

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Biología – Microbiología

Incremento en el rendimiento del cultivo de Orégano (*Origanum vulgare* L.) variedad nigra, fertilizada con cepas nativas de *Azospirillum* sp. y *Azotobacter* sp., bajo condiciones de invernadero

TESIS

Presentada por:

Bach. FERNANDA VANESSA PÉREZ GARCÍA

Para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO – MICROBIÓLOGO

TACNA – PERÚ

2016

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN, TACNA

FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS N° 279

TÍTULO PROFESIONAL DE:

BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

El secretario Académico Administrativo de la Facultad de Ciencias, certifica que por resolución de Facultad **N°8512-2016-FACI-UNJBG**, el Consejo de Facultad ha designado como jurados para la sustentación de la tesis: **Incremento en el rendimiento del cultivo de Orégano (*Origanum vulgare* L.) variedad negra, fertilizada con cepas nativas de *Azospirillum* sp. y *Azotobacter* sp., bajo condiciones de invernadero.**

El mismo que está conformado por:

PRESIDENTE : DRA. ISABEL ANCCO OLIVA

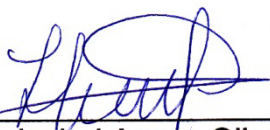
SECRETARIO : DR. CÉSAR JULIO CÁCEDA QUIROZ

VOCAL : MSc. ANGELA CHOQUE MIRANDA

Para examinar y calificar la sustentación de tesis en acto público el día 12 de julio del 2016 a las 16:00 horas. Presentada por la Bachiller: **FERNANDA VANESSA PÉREZ GARCÍA**, de la Escuela Profesional de Biología – Microbiología.

Los miembros del Jurado Calificador, en forma individual y secreta emitieron su calificación sobre la tesis expuesta y procedió a emitir el siguiente resultado: **APROBADO** por **UNANIMIDAD**, con el calificativo de **BUENO** y promedio de 15.


Para ratificar lo detallado firman:



Dra. Isabel Ancco Oliva
Presidente



Dr. César Julio Cáceda Quiroz
Secretario



MSc. Angela Choque Miranda
Vocal

DEDICATORIA

A **Dios** por darme vida y salud,
a **mis padres**, por todo su amor, su
esfuerzo constante durante mi carrera y su
comprensión; a **mis hermanos y cuñada**
por su apoyo incondicional y único; y por
creer en mí en cada momento en esta gran
etapa de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor Mgr. Daladier Castillo Cotrina, por su asesoramiento en el desarrollo de mi tesis.

A los profesionales del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias por el apoyo y la orientación brindada.

A mis profesores de la Facultad de Ciencias de la Escuela de Biología – Microbiología, por sus enseñanzas que contribuyeron en la formación de mi carrera profesional.

A mis hermanos, a mi cuñada y a mis abuelitos que me apoyaron y creyeron en mí, día a día.

A mis grandes amigos, que siempre tuvieron palabras de motivación y su apoyo para la culminación de mi tesis.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos	4
1.1.1. Objetivo general	4
1.1.2. Objetivos específicos	4
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Impactos ambientales en agricultura	5
2.2. La agricultura en el Perú	8
A. Alteraciones y erosión del suelo	10
B. Pérdida de fertilidad del suelo	11
2.3. Cultivo de orégano	12
2.3.1. Características botánicas	18
2.3.2. Taxonomía	20
2.3.3. Suelo y clima	20
2.3.4. Propagación del orégano	21
2.3.5. Plagas y enfermedades	22
2.3.6. Cosecha	30
2.3.7. Post cosecha	32
2.4. Microorganismos promotores de crecimiento vegetal	33
2.4.1. Beneficios que ofrecen los microorganismos utilizados como biofertilizantes	34
2.5. Biofertilizantes	35
2.6. Fijación biológica de nitrógeno (FBN)	39
2.7. Relación planta – bacteria	45

2.8.	Género <i>Azotobacter</i>	47
2.9.	Género <i>Azospirillum</i>	52
2.10.	Enunciado del problema científico	55
2.11.	Definición y delimitación del problema	56
2.12.	Justificación del problema	67
2.13.	Hipótesis	70
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	71
3.1.	Lugar de experimentación	71
3.2.	Fase en laboratorio	71
3.2.1	Material biológico	71
3.2.2.	Recolección de muestras	72
3.2.3.	Aislamiento	73
3.2.4.	Identificación	76
3.2.5.	Producción de biomasa	77
3.2.6.	Preparación del inóculo	78
3.3.	Fase de invernadero	79
3.3.1.	Material biológico	79
3.3.2.	Recolección de material vegetal y primera inoculación	79
3.3.3.	Preparación del sustrato	80
3.3.4.	Selección, trasplante y segunda inoculación	81
3.3.5.	Riego	81
3.3.6.	Prevención de plagas	82
3.3.7.	Cosecha	82
3.4.	Diseño de investigación	82
3.5.	Diseño de experimentación	82
3.6.	Criterios de evaluación	84

IV. RESULTADOS	86
V. DISCUSIÓN	108
VI. CONCLUSIONES	119
VII. RECOMENDACIONES	121
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
IX. ANEXOS	136

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1 Producción de orégano a nivel nacional y de Tacna (2001 – 2012)	14
Cuadro 2 Serie histórica del orégano en la región de Tacna	15
Cuadro 3 Orégano a nivel regional y por provincias	16
Cuadro 4 Resumen del cultivo de orégano en Tacna – 2011	17
Cuadro 5 Altura de la planta a los 90 días	86
Cuadro 6 Altura de la planta a los 180 días	87
Cuadro 7 Peso fresco de hojas a los 90 días	87
Cuadro 8 Peso fresco de hojas a los 180 días	88
Cuadro 9 Peso seco de hojas a los 90 días	88
Cuadro 10 Peso seco de hojas a los 180 días	89
Cuadro 11 Volumen de raíz a los 180 días	89
Cuadro 12 Análisis de varianza – Altura de la planta a los 90 días	90
Cuadro 13 Prueba de Significación de Duncan – Altura de la planta a los 90 días	91
Cuadro 14 Análisis de varianza – Altura de la planta a los 180 días	92
Cuadro 15 Prueba de Significación de Duncan – Altura de la planta a los 180 días	93

Cuadro 16	Análisis de varianza – Peso fresco de hojas a los 90 días	95
Cuadro 17	Prueba de Significación de Duncan – Peso fresco de hojas a los 90 días	96
Cuadro 18	Análisis de varianza – Peso fresco de hojas a los 180 días	97
Cuadro 19	Prueba de Significación de Duncan – Peso fresco de hojas a los 180 días	98
Cuadro 20	Análisis de varianza – Peso seco de hojas a los 90 días	100
Cuadro 21	Prueba de Significación de Duncan – Peso seco de hojas a los 90 días	101
Cuadro 22	Análisis de varianza – Peso seco de hojas a los 180 días	102
Cuadro 23	Prueba de Significación de Duncan – Peso seco de hojas a los 180 días	103
Cuadro 24	Análisis de varianza – Volumen de raíz de la planta a los 180 días	105
Cuadro 25	Prueba de Significación de Duncan – Volumen de raíz de la planta a los 180 días	106

ÍNDICE DE GRÁFICOS

		Pág.
Gráfico 1	Producción de orégano nacional y de Tacna (2001 – 2012)	13
Gráfico 2	Porcentaje de participación en la producción de orégano por provincias	16
Gráfico 3	Cultivo de orégano – Superficie de orégano en hectáreas	18
Gráfico 4	Superficie cultivada con orégano según regiones	68
Gráfico 5	Mapa de la región de Tacna	72
Gráfico 6	Prueba de Significación de Duncan – Altura de la planta a los 90 días	91
Gráfico 7	Prueba de Significación de Duncan – Altura de la planta a los 180 días	94
Gráfico 8	Prueba de Significación de Duncan – Peso fresco de hojas a los 90 días	96
Gráfico 9	Prueba de Significación de Duncan – Peso fresco de hojas a los 180 días	99
Gráfico 10	Prueba de Significación de Duncan – Peso seco de hojas a los 90 días	101
Gráfico 11	Prueba de Significación de Duncan – Peso seco de hojas a los 180 días	104
Gráfico 12	Prueba de Significación de Duncan – Volumen de raíz a los 180 días	106

RESUMEN

El objetivo principal de la presente investigación fue incrementar el rendimiento del cultivo de orégano (*Origanum vulgare* L.) variedad nigra fertilizándolo con cepas nativas de *Azospirillum* sp. y *Azotobacter* sp.; bajo condiciones de invernadero; llevadas a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la UNJBG, donde las muestras fueron recolectadas del Distrito de La Yarada – Los Palos. El experimento se condujo bajo el diseño de bloques completamente aleatorio; se establecieron 3 bloques y 4 tratamientos en donde cada tratamiento estuvo conformado por 30 unidades experimentales, haciendo un total de 120 plantas en todo el experimento. Las evaluaciones fueron realizadas a los 90 y 180 días. Los parámetros evaluados fueron altura de la planta, peso fresco de hojas, peso seco de hojas y volumen de la raíz. Para las comparaciones de los tratamientos se empleó la Prueba de Duncan al 5 % de probabilidad, en donde se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. El tratamiento T₃ (*Azotobacter* sp. + *Azospirillum* sp.), presentó el mejor resultado con un incremento del 12 % del rendimiento del peso seco de hojas de orégano con 475,40 kg/ha comparándolo con el testigo sin inocular T₀ (377,13 kg/ha).

I. INTRODUCCIÓN

La agricultura viene jugando un papel importante a nivel mundial presentando una gran evolución con la aplicación creciente de fertilizantes químicos, lo que se reflejó en un incremento ininterrumpido de los rendimientos agrícolas. A través de los años, para mantener ese potencial productivo, los cultivos requerían de una aplicación masiva de diversos insumos químicos, lo que empezó a generar, junto con su efecto positivo, una serie de condiciones y factores negativos en los agroecosistemas actuales, por lo que en muchos suelos agrícolas se observaron acumulaciones importantes de nitratos, nitritos, pesticidas y otras combinaciones ecológicamente dañinas (**Bach & Díaz, 2009; Fornasero et al., 2001**).

Una de las principales causas de que no se hayan detenido a tiempo los procesos negativos en la agricultura, fue el desconocimiento de las implicaciones en el uso excesivo de los insumos y al poco estudio de su efecto sobre la microflora del suelo y sobre los procesos biológicos que condicionan la fertilidad de los mismos (**Acuña et al., 2006**).

Por tal motivo, es que se quiere implementar el uso de los microorganismos benéficos del suelo que pueden promover el crecimiento de las plantas y también evitar la infección del tejido vegetal por patógenos, estas son las denominadas Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal.

Estos microorganismos viven en la zona rizosférica de las plantas y utilizan como nutrientes las sustancias contenidas en las secreciones de las raíces, suministrando a estas el nitrógeno que fijan. Al mismo tiempo, sintetizan aminoácidos, citoquininas, auxinas, giberelinas, ácidos orgánicos y péptidos, entre otras sustancias, las cuales actúan como estimuladores del crecimiento vegetal **(Dibut et al., 2009)**.

Por todas estas razones, actualmente se está empleando lo que se denomina “Biofertilización o Fertilización Microbiana”; que es una alternativa que se ajusta a los parámetros en la disminución del uso de fertilizantes químicos. Ya que el uso de estas va a permitir mejorar o reducir las diversas formas de fertilización química al suelo, e incluso los pesticidas químicos; para que el suelo, la planta y el agricultor se beneficien **(Rubio et al., 2003)**.

Una biofertilización correcta es compatible a una fertilización tradicional, y ayuda reduciendo el uso de energía de la planta a la hora de absorber los distintos nutrientes, disminuye la degradación del agroecosistema y reduce la pérdida de nutrientes del suelo por lixiviados, sobre todo de nitrógeno. Por esta razón día a día, el uso de biofertilizantes, en sustitución de fertilizantes químicos, cobra mayor importancia, por lo que garantiza que al menos uno de los eslabones de la producción de vegetales es de carácter natural (**Jiménez et al., 2001**).

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo general

- ✓ Incrementar el rendimiento del cultivo de orégano (*Origanum vulgare* L.) variedad nigra fertilizándolo con cepas nativas de *Azospirillum* sp. y *Azotobacter* sp., bajo condiciones de invernadero.

1.1.2. Objetivos específicos

- ✓ Aislar e identificar cepas nativas del género *Azospirillum* sp. y *Azotobacter* sp. a partir de *Origanum vulgare* L. (orégano).
- ✓ Evaluar el rendimiento del cultivo orégano (*Origanum vulgare* L.) variedad nigra, después de inocularlas con cepas de *Azospirillum* sp. y *Azotobacter* sp.
- ✓ Determinar con qué cepa nativa microbiana se obtiene el mejor rendimiento del cultivo de orégano.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Impactos ambientales en agricultura

Hasta mediados del siglo pasado, la producción agrícola se practicaba de una forma natural, se utilizaban productos y técnicas que prácticamente no se habían modificado en muchos siglos. Con la evolución de la agricultura que tuvo lugar a mediados del siglo XX se pudo incrementar de forma muy significativa la producción de alimentos. Una gran innovación fue la aparición de los primeros fertilizantes químicos en los años cuarenta. Los agricultores fueron testigo de que al aplicarlos en el campo los resultados de producción que se obtenían eran espectaculares, puesto que las plantas respondían intensamente al estímulo químico. Si se aplicaban fertilizantes con nitratos, los rendimientos de las explotaciones se veían notablemente incrementados. La adición sistemática de abonos químicos con el consiguiente aumento de la producción, ha derivado en que hoy en día, para obtener los mismos resultados que los conseguidos décadas atrás sea necesario incrementar la dosis de abono de 20 unidades fertilizantes a 240 unidades. Con la aplicación de los abonos, no

solo aumentó la cosecha en los cultivos, las malas hierbas comenzaron a desarrollarse al mismo tiempo y fue entonces cuando se introdujeron los herbicidas en el mercado. Posteriormente, comenzaron a fabricarse los diferentes tipos de fitosanitarios necesarios para paliar los ataques de hongos e insectos **(Chávarri et al., 2004)**.

Antiguamente no se contemplaba la existencia de plagas ya que los enemigos naturales de determinados insectos controlaban la población al actuar como sus depredadores. Quedaba establecido de este modo un equilibrio en el micro-ecosistema de la explotación, y por lo tanto los microorganismos que habitaban en el cultivo no influían negativamente en el mismo **(Chávarri et al., 2004)**.

Al pasar de una agricultura extensiva a una intensiva, los enemigos naturales perdieron esa capacidad de control y fue entonces cuando surgieron las plagas con capacidad de atacar a los cultivos. Gracias a los productos químicos fitosanitarios que se fabricaron, se consiguieron controlar las plagas y enfermedades surgidas. Estos productos que fueron inicialmente muy bien

acogidos en un principio por las ventajas que ofrecían a los agricultores frente al control de los agentes patógenos, generaron a su vez notables inconvenientes **(Chávarri et al., 2004)**.

Entre los que destacan los siguientes:

- Se eliminaron indistintamente plagas e insectos beneficiosos.
- Se crearon resistencias en las plagas a los químicos empleados.
- Se contaminaron suelos y ríos.
- Se propició la desaparición de fauna y flora por el uso de herbicidas residuales.
- Se localizaron niveles de polución química y salinización muy preocupantes.

A pesar de conocer el daño que provocan en el entorno estos productos, es difícil llegar a establecer el impacto real que provoca la agricultura sobre el medio ambiente **(Chávarri et al., 2004)**.

Todos estos efectos negativos que se ocasionan sobre el medio ambiente, están llevando a los países desarrollados a cambiar la

imagen del agricultor, que de ser considerado como un productor exclusivamente de alimentos, está pasando a ser visto como un gestor del medio ambiente **(Chávarri et al., 2004)**.

2.2. La agricultura en el Perú

El Perú es uno de los doce países considerados como megadiversos y se estima que posee entre 60 y 70 % de la diversidad biológica. Esta ventajosa situación se ha visto amenazada con un inadecuado manejo de recursos existentes llevándolo a niveles críticos de deterioro de ciertas zonas del país generando problemas de desertificación, deforestación, salinización, pérdida de tierras agrícolas, toxicidad de la vegetación, agotamiento de las fuentes de agua, degradación de ecosistemas y desaparición de especies silvestres **(MINAGRI, 2015)**.

La situación de pobreza de la mayor parte de campesinos y pequeños productores agropecuarios se explican en parte por la utilización inadecuada y degradación de la base productiva de los recursos naturales debido a la aplicación de sistemas productivos

que generan desequilibrios negativos entre el proceso de extracción y regeneración de los recursos naturales **(MINAGRI, 2015)**.

Hoy se trata de aplicar una agricultura sustentable caracterizada por su inocuidad medioambiental y la preservación de los recursos naturales, la utilización de recursos renovables locales y tecnologías apropiadas y económicas, con una mínima compra de insumos externos y, consiguientemente, un alto grado de autosuficiencia local. Esto ha creado una necesidad de nuevas tecnologías ecológicas que mejoren la productividad agrícola y al mismo tiempo sean seguras para el entorno y la salud humana **(Naredo, 1991)**.

Una alternativa de manejo para mejorar el estado nutricional de los suelos es el uso de biofertilizantes, lo cual en los sistemas productivos es una alternativa viable y sumamente importante para lograr un desarrollo agrícola ecológicamente sostenible, ya que permite una producción a bajo costo, no contamina el ambiente y mantiene la conservación del suelo desde el punto de vista de fertilidad y biodiversidad **(Naredo, 1991)**.

A. Alteraciones y erosión del suelo

El suelo es el elemento principal para la producción agrícola, tiene la capacidad de proporcionar agua y nutrientes a los cultivos, además actúa de soporte físico de la agricultura, recibe sus residuos y ejerce de filtro depurador para proteger de la contaminación especialmente a las aguas subterráneas y a la cadena alimentaria. Este elemento es necesario para la existencia de la vida, interviene en el ciclo del agua y en los ciclos del carbono, nitrógeno y fósforo, y al mismo tiempo, en él tienen lugar gran parte de las transformaciones de la energía y de la materia de los ecosistemas **(FAO & IFA, 2002)**.

Debido a que su regeneración es muy lenta, el suelo debe considerarse como un recurso no renovable y cada vez más escaso, puesto que está sometido a constantes procesos de degradación y destrucción **(FAO & IFA, 2002)**.

El manejo tradicional de estos ecosistemas ha involucrado la fertilización química con fuentes solubles, el uso de maquinaria para acondicionamiento del suelo y el establecimiento de

monocultivos, ha llevado a un desgaste y erosión de los suelos **(FAO & IFA, 2002)**.

La agricultura es una de las causas de erosión del suelo, está convirtiéndose en un grave problema que a su vez se irá incrementando si no se toman las medidas necesarias para cuidarla con el fin de mejorar, conservar y hacer un uso sostenible del mismo **(FAO & IFA, 2002)**.

B. Pérdida de fertilidad del suelo

La pérdida de fertilidad natural se ha visto compensada durante muchos años por el uso creciente de abonos químicos. Estos fertilizantes artificiales a pesar de que reemplazan el nitrógeno, fósforo, potasio y demás elementos nutritivos extraídos del terreno, no son un sustituto perfecto que garantice la buena salubridad del terreno debido a que no aportan materia orgánica, microorganismos, insectos, agua y nutrientes secundarios, elementos extremadamente necesarios para el correcto desarrollo de la explotación **(Pérez & Landeros, 2009)**.

Hay que tener muy en cuenta que los microorganismos son esenciales para mantener la salud de los suelos. La comunidad microbiana es reducida con respecto al conjunto de la materia orgánica presente en el suelo, pero la mayor parte de las transformaciones que sufre la misma es llevada a cabo por estos microorganismos. Por lo tanto, es esencial para el buen desarrollo de los cultivos que exista una correcta biodiversidad de estos organismos **(Chávarri, 2004; Pérez & Landeros, 2009)**.

