

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN – TACNA

Facultad de Ciencias

Escuela Académico Profesional de Biología Microbiología

**Influencia de la biofertilización con *Azotobacter chroococcum* en
la producción y calidad de cebolla rosada (*Allium cepa* L.)
en el valle de Locumba**

Tesis

Presentada por:

Bach. Gladys Aycaya Quenaya

Para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

TACNA – PERÚ

2012

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHOMANN – TACNA

FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS 183

TITULO PROFESIONAL: BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

El secretario Académico Administrativo de la facultad de ciencias; certifica que por resolución de la facultad N° 7259 - 2012 - FACI/UNJBG, se ha diseñado como jurado calificador para la sustentación de la tesis: "Influencia de la biofertilización con *Azotobacter chroococcum* en la producción y calidad de cebolla rosada (*Allium cepa* L.) en el valle de Locumba", conformado por:

PRESIDENTE: Msc. Cesar Efraín Rivasplata Cabanillas
SECRETARIO: Mgr. Isabel Ancco Oliva
VOCAL: Blga. Liduvina Sulca Quispe

Quienes calificaron el trabajo de tesis sustentado en acto público el día 28 de noviembre del 2012, a las 16 horas, por la bachiller GLADYS AYCAYA QUENAYA, de la Escuela Académica Profesional de Biología Microbiología.

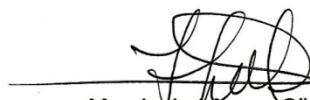
El jurado calificador en forma secreta e individual, se pronunció sobre el calificativo del trabajo expuesto, procedimiento a emitir el siguiente resultado:

Aprobado por unanimidad con la nota de 12 (doce) con el calificativo de regular.

Para ratificar firma:



Msc. Cesar Efraín Rivasplata Cabanillas
PRESIDENTE



Mgr. Isabel Ancco Oliva
SECRETARIO



Blga. Liduvina Sulca Quispe
VOCAL

DEDICATORIA

A mi madre SATURNINA, por su amor incondicional, apoyo, comprensión y sacrificio; que me brindó y por aquellos principios y valores que siempre me inculcó.

A mi padre MARIANO, a mi hermano EDWIN y a toda mi familia que me brindó el apoyo necesario para culminar mi carrera profesional.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor Msc. DALADIER CASTILLO COTRINA, por sus orientaciones y apoyo durante el desarrollo de la presente tesis.

A los docentes de la Escuela Académica Profesional de Biología Microbiología, por sus enseñanzas durante los cinco años de estudio de la carrera.

A la MUNICIPALIDAD JORGE BASADRE, por los recursos brindados en el desarrollo de la presente tesis.

Al Ing. Agrónomo AVELINO GARCÍA LEVANO por sus orientaciones e información brindada durante el desarrollo de la presente tesis.

Al Ing. RENAN JESUS CARNERO LUQUE, por su apoyo incondicional para la ejecución de la presente tesis.

A mi tío RAÚL, por sus palabras de aliento en los momentos que más necesité durante mi carrera y hasta el término de la presente Tesis.

A mis amigos de estudio quienes me acompañaron y brindaron su apoyo en los buenos y malos momentos que estudiamos en la universidad.

CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
CONTENIDO	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE CUADROS.....	ix
RESUMEN.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN	01
Objetivos.....	03
Objetivo general.....	03
Objetivos específicos	03
Hipótesis	03
II. MARCO TEÓRICO	04
EL CULTIVO DE CEBOLLA.....	04
Clasificación botánica.....	04
Importancia del cultivo de cebolla	04
Origen	06
Descripción botánica.....	07
REQUERIMIENTOS CLIMÁTICOS	11
Requerimientos fotoperiódicos.....	11

FASES DE DESARROLLO DE LA CEBOLLA.....	12
Cambios bioquímicos durante la maduración del bulbo.....	13
Parámetros de calidad	14
Criterios de cosecha	17
Índices de cosecha	17
Sistema de recolección	18
Manejo post cosecha	18
CONTROL DE PLAGAS Y ENFERMEDADES.....	19
Control de plagas.....	19
Control de enfermedades.....	21
BIODIVERSIDAD DEL SUELO	25
MICROBIOLOGÍA DE LA RIZÓSFERA.....	28
BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO.....	29
MICROORGANISMOS FIJADORES DE NITRÓGENO ATMOSFÉRICO.....	31
FAMILIA AZOTOBACTERACEAE.....	33
GENERALIDADES DEL GÉNERO <i>Azotobacter</i> sp	35
INOCULACIÓN CON BACTERIAS ASIMBIÓTICAS	38
TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN REALIZADAS CON	
<i>Azotobacter chroococcum</i>	44
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
Lugar de experimentación.....	48
Material experimental.....	48
Diseño experimental	48

METODOLOGÍA	51
Etapa de aislamiento de <i>Azotobacter chroococcum</i> nativo	51
Recolección de muestras de suelo.....	51
Aislamiento de <i>A. chroococcum</i>	52
Caracterización e identificación de <i>A. chroococcum</i>	53
Producción de la biomasa de <i>A. chroococcum</i>	54
Etapa de campo.....	56
Preparación del suelo del área experimental	56
Obtención del almácigo.....	57
Inoculación de <i>A. chroococcum</i> en plantines de cebolla (<i>Allium cepa</i> L.) antes de su plantación en campo.....	57
Plantación de los plantines de cebolla (<i>Allium cepa</i> L.) en campo.....	58
Mantenimiento y control de la plantación de cebolla (<i>Allium cepa</i> L.)	58
Evaluación de la producción y calidad de la cebolla.....	60
Análisis estadístico.....	62
IV. RESULTADOS	63
V. DISCUSIÓN	95
VI. CONCLUSIONES	98
VII. RECOMENDACIONES	99
VIII. BIBLIOGRAFÍA	100
IX. ANEXOS.....	106

LISTA DE FIGURAS

Figura N° 1:	Promedio de los tratamientos sobre la producción de la cebolla rosada obtenida en la experimentación (kg/parcelas).....	64
Figura N° 2:	Promedio de los tratamientos sobre la producción de cebolla rosada obtenida en la experimentación (kg/ha).....	68
Figura N° 3:	Promedio de los tratamientos sobre la altura de cebolla rosada obtenida a los 50 días en la experimentación.....	72
Figura N° 4:	Promedio de los tratamientos sobre la altura de cebolla rosada obtenida a los 70 días en la experimentación.....	76
Figura N° 5:	Promedios de los tratamientos sobre el número de hojas de cebolla rosada obtenido a los 90 días en la experimentación.....	80
Figura N° 6:	Promedio de los tratamientos sobre el peso del bulbo de las plantas de cebolla rosada obtenido a los 90 días en la experimentación.....	84

Figura N° 7:	Promedio de los tratamientos sobre el diámetro ecuatorial del bulbo de cebolla rosada obtenido a los 90 días en la experimentación	88
Figura N° 8:	Promedio de los tratamientos sobre diámetro polar del bulbo de cebolla rosada obtenido a los 90 días en la experimentación.....	92

LISTA DE CUADROS

Cuadro N°01:	Valor nutritivo de la cebolla	06
Cuadro N°02:	Distribución de tratamientos en el campo experimental ...	49
Cuadro N°03:	Promedios de la producción (kg/parcela) de cebolla por tratamiento y por bloques en la experimentación	63
Cuadro N°04:	Análisis de varianza de la producción de la cebolla (kg/parcela).....	65
Cuadro N°05:	Prueba de significación de Duncan de la producción de la cebolla (kg/parcela).....	66
Cuadro N°06:	Promedios de la producción (kg/ha) de cebolla por tratamiento y por bloques en la experimentación	67
Cuadro N°07:	Análisis de varianza de la producción de la cebolla (kg/ha)	69

Cuadro N°08:	Prueba de significación de Duncan de la producción de la cebolla (kg/ha).....	70
Cuadro N°09:	Promedios de altura de la planta de cebolla a los 50 días por tratamientos y por bloques en la experimentación.....	71
Cuadro N°10:	Análisis de varianza de la altura de la planta de cebolla a los 50 días	73
Cuadro N°11:	Prueba de significación de Duncan de la altura (cm) de la planta de cebolla a los 50 días.....	74
Cuadro N°12:	Promedios de altura de la planta de cebolla a los 70 días por tratamientos y por bloques obtenidos en la experimentación	75
Cuadro N°13:	Análisis de varianza de la altura de la planta de cebolla a los 70 días	77
Cuadro N°14:	Prueba de significación de Duncan de la altura de la planta de cebolla a los 70 días.....	78

Cuadro N°15:	Promedios del número de hojas de la planta de cebolla por tratamientos y por bloques obtenidos en la experimentación.....	79
Cuadro N°16:	Análisis de varianza del número de hojas de la planta de cebolla	81
Cuadro N°17:	Prueba de significación de Duncan del número de hojas de planta de cebolla a los 90 días.....	82
Cuadro N°18:	Promedios del peso del bulbo de cebolla por tratamientos y por bloques obtenidos en la experimentación a los 90 días.....	83
Cuadro N°19:	Análisis de varianza del peso (g) del bulbo de la planta de cebolla	85
Cuadro N° 20:	Prueba de significación de Duncan del peso (g) del bulbo de la cebolla	86
Cuadro N°21:	Promedios del diámetro ecuatorial del bulbo de cebolla Rosada por tratamientos y por bloques obtenidos en la experimentación.....	87

Cuadro N°22:	Análisis de varianza del diámetro ecuatorial del bulbo de cebolla rosada.....	89
Cuadro N°23:	Prueba de significación de Duncan de diámetro ecuatorial del bulbo de cebolla rosada.....	90
Cuadro N°24:	Promedios del diámetro polar de cebolla rosada por tratamientos y por bloques obtenidos en la experimentación.....	91
Cuadro N°25:	Análisis de varianza del diámetro polar del bulbo de cebolla rosada	93
Cuadro N°26:	Prueba de significación del diámetro polar (cm) del bulbo de la planta de cebolla.....	94

LISTA DE ANEXOS

Anexo N° 01:	Mapa de localización de zona, estación de muestreo en el distrito de Locumba.....	107
Anexo N° 02:	Características del área experimental.....	108
Anexo N° 03:	Tabla de la técnica del numero mas probables.....	109
Anexo N° 04:	Componentes del medio Ashby sólido (g/L).....	110
Anexo N° 05:	Componentes del medio liquido LG (g/L).....	111
Anexo N° 06:	Protocolo de aislamiento y Recuento de <i>Azotobacter chroococcum</i>	112
Anexo N° 07:	Producción de inoculante de <i>Azotobacter chroococcum</i> ..	113
Anexo N° 08:	Fotografía del lugar de muestreo	114
Anexo N° 09:	Fotografía de medición del área experimental	115

Anexo N° 10:	Fotografía de siembra de los tubos positivos del recuento de bacterias <i>Azotobacter chroococcum</i>	116
Anexo N° 11:	Fotografía de las colonias y células de <i>A. chroococcum</i> ..	117
Anexo N° 12:	Fotografía de inoculación de plantación de <i>A. chroococcum</i> en campo.....	118
Anexo N° 13:	Cuadro de características de análisis físico químico del suelo sector Oconchay.....	119

RESUMEN

Utilizar bacterias fijadoras del nitrógeno como *Azotobacter* representa una alternativa al empleo de fertilizantes convencionales ya que su uso constituye un ahorro económico para el agricultor y contribuye a la preservación del medio ambiente, ya que no es un fertilizante químico. El presente trabajo tuvo el objetivo de determinar la influencia de diferentes concentraciones de *Azotobacter chroococcum*, en la producción y calidad de la cebolla rosada (*Allium cepa* L.) en el valle de Locumba.

Se utilizó el diseño experimental de bloques completos al azar con 05 tratamientos experimentales formado por concentraciones de *A. chroococcum*: 10^4 ; 10^5 ; 10^6 ; 10^7 ; y 10^8 UFC/ml; y 01 tratamiento control formado por la concentración 00 UFC/ml de *A. chroococcum*. Cada tratamiento con 04 bloques y cada bloque con 24 unidades experimentales.

Cada planta de cebolla fue inoculado en 1 L de una suspensión de *Azotobacter chroococcum*, con una concentración de acuerdo al diseño experimental establecido. Se evaluó el rendimiento y calidad de la cebolla; la calidad en función de la altura de la planta, número de hojas, peso del bulbo y diámetro ecuatorial y polar del bulbo.

Se determinó que las concentraciones de *A. chroococcum* de 10^5 ; 10^6 ; 10^7 ; y 10^8 UFC/ml, permitieron obtener un mayor incremento en la producción de la cebolla rosada y las concentraciones *A. chroococcum* que permitieron obtener mayor calidad con respecto a la altura y diámetro ecuatorial fue de 10^7 y 10^8 UFC/ml, con respecto al bulbo y diámetro polar fueron 10^6 , 10^7 y 10^8 UFC/ml y al número de hojas con 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 UFC/ml respectivamente.

INTRODUCCIÓN

La cebolla, es una hortaliza de gran importancia tanto en la alimentación familiar, por su contenido en minerales, vitaminas, proteínas y carbohidratos; como por su valor económico y porque representa para la agricultura una buena alternativa de cultivo. Asimismo es una de las hortalizas de mayor importancia en el consumo humano, por lo que existe una alta demanda, encontrándose en todos los mercados durante el año.

Desde hace algunos años se vienen introduciendo en nuestro país el uso de biofertilizantes y bioestimulantes del crecimiento vegetal, en especial el de bacterias rizosféricas del género *Azotobacter*, debido fundamentalmente al papel crucial que estas cumplen en la nutrición vegetal y su influencia en la actividad fisiológica de las plantas. Esta alternativa ha logrado un amplio desarrollo a nivel técnico y comercial. El nivel de aceptación que viene alcanzando por parte de los agricultores representa un gran potencial para aplicar los principios de la biotecnología de primera generación en el aprovechamiento eficiente de la microfauna en el mejoramiento de la fertilidad del suelo.

Según el ministerio de agricultura (2010) para incrementar la producción de cebolla rosada se hace necesario la utilización de productos que generen

incremento en el rendimiento. El presente trabajo está orientado en parte a contribuir con la solución de este problema.

El uso de bacterias fijadoras de nitrógeno como el de *Azotobacter* se presenta como alternativa al uso de fertilizantes convencionales, con las ventajas de que estos biofertilizantes estimulan el desarrollo de las plantas, consumen poca energía, no contaminan el medio ambiente, incrementan la fertilidad del suelo y proporcionan protección frente a microorganismos fitopatógenos.

En este sentido, los bioestimuladores o inoculantes microbianos son un componente vital de los sistemas sustentables, ya que constituyen un medio económicamente atractivo y ecológicamente aceptable de reducir los insumos externos y de mejorar la cantidad y calidad de los recursos internos.

Los usuarios desconocen el real efecto de los biofertilizantes que oferta el mercado destinados a la producción de cebollas. Es necesario buscar y dar a conocer alternativas enfocadas a nuevos manejos de producción que permitan un aumento en el rendimiento y la calidad de cebolla. Los productores de cebolla necesitan aspirar a mejores rentabilidades sobre todo del Valle de Locumba que es donde se ha realizado el presente trabajo de investigación.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. OBJETIVO GENERAL:

Determinar la influencia de diferentes concentraciones de *Azotobacter chroococcum*, en la producción y calidad de cebolla rosada (*Allium cepa* L.) en el valle de Locumba.

1.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Establecer el efecto de las concentraciones 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 y 10^8 UFC/mL de *Azotobacter chroococcum* en la producción y calidad de cebolla.
2. Determinar a que concentración de UFC/mL de *Azotobacter chroococcum* se obtiene la mayor producción y calidad de cebolla rosada.

1.2. HIPÓTESIS

A medida que se incrementa la concentración de *Azotobacter chroococcum* se incrementa la producción y calidad de cultivo de cebolla rosada (*Allium cepa* L.) en el valle de Locumba.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. EL CULTIVO DE CEBOLLA

2.1.1. Clasificación botánica

La cebolla dentro de la botánica, es clasificada de la siguiente manera

División: Fanerógamas

Sub división: Angiospermas

Clase: Monocotiledóneas

Orden: Liliflorales

Familia: Alliaceae

Género: *Allium*

Especie: *Allium Cepa* L.

Variedad: Roja Arequipeña

2.1.2 Importancia del cultivo de cebolla

La cebolla es la segunda hortaliza más importante en el mundo, después del tomate, lo cual se debe a su uso como condimento en la alimentación humana. Tiene la ventaja de que puede consumirse en diferentes formas, tales como: bulbo seco, hojas verdes, bulbo o

cabeza fresca, cabeza tierna o de desarrollo intermedio, deshidratado en polvo o escamas y en encurtidos. Además, es un cultivo que hoy en día cuenta con gran diversidad genética adaptable a diferentes condiciones agroclimáticas lo cual hace de este cultivo un producto que puede ser adaptado a muchas zonas en el país. (DESPRESTO *et al.*, 1992; CASTILLO, 1999).

La producción de cebolla en el mercado nacional ha ido creciendo en forma sostenida, en el 2007 se alcanzó una producción de 630,000 TM, de las cuales el 6% fue destinado para el mercado externo. La “Cebolla Rosada” que se produce en el valle de Locumba tiene una demanda establecida en el mercado, porque es un producto que ofrece una característica comparativa única, contribuyendo a incrementar su demanda por un sector de consumo exigente en calidad. La baja pungencia de la cebolla rosada la hace accesible a ser servida a los niños, es un alimento muy rico en sales minerales y tiene propiedades que hacen de ella un tónico general y un estimulante debido a su contenido en vitaminas A y C (FINTRAC,2001).

Cuadro N° 01: Valor nutritivo de la cebolla (cantidad / 100 g cebolla fresca)

	Cruda	Cocida	Unidad
Agua	89	92	%
Energía	38	29	calorías
Proteína	1,5	1,2	g
Grasas	0,1	0,1	g
Carbohidratos	8,7	6,5	g
Fibra	0,6	0,6	g
Calcio	27,0	24,0	mg
Fósforo	36,0	29,0	mg
Fierro	0,5	0,4	mg
Sodio	10,0	7,0	mg
Potasio	157,0	110,0	mg
Vitamina A	40,0	40,0	U.I.*
Vitamina C	7,0	7,0	U.I.*
Tiamina	0,03	0,03	mg
Riboflavina	0,04	0,04	mg
Niacina	0,20	0,20	mg
Ácido ascórbico	10,0	7,0	mg

Fuente: FAO (1 992) * U. I.= unidades internacionales

2.1.3 Origen

La cebolla es originaria de Asia Central y como centro secundario el Mediterráneo, la cebolla es una hortaliza de las más antiguas. Se menciona en la Biblia; Hipócrates afirma que se consumía en el año 430 A.C, pues fue muy cultivada por los egipcios, griegos y romanos. Durante la Edad Media su cultivo se desarrolló en los países mediterráneos, donde se seleccionaron las variedades de bulbo

grande, que dieron origen a las variedades modernas (MAROTO, 1994).

2.1.4 Descripción botánica

La cebolla (*Allium cepa* L.), pertenece a la clase de las Monocotiledóneas, familia Alliaceae, género *Allium* (HANELT, 1990). Es una planta bianual que en condiciones normales, se cultiva como anual para recolectar sus bulbos y cuando se persigue la obtención de semillas, como bianual (MAROTO, 1994).

