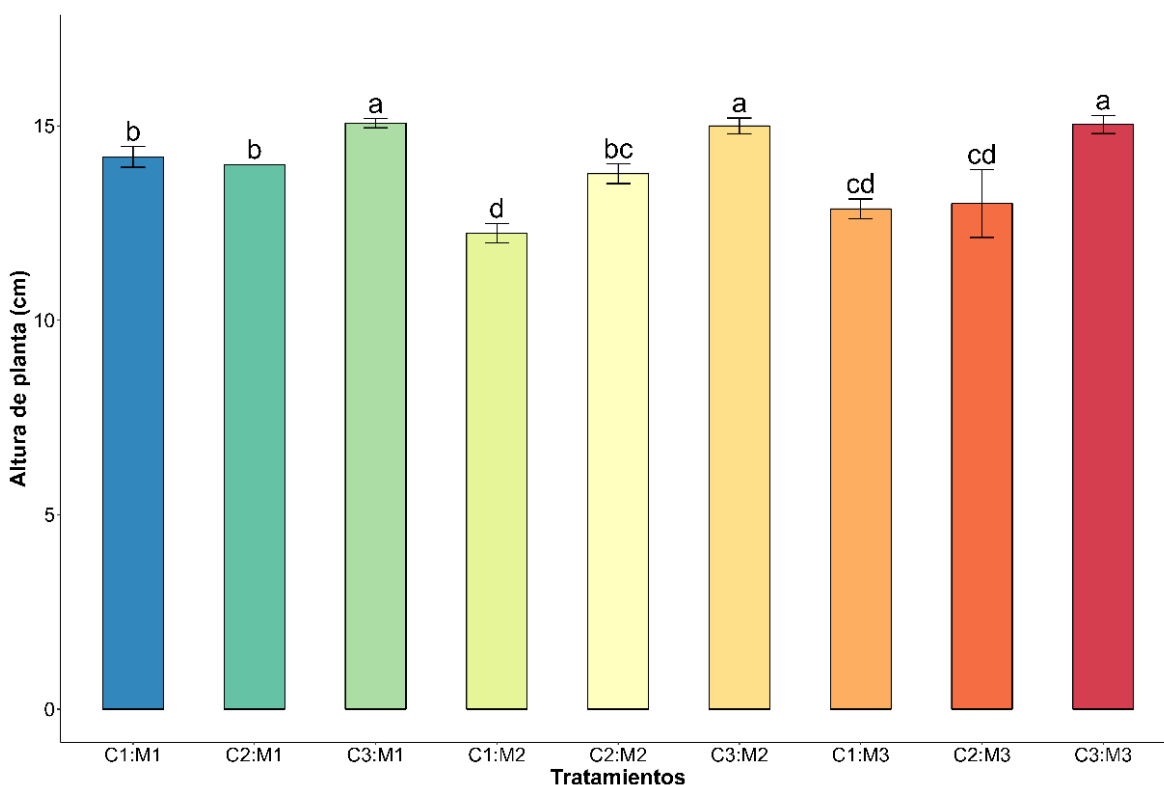
Efecto del medio de cultivo sobre la altura de planta de maíz.



Nota: Las barras expresan la media y las líneas verticales sobre la media muestran la desviación estándar. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$).

Figura 9

Efecto de la interacción de cepas de *Azospirillum* spp. y medios de cultivo sobre la altura de plantas de maíz.



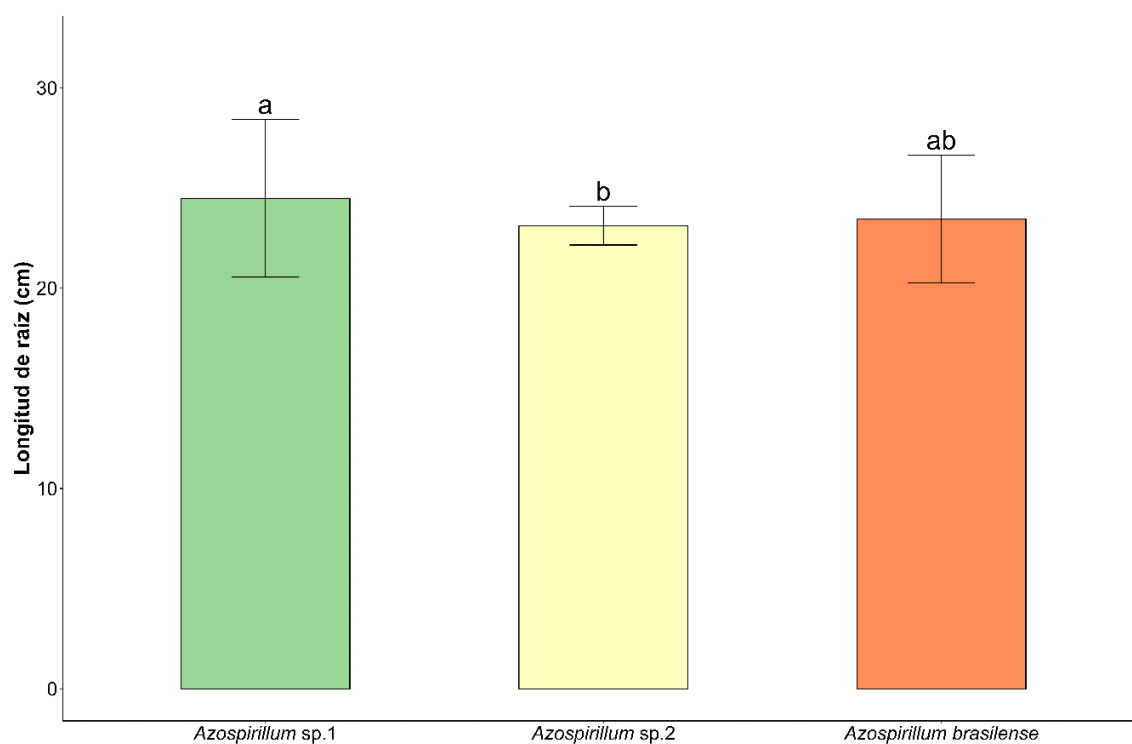
Nota: C1 = *Azospirillum* sp. 1; C2 = *Azospirillum* sp. 2; C3 = *Azospirillum brasilense*; M1 = Medio 1; M2 = Medio 2; M3 = Medio 3.

4.1.4. Longitud radicular

En la variable longitud radicular se encontraron diferencias estadísticas entre cepas ($p < 0.05$) donde *Azospirillum* spp. 1 con 24.48 cm fue superior significativamente a *A. brasilense* y *Azospirillum* spp. 2, con 23.45 y 23.12 cm de longitud radicular, respectivamente (Figura 10). El medio 1 con 26.79 cm fue significativamente mayor ($p < 0.001$) a los medios 3 y 2, con 22.98 y 21.27 cm de longitud radicular, respectivamente (Figura 11). La interacción cepas por medios presentó diferencias significativas ($p < 0.001$), donde M1:C1 y M1:C3 fueron mayores con 29.60 y 27.10 cm de altura, respectivamente, en comparación al control que alcanzó los 15.7 cm (Figura 12). El contraste entre factorial (23.68 cm) y el control (15.7 cm) fue significativo ($p < 0.001$).

Figura 10

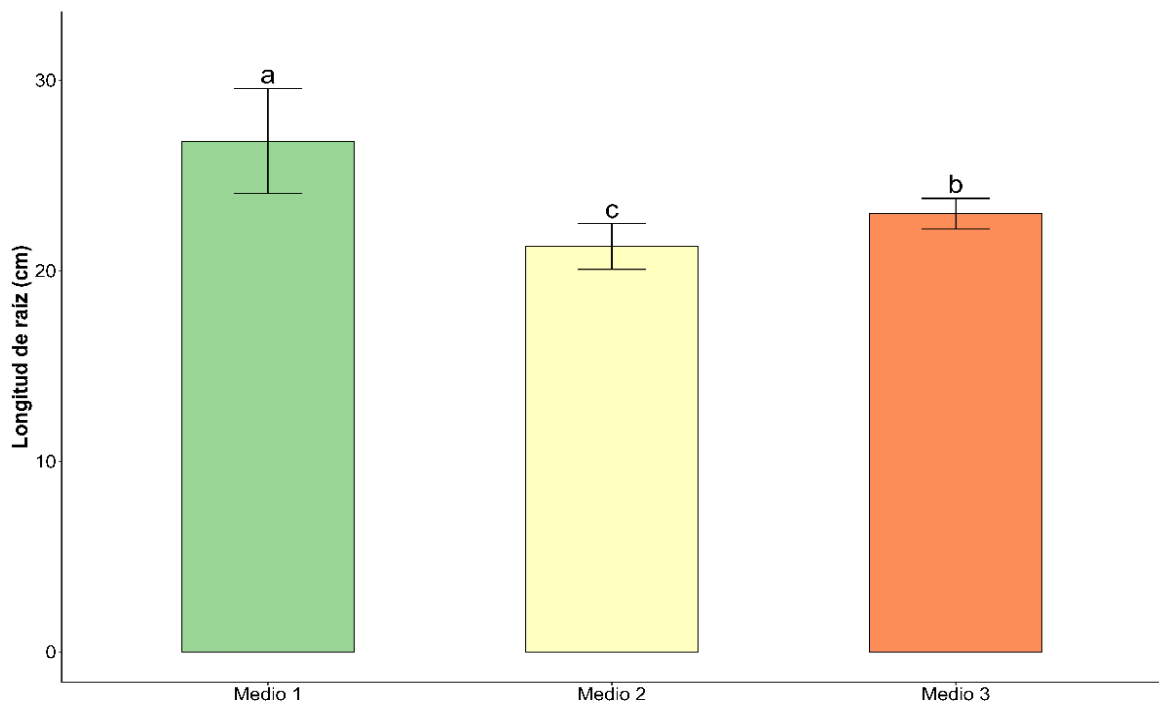
Efecto de la inoculación con cepas de Azospirillum spp. sobre la longitud radicular de maíz.



Nota: Las barras expresan la media y las líneas verticales sobre la media muestran la desviación estándar. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$).

Figura 11

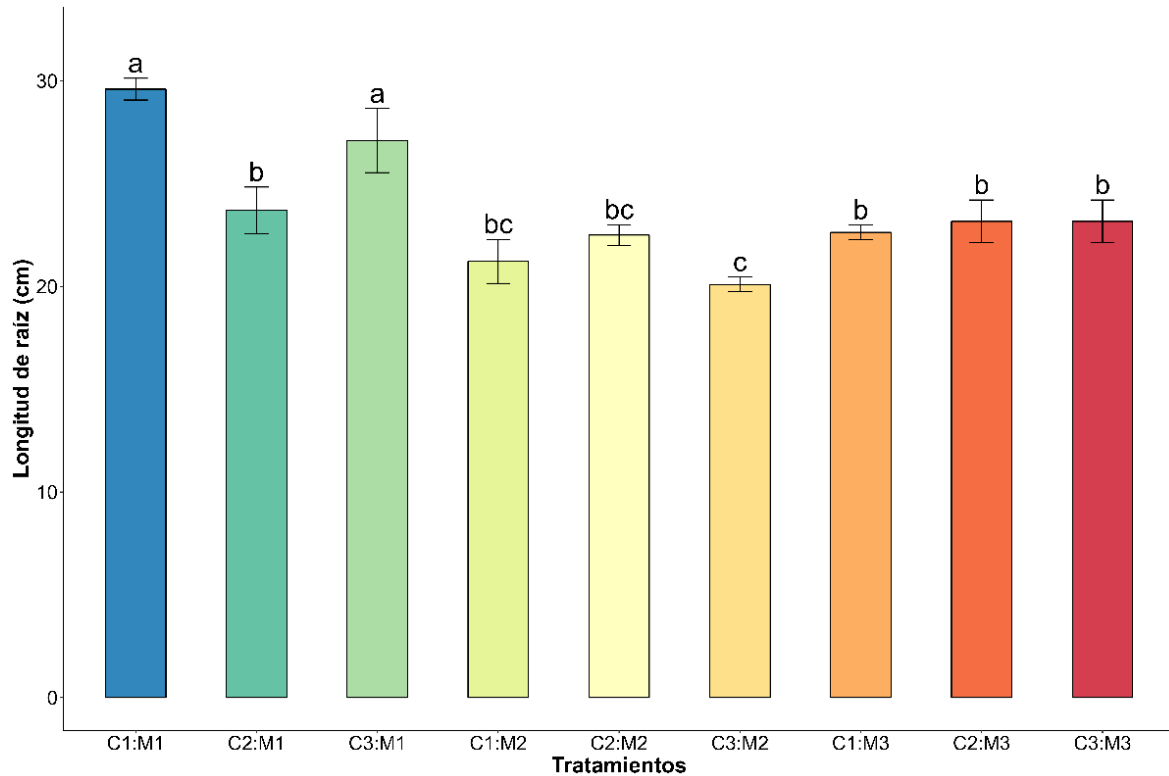
Efecto del medio de cultivo sobre la longitud radicular de maíz.