2.3. El cultivo de orégano

El orégano es una de las riquezas florísticas con las que cuenta el territorio tacneño altoandino; se conoce su utilización desde tiempos ancestrales como planta medicinal y como condimento en las comidas, debido a que poseen un fuerte aroma y rico sabor.

El orégano está dentro de las hierbas aromáticas y medicinales de gran interés en cuanto a su aprovechamiento en la industria farmacéutica, cosmética, perfumera y alimentaria, y son una alternativa a los cultivos tradicionales, con especies de gran demanda en el mercado actual a nivel mundial.

En el Perú; la región con mayor superficie cultivada es Tacna con 1 528 ha, seguido por Moquegua con 666 ha y Arequipa con 660 ha y el resto del país con 92 ha; siendo la zona sur la de mayor potencial productivo.



FUENTE: INEI, 2012

Gráfico 1. Producción de orégano nacional y de Tacna (2001 – 2012)

Tacna es la región más importante en la producción de orégano a nivel nacional y la existencia de ese cultivo representa para los pequeños productores un rubro importante de sus ingresos, especialmente de los productores de la provincia de Tarata y Candarave; la producción de orégano desde el año 2001 hasta el año 2012 ha tenido un notable crecimiento, ya que en el año 2001

mostraba una producción de 3 964 toneladas, y en el 2012 se ha producido 5 443 toneladas (ver cuadro 1) en 1 528 ha de cosecha, el incremento posiblemente se deba a la mayor demanda de orégano en el mercado mundial.

Cuadro 1. Producción de orégano a nivel nacional y de Tacna (2001 – 2012)

COMPARATIVO DE PRODUCCIÓN (t)		
AÑOS	PRODUCCIÓN NACIONAL	PRODUCCIÓN DE TACNA
2001	5 312	3 964
2002	4 857	4 222
2003	4 502	4 136
2004	4 907	4 206
2005	5 491	4 560
2006	5 910	4 589
2007	6 984	4 748
2008	9 122	5 223
2009	10 427	5 674
2010	10 655	5 534
2011	11 341	5 508
2012	10 544	5 443

FUENTE: INEI, 2012

Cuadro 2. Serie histórica del orégano en la región de Tacna

AÑOS	PRODUCCIÓN (t)	SUPERFICIE COSECHADA (ha)	RENDIMIENTO (kg/ha)	PRECIO EN CHACRA (S/./kg)
2001	3 964	1 011	3 921	3,09
2002	4 222	1 078	3 917	2,46
2003	4 136	1 074	3 851	1,77
2004	4 206	1 067	3 942	4,33
2005	4 560	1 091	4 180	4,96
2006	4 589	1 093	4 200	5,05
2007	4 748	1 145	4 147	5,13
2008	5 223	1 281	4 090	5,53
2009	5 674	1 302	4 358	4,99
2010	5 534	1 305	4 241	4,87
2011	5 508	1 355	4 065	5,52
2012	5 443	1 528	3 562	6,08

FUENTE: INEI, 2012

En los últimos años agricultores e inversionistas están instalando plantaciones de orégano en La Yarada y Proter en Sama que es costa, a una altitud menor de los 300 msnm, con miras a la obtención de esencia de orégano, sus rendimientos son superiores en 2 a 4 veces a la producción que se obtiene en la sierra.

El rendimiento de orégano a nivel regional en el año 2012 fue de 3 562 kg/ha, siendo la provincia de Candarave que tiene un mayor rendimiento de 4 061 kg/ha.

Cuadro 3. Orégano a nivel regional y por provincias

	COSECHA (ha)	RENDIMIENTO (kg/ha)	PRODUCCIÓN (t)	CHACRA (S/. /kg)
Regional	1 528	3 562	5 443	6,08
Tarata	249	3 847	958	6,27
Jorge Basadre	470	2 876	1 352	5,63
Candarave	709	4 061	2 879	6,31
Tacna	100	2 540	254	5,12

FUENTE: INEI, 2012



FUENTE: INEI, 2012

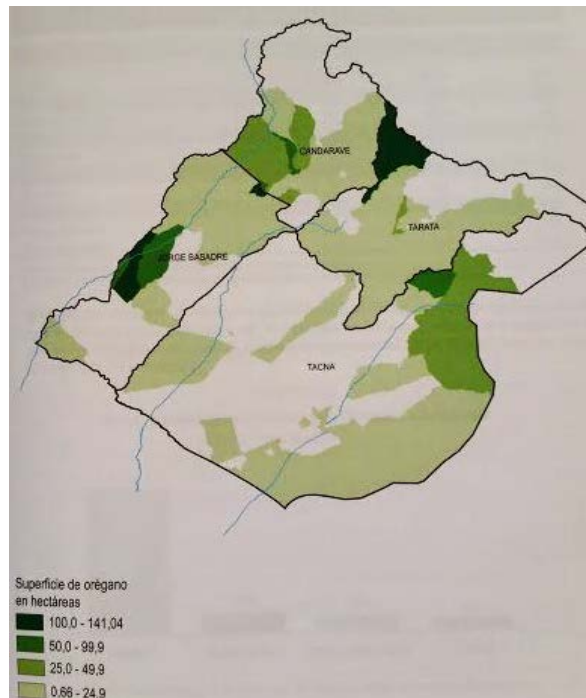
Gráfico 2. Porcentaje de participación en la producción de orégano por provincias.

Los distritos con mayor rendimiento en la región de Tacna son el distrito de Camilaca, Susapaya, Ilabaya, Candarave, Sitajara y Huanuara tal como se observa en el siguiente cuadro.

Cuadro 4. Resumen del cultivo de orégano en Tacna

ZONAS PRODUCTORAS EN TACNA	PRODUCCIÓN (t)	SUPERFICIE COSECHADA (ha)	RENDIMIENTO (kg/ha)	PRECIO EN CHACRA (S/. /kg)
Camilaca	2 125	506	4 199	5,71
Susapaya	892	211	4 227	5,50
Ilabaya	721	185	4 120	5,17
Cairani	300	75	4 000	5,72
Candarave	258	60	4 300	5,90
Sitajara	231	55	4 200	5,26
Huanuara	172	42	4 095	5,72
Tarata	164	48	3 416	5,26
Pachia	159	41	3 878	4,97
Ticaco	142	41	3 641	5,49
Palca	130	43	3 023	4,95
Héroes Albarracín	128	33	3 878	5,00
Otros	54	10	3 600	5,19
Locumba	32	136	2 461	5,30

FUENTE: INEI, 2012



FUENTE: INEI, 2012.

Gráfico 3. Cultivo de orégano – Superficie de orégano en hectáreas

2.3.1. Características botánicas

La planta de orégano, cuyo nombre científico es *Origanum vulgare* L., es una hierba perenne que vive más de diez años. Se desarrolla desde el nivel del mar hasta los 3 800 msnm, consiguiéndose mejores producciones en alturas comprendidas entre los 2 400 a 3 000 msnm (**Aguilar et al., 2013**).

Es una planta resistente al frío, sin embargo, las temperaturas menores a 5 °C afectan al cultivo, retrasando su crecimiento y en algunos casos quemando los bordes de las hojas **(Humpire, 2012)**.

El orégano es una planta de tallos muy ramificados, por lo cual esta planta parece un pequeño arbusto. Los tallos a menudo presentan una tonalidad de color rojizo, estos alcanzan alturas del orden de los 45 cm **(Aguilar et al., 2013)**.

Las hojas se disponen de manera opuesta, presentan forma ovalada y anchas de entre 2 a 5 cm, con bordes enteros o ligeramente dentados, nacen de a dos en cada nudo, enfrentadas; estas hojas se presentan de color verde, por el haz, y más pálidas y vellosas por el envés. Tienen numerosas y diminutas punteaduras glandulares o pelos llenos de esencia por ambas caras **(Klauer, 2009)**.

Las flores que presenta el orégano son diminutas, habitualmente de color blanco aunque en algunas ocasiones son de color rosado o lila. Estas flores están agrupadas en una inflorescencia (conjunto de flores) apical **(Klauer, 2009)**.

2.3.2. Taxonomía

Descripción taxonómica, según Tajtajan, 1983 & Klauer, 2009:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Origanum*

Especie: *Origanum vulgare* L.

2.3.3. Suelo y clima

El cultivo de orégano tiene éxito en todos los tipos de terrenos ricos en materia orgánica, silíceos arcillosos, francos, humíferos, calcáreos, arcilloso – arenosos e incluso en lugares áridos. Prefiere suelos franco – arenosos, en los que puede vivir hasta 10 años **(Klauer, 2009)**.

El Orégano se adapta a cualquier clima, alcanzando sus mayores rendimientos en ambientes templados y soleados (de 7 a 8 horas de sol), donde alcanza los mayores rendimientos de aceite esencial **(Klauer, 2009; Aguilar et al., 2013)**.

Este cultivo se desarrolla muy bien en lugares templados durante el día, y fríos durante la noche. Las temperaturas medias máximas pueden variar entre 17 – 20 °C y las temperaturas medias mínimas, entre 2 y 6,5 °C a través de los diferentes meses del año **(Klauer, 2009)**.

En pisos altitudinales altos por encima de los 3 000 msnm, donde las temperaturas descienden a menos de cero grados centígrados en ciertas horas de la noche, el cultivo no se perjudica **(Klauer, 2009)**.

2.3.4. Propagación del orégano

Existen dos métodos usuales de propagación según **Klauer, 2009**: sexual y asexual.

La reproducción por semillas no se recomienda para cultivos comerciales, porque no se logra uniformidad en la plantación.

La reproducción asexual se realiza mediante esquejes, seleccionándolos y cortándolos de 15 cm de largo. Para preparar los esquejes se retiran las hojas de los diez centímetros inferiores del tallo, luego estos se entierran con las hojas verdes expuestas a la luz en bandejas de propagación que son llenadas con sustrato húmedo donde los esquejes permanecerán por unos 30 a 40 días hasta el momento de trasplantarlos ya convertidos en una planta.

La propagación de orégano a través de esquejes es la forma de obtener plántulas fuertes y vigorosas en un periodo de tiempo corto.

2.3.5. Plagas y enfermedades

El orégano está sujeto al ataque de algunas plagas y enfermedades, que generan el debilitamiento de la planta. Normalmente, los problemas fitosanitarios, que se presentan en este cultivo, son debido a la cercanía de alguna planta hospedera

que albergue plagas, cercana al cultivo; o por contaminación y mala rotación del suelo para el caso de enfermedades (**Humpire, 2012**).

A continuación se describen las principales plagas y enfermedades que pueden aparecer en este cultivo.

A. Plagas

Las plagas que se presentan en el orégano son estacionales y no se consideran exclusivas de este cultivo, ya que son consecuencia de la cercanía de otras plantas y/o cultivos que hospedan a estas plagas (**Klauer, 2009**).

No generan mayor problema para el cultivo pero pueden serlo si no se consideran labores mínimas de control y cuidado con plantas hospederas cercanas al cultivo (**Klauer, 2009**).

Pulgones o áfidos

En el orégano se presenta el pulgón verde (*Mizus* spp.). Esta plaga mancha la hoja con sus secreciones, y es vector de virus.

Es importante evitar cultivos hospederos de pulgón cerca del cultivo de orégano, como alfalfa por ejemplo; y de plantas como el “canacho” (*Sonchus oleraceus*), que son muy susceptibles a este insecto **(Klauer, 2009)**.

Artrópodos

El ácaro *Tetranychus urticae* o *cinnabarinus*, también conocido como “Arañita Roja”, puede atacar a los órganos verdes de la planta. La succión de los contenidos celulares por parte del ácaro provoca la desecación de los mismos, induciendo un aspecto como manchado a la cara superior de las hojas **(Humpire, 2012)**.

La característica del ataque de la arañita roja es cubriendo la planta con una fina tela, en las cuales se hallan miles de estos ácaros, reduciendo la capacidad fotosintética de la planta. Las arañitas rojas producen manchas cloróticas y amarillentas en las hojas, si el ataque es muy fuerte ocasiona la caída de las hojas y el secamiento de los tallos **(Humpire, 2012)**.

B. Enfermedades

Es importante considerar que las enfermedades en un cultivo se presentan cuando existen condiciones favorables para su desarrollo. Estos factores son: alta humedad, incidencia solar, y desbalance nutricional (exceso de nitrógeno, por ejemplo), lo que provoca un pH ácido, condicionando un ambiente propicio para el desarrollo de hongos y bacterias **(Klauer, 2009)**.

Es por ello que, antes de dar a conocer las principales enfermedades en el orégano, es necesario indicar que una buena nutrición (balanceada), es garantía de plantas sanas. El exceso de abono sintético (sobre todo los nitrogenados) favorece la proliferación de insectos, hongos y bacterias **(Klauer, 2009)**.

Asimismo, todo control que se realice es a nivel preventivo, ya que cuando la enfermedad aparece, su control es muy difícil **(Humpire, 2012)**.

Hongos del suelo

Se ha encontrado un complejo de hongos perteneciente a los géneros *Fusarium*, *Rhizoctonia*, y a la familia de la Phythiaceas, *Phytophthora cryptogea*, que también se presentan en romero, tomillo y salvia, provocan necrosis a nivel del cuello y de las raíces. El marchitamiento del pie de las plantas afectadas se caracteriza por la presencia de ramas secas y de hojas con manchas amarillas, pardas y negras. El hongo está presente, sobre todo, desde primavera en los suelos húmedos y compactos, propensos a los encharcamientos **(Klauer, 2009; Aguilar et al., 2013)**.

Es importante considerar la rotación del cultivo, es decir, que el orégano no debe ser instalado en terrenos que hayan tenido un cultivo con registro de problemas radiculares causados por hongos **(Klauer, 2009)**.

Hongos foliares

Causantes de enfermedades en el orégano son *Botrytis cinerea* (mancha gris), *Alternaria solani* (tizón), *Puccinia rubsaameni* (roya) y *Oidium* spp. (oidiosis). Estos hongos

parasitan al orégano, siendo los dos últimos los que causan mayores problemas sanitarios en el país, manchando las hojas, afectando directamente el valor comercial **(Humpire, 2012)**.

El hongo *B. cinerea* causa manchas grises en las hojas, afectando directamente el valor comercial de la planta **(Humpire, 2012)**.

Alternaria solani es un hongo fitopatógeno, ocasiona una enfermedad en los cultivos conocida como tizón temprano que se caracteriza por afectar al follaje y estar difundida en zonas húmedas y de altas temperaturas **(Humpire, 2012)**.

P. rubsaameni, (roya), es un hongo foliar que produce pústulas (costras) en el envés de las hojas, de color marrón o rojizo; y en el haz, manchas cloróticas **(Humpire, 2012)**.

El hongo aparece cuando la planta está madurando; es decir, cuando se inicia la floración. La proliferación del hongo en la planta es de las partes más viejas a las más jóvenes. Cuando

el ataque es intenso, se produce desecamiento de las hojas y la consiguiente caída de las mismas **(Humpire, 2012)**.

Oidium spp., produce micelio de color blanquecino en la superficie de las hojas, a manera de “polvillo”. Al igual que la roya, el *Oidium* spp., se hace visible cuando la planta está madurando; sin embargo, su presencia es en cualquier época del año a diferencia de la roya que aparece después de la temporada de lluvias. Cuando el ataque es intenso, produce desecamiento y caída de las hojas **(Humpire, 2012)**.

Estos hongos se propagan muy fácilmente, ya que sus esporas son trasladadas por el viento, insectos, herramientas, ser humano, etc.; de una planta a otra; lo que permite su rápida proliferación y contaminación, pudiendo afectar a todo el cultivo en cuestión de horas **(Humpire, 2012)**.

Ambos hongos se pueden convertir en un problema endémico, lo que hace que siempre se tenga el riesgo de aparición de la enfermedad **(Humpire, 2012)**.

Nemátodos

El nemátodo *Meloidogyne* spp., produce síntomas tanto en las raíces como en los órganos aéreos. Los síntomas de raíces aparecen en forma de nudos, agallas y pudriciones cuando se agrega el ataque de bacterias y hongos saprofitos o fitopatógenos. Las lesiones son ocasionadas por la secreción de saliva que el nematodo inyecta en la planta mientras se alimenta de ella. El proceso de alimentación hace que las células vegetales afectadas reaccionen causando la muerte o el debilitamiento de las yemas y de las puntas de la raíz **(Klauer, 2009)**.

Las plantas afectadas sobreviven con frecuencia durante la etapa de crecimiento, ocasionalmente son destruidas prematuramente por la enfermedad. Las raíces infectadas se engruesan en la zona de invasión y se forman las agallas en forma de nódulo, las mismas alcanzan un diámetro doble o triple al de las raíces sanas, se observa con frecuencia necrosis y se pudren **(Klauer, 2009)**.

Enfermedades de origen viral

Sobre cultivos de orégano han sido detectados y aislados los virus causantes del mosaico de la alfalfa (AMV) y del pepino (CMV). Estos virus son transmitidos por vectores como son los pulgones. Los síntomas observados sobre el orégano han sido manchas amarillas y blanquecinas sobre las hojas, una deformación y un marchitamiento de aquellas, retardando y después parando el crecimiento de la planta **(Humpire, 2012)**.

El efecto de la temperatura es notable sobre esta virosis, la severidad varía ampliamente dependiendo de la temperatura que predomine durante algunas de las etapas del ciclo vegetativo de la planta. Así se observa síntomas más severos en la primavera y en verano, en cambio, los nuevos brotes producidos por las plantas infectadas no muestran síntomas de anomalía **(Humpire, 2012)**.

2.3.6. Cosecha

El orégano es un cultivo al que durante todo el año pueden realizarse cortes para cosecha; sin embargo, se recomienda que

los cortes se realicen empezando la floración, ya que es cuando el aroma está más concentrado en las hojas **(Aguilar et al., 2013)**.

La cosecha debe hacerse después de “levantado” el rocío de la mañana. No se debe cosechar después de una lluvia, ya que el producto se oxida, tomando un color pardo oscuro, que reduce su valor comercial **(Klauer, 2009)**.

Es muy importante desinfectar las herramientas a utilizar para el corte o cosecha, antes y después del corte. Esta es una práctica cultural que evita la propagación de enfermedades de planta a planta **(Klauer, 2009)**.

El producto cosechado deberá colocarse en bandejas o mantas, debidamente ordenadas y conducidas lo más pronto posible a un área adecuada (sombreada de preferencia), para su oreo y secado **(Klauer, 2009)**.

2.3.7. Post cosecha

Las operaciones de post cosecha son: secado, deshojado, zarandeo, ventilado, clasificación por tamaño, envasado y almacenado **(Klauer, 2009)**.

El secado del orégano normalmente se realiza de manera rústica, colocando el producto en mantas y expuesto a los rayos solares durante 04 días aproximadamente **(Klauer, 2009)**.

El deshojado se realiza manualmente con ayuda de herramientas simples, el objetivo es desprender las hojas secas de los tallos. Una vez logrado el desprendimiento de las hojas, se realiza la separación de los tallos en forma manual o con ayuda de zarandas **(Klauer, 2009)**.

El ventilado es un proceso mecánico por el cual el producto es sometido a un seleccionador neumático que, por acción de una corriente de viento, el producto es seleccionado por tamaño de partícula **(Klauer, 2009)**.

Por último, el envasado se hace en sacos de papel plastificado y el almacenamiento de este producto debe ser en un lugar ventilado y con baja humedad relativa **(Klauer, 2009)**.

2.4. Microorganismos promotoras de crecimiento vegetal

Los microorganismos juegan un papel muy importante en el desarrollo de las plantas, siendo capaces de colonizar las raíces de forma externa y, en algunos casos, internamente; el interés sobre éstas se ha basado en tres aspectos básicos: influencia en la nutrición de las plantas, protección de la raíz del ataque de patógenos procedentes del suelo y producción de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, tales como ácido indolacético, giberelinas, citoquininas y otros **(Elein, 1998)**.

