

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



TESIS

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y SELECCIÓN DE BIOINOCULANTES DE
BACTERIAS NITRIFICANTES DE LA SUB FAMILIA CAESALPINIOIDEAE
DEL PONGO DE QOÑEC, VALLE DE KOSÑIPATA, CUSCO**

PRESENTADA POR:

- Br. WENDINA YOSHIN COLQUE PINEDA
- Br. YESENIA KATERIN PERCCA LIPE

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL
DE BIÓLOGO**

ASESORA:

Dra. HELDY YIYI ESPINOZA CARRASCO

CO-ASESOR:

Dr. ISAU HUAMANTUPA CHUQUIMACO

CUSCO – PERÚ

2024

INFORME DE ORIGINALIDAD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-303-2020-UNSAAC)

El que suscribe, **Asesor** del trabajo de investigación/tesis titulada: "Caracterización fenotípica y selección de Bioinoculantes de bacterias nitrificantes de la sub familia. Caesalpinioideae del Pongo de Boñec, Valle de Kosñipata, Cusco".

presentado por: Yesenia Katerin Percca Lipe con DNI Nro.: 70420462 presentado por: Wendina Yoshin Colque Pinedo con DNI Nro.: 73763120 para optar el título profesional/grado académico de Biologo

Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por 2 veces, mediante el Software Antiplagio, conforme al Art. 6° del **Reglamento para Uso de Sistema Antiplagio de la UNSAAC** y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de 9%.

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No se considera plagio.	X
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las correcciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, quien a su vez eleva el informe a la autoridad académica para que tome las acciones correspondientes. Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	

Por tanto, en mi condición de asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y adjunto la primera página del reporte del Sistema Antiplagio.

Cusco, 17 de Octubre de 2024



Firma

Post firma Hedy Yiyi Espinoza Carrasco

Nro. de DNI 23826797

ORCID del Asesor 0000-0002-4016-8815

Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio: oid: 27259:393713496

NOMBRE DEL TRABAJO

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y SELECCIÓN DE BIOINOCULANTES DE BACTERIAS NITRIFICANTES DE LA SUB FAMILI

AUTOR

Wendina Colque, Yesenia Percca

RECUENTO DE PALABRAS

31758 Words

RECUENTO DE CARACTERES

185745 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

165 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

16.0MB

FECHA DE ENTREGA

Oct 17, 2024 6:08 AM GMT-5

FECHA DEL INFORME

Oct 17, 2024 6:11 AM GMT-5**● 9% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 9% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 3% Base de datos de trabajos entregados
- 1% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Material citado
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 12 palabras)

DEDICATORIA

A Dios padre todo poderoso por su infinita gratitud por guiar mi camino y ser la mayor fuente de fortaleza, felicidad y sabiduría en mi vida.

A mis padres: Wilber y Rosaura, Por brindarme las herramientas necesarias para mi formación integral, por ser partícipe de mis decisiones, por orientarme, ser la base de mi inspiración, refugio de amor, esperanza y apoyo constante.

A mis hermanos: Ronnie, Teoval, por ser motivo de alegría, lucha y vida. Por acompañarme en todo momento y por ser paciente frente a las dificultades. por el estímulo y apoyo incondicional.

A mi abuela Lucia por su ejemplo de vida y valores, a mis abuelos que hoy se encuentran en el reino celestial, porque desde allí me han protegido y enviado las fuerzas necesarias para luchar.

Wendina Yoshin Colque Pineda

DEDICATORIA

A Dios por guiarme en cada paso que doy, por ser mi fortaleza en los momentos más difíciles, por el infinito amor, amor que trasciende más allá de cualquier barrera y sabiduría que día con día me demuestra.

A mis amados padres, Mario y Cecilia por ser los principales impulsores y motivadores en mi desarrollo profesional y sobre todo por creer en mis sueños, quienes con su apoyo y amor incondicional me guiaron por el camino correcto, demostrándome siempre que a pesar de la adversidad habrá una luz de esperanza, que todo en la vida tiene solución y por hacer de mí una mujer empoderada y luchadora.

A mis hermanas Gaby, Elizabeth y Maria por ser mi motivación a seguir adelante con mi proyecto, por ser el soporte y paciencia que necesito en medio de tanta de turbación.

A mis amistades más cercanas por su comprensión y apoyo moral incondicional.

A Dios padre amado que a pesar de mis dificultades siempre estuvo guiándome y dándome mucha fortaleza en cada paso que fui dando.

Yesenia Katerin Percca Lipe

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, queremos agradecer a Dios, por fortalecernos e iluminar nuestra mente y corazón, por poner en nuestro camino a personas tan maravillosas.

A nuestra asesora de la tesis Dr. Blga. Hedy Y. Espinoza Carrasco, un agradecimiento muy especial por apoyarnos incondicionalmente, alentándonos en la realización del proyecto, por su valiosa colaboración en el desarrollo del mismo. El agradecimiento y admiración por compartir sus conocimientos, por su confianza, consideración y por su amistad.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Blgo. Isau Huamantupa Chuquimaco por su apoyo incondicional, por su amistad y paciencia.

A la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco por abrirnos las puertas y brindarnos la oportunidad de ampliar nuestros conocimientos en pro de la superación personal y formación profesional.

A todos nuestros amigos por tener un apoyo y aliento, por con fortarnos en momentos difíciles y ayudarnos en este proceso.

INDICE

	pág.
CAPITULO I.....	i
INTRODUCCIÓN	i
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	iii
JUSTIFICACIÓN	iv
OBJETIVOS	v
HIPÓTESIS.....	vi
VARIABLES	vii
MARCO TEÓRICO Y CONCEPTO.....	1
1.1 ANTECEDENTES DEL ESTUDIO.....	1
1.1.1. Internacionales	1
1.1.2. Nacionales	4
1.1.3. Locales	5
1.2. MARCO CONCEPTUAL	6
1.2.1. Familia Leguminosae	6
1.2.2. Subfamilia Caesalpinioideae	6
1.2.3. Clasificación taxonómica actual de la Subfamilia <i>Caesalpinioideae</i>	7
1.2.4. Fijación biológica de nitrógeno (FBN)	13
1.2.5. Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas	13
1.2.6. Bacterias fijadoras de nitrógeno en leguminosas	14
1.2.7. Funcionamiento del nódulo.....	14

1.2.8. Fases de infección y formación de nódulo	16
1.2.9. Taxonomía de bacterias fijadoras de nitrógeno en leguminosas.....	17
1.2.10. Género <i>Rhizobium</i>	18
1.2.11. Género <i>Bradyrhizobium</i>	18
1.2.12. Género <i>Sinorhizobium</i>	18
1.2.13. Aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno	19
1.2.14. Caracterización fenotípica.....	19
1.2.15. Características morfológicas	19
1.2.16. Bacterias con potencial bioinoculante.....	20
1.2.17. Crecimiento de Rhizobios a diferentes condiciones ambientales	20
CAPÍTULO II	22
MATERIALES Y MÉTODOS	22
2.1. ÁREA DE ESTUDIO	22
2.1.1. Ubicación geográfica.....	22
2.2. MATERIALES	23
2.2.1. Material biológico	23
2.2.2. Materiales de campo.....	23
2.2.3. Material de laboratorio	24
2.2.4. Equipos y aparatos de laboratorio	25
2.2.5. Medios de cultivos y Reactivos.....	25
2.3. METODOLOGÍA	26