Semilla

La semilla es producida en la inflorescencia o conjunto de flores (umbela). Es relativamente pequeña, angulosa y de color negro, cuando está madura. Tiene forma arriñonada y mide unos 4 mm por 2 mm. La mayor parte de cada semilla está constituida por el endospermo, en cuyo interior se ubica el embrión que tiene forma cilíndrica y está retorcido en un espiral. En un gramo hay entre 250 y 260 semillas. La semilla de cebolla tiene la capacidad de germinar a temperaturas bajas, en efecto el umbral mínimo para que se inicie el proceso es de 1.5° C. La temperatura óptima es de 24° C y la máxima 35° C. Esta semilla pierde su poder germinativo con mayor rapidez que la mayoría de las otras especies hortícolas. Esto obliga a mantenerla bajo condiciones especiales para retener alto el porcentaje de germinación. Ello implica conservarla a baja

temperatura (inferior a 6° C), baja humedad nativo hace esencial el uso de semilla lo más nueva posible y en ningún caso recurrir a semilla de más de un año de edad (FINTRAC, 2001).

Raíz

La cebolla es una planta que tiene un sistema radicular muy superficial (45 cm) y poco ramificado; siendo las raíces blancas, espesas y simples, su mayor volumen de raíces se ubica en los primeros 30 cm de suelo, debajo de la placa basal o tallo se forman raíces adventicias, y más adelante en el desarrollo de la planta se forman raíces a los lados de la placa basal. Debido a que la cebolla tiene solo una raíz primaria, el desarrollo de la planta depende de la formación de raíces adventicias. Estas raíces están continuamente desintegrándose y siendo reemplazadas por nuevas raíces. La superficie radicular por unidad de peso de la planta es menor que en la mayoría de las especies hortícolas. (FINTRAC, 2001).

Formación del bulbo

Está formado por numerosas capas gruesas y carnosas al interior, que realizan las funciones de reserva de sustancias nutritivas necesarias para la alimentación de los brotes y están recubiertas de membranas secas, delgadas y transparentes, que son base de las hojas. La sección longitudinal muestra un eje caulinar llamado corma,

siendo cónico y provisto en la base de raíces fasciculadas. La formación del bulbo está influenciada por varios factores, pero el más importante es el fotoperíodo o largo del día. Las condiciones de días largos estimulan la formación del bulbo el efecto de día largo puede ser anulado exponiendo las plantas a condiciones de día corto. La temperatura es otro factor que influye en la formación del bulbo. Los niveles de 25 a 30° C aceleran este proceso, si el fotoperíodo es el apropiado; en cambio se produce un retraso progresivo a medida que baja la temperatura. Cada cultivar requiere un desarrollo mínimo de la planta para reaccionar a los estímulos ambientales para la formación del bulbo. La formación del bulbo es un proceso controlado por el sistema del fotocromo, que es acelerado por la luz infrarroja y azul; mientras que es suprimido por la luz roja. Los altos niveles de nitrógeno y de riego retrasan la maduración del bulbo. (FINTRAC, 2001).

Planta

La planta es bianual, polinización cruzada, en la primera temporada se desarrolla a partir de una semilla hasta formar un bulbo maduro. En la segunda temporada se produce la brotación del bulbo, formándose los tallos florales, en cuyas umbelas se forman las semillas.

El tallo es un disco delgado del cual nacen las raíces y las hojas de las plantas; permanece con esta forma en la primera temporada pero en la segunda se alarga hasta 1.5 ó 2.0 m. de altura y en su extremo se forman las flores en una inflorescencia llamada umbela. Las hojas son erectas, huecas y semicilíndricas, con un diámetro de 0.5 cm. aproximadamente.

Una planta forma de 6 a 11 hojas de unos 30 a 60 cm de longitud. Al nacer, cada hoja aparece dentro de la anterior y así se forma una especie de tallo, llamado “tallo falso” constituido por las vainas de las hojas. La porción basal de cada hoja envuelve completamente el tallo (disco), que al engrosarse por la acumulación de reservas forman el bulbo. (FINTRAC, 2001).

Etapas fenológicas:

- Etapa de semillero
- Etapa de trasplante
- Etapa vegetativa
- Etapa de floración
- Etapa de cosecha
- La cosecha se hace normalmente antes de la floración

2.2. REQUERIMIENTOS CLIMÁTICOS

La cebolla se adapta a diferentes tipos de temperatura; se desarrolla bien en climas cálidos, templados y fríos, comprendidos entre los 50 y 300 metros de altura; produciéndose mejor en altitudes arriba de los 900 msnm., con ambiente seco y luminoso; temperatura ambiental entre los 18 y los 25 grados centígrados.

Abajo de los 18 grados centígrados los bulbos no desarrollan bien, obteniéndose únicamente el crecimiento de los tallos, luminosidad es fotoperiódica, siendo las de días cortos los que desarrollan el bulbo con 10 a 12 horas luz. (CASTILLO, 1999).

2.2.1. Requerimientos fotoperiódicos.

La formación de bulbos en la cebolla requiere fotoperiodos largos; Cuanto más largo es el día mas pronto se iniciará la formación del bulbo y el crecimiento de las hojas decrecerá, esto se da entre 12 y 16 horas de luz; aunque según algunos autores, la formación del bulbo corresponde a la interacción entre fotoperíodo y temperatura (CASTILLO, 1999).

En fotoperiodos y temperaturas altas se acelera la formación de los bulbos, la luminosidad es importante en está especie, la cual

generalmente va acompañada de temperatura alta, por eso es que en zonas con cielos despejados, fuerte radiación y una humedad relativa baja son favorables para el cultivo de cebolla; las temperaturas bajas la retrasan, pudiendo inducirse incluso floración prematura (MAROTO, 1994).

En fotoperiodos cortos no hay formación de bulbos, la planta sólo forma raíces y hojas, es decir, mantiene un desarrollo vegetativo (MAROTO, 1994).

2.3. FASES DE DESARROLLO DE LA CEBOLLA

La primera fase de crecimiento se inicia con la germinación de semilla, formándose una plántula provista de un tallo muy corto, en el que se insertan las raíces y en el que existe un meristemo que origina progresivamente hojas. En esta fase, la plántula desarrolla ampliamente su sistema radicular y foliar (MAROTO, 1994).

La segunda fase corresponde a la formación de bulbos, ésta se inicia una vez que cesa la formación de follaje, y la planta inicia la movilización y acumulación de reservas en la base de las hojas, esto es ocasionado por el estímulo de días largos (KOMACHI, 1990). Paralelamente, se produce una síntesis muy intensa de glucosa y fructosa que van siendo acumulados en el bulbo (MAROTO, 1994).

La tercera fase o de reposo vegetativo es en la que el bulbo maduro está en latencia y la planta no se desarrolla (MAROTO, 1994).

La cuarta fase se produce en el segundo año del cultivo, comienza con la floración y termina con la producción de semillas. Se produce una vez lograda la inducción floral por efecto de bajas temperaturas. Durante el desarrollo floral, el ápice comienza a elongarse y a dar forma al escapo floral. El escapo es hueco, cilíndrico y más grueso en su parte media. En el extremo, se genera una umbela con pétalos blanco azulados (CASTILLO, 1999).

2.3.1. Cambios bioquímicos durante la maduración del bulbo.

Cuando las cebollas están en condiciones inductivas, aumentan las concentraciones de azúcares reducidos en los bulbos. Al mismo tiempo se ha medido un rápido descenso de los niveles de la invertasa ácida, enzima que cataliza la conversión de la sucrosa en azúcares reducidos solubles como glucosa y fructosa. Estos cambios ocurren antes que la formación del bulbo sea visible. La formación del bulbo puede generar la hidrólisis de fructános, acumulados con anterioridad, a fructosa y glucosa. (BREWSTER, 1994).

La mayoría de los fotosintatos es retenida, ya sea en las hojas nacientes o en la base engrosada de las hojas. La exportación de fotosintatos a las hojas es relativamente baja, y la mayoría de éstos va a

las yemas más internas, especialmente durante la expansión del bulbo. Las hojas más internas, por lo tanto, adquieren asimilados desde las hojas más cercanas y las más remotas. Las raíces adquieren una baja cantidad de asimilados, sólo desde las hojas viejas (MANN, 1983).

El inicio de la dormancia es causado por la translocación de sustancias inhibitorias del crecimiento, desde las hojas a los bulbos, durante la madurez del cultivo.

Dentro de las sustancias inhibitorias del crecimiento, se ha identificado al ácido absícico (ABA), pero se le atribuye sólo un 10 a 20% de la acción inhibitoria. KOMOCHI (1990),

Durante el posterior almacenaje de los bulbos, la actividad del ABA es progresivamente menor y se asocia con un aumento en primer lugar de la actividad de las Citoquininas, luego del Ácido Giberélico y por último de las Auxinas. BREWSTER (1997).

2.3.2. Parámetros de calidad

En cuanto a la clasificación de cebollas tardías, es usual el uso de categorías: país, fracción exportable y fracción desecho o descarte. (TAPIA, 1999).

Señala que uno de los aspectos que descalifica los bulbos como uno de tipo comercial y excluyente por lo tanto de la fracción exportable, es la forma del bulbo. Por otro lado, existen varias otras características que fundamentalmente, se centran en diferencias en el color, grado de adherencia de las túnicas periféricas o envolventes, presencia de daño mecánico y enfermedades o plagas. ALJARO (2001).

a) Calidad exportable:

Considerando las tolerancias admitidas por cada mercado, los bulbos de cebolla para almacenaje y exportación deben estar enteros y sanos, excluyendo aquellos afectados por podredumbres u otras alteraciones que los hagan impropios para el consumo. También deben estar limpios es decir, prácticamente exentos de materias extrañas visibles, exentas de daños causados por heladas, suficientemente secos, libres de humedad exterior anormal, lo que produce olores o sabores extraños. Además el pseudo tallo debe presentar un corte neto y no superar 4 cm de longitud. Las cebollas deben presentar un estado que les permita soportar el transporte y la manipulación y llegar en condiciones satisfactorias al lugar de destino. Se descartan aquellos bulbos que presenten vástago floral, cuellos gruesos (cebollones), heridas o grietas, centros dobles, daño de insectos, nemátodos y enfermedades (NAMESNY, 1993).

b) Calidad sanitaria en post-cosecha.

Los hongos de post-cosecha están ampliamente distribuidos a través del mundo, pero su incidencia en un área en particular está determinada por el número de factores que interactúan en el cultivo, incluyendo el clima, prácticas culturales (fuente de la semilla, rotación de cultivos, estrategias de protección del cultivo), curado, temperatura y humedad relativa de almacenaje y método de almacenaje. El desarrollo de la enfermedad en post-cosecha depende de la temperatura y humedad relativa, bajo las cuales los bulbos son mantenidos después de la cosecha; por lo tanto, la naturaleza y severidad de la enfermedad es producto del ambiente de pre y post-cosecha (HAYDEN Y MAUDE, 1997).

Estas enfermedades pueden ser controladas regulando las condiciones ambientales en almacenaje. Sin embargo en muchos países en desarrollo el control del ambiente de almacenaje es impracticable y sólo se realiza durante el transporte cuando las cebollas son exportadas. (THOMPSON *et al.*, 1972. citado por HAYDEN *et al.*, 1994).

Las enfermedades de post-cosecha de cebollas más comunes y signos de rechazo son moho negro (*Aspergillus niger*), moho azul (*Penicillium cyclopium*, *P. digitalum*, *P. expansum*, *P. chrysogrum*), y pudrición gris del cuello (*Botrytis allii*, *B. byssoidea*, *B. squamosa*, *B. cinerea*) (BRUNA, 2001).

2.3.3. Criterios de cosecha

Para la cebolla (de guarda y exportación), se suspende el riego dos a tres semanas antes del arranque. Esta seca permite acelerar el proceso de maduración y el secado de las catáfilas externas de los bulbos; además, estos adquieren mayor consistencia y aptitud para la guarda. Los síntomas de madurez se aprecian a través de las hojas, cuya mitad o tercio superior se torna de color verde a amarillo y tiende a doblarse. A este nivel del proceso los bulbos han adquirido su máximo volumen. El momento para iniciar la cosecha es cuando el cultivo muestra un 50% de tallos doblados o caídos (GIACONI y ESCAFF, 1993).

Según MAROTO (1994), la cosecha debe realizarse cuando los bulbos están suficientemente maduros, esto se manifiesta cuando dos a tres hojas exteriores están secas.

2.3.4. Índices de cosecha

Los índices dependen de los materiales genéticos, cultivos y uso que se le dé.

Los principales índices son:

- Bulbos bien desarrollados.
- Tamaño, forma y apariencia característicos de la variedad (redonda, achatada, alargada), picante y muy picante.

- Hojas erectas con ablandamiento del cuello y doblez en un 70-80% del total de la plantación.
- Bulbos salidos de la tierra; esto es conocido por el productor como el cabeceo.
- Tamaño del bulbo, según variedad; de una a cuatro pulgadas de diámetro. (CASTILLO, H. 1999)

2.3.5. Sistema de recolección

En nuestro país la forma de recolección de los frutos de cebolla es manual.

2.3.6. Manejo post cosecha

Se protegen los bulbos cosechados bajo la sombra. La cebolla se deja curar en el campo de dos a tres días y luego se le cortan los tallos y las raíces (las hojas deben estar secas antes de cortarlas). Los bulbos cortados se colocan en sacos de yute por tres días más, con el objeto de completar el curado. El transporte a la planta empacadora, deberá hacerse cuidadosamente evitando golpear los sacos al cargar o descargar (CASTILLO, H. 1999).

Es conveniente realizar una primera clasificación de los bulbos en el campo para retirar aquellos que estén dañados o enfermos.

Curado: Las cebollas se alinean en una fila por encima de la cama, dejando las hojas de una cebolla cubriendo el bulbo de la cebolla siguiente. El curado de la cebolla busca evitar que los bulbos se quemen por efecto del sol, los protege de la deshidratación y daño de enfermedades con lo cual se permite alargar la vida de post cosecha de los bulbos. Dependiendo de la intensidad del sol y la nubosidad, el tiempo de curado puede tomar de 5 a 10 días, hasta que las hojas exteriores que cubren el bulbo se sequen completamente. Los bulbos ubicados al inicio de la hilera que no quedan tapados, se cubren con maleza u otro material seco. Después de este proceso, se procede al cortado de las hojas y las raíces utilizando tijeras. Se debe ser cuidadoso de no dañar los bulbos, ya que no solo deteriora su presentación, sino que permite la entrada de patógenos que lo descomponen. (INCAGRO, 2008).

2.4. CONTROL DE PLAGAS Y ENFERMEDADES

2.4.1. Control de Plagas.

A) Trips de una cebolla (*Thrips tabaci*)

Estos son pequeños insectos difíciles de observar a simple vista, viven en la base de las hojas, y evitan la luz del sol, los adultos y las ninfas no miden más de 1 mm de largo. Los adultos pueden vivir hasta 4 meses. Los huevos son depositados en el envés de las hojas, en grupos de 50 – 100 y cubiertos con una secreción. Las ninfas no tienen alas. Se alimentan punzando las

células e ingiriendo la savia causando laceraciones en la superficie de las hojas.

Al principio las hojas presentan una apariencia plateada y hundida causada por el raspado y posterior desecamiento de las zonas afectadas, resultando en un debilitamiento de la planta y retraso en el crecimiento, y una reducción en los rendimientos y tamaño del bulbo. También el nivel de azúcares del bulbo es reducido.

La infestación de trips es más abundante en la época seca, tiene un amplio rango de hospederos, junto con la facilidad con que los insectos son dispersados por el viento y la rapidez con que se desarrollan, hacen que esta plaga sea de difícil pronóstico cuyo control puede presentar dificultades.

B) Gusanos cortadores (*Spodoptera ssp*)

Las hembras adultas ponen sus huevos en forma masal de 50 – 150 sobre las hojas. Las larvas eclosionadas barrenan hacia el interior de las hojas de la cebolla y se alimentan de ellas, dejando la epidermis externa casi intacta. Las hojas dañadas se tornan blanquecinas, se arrugan y se secan. También los bulbos en las capas superiores pueden ser atacados por las larvas.

Las larvas evolucionan por 5-6 estados y miden hasta 35 mm de largo cuando están maduras. El primer estado larval se alimenta gregariamente. Los estados posteriores se pueden encontrar alimentándose solitarios, en grupos o en agregados extensos. Bajo esta última condición ocurre una seria defoliación y las larvas pueden emigrar en grandes números hacia nuevos campos de alimentación. La formación de la pupa tienen lugar en el suelo o en hojas de cebollas dañadas.

2.4.2. Control de enfermedades

A) Mancha Púrpura (*Alternaria porri*)

La mancha púrpura causada por *Alternaria porri* ocurre en varios países y ataca la cebolla, cebollín y ajo. Afecta las hojas, bulbos, tallos florales, y las semillas producidas artesanalmente. Las esporas germinan y penetran la cutícula directamente. Los síntomas son visibles a los 4 días después. El hongo sobrevive en los residuos de la cosecha. El hongo necesita la presencia de lluvia o rocío para esporular e infectar. Crece desde los 6.1 – 33.9° C (43-93° F) pero la óptima temperatura es de 25-27.2° C (77-81° F) casi no causa infección debajo de 12.8° C (55° F). Las lesiones al principio son pequeñas, hundidas, en cuyo centro aparecen manchas oscuras que se agrandan tomando un color púrpura y separadas del tejido sano por una zona clara. En clima húmedo la superficie de la lesión se cubre con las esporas del

hongo que le dan una coloración café o negra. En 2-3 semanas estas manchas rodean hojas y tallos.

B) Raíz Rosada (*Pyrenochaeta terrestris*)

El hongo es un habitante común del suelo que ataca las raíces débiles de las plantas. Ataca más comúnmente la cebolla, el puerro, el ajo y el cebollín, pero también ataca otras especies de hortalizas. Aunque la cebolla puede ser infectada durante todos los estados de su crecimiento, la enfermedad aparece más frecuentemente en plantas casi maduras. El síntoma principal de la enfermedad consiste en que las raíces una por una toman un color rosado, después se oscurecen a rojo o púrpura y por último se vuelve café o negro. En algunos casos las raíces rosadas se vuelven color café inmediatamente, luego se encogen y mueren. Se pueden formar nuevas raíces varias veces las que son destruidas. Cuando hay infecciones severas la parte foliar se pone blancuzco, amarillo o café y finalmente muere. Las plantas que son infectadas al inicio de su crecimiento no producen nada, mientras que las que son atacadas más tarde producen bulbos suaves o pequeños. El hongo causante es un patógeno débil que usualmente sigue a infecciones causadas por otros organismos o daños causados por calor, frío, exceso de agua, sales o falta de nutrientes. El hongo vive indefinidamente en el suelo y se disemina al moverse éste de un lugar a otro. También se ha llevado durante el transporte de plantas enfermas. El período desde la inoculación hasta que aparecen los síntomas es de 1-3 semanas. Una vez

que la planta muere se forman nuevas esporas en los residuos y el ciclo de vida del hongo se repite. El hongo no es afectado por el agua pero si por la temperatura. El hongo necesita temperaturas superiores a 12.8° C (55° F) para crecer, y un máximo de 33° C (92° F). El óptimo para el crecimiento y la infección varía de 23.9 – 27.8° C (75-82° F) dependiendo de la raza.