Hasta la fecha, se han acumulado gran número de reportes acerca de microorganismos que aislados de diversos ecosistemas naturales, son capaces de excretar sustancias reguladoras del crecimiento vegetal. Estas sustancias orgánicas en pequeñas concentraciones influyen sobre el metabolismo de las plantas superiores conllevando a variaciones en su crecimiento y

desarrollo; entre ellas las más conocidas son las fitohormonas que son sustancias de elevada actividad biológica **(Elein, 1998)**.

Desde los años 70 vienen desarrollándose las investigaciones e informes sobre microorganismos del suelo que promueven el crecimiento de las plantas, lo que ha llevado a la aplicación de técnicas de fertilización “no contaminantes” para aumentar el rendimiento de los cultivos, estos son los llamados biofertilizantes **(Pernasetti & Di Barbaro, 2012)**.

2.4.1. Beneficios que ofrecen los microorganismos utilizados como biofertilizantes

- ✓ Incrementan los procesos microbianos en el suelo, incrementando los microorganismos beneficiosos.
- ✓ Se consume escasa energía no renovable en su producción industrial.
- ✓ Son productos limpios que no contaminan el medio ambiente.
- ✓ Mejoran la eficiencia de los fertilizantes minerales, permitiendo un ahorro de hasta un 30-50 % de fertilización nitrogenada y

entre un 15-30 % de los fertilizantes de fórmulas completas, según los tipos de suelos y cultivos.

- ✓ Producen sustancias bioactivas estimuladoras del crecimiento vegetal, pudiendo incrementar el rendimiento de los cultivos hasta un 20-30 %.
- ✓ Actúan sobre el control de diversos microorganismos fitopatógenos.

Son muchos los beneficios que brindan las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, sin embargo, en ocasiones se subestiman estos productos biofertilizantes debido al poco conocimiento que se tiene de ellos, la poca cultura en el empleo de medios biológicos en agricultura y la limitada comercialización que se realiza para facilitar su adquisición por los productores **(Lozada & Rivas, 2010)**.

2.5. Biofertilizantes

Los biofertilizantes son productos a base de microorganismos que viven normalmente en el suelo aunque en poblaciones bajas y que al incrementar sus poblaciones por medio de la inoculación

artificial son capaces de poner a disposición de las plantas, mediante su actividad biológica, una parte importante de las sustancias nutritivas que necesitan para su desarrollo, así como suministrar sustancias hormonales o promotores de crecimiento **(Pernasetti & Di Barbaro, 2012; Alarcón & Ferrera, 2000)**.

La acción de un biofertilizante va a depender de la capacidad de los microorganismos para establecerse sobre los raíces de las plantas, por eso es importante tener claro el concepto de rizósfera **(Elein, 1998; Díaz & Márquez, 2011)**.

Se puede decir que la rizósfera es un pequeñísimo espacio, aproximadamente de 2 mm, entre el suelo común y las raíces, donde existe una relación de aprovechamiento mutuo entre las plantas y las bacterias o microorganismos que la rodean. La rizósfera es colonizada más intensamente por microorganismos que en otras regiones del suelo y algunos de estos, no solo se benefician por las excreciones de sustancias nutritivas de las raíces sino que ejercen una acción benéfica para la planta ya que estimulan su crecimiento **(Elein, 1998; Estrada, 2008)**.

Las bacterias que se desarrollan en la rizósfera de las plantas se las denomina “rizobacterias” y aquellas que además promueven el crecimiento o desarrollo de las plantas son las llamadas “Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal” o “Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal” (MPCV) **(Bach & Díaz, 2009; Elein, 1998).**

Dentro de los estos microorganismos “MPCV”, se encuentra los que tienen *acción directa* que son las que proveen a la planta de algún nutriente como nitrógeno, fósforo, hierro o producen reguladores de crecimiento (fitohormonas) los cuales aumentan el volumen de la raíz y con ello incrementan la toma de nutrientes y agua. Los de *acción indirecta* son aquellos microorganismos con capacidad de control biológico los cuales promueven el crecimiento de las plantas al suprimir los fitopatógenos que puedan contener **(Pernasetti & Di Barbaro, 2012; Estrada, 2008).**

Los biofertilizantes que se producen son:

- Biofertilizantes a base de *Azotobacter chroococcum*, bacteria fijadora de nitrógeno atmosférico, capaz de sustituir entre 30 a

40 % el fertilizante nitrogenado y de incrementar los rendimientos, porque aumentan el número de flores y frutos en los distintos cultivos por la acción de las sustancias activas que son capaces de sintetizar **(Chirinos et al., 2006)**.

- Biofertilizantes a base de la bacteria *Bacillus megatherium var. phosphaticum*, bacteria solubilizadora del fósforo del suelo, capaces de sustituir hasta 70 % del fertilizante fosfórico, porque ponen a disposición de las plantas el fósforo almacenado y fijado en el suelo, que en suelos tropicales presentan altos niveles **(Chirinos et al., 2006)**.

- Biofertilizantes mixtos a base de bacterias de *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum brasilense*, ambas fijadoras del nitrógeno atmosférico y estimuladoras del rendimiento, capaces de sustituir hasta un 50 % del fertilizante nitrogenado en las gramíneas, y de incrementar los rendimientos por la acción de las sustancias activas que son capaces de sintetizar **(Chirinos et al., 2006)**.

2.6. Fijación biológica de nitrógeno (FBN)

Con excepción del agua, el nitrógeno es considerado generalmente el nutriente más limitante para el crecimiento de las plantas en su ambiente natural y es un constituyente esencial de moléculas fundamentales de todos los seres vivos: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas, entre otros **(Estrada, 2008)**.

El nitrógeno molecular (N_2) es la única reserva de nitrógeno accesible en la biósfera, la cual es prácticamente ilimitada y no es directamente utilizada por los vegetales y animales. Para que el nitrógeno molecular pueda ser asimilado, es necesario que sea reducido y los únicos seres capaces de realizar esta reacción son los organismos pertenecientes a los dominios Eubacteria y Archea, por el proceso denominado fijación biológica de nitrógeno **(Estrada, 2008)**.

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso mediante el cual la mayor parte de nitrógeno atmosférico se ha incorporado a la materia viva, a lo largo de la evolución del planeta. Este proceso constituye la principal vía de incorporación de nitrógeno al

ecosistema, que constantemente es reciclado de la atmósfera principalmente por la acción de organismos descomponedores de materia orgánica en el suelo. La transformación del nitrógeno no es exclusivamente biológica: las radiaciones ultravioleta representan un 10 % del aporte global, las descargas de tormentas eléctricas y las lluvias ácidas un 5 %, la industria de los fertilizantes aporta un 25 %, por lo que la fijación biológica de nitrógeno contribuye con el 60 % aproximadamente **(Estrada, 2008)**.

De esta forma, la acción de los microorganismos fijadores de nitrógeno y desnitrificadores garantiza un reservorio inagotable de nitrógeno en la atmósfera. La fijación biológica de nitrógeno contribuye con la manutención del ecosistema en equilibrio, lo que conlleva a la reducción en la aplicación de dosis excesivas de compuestos nitrogenados de síntesis, como por ejemplo, el nitrato que contamina aguas y los vegetales que serán consumidos por el hombre. De esta forma, posibilita el desarrollo de una agricultura más sustentable y menos agresiva con el medio ambiente **(Estrada, 2008)**.

Varios sistemas de fijación biológica de nitrógeno ya han sido descritos en organismos procarióticos. Dentro de los organismos que fijan nitrógeno (o diazotróficos) muchos son heterótrofos, los cuales necesitan un suplemento de carbono reducido y otros dependen indirectamente de la energía lumínica. En general, requieren de una simbiosis con un hospedero eucariótico o pueden ser de vida libre, compitiendo con otros microorganismos por la materia orgánica disponible en el ambiente. Han sido descritas especies representantes de varios grupos de procariotes que fijan nitrógeno, tales como: bacterias fotosintéticas (*Rhodospirillum rubrum*), bacterias anaeróbicas (*Clostridium*), bacterias aeróbicas (*Azotobacter*, *Derxia*, *Beijerinckia*), bacterias microaeróbicas (*Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Azorhizobium*, *Azoarcus*, *Acetobacter*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, entre otros), y también algunas especies de cianobacterias (algas verde-azules) y actinomicetos (*Frankia* sp.) **(Estrada, 2008)**.

Se pueden caracterizar tres grupos de bacterias fijadoras de nitrógeno: las bacterias diazotróficas de vida libre, asociativas y simbióticas **(Estrada, 2008)**.

Los *diazótrofos de vida libre* son heterótrofos, requiriendo ecosistemas capaces de brindar una fuente de carbono utilizable, necesario para la fijación de nitrógeno. Estos microorganismos fueron los primeros en ser conocidos como es el caso de *Beijerinckia fluminensis* y *Beijerinckia indica*, aisladas de la rizósfera de plantas de caña de azúcar en suelos tropicales, demostrando su potencial en asociaciones con gramíneas. Dentro de las bacterias de vida libre se encuentra la familia Pseudomonadaceae que está representada en su mayoría por el género *Azotobacter* el cual es aeróbico, heterótrofo y fijador de nitrógeno y las especies más conocidas son *A. chroococcum*, *A. vinelandii* y *A. paspali*, siendo esta última la más estudiada ecológicamente (**Estrada, 2008**).

Las *bacterias diazotróficas asociativas* tienen la capacidad de asociación con gramíneas, dentro de las cuales se encuentran especies forrajeras utilizadas como alimento por la ganadería; éstas se dividen en endófitos facultativos (pueden colonizar tanto la rizósfera como el interior de las raíces) y obligados (colonizan el interior de las raíces) (**Estrada, 2008**).

Respecto a los endófitos facultativos, solamente después del redescubrimiento del género *Azospirillum*, los científicos del mundo mostraron interés por la asociación de diazótrofos con gramíneas. Los microorganismos de este género se encuentran tanto en el interior como en la superficie de las raíces de muchas gramíneas forrajeras.

La distribución ecológica de *Azospirillum* spp., es extremadamente amplia, siendo considerada como una bacteria que coloniza plantas que crecen en diferentes hábitats. Otras especies también han sido encontradas en asociación como arroz, sorgo, caña de azúcar, gramíneas forrajeras, entre otras. Este género comprende diez especies como *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens*, *A. irakense*, *A. largimobile*, *A. dobereineriae*, *A. oryzae*, *A. melinis* y *A. canadense*. Algunas especies de *Azospirillum* son capaces de producir sustancias reguladores de crecimiento vegetal como el ácido indolacético **(Estrada, 2008)**.

La característica de diazótrofos endófitos obligados fue descubierta recientemente y parece ser clave para explicar una

contribución de la fijación de nitrógeno mucho más eficiente, especialmente en los trópicos, en relación con las asociaciones rizosféricas en otros cultivos. A este grupo de microorganismos pertenecen: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Klebsiella pneumoniae* y *Burkholderia* spp. **(Estrada, 2008)**.

Las *bacterias diazotróficas simbióticas* se encuentra en varios grupos de microorganismos y en algunos casos se observa la formación de estructuras diferenciadas. En relación a los rizobios, durante su asociación con las plantas leguminosas, se observan estructuras que se denominan nódulos. Estos microorganismos tienen la capacidad de invadir las raíces de las plantas leguminosas, haciendo que ocurra la formación del nódulo. En el nódulo, la bacteria, en su forma de bacteroide está involucrada en la fijación biológica de nitrógeno atmosférico de una forma combinada (amonio) que puede ser utilizado por la planta huésped. Actualmente son conocidos siete géneros de diazótrofos simbióticos de la familia Rhizobiaceae: *Azorhizobium*, *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Allorhizobium* **(Estrada, 2008)**.

Histórica y económicamente, varios diazótrofos han sido ampliamente utilizados como organismos modelo para investigaciones en laboratorio. Así como *Clostridium pasteurianum*, *Azotobacter vinelandii* y *Azotobacter chroococcum* fueron utilizados para el aislamiento y caracterización de la enzima nitrogenasa. *Klebsiella pneumoniae*, *A. vinelandii*, *A. chroococcum* y una especie de *Anabaena*, han sido utilizados en estudios de genética en la fijación biológica de nitrógeno (**Estrada, 2008**).

Como opción tecnológica se avizora la utilización de microorganismos nativos fijadores de nitrógeno con el propósito de reducir la fertilización nitrogenada de síntesis, con las ventajas de reducir la contaminación de los suelos y aguas freáticas, disminución de los costos de producción y mejorar la competitividad de los sistemas productivos agrícolas (**Estrada, 2008**).

2.7. Relación planta – bacteria, un sistema de retroalimentación

Las bacterias que fijan nitrógeno utilizan el carbono exudado por la planta en sus raíces como una fuente rica en energía de alto

poder calórico; estos exudados son utilizados como combustible para alimentar la reacción biológica. La planta controla la cantidad de energía con la cual las bacterias realizan el proceso de fijación de nitrógeno, de esta forma la cantidad de nitrógeno que se fija es controlada indirectamente por la planta **(López, 2004)**.

Por ejemplo, cuando la humedad del suelo es una limitante, disminuyen las necesidades de nitrógeno requerido por la planta, la cual disminuye el suministro de carbono a la flora bacteriana de la rizósfera. Al disminuir la energía entregada, las bacterias disminuyen la fijación de nitrógeno. Cuando las condiciones del suelo son óptimas, la planta requiere satisfacer necesidades crecientes de nitrógeno para su desarrollo; por lo cual, la fijación de nitrógeno es maximizada por la planta mediante una creciente oferta de carbono a la colonia de bacterias. Así se asegura que la planta recibirá la cantidad de nitrógeno adecuada a sus requerimientos, en base a las condiciones de crecimiento durante la temporada **(López, 2004)**.

En contraste con las aplicaciones físicas de fertilizantes nitrogenados, en donde los agricultores deben adivinar la cantidad

de nitrógeno a aplicar al comienzo de la temporada. Si nos hemos equivocado, el exceso de nitrógeno en un año seco puede reducir dramáticamente la eficiencia en el uso del agua y la sanidad vegetal, "cocinando" literalmente el cultivo. En un año de humedad adecuada, puede no ser suficiente la cantidad de nitrógeno en la aplicación, desaprovechando las buenas condiciones para el desarrollo del cultivo **(López, 2004)**.

La fijación de nitrógeno resuelve el problema a través de este sistema de retroalimentación natural. Se ha demostrado que mediante la utilización correcta de especies fijadoras de nitrógeno y la aplicación de un número conocido de estas bacterias, se logra una efectiva colonización en un cultivo, estos organismos suministrarán entre 30 a 110 o más unidades de nitrógeno por hectárea por temporada con una inoculación, dependiendo de las condiciones estacionales y de la humedad del suelo **(López, 2004)**.

2.8. Género *Azotobacter*

Según Bergey's se ubican a las bacterias del género *Azotobacter* dentro de la siguiente clasificación taxonómica:

Phyllum: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Pseudomonadales

Familia: Pseudomonadaceae

Género: *Azotobacter*

Especie: *Azotobacter* sp

El género *Azotobacter* comprende siete especies: *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. paspali*, *A. armeniacus*, *A. nigricans*, *A. salinestris* (**Bergey's, 2005**).

La familia Pseudomonadaceae está compuesta por bacterias de vida libre capaces de fijar el dinitrógeno atmosférico (fijan asimbióticamente nitrógeno); estas bacterias comúnmente habitan en el suelo, agua y sedimentos. *Azotobacter* ha sido el más estudiado en el ámbito mundial; su nombre proviene de la palabra francesa “asoto” que significa nitrógeno y del griego “bacter” que significa bacilo (**Jiménez, 2007; Lozada & Rivas, 2010**).

Son microorganismos que se mueven por flagelos peritricos, son aerobios, pero pueden crecer en concentraciones de oxígeno bajas. Son bacterias pleomórficas, cuya morfología varía desde

bacilos hasta células en forma de cocos que miden aproximadamente 2 μm a 4 μm de diámetro, siendo las de mayor tamaño las de *A. chroococcum* que llega a medir hasta 6 μm . Se las observa como células individuales, como pares, en agregados irregulares y algunas veces cadenas de tamaño variable, son gram negativas; 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 Asbhy) selectivo para este género. La forma de resistencia es el quiste **(Egas, 2010; González, 2000; Jiménez, 2007)**.

Bioquímicamente son catalasa y oxidasa positivo, reducen el nitrato, producen el sulfuro de hidrógeno e hidrolizan el almidón, producen sustancias promotoras de crecimiento entre ellas auxinas (ácido indol acético), giberelinas, citoquininas y vitaminas (tiamina, ácido nicotínico, ácido pantoténico y otros), capaces de estimular la germinación de las semillas, el crecimiento y desarrollo de algunas especies vegetales **(Egas, 2010; Jiménez, 2007)**.

Las bacterias del género *Azotobacter* son quimioorganotróficas, es decir, que obtienen su fuente de energía de la oxidación de compuestos orgánicos. En medio libre de nitrógeno con glucosa como única fuente de carbono, las células jóvenes de diferentes especies presentan una forma bacilar con extremos redondeados. Las células de cultivos viejos tienden a ser elipsoidales y en ciertos casos es común observar gránulos sudanofílicos y metacromáticos (PHBs) (Egas, 2010; Jiménez, 2007).

El rango de pH en el que crecen en presencia de nitrógeno combinado es de 4,8 a 8,5; el pH óptimo para crecer cuando fijan nitrógeno es de 7,0 a 7,5. La presencia de *Azotobacter* en el suelo está relacionada directamente con el pH del mismo, pues no se desarrollan en medios con valores por debajo de 6,0; también señala que la cantidad de ciertos elementos minerales, la abundancia de materia orgánica, la presencia de elementos antagónicos, la aireación, la humedad, la temperatura, entre otros factores, son condiciones reguladoras de estas bacterias en el suelo. *Azotobacter* crece en suelos bien aireados y a temperaturas entre 25 y 35 °C, lo que la califica como una bacteria mesófila, con una temperatura óptima 30 °C para su crecimiento; pero que se

puede desarrollar entre 10 y 40 °C y a pH entre 7,0 – 8,0 (**Egas, 2010**).

Especies como *A. chroococcum* y *A. vinelandii* son utilizadas como bioinoculantes. Igualmente muchas otras son usadas para producción de compuestos de interés comercial como polisacáridos, vitaminas y pigmentos (**Lozada & Rivas, 2010**).

Además del efecto nitro fijador como inoculante en su proceso de producción se origina un número grande de sustancias bioestimuladoras tales como auxinas (AIA), giberelinas (AG₃), citoquininas entre otros; es así que promueven el crecimiento de las plantas y muchas veces son las responsables, de su efecto sobre la germinación, floración y vigor de ellas, todo lo cual contribuye a la elevación en los rendimientos. Estas sustancias no sólo incrementan el desarrollo de las plantas, si no que aseguran el establecimiento competitivo de una especie de bacteria particular en la rizósfera (**González et al., 2000**).

2.9. Género *Azospirillum*

La siguiente clasificación taxonómica es según el Manual de Bergey's, 2005:

Phyllum: Proteobacteria

Clase: Alphaproteobacteria

Orden: Rhodospirillales

Familia: Rhodospirillaceae

Género: *Azospirillum*

Especie: *Azospirillum* sp

Actualmente son reconocidas diez especies en el género *Azospirillum*. Las dos primeras en ser descritas fueron *A. lipoferum* y *A. brasilense*, siendo éstas las más ampliamente estudiadas. Posteriormente fueron descritas las especies *A. amazonense*, *A. halopraeferans*, *A. irakense*, *A. largimobile*, *A. doebereineriae*, *A. oryzae*, *A. melinis* y *A. canadense* (**Estrada, 2008; Rueda, 2003**).

Azospirillum spp. fue aislada por primera vez por Beijerinck, a partir de suelos arenosos pobres en nitrógeno; inicialmente fue

denominada con el nombre de *Spirillum lipoferum*. Su amplia distribución en pastos tropicales, subtropicales, templados, silvestres y cultivados de todo el mundo. Estos microorganismos pueden encontrarse en la rizósfera formando diferentes clases de asociaciones con plantas no leguminosas (no forman nódulos) **(Rivera, 2008; Rueda, 2003)**.