2.3.1. Flujograma de la metodología de investigación.....	26
2.3.3. Determinación de las especies arbóreas de la Subfamilia Caesalpinioideae.	30
2.3.4. Selección y recolección de nódulos radiculares	32
2.3.5. Aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno	33
2.3.5.1. Preparación de nódulos radiculares	34
2.3.5.2. Aislamiento de bacterias nitrificantes obtenidas de nódulos radiculares	35
2.3.6. Caracterización fenotípica de colonias aisladas	40
2.3.6.1. Diferenciación morfológica de colonias aisladas	40
2.3.6.2. Diferenciación de pruebas bioquímicas.....	40
2.3.6.3. Identificación de géneros de bacterias nitrificantes de la subfamilia Caesalpinioideae.....	43
2.3.7. Selección del potencial bioinoculante de bacterias nitrificantes.....	46
2.3.7.1. Tolerancia a pH	46
2.3.7.2. Tolerancia a Salinidad	46
2.3.7.3. Tolerancia a Temperatura.....	47
2.3.8. Análisis estadístico.....	48
CAPÍTULO III.....	50
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
3.1. RESULTADOS.....	50
3.1.1. Identificación de especies arbóreas de la subfamilia Caesalpinioideae	50
3.1.2. Caracterización morfológica de nódulos radiculares presentes en especies arbóreas de la subfamilia Caesalpinioideae	52

3.1.3. Aislamiento de cepas fijadoras de nitrógeno presentes en especies arbóreas de la subfamilia Caesalpinioideae.....	60
3.1.4. Identificación a nivel de género y morfoespecies de bacterias nitrificantes presentes en la subfamilia Caesalpinioideae	62
3.1.4.1. Caracterización fenotípica de colonias aisladas	63
3.1.4.2. Diferenciación de pruebas bioquímicas.....	67
3.1.4.3. Géneros y morfoespecies identificadas	73
3.1.5. Determinación del potencial bioinoculante de bacterias nitrificantes de nitrógeno aisladas de especies arbóreas de la subfamilia Caesalpinioideae.....	77
3.1.5.1. Tolerancia a concentraciones de NaCl (1.5, 2.5, 4, 6 y 8%)	77
3.1.5.2. Tolerancia a diferentes valores de pH (2, 4, 8 y 9).....	82
3.1.5.3. Crecimiento a diferentes temperaturas (4, 13 y 40°C)	86
CONCLUSIONES	91
RECOMENDACIÓN	92
BIBLIOGRAFÍA	93
ANEXOS.....	102

Índice de figuras

Figura N° 1: Clasificación taxonómica de la Subfamilia Caesalpinioideae...	8
Figura N° 2. Morfología del género	10
Figura N° 3: Infección y formación de nódulo.....	16
Figura N° 4: Mapa de ubicación del bosque amazónico Pongo de Qoñec.....	22
Figura N° 5: Flujograma de recolección de especies arbóreas y nódulos de la subfamilia Caesalpinioideae.	26
Figura N° 6: Flujograma de preparación de nódulos radiculares.	27
Figura N° 7: Flujograma de aislamiento de bacterias nitrificantes	27
Figura N° 8: Flujograma de caracterización fenotípica de colonias aisladas.....	28
Figura N° 9: Flujograma de selección del bioinoculante de bacterias nitrificantes.....	28
Figura N° 10: Recolección de especies arbóreas de la Subfamilia Caesalpinioideae que presentan nódulos	31
Figura N° 11: Excavación del suelo para obtención de nódulos	32
Figura N° 12: Obtención y transporte nódulos bacterianos.....	33
Figura N° 13: Proceso de aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno	33
Figura N° 14: Hidratación de nódulos.....	34
Figura N° 15: Desinfección y trituración de nódulo	35
Figura N° 16: Siembra en la placa en el medio ELMARC.....	37
Figura N° 17: Diluciones en el medio de cultivo ELM.....	37
Figura N° 18: Siembra de inoculos en el medio ELMA.	38
Figura N° 19: Siembra en el medio ELMA por agotamiento en superficie.....	38
Figura N° 20: Preservación de cepas aisladas en glicerol	38
Figura N° 21: Tinción Gram..	40
Figura N° 22: Prueba de catalasa.	43

Figura N° 23: Reacción de acidez o alcalinidad.	44
Figura N° 24: Morfología de colonias y rasgos característicos de bacterias formadoras de nódulos cultivados en medio ELMA..	45
Figura N° 25: Siembra en placas en el medio ELMA a diferentes pHs..	46
Figura N° 26: Siembra en placas en el medio ELMA de NaCl.....	47
Figura N° 27: Siembra en placas en el medio ELMA a diferentes temperaturas.....	47
Figura N° 28: Identificación de especies arbóreas de la subfamilia <i>Caesalpinioideae</i>	50
Figura N° 29: Identificación de especies arbóreas y codificación de nódulos radiculares.....	52
Figura N° 30: Crecimiento y aislamiento de cepas.....	61
Figura N° 31: Características fenotípicas de cepas aisladas	63
Figura N° 32: Crecimiento rápido y lento.	66
Figura N° 33: Pruebas bioquímicas TSI y MIO	69
Figura N° 34: Prueba de alcalinidad y acidez en ELMA+AB	71
Figura N° 35: Identificación de géneros fijadores de nitrógeno	73
Figura N° 36: Morfoespecies de los géneros <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Rhizobium</i> y <i>Sinorhizobium</i>	74
Figura N° 37: Crecimiento a concentraciones de NaCl.....	77
Figura N° 38: Tolerancia a concentraciones de NaCl	79
Figura N° 39: Aporte del porcentaje de las varianzas al análisis de componentes principales (NaCl)	79
Figura N° 40: Análisis de componentes principales (PCA) de las morfoespecies (NaCl).....	79
Figura N° 41: Crecimiento a diferentes pH.....	82
Figura N° 42: Tolerancia a diferentes pH	83
Figura N° 43: Aporte del porcentaje de las varianzas al análisis de componentes principales (pH).....	83
Figura N° 44: Análisis de componentes principales (PCA) de las morfoespecies (pHs).....	84

Figura N° 45: Crecimiento a diferentes temperaturas	86
Figura N° 46: Crecimiento a diferentes temperaturas (Placas con medio ELMA a una temperatura de 4, 13 y 40°C)	87
Figura N° 47: Aporte del porcentaje de las varianzas al análisis de componentes principales(temperatura)	88
Figura N° 48: Análisis de componentes principales (PCA) de las morfoespecies sometidas a diferentes temperaturas.	89