C) Mildiu Algodonoso o Lanoso (*Peronospora destructor*)

Este hongo existe en todas las regiones en donde las cebollas se cultivan bajo condiciones frías y húmedas. Puede infectar la cebolla, ajo cebollín, chalot y la cebolla multiplicadora. Esta enfermedad ocurre solamente cuando el tiempo está relativamente frío de 4-25° C (39-77° F) y existe humedad relativa alta, la temperatura óptima es de 13° C (55° F). Días moderados arriba de 23-24° C (73-75° F) favorecen al desarrollo de la enfermedad. Una humedad de 95% de las 2 a.m. hasta las 6:00 a.m. se requiere para el desarrollo de la enfermedad. Durante este período la lluvia previene la producción de esporas y así el desarrollo de la enfermedad. Las esporas se maduran temprano en la mañana y se diseminan durante el día. Las esporas pueden vivir aproximadamente 4 días. El mildiu se caracteriza por presentar un color verde claro, de un color amarillento a cafésoso y lesiones de figura irregular (de ovalada a cilíndrica). Cuando la humedad relativa es alta, la esporulación que causa este hongo es grisáceo a violeta con pelusa en la masa de las esporas (esta apariencia es la que le da el nombre de algodónoso). El área arriba de la lesión se hunde por el enrollamiento de la

hoja por el hongo. La hoja muerta esta ya colonizada por la alternaría obscureciendo la lesión de mildiu. El mildiu algodonoso rara vez mata la planta pero si reducirá el rendimiento.

D) Tizón de la cebolla (*Botrytis* sp)

El tizón causado por cualquier especie de *Botrytis* es una enfermedad muy interesante. Pues aunque el hongo no puede penetrar directamente el tejido de las plantas robustas puede se ayudado por factores que debilitan a la planta como insectos, mal nutrición, etc. en unos pocos días las plantas se cubren de numerosas lesiones blancuzcas. Todo el follaje de un campo puede ser destruido, cambiar a color café y caerse en un período de una semana.

E) Pudrición Blanca (*Sclerotium cepivorum*)

La enfermedad es causada por *sclerotium cepivorum*, un hongo del suelo. Las plantas infectadas muestran amarillamiento, quemado de las puntas de las hojas y marchitamiento, especialmente de las hojas viejas. El hongo penetra y crece a través de las raíces y eventualmente entra a la base del bulbo en donde causa una descomposición semi acuosa de las brácteas del bulbo. También se puede ver crecer el hongo de color blanquecino. La presencia de pelotitas negras de 0.2 – 0.5 mm llamadas esclerocio, que sirve para diagnosticar la enfermedad. El hongo es favorecido por temperaturas

frescas del suelo de 10-20° C (50-68° F). La enfermedad se inhibe arriba de 25° C (77° F).

2.5. BIODIVERSIDAD DEL SUELO

Un puñado de tierra contiene billones de microorganismos, son tantos tipos diferentes que se desconocen las cantidades exactas. Actualmente conocemos algunos de ellos; sólo se han descrito formalmente alrededor de 500 microorganismos procariontes, lo que contrasta con las 500 000 especies de insectos ya descritas. Se conoce muy poco de la microbiología del suelo, a pesar de que es la parte de la Biología que más se proyecta hacia el mantenimiento de la vida en el planeta (Ver Fig 1).

Dada la gran diversidad de organismos y microorganismos existentes en el suelo, este trabajo se enfoca en hacer énfasis en la flora bacteriana del suelo con más efectos benéficos y que han sido mayormente estudiados por la ciencia. (BROCK et al 1996).

El suelo posee una gran variedad de biodiversidad, en esta se encuentran desde parásitos hasta virus y bacterias, estos microorganismos aportan fuertemente al desarrollo de la flora que crece en él, mientras más rico en microorganismos sea el suelo mayor será el desarrollo de las plantas en el suelo. (BROCK et al 1996).

La diversidad de microorganismos presentes en el suelo va a depender de las condiciones naturales y ambientales del mismo, es decir, que factores como la acidez del suelo, humedad, salinidad, temperatura, etc. afectan directamente a la población microbiana existente en él, a raíz de ello también se pueden explicar que en zonas geográficas conocidas por altos índices de estos factores ya mencionados, su capacidad de cultivo sea baja (BROCK et al 1996).



Gráfico N° 01: Muestra la diversidad de organismos y microorganismos existentes en el Suelo.

Aunque hay diversas asociaciones que contribuyen a la fijación biológica del N₂, en la mayoría de lugares agrícolas la principal fuente de fijación de nitrógeno (80%), ocurre a través de dicha simbiosis. Se estima que esta puede oscilar entre 200 y 250 kg. N. ha /año, calculándose que esta puede alcanzar el 20 % de la cantidad fijada anualmente sobre el planeta, constituyendo la asociación más elaborada y eficiente entre plantas y microorganismos. (MCSPADDEN et al 1998).

Dentro de las especies de plantas que establecen relaciones simbióticas con esta bacteria se encuentra el *Phaseolus vulgaris* comúnmente llamado poroto, el cual es una planta leguminosa de importancia para el consumo humano en los países del tercer mundo, esta planta ha sido utilizada como modelo de experimentación por lo que el conocimiento sobre la población bacteriana que la habita es bastante conocido (BROCK et al 1996).

En los últimos 20 años, se han realizado variados esfuerzos por parte de científicos e investigadores en todo el mundo con el fin de conseguir una mayor eficiencia en la fijación biológica de N₂ por parte de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa en el cultivo del poroto, basados en las herramientas y perspectivas moleculares, ello ha permitido determinar que en la flora microbiana del suelo existen especies de microorganismos que no son

capaces de cultivarse in vitro, pero que pueden identificarse utilizando herramientas moleculares (MCSPADDEN et al 1998).

2.6. MICROBIOLOGÍA DE LA RIZÓSFERA

La Rizósfera, región inmediata más externa de la raíz, porción de suelo distinto del suelo edáfico, es una zona donde se concentra una alta actividad bacteriana, el número de bacterias encontradas en la rizósfera es mayor al encontrado en suelo sin raíces, debido a que la raíz genera una serie de sustancias nutritivas como azúcares, aminoácidos, vitaminas etc. La rizósfera habitualmente se encuentra poblada por bacterias fijadoras de nitrógeno y hongos (TORO, M. R. Azcón, and J.M. BAREA 1997).

Habitualmente las bacterias que habitan la rizósfera son fijadoras de nitrógeno y muchas de ellas tienen propiedades beneficiosas para la planta, logrando así una interacción bacteria-planta en donde forma un sistema de simbiosis en que la planta aporta sustancias nutritivas y la bacteria aporta nutrientes a la planta como Nitrógeno, Fósforo, fitohormonas, vitaminas y sustancias antibacterianas capaz de marginar las bacterias Fitopatógenas. (TORO, M. R. Azcón, and J.M. BAREA 1997).

2.7. BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO

Actualmente el término de bacterias promotoras del crecimiento (en adelante BPC) ha sido aceptado en el mundo científico, e incluso se ha llegado a asociar con ciertas formas de biocontrol. Como definición las BPC son un grupo de bacterias capaces de aumentar el crecimiento en las plantas, mediante la disminución de enfermedades producto del ataque de bacterias fitopatógenos, así como también de la morbilidad causadas por las mismas, además se estima que las BPC son capaces de aportar sustancias nutritivas que estimulan el crecimiento radicular y la absorción de nutrientes desde la rizósfera.

El mecanismo de acción de estas bacterias es a través de un sistema de intervención directa y otra indirecta.

Mecanismo directo, en este proceso actúan los metabolitos inhibitorios producidos por estas bacterias, específicamente antibióticos y enzimas, también actúan como estimulantes del crecimiento las fitohormonas liberadas (Auxinas, Giberelinas, Citoquininas, etileno), disminución de compuestos tóxicos existentes en el medio (existencia de metales pesados). Experiencias de este tipo han sido posibles gracias a las capacidades cultivables de estas bacterias (MCSPADDEN et al 1998).

El mecanismo indirecto, se encuentra orientado básicamente a la solubilización de nutrientes como los compuestos fosforados, llevándolos a formas solubles y asimilables por las plantas, así como la fijación del nitrógeno llevándolo también a una forma asimilable, básicamente en forma de amonio (MCSPADDEN et al 1998).

De esta forma se ha planteado que las BPC, no solo son capaces de fijar cantidades importantes de nitrógeno sino que también son capaces de ejercer un biocontrol en la rizósfera, de modo que la existencia de estas bacterias a temprana edad sería bastante beneficiosa para la planta, en especial en los cultivos intensivos. Dada esa particularidad, los estudios científicos se han centrado en un grupo determinados de bacterias, en ese grupo podemos encontrar los siguientes géneros bacterianos:

Tabla Nº 01: Principales bacterias promotoras del crecimiento.

	Efecto benéfico
<i>Azotobacter sp.</i>	Fijación N2
<i>Rhizobium sp.</i>	Fijación N2
<i>Pseudomonas Fluorescens</i>	Producción de enzimas
<i>Bacillus sp.</i>	Producción de enzimas
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Fijación N2 y antibiosis
<i>Enterobacter agglomerans</i>	Fijación de N2

2.8. MICROORGANISMOS FIJADORES DE NITRÓGENO ATMOSFÉRICO (DIAZÓTROFOS)

Los diazotrófos son microorganismos de vida libre capaces de fijar nitrógeno, integrado por protistas inferiores; bacterias heterótrofas aerobias, anaerobias y anaerobias facultativas, un representante de bacterias quimio autótrofas y microorganismos fotosintéticos: bacterias y cianobacterias. El grupo de diazótrofos, comenzando por aquellos reconocidos como fijadores de vida libre, es decir los que expresan su nitrogenasa sin requerir la protección o la colaboración de otro organismo, aunque pueden ser favorecidos por los nutrientes y el ambiente con baja pO_2 que le ofrece la rizósfera. Ningún eucariota posee esta importante capacidad y los intentos de la ingeniería genética tratando de transferir esta propiedad cuando los genes *nif* se encuentran en plásmidos o están integrados al cromosoma bacteriano, son numerosos y se han logrado algunos diazótrofos sintéticos. Numerosos experimentos intentan transferir esta propiedad a vegetales, sobre todo a gramíneas, pero el funcionamiento de estas plantas transgénicas en la naturaleza, es motivo de controversia (Frioni, 1999).

La fijación biológica de nitrógeno molecular la llevan a cabo diversos géneros de bacterias de vida libre, algunas de estas se encuentran en la rizósfera en vida libre, y otros géneros bacterianos forman asociaciones mutualistas con plantas (Saribay, 2003).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno presentan una amplia diversidad taxonómica, con diferentes estilos de vida y de asociación con los vegetales. Sin embargo, sólo una pequeña proporción de especies es capaz de hacerlo; 87 especies en dos géneros de arqueobacterias, 38 de bacterias, y 20 géneros de cianobacterias se han identificado como diazótrofos (Hussein, 1999).

En la rizósfera la fijación del nitrógeno se realiza aparentemente sólo por ciertos tipos de bacterias y por algunos miembros del taxón Archea; estos diazótrofos incluyen algunas especies de *Bacillus* spp., *Clostridium* spp. Y *Klebsiella* spp. Miembros de la familia *Azotobacteraceae* (*A. vinelandii* y *A. chroococcum*), *Rhizobiaceae* y del orden *Rhodospirillales* (Singleton, 2004). Además de estos, se han descrito géneros en diferentes hábitats con la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, entre estos están: *Beijerinckia*, *Chromatium*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Rhodomicrobium*, *Chlorobium*, *Azospirillum*, *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum* y *Pseudomonas* (Frioni, 1999).

Los diazótrofos de vida libre y en asociaciones rizosféricas se pueden clasificar por sus relaciones con el O₂:

- Aerobias estrictas, como la familia *Azotobacteriaceae*
- Anaerobios facultativos, como los géneros *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*.

- Microaerófilicos, como *Azospirillum*, *Thiobacillus*, *Mycobacterium*, *Acetobacter*. Estos dos últimos grupos se comportan como aerobios cuando crecen con nitrógeno combinado y fijan nitrógeno en condiciones de anaerobiosis.
- Anaerobios estrictos, que no crecen ni fijan en aerobiosis, con representantes de los géneros *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum* y productores de metano.

La mayoría de las bacterias son heterótrofas, sólo ha sido descrito *Thiobacillus ferrooxidans*, como fijador de N₂, quimioautótrofo que crece en condiciones muy ácidas. El resto de los diazótrofos son bacterias fotosintéticas, con representantes de las cianobacterias (Frioni, 1999).

2.9. FAMILIA AZOTOBACTERACEAE

Es una familia curiosamente integrada exclusivamente con diazótrofos. Ya en 1901, el microbiólogo holandés Beijerinck describió al *Azotobacter chroococcum*, luego que Winogradsky, de la escuela rusa, describió al anaerobio *Clostridium pasteurianum*. Los integrantes de esta familia se presentan con células grandes, predominantemente de bacilos romos u ovals, pero cambian su morfología con el tiempo o las condiciones de desarrollo. Las células se presentan frecuentemente de a

pares, son Gram negativas, aunque pueden aparecer como Gram variables, son aerobios estrictos, pero pueden crecer y fijar N₂ bajo presión reducida de O₂. Son móviles por flagelos peritricos o polares, o inmóviles. (Frioni, 1999).

La familia *Azotobacteraceae* pertenece a la subclase gamma de las proteobacterias (Tchan, 1984), está compuesta por bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre que comúnmente habitan en el suelo, agua y sedimentos. Estudios de DNA ribosomal 16s (DNAr 16s) han identificado dos géneros en esta familia, *Azotobacter* y *Azomonas*. El género *Azotobacter* se diferencia de *Azomonas* por la presencia de quistes pero no se puede diferenciar morfológicamente de muchos otros géneros de bacterias diazotrofas como *Azospirillum* y *Beijerinckia*; comprende siete especies: *A. chroococcum*, *A. vinelandi*, *A. beijerinckii*, *A. paspali* (Doberienener & Day, 1975), *A. ameniacus*, *A. nigricans* (Tchan & New, 1984 (a)). (Jiménez, 2007).

Los miembros de esta familia *Azotobacteraceae* tienen la capacidad de sintetizar antibióticos y generar sustancias promotoras del crecimiento vegetal, (Pandey & Kumar, 1990) además de fijar nitrógeno no simbióticamente, especies como *A. chroococcum* y *A. vinelandi* son utilizadas como bioinoculantes en suelos tropicales y alcalinos. Igualmente muchos miembros de la familia *Azotobacteraceae* son

utilizados para la producción de compuestos de interés comercial como polisacáridos, (Sabra *et al.*, 2001). Vitaminas y pigmentos (Pandey *et al.*, 1998).

2.10. GENERALIDADES DEL GÉNERO *Azotobacter* sp

El *Azotobacter* es uno de los primeros géneros conocidos como fijadores asociativos de nitrógeno, siendo el más estudiado en el ámbito mundial a juicio de Martínez y Dibut (1996). Su nombre proviene de la palabra francesa “azoto” que significa nitrógeno y del griego “bacter” que significa Bacilo (Hernández *et al.*, 1994) y según esos autores son microorganismos de vida libre de suelo que requieren de sustancias orgánicas como fuente de energía, pero si hay abundancia de NO^{3-} y NH^{4+} , lo emplean con facilidad y no fijan nitrógeno. Son bacterias Gram negativas, móviles; las colonias son viscosas, convexas, lisas o arrugadas y poseen pequeñas inclusiones granulares, el color se presenta en diferentes matices de pardo, producen pigmentos que en ocasiones se difunden en el medio de cultivo (Agar-Ashby) selectivo para este género (Rubenchik, 1960).

Abundan en suelos bien aireados, neutros o ligeramente alcalinos (pH de 6,0 a 7,5) pero hay formas ácido existentes que crecen a pH inferiores a 5,0; aunque según Martínez *et al.* (1985) el género está

representado en los principales suelos, no se desarrolla bien en los muy ácidos y con limitantes nutricionales.

2.10.1. *Azotobacter chroococcum*

En medios libres de nitrógeno de *A. chroococcum* produce un pigmento café- negro no difusible, estos se producen en presencia de benzoato. También produce pigmentos grises-café en medios adicionados con 0.2% de gluconato. Sobre medios libres de nitrógeno esta bacteria forma colonias mucilaginosas pardas las cuales aparecen a las 48 horas a 30°C. *A. chroococcum* presenta colonias mucosas opacas, inicialmente el color del pigmento es claro y brillante, pero a medida que la colonia se desarrolla se toma de color café oscuro, la fuente principal de carbono es el manitol (Santana *et al.*, 2002). *A. chroococcum* puede llegar a crecer en un pH alrededor de 5.5 (Saribay, 2003).

Azotobacter chroococcum puede utilizar diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico como amonio, nitrato, nitrito o dinitrógeno, este microorganismo realiza la asimilación de nitrógeno en tres pasos: transporte del nitrato dentro de la célula, reducción del nitrato a nitrito (Nitrato reductasa) y la reducción de nitrito a amonio (Nitrito reductasa) y la reducción de nitrito a amonio (Nitrito reductasa), sin embargo estos pasos requieren de dos condiciones nutricionales, la ausencia de amonio

(represor) y la presencia de nitrato o nitrito (inductores). Se ha reportado la presencia de dos polipéptidos con masas moleculares de 22 kDa (P22) y 35 kDa (P35), la expresión de estos genes es regulada por las fuentes de nitrógeno. La P22 está asociada a la membrana citoplasmática y es fosforilada en respuesta al nitrato, este polipéptido es una proteína sensorial para la asimilación de nitrato en *A. chroococcum* (Muñoz *et al.*, 1996).

Además de la fijación de nitrógeno y excreción de amonio al medio, esta especie tiene la propiedad y la capacidad de biodegradar compuestos tóxicos y contaminantes; tener efecto antagónico con patógenos (Hongos y Nematodos), en cultivos agrícolas solubilizar fosfato tricalcico y producir fitohormonas. Es una bacteria que metaboliza compuestos fenólicos como, ácidos *p*-hidroxibenzoico, vanilínico, *p*-cumarico, ferulico y 4-hidroxifenilacético, compuestos que se encuentran en aguas residuales procedentes de la extracción de aceite de oliva, estos ácidos tienen un efecto antibacterial, fitotóxico y generan coloración a las aguas residuales, debido a esto, son compuestos con alta carga contaminante para el ambiente (Sarybay, 2003; Juárez *et al.*, 2004).

2.11. INOCULACIÓN CON BACTERIAS ASIMBIÓTICAS.

La aplicación práctica de la inoculación de bacterias asimbióticas ha sido positiva, observándose notables incrementos en los rendimientos en diferentes cultivos, principalmente en cereales. Estos resultados obtenidos, especialmente con la inoculación de *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum brasilense*, no deben atribuirse exclusivamente a la ganancia de N₂ por las plantas, ya que estos microorganismos en determinadas condiciones, su efecto beneficioso se debe fundamentalmente a la capacidad de solubilizar fosfatos y sintetizar sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal, tales como, vitaminas y hormonas vegetales que intervienen directamente sobre el desarrollo de las plantas (GONZÁLEZ *et al*, 2001).

Por ello, las bacterias utilizadas como biofertilizantes deben ser eficientes en captar el nitrógeno, competir con microorganismos antagonicos, tener buena capacidad de sobrevivencia y ser capaces de invadir la raíz.

Principales formas de aplicación de los biofertilizantes:

- Al voleo: se distribuye uniformemente sobre la superficie del terreno o sobre el cultivo, similar a la fertilización en los campos.
- En surcos: un chorro suave y continuo del concentrado bacteriano, sobre la semilla, alrededor de la semilla o a un lado de la misma.
- En la planta: al pie de la planta, alrededor de la planta, a uno o ambos lados de la hilera de las plantas.
- Al trasplante: colocando al fondo del hoyo, o en el relleno. Es recomendable para frutales, papa, cebolla y ajo.

Algunas especies de hongos micorrizógenos son más beneficiosas que otras para el desarrollo de determinadas especies forestales; algunas especies arbóreas en especial del género *Pinus*, tienen necesidad obligada de la asociación con hongos micorrizógenos; otras especies de árboles no tienen necesidad de asociarse con hongos (Hernández *et al.*, 1994).