Nota: Las barras expresan la media y las líneas verticales sobre la media muestran la desviación estándar. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$).

Figura 12

Efecto de la interacción de cepas de Azospirillum spp. y medios de cultivo sobre la longitud radicular de maíz.



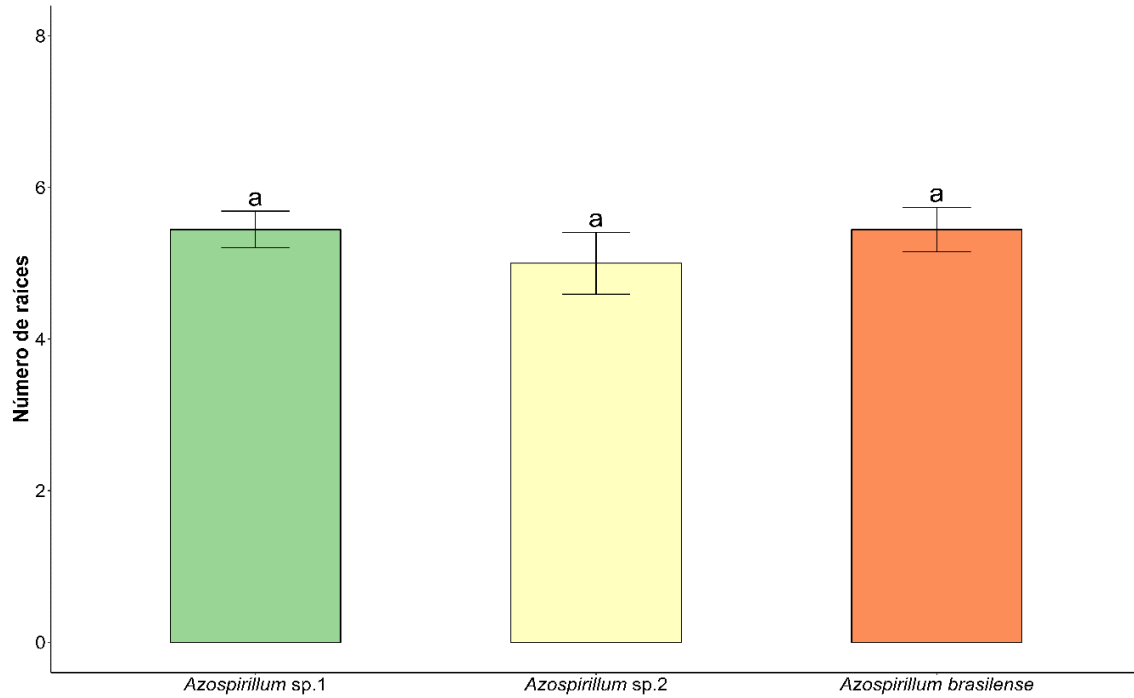
Nota: C1 = *Azospirillum* sp. 1; C2 = *Azospirillum* sp. 2; C3 = *Azospirillum brasilense*; M1 = Medio 1; M2 = Medio 2; M3 = Medio 3.

4.1.5. Número de raíces

En la variable número de raíces no se encontraron diferencias estadísticas entre cepas ($p = 0.44$), sin embargo, *Azospirillum* spp. 1 y *A. brasilense* con 5.44 unidades fueron superior a *Azospirillum* spp. 2, con 5.0 unidades de número de raíces (Figura 13). El efecto del medio de cultivo no fue significativo ($p = 0.25$) (Figura 14). La interacción cepas por medios también no presentó diferencias significativas ($p = 0.07$) (Figura 15). El contraste entre factorial (5.30 raíces) y el control (3.33 raíces) fue significativo ($p < 0.001$).

Figura 13

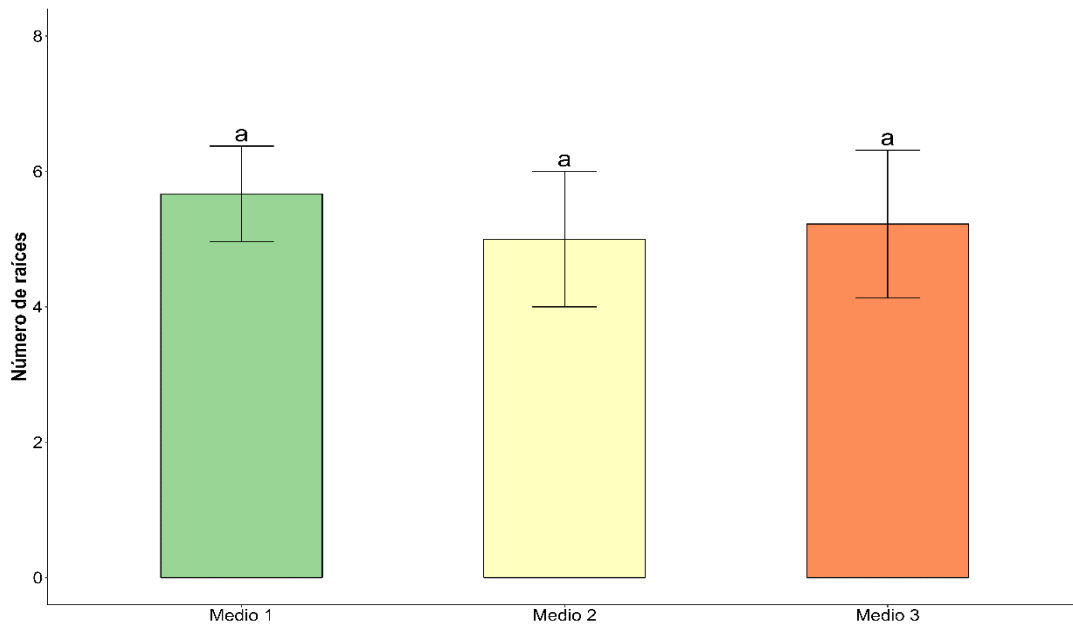
Efecto de la inoculación con cepas de Azospirillum spp. sobre el número de raíces de la planta maíz.



Nota: Las barras expresan la media y las líneas verticales sobre la media muestran la desviación estándar. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$).

Figura 14

Efecto del medio de cultivo sobre el número de raíz de la planta de maíz.

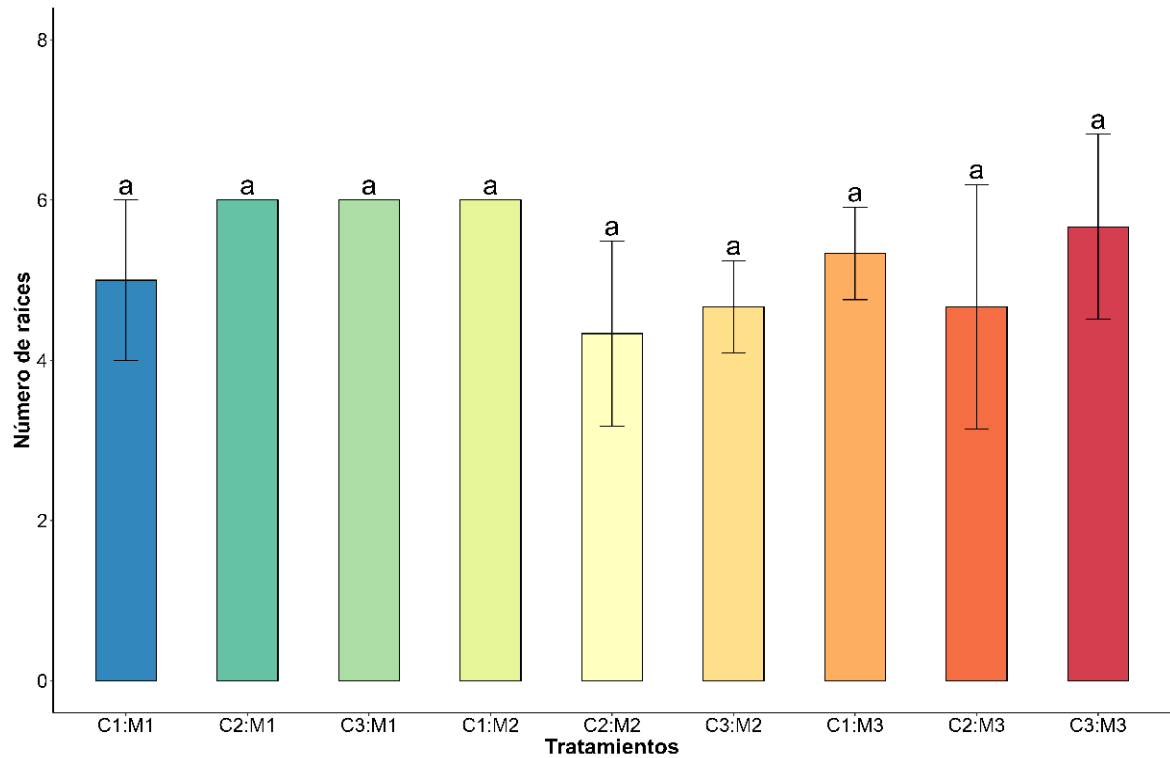


Nota: Las barras expresan la media y las líneas verticales sobre la media muestran la desviación estándar.

Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$).

Figura 15

Efecto de la interacción de cepas de *Azospirillum* spp. y medios de cultivo sobre el número de raíz de la planta de maíz.