Índice de tablas

Tabla N° 1: Medio de cultivo Extracto de levadura-Manitol (ELMA)	35
Tabla N° 2: Medio de cultivo Extracto de levadura-Manitol-Agar-Rojo Congo.....	36
Tabla N° 3: Composición para la preparación de 1 litro del medio (TSI)	41
Tabla N° 4: Composición para la preparación de 1 litro del medio (MIO).....	42
Tabla N° 5: Características morfológicas de las especies arbóreas.....	51
Tabla N° 6: Características morfológicas de nódulos radiculares.....	59
Tabla N° 7: Aislamiento de colonias obtenidas de nódulos.....	62
Tabla N° 8: Características morfológica de colonias aisladas.	64
Tabla N° 9: Identificación morfológica de colonias aisladas en tiempo de crecimiento.....	67
Tabla N° 10: Pruebas bioquímicas de cepas aisladas purificadas.	72
Tabla N° 11: Identificación de género y morfoespecie.	75
Tabla N° 12: Tolerancia a diferentes valores de NaCl.....	81
Tabla N° 13: Tolerancia a diferentes valores de pH.....	85
Tabla N° 14: Crecimiento a diferentes temperaturas.....	90
Tabla N° 15: Crecimiento a diferentes temperaturas.....	115

RESUMEN

Las leguminosas poseen una distribución cosmopolita y representan componentes ecológicos importantes en casi todos los biomas, entre estas una gran proporción realizan simbiosis con rizobios, estas bacterias que viven en los nódulos de las raíces de las plantas leguminosas son capaces de fijar nitrógeno atmosférico, lo que les confiere a las plantas una ventaja nutricional significativa. En la presente investigación el objetivo fue realizar la caracterización fenotípica y selección del bioinoculante de bacterias nitrificantes de la sub familia Caesalpinioideae del Pongo de Qoñec, Valle de Kosñipata, Cusco. Se trabajaron con los nódulos radiculares obtenidos de especies arbóreas, logrando identificar 20 especies arbóreas las cuales presentaron nódulos radiculares con características morfológicas variadas, donde se aislaron 39 cepas las cuales fueron cultivadas en medio ELMARC y ELMA para su caracterización fenotípica. El tiempo de crecimiento fue una de las características relevantes obteniéndose dos grupos: rápido crecimiento (1 a 3 días) y lento crecimiento (5 a 7 días); también se usó el medio ELMA+AB para evaluar la reacción de acidez y alcalinidad. Los resultados obtenidos de la caracterización fenotípica permitieron la identificación de los géneros *Rhizobium* con 13 morfoespecies, *Bradyrhizobium* con 8 morfoespecies y *Sinorhizobium* con 1 morfoespecie. Para la obtención del bioinoculante se trabajó a nivel de morfoespecie, fueron sometidas a condiciones de estrés las cuales fueron: Temperaturas (4, 13, 40 °C); Salinidad (1.5, 2.5, 4, 6, 8%) y pH (2, 4, 8 y 9) además se utilizó la técnica estadística de Análisis de componentes principales esto permitió determinar la adaptabilidad que presentan cada morfoespecie en cuanto a las diferentes condiciones de estrés, donde se obtuvo lo siguiente: 9 morfoespecies (*Rhizobium sp1, sp3, sp5, sp6, sp7, sp10, sp11, sp13* y *Bradyrhizobium sp2*) presentaron mejor crecimiento y desarrollo a pH 8 y 9; mientras que 7 morfoespecies (*Rhizobium sp3, sp5, sp13, sp8, Sinorhizobium sp1* y *Bradyrhizobium sp3, sp6*) asociados a los 13 °C y 40 °C y 5 morfoespecies (*Rhizobium sp3, sp5, sp12, sp8* y *Bradyrhizobium sp3*) relacionadas a 1.5,

2.5 y 4% NaCl. Se concluye con la identificación a nivel de género de: *Rhizobium* (13 morfoespecies), *Bradyrhizobium* (8 morfoespecies) y *Sinorhizobium* (1 morfoespecie), donde solo 3 morfoespecies (*Rhizobium* sp13, sp5 y sp1), lograron adaptarse de manera óptima. La presente investigación será de soporte en futuras investigaciones tomándose en cuenta la importancia de la simbiosis entre bacterias y leguminosas que además contribuye con el desarrollo de estrategias de biofertilización y biorremediación que permiten mejorar la calidad de los suelos, aumentar la productividad agrícola y reducir el impacto ambiental de la agricultura intensiva. Asimismo, el estudio de las cepas bacterianas que presentan un nicho amplio y capacidad de adaptación a condiciones de estrés puede abrir nuevas oportunidades para el uso de bioinoculantes en la regeneración de suelos degradados y la mitigación de los efectos negativos del cambio climático en los agroecosistemas.

Palabras clave: Potencial bioinoculante, Caesalpinioideae, bacterias nitrificantes y nodulos radiculares.

GLOSARIO DE PALABRAS

ACP: Análisis de Componentes Principales

ELMARC: Agar extracto de levadura manitol con rojo de congo

ELMA: Agar extracto de levadura manitol

ELMA+AB: Agar extracto de levadura manitol con azul de bromotimol

ELM: Extracto levadura manitol

TSI: Agar hierro tres azúcares

MIO: Movilidad, indol, ornitina

UNAMAD: Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios

INTRODUCCIÓN

La familia Fabaceae está conformada por árboles, arbustos y hierbas, su diversidad se estima cerca de 19500 especies, con 770 géneros, lo que las hace la tercera familia de plantas más diversa y las segunda con mayor importancia económica y alimentaria (Polhill & Raven, 1981). Después de muchos años de investigación el equipo científico “Legume Phylogeny Working Group” publicó en el año 2017 una nueva clasificación donde se describen 6 subfamilias: Cercidoideae, Detarioideae, Duparquetioideae, Dialioideae, Caesalpinioideae donde dentro de esta subfamilia se incorpora a las Mimosoideae y finalmente Papilionoideae (The Legume Phylogeny Working Group, 2017).

La Subfamilia Caesalpinioideae está conformada por aproximadamente 160 géneros y 2500 especies. Entre uno de sus atributos se resalta que las raíces de una gran proporción de especies arbóreas realizan simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno en un 23% (Ulibarri, 2008).

En el Perú actualmente por la alta demanda en la producción de *Caesalpineia spinosa* conocido comúnmente como la T'ara se han realizado investigaciones respecto a la mejora en su producción y recuperación de suelos degradados, pero no existe mucha investigación sobre la simbiosis con bacterias noduladoras (fijadoras de nitrógeno) existentes en diferentes especies de la Subfamilia Caesalpinioideae que podrían tener un gran potencial como bioinóculos para la recuperación de suelos degradados por minería informal, ganadería, agricultura e incendios forestales (Romero, 2019).

En la Amazonía del departamento del Cusco y el sur peruano no se conocen estudios de especies arbóreas de la subfamilia Caesalpinioideae que tengan simbiosis con bacterias noduladoras, pero sin embargo por la alta diversidad de especies arbóreas existentes, asociada a la alta variabilidad de suelos y hábitats en áreas pequeñas, esta excepcional diversidad está

evidenciada por ejemplo en la presencia de 249 especies de árboles en 1 hectárea de las cuales el 28% corresponden a especies de la familia Leguminosae (Huamantupa, 2010).

La característica fenotípica que las distingue de otras bacterias no simbióticas es por su habilidad en el desarrollo de órganos fijadores de nitrógeno llamados nódulos, en las raíces o tallos de plantas hospederas (Sadowsky & Graham, 2002).