Las cepas (“variedades”) de microorganismos que podemos encontrar como biofertilizantes comerciales son:

Azotolam

Es un producto ecológico natural preparado en base a cultivo de bacterias del género "***Azotobacter***" fijadoras de nitrógeno, solubilizan al fósforo mineralizado del suelo. Sus exudaciones extracelulares inhiben el ataque de enfermedades fungosas de la raíz. Dentro de sus principales beneficios están los siguientes:

- Regula el crecimiento y desarrollo vegetal.
- Estimula la germinación y emergencia de las semillas.
- Promueve y acelera el periodo vegetativo, la floración y fructificación aumentando el número de flores y frutos.
- Promueve la formación de frutos, bulbos y tubérculos con mayor peso
- Incrementa la productividad alrededor de un 25%

Agro Fertilizer

Consiste en el uso de microorganismos para mejorar la fertilidad del suelo como las bacterias que fijan el nitrógeno atmosférico (*Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*), algas (*Azolla*) y hongos que viven en las raíces de las plantas (micorriza) permitiéndoles absorber

mejor el fósforo y protegiéndolos contra las enfermedades. Estos microorganismos se pueden inocular o aplicar al suelo para facilitar su multiplicación. Por ejemplo actualmente se viene produciendo a nivel comercial inóculos a base de *Rhizobium* y *Azotobacter*. Experiencias de campo demuestran que la fijación biológica de nitrógeno por intermedio de la asociación leguminosa (alfalfa, trébol, frijol, etc.) y *Rhizobium*, ascienden a cifras considerables de nitrógeno fijado en el suelo (50-400 kg/ha/año).

Monibac Corpoica.

Es un biofertilizante formulado a base de *A. chroococcum*, con una concentración mínima de 10^8 UFC/mL de producto. Esta bacteria es nativa de las fincas algodonerías del Caribe seco colombiano y está aislada a partir de un agro ecosistema de algodón, sin ninguna manipulación genética.

MONIBAC disminuye el impacto negativo que causan los fertilizantes nitrogenados de síntesis sobre el medio ambiente, reduciendo de manera efectiva la dosis y el número de aplicaciones del fertilizante y los costos por este concepto. Con el uso de MONIBAC se ha logrado reducir hasta el 60% de los costos de fertilización nitrogenada del cultivo del algodón, con incrementos de hasta 18% en producción.

2.11.1. Algunos beneficios y aspectos interesantes de los biofertilizantes

son:

Beneficios para las plantas y suelo:

- Promueve la salud de las plantas
- Mejora de la estructura del suelo.
- Baratos y sencillos.
- Fortalecedor del metabolismo de la planta, incrementando crecimiento y favoreciendo su desarrollo.
- Corrige deficiencias en micro-nutrientes.
- Estimula la vida del suelo.
- Estimulan la creatividad y los saberes del agricultor. (MARTÍNEZ-VIERA, R. (2002)

Desde la perspectiva del rendimiento, los biofertilizantes producen sustancias muy activas que al interactuar en su conjunto con el metabolismo vegetal, provocan diferentes efectos beneficiosos:

- Incremento en el número de plántulas que emergen.
- Acortamiento del ciclo de los cultivos entre 7 y 10 días.
- Aumento en los procesos de floración fructificación.
- Incremento entre 5 y 20% del rendimiento.
- Obtención de frutos con mayor calidad comercial (aspecto y tamaño)
(MARTÍNEZ-VIERA, R. 2000).

Señalan que el uso de biofertilizantes por su parte, presenta la ventaja de que éstos originan procesos rápidos, consumen poca energía y no contaminan el medio ambiente. Esta biotecnología además de incrementar la fertilidad del suelo, favorece el antagonismo y el control biológico de organismos fitopatógenos. PEÑA, S. E, DE LA Y TORRES, E (1992).

2.4.4 Biofertilizantes de última generación

En general, se puede decir que el funcionamiento de un ecosistema edáfico depende en gran medida de la actividad microbiana del suelo, dado que los microorganismos protagonizan diversas acciones que producen beneficios para las plantas a las que se asocian (GUTIÉRREZ, A.; DREYER, B.; TORRENTE, P. Y HONRUBIA, M., 2002).

Entre otras acciones, los microorganismos beneficiosos facilitan la captación de nutrientes, producen fitohormonas que favorecen el enraizamiento, protegen a la planta frente a patógenos, descomponen sustancias tóxicas y mejoran la estructura del suelo (MARTINS, M. B., CASTRO, 1997).

En melón, la producción de las plantas micorrizadas aumentó en un 36% respecto a las no micorrizadas, el ahorro de la fertilización fosfórica fue del 100%, el de la fertilización nitrogenada y potásica del

20%, el de agua un 25% y una reducción del fungicida al 100%. (RAAA.1999).

2.12. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN REALIZADAS CON *Azotobacter chroococcum*

Varios son los cultivos en los cuales la aplicación de *Azotobacter chroococcum* como biofertilizante ha resultado ser satisfactoriamente positiva:

Determinó el efecto de *Azotobacter chroococcum* nativo y de *Azotobacter chroococcum* comercial “Azotolam” en el desarrollo del cultivo de *Allium cepa* L. (cebolla amarilla dulce) en La Yarada – Tacna. Obtuvo como conclusiones: la inoculación de *Azotobacter* influyó en la altura de planta, longitud radicular, diámetro y peso fresco del bulbo; en todos los tratamientos con inoculación de *Azotobacter* hubo un incremento de 70.9 y 41.7 % en relación al tratamiento testigo sin inocular CONDORI, D. (2003).

Comparan los efectos de biofertilizantes caseros y de recetas de productores con otros biofertilizantes comerciales y con fertilizantes convencionales (Úrea). En el cultivo de lechuga en campo. Concluyen que los biofertilizantes han dado rendimientos parecidos a aquellos obtenidos con fertilizantes convencionales asimismo permite una menor presencia de

nitratos en las hojas y ningún impacto negativo medio-ambiental. La inoculación (siembra) de *Pseudomonas* (bacterias que viven en la zona cercana a la raíz) al pie de las plantas de maíz en la localidad de Pergamino, Argentina, permitió obtener diferencias de hasta 700 kg/ha con respecto a los testigos (cultivos sin *Pseudomonas*) TARIGO, ALEJANDRO; REPETTO, CARLOS; ACOSTA, DIEGO (2004)

Evaluaron biofertilizantes en la aplicación de cuatro tratamientos; tres biofertilizantes: Probiótico 1, Probiótico 2, Probiótico 3 y el testigo; para determinar el efecto de los biofertilizantes sobre: los hongos filamentosos y micorrízicos asociados al cultivo de melón, los factores químicos del suelo, rendimiento, calidad y vida de anaquel de melón. En los resultados se mostró que el peso, diámetro y número de frutos no mostró variaciones inherentes a la aplicación de los biofertilizantes. Los factores de calidad evaluados al momento de la cosecha y durante ocho días de vida post cosecha del fruto (firmeza, pérdida de peso, sólidos solubles totales, acidez titulable y pH) en los tres primeros tratamientos tuvieron un comportamiento similar al testigo. PADILLA, E., SÁNCHEZ, J.A., TRONCOSO, R., SÁNCHEZ, A. Y ESQUEDA, M. (2004).

Estudió el efecto de la inoculación con *Azotobacter chroococcum* en la germinación y la altura de las plántulas de las leguminosas: *Centrosema pubescens* cv. CIAT-423 y *Leucaena leucocephala* cv. CNIA-250 y en las

gramíneas *Cenchrus ciliaris* cv. *Biloela* y *Panicum maximum* cv. Likoni. El inóculo de *Azotobacter* fue añadido diluyendo a 1:40 (v/v) En caldo de cultivo con una concentración superior a 10^{10} UFC/ml en agua. *C. pubescens* y *L. leucocephala* no mostraron marcados efectos en el incremento de la germinación al ser inoculados, aunque existió cierta tendencia a aumentar con respecto al tratamiento no inoculado; los incrementos producidos fueron de 3,7 y 2,2% respectivamente a los 28 días después de la siembra con un ligero aumento en la altura de las plántulas. BACILIO-JIMÉNEZ, F. J. 2001.

Utilizó concentraciones de *Azotobacter* de 10, 20, 30, 40 y 50%, que fueron inoculados en el cultivo del tomate, se obtuvieron en la plantas inoculadas con *Azotobacter* incrementos significativos de la masa seca promedio de la planta (76,8 y 104,9%); de la masa seca de los frutos por planta (212,83 y 260,53%), de la masa seca de la parte aérea (81,79 y 110,78%) y de la altura promedio de la planta (13,79 y 32,13%). MORALES, J. (2005).

En su trabajo de investigación utilizando cepas de *A. chroococcum* nitrógeno combinado con materia en un cultivo de pepinillo obtuvo mayor rendimiento en comparación a los tratamientos sin aplicación de *Azotobacter chroococcum*. La combinación de ambos factores tiene mayor influencia en la acción estimuladora. LOAYZA, J. (2007)

MONTESINOS, W. (2008) realizó su estudio utilizando cepas de *Azotobacter chroococcum* y niveles crecientes de nitrógeno en la variedad de tomate Río grande mejorado, encontró que las dosis de *Azotobacter chroococcum* + nitrógeno lograron mayor influencia sobre las variables rendimiento, peso del fruto, número de frutos y número de racimos, a diferencia de los tratamientos sin aplicación de *Azotobacter* donde se obtuvieron valores inferiores.

En su investigación sobre la fertilización en el cultivo de pprika, utilizó cepas de *Azotobacter chroococcum* combinada con niveles crecientes de nitrógeno. Los mejores resultados que obtuvo fue en las variables de estudio peso seco, peso fresco, número de frutos y altura de planta con la aplicación de *Azotobacter* + niveles crecientes de nitrógeno; demostrando a su vez que la presencia de nitrógeno combinado modifica la producción de auxinas y giberelinas. MARTINEZ, L. (2008).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EXPERIMENTACIÓN

El trabajo referido al aislamiento y producción de biomasa microbiana se realizó en el Laboratorio de Micología y virología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Jorge Basadre Grohmann, departamento de Tacna. La etapa experimental se realizó en el sector de Oconchay, Valle de Locumba.

3.2. MATERIAL EXPERIMENTAL

Se utilizó plantines de cebolla rosada (*Allium cepa* L.) de la Provincia Jorge Basadre y diferentes concentraciones 10^4 ; 10^5 ; 10^6 ; 10^7 ; y 10^8 UFC/ml de *Azotobacter chroococcum* nativo.

3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental utilizado fue el de bloques completos al azar con 6 tratamientos y 4 bloques, cada bloque conformado por 6 unidades experimentales, totalizando 24 unidades experimentales y cada unidad experimental formada a su vez por 83 plantas de cebolla.

Tratamiento control:

T₀: Planta de cebolla + 1 L de Solución Salina Fisiológica (0,85%) con sacarosa (10%) a 00 UFC/mL de *A. chroococcum*

Tratamientos experimentales

T₁: Planta de cebolla+ 1 L de Cultivo de *A. chroococcum* a 10⁴ UFC/mL

T₂: Planta de cebolla+ 1 L de Cultivo de *A. chroococcum* a 10⁵ UFC/mL

T₃: Planta de cebolla+ 1 L de Cultivo de *A. chroococcum* a 10⁶ UFC/mL

T₄: Planta de cebolla+ 1 L de Cultivo de *A. chroococcum* a 10⁷ UFC/mL

T₅: Planta de cebolla+ 1 L de Cultivo de *A. chroococcum* a 10⁸ UFC/mL

CUADRO N°02: DISTRIBUCIÓN DE TRATAMIENTOS EN EL CAMPO EXPERIMENTAL

Block I	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅
Block II	T ₄	T ₅	T ₁	T ₀	T ₂	T ₃
Block III	T ₅	T ₂	T ₃	T ₄	T ₁	T ₀
Block IV	T ₂	T ₀	T ₅	T ₁	T ₃	T ₄

Fuente: Elaboración propia

Las variables en estudio fueron:

- **Variable independiente:**
 - Concentración de *A. chroococcum* (10^4 ; 10^5 ; 10^6 ; 10^7 ; 10^8 UFC/ml)
- **Variable dependiente:**
 - Producción y calidad de cebolla rosada

Indicadores:

1. Indicadores de la producción:

- Producción (kg/parcela)

2. Indicadores de la calidad:

- Altura de la planta (cm)
- Número de hojas
- Peso fresco del bulbo (g)
- Diámetro del bulbo ecuatorial y polar (cm)

3.4. METODOLOGÍA

3.4.1. ETAPA DE AISLAMIENTO DE *Azotobacter chroococcum* nativo

3.4.1.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE SUELO

El muestreo se realizó en un campo de cultivo de cebolla rosada en el sector de Oconchay, en el Valle de Locumba. Este campo presentó una extensión de cultivo de cebolla de 3 Hectáreas. Se tomaron 05 muestras de suelo rizosférico en diferentes puntos del cultivo en forma dirigida seleccionando plantas de cebolla rosada con buen desarrollo en relación a las demás.

Para la obtención de las muestras, se utilizó una pala de acero inoxidable de 20x15 cm que permitió extraer parte del suelo rizosférico sin la planta de cebolla de una profundidad de 15 cm aproximadamente. La cantidad de suelo extraída por punto de muestreo, 1kg, fue colocada en bolsa de polietileno, las cuales se etiquetó, rotuló y llevó al laboratorio para su procesamiento.

3.4.1.2. AISLAMIENTO DE *Azotobacter chroococcum* (ZAPATER, 1975)

Se pesó 10 gramos de muestra de suelo y se diluyó en 90 mL de solución salina fisiológica (S.S.F) estéril, de la cual se hicieron diluciones hasta 10^{-4} en tubos de ensayo con 9 mL de S.S.F. Se cultivó 1 mL de cada dilución por triplicado, en tubos de ensayo de 15x150 mm con 10 mL de Medio de cultivo ASHBY con azul de bromotimol como indicador de pH. Los tubos fueron incubados a 28°C durante 7 días en aerobiosis. Posteriormente a la incubación, se realizó la lectura considerando como tubos positivos de crecimiento presuntivo de *Azotobacter chroococcum*, los que presentaron turbidez, velo superficial y viraje del medio de azul a amarillo (Zapater, 1975).

Se tomó una alícuota a partir de los tubos positivos y se sembró por agotamiento en placas Petri con Agar ASHBY. Estas placas fueron incubadas a 25 - 28 °C durante 3 días, tiempo en el cual se observaron colonias cremosas posterior al cabo de 6 a 7 días un color marrón oscuro presuntivo para *A. chroococcum*.

Para la purificación de las colonias se tomó una porción de la colonia con el asa de kolle y se suspendió en 1 mL de S.S.F. (0,85% de NaCl). Esta suspensión se volvió a sembrar en placas con Agar ASHBY mediante agotamiento por estría y se incubó a 28 °C por 3 días. Después de la incubación las colonias desarrolladas fueron repicadas en el medio Agar ASHBY contenidos en tubos de ensayo para conservar al cultivo de *A. chroococcum* en estado puro.

3.4.1.3 CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *Azotobacter chroococcum* (JIMÉNEZ, 2007)

A partir del cultivo puro se realizó una nueva siembra por estría en placas Petri con Agar ASHBY para la caracterización macroscópica de las colonias considerando: Tamaño, color, forma, borde y superficie de las colonias. También a partir del cultivo puro se tomó inóculos para realizar las pruebas siguientes:

- Prueba de la catalasa

Se cogió una porción de colonia que fue extendida sobre un porta objetos y sobre ella se le agregó una gota H₂O₂ al 3%, observándose burbujas que fue el indicativo de la liberación

de oxígeno, característico de un resultado positivo correspondiente a la de *A. chroococcum* (Jiménez, 2007).

- Coloración Gram

Se cogió una porción de colonia que fue extendida sobre un porta objetos, se fijó al calor y luego se coloreo con el set de Gram; la laminilla coloreada fue llevada a observación microscópica determinándose a todas las bacterias como Gram negativas compatibles a *A. chroococcum* (Frioni, 1999).

3.4.1.4 PRODUCCIÓN DE LA BIOMASA DE *A. chroococcum* (PÁRAMO, 1999; FRIONI, 1999)

A partir del cultivo puro *A. chroococcum* aislado se tomó una porción de colonias y se suspendió en 1ml de S.S.F. Se tomó 0,1 ml de la suspensión y se colocó en el centro de la superficie del medio de cultivo Agar ASHBY luego del cual se extendió con ayuda del asa de Drigaslky por toda la superficie del medio de la placa, la placa Petri se llevó a incubar a 28 °C durante 72 horas. Se agregó 10 mL de S.S.F. (0,85% de NaCl), sobre las colonias desarrolladas en la placa Petri, luego con la ayuda de un asa Drigalsky estéril se procedió a remover las colonias, para obtener una suspensión. Se extrajo

5 ml de la suspensión bacteriana y se transfirió a un tubo de ensayo.

Del cual se hizo el recuento bacteriano de la suspensión en cámara de Neubauer obteniendo una concentración de $1,5 \times 10^9$ UFC/mL. Finalmente a partir de esta suspensión se obtuvo inóculos bacterianos de 100 ml en medio LG a una concentración de 10^7 UFC/mL.

El inóculo bacteriano de 100 ml obtenido fue agregado a 900 mL de medio líquido LG con azul de bromotimol como indicador de pH, previamente esterilizado y contenido en un fermentador. El fermentador fue incubado a 28 °C durante 24 horas con aireación. La purificación del aire para la aireación se hizo antes de que ingrese al fermentador haciendo pasar el aire a través de una solución saturada de sulfato de cobre al 10%, contenido en un matraz de 250ml. Luego del tiempo de incubación se procedió a realizar el recuento del cultivo en cámara de Neubauer obteniendo $2,3 \times 10^8$ UFC/mL.

A partir de la biomasa obtenida en el fermentador se preparó diluciones con una solución estéril de agua deionada con sacarosa al 10 % como adherente. Cada dilución presentó

un volumen de 1 L contenidos en recipientes de plástico tipo taper. Las diluciones obtenidas fueron los inóculos con concentraciones de: 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 UFC/mL. Que luego fueron empleados para los tratamientos experimentales T₁, T₂, T₃, T₄ y T₅.

Para preparar el tratamiento control (T₀) con concentración de 00 UFC/mL de *A. chroococcum* se agregó en un recipiente 8,5 de NaCl más 100gr de sacarosa al 10% y 900 ml de agua declorada estéril que hizo que tuviera un volumen de 1 L.

3.4.2. ETAPA DE CAMPO

3.4.2.1. ANTECEDENTES DE CULTIVOS DE CAMPO EXPERIMENTAL

Tabla N° 2

CULTIVO	AÑO
Ají Pacae (<i>Capsicum Chínense</i>)	2010
Maíz Opaco Malpaso (<i>Zea mays</i>)	2011
Cebolla (<i>Allium cepa</i>)	2012

Fuente: Elaboración propia

En la tabla N° 2 se observa que durante el año 2010 se sembró ají Pacae, (*Capsicum Chínense*), sin embargo en el año 2011 en el área se realizó la rotación con el cultivo de maíz Opaco Malpaso, después de este cultivo el terreno tuvo

un periodo descansó de 4 meses antes del inicio del presente experimento con el cultivo de cebolla.

3.4.2.2. PREPARACIÓN DEL SUELO DEL ÁREA EXPERIMENTAL

El suelo del área experimental empleado tuvo una rotación de cultivo para evitar el desequilibrio de nutrientes en el suelo y obtener un corte o continuidad de plagas y/o enfermedades en el campo de cultivo. El suelo del área experimental fue desinfectado con Benomilo para evitar enfermedades contra la chupadera fungosa utilizando 250 gr/cilindro fumigando al suelo una sola vez, antes del trasplante de los almácigos.