Las bacterias del género *Azospirillum* son eubacterias gram negativas de formas pleomórficas (vibroide, bacilo) 1,0 µm x 2,1-3,8 µm de diámetro, con una movilidad en espiral, creciendo en concentraciones bajas de oxígeno. Este tipo de bacterias son fijadores de nitrógeno y hacen parte del grupo de diazótrofos asociativos que contribuyen al crecimiento de la planta sin la formación de estructuras diferenciadas y no establecen simbiosis creciendo exitosamente a pH de 6,8 – 7,0 **(Rivera, 2008)**.

En cultivos semisólidos y sólidos con más de 24 horas de incubación se presentan frecuentemente células refringentes con forma ovoide y de paredes gruesas similares a quistes. Una de las características fenotípicas más ampliamente usada como criterio para el reconocimiento tentativo del género *Azospirillum*, es el color

rojo escarlata, que toman las colonias al crecer en un medio adicionado del colorante rojo congo. No obstante, en este medio pueden hallarse colonias mutantes de *Azospirillum* sp., de color blanco debido a la incapacidad de producir polisacáridos no identificados **(Rivera, 2008)**.

Son bacterias químiorganotróficas, estas pueden utilizar como fuentes de carbono y nitrógeno, ácidos orgánicos como malato y succinato, los cuales están presentes en los exudados de las raíces; y como fuente de nitrógeno, ellas pueden usar amonio o nitrato y en condiciones microaeróbicas pueden ser capaces de fijar nitrógeno atmosférico **(Rivera, 2008; Elein, 1998)**.

La colonización de las raíces es el factor clave en el éxito de la asociación de las plantas con *Azospirillum* sp.; las bacterias del género *Azospirillum*, tienen la capacidad de producir auxinas, citoquininas y giberelinas. No obstante, el mecanismo analizado con mayor amplitud ha sido la producción de auxinas, que puede modificar el contenido de fitohormonas de las plantas conduciendo a la estimulación del crecimiento de las mismas, incrementándose el número de pelos radicales y generando con ello una mayor

superficie radical y mejor disponibilidad del agua y los nutrientes, debido a que las raíces pueden explorar un volumen mayor de suelo **(Elein, 1998; Rivera, 2008)**.

Las especies de *Azospirillum* tienen potencial para incrementar los rendimientos de cereales y gramíneas de importancia económica en diferentes regiones climáticas. Los efectos reportados por la inoculación de este microorganismo parecen ser dependientes del tipo de planta hospedera, de la cepa de *Azospirillum* sp., usada y de las condiciones del medio ambiente **(Elein, 1998)**.

2.10. Enunciado del problema científico

La agricultura mundial ha tendido a buscar la sustentabilidad de los cultivos a través de alternativas de origen biológico que sean más económicas, que mejoren la rentabilidad de los cultivos y que eviten el deterioro del medio ambiente. El desarrollo y uso de los biofertilizantes se contempla como una importante alternativa para la sustitución parcial o total de los fertilizantes químicos y es considerada una opción viable en muchos países. En la actualidad

se busca el desarrollo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal; y en particular con las bacterias *Azospirillum* sp. y *Azotobacter* sp., fijadoras de nitrógeno y productoras de fitohormonas. Es por ello; lo que motivo la formulación de la siguiente pregunta:

¿En qué medida se incrementará el rendimiento del cultivo de orégano (*Origanum vulgare* L.) variedad nigra fertilizándolo con cepas nativas de *Azospirillum* sp. y *Azotobacter* sp., bajo condiciones de invernadero?

2.11. Definición y delimitación del problema

A nivel mundial, la producción agrícola presentó una gran evolución con la aplicación creciente de fertilizantes químicos, lo que se reflejó en un incremento ininterrumpido de los rendimientos agrícolas. A través de los años, para mantener ese potencial productivo, los cultivos requerían de una aplicación masiva de diversos insumos químicos, lo que empezó a generar, junto con su efecto positivo, una serie de condiciones y factores negativos en los agroecosistemas actuales, por lo que en muchos suelos

agrícolas se observaron acumulaciones importantes de nitratos, nitritos, pesticidas y otras combinaciones ecológicamente dañinas. Una de las principales causas de que no se hayan detenido a tiempo los procesos negativos en la agricultura fue el desconocimiento de las implicaciones en el uso excesivo de los insumos y al poco estudio de su efecto sobre la microflora del suelo y sobre los procesos biológicos que condicionan la fertilidad de los mismos. El efecto final fue una destrucción sustancial de las asociaciones microbianas y su actividad funcional o bioquímica **(Barrón et al., 2009; Aguado & Moreno, 2008; Schoebitz, 2006)**.

Es por ello que, actualmente se está empleando una alternativa que se ajusta a los parámetros en la disminución del uso de fertilizantes químicos que es la llamada fertilización microbiana. **(Fornasero et al., 2001)**.

Estos microorganismos benéficos que se encuentran en el suelo son los responsables de la dinámica de transformación y desarrollo de los nutrientes del suelo y de los fertilizantes. En un solo gramo de tierra encontramos millones de microorganismos beneficiosos para los cultivos **(Rubio et al., 2003; Díaz et al., 2001)**.

Estos microorganismos viven en la zona rizosférica de las plantas y utilizan como nutrientes las sustancias contenidas en las secreciones de las raíces, suministrando a estas el nitrógeno que fijan. Al mismo tiempo, sintetizan aminoácidos, citoquininas, auxinas, giberelinas, ácidos orgánicos y péptidos de bajo peso molecular, entre otras sustancias, las cuales actúan como estimuladores del crecimiento vegetal **(Hernández et al., 2004)**.

Pero estos microorganismos actúan también como agentes de control biológico contra enfermedades causadas por hongos o bacterias en la raíz; permitiendo de esta manera reducir aquellos microorganismos indeseables en el suelo y favoreciendo los organismos útiles para los cultivos; logrando con ello un mayor beneficio en la producción **(Díaz et al., 2001)**.

Los microorganismos con mayor versatilidad para uso como bioinoculantes son las PGPR. El término PGPR fue introducido por Kloepper y sus colaboradores en 1978 al hacer referencia a un tipo de bacteria como BPCV (o PGPR por sus siglas en inglés que significan plant growth promoting rhizobacteria, o rhizobacteria promotora del crecimiento vegetal), las cuales mostraron ser

organismos altamente eficientes para aumentar el crecimiento de las plantas e incrementar su tolerancia a otros microorganismos causantes de enfermedades (**Acuña et al., 2006; Curá et al., 2005**).

Las BPCV pueden ser de vida libre o asociativa, aerobia, anaerobia o anaerobia facultativa. Entre ellas, muchos tipos se encuentran asociados a la familia Enterobacteriaceae, mientras que otros están relacionados con los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* (**Bach & Díaz, 2009**).

Las bacterias pertenecientes al Género *Azospirillum* y *Azotobacter* parecen ser muy promisorias como inoculantes para las plantas; ellas tienen un número de características interesantes que las hace adaptables, para establecerse ellas mismas en el complejo medio extremadamente competitivo de la rizósfera (**Acuña et al., 2006**).

El género *Azospirillum* es un grupo de microorganismos que incluye bacterias de vida libre, presentes en suelos de todo el mundo, capaces de fijar nitrógeno molecular del medio ambiente.

Especies de este grupo presentan una característica cosmopolita, debido a que se distribuyen en regiones templadas y tropicales **(Bach & Díaz, 2009)**.

Las bacterias del género *Azotobacter* son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico en el suelo, siendo una gran fuente para obtener un biofertilizante natural que puede ser utilizado en la mayoría de los cultivos, reduciendo el uso de los fertilizantes químicos nitrogenados **(Reyes et al., 2008)**.

Según **Dibut, et al., 2009**; en el artículo “*Contribución de los Biofertilizantes a una Agricultura sin Contaminación*”; llevada a cabo en la Habana, de la Revista Agricultura Orgánica; se ha logrado obtener desde el punto de vista socioeconómico beneficios entre \$530 – 680 por hectárea al aplicar ACESTIM sobre el cultivo de la papa, posibilitando la adquisición de elevadas ganancias en la totalidad de las áreas destinadas al desarrollo de este cultivo en el país.

Estudios realizados en Cuba por **Elein, 1998**.; sobre la “*Efectividad agronómica de biofertilizantes en el cultivo del Tomate*”

(*Lycopersicon esculentum*, Mill)”; basados en disminuir los costos de producción así como minimizar la contaminación ambiental; demostraron que en el tratamiento con inoculación mixta de *Azospirillum* sp. y *Glomus manihotis* combinada con 90 kg/ha de nitrógeno, resultó ser el tratamiento de mayor eficiencia agronómica además de lograrse rendimientos satisfactorios con una reducción del 30 % del fertilizante nitrogenado. Llegando a la conclusión que la inoculación con *Azospirillum* sp. y *Glomus manihotis*, permitió disminuir el consumo de fertilizante nitrogenado en un 30 %, lográndose rendimientos satisfactorios, contribuyendo de esta forma a minimizar las afectaciones al ambiente. Por otra parte, la inoculación combinada con 90 kg de nitrógeno/ha, permite contar con un sistema eficientemente agronómico.

En Venezuela según la Revista BIOAGRO “*Selección y Evaluación de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento en Pimentón y Maíz*” llevada a cabo por **Reyes et al., 2008.**; demostraron que los estudios de inoculación con cepas de *Azospirillum* sp. en el pimentón (*Capsicum annum*), hubo un aumento en la germinación, el peso seco y en el porcentaje de N, mientras que todas las cepas indujeron una disminución del P foliar

para el momento del muestreo (a las seis y nueve semanas para el maíz y pimentón respectivamente). El maíz presentó una tendencia más selectiva que el pimentón en la germinación, y en la promoción del crecimiento se corroboró este efecto observándose los mejores resultados con *Azospirillum* 23.

En la Universidad de Catamarca en Argentina; se realizaron estudios a con una cepa nativa de *Azospirillum* sp., sobre la germinación del orégano, que al ser inoculadas se obtuvo un mayor porcentaje de semillas germinadas **(Pernasetti & Di Barbaro, 2012)**.

Estudios en el “Efecto de un inoculante microbiano a partir de cepas nativas de *Azotobacter chroococcum* sobre el rendimiento en secuencias de cultivos hortícolas” se realizaron experimentos con el propósito de conocer el efecto de diferentes cepas nativas de *Azotobacter chroococcum* para lo cual se llevó a cabo la prospección de las mismas en cuatro zonas edafoclimáticas de la Provincia de Camagüey, en una secuencia de cultivos organopónicos (tomate, pepino y lechuga), dando como resultados una estimulación en los parámetros evaluados (rendimiento, altura

de la planta, porcentajes de materia seca, vitamina C, sólidos solubles totales, N, P y K en el fruto y el follaje) así como los contenidos de fósforo, potasio y materia orgánica en el sustrato, destacando en sus efectos positivos la cepa nativa FS-2 AISLADA de un suelo fersialítico pardo rojizo obteniendo una ganancia de \$ 29,56 m², con un incremento en los rendimientos de 53 % respecto a la cepa de referencia INIFAT-12 **(González et al., 2000)**.

En el Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería en México; se llevó a cabo el tema “*Uso de Azospirillum en México como Biofertilizante y Potencial de Nuevas Especies Bacterianas como Biofertilizantes, Agentes de Biorremediación y Biocontrol de Fitopatógenos*”; demostrando que la inoculación con cepas de *Azospirillum* sp., permitieron reducir hasta en un 50 % el uso de fertilizantes minerales (N, P, K) sin que disminuya el rendimiento del cultivo de maíz e incluso se obtiene 5 – 10 % de aumento respecto a los cultivos fertilizados con el 100 % del fertilizante mineral **(Caballero et al.,2009)**.

El “Rendimiento de cultivos de trigo en la región pampeana inoculados con *Azospirillum brasiliense*”; indica que la producción

de materia seca aérea y de raíces fue generalmente mayor que en los controles sin inocular, en el caso del rendimiento se indujo un aumento de 229 kg/ha, equivalente a aproximadamente el 6,5 % de mejora sobre el control sin inoculación. Los niveles de respuesta y la cantidad proporcional de sitios con mejoras en rendimientos en cultivos tratados con *Azospirillum* sp., son coincidentes con información analizada a nivel mundial **(Díaz et al., 2005)**.

El estudio de “Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo de tomate” de la Revista Biotecnológica Colombiana vol. VII; indica que es importante conocer la comunidad bacteriana, ya que ejerce un efecto positivo en los cultivos agrícolas, en donde se encontraron los géneros de *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* y *Streptomyces*; siendo el género predominante *Azospirillum*, que causa un efecto positivo sobre el crecimiento de las plántulas así como su estado nutricional, con un rendimiento agrícola superior a un 11 % con respecto a la planta testigo **(Elein et al., 2005)**.

En México, el artículo de “Inoculación del trigo var. pavón con *Azospirillum* spp. y *Azotobacter beijerinckii*”; indican que la

repuesta del cultivo de trigo a la inoculación con estas bacterias más 80 kg/ha de urea, dieron mejores resultados que el Control sin inocular (**García et al., 2005**).

Estudios en “Nuevas cepas nativas promotoras del crecimiento vegetal” en Cuba – INIFAT, con cepas nativas de *Azotobacter* sp. en diferentes zonas edafoclimáticas de la provincia de Camagüey en cultivos de tomate; las cuatro cepas seleccionadas se evaluaron y compararon con el testigo de referencia (cepa INIFAT-12) y un testigo absoluto (planta sin inocular); no existiendo diferencias morfológicas, culturales, fisiológicas y bioquímicas entre el género *Azotobacter*, sin embargo existieron diferencias en cuanto a parámetros de rendimiento, contenido de macroelementos en fruto y en las poblaciones microbianas, en donde todos los casos inoculados tuvieron un mejor comportamiento con relación al testigo absoluto y la más eficiente y efectiva resulto ser la cepa nativa FS-2 (**González, 2000**).

En la revista del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. México. “Uso de bacterias como biofertilizantes en la producción de orégano y tomillo” se demostró que el efecto de la

inoculación de *Azospirillum* sp., es poco evidente con respecto a la altura de la planta; sin embargo, en el peso de follaje fue más evidente el efecto de algunas bacterias de *Azospirillum* sp., siendo mayor en el orégano que en tomillo **(Castellanos et al., 2013)**.

En Trujillo; la Universidad de los Andes. Núcleo Universitario “Rafael Rangel”, con el tema de “Evaluación del efecto de la inoculación con *Azotobacter* spp. en plantas de ají dulce *Capsicum frutescens*”; donde se obtuvieron mayores resultados en primer lugar con el tratamiento químico, seguido del tratamiento donde se aplicó la mitad del fertilizante químico más la concentración media (20 %) de *Azotobacter* spp.; en todas las variables consideradas como altura de la planta, diámetro del tallo, rendimiento y algunas características del fruto **(Lozada & Rivas, 2010)**.

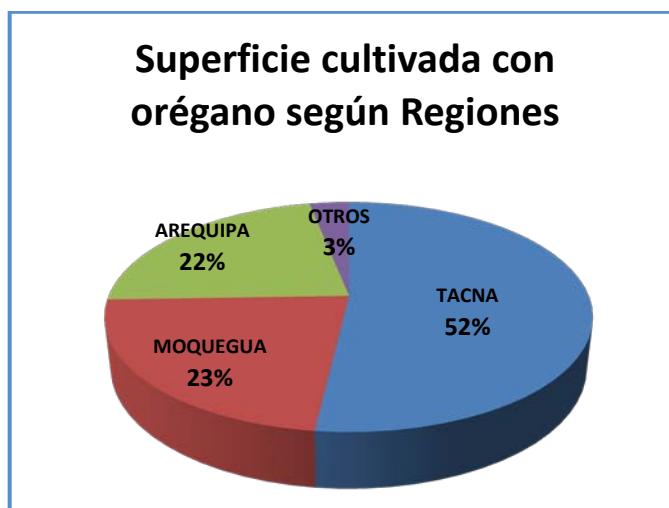
Cabe destacar que los resultados de innumerables estudios, junto con la toma de conciencia sobre los efectos adversos de los pesticidas químicos, propiciaron el resurgimiento a escala mundial de la investigación sobre el uso de inoculantes bacterianos para controlar patógenos y mejorar el crecimiento vegetal. De esta manera se utilizan organismos naturales (rizobacterias) para

reducir los efectos de organismos indeseables (patógenos) y así favorecer la producción de cultivos vegetales (**Santillana, 2006**).

2.12. Justificación del problema

En la actualidad, la agricultura juega un papel crucial en la economía de los países en desarrollo, y brinda la principal fuente de alimentos, ingresos y empleo a sus poblaciones rurales. Debido al elevado precio de los fertilizantes químicos en los últimos años se deben buscar alternativas tecnológicas que contribuyan a la disminución de estos, sin afectar significativamente los niveles de producción y evitando también de esta manera contaminar mantos freáticos y la erosión del suelo.

Por otra parte, la Dirección Regional Agricultura de Tacna, registra información hasta el año 2012, dando cuenta que la superficie cosechada de orégano a nivel nacional fue de 2 946 ha. La región con mayor superficie cultivada de orégano fue Tacna con 1 528 ha, seguida de Moquegua con 666 ha, Arequipa con 660 ha y resto del país con 92 ha, siendo la zona sur la de mayor potencial productivo.



FUENTE: DRA-TACNA, 2012.

Gráfico 4. Superficie cultivada con orégano según regiones

Las regiones donde se concentra la participación en la producción de orégano son Arequipa con el (42,96 %), Moquegua con (9,19 %) y Tacna con (47,85 %) para el año 2012, siendo Tacna la de mayor producción a nivel nacional, por lo tanto constituye un cultivo de gran importancia, incidiendo en la economía local de un alto número de localidades involucradas en el cultivo del mismo y siendo la base de alimentación de la población altoandina.

Hoy en día, el cultivo de orégano se enfrenta a muchos problemas, entre ellos está el continuo deterioro de los suelos, lo cual afecta a la microbiota del suelo; por lo tanto, el estudio de la relación microorganismo-planta es muy importante ya que permite establecer una relación entre el tipo de suelo, la variedad de planta y la microbiota asociada, ya que todos los microorganismos cumplen un rol fundamental en el mantenimiento del suelo como ecosistema.

Es por ello, que uno de los principales problemas con el uso y manejo de fertilizantes químicos e insecticidas en la agricultura es el desconocimiento de las especies presentes en los agroecosistemas con lo que conlleva a su posible utilización eficiente como lo son el uso de inoculantes biológicos (biofertilizantes), que pueden a largo plazo, contribuir a la recuperación de las poblaciones microbianas del suelo y con ello mejorar la calidad de este recurso.

En Tacna son pocos los estudios realizados sobre el uso de bacterias promotoras de crecimiento vegetal; además que se cuenta con pocas referencias sobre trabajos similares respecto al

cultivo de orégano; es por ello que se pretende dar a conocer los beneficios que se pueden lograr por estas bacterias; ya que el efecto de las actividades agrícolas en la degradación de los recursos naturales (erosión del suelo, uso de agroquímicos, etc.) es evidente en varias regiones de nuestro país, y debe ser evitado o por lo menos controlado.

2.13. Hipótesis

Se incrementa el rendimiento de orégano (*Origanum vulgare* L.) variedad nigra, cuando se fertiliza con cepas nativas de *Azospirillum* sp. y *Azotobacter* sp., bajo condiciones de invernadero.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de experimentación

El presente trabajo se desarrolló en el área de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la UNJBG, ubicada en el Centro Experimental Agrícola CEA III Fundo “Los Pichones”; en el Laboratorio e Invernadero de Biotecnología Vegetal, a los 17°59'38" de latitud Sur y los 70°14'22" de longitud Oeste y a 550 msnm.