Las bacterias noduladoras que fijan nitrógeno tienen la capacidad de realizar simbiosis con plantas de la familia de las leguminosas de esta forma aporta con nitrógeno para su desarrollo y estas bacterias a cambio reciben compuestos carbonados. Esta simbiosis aporta nitrógeno al suelo y hace posible el crecimiento de plantas leguminosas sin necesidad de fertilizantes nitrogenados por ende no empobrece los suelos (Franché, Lindstrom & Elmerich, 2009).

Asimismo, su uso como bionoculante de cepas de bacterias que fijan nitrógeno, reduce los costos de producción de cultivos de leguminosas, principalmente de la soya, el frijol, el pallar (Zúñiga, 2006).

En la presente investigación se realizará una caracterización fenotípica de bacterias nitrificantes, así como seleccionar cepas con alto potencial bioinoculante.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen muchas bacterias fijadoras de nitrógeno que aún no han sido identificadas en el mundo que representan un gran recurso biológico porque las leguminosas son un grupo de plantas más diversas con suma importancia alimentaria y además se encuentran distribuidos en diferentes ecosistemas (Bécquer, 2004) además, el estudio de esta simbiosis impulsa la investigación en biotecnología agrícola para poder comprender mejor los mecanismos existentes entre el simbiote y la especie hospedera, ya que es esencial para mejorar la eficiencia agrícola, promover prácticas más sostenibles y avanzar en la investigación biotecnológica para el beneficio tanto de la producción agrícola como del medio ambiente.

En el Perú son muy escasas las investigaciones sobre la simbiosis presente entre bacterias noduladoras con las especies de la subfamilia Caesalpinioideae que son importante en la fijación biológica y asimilación de nitrógeno, lo cual es un factor de estudio muy importante en la recuperación de suelos degradados y la agricultura por el alto potencial bioinoculante que presentan las bacterias noduladoras por su alta capacidad de fijación biológica de nitrógeno.

Por ello se plantea la siguiente interrogante ¿Se podrá caracterizar fenotípicamente y seleccionar el bioinoculante de bacterias nitrificantes de la sub familia Caesalpinioideae del pongo de Qoñec, Valle de Kosñipata, Cusco?

JUSTIFICACIÓN

El 75% de la superficie terrestre mundial está degradada (FAO, 2018). Siendo los bosques los que presentan más degradación, seguido de las tierras de cultivo debido a actividades antrópicas como el uso excesivo de fertilizantes químicos, sobrepastoreo, minería ilegal, deforestación (Bai, Dent, Olsson, & Schaeoman, 2008). Esto es actualmente un problema difícil de manejar y por ende se buscan nuevas alternativas para mitigar sus efectos. Las bacterias noduladoras que fijan nitrógeno son muy estudiadas a nivel mundial por su gran importancia para la fertilización de suelos. Pero desafortunadamente en la región de Cusco siendo rica en biodiversidad existen muy pocas investigaciones sobre bacterias que fijan nitrógeno.

El proyecto de investigación logrará generar un avance en el estudio de bacterias nitrificantes que viven en simbiosis con especies arbóreas de las Sub Familia Caesalpinioideae, así como determinar que cepas aisladas presentan potencial bioinoculante, que serán una gran alternativa factible y sostenible en sustitución de fertilizantes nitrogenados en el sector agrícola además contribuirán con la recuperación, restauración y regeneración de suelos degradados mediante el uso de bioinóculos que evitará la contaminación de suelos y agua, además existe una creciente concientización mundial sobre la importancia de abordar los retos medioambientales y agrícolas de manera sostenible. La degradación del suelo y la necesidad de reducir el uso de pesticidas químicos son problemas urgentes que requieren soluciones eficaces. Con la presentación del proyecto de investigación, se podrá mostrar alternativas y soluciones a estos problemas, claro que aún se deben profundizar la investigación para seguir obteniendo más avances y desarrollo con el proyecto de investigación.

OBJETIVOS

a. Objetivo general

Realizar la caracterización fenotípica y selección de bioinoculantes de bacterias nitrificantes colectadas de la sub familia Caesalpinioideae del Pongo de Qoñec, Valle de Kosñipata, Cusco.

b. Objetivos específicos

- Determinar taxonomicamente especies de árboles de la subfamilia Caesalpinioideae , que presentan nódulos radiculares fijadores de nitrógeno, del bosque Amazónico del Pongo de Qoñec.
- Determinar las características morfológicas de nódulos radiculares presentes en las especies arbóreas de la subfamilia Caesalpinioideae.
- Aislar cepas fijadoras de nitrógeno presentes en especies arbóreas de la Subfamilia Caesalpinioideae .
- Identificar a nivel de género y morfoespecie de bacterias nitrificantes aisladas de la Subfamilia Caesalpinioideae.
- Determinar el potencial bioinoculante de bacterias nitrificantes presentes en la Subfamilia Caesalpinioideae.

HIPÓTESIS

Existe la presencia de nódulos bacterianos con la capacidad de fijar nitrógeno aisladas y caracterizadas fenotípicamente, que presentan potencial bioinoculante provenientes de la diversidad de especies arbóreas de la subfamilia Caesalpinioideae presentes en el bosque amazónico del Pongo de Qoñec,

VARIABLES

a. Variable dependiente

- Cepas de bacterias fijadoras nitrificantes aisladas de la Subfamilia Caesalpinioideae.
- Cepas con potencial bioinoculante fijadora de nitrógeno

b. Variable independiente

- Características fenotípicas de las cepas aisladas
- Concentración de pH
- Concentración de salinidad
- Concentración de temperatura
- Especies de la Subfamilia Caesalpinioideae

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO Y CONCEPTO

1.1 ANTECEDENTES DEL ESTUDIO

1.1.1. Internacionales

Contreras et al. (2007). Bolivia. Realizaron el Aislamiento y Caracterización bioquímica, fisiológica y morfológica de géneros *Rhizobium sp.* y *Bradyrhizobium sp.* asociados a la leguminosa *Cajanus cajan* en parcelas agrícolas del municipio de Sampedro. Obtuvieron las raíces a una profundidad de 0 a 20 cm de forma aleatoria representativa de 20 muestras y procedieron a la fase de laboratorio donde trabajaron con nódulos radiculares los cuales fueron triturados con agua estéril, para luego extraer de 100 a 200 microlitros de la solución de macerado, para finalmente ser inoculadas en placas petri con el medio ELMARC; donde realizaron repiques sucesivos de colonias aisladas y típicas de los géneros en estudio para este paso usaron el medio sólido ELMA. Obtuvieron 37 aislamientos positivos de rizobios de los cuales 25 cepas resultaron pertenecer al género *Rhizobium* y 12 cepas son del género *Bradyrhizobium*. De acuerdo a los resultados mediante el análisis de conglomerados (CLUSTER) el vecino más cercano de acuerdo a las características fisiológicas y bioquímicas indica la formación de 5 grupos.