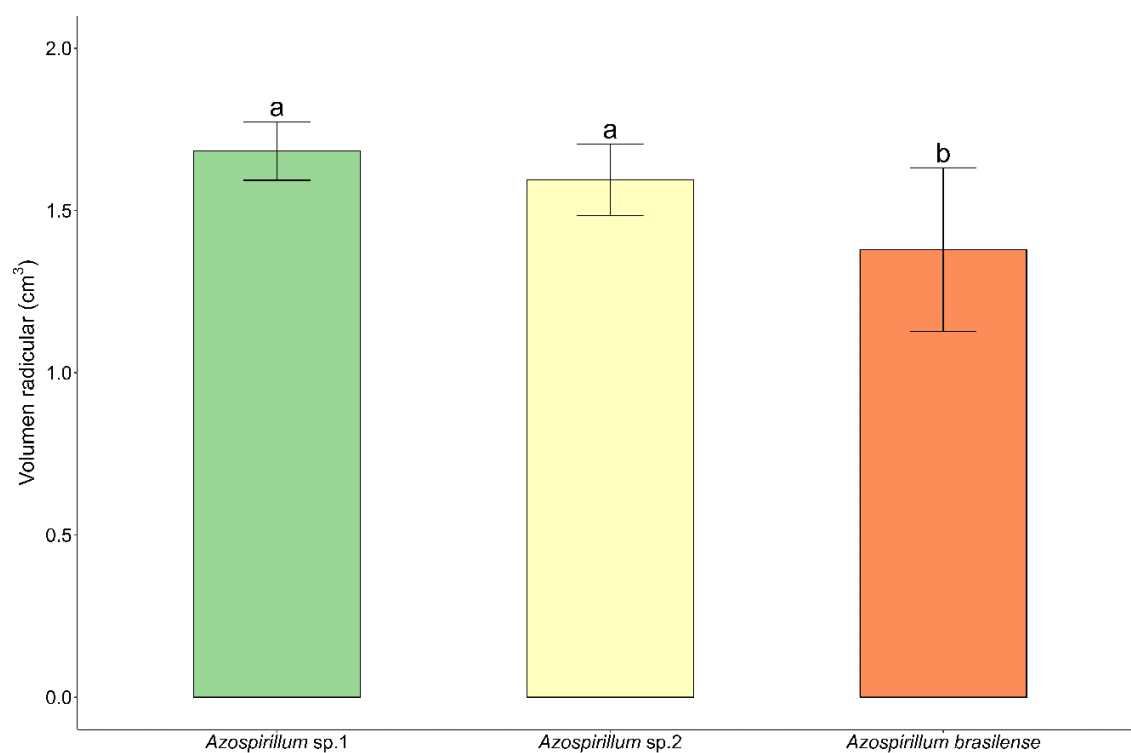
Nota: C1 = *Azospirillum* sp. 1; C2 = *Azospirillum* sp. 2; C3 = *Azospirillum brasilense*; M1 = Medio 1; M2 = Medio 2; M3 = Medio 3.

4.1.6. Volumen radicular

En la variable volumen radicular se encontraron diferencias estadísticas entre cepas ($p < 0.001$) donde *Azospirillum* spp. 1 y *Azospirillum* spp. 2 con 1.68 cm^3 y 1.59 cm^3 , respectivamente, fue superior significativamente a *A. brasilense* con 1.37 cm^3 de volumen radicular (Figura 16). Los medios 1 y 2 fueron significativamente mayor ($p < 0.01$) con 1.61 cm^3 y 1.59 cm^3 , respectivamente, al medio 3, con 1.44 cm^3 (Figura 17). La interacción cepas por medios presentó diferencias significativas ($p < 0.01$), donde M1:C1 con 1.75 cm^3 presentó el mayor promedio, siendo igual significativamente al resto del tratamiento, pero diferentes estadísticamente al control que alcanzó los 1.27 cm^3 (Figura 18). El contraste entre factorial (1.55 cm^3) y el control (1.27 cm^3) fue significativo ($p < 0.001$).

Figura 16

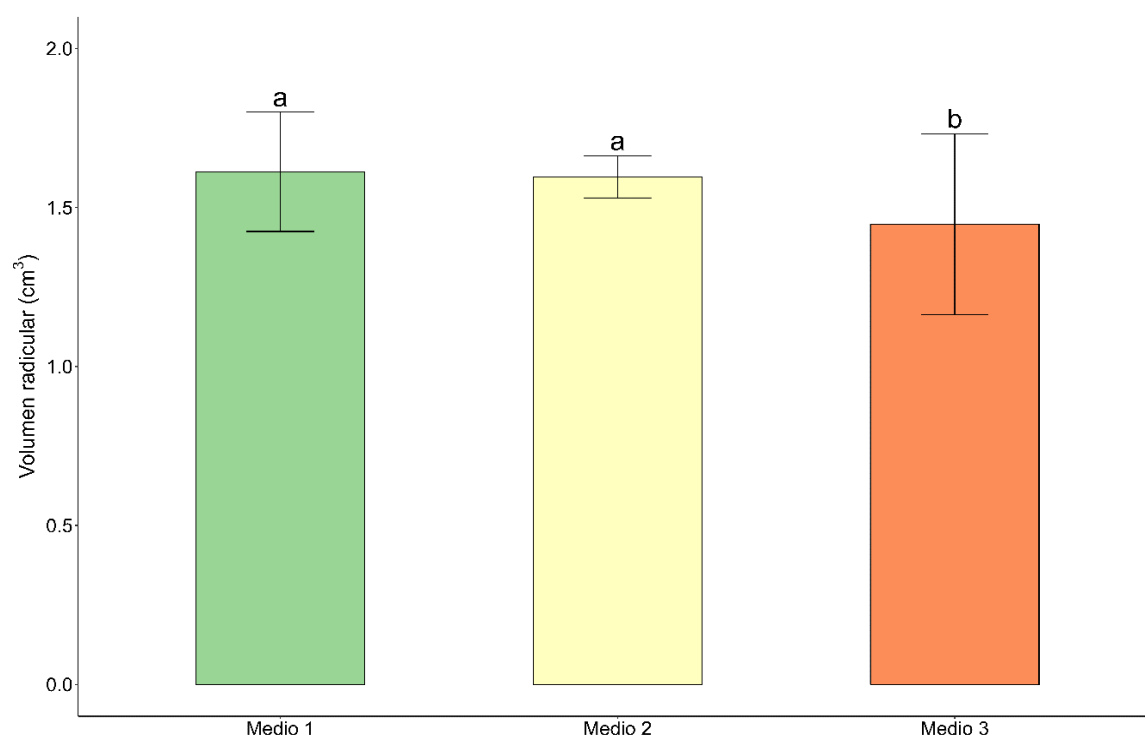
Efecto de la inoculación con cepas de Azospirillum spp. sobre el volumen radicular de la planta maíz.



Nota: Las barras expresan la media y las líneas verticales sobre la media muestran la desviación estándar. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$).

Figura 17

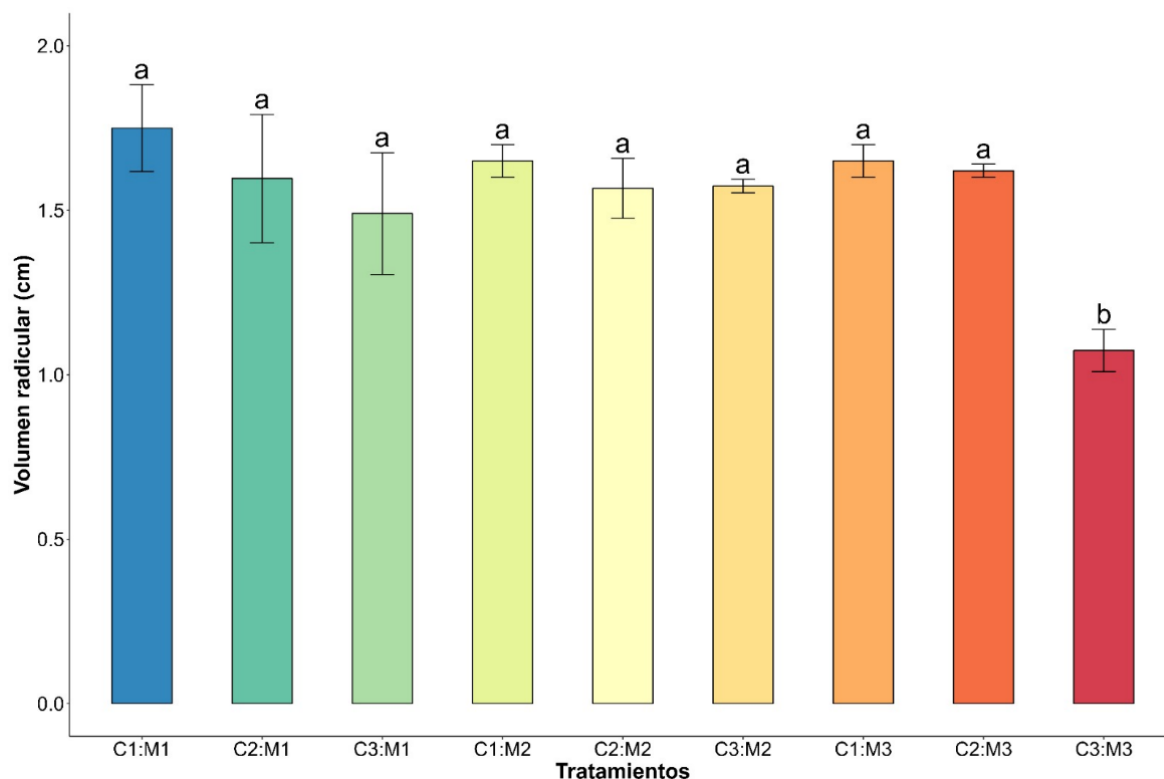
Efecto del medio de cultivo sobre el volumen radicular de la planta de maíz.



Nota: Las barras expresan la media y las líneas verticales sobre la media muestran la desviación estándar. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$).

Figura 18

Efecto de la interacción de cepas de Azospirillum spp. y medios de cultivo sobre el volumen radicular de la planta de maíz.



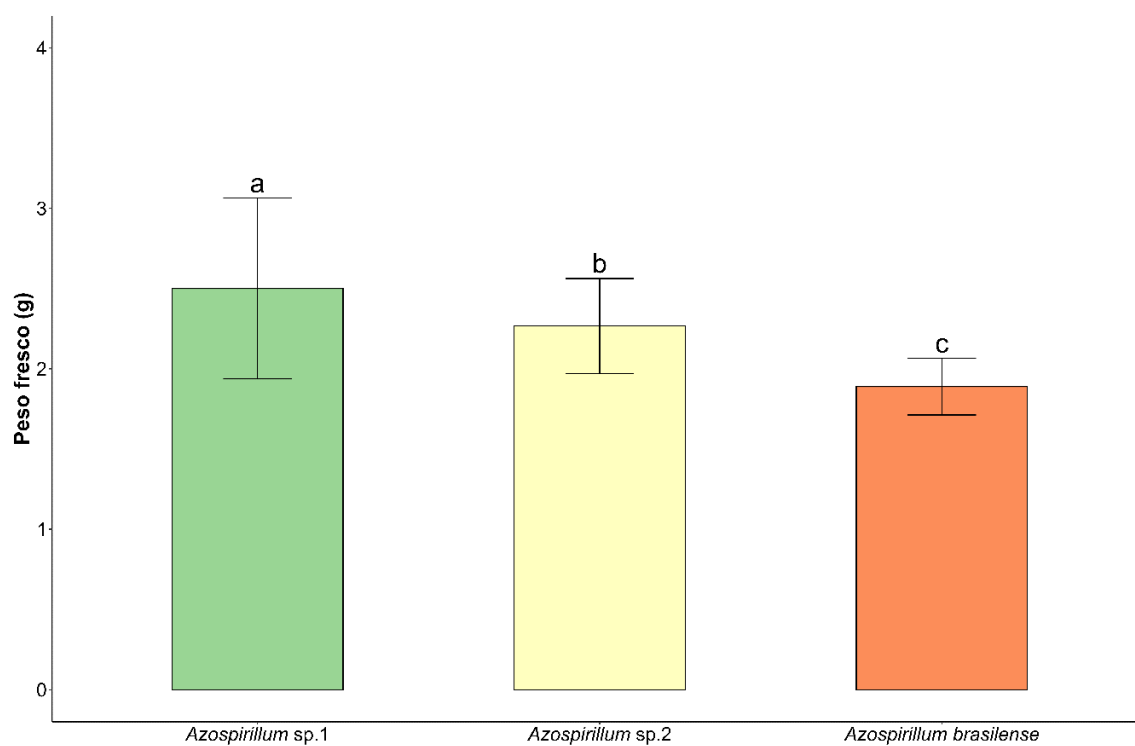
Nota: C1 = *Azospirillum* sp. 1; C2 = *Azospirillum* sp. 2; C3 = *Azospirillum brasilense*;
M1 = Medio 1; M2 = Medio 2; M3 = Medio 3.