3.2. Fase en laboratorio

3.2.1. Material biológico

Bacterias nativas del Género *Azotobacter* y *Azospirillum*; las que fueron obtenidas del cultivo de orégano, del Distrito de La Yarada – Los Palos.

3.2.2. Recolección de suelo y raíz

La recolección de las raíces y del suelo, fueron extraídas de 5 plantas de orégano de la zona rizosférica, para el aislamiento de cepas nativas. Estas muestras se colocaron en bolsas de polietileno de primer uso, las que fueron transportadas del distrito de La Yarada – Los Palos, al Laboratorio de Biotecnología Vegetal para desarrollar el protocolo de aislamiento (ANEXO 1).

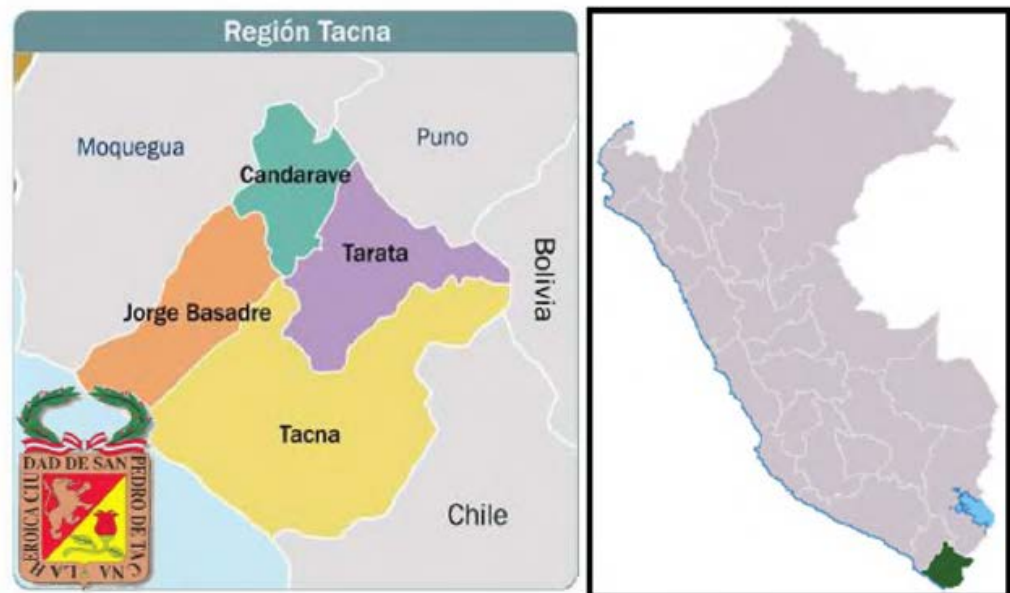


Gráfico 5. Mapa de la región de Tacna

3.2.3. Aislamiento

A. Aislamiento de *Azotobacter* (Sánchez M., 2004)

A partir de las muestras de suelo obtenidas de la zona rizosférica, se empleó la técnica de gránulos de suelo (Fenglerowa W., 1965; Novo B., 1993), que consistió en colocar cinco gránulos de la muestra de suelo en cada placa Petri, en medio selectivo Agar Ashby – Sacarosa (ANEXO 2); las placas se incubaron a 28 °C por 5 días, hasta observar colonias translúcidas mucilaginosas; a partir de estas colonias obtenidas se realizó la resiembra en estrías por duplicado en placa petri. De esta manera las muestras se sometieron a observaciones microscópicas mediante la coloración Gram (Frioni L., 1999), siendo bacterias pleomórficas, para determinar si las características morfológicas que presentaron las bacterias fueron del género *Azotobacter*, posteriormente, se procedió a tomar de cada muestra una porción de la colonia que presentaron características con borde circular, con elevación, colonias medianas redondas de forma convexa, superficie lisa o rugosa, de color blanquecino incoloras, con abundante o

moderada mucosidad, que al ser observadas a trasluz el borde es azulado (ANEXO 3). Con el fin de observar la coloración marrón oscuro en medio sólido, se realizó una siembra en Agar Diferencial Ashby con 5 g/L de Benzoato (Borda D., 2009); las que son características típicas del género *Azotobacter*, según referencias bibliográficas del Manual de Bergey's, 2005.

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 sembró en placas con Agar Ashby mediante siembra por estrías y se incubó a 28 °C por 48 horas; luego las colonias desarrolladas fueron repicadas en medio Agar Ashby, para conservar el cultivo puro.

B. Aislamiento de *Azospirillum* (Sánchez M., 2004)

Para el aislamiento del género *Azospirillum*, se extrajeron las raíces de las muestras de orégano llevando a cabo el siguiente protocolo de desinfección (Roca W., 1991); se cortaron segmentos de raíz, que fueron lavados sucesivamente con agua de caño para separar los residuos adheridos a éstos,

luego mediante un lavado con solución desinfectante cloro 10% por 5 min, lavándose 3 veces continuas, con agua destilada estéril seguido de una segunda desinfección por 1 min, finalmente se enjuagaron varias veces con agua destilada estéril, estos lavados se efectuaron con agitación manual; posteriormente fueron llevados a la cámara de flujo laminar para ser sembrados en tubos de ensayo en medio de cultivo NFB semisólido (Sánchez M., 2004), incubándolos a una temperatura de 27 a 33 °C por 72 horas, hasta el desarrollo de una película blanca, densa y ondulada; por debajo de la superficie también se observará un viraje del indicador azul de bromotimol hacia el color azul, debido a la alcalinización del medio causada por la oxidación del malato (ANEXO 4); de los tubos de ensayo positivos se sembraron por estrías en placas conteniendo medio NFB, las que fueron incubadas.

Posteriormente, se sembraron en medio selectivo Agar Rojo de Congo Ácido Málico a una temperatura de 27 a 33 °C por un periodo de 96 horas, se consideraron muestras positivas colonias que presentaron coloración rojo escarlata, con abundante crecimiento, consistencia seca, superficie rugosa y

borde irregular (ANEXO 5); así como la técnica de coloración Gram (Frioni L., 1999) para corroborar que las bacterias son Gram negativas; presenta una morfología vibroide, pleomorfismo y movimiento en espiral, según las características del Manual de Bergey's, 2005.

Para la purificación de las colonias de *Azospirillum* sp., 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 sembró en placas con medio NFB sólido, mediante siembra por estrías y se incubó a 27 a 33 °C por 72 horas; luego las colonias desarrolladas fueron repicadas en medio NFB, para conservar el cultivo puro.

3.2.4. Identificación

Para la identificación de las cepas aisladas se utilizó como patrón de identificación el Manual de Bergey's, 2005:

- ✓ *Prueba de la catalasa*; para esta prueba se mezcló una asada de la cepa bacteriana con una gota de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) observándose burbujas en caso de ser positivas.
- ✓ *Prueba de motilidad*; en una lámina portaobjetos se colocó una gota de la solución de fisiológica al 0,85 % y una pequeña muestra de las colonias.
- ✓ *Coloración Gram*; se empleó la técnica de coloración para bacterias.
- ✓ *Producción de pigmentos*; se observó a los siete días después de la siembra en los medios con benzoato dando una coloración pardo marrón, esta prueba se realizó sólo en el caso de *Azotobacter sp.*

3.2.5. Producción de biomasa (Frioni L., 1999)

Se emplearon placas con cultivos de *Azospirillum sp.* y *Azotobacter sp.*; estas cepas aisladas y seleccionadas cuyo estado de pureza se evaluó con la técnica de coloración Gram, se les agregó 5 ml de solución fisiológica (0,85 %) procediéndose a la remoción de las colonias con una asa de Drigalsky. Se agregó independientemente a cada frasco las suspensiones bacterianas

de cada cepa en 995 ml del medio líquido NFB con azul de bromotimol y el otro en medio líquido Ashby, previamente esterilizados y contenido en el biorreactor de tipo discontinuo, los cuales fueron incubados a 28 °C por 48 horas con un agitador de aire permanente (ANEXO 6)

Luego de este tiempo se procedió a realizar el recuento bacteriano el cual se llegó a una concentración de 10^9 UFC/ml, que se obtuvo en cada biorreactor utilizando la cámara Neubauer.

3.2.6. Preparación del inóculo (Borda D., 2009)

Se realizó a partir de la concentración obtenida en el biorreactor, de la cual, se prepararon diluciones con agua destilada, para un volumen de 300 ml conteniendo 10^7 UFC/ ml, utilizando la fórmula de concentración por volumen igual concentración por volumen para *Azospirillum* sp. y *Azotobacter* sp., esta concentración es recomendada por Caballero J. (2012); luego se procedió a colocarlos en recipientes de plástico de primer uso rotuladas según cada tratamiento a evaluar como son los tratamientos T₃ (*Azospirillum* sp. + *Azotobacter* sp.), T₂

(*Azotobacter* sp.), T₁ (*Azospirillum* sp.) y para el caso del testigo (T₀) sólo se le agregó agua destilada. (ANEXO 7).

3.3. Fase de invernadero

3.3.1. Material biológico

Esquejes de orégano variedad nigra, extraídas del distrito de La Yarada – Los Palos.

3.3.2. Recolección de material vegetal y primera inoculación

Los esquejes fueron recolectados de plantas de 2 años en campo, encontrándose al momento del corte con el 50 % de floración, siendo esta la edad fenológica más apropiada para el corte de esquejes; después del aislamiento de las bacterias a estudio; extraídas de una parcela con cultivo de orégano, de donde se recolectaron los ejemplares; de las cuales se consideraron plantas con buen desarrollo; estas muestras se transportaron en condiciones adecuadas al Laboratorio de Biotecnología Vegetal – Invernadero, en una caja de tecnopor con papel toalla humedecido

para evitar la deshidratación; las que fueron fraccionadas en un tamaño de 10 cm aproximadamente; para ser colocadas estos esquejes en la bandeja de enraizamiento por un periodo de 1 mes, las que se inocularon a una concentración de 10^7 UFC/ml, según cada tratamiento y en el caso del testigo sólo se aplicó agua destilada (ANEXO 8).

3.3.3. Preparación del sustrato

Para la experimentación se preparó una mezcla de suelo conformada por una parte de turba, otra de perlita y por último de humus en proporciones de 2:2:1 en volumen respectivamente; las que se mezclaron y colocaron en bolsas de polipropileno de 3 kg de capacidad y se esterilizaron en autoclave a 121 °C por 15 min a 15 libras de presión (ANEXO 9).

El suelo esterilizado fue colocado homogéneamente en bolsas de cultivo listas para su posterior siembra.

3.3.4. Selección, trasplante y segunda inoculación

Una vez seleccionados los esquejes de las bandejas enraizadoras, con características similares de tallos gruesos de color rojizo oscuro, hojas anchas de color verde intenso y vigorosas; se procedió a realizar el trasplante en las bolsas de cultivo según los cuatro tratamientos a estudio; inmediatamente se realizó la segunda inoculación a una concentración de 10^7 UFC/ml para cada tratamiento excepto el testigo. Posteriormente fueron colocadas en el Invernadero de Biotecnología Vegetal – Área Tuberosas, donde fueron evaluadas (ANEXO 10).

3.3.5. Riego

Posterior al trasplante se realizaron riegos periódicos cada 3 días por cada semana, tomando en cuenta la necesidad de la planta en todo su desarrollo, con un volumen de 150 ml a 300 ml aprox. por cada ejemplar.

3.3.6. Prevención de plagas

Como medida de prevenir algún tipo de enfermedad en las plantas de orégano, se realizaron aplicaciones de fungicidas e insecticidas.

3.3.7. Cosecha

Se realizaron 2 cosechas; la primera cosecha a los 90 días y la segunda cosecha a los 180 días, esto se llevó a cabo cuando empezó la floración, señal que ha llegado al estado conveniente para realizar la cosecha (ANEXO 12).

3.4. Diseño de investigación (Cappelletti C., 1992)

El diseño de investigación fue de tipo experimental.

3.5. Diseño de experimentación (Cappelletti C., 1992)

El diseño experimental utilizado fue el Diseño de Bloques Completamente Aleatorio – DBCA, constituido por 3 bloques y 4

tratamientos en donde cada tratamiento estuvo conformado por 30 unidades experimentales, haciendo un total de 120 plantas en todo el experimento (ANEXO 17). Para el análisis estadístico se utilizó, el Análisis de Varianza (ANOVA) a un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$ y para las comparaciones de los tratamientos se empleó la Prueba de Duncan al 5 % de probabilidad, utilizando el Software Estadístico INFOSTAT.

Los tratamientos fueron:

T₀: Testigo sin inocular (Control)

T₁: Planta + *Azospirillum* sp.

T₂: Planta + *Azotobacter* sp.

T₃: Planta + *Azospirillum* sp. + *Azotobacter* sp.

Las variables en estudio fueron:

✓ *Variable Independiente*. Presencia de cepas nativas de *Azospirillum* sp. y *Azotobacter* sp.

- ✓ *Variable Dependiente.* Rendimiento del orégano (*Origanum vulgare L.*) variedad nigra.

Indicadores de la Variable Dependiente:

- ✓ Altura de la planta
- ✓ Peso fresco de hojas
- ✓ Peso seco de hojas
- ✓ Volumen de la raíz

3.6. Criterios de evaluación

Los criterios de evaluación considerados, fueron los siguientes parámetros (González G., 1986) (ANEXO 12):

- ✓ **Altura de la planta;** con el propósito de evaluar la altura máxima alcanzada por las plantas a los 90 y 180 días, en su etapa de cosecha (2 cortes), se colocó el extremo de la cinta métrica en la base del tallo principal y se llevó hasta la yema apical más elevada, en donde se hizo la lectura correspondiente de la altura de la planta, expresada en centímetros (cm).

- ✓ **Peso fresco de hojas;** para determinar el peso fresco, se realizó a los 90 y 180 días, donde se separaron los tallos de las hojas y se pesaron en un sobre de papel aluminio de peso conocido, según cada tratamiento, los resultados obtenidos se expresaron en gramos.

- ✓ **Peso seco de hojas;** una vez tomados los pesos frescos, las muestras se llevaron a la estufa a 105 °C por 48 horas consecutivas, hasta obtener un peso constante.

- ✓ **Volumen de la raíz;** se realizó a los 180 días, se lavaron las raíces con abundante agua para eliminar los restos de sustrato, luego en una probeta con un volumen conocido de agua destilada, se introdujo la raíz de la planta y se realizó la lectura del volumen de agua desplazada por esta en mililitros.

IV. RESULTADOS

A continuación se muestran los resultados obtenidos en el rendimiento del cultivo de orégano (*Origanum vulgare* L.) variedad nigra, fertilizada con cepas nativas de *Azospirillum* sp. y *Azotobacter* sp., bajo condiciones de invernadero; los parámetros evaluados fueron altura de la planta, peso fresco de hojas, peso seco de hojas y por último, el volumen de la raíz, detallados a continuación:

CUADRO 5. Altura de la planta a los 90 días

Bloques Tratamientos	I	II	III	Promedio
T0	16,83	16,32	17,14	16,76
T1	20,53	17,81	17,20	18,51
T2	19,40	22,08	21,92	21,13
T3	25,48	23,58	22,09	23,71
Promedio	20,56	19,94	19,58	

FUENTE: Elaboración propia.

CUADRO 6. Altura de la planta a los 180 días

Bloques Tratamientos	I	II	III	Promedio
T0	42,00	38,79	41,80	40,86
T1	47,64	48,04	44,95	46,87
T2	52,68	50,82	48,88	50,79
T3	51,32	48,92	55,13	51,79
Promedio	48,41	46,64	47,69	

FUENTE: Elaboración propia.

CUADRO 7. Peso fresco de hojas a los 90 días

Bloques Tratamientos	I	II	III	Promedio
T0	9,73	10,08	9,55	9,78
T1	10,17	10,25	10,74	10,38
T2	11,12	11,03	11,43	11,19
T3	11,27	11,58	11,87	11,57
Promedio	10,57	10,73	10,89	

FUENTE: Elaboración propia.

CUADRO 8. Peso fresco de hojas a los 180 días

Bloques Tratamientos	I	II	III	Promedio
T0	31,25	33,63	32,88	32,58
T1	34,41	34,42	36,21	35,01
T2	38,28	37,46	36,52	37,42
T3	39,57	40,13	38,84	39,51
Promedio	35,87	36,41	36,11	

FUENTE: Elaboración propia.

CUADRO 9. Peso seco de hojas a los 90 días

Bloques Tratamientos	I	II	III	Promedio
T0	3,28	3,08	3,21	3,19
T1	3,29	3,96	3,58	3,60
T2	4,23	3,82	3,92	3,99
T3	4,19	4,50	4,54	4,41
Promedio	3,74	3,84	3,81	

FUENTE: Elaboración propia.

CUADRO 10. Peso seco de hojas a los 180 días

Bloques Tratamientos	I	II	III	Promedio
T0	8,31	8,32	8,51	8,38
T1	9,19	8,84	9,45	9,15
T2	9,96	10,09	9,60	9,88
T3	10,96	10,59	10,15	10,56
Promedio	9,60	9,46	9,42	

FUENTE: Elaboración propia.

CUADRO 11. Volumen de raíz a los 180 días

Bloques Tratamientos	I	II	III	Promedio
T0	7,23	5,78	5,48	6,16
T1	6,35	7,36	6,33	6,68
T2	8,58	6,65	7,63	7,62
T3	9,67	7,53	8,84	8,68
Promedio	7,95	6,83	7,07	

FUENTE: Elaboración propia.

Cuadro 12. Análisis de varianza - Altura de la planta a los 90 días

F.V	GL	SC	CM	FC	F _α	
					0,05	0,01
Bloques	2	1,93	0,96	0,38	5,14	10,92 Ns
Tratamientos	3	83,34	27,78	11,13	4,76	9,78 **
Error	6	14,96	2,49			
Total	11	100,23				

CV: 7,88 %

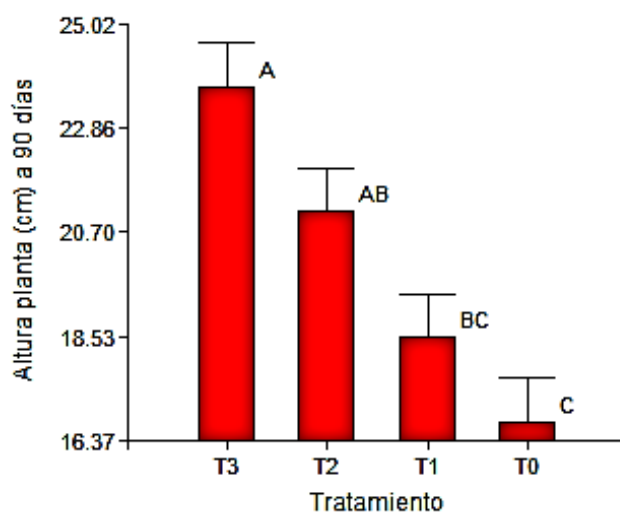
Ns: no significativo **altamente significativo

En relación a la variable altura de la planta a los 90 días (Cuadro 12), al realizar el análisis de varianza, indica que no existen diferencias estadísticas entre los bloques, es decir, el campo experimental fue homogéneo, caso contrario sucede con los diferentes tratamientos donde se halló diferencias estadísticas altamente significativas, con un nivel de confianza del 99 %. El coeficiente de variabilidad fue de 7,88 % lo cual es un indicador de confiabilidad de los resultados, siendo aceptable para este experimento.

Cuadro 13. Prueba de Significación de Duncan - Altura de la planta a los 90 días

Orden	Tratamientos	Promedio (cm)	Significación $\alpha=0,05$
1	T ₃ : <i>Azospirillum</i> sp. + <i>Azotobacter</i> sp.	23,72	a
2	T ₂ : <i>Azotobacter</i> sp.	21,13	a b
3	T ₁ : <i>Azospirillum</i> sp.	18,51	b c
4	T ₀ : Testigo	16,76	c

Letras iguales no difieren estadísticamente



Leyenda. T₀: Testigo, T₁: *Azospirillum* sp., T₂: *Azotobacter* sp., T₃: *Azospirillum* sp. + *Azotobacter* sp.