Cuadrado et al. (2009). Colombia. Investigaron el uso de bacterias con potencial de nodulación y fijación de nitrógeno en leguminosas como potencial de bioinóculo, donde analizaron la diversidad de cepas de rizobios que fueron aislados del frijol *Vigna unguiculata*. Se recolectaron de forma aleatoria y representativa de raíces de 57 plantas de frijol. Una vez en laboratorio procedieron a lavar los nódulos y macerar una vez obtenido el producto se sembraron en placas Petri con Agar Extracto Levadura Manitol con indicador Rojo Congo, luego incubadas a 28°C durante 10 días. Se evaluaron los siguientes parámetros como velocidad de crecimiento, producción de acidez o alcalinidad con indicador azul de

bromotimol, tolerancia a cloruro de sodio al 1, 2, 3%, crecimiento en diferentes pH: 4.0, 5.0 (con HCl 1N) 7.0 Y 9.0 (con NaPOH 0,5 N), a temperaturas: 10, 36, y 40°C y resistencia a metales pesados Zn^{+2} , Al^{+3} , y Co^{+2} . De un total de 57 muestras recolectadas se obtuvieron 77 nódulos de los cuales se aislaron 166 cepas bacterianas y luego fueron sometidas a pruebas de pureza. De acuerdo al tiempo de crecimiento 63,5% fueron cepas de lento crecimiento y se caracterizaron de acuerdo a la asimilación de hidratos de carbono donde se encontraron microorganismos de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Mesorhizobium*.

Crespo & Julio (2012). Ecuador, Realizaron la Identificación y caracterización de Rhizobium nativo para la producción de biofertilizante en la provincia de Santa Elena. Se aislaron 13 cepas de nódulos presentes en el frijol en medio ELMARC. Se realizaron pruebas de coloración Gram, tiempo de crecimiento así como la caracterización morfológica donde 3 cepas presentaron alta probabilidad de pertenecer al género Rhizobium por su rápido crecimiento de las colonias, presentaron color translúcidos y blanquecino rosáceo, elevación convexa, consistencia gomosa, borde irregular; así como pruebas bioquímicas donde un 80% de cepas fueron ácido productores, En cuanto al crecimiento en concentraciones de NaCl al 3% el 50 % de las cepas aisladas lograron crecer mientras que al 2 y 5% hubo crecimiento del 60%, para la prueba ANTIMIC indican que las 3 cepa fueron s tolerantes y resistentes a pesticidas evaluados así como también su resistencia en presencia de Co^{+2} . Las cepas (VAI-RV, FO-MG2 y FO-MG4) fueron seleccionadas para producción de inoculante para uso agrícola.

Sinyanya (2016). Sudáfrica, Realizaron la caracterización fenotípica de rizobios y distribución de Burkholderia. Para realizar la caracterización fenotípica los rizobios fueron obtenidos de una investigación previa un total 29 aislados bajo condiciones de laboratorio donde se tomaron en cuenta la morfología de colonia, tiempo de crecimiento, temperatura, fuente de carbono, salinidad y tolerancia al pH. Las cepas se cultivaron en medio de cultivo

Agar ELM, que permitió evaluar características morfológicas tales como forma, el color y el tiempo de crecimiento de los rizobios (días). Cuyos resultados morfológicos fueron que la mayoría presentaba color blanco opaco con forma de bastoncillo y rápido crecimiento. La tolerancia de temperaturas a 30°C solo creció 24 aislados donde a 25 °C fue más favorable para todos los aislados. En cuanto a la resistencia de NaCl respondiendo bien a concentraciones de 0 y 1%, mientras que a concentraciones (>1.5%) disminuyó drásticamente. Solo 7 aislados respondieron a 2% de NaCl y 3 aislados al 3% de NaCl. Presentaron una mayor tolerancia a condiciones ácidas a pH 3 y 4 en *Mesorhizobium* en comparación con *Burkholderia* a pH 5 y *Bradyrhizobium* a pH 6 y pH *Mesorhizobium* tuvo mayor crecimiento. Donde los rizobios crecieron mejor a 25°C en concentración de salinidad entre 0 y 1% y *Mesorhizobium* tuvo tolerancia más alta hacia condiciones bajas de acidez. Así demostrando que existe diversidad fenotípica entre las diferentes cepas estudiadas y que *Burkholderia* son diversas y comunes.

Lopez et al. (2017). México. Investigaron la caracterización morfológica y bioquímica de 20 cepas de *Rhizobium*, donde 9 fueron extraídas de raíces de frijol y 11 de raíces de frijol domesticado. En laboratorio se seleccionaron entre 5 a 6 nódulos color rosado. Los nódulos se sembraron en cajas Petri con medio (ELMARC). En la caracterización morfológica todas las cepas tuvieron crecimiento rápido (2 a 3 días) y presentaron color blanco y borde liso, 14 mostraron forma convexa y 12 un aspecto translúcido. En la caracterización bioquímica, todos los Rizobios crecieron en medios con pH iguales o mayores de 6.0 y 4 cepas no crecieron en pH 4.0 a 5.5. En cuanto a la tolerancia de cloruro de sodio todas las cepas crecieron a 1%, 13 crecieron a 3% y ninguna de las cepas creció entre 5 y 10%. Para resistencia a metales pesados todos los Rizobios fueron sensibles a cloruro de mercurio y sulfato de cobre. Concluyendo que 20 cepas estudiadas presentaron rápido crecimiento, tolerancia de pH ácido, tolerancia moderada a concentraciones de cloruro de sodio, susceptibilidad a metales pesados y resistencia a antibióticos.

1.1.2. Nacionales

Gonzales (2013). Lima. Realizaron el estudio de la diversidad de cepas de *Rhizobium* provenientes de nódulos de tres variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*), donde trabajaron con 23 cepas bacterianas aisladas que pertenecían al género *Rhizobium* y 9 al género *Agrobacterium* pertenecientes a tres variedades de frijol de suelos de la Molina. Para su aislamiento utilizaron el medio de cultivo LMA (Agar-Levadura-Manitol) con rojo de congo por estrías donde las placas fueron incubadas a 28°C de 2 a 15 días, así como también realizaron pruebas de pureza en medios de cultivo tales como fueron Luria Bertani(LB), Peptona-Glucosa(PG), Levadura Lactosa Agar (LLA). En la caracterización fenotípica, el 64.35 % de las cepas crecieron a 37°C; el 57.1% de las cepas toleraron pH4 y el 87% de las cepas presentaron disminución en cuanto a su crecimiento con valores superiores a 0.5% de NaCl. Para el ensayo en plantas de frijol el 84.6% de las cepas, formaron nódulos efectivos e inefectivos en la variedad 'Canario Centenario'. La cepa 17 no moduladora, incrementó el peso seco de parte aérea en 38.24 % con respecto al N₂, siendo esta diferencia la mayor estadísticamente significativa (p<0.05). Todas las cepas tuvieron la capacidad de solubilizar fosfato y ninguna inhibió el crecimiento del hongo *Macrophomina phaseolicola*. Éstos resultados nos indican la diversidad de cepas de *Rhizobium* que nodulan frijol, y permite seleccionar aquellas con mejor potencial para posterior aplicación como bioinoculantes, que aportan nitrógeno al cultivo y no contaminan los suelos.