4.1.7. *Peso fresco*

En la variable peso fresco se encontraron diferencias estadísticas entre cepas ($p < 0.001$) donde *Azospirillum* spp. 1 con 2.50 gramos fue superior significativamente a *Azospirillum* spp. 2 y *A. brasilense* con 2.26 y 1.88 gramos de peso de fresco, respectivamente (Figura 19). El medio 1 con 2.55 g fue significativamente mayor ($p < 0.001$) a los medios 2 y 3, con 2.14 y 1.95 g de peso fresco, respectivamente (Figura 20). La interacción cepas por medios presentó diferencias significativas ($p < 0.001$), donde M1:C1 fue mayor con 3.16 g de peso fresco en comparación al control que alcanzó los 1.66 g (Figura 21). El contraste entre factorial (2.21 g) y el control (1.66 g) fue significativo ($p < 0.001$).

Figura 19

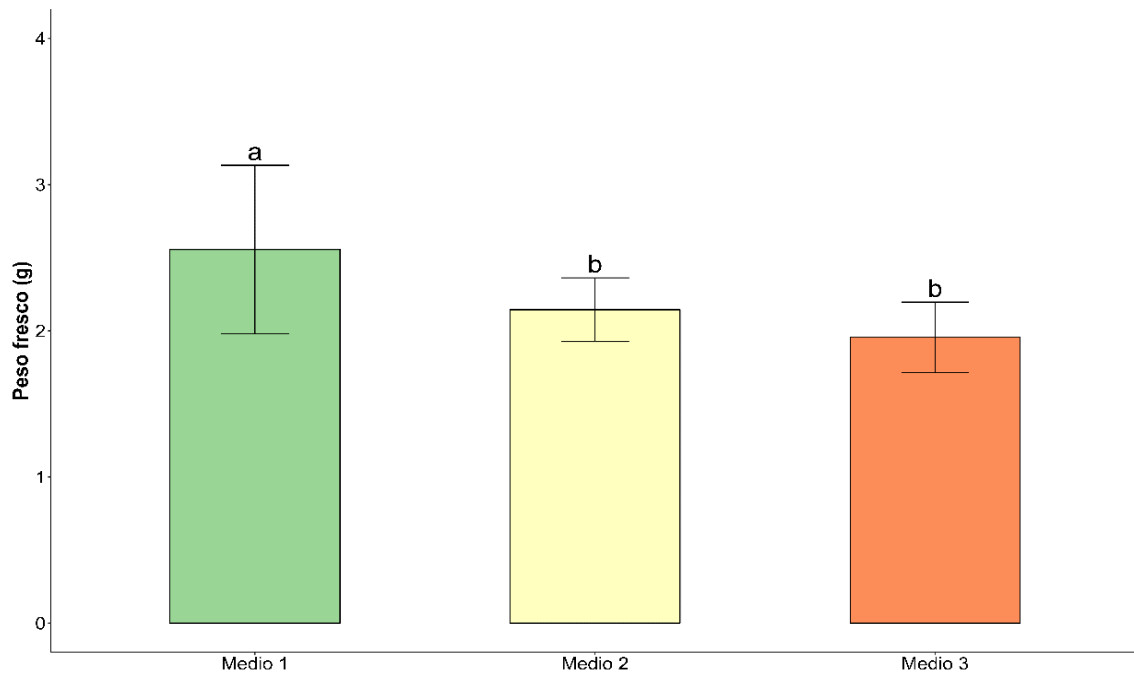
Efecto de la inoculación con cepas de *Azospirillum* spp. sobre el peso fresco de la planta maíz.



Nota: Las barras expresan la media y las líneas verticales sobre la media muestran la desviación estándar. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$).

Figura 20

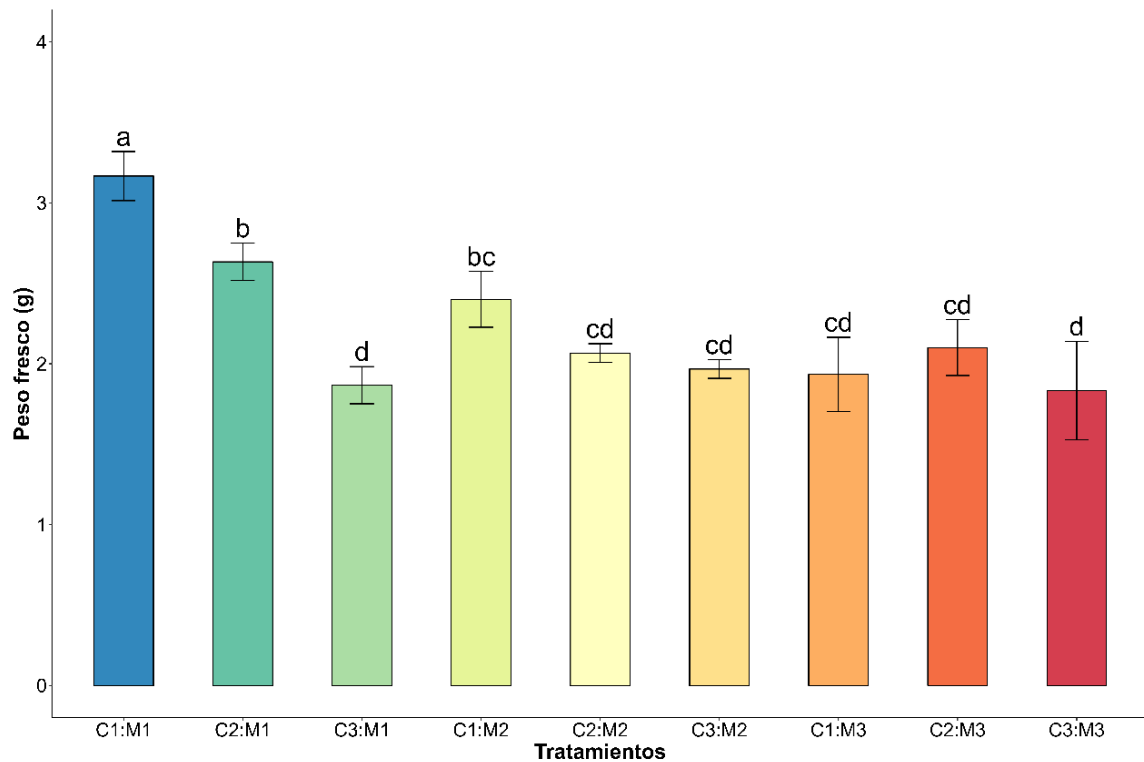
Efecto del medio de cultivo sobre el peso fresco radicular de la planta de maíz.



Nota: Las barras expresan la media y las líneas verticales sobre la media muestran la desviación estándar. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$).

Figura 21

Efecto de la interacción de cepas de Azospirillum spp. y medios de cultivo sobre el peso fresco radicular de la planta de maíz.



Nota: C1 = *Azospirillum* sp. 1; C2 = *Azospirillum* sp. 2; C3 = *Azospirillum brasilense*;

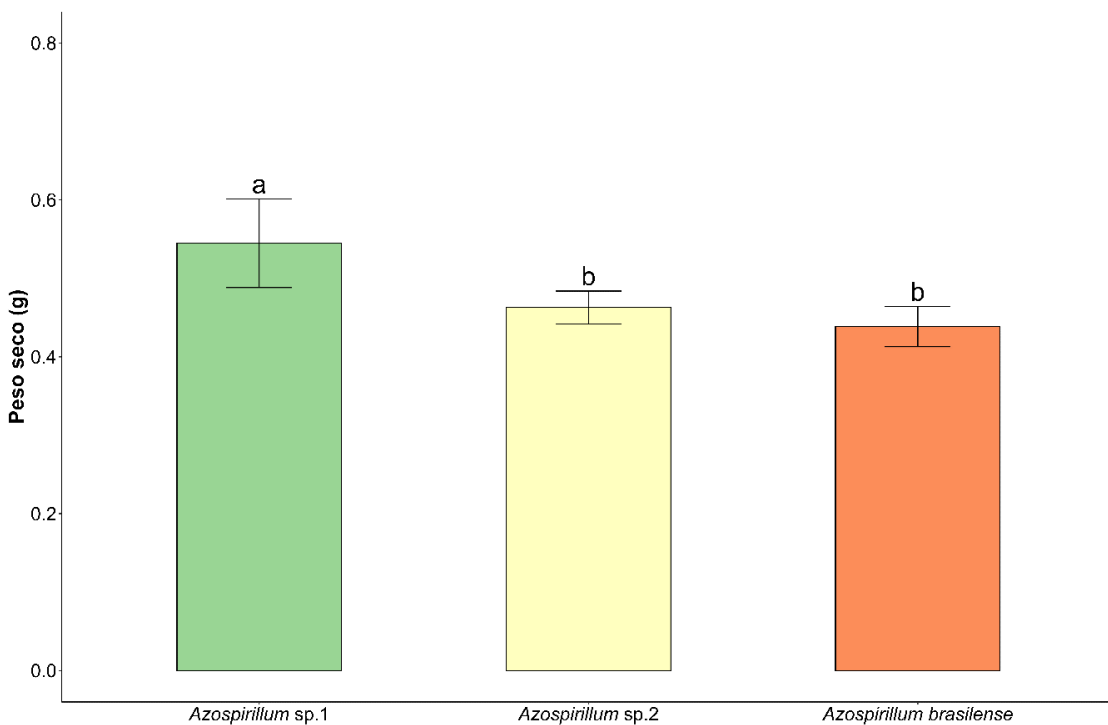
M1 = Medio 1; M2 = Medio 2; M3 = Medio 3.

4.1.8. *Peso seco*

En la variable de peso seco se encontraron diferencias estadísticas entre cepas ($p < 0.001$) donde *Azospirillum* spp. 1 con 0.54 g fue superior significativamente a *Azospirillum* spp. 2 (0.46 g) y *A. brasilense* (0.43 g) (Figura 22). El medio 1 con 0.51 g fue significativamente mayor ($p < 0.001$) a los medios 2 y 3, con 0.48 y 0.45 g de peso seco, respectivamente (Figura 23). La interacción cepas por medios presentó diferencias significativas ($p < 0.01$), donde M1:C1 fue mayor con 0.61 g de peso seco en comparación al control que alcanzó los 0.53 g (Figura 24). El contraste entre factorial (0.48 g) y el control (0.53 g) fue significativo ($p < 0.001$).

Figura 22

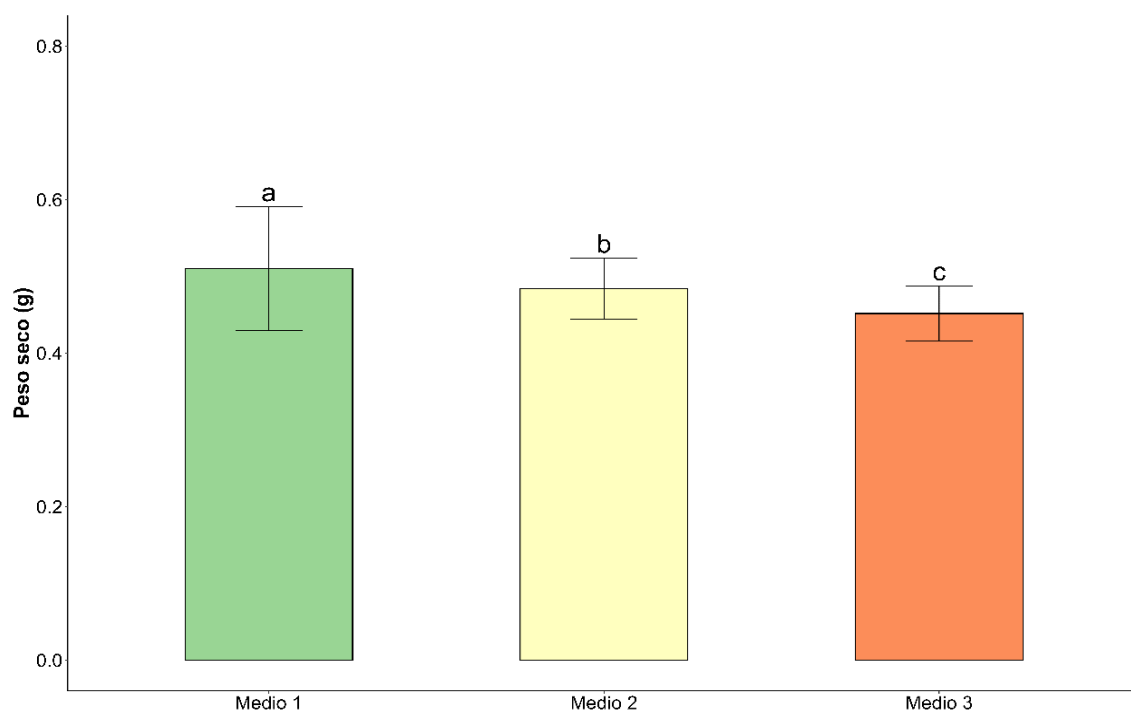
Efecto de la inoculación con cepas de Azospirillum spp. sobre el peso seco de la planta maíz.