Luego de la desinfección el suelo fue arado con un tractor agrícola. Esta labor permitió que el área experimental fuera homogenizada y se surcara, a su vez se marcó en sub áreas en forma correspondiente al número, orden y área de cada unidad experimental de cada bloque determinado en el diseño experimental.

3.4.2.3. OBTENCIÓN DE ALMÁCIGO

Los plantines de cebolla fueron donados por la Municipalidad Jorge Basadre de Tacna, obtenidos luego de 45

días de sembrado con un diámetro parecido al grosor de un lápiz.

3.4.2.4. INOCULACIÓN DE *Azotobacter chroococcum* EN PLANTINES DE CEBOLLA (*Allium cepa* L.) ANTES DE SU PLANTACIÓN EN CAMPO.

La Inoculación con *A. chroococcum* de los plantines de cebolla se realizó sumergiendo la raíz y el bulbo de cada plantín en grupo dentro del volumen del inóculo de 1 L de suspensión de *A. chroococcum*, durante 30 min. La inoculación del tratamiento control se hizo empleando como inóculo S.S.F. (0.85%) y con sacarosa al 10% no contiene *A. chroococcum*.

3.4.2.4 PLANTACIÓN DE LOS PLANTINES DE CEBOLLA (*Allium cepa* L.) EN CAMPO

Los plantines fueron plantados en el suelo del área experimental introduciendo las raíces, previo excavado de un hoyo de 3 a 4 cm de profundidad que enseguida fue tapado con el mismo suelo. La distancia que hubo entre uno y otro plantín plantado fue de 10 cm.

3.4.2.5 MANTENIMIENTO Y CONTROL DE LA PLANTACIÓN DE CEBOLLA (*Allium cepa* L.)

A. RIEGOS:

Se utilizó el riego por goteo de 2 a 3 horas durante los primeros días del primer mes, desde el segundo mes de plantación hasta el final de la cosecha el riego fue interdiario.

B. CONTROL DE MALEZAS

Para el control se asperjó a los tres días del trasplante un herbicida post- emergente utilizando centurión ½ litro/cilindro; así mismo se realizó una escarda un movimiento ligero de la tierra para oxigenar el suelo, usando deshierbadores.

C. CONTROL DE PLAGAS Y ENFERMEDADES

Se efectuaron controles fitosanitarios en forma preventiva, aplicando sobre las plantas de cebolla un pesticida tipo sistémico y en algunas ocasiones un pesticida de contacto.

Los pesticidas fueron aplicados por aspersión estas fueron:

- Aspersiones Foliares con Zetametrina 18% EC (FURIA o similar) a razón de 100ml /ha para el control del trips (*Thrips tabaci*). Se aplicaron en 4 ocasiones durante la ejecución del ensayo.
- Aspersiones foliares de Friponil (REGENT o similar) a razón de 250 - 500 ml / ha para el control de trips (*Thrips tabaci*). La primera aplicación se desarrolló a los 15 días de la plantación luego a los 30, 40 y 50 días de la plantación.
- Aspersiones foliares de Fosetil (ALIETTE o similar) a razón de 2 – 3,5 g / L para el control del Mildiu. Se Aplicó a los 8 días de la plantación en una sola ocasión.
- Aspersiones foliares de VIDATE L. A razón de 1 ml/L para el control de nemátodos.

3.4.2.6 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN Y CALIDAD DE LA CEBOLLA

A. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CEBOLLA:

La producción se evaluó a los 90 días de plantado los plantines, pesando el total de bulbos de cebolla de cada tratamiento. Se consideró para cada tratamiento el promedio del peso de cebolla de sus repeticiones.

B. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD:

▪ Altura de la planta (cm)

La altura se midió en dos etapas, a los 50 y 70 días desde el cuello de la planta hasta el ápice de la rama más larga de cada planta de cebolla. La altura para cada tratamiento se consideró en base al promedio de las repeticiones.

▪ Número de hojas

A los 90 días de plantado los plantines se contó manualmente la cantidad de hojas emitidas en cada una de las plantas para los tratamientos. Se consideró para cada tratamiento el promedio del número de hojas de las repeticiones

▪ Peso fresco del bulbo (g)

Al momento de la cosecha se contaron y pesaron los bulbos de las plantas por cada tratamiento. Los resultados se expresaron en gramos. Se consideró para cada tratamiento el promedio del peso fresco del bulbo de cada repetición.

- **Diámetro de bulbo ecuatorial y polar (cm)**

El diámetro del bulbo ecuatorial y polar de la cebolla se midió con un vernier al momento de la cosecha. Se consideró como diámetro de bulbo ecuatorial a la parte del bulbo mas ensanchada y como diámetro polar a la parte de la altura del bulbo de la cebolla; Se consideró para cada tratamiento el promedio de los diámetros de los bulbos ecuatorial y polar de la cebolla de cada repetición.

3.4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron procesados estadísticamente mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) con el propósito de determinar las diferencias significativas entre los tratamientos que tuvieron mayor efecto en la producción y calidad; y luego establecer los mejores tratamientos mediante la prueba de Duncan con 95 % de nivel de confianza.

IV. RESULTADOS

4.1. PRODUCCIÓN DE LA CEBOLLA

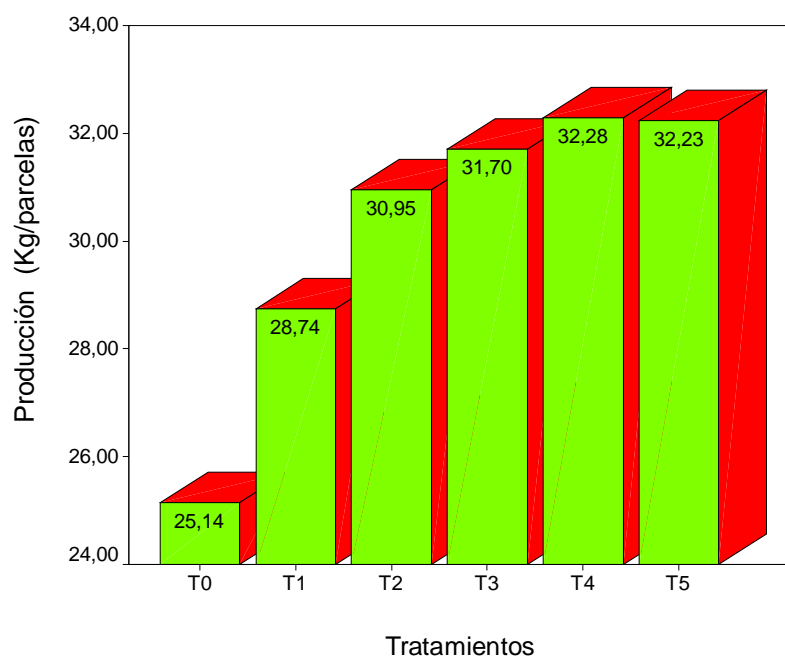
Cuadro N° 03: Promedios de la producción (kg/parcelas= 16,66m²) de Cebolla por tratamiento y por bloques en la experimentación

Bloques \ Tratamientos	I	II	III	IV	Promedio Tratamientos
T ₀	26,602	25,300	25,256	23,416	25,14
T ₁	28,817	29,723	28,931	27,493	28,74
T ₂	30,663	31,886	30,675	30,582	30,95
T ₃	31,812	32,521	31,321	31,140	31,70
T ₄	33,121	31,590	32,503	31,902	32,28
T ₅	31,320	32,455	31,963	33,197	32,23
Promedio de bloques	30,39	30,58	30,11	29,62	30,17

Fuente: Elaboración propia

Leyenda: T₀: 00 UFC/mL; T₁: 10⁴ UFC/mL; T₂: 10⁵ UFC/mL; T₃: 10⁶ UFC/mL; T₄: 10⁷UFC/mL;T₅: 10⁸ UFC/mL.

Figura N°01: Promedio de los tratamientos sobre la producción de cebolla rosada obtenida en la experimentación (kg/parcelas).



Fuente: Elaboración propia.

Leyenda: T₀: 00 UFC/mL; T₁: 10⁴ UFC/mL; T₂: 10⁵ UFC/mL; T₃: 10⁶ UFC/mL; T₄: 10⁷ UFC/mL; T₅: 10⁸ UFC/mL.

En el cuadro N°03 y Figura 01 se muestra que en el T₄ se tiene el mayor promedio con 32,28 kg/parcela y la menor en el tratamiento T₀ con 25,14 kg/parcela.

Cuadro N° 04: Análisis de varianza de la producción de Cebolla (kg/parcela)

Fuentes de variabilidad	G.L.	S.C	C.M.	F.C.	F	
					0,05	0,01
Bloques	3	3,117	1,039	1,533	3,29	5,42 NS
Tratamientos	5	155,846	31,169	45,993	2,90	4,56 **
Error	15	10,165	0,677			
Total	23	169,128				

Fuente: Elaboración propia.

C.V: 2,728 %

El cuadro N° 04, muestra que no existe significación estadística entre los bloques, sin embargo si existen diferencias estadísticas y altamente significativas para los tratamientos con un nivel de confianza de 99%, es decir que al menos uno de los tratamientos tuvo mayor promedio en la producción; su coeficiente de variabilidad de 2,728 % que es bajo; es aceptable para el ensayo.

Cuadro N° 05: Prueba de significación de Duncan de la producción de cebolla

Tratamientos	Promedio (kg/parcela)	Significación 0,05
T ₄ : 10 ⁷ UFC/mL	32,28	a
T ₅ : 10 ⁸ UFC/mL	32,23	a
T ₃ : 10 ⁶ UFC/mL	31,70	a
T ₂ : 10 ⁵ UFC/mL	30,95	a
T ₁ : 10 ⁴ UFC/mL	28,74	b
T ₀ : 00 UFC/mL	25,14	c

Fuente: elaboración propia

El cuadro N° 05 de la prueba de significación de Duncan, muestra en primer lugar al tratamientos T₄ con 32,28 kg/parcela, en el segundo lugar al T₅ con 32,23 kg/parcela, en el tercer lugar al T₃ con 31,70 kg/parcela, en el cuarto lugar al T₂ con 30,95 kg/parcela, no existiendo diferencias estadísticas entre estos 4 tratamientos, en el penúltimo lugar se ubica el T₁ con 28,74 kg/parcela; y en el último lugar al T₀ con 25,14 kg/parcela, estos dos últimos difieren estadísticamente en sus promedios.

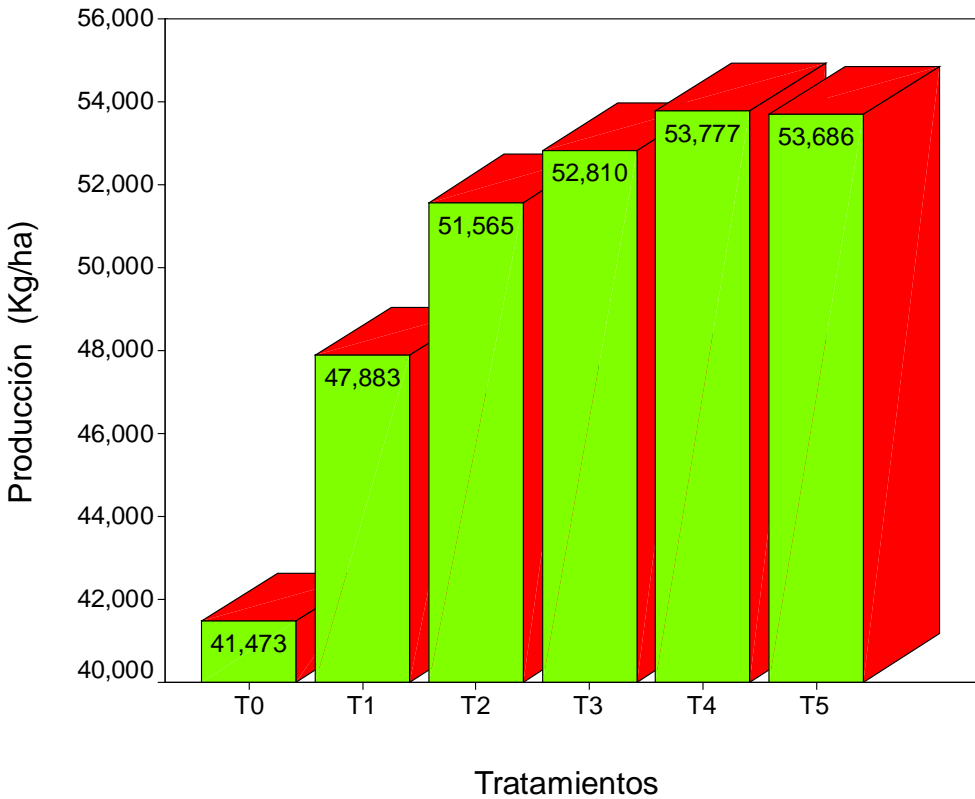
Cuadro N° 06: Promedios de la producción (kg/ha) de Cebolla por tratamiento y por bloques en la experimentación

Bloques Tratamientos	I	II	III	IV	Promedio Tratamientos
T ₀	44 320	42 150	40 410	39 012	41 473
T ₁	48 010	49 520	48 200	45 805	47 883
T ₂	51 085	53 120	51 105	50 950	51 565
T ₃	53 000	54 180	52 180	51 880	52 810
T ₄	55 180	52 630	54 150	53 150	53 777
T ₅	52 180	54 007	53 250	55 306	53 686
Promedio de bloques	50 629	50 934	49 882	49 350	50 199

Fuente: elaboración propia

Leyenda: T₀: 00 UFC/mL; T₁: 10⁴ UFC/mL; T₂: 10⁵ UFC/mL; T₃: 10⁶ UFC/mL;
T₄:10⁷UFC/mL;T₅: 10⁸ UFC/mL.

Figura N°02: Promedio de los tratamientos sobre la producción de Cebolla rosada obtenida en la experimentación (kg/ha).



Fuente: Elaboración propia.

El cuadro N° 06 y Figura N°02 se muestra que el tratamientos T₄ con 53,77 kg/ha se tiene la mayor producción, y la menor en el tratamiento T₀ con 41,50 kg/ha.

CUADRO N° 07: Análisis de varianza de la producción de la cebolla (kg/ha)

Fuentes de variabilidad	G.L.	S.C	C.M.	F.C.	F	
					0,05	0,01
Bloques	3	9274709	3091570	1,598	3,29	5,42 NS
Tratamientos	5	4,6059993E+08	9,211986+E07	47,664	2,90	4,56 **
Error	15	2,900241E+07	1933494			
Total	23	4,988764E+08				

Fuente: Elaboración propia.

C.V: 2,770 %

El cuadro N° 07, muestra que no existe significación estadística entre los bloques, sin embargo si existen diferencias estadísticas y altamente significativas para los tratamientos con un nivel de confianza de 99%, es decir que al menos uno de los tratamientos tuvo mayor promedio de producción; su coeficiente de variabilidad de 2,770% que es bajo; es aceptable para el ensayo.

Cuadro N° 08: Prueba de significación de Duncan de la producción de cebolla

Tratamientos	Promedio (kg/ha)	Significación 0,05
T ₄ : 10 ⁷ UFC/mL	53 777	a
T ₅ : 10 ⁸ UFC/mL	53 685	a
T ₃ : 10 ⁶ UFC/mL	52 810	a
T ₂ : 10 ⁵ UFC/mL	51 565	a
T ₁ : 10 ⁴ UFC/mL	47 883	b
T ₀ : 00 UFC/mL	41 473	c

Fuente: elaboración propia

El cuadro N° 08, de la prueba de significación de Duncan, muestra en primer lugar al tratamientos T₄ con 53 777 kg/ha, en el segundo lugar al T₅ con 53 685 kg/ha, en el tercer lugar al T₃ con 52 810 t/ha, en el cuarto lugar al T₂ con 565 kg/ha, no existiendo diferencias estadísticas entre estos 4 tratamientos, en el penúltimo lugar se ubica el T₁ con 47 8863 kg/ha; y en el último lugar al T₀ con 41 473 kg/ha, estos dos últimos difieren estadísticamente en sus promedios.

4.2. CALIDAD DE LA CEBOLLA

A. Altura de la Plantade Cebolla Rosada a los 50 Días

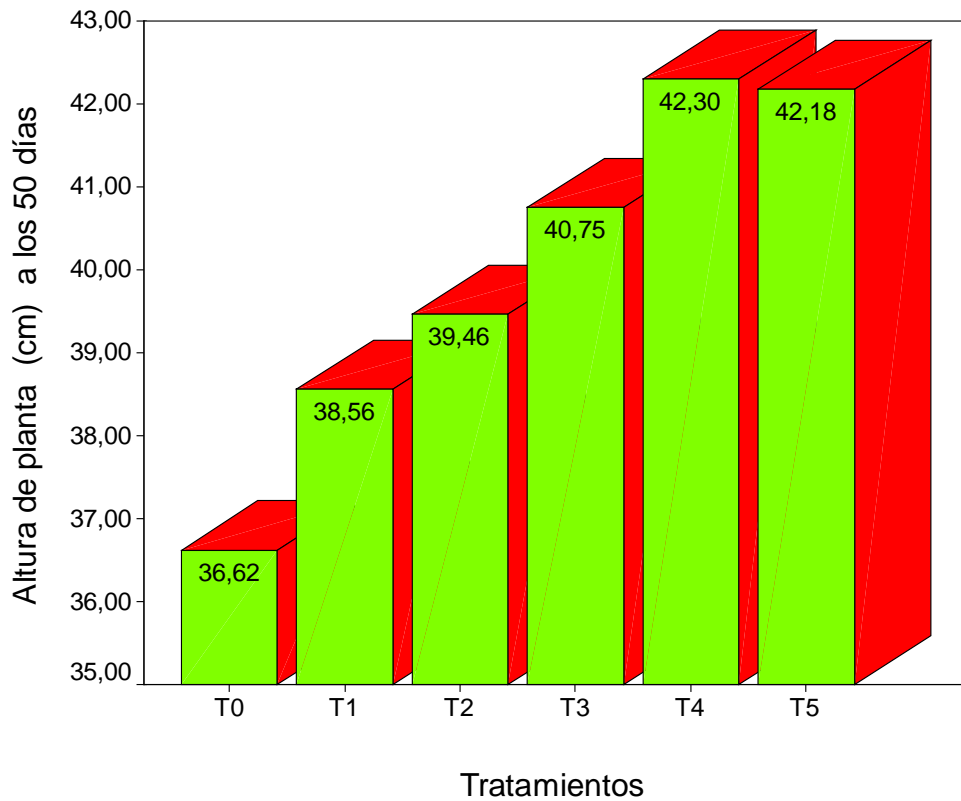
Cuadro N° 09: Promedios de altura de la planta de cebolla a los 50 días por tratamiento y por bloques en la experimentación

Bloques \ Tratamientos	Bloques				Promedio de Tratamientos (cm)
	I	II	III	IV	
T ₀	35,65	36,65	38,75	35,42	36,62
T ₁	38,45	39,42	39,41	36,95	38,56
T ₂	38,74	39,95	39,00	40,15	39,46
T ₃	39,63	40,15	42,15	41,05	40,75
T ₄	40,15	41,22	43,52	44,32	42,30
T ₅	41,15	41,29	42,95	43,32	42,18
Promedio de Bloques	38,96	39,78	40,96	40,20	39,98

Fuente: Elaboración propia

Leyenda: T₀: 00 UFC/mL; T₁: 10⁴ UFC/mL; T₂: 10⁵ UFC/mL; T₃: 10⁶ UFC/mL; T₄: 10⁷ UFC/mL; T₅: 10⁸ UFC/mL.

Figura N°03: Promedio de los tratamientos sobre la altura de cebolla rosada obtenida a los 50 días en la experimentación.