Alva (2013). Cajamarca. Realizaron la caracterización de rizobios simbióticos a partir de cultivos de arveja (*Pisum sativum*), se colectaron nódulos radiculares de 8 plantas. Para su aislamiento medio de cultivo Agar Extracto de Levadura- Rojo de Congo (ELMARC). Se seleccionaron 32 cultivos en base a las características típicas de los rizobios, los cuales fueron sometidos a pruebas de pureza tales como; crecimiento en Luria Bertani y la producción de acidez y alcalinidad con azul de Bromotimol al 0,5%. Se obtuvo 27 aislados pertenecen al género *Rhizobium* y 1 al género *Bradyrhizobium* y al evaluar su competitividad en estos rizobios en diferentes factores físico químicos, Se concluyó que el cultivo perteneciente a *Bradyrhizobium* es el más competitivo comparado con los demás por su amplio crecimiento en distintos valores de pH, temperatura y salinidad.

1.1.3. Locales

Huaranca (2017). Valle de Kosñipata, Realizaron estudios sobre la determinación de la fijación de nitrógeno que se realiza entre las especies del género Inga (Fabaceae) con las bacterias nitrificantes para el mejoramiento de suelos agrícolas. Se estudió a 6 especies del género Inga realizando un muestreo aleatorio restringido para la elección y ubicación del área. Fueron evaluadas algunas características como DAP (diámetro a la altura del pecho), presencia de nódulos en raicillas secundarias y el rizoplano de cada especie. Los resultados de este estudio mostraron especies con mayor DAP y altura como *I. acrocephala*, y con mayores nódulos a *I. edulis*. Según la observación microscópica los nódulos muestran características típicas de *Rhizobium*.

1.2. MARCO CONCEPTUAL

1.2.1. Familia Leguminosae

Las leguminosas poseen una distribución cosmopolita y representan componentes ecológicos importantes en casi todos los biomas del mundo (Schrire, Lavin, & Lewis, 2005), estas especies constituyen una importancia en diversidad y abundancia en bosques tropical de América del Sur y Asia y dominan bosques secos y sabanas a lo largo de los trópicos (Yahara & Javadi, 2013). Se distribuye en casi todos los continentes, con aproximadamente 730 géneros y unas 19.400 especies (Ulibarri, 2008).

Las leguminosas presentan seis subfamilias: Caesalpinioideae, Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae, Duparquetioideae y Papilionoideae (The Legume Phylogeny Working Group, 2017).

1.2.3. Características de la familia Leguminosae

La familia Leguminosae pertenece al orden Fabales, reúne árboles, arbustos y hierbas perennes o anuales, son reconocibles por su fruto tipo legumbre, hojas compuestas y estipuladas (Ulibarri, 2008).

1.2.2. Subfamilia Caesalpinioideae

En Sudamérica se tiene 65 géneros de la subfamilia Caesalpinioideae (Leguminosae) con diversa variación morfológica, es distribuido en 4 tribus: Caesalpinieae con 31 géneros; Cassieae con 9 géneros; Detarieae con 23 géneros nativos y Cercideae con 2 géneros (Ulibarri, 2008).

1.2.3. Características de la subfamilia Caesalpinioideae

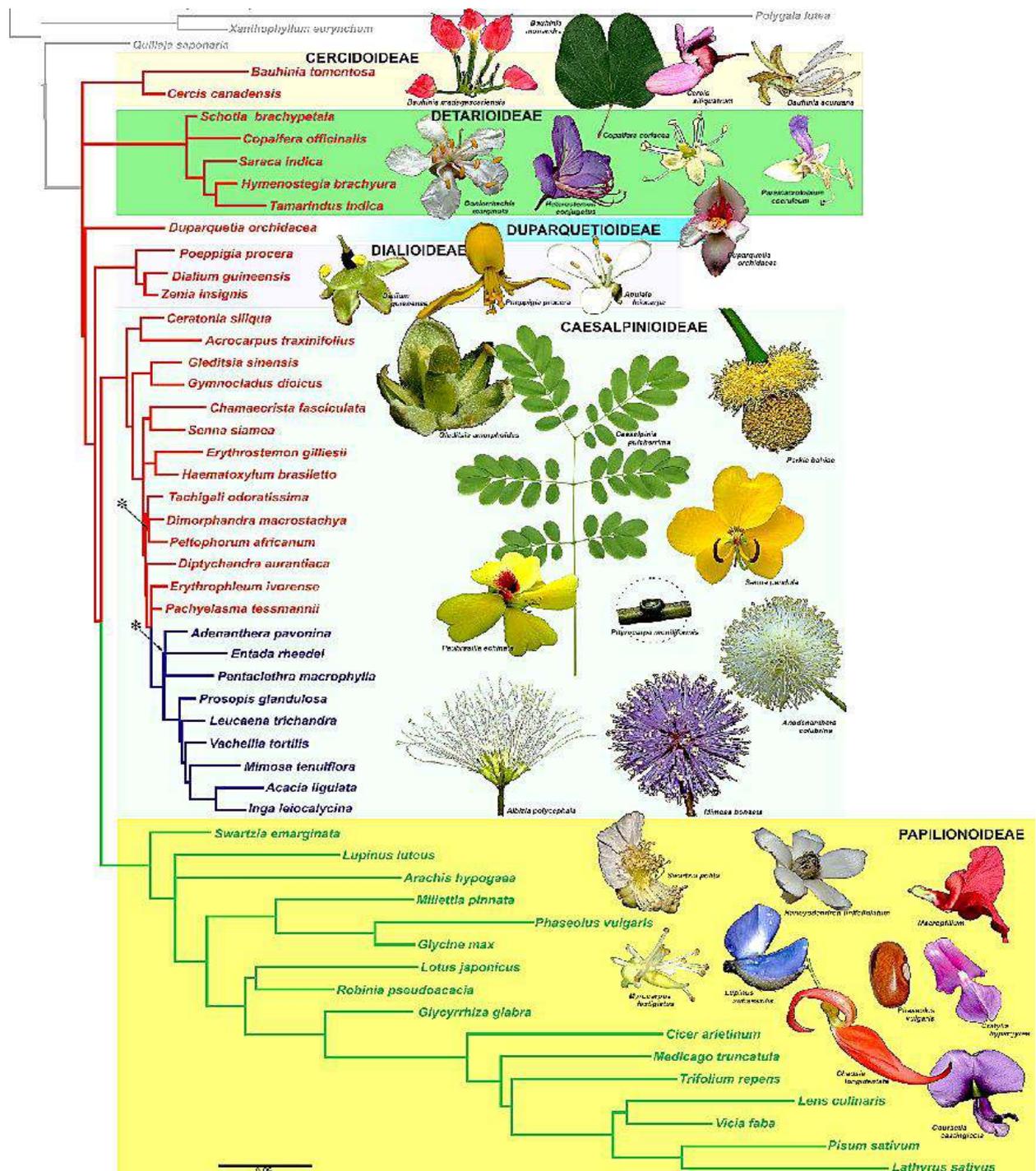
Son árboles, arbustos, anuales o perennes en cuanto a su morfología son con o sin indumento de tricomas simples o glandulares variados. Nectarios extraflorales. Hojas alternas, pecioladas, bipinnadas, o pinnadas; estípulas pequeñas, deltoides, filiformes a foliáceas;

Inflorescencias axilares o terminales en racimos simples o compuestos o espigas, flores solitarias, a veces con caulifloría; brácteas y bractéolas presentes o no. Flores zigomorfas, bisexuales; hipanto presente, cupular o tubuloso; estigma cóncavo o convexo. Ovario plurióvulado, con el estípito libre o; estilo largo o breve, a menudo incurvo; Legumbres alargadas, rectas o encorvadas, comprimidas lateralmente o cilíndricas, Semillas comprimidas, globosas, ovoides o romboidales, con o sin endosperma mucilaginoso; cotiledones carnosos o foliáceos (Ulibarri, 2008).