Nota: Las barras expresan la media y las líneas verticales sobre la media muestran la desviación estándar. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$).

Figura 23

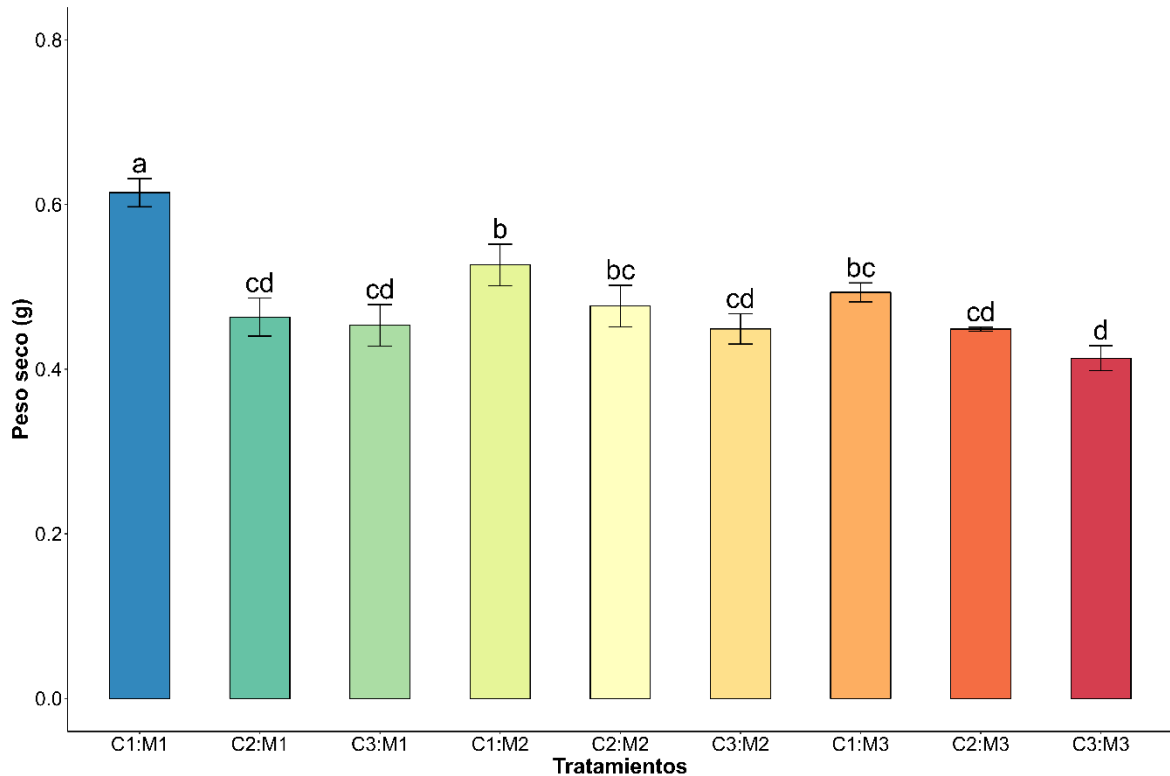
Efecto del medio de cultivo sobre el peso seco radicular de la planta de maíz.



Nota: Las barras expresan la media y las líneas verticales sobre la media muestran la desviación estándar. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$).

Figura 24

Efecto de la interacción de cepas de Azospirillum spp. y medios de cultivo sobre el peso seco radicular de la planta de maíz.



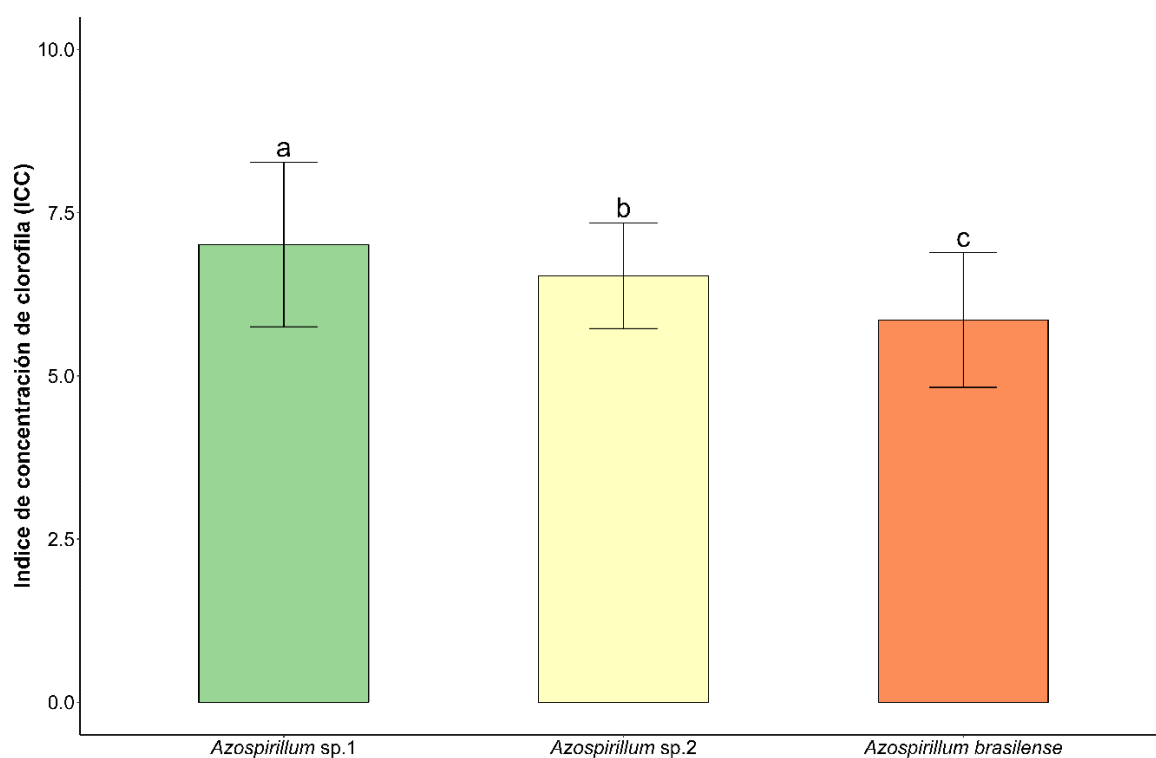
Nota: C1 = *Azospirillum* sp. 1; C2 = *Azospirillum* sp. 2; C3 = *Azospirillum brasilense*;
M1 = Medio 1; M2 = Medio 2; M3 = Medio 3.

4.1.9. Clorofila

En la variable clorofila presente en las hojas se encontraron diferencias estadísticas entre cepas ($p < 0.001$) donde *Azospirillum* spp. 1 con 7.03 fue superior significativamente a *Azospirillum* spp. 2 y *A. brasilense* con 6.53 y 5.85 de contenido de clorofila. respectivamente (Figura 25). El medio 1 con 7.23 fue significativamente mayor ($p < 0.001$) a los medios 3 y 2, con 6.63 y 5.53, respectivamente (Figura 26). La interacción cepas por medios presentó diferencias significativas ($p < 0.001$), donde M1:C1 fue mayor con 8.16 al resto de tratamientos, a excepción del tratamiento C2:M3 (Figura 27). El contraste entre factorial (6.46) y el control (4.03) fue significativo ($p < 0.001$)

Figura 25

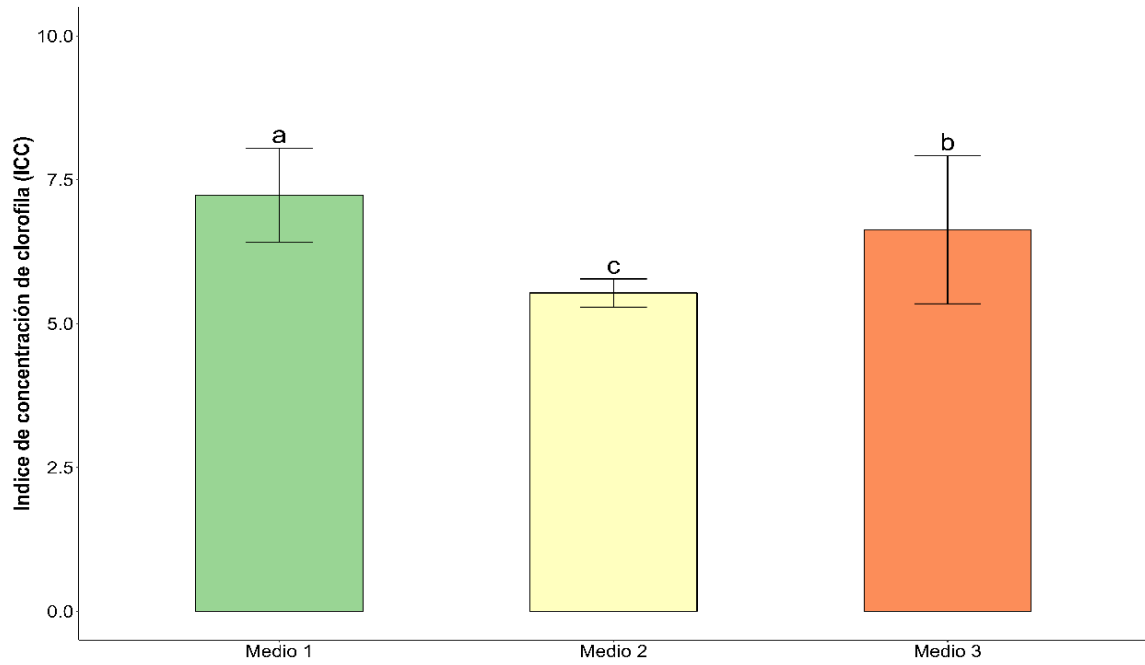
Efecto de la inoculación con cepas de Azospirillum spp. sobre el índice de concentración de clorofila en la planta de maíz.



Nota: Las barras expresan la media y las líneas verticales sobre la media muestran la desviación estándar. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$).