Gráfico 6. Prueba de Significación de Duncan - Altura de la planta a los 90 días

Se observa en el Cuadro 13 la prueba de significación de Duncan, que permite evidenciar las diferencias estadísticas en la altura de la planta a los 90 días entre los tratamientos inoculados; donde el promedio del tratamiento T₃ y el T₂ (*Azotobacter* sp.) son similares con un promedio de 23,72 y 21,13 cm respectivamente y que el promedio del tratamiento T₁ con 18,51 cm es similar a 16,76 cm al del testigo sin inocular, observándose que hay diferencias entre los tratamientos.

Cuadro 14. Análisis de Varianza - Altura de la planta a los 180 días

F.V	GL	SC	CM	FC	F _α	
					0,05	0,01
Bloques	2	6,31	3,15	0,58	5,14	10,92 Ns
Tratamientos	3	220,98	73,66	13,53	4,76	9,78 **
Error	6	32,64	5,44			
Total	11	259,94				

CV: 4,90 %

Ns: no significativo

El análisis de varianza del Cuadro 14 de altura de la planta a los 180 días, evidencian que no existen diferencias estadísticas entre los bloques, garantizando la homogeneidad de las condiciones en el invernadero, mientras que en lo relacionado a los tratamientos sí existen diferencias

estadísticas altamente significativas, con un nivel de confianza del 99 % por lo tanto, la altura de la planta difieren unas de otras, según los tratamientos inoculados. El coeficiente de variabilidad fue de 4,90 %, siendo aceptable para este experimento.

Cuadro 15. Prueba de Significación de Duncan - Altura de la planta a los 180 días

Orden	Tratamientos	Promedio (cm)	Significación $\alpha= 0,05$
1	T₃: <i>Azospirillum</i> sp. + <i>Azotobacter</i> sp.	51,79	a
2	T₂: <i>Azotobacter</i> sp.	50,79	a b
3	T₁: <i>Azospirillum</i> sp.	46,88	b
4	T₀: Testigo	40,86	c

Letras iguales no difieren estadísticamente

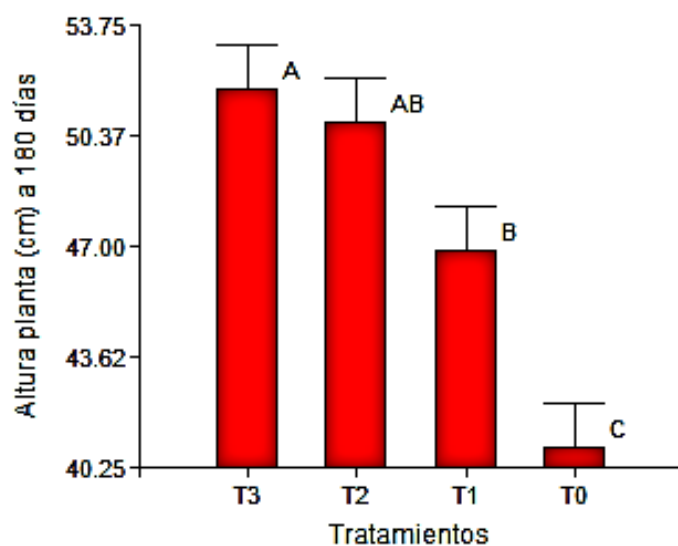


Gráfico 7. Prueba de Significación de Duncan - Altura de la planta a los 180 días

En el Cuadro 15 se aprecia la prueba de significación de Duncan, donde la altura alcanzada a los 180 días en el tratamiento T₃ con 51,79 y T₂ con 50,79 cm son similares; superando al tratamiento T₁ y al testigo (T₀) siendo los tratamientos inoculados con *Azotobacter* sp. (T₂) y *Azospirillum* sp. (T₁), similares en sus promedios, pero dando mejores resultados en los tres tratamientos inoculados como son el T₃, T₂ y T₁ a diferencia del testigo sin inocular que es la que presentó una menor altura alcanzada en 40,86 cm.

Cuadro 16. Análisis de Varianza – Peso fresco de hojas a los 90 días

F.V	GL	SC	CM	FC	F _α	
					0,05	0,01
Bloques	2	0,21	0,10	1,61	5,14	10,92 Ns
Tratamientos	3	5,80	1,93	29,58	4,76	9,78**
Error	6	0,39	0,06			
Total	11	6,40				

CV: 2,38 %

Ns: no significativo

**altamente significativo

Se puede observar el análisis de varianza descrito en el Cuadro 16 sobre la variable del peso fresco de hojas, indica que no existen diferencias estadísticas entre los bloques; caso contrario se observa que entre los tratamientos, uno es estadísticamente altamente significativo, correspondiente a los datos evaluados de peso fresco de hojas a los 90 días. El coeficiente de variabilidad fue de 2,38 %, siendo aceptable para este experimento.

Cuadro 17. Prueba de Significación de Duncan – Peso fresco de hojas a los 90 días

Orden	Tratamientos	Promedio (g)	Significación $\alpha= 0,05$
1	T ₃ : <i>Azospirillum</i> sp. + <i>Azotobacter</i> sp.	11,57	a
2	T ₂ : <i>Azotobacter</i> sp.	11,19	a
3	T ₁ : <i>Azospirillum</i> sp.	10,39	b
4	T ₀ : Testigo	9,79	c

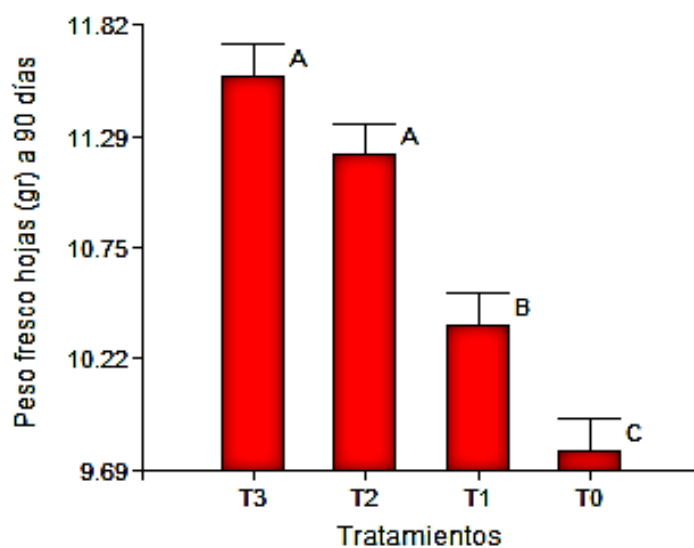


Gráfico 8. Prueba de Significación de Duncan – Peso fresco de hojas a los 90 días

En el Cuadro 17 de prueba de significación de Duncan se puede apreciar que el tratamiento T₃ (*Azotobacter* sp. + *Azospirillum* sp.), y el tratamiento T₂ (*Azotobacter* sp.) son estadísticamente similares siendo los de mayor promedio obtenido con 11,57 y 11,19 g, respectivamente; a diferencia del tratamiento con *Azospirillum* sp., que obtuvo un promedio de 10,39 g; siendo el de menor promedio para el testigo con un peso fresco de 9,79 g evaluados a los 90 días del primer corte de las plantas de orégano.

Cuadro 18. Análisis de Varianza – Peso fresco de hojas a los 180 días

F.V	GL	SC	CM	FC	F _α	
					0,05	0,01
Bloques	2	0,56	0,28	0,24	5,14	10,92 Ns
Tratamientos	3	80,73	26,91	23,30	4,76	9,78**
Error	6	6,90	1,15			
Total	11	88,23				

CV: 2,97 % Ns: no significativo **altamente significativo

Los resultados de análisis de varianza en el Cuadro 18, evidencian que entre los bloques no existen diferencias estadísticas significativas mientras que lo referente a los tratamientos existen diferencias altamente

significativas con un nivel de confianza del 99 %, al comparar los resultados (F_{∞}) con la F calculada, correspondiendo a los datos evaluados de peso fresco de hojas a los 180 días, evidenciando que uno de los tratamientos obtuvo un mayor promedio que los demás. El coeficiente de variabilidad fue de 2,97 % siendo aceptable para este experimento.

Cuadro 19. Prueba de Significación de Duncan – Peso fresco de hojas a los 180 días

Orden	Tratamientos	Promedio (g)	Significación $\alpha= 0,05$
1	T ₃ : <i>Azospirillum</i> sp. + <i>Azotobacter</i> sp.	39,51	a
2	T ₂ : <i>Azotobacter</i> sp.	37,42	a
3	T ₁ : <i>Azospirillum</i> sp.	35,01	b
4	T ₀ : Testigo	32,59	c

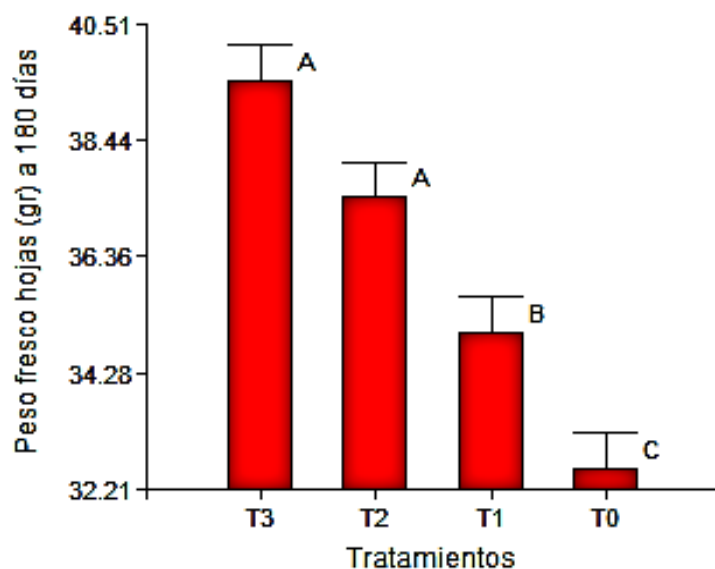


Gráfico 9. Prueba de Significación de Duncan – Peso fresco de hojas a los 180 días

Respecto a la prueba de significación de Duncan según el Cuadro 19, se evidencia que el tratamiento T₃ y el tratamiento T₂ son superiores a los otros dos tratamientos como son el tratamiento T₁ y el testigo sin inocular el T₀ con un 35,01 y 32,59 g, respectivamente del peso fresco de las hojas a los 180 días de realizado el segundo corte.

Cuadro 20. Análisis de Varianza – Peso seco de hojas a los 90 días

F.V	GL	SC	CM	FC	F _α	
					0,05	0,01
Bloques	2	0,01	0,01	0,13	5,14	10,92 Ns
Tratamientos	3	2,45	0,81	12,62	4,76	9,78**
Error	6	0,38	0,06			
Total	11	2,85				

CV: 6,69 %

Ns: no significativo

**altamente significativo

En el Cuadro 20 se muestra el análisis de varianza realizado al diseño de bloques completamente aleatorizado, en el cual se obtuvo que en uno de los tratamientos existen diferencias significativas respecto al peso seco de hojas evaluadas a los 90 días; mientras que en lo relacionado a los bloques se evidencia que no existen diferencias estadísticas significativas. El coeficiente de variabilidad fue de 6,69 % siendo aceptable para este experimento.

Cuadro 21. Prueba de Significación de Duncan – Peso seco de hojas a los 90 días

Orden	Tratamientos	Promedio (g)	Significación $\alpha= 0,05$
1	T ₃ : <i>Azospirillum</i> sp.+ <i>Azotobacter</i> sp.	4,41	a
2	T ₂ : <i>Azotobacter</i> sp.	3,99	a b
3	T ₁ : <i>Azospirillum</i> sp.	3,61	b c
4	T ₀ : Testigo	3,19	c

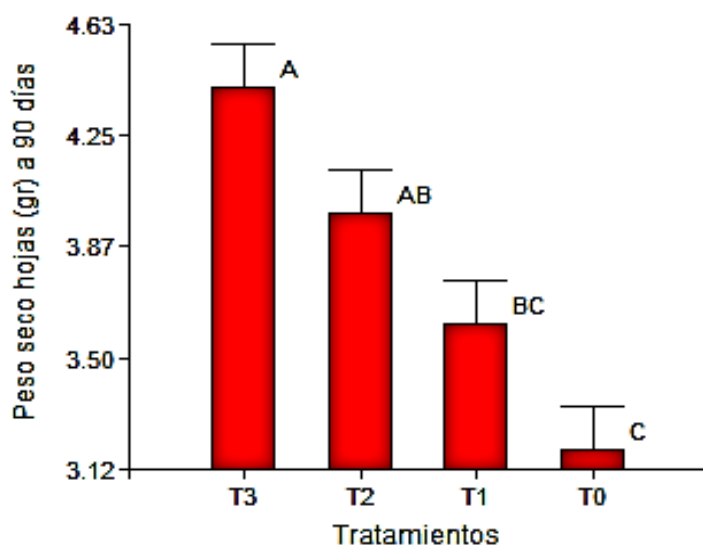


Gráfico 10. Prueba de Significación de Duncan – Peso seco de hojas a los 90 días

Efectuada la prueba de Duncan se observa que los mejores resultados, entre todos los tratamientos, se obtuvieron con la aplicación del tratamiento T₃ que contiene *Azospirillum* sp. + *Azotobacter* sp. y el tratamiento T₂; con los que se obtuvieron los mejores promedios con un peso seco de hojas de 4,41 y 3,99 g, respectivamente, en el primer corte (a los 90 días), respecto a los otros tratamientos que indican que el tratamiento con *Azospirillum* sp. (T₁) con un promedio de 3,61 g, es similar al promedio del testigo (T₀) con 3,19 g.

Cuadro 22. Análisis de Varianza – Peso seco de hojas a los 180 días

F.V	GL	SC	CM	FC	F _α	
					0,05	0,01
Bloques	2	0,07	0,03	0,35	5,14	10,92 Ns
Tratamientos	3	7,95	2,65	26,42	4,76	9,78**
Error	6	0,60	0,10			
Total	11	8,62				

CV: 3,33 %

Ns: no significativo

**altamente significativo

El análisis de varianza realizado al peso seco de hojas a los 180 días se ve reflejado en el Cuadro 22, donde se puede observar que en lo relacionado a los bloques no hay diferencia significativa, como en el caso

de los tratamientos que indica q por lo menos en uno de los tratamientos hay diferencias significativas. Teniendo en este cuadro un coeficiente de variabilidad de 3,33 % siendo aceptable para este experimento.

Cuadro 23. Prueba de Significación de Duncan – Peso seco de hojas a los 180 días

Orden	Tratamientos	Promedio (g)	Significación $\alpha= 0,05$
1	T₃: <i>Azospirillum</i> sp. + <i>Azotobacter</i> sp.	10,57	a
2	T₂: <i>Azotobacter</i> sp.	9,88	b
3	T₁: <i>Azospirillum</i> sp.	9,16	c
4	T₀: Testigo	8,38	d

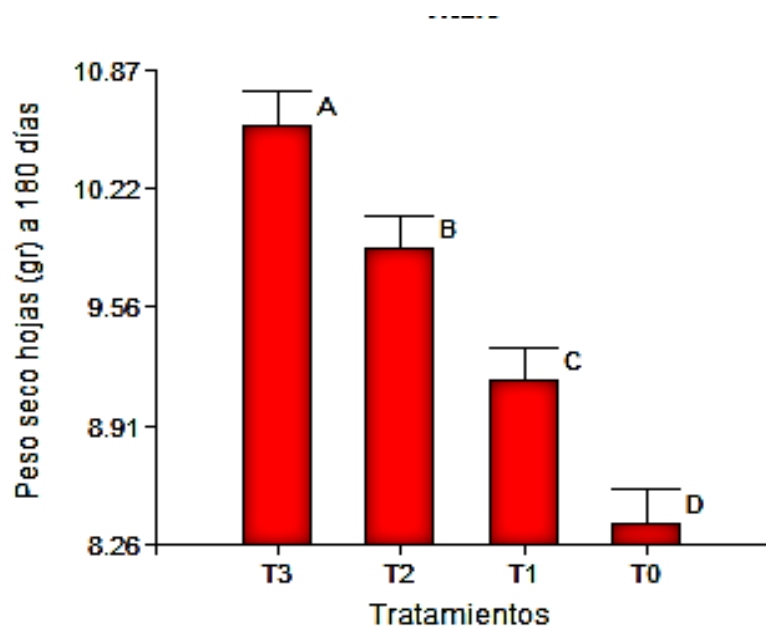


Gráfico 11. Prueba de Significación de Duncan – Peso seco de hojas a los 180 días

Los resultados de la prueba de Duncan sobre el peso seco a los 180 días (segundo corte), se ven reflejados en el Cuadro 23, demostrando que el tratamiento T_3 es el que presentó el mayor promedio con 10,57 g, respecto a los demás tratamientos; el tratamiento T_0 presentó el promedio más bajo, existiendo diferencias significativas entre todos los tratamientos; con un promedio de 9,88 g en el T_2 , en el tratamiento T_1 con 9,16 g y en el caso del testigo sin inocular con 8,38 g con estos resultados se puede deducir el rendimiento en kilogramos que se obtiene en comparación con el testigo y cuán beneficioso sería tener, como una muy buena alternativa,

la utilización de cepas nativas en lugar de fertilizantes químicos que se usan cotidianamente en la agricultura.

Cuadro 24. Análisis de Varianza – Volumen de raíz de la planta a los 180 días

F.V	GL	SC	CM	FC	F α	
					0,05	0,01
Bloques	2	2,82	1,41	2,21	5,14	10,92 Ns
Tratamientos	3	11,04	3,68	5,79	4,76	9,78*
Error	6	3,81	0,63			
Total	11	17,68				

CV: 10,94 %

Ns: no significativo

*Significativo

Referente al Cuadro 24, el análisis de varianza, evaluada al 95 % y 99 % de confianza respecto al volumen de la raíz a los 180 días, indica que no existe diferencias estadísticas entre los bloques, caso contrario sucede en los tratamientos donde la $F_{calculada}$ con 5,79 nos indica que en uno de los tratamientos se obtuvo un mayor promedio que los demás. El coeficiente de variabilidad fue de 10,94 % siendo aceptable para este experimento.

Cuadro 25. Prueba de Significación de Duncan – Volumen de raíz de la planta a los 180 días

Orden	Tratamientos	Promedio (ml)	Significación $\alpha=0,05$
1	T ₃ : <i>Azospirillum</i> sp. + <i>Azotobacter</i> sp.	8,68	a
2	T ₂ : <i>Azotobacter</i> sp.	7,62	a b
3	T ₁ : <i>Azospirillum</i> sp.	6,68	b
4	T ₀ : Testigo	6,16	b

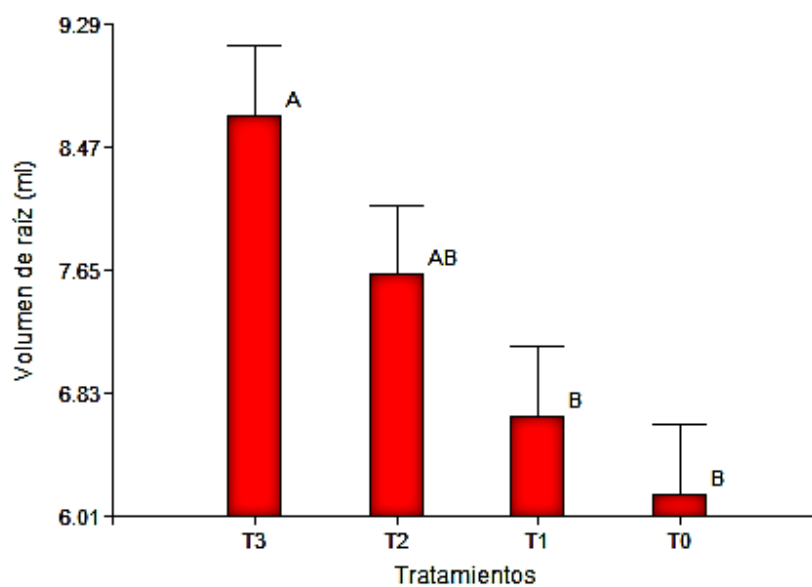


Gráfico 12. Prueba de Significación de Duncan – Volumen de raíz a los 180 días

En el Cuadro 25 se aprecia los resultados de la prueba de significación de Duncan del volumen de la raíz realizada en el último corte (180 días) demostrando que el promedio del tratamiento T_3 y del tratamiento T_2 no muestran diferencias significativas y que el promedio de los tratamientos T_2 y T_1 son similares al testigo (T_0); observándose que el tratamiento T_1 y el testigo es diferente al tratamiento T_3 el cual indica que es superior a los otros tratamientos.

V. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la presente tesis indican que la asociación entre cepas nativas de *Azotobacter* sp. + *Azospirillum* sp. (T₃) dieron mejores resultados; así como los hallados de los diferentes tratamientos (T₁, T₂) que fueron superiores al testigo sin inocular (T₀); donde se encontró que las variables influenciaron positivamente en el desarrollo de las plantas de orégano, así como lo indica **LÓPEZ** (2004); sobre la relación planta – bacteria, donde se muestra que las bacterias que fijan nitrógeno utilizan el carbono exudado por la planta en sus raíces, los cuales operan simultáneamente o en asociación como una fuente rica en energía de alto poder calórico (**BASHAN y LEVANONY**, 1990); el cual induce un incremento en el número y longitud de los pelos radicales (**BACILIO**, 2001) a lo que se suma las contribuciones al aumento de la masa seca de las plantas, a través de la enzima nitrato reductasa, para una mejor asimilación de los nitratos presentes en el suelo, o por los aportados a través de la fertilización inorgánica (**ELEIN et al.**, 2005).

También indicó **DIBUT** (2000), que en el suelo existe una notable población microbiana, dentro de la que se encuentran los microorganismos beneficiosos, todas ellas de suma importancia para el

normal establecimiento y aumento de la productividad de especies cultivables de importancia económica.

Con relación al efecto de diferentes rizobacterias estimuladoras del crecimiento vegetal sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas, en Cuba varios autores obtuvieron resultados positivos; en este sentido pueden citarse los trabajos realizados por **DIBUT** (2000) y **PULIDO** (2002) con la utilización de *Azotobacter chroococcum* en el cultivo de la cebolla y también **MARTÍNEZ** (2002) con aplicaciones de este microorganismo en el cultivo del tomate.

Otra fue la situación según **RIVERA** (1997), en posturas de cafeto cuando se aplicó bacterias rizosféricas combinadas con hongos MVA, donde en condiciones de suelo de media-alta fertilidad, se logró incrementar el efecto positivo de las MVA, indicando que se potencia la acción de estas y posiblemente como resultante de una interacción mutualista y complementaria entre estos microorganismos.

Por otra parte, según **PERNASETTI et al.** (2012); en un ensayo de inoculación con *Azospirillum brasilensis* en *Opuntia* (tuna), resultó en un aumento significativo de las raíces, característica de gran importancia

para esta planta que se desarrolla en zonas de aridez, ya que amplía la posibilidad de toma de agua y nutrientes sin olvidar también la importancia que tiene el mayor desarrollo radical en el anclaje de la planta en zonas ventosas. Así como los hallados en esta tesis, encontrándose que las raíces de los diferentes tratamientos (T_3 , T_2 y T_1) presentaron un volumen de (8,68; 7,62 y 6,68 ml) a diferencia del testigo sin inocular con 6,16 ml.

Así como los resultados obtenidos en la inoculación y co-inoculación en algodón según **ROTELA et al.** (2000); es evidente que el tratamiento con *Azospirillum* sp. presentando un promedio de 64,17 ml, respecto al volumen radical es superior al testigo que dio un promedio de 48,67 ml; así como también se evidenció en el peso seco de la planta (20,3 g) siendo inferior el testigo (16,3 g).

La ausencia de diferencias entre ambos tratamientos demuestra que *Azospirillum brasilense* (UAP-154) tiene características muy similares a *Azotobacter chroococcum*, bacteria a la cual se le confiere la habilidad de acelerar el crecimiento de las plantas, según **MARTÍNEZ** (1994); en igual sentido, el género *Azospirillum* sp. es considerado dentro del grupo de

"bacterias rizosféricas que promueven el crecimiento de las plantas", a través de un proceso hormonal.

Referente a la variable altura en esta investigación, entre los diferentes tratamientos, el testigo (T_0) fue quien mostró un menor valor (40,86 cm), indicando que con la inoculación de cepas nativas, se obtuvieron mejores resultados sobre el crecimiento de las plantas de orégano. Los resultados establecidos para esta variable coinciden con los expuestos por **DELGADO et al.** (2003) en el cultivo de café (*Coffea arabica*), donde los tratamientos con diversas cepas de *Azotobacter* sp. alcanzaron alturas de (37,30; 36,78 y 35,14 cm) superando en altura al testigo absoluto con 34,24 cm.

Según **ELEIN et al.** (2005), con relación al género *Azotobacter* se ha obtenido un efecto positivo sobre el crecimiento y desarrollo del cultivo de tomate, demostrándose la importancia de establecer altas poblaciones de esta bacteria en la rizósfera de las plantas a través de la aplicación de productos de origen bacteriano con el fin de obtener un mayor efecto agrobiológico positivo. También se muestra el efecto de *Azospirillum* sp. sobre el crecimiento de las posturas, obteniéndose las plántulas más

vigorosas en cuanto a la altura y la longitud de las raíces en los tratamientos donde se inoculó el biofertilizante AzoFert.

Se encontró que la inoculación con *Azotobacter chroococcum* en cultivo de tomate según **GONZÁLES et al.** (2000); pueden obtenerse plantas más desarrolladas y vigorosas, que cuando no se realiza esta labor, en este caso al utilizar el inoculante a partir de la cepa nativa FS-2 se obtuvo en general una mejor respuesta, superando incluso a la cepa de referencia INIFAT-12, estos resultados pueden estar dado además porque esta cepa fue obtenida precisamente del tipo de suelo donde se realizó el estudio.

EGAS (2010); en su investigación con *Azotobacter* comercial y nativo en plantas injertadas de cacao, se obtuvo mejores resultados con la cepa comercial que con la cepa nativa en comparación con el testigo presentando la cepa comercial una altura de 35,60 cm a diferencia del testigo con 32,54 cm y teniendo un promedio de 32,74 cm la cepa nativa; estos resultados difieren con los hallados en esta investigación ya que los mejores resultados se encontraron con cepas nativas del cultivo del orégano evidenciando que estas son mejores que la del testigo sin inocular.

En el estudio realizado por **CASTELLANOS et al.** (2013), quien encontró que en diferentes cepas del género *Azospirillum* asociados a los cultivos de orégano y tomillo dieron resultados diferentes respecto a la altura y peso fresco, evidenciando que la altura entre estos cultivos es poco visible, sin embargo, en el peso del follaje fue más evidente el efecto de algunas cepas de orégano dando mejores resultados con estas cepas (R12, YMA13, R2 y N4) que en tomillo con (R12 y YMA11).

También se probó la acción de una cepa nativa de *Azospirillum* sp., sobre la germinación del orégano, al inocularse se obtuvo mayor porcentaje de semillas germinadas (**PERNASETTI et al.**, 2012).

Los resultados de **GARCÍA et al.** (2005); de la repuesta del trigo a la inoculación con *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense* y *Azotobacter beijerinckii* y a la mezcla de *A. lipoferum* + *A. brasilense* (todos con 80 kg/ha de urea), dieron mejores resultados que el Control sin inocular.

Los resultados arrojados en esta investigación, por los diversos tratamientos en los análisis de peso fresco y seco de las hojas de orégano, indican una tendencia a obtener mejores resultados debido a la inoculación con *Azotobacter* sp. y *Azospirillum* sp.; que coincide con los

resultados obtenidos con la aplicación de otros biofertilizantes sobre plántulas de cacao de vivero (**AGUIRRE et al.**, 2007), donde no se registraron diferencias significativas para el área foliar entre los tratamientos, pero se observó la tendencia de mayores valores de esta variable con el uso de microorganismos benéficos para la raíz.

De acuerdo a los resultados obtenidos por **BORDA et al.** (2009), después de 180 días de evaluación en el cultivo de *Stevia rebaudiana*, se obtuvo una producción de biomasa fresca en el tratamiento control de 497 kg/ha mientras que en el tratamiento con el biofertilizante (*A. nigricans*) se obtuvo un valor de biomasa de 577 kg/ha, que equivale a un aumento del 15% en la producción. Esto demuestra una correlación positiva entre la aplicación de una bacteria fijadora de nitrógeno y el rendimiento de biomasa de *S. rebaudiana*. Siendo similar a los resultados de la presente investigación, donde se obtuvo un incremento de un 21 % de biomasa fresca, evaluada a los 180 días presentando el testigo un valor de 1 085,25 kg/ha a diferencia del tratamiento T₃ con 1 315,68 kg/ha.

Las plántulas crecidas en los tratamientos *Azotobacter chroococcum* + Cascarilla de cacao 35 %, registraron la mayor biomasa en fresco y seco (biomasa fresca = 36,7 g, biomasa seca = 4,55 g) siendo el testigo +

cascarilla de cacao 35 % con una biomasa fresca de 34,5 g y biomasa seca de 3,92 g (**CONSTANTINO et al.**, 2011). En contraste con los resultados obtenidos en el tratamiento T₂ (*Azotobacter* sp.) comparándolos con el testigo sin inocular se da un incremento de 37,42 g en biomasa fresca y una biomasa seca de 9,88 g a diferencia del testigo que presentó una biomasa fresca de 32,59 g y una seca de 8,38 g.

CASTILLA (2005), al realizar la evaluación de líneas interespecíficas de arroz (*Oryza* spp.) a la inoculación con las bacterias fijadoras de nitrógeno *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum amazonense* en el mismo suelo, concluye que la inoculación con *A. chroococcum* y *A. amazonense* y 50 % de la fertilización nitrogenada produjeron plantas de arroz más vigorosas, con mayor biomasa aérea y radical; especialmente en las líneas interespecíficas Cirad y Cirad CT13941 logró la mayor altura a los 60 días de siembra; sin embargo, a la cosecha este efecto no apareció.

Según **GONZÁLES et al.**, (2000) en cuanto al peso fresco de las plantas y longitud de la raíz de tomate se observan también diferencias significativas entre las cepas evaluadas y las plantas no inoculadas, entre las que se destaca la cepa nativa FS-2, con un incremento en cuanto al

peso fresco de 74 % respecto al testigo sin inocular y un 13 % con relación al testigo de referencia. En cuanto a la longitud de la raíz hubo un incremento del 44 y 9 % respectivamente, tomando como referencia a las variantes anteriormente mencionadas. Otros estudios con cultivos de pepino y lechuga se aprecian diferencias significativas entre los tratamientos en cuanto al porcentaje de materia seca, los mejores resultados se obtuvieron con la utilización de esta cepa nativa FS-2.

En los cultivos tratados con *Azospirillum brasilense* la producción de materia seca aérea y de raíces fue generalmente mayor que en los controles sin la aplicación de este tratamiento (DÍAZ et al., 2005). Este comportamiento es concordante con los efectos esperados por la presencia del microorganismo permitiendo mejoras relevantes en el crecimiento del cultivo de orégano y en su capacidad de exploración del suelo y uso eficiente de recursos tales como agua y nutrientes. De igual forma se evaluó el rendimiento del cultivo de trigo en las 4 campañas tratadas con *Azospirillum brasilense*, donde hubo aumentos de 229 kg/ha equivalente a aproximadamente el 6,5 % de mejora sobre el control sin inocular. Así como se obtuvo en el cultivo de orégano con la inoculación de *Azospirillum* sp. el cual presentó un promedio de 9 % superando al testigo.

Según **POZZON et al.** (1993), las especies de *Azospirillum* tienen potencial para incrementar los rendimientos de los cereales y gramíneas de importancia económica en diferentes regiones climáticas. Los efectos reportados por la inoculación de este microorganismo parece ser dependientes del tipo de planta hospedera, de la cepa de *Azospirillum* sp. usada y de las condiciones del medio ambiente.

RODRÍGUEZ et al., (1996); en su investigación con diferentes cepas de *Azospirillum* sp., se encontró que la respuesta del cultivo del trigo a la inoculación en la variable rendimiento dieron resultados estadísticamente similares al testigo sin ninguna inoculación ni fertilización química. Dado estos resultados con los hallados en esta tesis difieren estadísticamente al testigo, siendo la cepa de *Azospirillum* sp. superior referente al rendimiento del testigo.

Se conoce el importante papel que desempeña *Azotobacter* en el crecimiento y desarrollo de las plantas, incluso son capaces de incrementar el rendimiento de los cultivos, los valores varían de acuerdo con la bacteria y su afinidad por el cultivo, lo que indica especificidad del microorganismo e incluso de las cepas (**GONZÁLEZ**, 2000).

LOZADA et al. (2010), en Venezuela los biofertilizantes a base de *Azotobacter* spp., se han aplicado en diferentes municipios donde se lleva a cabo actividades agrícolas como el municipio Urdaneta, Pampan, Monay, en cultivos como yuca, hortalizas, cítricos, musáceas entre otros, en los cuales los productores han obtenido buenos resultados en rendimiento, con la aplicación de este biofertilizante, incluso muchos de estos hoy en día solo aplican estos productos biológicos y han dejado a un lado los fertilizantes tradicionales como el 12-12-12, 12-24-12, 15-15-15.

Finalmente **RIVERA** (1997); un aspecto interesante y que se abordó en los primeros experimentos, fue el concerniente a la necesidad de esterilizar el sustrato donde se desarrollan las posturas. Se encontró en los tres experimentos realizados con tales fines, que la esterilización previa del sustrato no solo fue innecesaria sino que en algunos casos ocasiona un efecto negativo, posiblemente asociado con la desaparición de los microorganismos que se establecen en la micorrizósfera y por ende la desaparición de las interacciones positivas y mutualistas entre ellos y la micorriza. Sin embargo, en la presente tesis se quiso trabajar sólo con sustratos estériles para ver únicamente el efecto de las bacterias en estudio y no se enmascare con el efecto de otros microorganismos presentes naturalmente en los sustratos utilizados.

VI. CONCLUSIONES

- Se llegó a incrementar el rendimiento de orégano (*Origanum vulgare* L.) variedad nigra; así como las otras variables en estudio, encontrándose, que la inoculación de cepas nativas, llevadas a cabo en el invernadero resultó provechosa; obteniéndose incrementos en el peso fresco y seco de las hojas, así como incrementos en la altura y en el volumen de las raíces.
- Se aislaron e identificaron cepas nativas del género *Azospirillum* y *Azotobacter* a partir del cultivo de *Origanum vulgare* L. (orégano) variedad nigra.
- Con la inoculación a base de *Azotobacter* sp. y *Azospirillum* sp., en los diferentes tratamientos evaluados, se incrementó la producción de peso fresco y seco, así como la altura y el volumen de las raíces del cultivo de *Origanum vulgare* L. variedad nigra, en comparación con el tratamiento testigo. Este hecho sugiere que puede ser considerado como una buena alternativa para mejorar las condiciones nutricionales y mantener una producción orgánica sostenible.

- Los mejores resultados en este trabajo se encontraron con la inoculación en el tratamiento T₃ (475,40 kg/ha); donde la asociación de cepas nativas de *Azospirillum* sp. y *Azotobacter* sp., dieron resultados superiores al testigo sin inocular (377,13 kg/ha), con un incremento en un 12 % del rendimiento del peso seco de hojas de orégano.

VII. RECOMENDACIONES

- 1.** Aislar bacterias nativas fijadoras de nitrógeno de diversos cultivos agrícolas, para comprobar la capacidad de fijación de las mismas y posteriormente, sacar al mercado productos comerciales adecuados para cada cultivo de importancia económica para nuestro país.
- 2.** Se recomienda realizar ensayos de inoculación con los mismos tratamientos estudiados, a nivel de campo en el cultivo de orégano y en otros cultivos agrícolas de importancia regional.
- 3.** Desarrollar esta investigación en otras localidades de la Provincia Tacna, Tarata, Candarave y Jorge Basadre; donde se cultiva orégano a nivel de campo.
- 4.** Realizar investigaciones a partir de diferentes concentraciones de cepas nativas (UFC/ml) y así probar la eficiencia de estas cepas en otros suelos y cultivos.
- 5.** Realizar estudios comparativos con productos comerciales a base de microorganismos promotores de crecimiento vegetal.

6. Desarrollar investigaciones en combinación, con diferentes concentraciones de abono nitrogenado a nivel de invernadero y campo.

7. Realizar investigaciones a base de bacterias nitrificantes, bajo condiciones controladas ya sean físicas (temperatura y humedad) y químicas (pH, salinidad), así como la concentración de microorganismos al inicio y al término de la experimentación, para determinar las condiciones óptimas de desarrollo.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **ACUÑA**, O.; W. Peña; E. Serrano; L. Pocasangre; F. Rosales; E. Delgado; J. Trejos & A. Segura. (2006). “La importancia de los microorganismos en la calidad y salud de suelos”. Santa Catarina – Brasil.
2. **AGUADO**, A.; B. Moreno. (2008). “Potencial de bioinoculantes microbianos como una alternativa para reducir costos de fertilización en maíz de temporal”. México.
3. **AGUILAR**, X; G. Valle; G. González; B. murillo. (2013). “Guía de cultivo de orégano”. México.
4. **AGUIRRE**, F. A. Mendoza; J. Cadena & C. Avendaño. (2007). “Efecto de la biofertilización en vivero del cacao (*Theobroma cacao* L.) con *Azospirillum brasiliense* y *Glomus intraradices*”. México.
5. **ALARCÓN**, A; R. Ferrera. (2000). “Biofertilizantes: importancia y utilización en la agricultura”. México.

6. **BACH**, T.; M. Díaz. (2009). “Las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) en la agricultura”. La Habana – Cuba.
7. **BACILIO**, F. (2001). “Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*”. Francia.
8. **BARRÓN**; J. Hallmann & E. Rueda. (2009). “Bacterias promotoras de crecimiento vegetal”. México.
9. **BASHAN**, Y. & H. Levanovy. (1990). “Current Status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture”. Canadá.
10. **BERGEY’S**. “Manual of Systematic Bacteriology”. (2005). Second edition. Volume two; George M. Garrity. USA.
11. **BORDA**, D.; J. Pardo; M. Martínez; J. Montaña. (2009). “Producción de un biofertilizantes a partir de un aislamiento de *Azotobacter nigricans*, obtenido en un cultivo de *Stevia rebaudiana* bert”. Colombia.

- 12. CABALLERO, J.** (2012). Programa de ecología molecular y microbiana, Centro de investigación sobre fijación de nitrógeno, UNAM. México.
- 13. CABALLERO, J.; J. Onofre; A. Wong y R. Castro.** (2009). “Uso de *Azospirillum* como biofertilizante y potencial de nuevas especies bacterianas como biofertilizantes, agentes de biorremediación y biocontrol de fitopatógenos”. México.
- 14. CAPPELLETTI, C.** (1992). Estadística Experimental. Editorial Agrovet. Primera edición. Buenos Aires – Argentina.
- 15. CASTELLANOS, T.; T. Aguilar; E. Felix; A. Carrillo.** (2013). “Uso de bacterias como biofertilizantes en la producción de orégano y tomillo”. México.
- 16. CASTILLA, L.** (2005). Evaluación de líneas interespecíficas de arroz (*Oryza spp*) a la inoculación con las bacterias fijadoras de nitrógeno *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum amazonense* en un *Typic haplustalf* de la meseta de Ibagué”. Colombia.