1.2.3. Clasificación taxonómica actual de la Subfamilia *Caesalpinioideae*

De acuerdo a estudios realizados con el gen del cloroplasto matK. La subfamilia Mimosoideae quedó sujeta dentro de la subfamilia Caesalpinioideae, considerándose así que las mimosoideas pertenecen ahora a la subfamilia Caesalpinioideae (The Legume Phylogeny Working Group, 2017) (Figura N°1).

Figura N° 1: Clasificación taxonómica de la Subfamilia Caesalpinioideae



Nota: Clasificación de las seis subfamilias que se indican mediante cuadros de colores a la derecha de la filogenia. Las ramas de colores indican las tres subfamilias tradicionalmente reconocidas de Leguminosae: rojo que muestra el sentido antiguo parafilético Caesalpinioideae, azul Mimosoideae y verde Papilionoideae (The Legume Phylogeny Working Group, 2017).

1.2.3.1. Género *Inga*

El género *Inga* comprende aproximadamente 300 especies de árboles distribuidos en América Tropical, estas especies son un componente importante en los bosques pluviales de llanura y montanos en las zonas húmedas de Latinoamérica Tropical, se encuentra la mayor diversidad del género en los países andinos de Colombia, Ecuador y Perú. Estas especies se encuentran en las laderas bajas y medias de los andes peruanos (Pennington, 1997).

Se describe 50 especies del género *Inga* en las Reservas Biológicas de Iquitos, Perú entre ellas son: (*Inga acrocephala*, *I. alba*, *I. chartacea*, *I. densiflora*, *I. aff. dumosa*, *I. edulis*, *I. gracifolia*, *I. heterophylla*, *i. ingoides*, *I. lopadadenia*, *I. loreтана*, *I. paraensis*, *I. pezizifera*, *I. ruziana*, *I. semialata*, *I. tenuistipula*, *I. tessmannii*, *I. tibiaudiana*, *I. tocacheana*, *I. umbellifera*, *I. yacoana*) (Vasquez, 1997); (*Inga calantha*, *I. edulis*, *I. marginata*, *I. ruiziana*, *I. thibaudiana*) (Ríos, 1990).

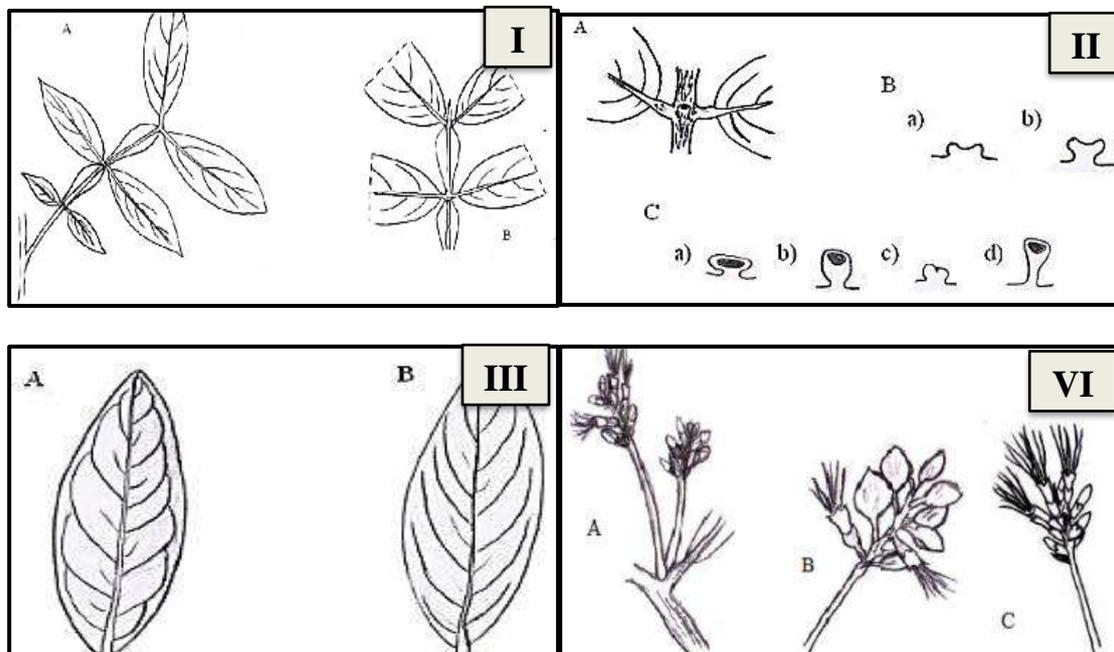
- **Morfología del género *Inga***

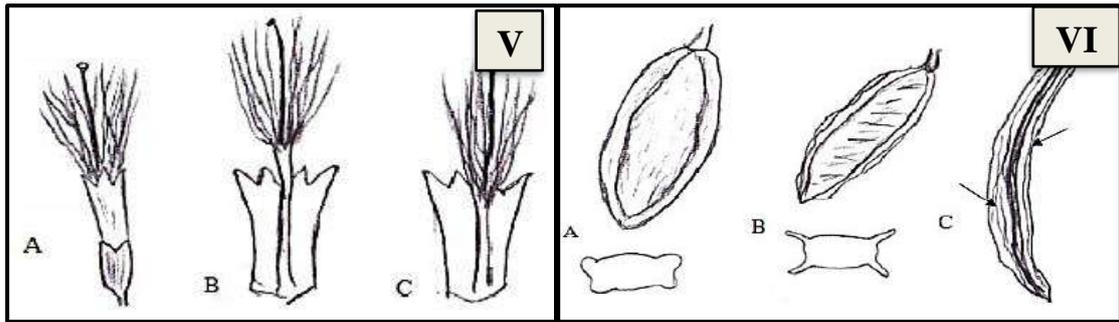
Las características según (Pennington, 1997) de acuerdo a la descripción de órganos:

- Hojas: Compuestas y formadas por pares de folíolos opuestos unidos a un raquis. El raquis y peciolo pueden ser alados. En la parte final del raquis se puede presentar o no un apéndice, el cual por lo general es caduco ver Figura 2.(I)
- Nectario foliar: Son glándulas que se encuentran en el raquis, al nivel de la inserción de los pares de folíolos, pueden encontrarse en todos los nudos foliares, basales o apicales. Pueden ser estipitados o sésiles es decir con un pedículo o estípite que la sostiene, lo cual varía el largo del estípite ver Figura 2.(II),
- Nervaduras foliar: Son pinnadas, puede ser broquidódroma (nervios secundarios se van uniendo hacia el margen); o eucamptódroma (nervios secundarios se van disminuyendo de tamaño y desaparecen hacia el margen sin llegar a unirse entre sí ver Figura 2.(III),

- Inflorescencias: Son axilares, en su mayoría de tipo espiga o racimo, agrupadas o solitarias. En su mayoría se encuentran en las axilas de hojas más desarrolladas, se encuentra de tipo capitado o umbeliforme por reducción del raquis Figura 2.(VI),
- Flores: Presentan una estructura uniforme, presenta una corola gamopétala, tubular a infundibuliforme; un cáliz gamosépalo tubular a ciatiforme o infundibuliforme; estambres largos que sobresalen la de corola. En la base del tubo estaminal se secreta néctar para atraer a polinizadores. Figura 2. (V).
- Frutos: En legumbre indehiscente, con una coloración verde, café o amarillenta, márgenes alados o prominentes, aplanada, pueden estar parcial o completamente cubiertos por el margen, recto, curvo, retorcido o enroscado en espiral Figura 2.(VI).
- Semillas: Son elípticas, oblongas, recalcitrantes, cubiertas por una sarcotesta comestible o “pulpa”, la cual es formada a partir de células malpighianas hipertrofiadas del tegumento espiga (Pennington, 1997).