Figura 26

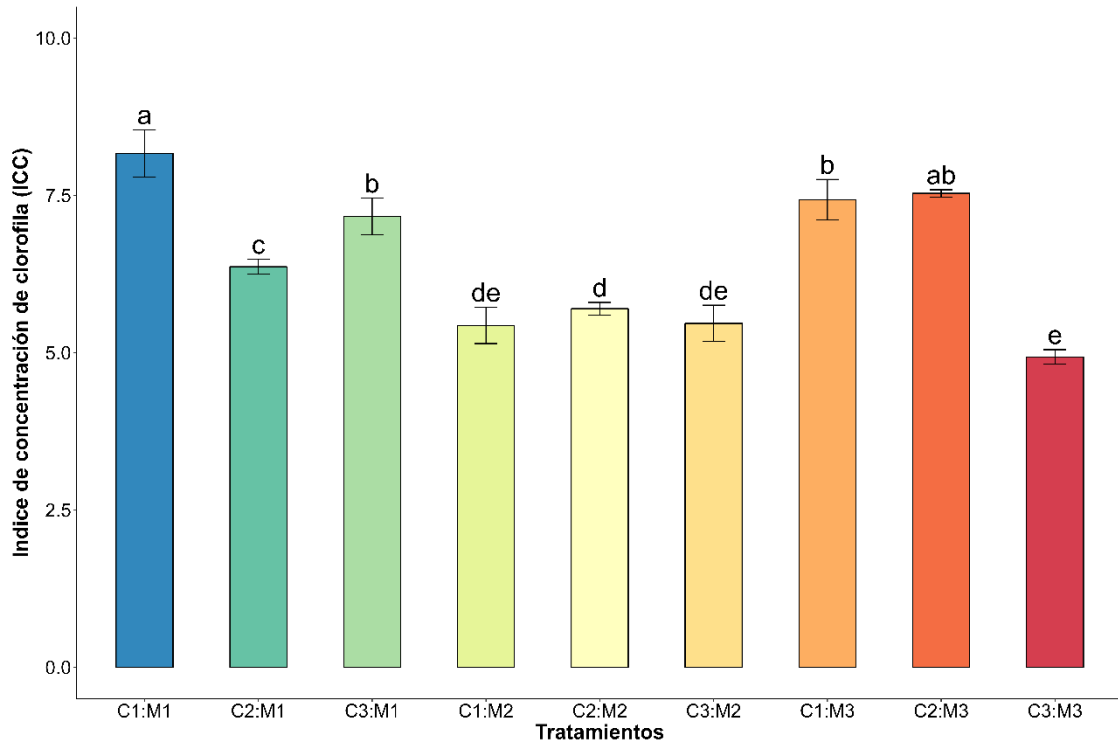
Efecto del medio de cultivo sobre el índice de concentración de clorofila en la planta de maíz.



Nota: Las barras expresan la media y las líneas verticales sobre la media muestran la desviación estándar. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($P < 0.05$).

Figura 27

Efecto de la interacción de cepas de Azospirillum spp. y medios de cultivo sobre índice de concentración de clorofila en la planta de maíz.



Nota: C1 = *Azospirillum* sp. 1; C2 = *Azospirillum* sp. 2; C3 = *Azospirillum brasilense*;
M1 = Medio 1; M2 = Medio 2; M3 = Medio 3.

4.2. Discusión

El objetivo principal de este estudio consistió en evaluar *Azospirillum* spp., como promotora de crecimiento y su actividad fijadora de nitrógeno en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.). Para alcanzar este propósito, se recopilieron datos que incluyen la densidad óptica (DO) entre otras variables. Se evaluaron tres cepas diferentes (*Azospirillum* spp.1, *Azospirillum* spp.2 y *Azospirillum brasilense*) en tres diferentes medios de cultivo, lo que proporciona información valiosa sobre el comportamiento y el rendimiento de estas cepas en un contexto experimental.

La densidad óptica (DO) es un indicador fundamental para comprender cómo estas cepas interactúan con la luz, lo que puede estar relacionado con su capacidad de crecimiento y fotosíntesis. Los valores de DO a lo largo del tiempo muestran cambios notables en la dinámica de estas cepas. *Azospirillum* spp.1, en particular, demuestra un aumento constante

en la densidad óptica a lo largo de las 48 horas, lo que podría sugerir un crecimiento continuo. En contraste, *Azospirillum* spp.2 muestra valores más consistentes, aunque ligeramente más bajos, y *Azospirillum brasilense* tiene valores extremadamente bajos y apenas cambiantes. Estas diferencias en la dinámica de la DO resaltan las respuestas únicas de cada cepa a las condiciones experimentales.

Azospirillum spp.1 demuestra una alta capacidad de absorción de luz a las 12 horas, que disminuye con el tiempo. La cepa 2, aunque con valores iniciales más bajos, también muestra una absorción significativa de luz. *Azospirillum brasilense*, por otro lado, tiene una absorción muy baja y constante a lo largo del tiempo.

La variable del número de semillas germinadas muestra diferencias estadísticas significativas entre factores, lo que indica que la cepa *Azospirillum* spp.1 tiene un impacto positivo en la germinación de semillas en comparación con *Azospirillum* spp.2 y *Azospirillum brasilense*. Esto podría sugerir que *Azospirillum* spp.1 es una opción preferente cuando el objetivo es mejorar la germinación de semillas.

En cuanto a la altura de la planta y la longitud radicular, se observan diferencias significativas entre los tratamientos. *Azospirillum brasilense* lidera en términos de altura, mientras que *Azospirillum* spp.1 muestra la longitud radicular más larga. Esto sugiere que la elección del tratamiento podría depender de los objetivos específicos, ya sea centrarse en el crecimiento vertical o en el desarrollo de raíces.

La variable de número de raíces no muestra diferencias significativas, lo que podría indicar que las cepas tienen un impacto similar en la formación de raíces. Sin embargo, es interesante destacar que los tratamientos con *Azospirillum* spp.1 y *Azospirillum brasilense* tuvieron un número mayor de raíces en comparación con *Azospirillum* spp.2. El volumen radicular muestra diferencias significativas, con *Azospirillum* spp.1 y *Azospirillum* spp.2 liderando en este aspecto. Esto sugiere que estas cepas tienen un efecto positivo en el desarrollo del sistema de raíces.

El peso de fresco y seco de la planta muestra diferencias significativas, y *Azospirillum* spp.1 obtiene los valores más altos. Esto indica que *Azospirillum* spp.1 tiene un impacto positivo

en el peso y el crecimiento de la planta. La variable de contenido de clorofila en las hojas también muestra diferencias significativas, y *Azospirillum* spp.1 nuevamente lidera con el contenido de clorofila más alto. Esto sugiere que *Azospirillum* spp.1 tiene un efecto positivo en la salud y la capacidad fotosintética de las plantas.

Diversos estudios respaldan consistentemente la eficacia de la inoculación con *Azospirillum* spp. en la promoción del desarrollo vegetativo en distintos cultivos y condiciones. De acuerdo con Rubiños (2019), la inoculación de *Azospirillum* spp. en maíz, realizada tanto antes de la siembra como en la emergencia de las plántulas, demostró un incremento significativo en el desarrollo vegetativo, destacándose en variables como altura, biomasa aérea y radicular, siendo más efectiva cuando se aplicó en las semillas antes de la siembra. Este hallazgo subraya el potencial de *Azospirillum* spp. como promotores del crecimiento en el maíz.

García *et al.* (2005) proporciona evidencia adicional al explorar la dinámica de colonización de *Azospirillum* spp. y *Azotobacter beijerinckii* en las raíces del trigo. La transformación de exudados radicales en SPCV por estas bacterias favoreció la absorción de urea en las raíces, resultando en un peso seco comparable al del trigo fertilizado con urea únicamente. Este estudio destaca la aplicación de las BBR (bacterias beneficiosas para la rizosfera) como una alternativa para reducir y optimizar la dosis de fertilizantes nitrogenados.

Los resultados de (Galeote *et al.*, 2022) en chiles Huacle negro, rojo y amarillo indican que, bajo condiciones de invernadero con diferentes sistemas de producción, la aplicación de *Azospirillum* sp. influyó positivamente en variables como altura de planta, número de hojas, peso de la parte aérea y radicular, así como el número de frutos por planta. Los genotipos de Chile Huacle se adaptaron favorablemente al sistema de producción orgánico con aplicaciones de *Azospirillum*, destacando la importancia de estas bacterias en la producción de chiles.

(Tagliaferro 2021) aporta información valiosa sobre la aplicación de cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus* y *Azospirillum brasilense* en Rye Grass anual, observando un aumento significativo en materia seca y altura de las plantas en comparación con el grupo de control. Este estudio subraya la capacidad de estas bacterias para promover el crecimiento en gramíneas forrajeras anuales.

(Guzmán *et al.* 2012) destaca la importancia de las bacterias diazotróficas de los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum* aisladas de la rizósfera de cultivos de algodón. La selección de cepas eficientes en la promoción del crecimiento vegetal apunta hacia su potencial aplicación como inoculantes para el algodón en la región del Espinal (Tolima). Estrada y Bonilla (2023) proporcionan evidencia sobre la co-inoculación de PGPB (bacterias promotoras del crecimiento vegetal) con diferentes fuentes de fósforo, destacando que la co-inoculación con BSF (bacterias solubilizadoras de fósforo) mejoró la disponibilidad de P en el suelo, aumentando significativamente la productividad del pasto kikuyo. Este enfoque se presenta como una estrategia efectiva para mejorar la solubilización y mineralización de fuentes de fósforo de baja solubilidad en praderas establecidas.

(Rangel *et al.*, 2011) exploraron la afinidad y el efecto de cepas de *Azospirillum* en maíz, observando resultados significativos en la población bacteriana y la fijación de nitrógeno, resaltando la importancia de la selección de cepas específicas para obtener beneficios óptimos en distintas variedades de maíz. (Cortez 2012) evaluó la promoción del crecimiento en plantas de maíz inoculadas con *Azospirillum* sp., observando diferencias significativas en la altura de la parte aérea. Este estudio destaca la capacidad de estas rizobacterias para influir en el desarrollo vegetal.

Aguirre *et al.* (2011) encontraron una respuesta diferencial entre *Azospirillum brasilense* y *Glomus intraradice* en café, destacando el papel de *A. brasilense* en el desarrollo radical y la mejora del contenido de nutrientes. Este hallazgo sugiere que la combinación de microorganismos beneficiosos puede tener un impacto positivo en el rendimiento de los cultivos. (Terry *et al.*, 2005) evaluaron la efectividad de *Azospirillum* sp. en el cultivo del tomate, destacando su papel dominante en la rizosfera y su impacto positivo en el crecimiento y rendimiento de las plantas. Este estudio resalta la importancia de considerar la interacción de *Azospirillum* con otros géneros bacterianos en la rizosfera.

(Abril *et al.*, 2006) exploraron el grado de colonización de raíces en diferentes ensayos de campo, observando una variabilidad significativa entre los tratamientos inoculados y el control. Aunque no se identificó un patrón claro, se destaca la importancia de considerar factores como el estrés hídrico y el origen de las cepas inoculantes en la colonización de raíces. (Grellet *et al.* 2017) evaluaron la cepa *A. brasilense* Az39 como biofertilizante para

el cultivo de sorgo azucarado, observando un aumento significativo en la emergencia de plántulas y el desarrollo tanto de la parte aérea como del sistema radicular. Este estudio destaca el potencial de esta cepa como una herramienta para mejorar el rendimiento del cultivo.

Finalmente, (Aguirre *et al.*, 2014) investigaron el efecto de la inoculación con *Rhizophagus intraradices*, *Glomus* spp. y *Azospirillum brasilense* en la especie maderable primavera. Los resultados indicaron un mayor crecimiento en plantas inoculadas, subrayando la relevancia de estas bacterias en el establecimiento y crecimiento de especies forestales en condiciones de vivero.

Los datos y resultados presentados proporcionan información valiosa sobre el impacto de diferentes cepas de *Azospirillum* en diversas variables relacionadas con el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Estos hallazgos pueden guiar la selección de cepas y tratamientos en función de los objetivos específicos de un cultivo o experimento agrícola. La comprensión de cómo estas cepas afectan a las plantas en términos de germinación, crecimiento y salud puede contribuir significativamente a la optimización de las prácticas agrícolas y la mejora de los rendimientos.