Fuente: Elaboración propia

Leyenda: T₀: 00 UFC/mL; T₁: 10⁴ UFC/mL; T₂: 10⁵ UFC/mL; T₃: 10⁶ UFC/mL; T₄: 10⁷ UFC/mL; T₅: 10⁸ UFC/mL.

En el cuadro N°09 y Figura 03 se muestra que en el T₄ se tiene la mayor calidad de la cebolla con respecto a la altura a los 50 días con 42,30 cm y la menor en el tratamiento T₀ con 36,62 cm

Cuadro N° 10: Análisis de varianza de la altura de la planta de cebolla a los 50 días

Fuentes de variabilidad	Grados de Libertad.	Suma Cuadrados	Cuadrado .Medio.	F. Calculado.	F	
					0,05	0,01
Bloques	3	6,436	2,146	1,108	3,29	5,42 ns
Tratamientos	5	74,085	14,817	7,657	2,90	4,56 **
Error	15	29,025	1,934			
Total	23	109,546				

Fuente: Elaboración propia

C.V: 3,465%

ns. No significativo

** Altamente significativo

El cuadro N° 10: muestra que no existe significación estadística entre los bloques, sin embargo para los tratamientos existen diferencias estadísticas altamente significativas con un nivel de confianza de 99%, es decir que al menos uno de los tratamientos tuvo mayor altura de planta; asimismo por el coeficiente de variabilidad de 3,465% que es bajo; es aceptable el valor para el ensayo.

Cuadro N° 11: Prueba de significación de Duncan de la altura (cm) de la planta de cebolla a los 50 días

Tratamientos	Promedio (cm)	Significación 0,05
T ₄ : 10 ⁷ UFC/mL	42,30	a
T ₅ : 10 ⁸ UFC/mL	42,18	a
T ₃ : 10 ⁶ UFC/mL	40,75	a b
T ₂ : 10 ⁵ UFC/mL	39,46	b
T ₁ : 10 ⁴ UFC/mL	38,56	c
T ₀ : 00 UFC/mL	36,62	c

Fuente: Elaboración propia

Se observa en el cuadro N° 11, de la prueba de significación de Duncan indica que los tres primeros tratamientos no difieren estadísticamente en sus respectivos promedios, donde el primer lugar se ubica el T₄ con 42,30 cm, en el segundo lugar el T₅ con 42,18 cm ; y en tercer lugar el T₃ con 40,75 cm, cuarto lugar el T₂ con 39,46, de igual forma no difieren estadísticamente el T₃ y T₂, en quinto lugar se ubicó el T₁ y en el último lugar el T₀ con 38,56 y 37,62 cm, siendo estadísticamente similares en sus promedios.

B. Altura de la planta de cebolla rosada a los 70 días

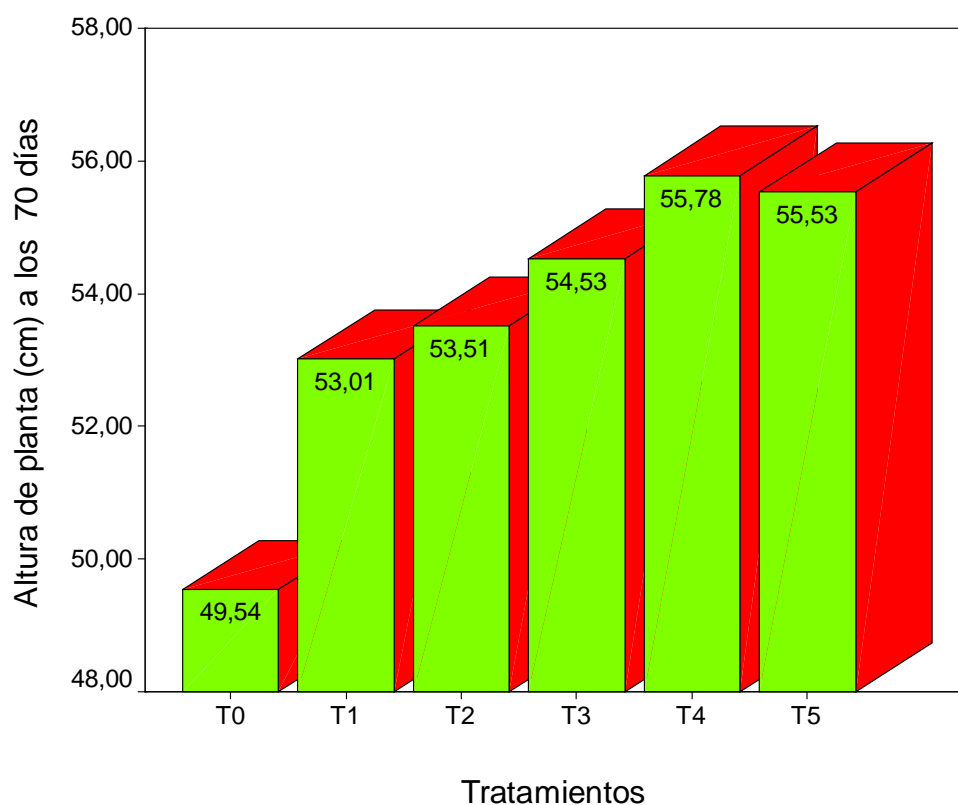
Cuadro N° 12: Promedios de altura de la planta de cebolla a los 70 días por tratamiento y por bloques obtenidos en la experimentación

Bloques Tratamientos	Bloques				Promedio de Tratamientos (cm)
	I	II	III	IV	
T ₀	50,10	49,85	48,21	50,00	49,54
T ₁	54,40	52,36	52,12	53,15	53,01
T ₂	55,42	51,45	53,05	54,12	53,51
T ₃	56,12	52,36	54,15	55,50	54,53
T ₄	56,02	55,42	55,23	56,45	55,78
T ₅	55,42	56,40	56,15	54,15	55,53
Promedios de Bloques	54,58	52,97	53,152	53,895	53,65

Fuente: Elaboración propia

Leyenda: T₀: 00 UFC/mL; T₁: 10⁴ UFC/mL; T₂: 10⁵ UFC/mL; T₃: 10⁶ UFC/mL; T₄: 10⁷ UFC/mL; T₅: 10⁸ UFC/mL.

Figura Nº 04: Promedio de los tratamientos sobre la altura de cebolla rosada obtenida a los 70 días en la experimentación.



Fuente: Elaboración propia.

Leyenda: T₀: 00 UFC/mL; T₁: 10⁴ UFC/mL; T₂: 10⁵ UFC/mL; T₃: 10⁶ UFC/mL; T₄: 10⁷ UFC/mL; T₅: 10⁸ UFC/mL.

En el cuadro Nº12 y Figura 04 se muestra que en el T₄ y T₅ se tiene la mayor calidad de la cebolla con respecto a la altura a los 70 días con 55,53 cm y la menor en el tratamiento T₀ con 49,54 cm.

Cuadro N°13: Análisis de varianza de la altura de la planta de cebolla a los 70 días

Fuentes de variabilidad	G.L.	S.C	C.M.	F.C.	F	
					0,05	0,01
Bloques	3	9,786	20,940	2,95	3,29	5,42 ns
Tratamientos	5	104,698	3,262	18,96	2,90	4,56 **
Error	15	16,563	1,104			
Total	23	131,047				

Fuente: Elaboración propia

C.V: 1,958%

El cuadro N°13, del análisis de varianza señala que no existe significación estadística entre los bloques, sin embargo para los tratamientos existen diferencias estadísticas altamente significativas con un nivel de confianza de 99%, es decir que al menos uno de los tratamientos tuvo mayor altura de planta, asimismo por el coeficiente de variabilidad de 1,958 % que es bajo; es aceptable para el ensayo.

Cuadro N° 14: Prueba de significación de Duncan de la altura de la planta de cebolla a los 70 días

Tratamientos	Promedio (cm)	Significación 0,05
T ₄ : 10 ⁷ UFC/mL	55,78	a
T ₅ : 10 ⁸ UFC/mL	55,53	a
T ₃ : 10 ⁶ UFC/mL	54,53	a b
T ₂ : 10 ⁵ UFC/mL	53,51	b
T ₁ : 10 ⁴ UFC/mL	53,00	b
T ₀ : 00 UFC/mL	49,54	c

Fuente: Elaboración propia

El cuadro N°14 de la prueba de significación de Duncan podemos observar que existen 2 grupos homogéneos donde destaca en el primer lugar el T₄ con 55,78 en el segundo lugar el T₅ con 55,53 cm el tratamiento T₂ en el tercer lugar con 54,53 cm, siendo estos tres primeros similares en sus promedios, en el cuarto lugar el tratamiento el T₃ con 53,51 cm y T₁ en el quinto lugar con 53,51 y en el último lugar se ubica T₀ con 49,54 cm, difiriendo estadísticamente al resto de tratamientos en sus promedios.

C. Número de hojas de cebolla rosada a los 90 días

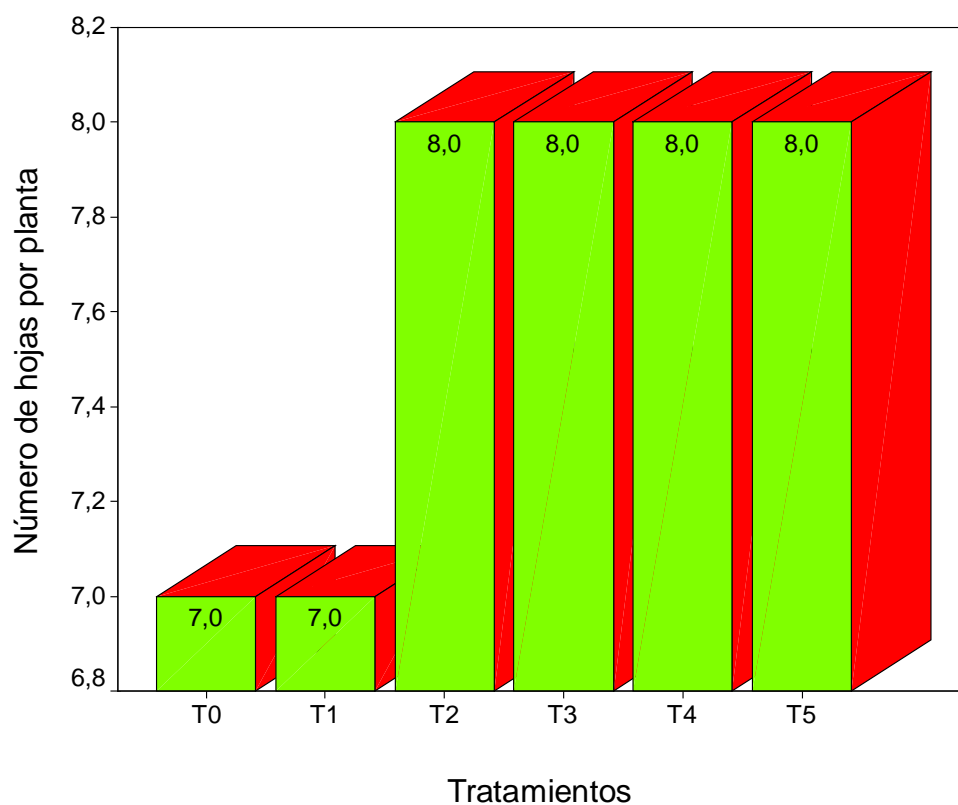
Cuadro Nº15: Promedios del número de hojas de la planta de cebolla por tratamiento y por bloques obtenidos en la experimentación

Bloques Tratamientos	Bloques				Promedio de Tratamientos
	I	II	III	IV	
T ₀	8	6	6	7	7,0
T ₁	7	7	7	8	7,0
T ₂	7	7	8	8	8,0
T ₃	8	8	8	8	8,0
T ₄	8	8	9	7	8,0
T ₅	8	8	8	7	8,0
Promedios de Bloques	7,7	7,3	7,7	7,5	7,7

Fuente: Elaboración propia

Leyenda: T₀: 00 UFC/mL; T₁: 10⁴ UFC/mL; T₂: 10⁵ UFC/mL; T₃: 10⁶ UFC/mL; T₄:10⁷ UFC/mL;T₅: 10⁸ UFC/mL.

Figura Nº 05: Promedios de los tratamientos sobre el número de hojas de cebolla rosada obtenido a los 90 días en la experimentación.



Fuente: Elaboración propia.

Leyenda: T₀: 00 UFC/mL; T₁: 10⁴ UFC/mL; T₂: 10⁵ UFC/mL; T₃: 10⁶ UFC/mL; T₄:10⁷ UFC/mL;T₅: 10⁸ UFC/mL.

En cuadro Nº15 y Figura 05 se muestra que en los tratamientos T₂, T₃, T₄ y T₅ tuvieron el mismo y el mayor número de hojas que fue de 08 y los tratamientos T₀ y T₁ tuvieron el menor y el mismo valor de número de hojas que fue de 07.

Cuadro N°16: Análisis de varianza del número de hojas de la planta de cebolla

Fuentes de variabilidad	G.L.	S.C	C.M.	F.C.	F	
					0,05	0,01
Bloques	3	0,458	0,152	0,337	3,29	5,42 ns
Tratamientos	5	4,708	0,941	2,079	2,90	4,56 ns
Error	15	6,791	0,452			
Total	23	11,957				

Fuente: Elaboración propia

C.V: 8,922 %

El cuadro N°16; nos muestra que no existe diferencia estadística para el efecto de bloques y tratamientos, por lo que todos los tratamientos no tuvieron diferencias estadísticas en el número de hojas, el coeficiente de variabilidad de 8,922 % que es bajo y es aceptable el valor para el ensayo.

Cuadro N° 17: Prueba de significación de Duncan del número de hojas de planta de cebolla

Tratamientos	Promedio	Significación 0,05
T ₅ : 10 ⁷ UFC/MI	8	a
T ₄ : 10 ⁶ UFC/mL	8	a
T ₃ : 10 ⁵ UFC/mL	8	a
T ₂ : 10 ⁸ UFC/mL	8	a
T ₁ : 10 ⁴ UFC/mL	7	b
T ₀ : 00 UFC/mL	7	b

Fuente: Elaboración propia

El cuadro N° 17 de la prueba de significación de Duncan podemos observar que todos los tratamientos son estadísticamente similares en sus promedios sin embargo los tratamientos donde T₅; T₄; T₃; y T₂ obtuvieron un promedio de 8 hojas, los tratamientos T₁ y T₀ obtuvieron un promedio de 7 hojas

D. Peso del bulbo de cebolla rosada

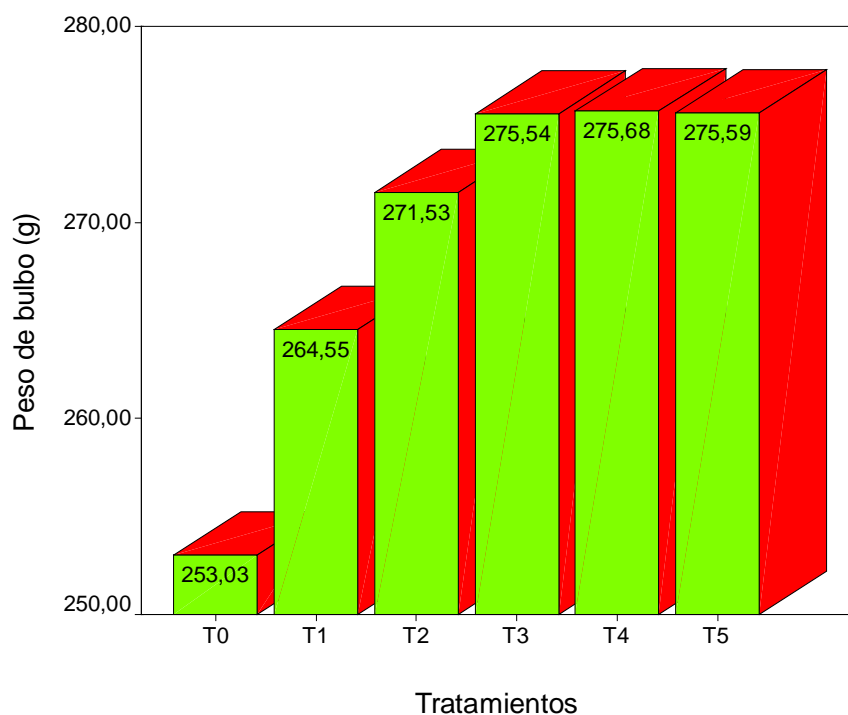
Cuadro N°18: Promedios del peso del bulbo de cebolla por tratamiento y por bloques obtenidos en la experimentación

Bloques Tratamientos	Bloques				Promedio peso de bulbos (g)
	I	II	III	IV	
T ₀	268,02	250,15	242,78	251,15	253,03
T ₁	269,15	265,15	262,18	261,74	264,55
T ₂	270,42	268,41	272,15	275,15	271,53
T ₃	271,63	270,12	282,15	278,45	275,54
T ₄	275,15	269,72	280,15	277,14	275,68
T ₅	274,18	271,15	278,15	279,22	275,59
Promedios de Bloques	271,43	265,78	269,59	270,48	269,32

Fuente: Elaboración propia

Leyenda: T₀: 00 UFC/mL; T₁: 10⁴ UFC/mL; T₂: 10⁵ UFC/mL; T₃: 10⁶ UFC/mL; T₄: 10⁷ UFC/mL; T₅: 10⁸ UFC/mL.

Figura N° 06: Promedio de los tratamientos sobre el peso del bulbo de las plantas de cebolla rosada obtenido a los 90 días en la experimentación.



Fuente: Elaboración propia.

Leyenda: T₀: 00 UFC/mL; T₁: 10⁴ UFC/mL; T₂: 10⁵ UFC/mL; T₃: 10⁶ UFC/mL; T₄: 10⁷ UFC/mL; T₅: 10⁸ UFC/mL.

En el cuadro N°18 y Figura 06 se muestra que el T₄ tiene el mayor promedio de peso de bulbo de cebolla con 275,68 g y el menor tratamiento T₀ con 253,03 g.

Cuadro N°19: Análisis de varianza del peso (g) del bulbo de la planta de cebolla

Fuentes de variabilidad	G.L.	S.C	C.M.	F.C.	F	
					0,05	0,01
Bloques	3	110,042	36,680	1,129	3,29	5,42 ns
Tratamientos	5	1645,750	329,150	10,136	2,90	4,56 **
Error	15	487,083	32,472			
Total	23	2242,875				

Fuente: Elaboración propia.

C.V: 2,116 %

El cuadro N°19; muestra que no existe significación estadística entre los bloques, sin embargo para los tratamientos existen diferencias estadísticas altamente significativas con un nivel de confianza de 99%, es decir que al menos uno de los tratamientos tuvo mayor promedio de peso del bulbo, su coeficiente de variabilidad de 2,116 % que es bajo; es aceptable para el ensayo.

Cuadro N°20: Prueba de significación de Duncan del peso (g) del bulbo de la cebolla

Tratamientos	Promedio (g)	Significación 0,05
T ₄ : 10 ⁷ UFC/mL	275,675	a
T ₅ : 10 ⁸ UFC/mL	275,587	a
T ₃ : 10 ⁶ UFC/mL	275,540	a
T ₂ : 10 ⁵ UFC/mL	271,532	a b
T ₁ : 10 ⁴ UFC/mL	264,555	b
T ₀ : 00 UFC/mL	253,025	c

Fuente: Elaboración propia.

El cuadro N°20, muestra que existen 2 grupos homogéneos que estadísticamente son similares, donde destaca en primer lugar el T₄ con 275,675 g, en el segundo lugar al T₅ con 275,587 g en el tercer lugar al T₃ con 275,540 g; en el cuarto lugar al T₂ con 271,532 g, siendo estadísticamente similares en sus promedios, en quinto lugar se ubica el T₁ con 264,555 g y finalmente en último lugar a T₀ con 253,025 g, todos los tratamientos evaluados superaron significativamente al tratamiento testigo.