- 17. CHÁVARRI**, J.; A. Alegría; B. Santander; E. Arróniz; B. Zuñiga & J. Portu. (2004). "Impactos ambientales en agricultura". España.
- 18. CHIRINOS**, J.; A. Leal & J. Montilla. (2006). "Uso de Insumos biológicos como alternativa para la agricultura sostenible en la zona sur del estado Anzoátegui". Venezuela.
- 19. CONSTANTINO**, M.; R. Gómez; J. Álvarez; J. Pat & E. Espín. (2011). "Efecto de la inoculación de *Azotobacter chroococcum* y *Glomus intraradices* en el crecimiento y nutrición de plántulas de papaya en fase de vivero". México.
- 20. CURÁ**, J.; C. Ribaudó; A. Gaetano; H. Ghiglione. (2005). "Utilidad de las bacterias promotoras del crecimiento y fijadoras de nitrógeno en el cultivo del arroz durante las primeras etapas de desarrollo". Buenos Aires – Argentina.
- 21. DELGADO**, Y.; R. Cupull; C. Pérez; A. Sánchez; M. Vilchez. (2003). "Efecto de *Azotobacter* spp. en la estimulación de la germinación y el desarrollo de posturas de *Coffea arabica* L."

- 22. DÍAZ, M.;** R. Baliña; M. Fernández; A. Peticari. (2005) “Rendimiento de cultivos de trigo en la región pampeana inoculados con *Azospirillum brasiliense*”. Argentina.
- 23. DÍAZ, P & E. Márquez.** (2011). “Validación de los biofertilizantes azotobacter, rhizobium y fosforina en cuatro sistemas de cultivos en condiciones de producción”. Cuba.
- 24. DÍAZ, P.;** R. Ferrera; J.J. Almaraz; g. Alcántar. (2001). “Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga”. Chapingo – México.
- 25. DIBUT, B.** (2000). “Obtención de un bioestimulador del crecimiento y el rendimiento para el beneficio de la cebolla (*Allium cepa*, L)”. Cuba.
- 26. DIBUT, B.;** M. Ortega; R. Martínez; G. Saavedra; T. Shagarodsky; L. fey. (2009). “Contribución de los biofertilizantes a una agricultura sin contaminación”. INIFAT. La Habana – Cuba.
- 27. DIRECCIÓN REGIONAL AGRICULTURA (DRA - Tacna).** (2013). “Tacna: producción y exportación de aceituna, orégano y cebolla”. Perú.

- 28. EGAS, J.** (2010). “Efecto de la inoculación con *Azotobacter* sp. en el crecimiento de plantas injertadas de cacao (*Theobroma cacao*), genotipo nacional, en la Provincia de Esmeraldas”. Quito – Ecuador.
- 29. ELEIN, T.; A. Leyva & A. Hernández.** (2005). “Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill)”. Colombia.
- 30. ELEIN, T.** (1998). “Efectividad agronómica de biofertilizantes en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill)”. La Habana – Cuba.
- 31. ESTRADA, G.** (2008). “Calidad de inoculantes almacenados a diferentes temperaturas: Efecto sobre la población, humedad y pH del producto”. Colombia.
- 32. FAO & Asociación Internacional de la Industria de los Fertilizantes (IFA).** (2002). “Los fertilizantes y su uso”. Cuarta edición. Roma.
- 33. FENGLEROWA, W.** (1965). Simple method for counting *Azotobacter* in soil samples. Acta Microbiológica Polonica.

- 34. FORNASERO, L.;** M. Toniutti; S. Gambaudo; H. Micheloud. (2001) “Fertilización biológica. Bacterias promotoras de crecimiento vegetal” Argentina.
- 35. FRIONI, L.,** (1999). Procesos microbianos. Editorial de la Fundación Universidad Nacional de Río de Cuarto. Argentina.
- 36. GARCÍA, M.;** R. Farías; J. Peña; J. Sánchez. (2005). “Inoculación del trigo var. pavón con *Azospirillum* spp y *Azotobacter beijerinckii*”. México.
- 37. GONZÁLES G.** (1986). Efecto de diferentes dosis de Azotobacter y frecuencia de aplicación de Agrispon sobre la Calidad y productividad en el crecimiento de la cebolla (*Allium cepa* T). Cajamarca.
- 38. GONZÁLES, M.;** I. Corrales; R. Martínez; A. Reyes; R. Curbelo & V. Méndez. (2000). “Nuevas cepas nativas promotoras del crecimiento vegetal”. Cuba.

- 39. GONZÁLEZ, M.** (2000). “Efecto de un inoculante microbiano a partir de cepas nativas de *Azotobacter chroococcum* sobre el rendimiento en secuencias de cultivos hortícolas”. Cuba.
- 40. HERNÁNDEZ, A.; N. Rives; A. Caballero; A. Hernández & M. Heydrich.** (2004). “Caracterización de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz en la producción de metabolitos del tipo AIA, sideróforos y ácido salicílico”. La Habana – Cuba.
- 41. HUMPIRE, A.** (2012). Guía Técnica: “Asistencia técnica dirigida en manejo integrado de plagas en el cultivo de orégano”. Moquegua – Perú.
- 42. INEI.** (2012). IV Censo Nacional Agropecuario (CENAGRO). Instituto Nacional de Estadística e Informática. Perú.
- 43. JIMÉNEZ, D.** (2007). “Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de *Azotobacter* spp. Mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal 16S”. Colombia.

- 44. JIMÉNEZ, R.;** G. Virgen; S. Tabares; V. Olalde. (2001). “Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: agro-biotecnología”. México
- 45. KLAUER, D.** (2009). “Manual técnico de cultivo ecológico de orégano (*Origanum sp L.*)”. Taller de asociación de promoción y desarrollo. Arequipa – Perú.
- 46. LÓPEZ, L.** (2004). “Bacterias Promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas”. México.
- 47. LOZADA, L.;** C. Rivas. (2010). “Evaluación del efecto de la inoculación con *Azotobacter spp* en plantas de ají dulce (*Capsicum frutescens*)” Universidad de los Andes. Núcleo Universitario “Rafael Rangel”. Venezuela.
- 48. MARTÍNEZ, V.** (1994). “El uso de biofertilizantes. Curso de agricultura orgánica”. La Habana – cuba.
- 49. MARTÍNEZ, V.** (2002). “Biofertilización y producción agrícola sostenible. Retos y perspectivas”. La Habana Cuba.

- 50. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y RIEGO (MINAGRI).** (2015). En:
<http://minagri.gob.pe/portal/22-sector-agrario/vision-general/190>.
- 51. NAREDO, J.M.** (1991). “La agricultura ecológica en perspectiva”. En
cuadernos del banco de crédito agrícola, nº 3, pp. 7-20. Madrid.
- 52. NOVO B.** (1993). Microbiología del suelo y biofertilización. En
memorias de la fundación de asesorías para el sector rural. Santa fe
de Bogotá.
- 53. PÉREZ, A.; C. Landeros.** (2009). “Agricultura y deterioro ambiental”.
pág. 19 – 25. México.
- 54. PERNASETTI S. & G. Di Barbaro.** (2012). “Rizobacterias promotoras
de crecimiento vegetal como biofertilizantes”. Editorial científica
universitaria volumen 2, N°2. Universidad nacional de Catamarca -
Argentina.
- 55. POZZON, G.; H. Giorgetti; R. Martínez; G. Aschar.** (1993).
“Biofertilización del trigo por inoculación con cepas nativas de
Azospirillum brasiliense”. Cuba.

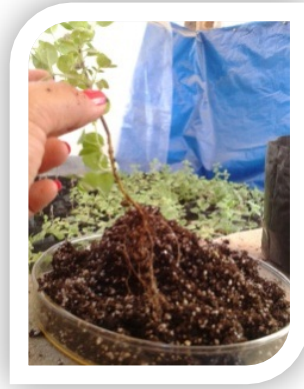
- 56. PULIDO, L.** (2002). "Manejo integrado de biofertilizantes para la producción de posturas de alta calidad en los cultivos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y cebolla (*Allium cepa*, L) sobre suelos ferralíticos rojos de Ciego de Ávila". Cuba.
- 57. REYES, I.;** L. Álvarez; H. El-Ayoubi y A. Valery. (2008). "Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz". San Cristóbal – Venezuela.
- 58. RIVERA, D.** (2008). "Optimización de un medio de cultivo para la producción de un inoculante con base en *Azospirillum brasilense* C16". San José de Cúcuta – Colombia.
- 59. RIVERA, R.** (1997). "Efecto de la inoculación con hongos micorrizógenos V.A. y bacterias rizosféricas sobre el crecimiento de las posturas de café". Cuba.
- 60. ROCA W. & L. Mroginski.** (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali – Colombia.

- 61. RODRÍGUEZ, C.;** F. Sevillano & P. Subramaniam. (1984). La fijación de nitrógeno atmosférico – Una biotecnología en la producción agraria. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología. 1era edición por CeresNet. España.
- 62. RODRÍGUEZ, E.;** C. Di ciocco; J. Pacheco. (1996). “Influencia de la inoculación con *Azospirillum brasiliense* en trigo cultivado en suelos de la provincia de la Pampa”. Argentina.
- 63. ROTELA, D.;** M. Díaz; I. Miceli. (2000). “Inoculación y co-inoculación con *Azospirillum* sp. En algodón (*Gossypium hirsutum*) var. Guazuncho”. Argentina.
- 64. RUBIO, I.;** J. Navarrete; G. Aguado. (2003). “Caracterización biológica y molecular de bacterias promotoras de crecimiento en vegetales para uso agrario del estado de Guanajuato”. México.
- 65. RUEDA, E.** (2003). “Estudio de la fenología y potencial productivo de la Halofita *Salicornia bigelovii* (Torr.) con la asociación de bacterias fijadoras de nitrógeno”. México.

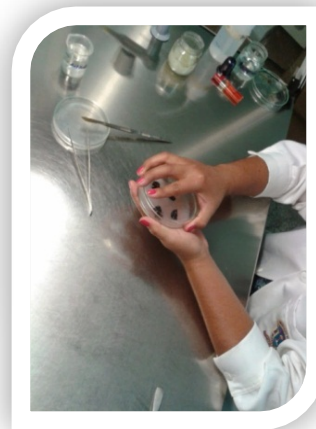
- 66. SALAS, F.** (2013). "TACNA: Producción y exportación de aceituna, orégano y cebolla". Dirección Regional de Agricultura. Tacna – Perú.
- 67. SÁNCHEZ M.** (2004). Microbiología de suelos: Técnicas, métodos y medios de cultivo. Universidad Nacional Autónoma de México
- 68. SANTILLANA, N.** (2006). "Producción de biofertilizantes utilizando *Pseudomonas sp.*". Perú.
- 69. SCHOEBITZ, M.** (2006). "Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de *Lolium perenne* L. de suelo volcánico (modelo género *Azospirillum spp.*). Valdivia – Chile.
- 70. TAJKTAJAN, A.** (1983). Sistema de clasificación de plantas. Rusia.

IX. ANEXOS

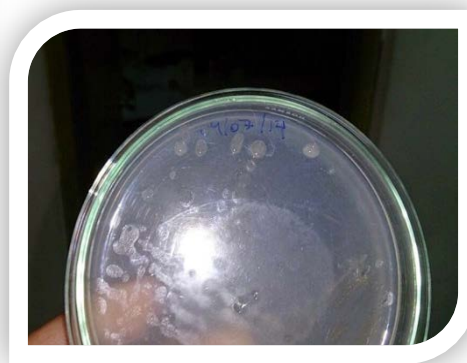
ANEXO 1. Recolección de suelo y raíz.



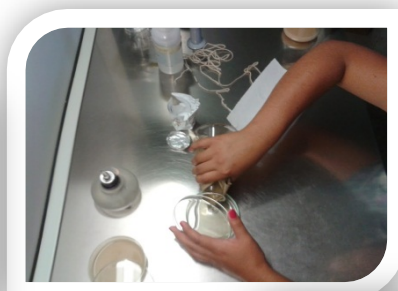
ANEXO 2. Aislamiento de *Azotobacter* sp. – Técnica de gránulos de suelo.



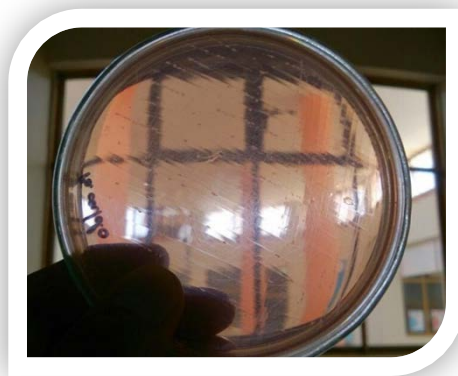
ANEXO 3. Incubación y aislamiento de *Azotobacter* sp en medio Ashby.



ANEXO 4. Aislamiento de *Azospirillum* sp.



ANEXO 5. Aislamiento de *Azospirillum* sp. – Agar Rojo de Congo Ácido Málico.



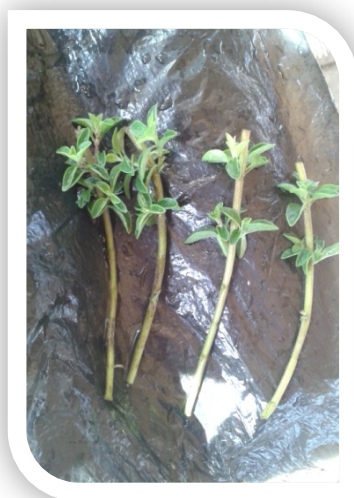
ANEXO 6. Producción de biomasa.



ANEXO 7. Preparación de los inóculos según los tratamientos a base de *Azospirillum* sp. y *Azotobacter* sp.



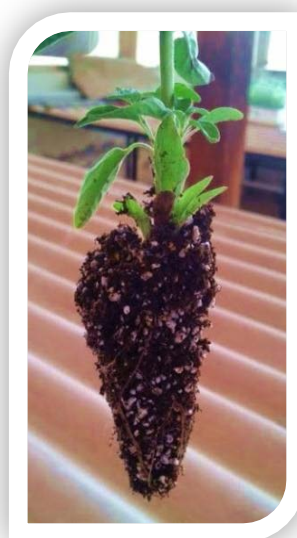
ANEXO 8. Esquejes de plantas de orégano e inoculación.



ANEXO 9. Preparación y esterilización del sustrato.



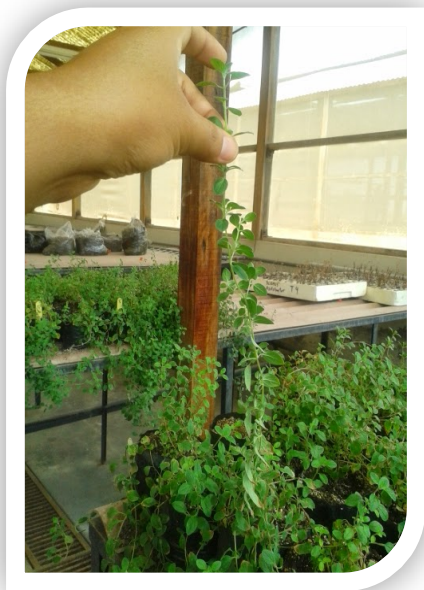
ANEXO 10. Bandejas de enraizamiento.



ANEXO 11. Tratamientos de orégano en invernadero.



ANEXO 12. Evaluaciones de plantas de orégano.



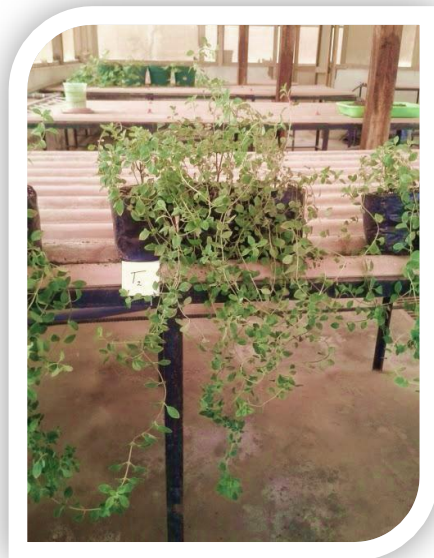
Medición de altura de la planta a los 90 y 180 días



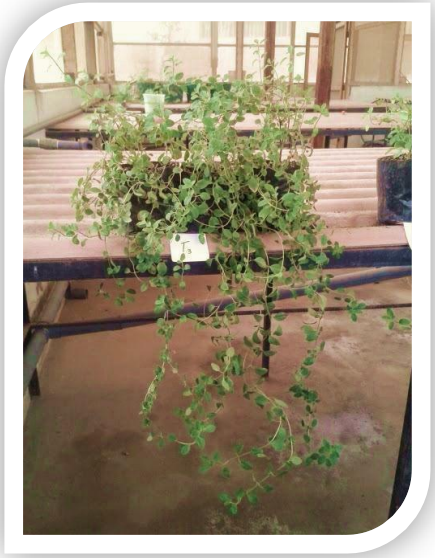
Tratamiento T₀



Tratamiento T₁



Tratamiento T₂



Tratamiento T₃



Primer corte (90 días)



Segundo corte (180 días)



Estufa – secado de hojas de orégano



Peso seco de hojas por cada tratamiento



Volumen de raíz de diferentes tratamientos

ANEXO 13. Datos meteorológicos registrados durante la ejecución del experimento (2014 – 2015).

MESES	TEMPERATURA (°C)	
	MÁXIMA	MÍNIMA
2014 12 09	13	28
2014 17 09	14	28
2014 24 09	13	27
2014 20 10	13	30
2014 31 10	13	31
2014 06 11	16	31
2014 14 11	16	31
2014 19 11	15	33
2014 28 11	17	32
2014 05 12	16	32
2014 12 12	18	33
2014 19 12	18	33
2014 26 12	18	34
2015 05 01	18	34
2015 09 01	18	34
2015 19 01	18	34
2015 03 02	19	35
2015 13 02	20	35
2015 02 03	19	35
2015 04 03	19	35
2015 09 03	19	35
2015 01 04	19	36

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO 14. Composición del medio de cultivo NFB.

Reactivo	Cantidad (g/L)
Ácido málico	5,0
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
CaCl ₂	0,02
Solución de micronutrientes	2 ml
Azul de bromotimol	Sol. 0,5%
En KOH 0,2 N	2 ml
Fe EDTA sol 1,64%	4 ml
KOH	4,5
Solución Vitamínica	1 ml
Agar	15,0
Agua destilada	1 000 ml

ANEXO 15. Medio de cultivo Asbhy.

Reactivo	Cantidad (g/L)
Glucosa	10,0
Manitol	10,0
KH ₂ PO ₄	1,0
NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O	2,36
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2
CaCl ₂	0,13
FeSO ₄ *7H ₂ O	0,01
MnSO ₄ *2H ₂ O	0,001
NaMoO ₄ *2H ₂ O	0,002 5
NaCl	0,2
CaCO ₃	5,0
Agar	15,0
Agua destilada	1 000 ml

ANEXO 16. Medio de cultivo rojo de congo ácido málico.

Reactivo	Cantidad (g/L)
Ácido málico	5,0
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
Extracto de levadura	0,5
FeCl ₃ *6H ₂ O	0,015
KOH	4,8
Solución Vitamínica	1 ml
Agar	15,0
Solución Rojo Congo (1:400)	15 ml*
* Esterilizado por filtración. pH 6,5	
Agua destilada	1 000 ml

ANEXO 17. Diseño experimental (DBCA).

Bloques			
	I	II	III
Tratamientos	T ₂	T ₀	T ₁
	T ₁	T ₂	T ₂
	T ₀	T ₃	T ₀
	T ₃	T ₁	T ₃

Fuente: Elaboración propia.



Bach. Fernanda Vanessa Pérez García

TESISTA



Dr. Daladier Castillo Cotrina

ASESOR