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Las mediciones de densidad óptica (OD) para tres cepas diferentes (*Azospirillum* spp.1, *Azospirillum* spp.2 y *Azospirillum brasilense*) tomadas en tres momentos distintos (12 horas, 24 horas y 48 horas), muestra variaciones a lo largo del tiempo, lo que sugiere cambios en la dinámica de las cepas en estudio.
- En el estudio de germinación de semillas, *Azospirillum* spp.1 mostró la tasa de germinación más alta, con un 66%, mientras que *Azospirillum* spp.2 y *Azospirillum brasilense* tuvieron tasas más bajas, del 52% y 48% respectivamente.
- En la altura de la planta, *Azospirillum brasilense* tuvo la mayor altura (15.03 cm), en la longitud radicular, *Azospirillum* spp.1 mayor con (24.48 cm), en el número de raíces, volumen radicular, peso fresco y peso seco de la planta y contenido de clorofila *Azospirillum* spp.1 fue mayor, diferenciándose de los demás tratamientos.

5.2.Recomendaciones

- Investigar si la combinación de cepas podría conducir a un rendimiento aún mejor en términos de germinación, crecimiento y desarrollo de las plantas.
- Implementar un seguimiento constante del parámetro de altura de las plantas, respaldado por prácticas efectivas que promuevan el desarrollo de raíces saludables, implicando no solo medir la altura de las plantas de manera regular, sino también adoptar estrategias específicas, como el riego adecuado, la aplicación balanceada de nutrientes y el uso de sustratos que favorezcan el crecimiento radicular.
- Implementar investigaciones más detallada sobre el contenido de clorofila, con el objetivo de comprender a fondo cómo estas variaciones inciden en las variables agronómicas de las plantas, incluyendo mediciones de indicadores clave de salud y rendimiento vegetal, como la fotosíntesis y la biomasa.

CAPÍTULO VI
BIBLIOGRAFÍA

6.1. Bibliografía

- Abril, A., Biasutti, C., Maich, R., Dubbini, L., y Noe, L. (2006). Inoculación con *Azospirillum* spp. en la Región Semiárida-Central de Argentina: factores que afectan la colonización rizosférica. *Ciencia del suelo*, 24(1).
- Aguirre, J., Culebro, F., Cadena, J., y Aguirre, J. (2014). Crecimiento de *Tabebuia donnell-smithii* Rose inoculada con hongos micorrízicos y *Azospirillum brasilense*. *Agrociencia*, 48(3).
- Aguirre, J., Moroyoqui, D., Mendoza, A., Cadena, J., Avendaño, C., y Aguirre, J. (2011). Hongo endomicorrízico y bacteria fijadora de nitrógeno inoculadas a *Coffea arabica* en vivero. *Agronomía Mesoamericana*, 22(1).
- Alexandratos, N. (2010). *World Agriculture: Towards 2010, an FAO Study*. Roma: Willey and Son, Chichester GB and FAO.
- Arca, C. (2018). *Taxonomía del maíz*. Revista de Ciencias Agrícolas. Australian Centre for International Agricultural Research Proceedings.
- Avis, T. (2008). Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil biology and biochemistry*, 40, 1733-1740.
- Avis, T. (2008). Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil biology and biochemistry*, 40, 1733-1740.
- Bashan, Y., Levanony, H., y Whitmoyer, R. (1991). *Root surface colonization of non-cereal crop plants by pleomorphic Azospirillum brasilense Cd*. Journal of General Microbiology.
- Bernal, G., Illanes, A., y Ciampi, L. (2020). *Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of Bacillus sp.* Electronic Journal of Biotechnology.
- Britania. (2021). *Pseudomonas Agar F*. Laboratorio Britania S.A.
- Caballero, J. (2006). Agriculture microbiology and microbe interaction with plants. *Rev.*
- Cassán, F., y Diaz, M. (2016). *Azospirillum* sp. in current agriculture: from the laboratory to the field. *Soil Biology and Biochemistry*.
- Castillo, F., y Ruiz, R. (2005). *Biotecnología ambiental*. Editorial Tébar. *ChemicoBiological Interactions*, 235, 63-75.
- Corrales, L., Antolinez, D., Bohórquez, J., & Corredor, A. (2015). *Anaerobic bacteria: processes they perform and their contribution to life sustainability on the planet*. [Tesis de Grado]. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

- Cortez, M. (2012). *Evaluación de la capacidad de promoción de crecimiento vegetal de Azospirillum SP. En plantas de maíz (Zea Mays L.)*. [Tesis de Grado]. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Didonet, A., y Magalhaes, A. (1997). *Growth and nitrite production by Azospirillum strains subjected to different levels of dissolved oxygen in the medium*. Soil Biology and Biochemistry
- Doyle, M., Beuchat, L., y Montville, T. (2001). *Microbiología de los alimentos fundamentos y fronteras*. Acribia.
- Estrada, G., y Bonilla, C. (2023). *Efecto de la inoculación de bacterias promotoras del crecimiento en la dinámica del fósforo edáfico en kikuyo (Cenchrus clandestinum Hochst. ex Chiov.)*. [Tesis de Grado]. Universidad Nacional de Colombia.
- Fajardo, E., y Sarmiento, S. (2007). *Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de Saccharomyces cerevisiae*. [Tesis de Grado]. Universidad Pontificia Javeriana.
- Figuerola, O. (2012). *Guía técnica: Análisis de suelo y fertilización en el cultivo de café*. Perú: [Tesis de Grado]. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Figuerola, O. (2012). *Guía técnica: Análisis de suelo y fertilización en el cultivo de café*. Perú: [Tesis de Grado]. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Fukami, J., Cerezini, P., y Hungria, M. (2018). *Azospirillum: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation*. AMB Express.
- Galeote, G., Cano, P., Ramírez, A., Nava, U., Reyes, L., y Cervantes, G. (2022). *Comportamiento del chile Huacle (Capsicum annum L.) con aplicación de compost y Azospirillum sp. en invernadero*. Terra Latinoamericana, 40.
- García, M., Faría, R., Peña, J., y Sánchez, M. (2005). *Inoculación del trigo var. Pavón con Azospirillum spp. y Azotobacter beijerinckii*. Terra Latinoamericana, 23(1), 65-72.
- García, S., y Serna, O. (2009). *Chapter 1 - Corn History and Culture*. In: Serna-Saldivar SOBT-C.
- Georgiou, P., Mouton, J., Pournaras, S., y Meletiadiis, J. (2020). *Cuantificación bacteriana en homogeneizados de tejidos de estudios farmacodinámicos in vivo utilizando curvas de crecimiento*. Journal of Medical Microbiology.
- Grellet, N., Vera, L., Leggio, F., Fernández, P., Sánchez, A., Fernández, J., Romero, E., y Tortora, M. (2017). *Evaluación de la cepa Azospirillum brasilense Az39 como biofertilizante para el cultivo de sorgo azucarado*. Revista industrial y agrícola de Tucumán, 94(1).

- Guzmán, A., Obando, M., Rivera, D., y Bonilla, R. (2012). Selección y caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14.
- Hernández, A., Alfaro, I., y Arrieta, D. (1988). *Microbiología Industrial* - Google Books. Editorial Universidad Estatal a Distancia.
- INEC. (2014). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua*. Retrieved 20 de febrero de 2023, from Instituto Nacional de Estadística y Censo.
- INEC. (2014). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua*. Recuperado el 20 de febrero de 2023, de Instituto Nacional de Estadística y Censo.
- Jayaram, S., Kapoor, S., y Dharmesh, S. (2011). Pectic polysaccharide from corn (*Zea mays*L.) effectively inhibited multi-step mediated cancer cell growth and metastasis.
- Karp, G. (2009). *Biología Celular y Molecular*. Editorial McGrawHill.
- Kim, K., Choi, D., Lim, H., Kim, H., & Jeon, J. (2016). *Examen in situ basado en marcadores de visión del crecimiento bacteriano en medios de cultivo líquidos*. . Sensores (Basilea).
- Kumar, J. (2012). *Libro de texto de microbiología*. Medical Ltd, Nueva Delhi.
- Lagier, J., Edouard, S., Pagnier, I., Mediannikov, O., Drancourt, M., & Raoult, D. (2015). *Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology*. *Clinical Microbiology Reviews Latinoam*, 151-161.
- López, L., y Torres, C. (2006). *Medios de Cultivo* . Universidad Nacional del Nordeste .
- Madigan, M., Martinko, J., y Parker, J. (2011). *Brock biología de los microorganismos*. Pearson,
- Marschner, P. (2012). *Mineral nutrition of higher plants* (Third edition ed.). (Amsterdam, Ed.) Marschner.
- Marschner, P. (2012). *Mineral nutrition of higher plants* (Third edition ed.). (Amsterdam, Ed.) Marschner.
- Martinez, L. (2018). Biofertilización y fertilización química en maíz (*Zea mays* l.). *Villaflores*, 5(1), 26-37.
- Martinez, L. (2018). Biofertilización y fertilización química en maíz (*Zea mays* l.). *Villaflores*, 5(1), 26-37.
- Matos, M., Valdivia, A., Rodríguez, Z., Boucourt, R., Brizuela, M., Portilla, Y., . . . Ramírez, H. (2018). Producción de xilanasas por *Bacillus subtilis* E44 en

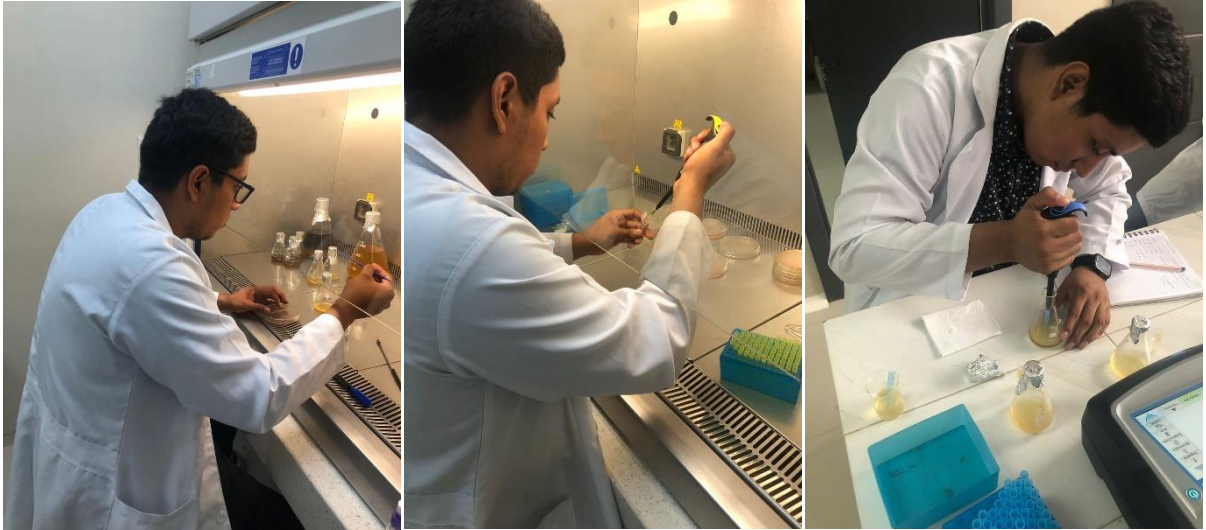
- condiciones de fermentación sumergida.
- Navarro, S., y Navarro, G. (2000). *Química agrícola: el suelo y los elementos químicos esenciales para la vida*. Google Books.
- Osorio, A., Gómez, N., y Sánchez, C. (2008). *Evaluación de diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno para la producción de renina a partir del moho *Mucor miehei**. Revista Facultad de Ingeniería. Oxford: AACC International Press.
- Paliwal, R. (2001). *Introducción al Maíz y su importancia*. In Paliwal RL, Granados. *El maíz en los trópicos mejoramiento y producción*. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Paliwal, R. (2001). *Introducción al Maíz y su importancia*. In Paliwal RL, Granados. *El maíz en los trópicos mejoramiento y producción*. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Pazos, M. (2000). *Aislamiento e identificación de cepas nativas, pertenecientes al género *Azospirillum* mediante*. [Tesis de Grado]. Universidad de La Habana.
- Pereg, L., Bashan, L., y Bashan, Y. (2016). *Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants*. Plant and Soil.
- Petrucci, R., Herring, F., Madura, J., y Bissonnette, C. (2017). *Química General. Principios y aplicaciones modernas*. Editorial Pearson.
- Piperno, D. (2003). A few kernels short of a cob: on the Staller and Thompson late entry scenario for the introduction of maize into northern South America. *Journal of Archaeological Science*, 30(7), 831-836.
- Piperno, D. (2003). A few kernels short of a cob: on the Staller and Thompson late entry scenario for the introduction of maize into northern South America. *Journal of Archaeological Science*, 30(7), 831-836. Prentice Hall Hispanoamericana.
- Quintero, R., y López, C. (1993). *Biotecnología alimentaria*. Limusa.
- Rangel, J., Rodríguez, M., Ferrera, R., Castellanos, J., Ramírez, R., & Alvarado, E. (2011). Afinidad y efecto de *Azospirillum* sp. en maíz. *Agronomía Mesoamericana*, 2(2).
- Regulator, O. o. (2008). *The Biology of *Zea mays* L. ssp *mays* (maize or corn)*. Australian Government. Department of Health.
- Rimski, H., Zubillaga, M., Landriscini, M., & Lavado, R. (2015). *¿A dónde va el N de la fertilización del maíz cuando hay estrés hídrico?* International Plant Nutrition Institute. doi:2-4