E. Diámetro ecuatorial del bulbo de cebolla rosada

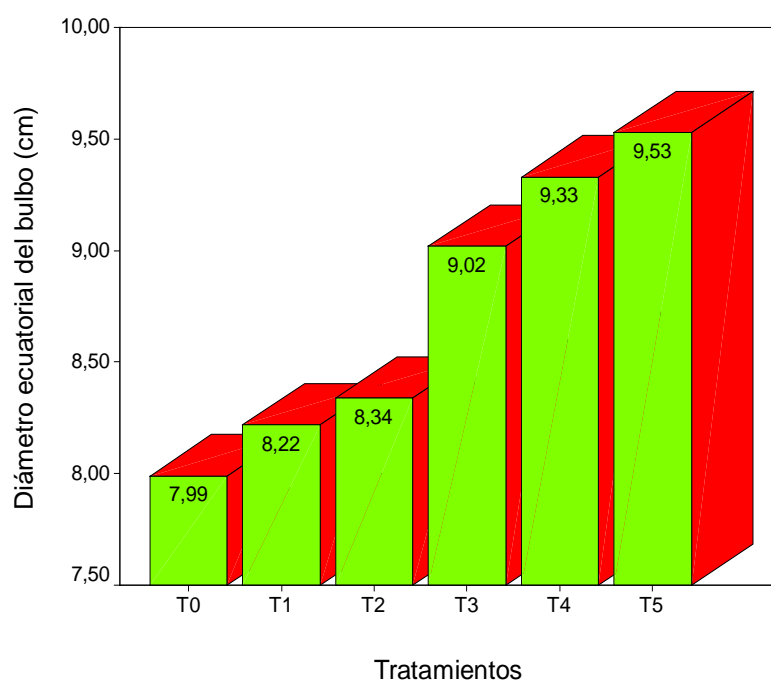
Cuadro Nº 21: Promedios del diámetro ecuatorial del bulbo de cebolla rosada por tratamiento y por bloques obtenidos en la experimentación

Bloques	Tratamientos				Promedio diámetro ecuatorial (cm)
	I	II	III	IV	
T ₀	8,75	7,79	7,80	7,63	7,99
T ₁	8,88	8,00	8,01	7,98	8,22
T ₂	8,98	8,12	8,15	8,12	8,34
T ₃	9,00	8,95	10,0	8,14	9,02
T ₄	9,12	9,08	9,98	9,15	9,33
T ₅	9,01	9,02	10,11	9,98	9,53
Promedios de Bloques	8,96	8,49	9,01	8,50	8,74

Fuente: Elaboración propia.

Leyenda: T₀: 00 UFC/mL; T₁: 10⁴ UFC/mL; T₂: 10⁵ UFC/mL; T₃: 10⁶ UFC/mL; T₄: 10⁷ UFC/mL; T₅: 10⁸ UFC/mL.

Figura N° 07: Promedio de los tratamientos sobre el diámetro ecuatorial del bulbo de cebolla rosada obtenido a los 90 días en la experimentación



Fuente: Elaboración propia.

Leyenda: T₀: 00 UFC/mL; T₁: 10⁴ UFC/mL; T₂: 10⁵ UFC/mL; T₃: 10⁶ UFC/mL; T₄: 10⁷ UFC/mL; T₅: 10⁸ UFC/mL.

En el cuadro N°21 y Figura 07 se muestra que el T₄ tiene el mayor promedio de peso de bulbo de cebolla con 275,68 g y el menor tratamiento T₀ con 253,03 g.

Cuadro N°22: Análisis de varianza del diámetro ecuatorial del bulbo de cebolla rosada

Fuentes de variabilidad	G.L.	S.C	C.M.	F.C.	F	
					0,05	0,01
Bloques	3	1,424	0,474	1,846	3,29	5,42 ns
Tratamientos	5	8,178	1,636	6,360	2,90	4,56 **
Error	15	3,857	0,257			
Total	23	13,459				

Fuente: Elaboración propia.

C.V: 5,083 %

El cuadro N°22 del análisis de varianza muestra que no existe significación estadística entre los bloques, si para los tratamientos en el cual existen diferencias estadísticas altamente significativas con un nivel de confianza de 99%, es decir que al menos uno de los tratamientos tuvo mayor promedio de diámetro ecuatorial; su coeficiente de variabilidad de 5,083 % que es bajo; es aceptable para el ensayo.

Cuadro N°23: Prueba de significación de Duncan diámetro ecuatorial del bulbo de cebolla rosada

Tratamientos	Promedio (cm)	Significación 0,05
T ₅ : 10 ⁸ UFC/mL	9,53	a
T ₄ : 10 ⁷ UFC/mL	9,33	a
T ₃ : 10 ⁶ UFC/mL	9,02	a b
T ₂ : 10 ⁵ UFC/mL	8,34	b c
T ₁ : 10 ⁴ UFC/mL	8,22	c
T ₀ : 00 UFC/mL	7,99	c

Fuente: Elaboración propia.

El cuadro N°23 de la prueba de significación de Duncan muestra que existen 3 grupos que estadísticamente son similares en sus promedios, donde destaca el primer lugar el T₅ con 9,53 cm, seguido en el segundo lugar al T₄ con 9,33 cm; en el tercer lugar al T₃ con 9,02 cm siendo estadísticamente similares en sus promedios, cuarto lugar se ubica el T₂ con 8,34 cm; y en quinto lugar al T₁ con 8,22 cm y en el último lugar al T₀ con 7,99 cm siendo similares en sus promedios los tres últimos tratamientos.

F. Diámetro polar del bulbo de cebolla rosada

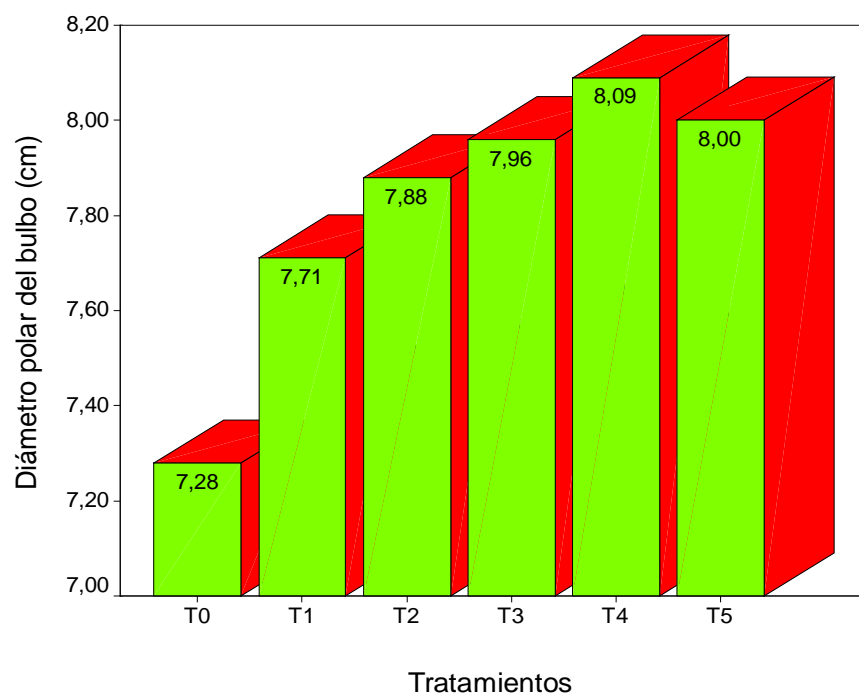
Cuadro Nº 24: Promedios del diámetro polar de cebolla rosada por tratamiento y por bloques obtenidos en la experimentación

Bloques / Tratamientos	I	II	III	IV	Promedio del diámetro polar (cm)
T ₀	7,52	7,32	7,17	7,12	7,28
T ₁	7,87	7,81	7,23	7,92	7,71
T ₂	7,92	8,11	7,51	7,98	7,88
T ₃	7,89	8,02	8,00	7,95	7,96
T ₄	8,11	8,15	7,98	8,15	8,09
T ₅	8,02	8,12	7,93	7,95	8,00
Promedios de Bloques	7,89	7,92	7,64	7,85	7,82

Fuente: Elaboración propia.

Leyenda: T₀: 00 UFC/mL; T₁: 10⁴ UFC/mL; T₂: 10⁵ UFC/mL; T₃: 10⁶ UFC/mL; T₄: 10⁷ UFC/mL; T₅: 10⁸ UFC/mL.

Figura N°08: Promedio de los tratamientos sobre diámetro polar del bulbo de cebolla rosada obtenido a los 90 días en la experimentación.



Fuente: Elaboración propia.

Leyenda: T₀: 00 UFC/mL; T₁: 10⁴ UFC/mL; T₂: 10⁵ UFC/mL; T₃: 10⁶ UFC/mL; T₄: 10⁷ UFC/mL; T₅: 10⁸ UFC/mL.

En el cuadro N°24 y Figura 08 se muestra que el T₄ tiene el mayor promedio de tratamiento con respecto al diámetro polar del bulbo de cebolla con 8,10 cm y el menor tratamiento T₀ con 7,28 cm.

Cuadro N° 25: Análisis de varianza del diámetro polar del bulbo de cebolla rosada

Fuentes de variabilidad	G.L.	S.C	C.M.	F.C.	F	
					0,05	0,01
Bloques	3	0,296	0,098	4,049	3,29	5,42 *
Tratamientos	5	1,748	0,349	14,325	2,90	4,56 **
Error	15	0,366	0,024			
Total	23	2,410				

Fuente: Elaboración propia.

C.V: 1,997 %

El cuadro N°25, muestra que existe significación estadística entre los bloques, también para los tratamientos en donde existen diferencias estadísticas altamente significativas con un nivel de confianza de 99%, es decir que al menos uno de los tratamientos tuvo mayor promedio de diámetro polar; su coeficiente de variabilidad de 1,997 % que es bajo; es aceptable para el ensayo.

Cuadro N°26: Prueba de significación del diámetro polar (cm) del bulbo de la planta de cebolla

Tratamientos	Promedio (cm)	Significación 0,05
T ₄ :10 ⁷ UFC/mL	8,09	a
T ₅ :10 ⁸ UFC/mL	8,01	a
T ₃ : 10 ⁶ UFC/mL	7,97	a
T ₂ :10 ⁵ UFC/mL	7,88	a b
T ₁ :10 ⁴ UFC/mL	7,71	b
T ₀ : 00 UFC/mL	7,28	c

Fuente: Elaboración propia.

En el cuadro N° 26, muestra que existen dos grupos homogéneos, donde se observa en el primer lugar al T₄ con 8,09 cm; en segundo lugar al tratamiento T₅ con 8,01 cm, en tercer lugar al T₃ con 7,97 cm; en cuarto lugar al T₂ con 7,88 cm, siendo estadísticamente similares en sus promedios, en quinto lugar se ubica el T₁ con 7,71 cm; y en el último lugar al T₀ con 7,28 cm, cabe señalar que todos los tratamientos superaron estadísticamente al testigo.

V. DISCUSIONES

La influencia de *A. chroococcum* en la producción y calidad de la cebolla se debe a que esta bacteria es fijadora de nitrógeno; este proceso está catalizado por una enzima compleja denominada nitrogenasa que reduce el gas nitrógeno hasta amonio, el cual es rápidamente convertido en aminoácidos y proteínas. El amonio restante y otros compuestos nitrogenados son eliminados a la rizósfera los cuales son aprovechados por las plantas (FRIONI, 1999). *Azotobacter* habita en la rizósfera y tiene interacción con la planta de la cebolla donde la planta aporta sustancias nutritivas y la bacteria aporta nutrientes a la planta como nitrógeno, fosforo, fitohormonas, vitaminas y sustancias antibacterianas capaces de marginar las bacterias fitopatógenas (TORO Y BAREA, 1977).

El efecto de incremento obtenido por *A. chroococcum* en la producción y calidad de la cebolla corrobora el efecto benéfico y biofertilizante que tiene esta bacteria. (CONDORI, 2003) demostró el efecto de *Azotobacter chroococcum* nativo y comercial "Azotolam" en el desarrollo del cultivo de *Allium cepa* L. (cebolla amarilla dulce) en La Yarada – Tacna. Al concluir que *A. chroococcum* nativo y comercial produjeron respectivamente un incremento del crecimiento y desarrollo de la planta de cebolla de 70,9 y 41,7 %.

MORALES, J. (2005) utilizando concentraciones de *Azotobacter* de 10, 20, 30, 40 y 50%, que fueron inoculados en el cultivo de tomate obtuvo en las plantas inoculadas con *Azotobacter* una masa seca promedio de la planta de 104,9%; de la masa seca de los frutos por planta de 260,53%; de la masa seca de la parte aérea de 110,78%; y de la altura promedio de la planta de 32,13%.

MONTESINOS, W. (2008) utilizando cepas de *A. chroococcum* y niveles crecientes de nitrógenos al inocularlos en las plantas de tomate de la variedad rio grande mejorado encontró que *Azotobacter* tuvo mayor influencia sobre la variable rendimiento, a diferencia de los tratamientos sin aplicación de *Azotobacter* donde obtuvo valores inferiores.

Las concentraciones de *A. chroococcum* que produjeron diferentes valores de producción, altura de la planta, peso del bulbo, diámetro ecuatorial y polar del bulbo de la cebolla es posible puede ser debido a la presencia de dos o mas cepas diferentes dentro de una misma concentración de *A. chroococcum* como inóculo. Zinoveva (1958) y Dibut (1988) demostraron que un cultivo de *A. chroococcum* puede tener individuos con diferentes características morfológicas, culturales, fisiológicas y bioquímicas; lo cual hace que cuando están inoculadas en las plantas producen cambios de la supervivencia en la rizósfera, cambios en la actividad fijadora de nitrógeno y velocidad de crecimiento; por lo tanto cambios en los efectos benéficos sobre la planta por *A. chroococcum*.

Considerando los valores de los mayores efectos (estadísticamente iguales) que se han tenido en la producción y calidad de la cebolla con las concentraciones mas bajas de *A. chroococcum*, nos sugiere que la concentración de 10^7 UFC/mL *A. chroococcum* es la que debe utilizarse cuando se aplique *A. chroococcum* como biofertilizante en una plantación de cebolla. Este valor de concentración de *A. chroococcum* para biofertilizar la cebolla es un valor menor al recomendado en otros trabajos. Paramo (1999) señala que en la producción y aplicación de *A. chroococcum* la concentración de biomasa estándar recomendado para vegetales es del orden de 10^8 y 10^9 unidades formadoras de colonias por mililitro.

VI. CONCLUSIONES

En las condiciones trabajadas se concluye lo siguiente:

1. Las concentraciones de *A. chroococcum* que permitieron obtener estadísticamente la mayor producción de cebolla fueron 10^5 ; 10^6 ; 10^7 y 10^8 UFC/mL.
2. Las concentraciones *A. chroococcum* que permitieron obtener mayor calidad con respecto a la altura y diámetro ecuatorial fue de 10^7 y 10^8 UFC/ml respectivamente. En cuanto al bulbo y diámetro polar las concentraciones fueron 10^6 , 10^7 y 10^8 UFC/ml. En relación al número de hojas se obtuvo mayor número de hojas en las concentraciones 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 UFC/ml.

VII. RECOMENDACIONES

1. Evaluar la dosis de *A. chroococcum* de 10^7 ; 10^8 ; 10^6 ; y 10^5 UFC/mL en otros tipos de suelos para diferentes cultivos de importancia económica de la zona como: Aji Pacae, Escabeche, Ajo y cereales (trigo y cebada).
2. Ampliar los estudios con *A. chroococcum* combinado con fertilizantes orgánicos e inorgánicos para evaluar su efecto en el desarrollo de los cultivos.
3. Realizar trabajos de investigación con *A. chroococcum* coiniculado con *Glomus* sp en el cultivo de cebolla rosada de Ilabaya

VIII. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. ALTIERI M. 1997. Bases científicas para una agricultura sostenible. Secretariado Perú – Bolivia. Edic. CIED. Lima - Perú. 152 pp.
2. BACILIO-JIMÉNEZ, F. J. 2001. Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. *Soil Biology and Biochemistry*. 33(2):167-172.
3. BROCK T., MADIGAN M., Microbiología, 1996 pág. 796-815. Ed. Prentice Hill.
4. BROWN, D.A. Y SCOTT, HD (1984) CAP6 Dependence of crop growth and yield on root development and activity ASA special publication 101 – 135 pp
Roots, Nutrient water influx and plant growth
5. CASTILLO, H. 1999. Aspectos ecofisiológicos del cultivo de cebolla. In: Tapia, M.eds. Cultivo de la Cebolla. Santiago, Universidad de Chile pp 19-24.

6. CONDORI, D. 2003; "Efecto de *Azotobacter chroococcum* nativo y del *azotobacter chroococcum* comercial Azotolam en el desarrollo del cultivo de *Allium cepa* L. (cebolla amarilla dulce) en la Yarada – Tacna, Tesis Biólogo – Microbiólogo, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna – Perú.
7. FRIONI, Lillian. 1999. Procesos microbianos. Primera edición. Editorial: Plant and Soil. fundación Universidad Nacional de Río Cuarto. Argentina.
8. FUENTES, J., 1999. Manual Práctico de Manejo del Suelo y de los Fertilizantes, Ediciones MUNDI-PRENSA, Madrid – España.
9. FINTRAC, 2001. Manual del cultivo de cebolla, Ediciones AGRO-IDEA, El Salvador. 27 pp.
10. IDEMA. 2000. Los fertilizantes biológicos nitrogenados. Instituto de Defensa del Medio Ambiente. Arequipa – Perú. 35 pp.
11. INCAGRO, 2008. Sub proyecto de servicios de extensión- FTA. Pp 25.
12. GONZÁLEZ, J. Y LLUCH, CARMEN. 1992. biología del Nitrógeno. Interacción Planta-Microorganismo. Ed. Rueda. Madrid. España 69 pp.

13. GUERRERO A. (2000) el suelo, los abonos y la fertilización de los cultivo ediciones MUNDI PRENSA 206 pp.

14. GUTIÉRREZ, A. DREYER, B. TORRENTE, P. Y HONRUBIA, M. Biofertilizantes de última generación Biofertilizantes de última generación Asunción Morte, Dpto. Biología Vegetal (Botánica), Facultad de Biología, Universidad de Murcia.

15. LATINOAMERICANA DE RHIZOBIOLOGÍA. 1994 La Habana. Cuba. 30 pp.

16. JIMÉNEZ. 2007. Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de *Azotobacter* spp. mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal 16S.

17. MARTÍNEZ R., DIBUT B. 2002. Biofertilización y producción agrícola sostenible. Retos y perspectivas. *In*: XIII Congreso Científico del INCA. Programa y Resúmenes. La Habana. 126 pp.