- Rivera, D. (2008). *Optimización de un medio de cultivo para la producción de un inoculante con base en Azospirillum brasilense C16* . [Tesis de Grado]. Universidad Francisco de Paula Santander.
- Rocha. (2008). *Cinética de crecimiento biológico*. Ingeniería de Tratamiento de Aguas Residuales .
- Rocha. (2008). *Cinética de crecimiento biológico*. Ingeniería de Tratamiento de Aguas Residuales .
- Rubiños, T. (2019). *Efecto de dos Momentos de Inoculación de Azospirillum Spp. Nativas en el desarrollo vegetativo de Zea Mays L. en condiciones de invernadero*. [Tesis de Grado]. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- Singleton, P., Keyser, H., y Sande, E. (2002). *Development and evaluation of liquid inoculants*.
- Steenhoudt, O. (2000). Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology*, 487 – 506.
- Tagliaferro, S. (2021). *Evaluación de la persistencia en filósfera y efecto promotor del crecimiento de gluconacetobacter sp. y Azospirillum sp. en rye grass anual (lolium multiflorum lam.) en el noroeste de la provincia de Buenos Aires*. [Tesis de Grado]. Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires (UNNOBA) .
- Tarrand, J., Krieg, N., y Dobereiner, A. (1978). *A taxonomic study of the Spirillum lipoferum group, with descriptions of a new genus Azospirillum gen. nov. and two pecies, Azospirillum lipoferum comb. nov. and Azospirillum brasilense sp. nov. Canadian Journal of Microbiology*.
- Terry, E., Leyva, Á., y Hernández, A. (2005). Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (Lycopersicon esculentum, Mill). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 7(2).
- Valerio, J. (2012). Evaluación de una fuente de enmienda líquida en el rendimiento del arroz en un ultisol de la zona norte de Costa. *Agronomía Costarricense*, 36(1), 89-96.
- Velazco, A. (2001). *Utilización de Azospirillum brasilense en el cultivo del arroz (Oryza sativa L.) sobre un suelo Hidromórfico Gley de la provincia de Pinar del Río* . Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente. Instituto de Ecología y Sistemática.

CAPITULO VII
ANEXOS

7.1. Anexos

Anexo A. Aislamiento y replicación de las cepas de *Azospirillum* spp.



Anexo B. Aplicación de las cepas bacterianas a las semillas de maíz.



Anexo C. Evaluación de la germinación.



Anexo D. Siembra de semillas de maíz inoculadas con las bacterias.



Anexo E. Evaluación de variables agronómicas.



Anexo F. ADEVA de Curva de crecimiento por densidad Óptica (OD) a 559nm.

Medio 1

hora	cepas_rep	N	od	sd	se	ci
1	12	Cepa 1 3	0.66233333	0.002081666	0.001201850	0.005171145
2	12	Cepa 2 3	0.55400000	0.148687592	0.085844821	0.369360454
3	12	Cepa 3 3	0.07100000	0.049507575	0.028583212	0.122983635
4	24	Cepa 1 3	0.71566667	0.040153871	0.023182848	0.099747745
5	24	Cepa 2 3	0.63200000	0.192260240	0.111001501	0.477600913
6	24	Cepa 3 3	0.04433333	0.005773503	0.003333333	0.014342176
7	48	Cepa 1 3	0.78500000	0.005291503	0.003055050	0.013144821
8	48	Cepa 2 3	0.76166667	0.088001894	0.050807917	0.218608823
9	48	Cepa 3 3	0.05366667	0.003511885	0.002027588	0.008724005

Medio 2

hora	cepas_rep	N	od	sd	se	ci
1	12	Cepa 1 3	0.27466667	0.001527525	0.0008819171	0.003794583
2	12	Cepa 2 3	0.78866667	0.096779819	0.0558758545	0.240414398
3	12	Cepa 3 3	0.08233333	0.015567059	0.0089876458	0.038670719
4	24	Cepa 1 3	0.70666667	0.103345698	0.0596666667	0.256724946
5	24	Cepa 2 3	0.51466667	0.001527525	0.0008819171	0.003794583
6	24	Cepa 3 3	0.16566667	0.016196707	0.0093511734	0.040234852
7	48	Cepa 1 3	0.98766667	0.261867015	0.1511889914	0.650513726
8	48	Cepa 2 3	0.73266667	0.105310652	0.0608011330	0.261606161
9	48	Cepa 3 3	0.37333333	0.001154701	0.0006666667	0.002868435

Medio 3							
	hora	cepas_rep	N	od	sd	se	ci
1	12	Cepa 1	3	1735.0000	9.6436508	5.5677644	23.956157
2	12	Cepa 2	3	630.5767	1090.6926010	629.7116668	2709.430622
3	12	Cepa 3	3	0.5000	0.1563682	0.0902792	0.388440
4	24	Cepa 1	3	1856.0000	77.2528317	44.6019432	191.906672
5	24	Cepa 2	3	1732.0000	2.6457513	1.5275252	6.572411
6	24	Cepa 3	3	580.5380	1004.1235557	579.7310052	2494.381192
7	48	Cepa 1	3	1280.2900	1110.2191911	640.9853488	2757.937361
8	48	Cepa 2	3	1814.0000	73.1846979	42.2532050	181.800868
9	48	Cepa 3	3	1823.3333	2.0816660	1.2018504	5.171145

Anexo G. ADEVA de Número de semillas germinadas.

CV (%) = 12.97
Mean Factorial = 55.1852
Median Factorial = 60
Mean Aditonal = 30
Median Aditonal = 30
Possible outliers = No discrepant point

Analysis of Variance

	Df	Sum Sq	Mean.Sq	F value	Pr(F)
Cepas	2	1540.7407	770.37037	16.507937	5.837687e-05
Medios	2	896.2963	448.14815	9.603175	1.193262e-03
Cepas x Medios	4	503.7037	125.92593	2.698413	6.017247e-02
Ad x Factorial	1	1712.5926	1712.59259	36.698413	6.380270e-06
Residuals	20	933.3333	46.66667		

Anexo H. ADEVA de Altura de planta.

CV (%) = 4.28
Mean Factorial = 0.4821
Median Factorial = 0.4667
Mean Aditonal = 0.5311
Median Aditonal = 0.5333
Possible outliers = No discrepant point

Analysis of Variance

	Df	Sum Sq	Mean.Sq	F value	Pr(F)
Cepas	2	0.055814025	0.0279070123	64.321633	1.944678e-09
Medios	2	0.015502914	0.0077514568	17.865988	3.542057e-05
Cepas x Medios	4	0.012041877	0.0030104691	6.938697	1.130841e-03
Ad x Factorial	1	0.006492504	0.0064925037	14.964283	9.569273e-04
Residuals	20	0.008677333	0.0004338667		

Anexo I. ADEVA de Peso fresco.

CV (%) = 8.61
Mean Factorial = 2.2185
Median Factorial = 2.1
Mean Aditonal = 1.6667
Median Aditonal = 1.5
Possible outliers = No discrepant point

Analysis of Variance

	Df	Sum Sq	Mean.Sq	F value	Pr(F)
Cepas	2	1.7118519	0.85592593	24.690171	3.962193e-06
Medios	2	1.6940741	0.84703704	24.433761	4.267322e-06
Cepas x Medios	4	1.2681481	0.31703704	9.145299	2.273126e-04
Ad x Factorial	1	0.8222593	0.82225926	23.719017	9.267967e-05
Residuals	20	0.6933333	0.03466667		

Anexo J. ADEVA de Peso seco.

CV (%) = 4.28
Mean Factorial = 0.4821
Median Factorial = 0.4667
Mean Aditonal = 0.5311
Median Aditonal = 0.5333
Possible outliers = No discrepant point

Analysis of Variance

	Df	Sum Sq	Mean.Sq	F value	Pr(F)
Cepas	2	0.055814025	0.0279070123	64.321633	1.944678e-09
Medios	2	0.015502914	0.0077514568	17.865988	3.542057e-05
Cepas x Medios	4	0.012041877	0.0030104691	6.938697	1.130841e-03
Ad x Factorial	1	0.006492504	0.0064925037	14.964283	9.569273e-04
Residuals	20	0.008677333	0.0004338667		

Anexo K. ADEVA de Longitud radicular.

CV (%) = 3.89
Mean Factorial = 23.6873
Median Factorial = 23
Mean Aditonal = 15.7
Median Aditonal = 15.7
Possible outliers = No discrepant point

Analysis of Variance

	Df	Sum Sq	Mean.Sq	F value	Pr(F)
Cepas	2	9.098065	4.5490325	5.746499	1.066989e-02
Medios	2	143.940806	71.9704029	90.915554	9.128909e-11
Cepas x Medios	4	52.804945	13.2012362	16.676268	3.707158e-06
Ad x Factorial	1	172.251103	172.2511033	217.593677	3.275269e-12
Residuals	20	15.832363	0.7916181		

Anexo L. ADEVA de Volumen radicular.

CV (%) = 6.97
Mean Factorial = 1.5522
Median Factorial = 1.6
Mean Aditonal = 1.2778
Median Aditonal = 1.3
Possible outliers = No discrepant point

Analysis of Variance

	Df	Sum Sq	Mean.Sq	F value	Pr(F)
Cepas	2	0.4411556	0.22057778	19.546424	1.972199e-05
Medios	2	0.1483556	0.07417778	6.573238	6.396262e-03
Cepas x Medios	4	0.3064889	0.07662222	6.789852	1.272047e-03
Ad x Factorial	1	0.2033633	0.20336333	18.020972	3.966080e-04
Residuals	20	0.2256963	0.01128481		

Anexo M. ADEVA de Clorofila.

CV (%) = 3.73
Mean Factorial = 6.4667
Median Factorial = 6.3
Mean Aditonal = 4.0333
Median Aditonal = 4
Possible outliers = No discrepant point

Analysis of Variance

	Df	Sum Sq	Mean.Sq	F value	Pr(F)
Cepas	2	6.068889	3.034444	56.19342	6.192301e-09
Medios	2	13.380000	6.690000	123.88889	5.402012e-12
Cepas x Medios	4	11.957778	2.989444	55.36008	1.547364e-10
Ad x Factorial	1	15.987000	15.987000	296.05556	1.868505e-13
Residuals	20	1.080000	0.054000		