18. MARTÍNEZ-VIERA, (2000) R. Efecto económico de la aplicación de biofertilizantes a base de *Azotobacter* en la Agricultura Cubana. En: XVII Reunión

19. MAROTO, J. 1989. Horticultura Herbácea Especies. Edit. Mundi-prensa, España. 236 pp.
20. MARTINS, M. B., CASTRO, 1997 A. P. R. de. Morphological and anatomical aspects of fruits of tomato "Angela Gigante"; Submitted to treatments with plant growth regulators. *Bragantia*, Campinas. 56(2): 225-236,
21. MCSPADDEN GARDENER, B., AND F. J. DE BRUIJN. 1998. FT-ARDRA of soil and rhizosphere bacterial communities. *Phytopathology* 88:S61.
22. MINAG (2009) MINISTERIO DE AGRICULTURA
23. MONTESINOS, W. (2008) Efecto de la inoculación de *Azotobacter chroococcum* en el rendimiento del cultivo de tomate (*Lycopersicon sculentum*) Tesis Ing. Agrónomo UNJBG – Tacna 110 pp
24. MUÑOZ M. PECIÑA A. CEJUDO F. & PENEQUE A. 1996. a sensor protein involved in induction of nitrate assimilation in *Azotobacter chroococcum*, *febs letter*. Vol 393. Pp 7-12

25. PEÑA, S. E, DE LA Y TORRES, E.1992 La biofertilización: alternativa para el desarrollo rural. Lima: Red de Acción en Alternativas al Uso de Agroquímicos 145 pp.
26. RAAA.1999. Manejo ecológico de suelos. Conceptos experiencias y técnica. Red de acción en alternativas al uso de agroquímicos Lima – Perú 56 pp.
27. RIOJA, M (2002) , APUNTES DE FITOTECNIA GENERAL
28. ROMAN, L. y GUTIERREZ, M. 1998. Evaluación de ácidos carboxílicos y nitrato de calcio para incrementar calidad, cantidad y vida de anaquel en tres tipos de melón, (online),
29. STEEL, D. 1986. Bioestadística Principios y Procedimientos 2da. Edic. Edit. McGraw Hill. EEUU. 454 pp.
30. STEINBERGA, V. 1996 The effect of *Azotobacter in* on the crop yield and biological activity of soil. In: Proceedings of Second European Nitrogen Fixation Conference Poznan, p. 191.

31. SABRA W., ZENG A. & DECK WER W. 2001. Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Applied microbiology biotechnology*. Vol 56. Pp 315-325

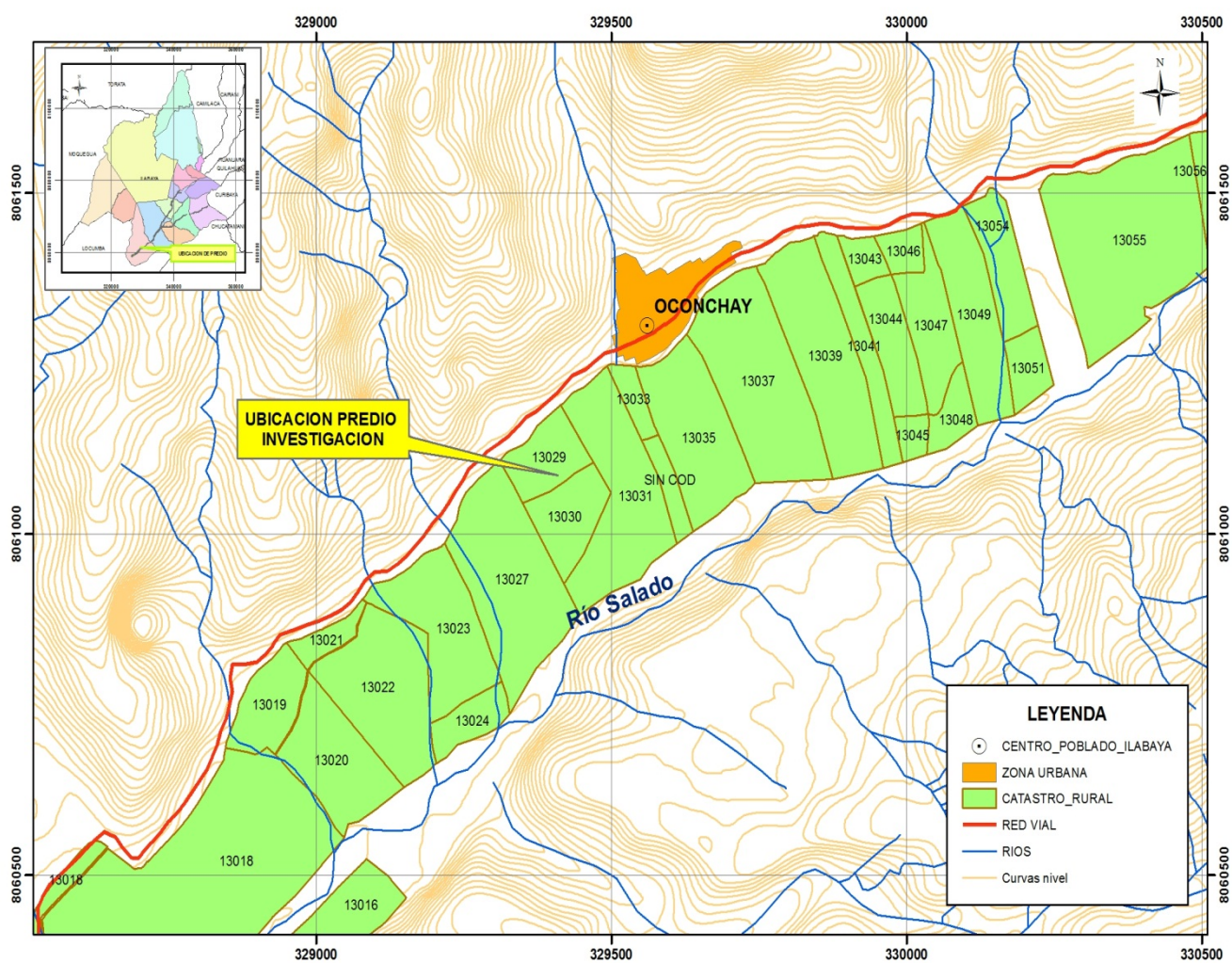
32. SARIBAY G. 2003. GROWTH and nitrogen fixation dynamics of *Azotobacter chroococcum*, nitrogen-free and own containing medium. Tesis de maestría en ciencias aplicadas departamento de ingeniería de alimentos. The Middle East. Technical university. Turkia. Pp 1-45.

33. TCHAN Y. 1984. Family II *AZOTOBACTERACEAE*. Pribram 1933. In: Krieg. N. holt, J. (Eds), *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*, volume. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, Md. Pp. 219-220.

34. TORO, M. R. AZCÓN, AND J.M. BAREA 1997. Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing Rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (32P) and nutrient cycling .*Appl. Environ. Microbiol.*, 63 : 4408–4412.

ANEXOS

ANEXO 01: Mapa de Localización de Zona, Estación de Muestreo en el Distrito de Locumba



Fuente: Elaboración propia

ANEXO 02

Características del área experimental

Largo	: 50 m
Ancho	: 2 m
Área total	: 400 m ²

▪ Característica del bloque

Largo	: 12,5 m
Ancho	: 2 m
Área total	: 25 m ²

▪ Características de la unidad experimental:

Largo	: 2,5 m
Ancho	: 2 m
Área total	: 5 m ²
Separación entre plantas	: 0,10 m
Separación entre líneas	: 1,5 m
Número de plantas	: 83

ANEXO N° 03: Tabla de la Técnica del Número Más Probable

Combinaciones de tubos positivos			NMP/g
0,1	0,01	0,001	
0	0	0	<3
0	0	1	3
0	1	0	3
0	2	0	6
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	1	1	11
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
2	2	1	28
2	3	0	29
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1100
3	3	3	2400

Fuente: Tabla obtenida del ICMSF, 2000.

ANEXO N° 04

Componentes del medio Ashby sólido (g/L)

- Glucosa	10
- Manitol	10
- KH_2PO_4	1,0
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,36
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
- CaCl_2	0,13
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
- $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,001
- $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0025
- NaCl	0,2
- CaCO_3	5
- Agar agar	20
- Agua destilada	1000ml

Se esteriliza en autoclave 121 °C a 15 lb. de presión durante 15 minutos al final se ajusta a pH 6,8 – 7,2

ANEXO N° 05

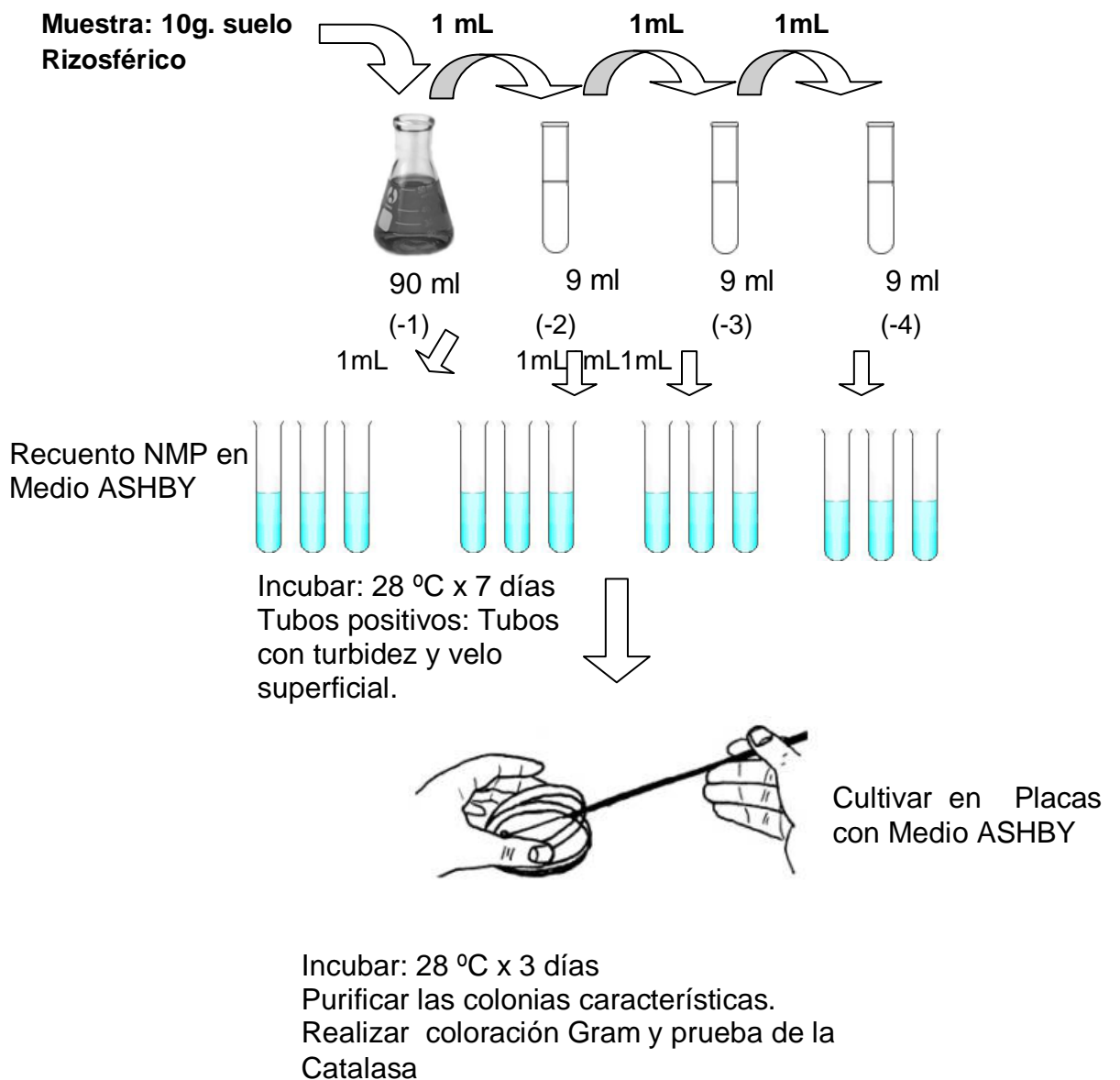
Componentes del medio liquido LG (g/L)

- Sacarosa (azúcar rubia)	20
- Manitol	1,0
- K ₂ HPO ₄	0,05
- KH ₂ PO ₄	0,15
- CaCl ₂	0,01
- MgSO ₄ .7H ₂ O	0.20
- NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,002
- FeCl ₃	0,01
- Azul de bromotimol	2,0 ml
- CaCO ₃	1,00
- Glucosa	1,00
- NaCl	1,00
- Agua destilada	1000 ml
- pH	7,0 – 7,3 (color verde – azul)

Nota: para la siembra en medio sólido se usa este mismo medio añadiendo 20 g de agar – agar.

ANEXO N° 06

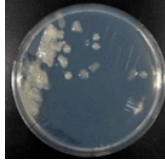
Protocolo de Aislamiento y Recuento de *Azotobacter* sp.



ANEXO N° 07

Producción de inoculante de *Azotobacter chroococcum*

Cultivo puro de
Azotobacter
chroococcum

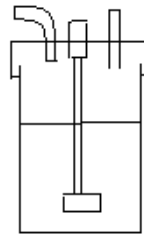


Se suspenden
las colonias



100 ml de medio
LG hasta
 10^7 UFC/mL

Agregar el
inóculo en el
biorreactor:



900 ml de
medio LG

Incubar a 28 °C por 24
horas con aireación



Diluir el cultivo a las
concentraciones: 10^4 , 10^5 , 10^6 ,
 10^7 y 10^8 UFC/mL

TRATAMIENTOS



T 0
Sin inoculante



T 1
 10^4 UFC/mL



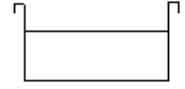
T 2
 10^5 UFC/mL



T 3
 10^6 UFC/mL



T 4
 10^7 UFC/mL



T 5
 10^8 UFC/mL

ANEXO N° 08

Fotografía del lugar de muestreo



A) Campo de cultivo de plantas de *Allium cepa* L. en Oconchay del Valle de Locumba.

B) Unidad muestral de suelo del cultivo de *Allium cepa* L.

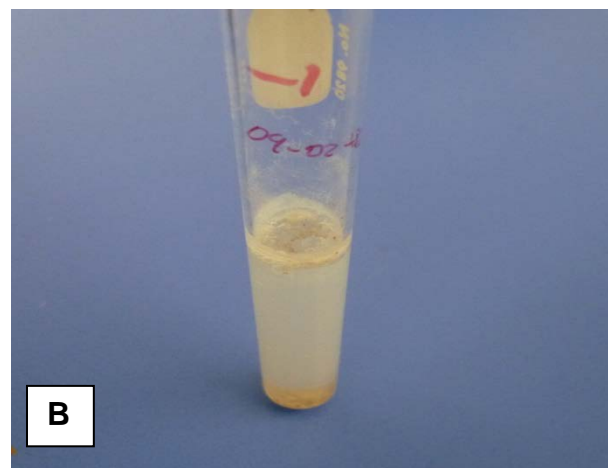
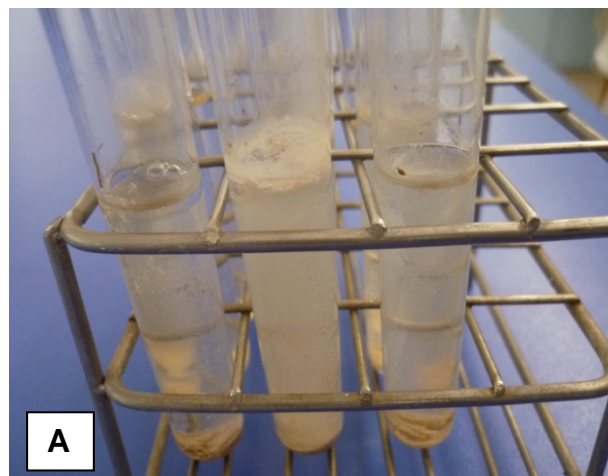
ANEXO N° 09



- A)** Medición del área experimental en el sector de Oconchay del Valle de Locumba
- B)** Colocación de carteles del área experimental en el sector de Oconchay del Valle de Locumba.

ANEXO N° 10

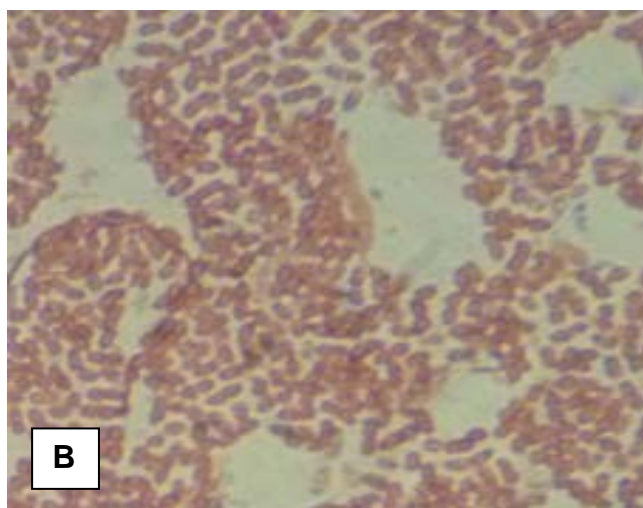
Fotografía de siembra de los tubos positivos del recuento de bacterias
Azotobacter sp.



- A) Lectura del recuento de bacterias *Azotobacter* sp mediante la técnica del NMP
- B) Tubo positivo del NMP con presencia de Turbidez, cambio de color a amarillo y presencia de velo superficial.

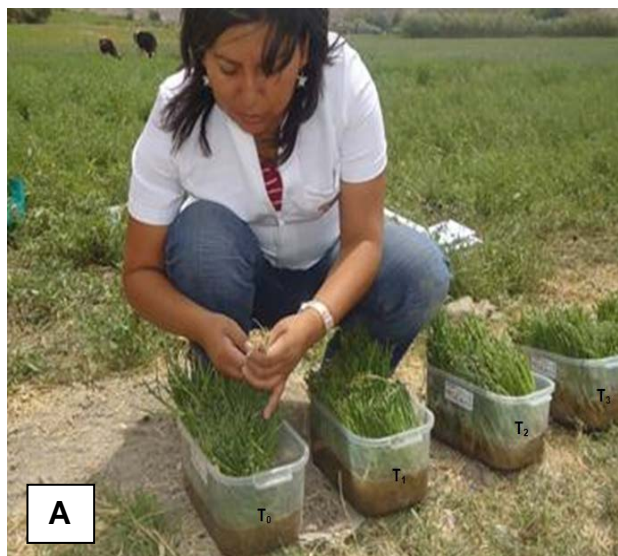
ANEXO N° 11

Fotografía de las colonias y células de *A. chroococcum*



- A)** Foto de las colonias pardo amarillentas de *Azotobacter chroococcum* en Medio Ashby después de 72 horas.
- B)** Bacilos Gram variables alargados y ovoides dispuestos en pares o solitarios.

ANEXO N° 11



- A)** Inoculación de *A. chroococcum* en plantines de cebolla (*Allium cepa* L.) antes de su plantación en campo.
- B)** Plantación de los plantines de cebolla (*Allium cepa* L.) en campo.



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE AGRONOMIA
LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES



ANALISIS DE SUELO

SOLICITANTE : AGROTECVER E.I.R.L.

PROCEDENCIA : TACNA/ JORGE BASADRE/ LOCUMBA – SECTOR OCONCHAY

REFERENCIA : H.R. 37789

No. Laboratorio	3994
No. Campo	Muestra 1 Suelo Locumba
pH	7.70
CE (1:1)	dS/m 2.44
CaCo ₃	(%) 1.70
M. O.)	(%) 1.70
P	(ppm) 5.40
K	(ppm) 688.00
Arena	54.00
Limo	(%) 32.00
Arcilla	(%) 14.00
Clase	Franco
CIC	12.00
Ca ⁺²	7.44
mg+2	2.22
K ^r	1.25
Na ⁺	1.09
Suma de	12.00
Suma de	12.00
% de Sat.	100.00

La Molina, 30 de Agosto del 2011



Ing. Erick La Torre Martínez
Jefe del Laboratorio

Av. La Universidad s/n. La Molina. Campus UNALM
Telfs.: 349 5669 349 5647 Anexo: 222 Telefax: 349 5622
[e-mail: labsuelo@lamolina.edu.pe](mailto:labsuelo@lamolina.edu.pe)