Figura N° 2: Morfología del género Inga





Nota: I.: Hoja . A- Hoja compuesta; B- Hoja con detalle del apéndice terminal y el raquis alado

II.: Nectarios foliares. A- Disposición general; B- Tipos según la presencia de estípite: a) sésil
 b) Estipitado; C- Tipos según la forma de la cabeza a) Pateliforme, b) Ciatiforme,
 c) pulviniforme, d) infundibuliforme

III.: Tipos de nerviación en los folíolos. A- broquidódroma; B- eucamptódroma

IV.: Inflorescencia. A- axilar; B-racimo; C-espiga

V. : Flores. A- Aspecto de una flor; B-Corola abierta para mostrar el tubo estaminal exerto;
 C. Corola abierta y tubo estaminal inserto

VI. : Tipos de frutos. A- Fruto con margen prominente; B- Fruto con margen alado; C- Fruto cubierto por alas (Pennington, 1997).

1.2.3.2. Genero *Zygia*

Este género comprende 113 especies, su morfología se describe como árboles o arbustos, plantas hermafroditas. Las hojas bipinnadas, con un solo par de pinnas; los pecíolos son muy reducidos, glandulares. Inflorescencias fascículos de capítulos o espigas caulifloros; estambres más de 10, monadelfos. El fruto es plano, recto, ligeramente curvo, enrollado, membranáceo o coriáceo, dehiscente o indehiscente; semillas esférico aplanadas o cuadrangulares, testa papirácea, sin arilo (Arce, 1990).

1.2.3.3. Género *Zapoteca*

Comprende 21 especies descritas su morfología se describe como arbustos erectos con ramas teretes o tetragonales, inermes; plantas hermafroditas. Hojas bipinnadas; folíolos generalmente numerosos por pinna, membranosos; estípulas foliáceas, persistentes. Inflorescencias capituliformes, esféricas, homomorfas, pedúnculos axilares, organizados en pseudopaniculas, flores bracteadas, sésiles; pétalos con filamentos exertos, blancos, purpúreos o rosados; Fruto linear, péndulo, rígidamente membranoso, con los márgenes engrosados, elásticamente dehiscentes desde la base hacia el ápice; semillas duras, generalmente ovoides o romboides, sin arilo (Arce, 1990).

1.2.3.4. Género *Cassia*

El género tiene 1396 especies se describe como árboles con tricomas simples. Hojas paripinnadas; nectarios peciolares ausentes, estípulas y pulvínulos presentes. Inflorescencias, racemosas, bracteadas, pedicelos bracteolados cerca de la base; pétalos amarillos, blancos o rosados; el verticilo antisépalo . Fruto péndulo, cilíndrico 30 - 60 cm de largo, las valvas leñosas o crustáceas , el endocarpo producido entre cada par sucesivo de semillas como un septo completo; muchas especies tienen como principio activo senósidos cuya actividad farmacológica es purgante. Las flores de (*Cassia siamea*) son utilizadas para insomnio y asma. Algunas especies son alimentos para las larvas de algunas especies de *Lepidoptera* (Arce, 1990).

1.2.3.5. Género *Calliandra*

El nombre del género proviene del griego "kallos",belleza y "andros", hombre. Comprende 420 especies descritas son nativos en las regiones tropical y subtropical de Asia, África y América. Se describe como plantas herbáceas perennes, arbustos y, raramente, pequeños árboles de 0,5 a 6 m de altura, su morfología presenta hojas bipinnadas. Flores con numerosos estambres largos y finos, en inflorescencias cilíndricas o globosas (Araujo, 2015).

1.2.4. Fijación biológica de nitrógeno (FBN)

El nitrógeno es un nutriente limitante en la tierra, siendo incluso un elemento más abundante en la atmósfera (80%), existiendo de la forma de N_2 . El nitrógeno constituye entre 1 al 4% del peso seco de los tejidos de las plantas, así como también se encuentran constituyendo la estructura principal en las proteínas, aminoácidos y la clorofila. La deficiencia de este elemento genera un bajo desarrollo en las plantas (Salisbury, 1992).

El nitrógeno pasa por cambios cíclicos para que pueda ser usado y ser repuesto, a través de procesos de fijación de nitrógeno que permite la transformación de una molécula de nitrógeno pasar de un estado orgánico a inorgánico y viceversa donde existen la interacción de actividades de microorganismos vivos y conversiones no biológicas. (Rodríguez et al. 1984) Las bacterias, cianobacterias, actinomicetos, quienes pueden fijar nitrógeno o también formar asociaciones (Allan & Graham, 2002). Aquellas bacterias que son capaces de formar nódulos en raíces en asociación con leguminosas son más eficaces, como son los géneros: *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. En el interior de estos nódulos albergan estos microorganismos, desarrollando simbiosis con la planta (Baca et al, 2000). La fijación biológica del nitrógeno atmosférico es un proceso que consiste en la reducción de N_2 a NH_4 por acción de la enzima nitrogenasa, esto se realiza después de la fotosíntesis, este evento es importante para el mantenimiento de la vida en la biosfera, Este proceso es llevado a cabo solo por procariotas. Esta requiere grandes cantidades de poder reductor y energía (ATP) (Mayz, 2004).

1.2.5. Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas

Existen determinados géneros que presentan la capacidad de realizar el proceso de fijación de nitrógeno como son: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Allorhizobium* (Madigan et al, 2000).

Para este proceso es importante que las bacterias se localicen junto a las leguminosas donde podrán interactuar con las mismas, que alertan a la planta para la formación de un órgano mixto el nódulo simbiótico que le brindara a las bacterias nutrientes necesarios para efectuar el proceso de fijación (Vargas,2011).

Según Rodriguez et al, 1984 describen que deben existir ciertas características entre la bacteria y la planta tales son:

- **Especificidad:** Para que la bacteria infecte haciendo selección de la planta hospedadora, existen también leguminosas que presentan requerimientos específicos para su bacteria noduladora, mientras que otras tienen un requerimiento más amplio.
- **Infectividad:** Es la propiedad que tiene la bacteria para nodular la planta hospedadora.
- **Efectividad:** El nódulo tiene la capacidad de realizar la reducción de nitrógeno atmosférico al amoníaco.

1.2.6. Bacterias fijadoras de nitrógeno en leguminosas

Son bacterias que fijan nitrógeno, capaces de formar nódulos en las raíces y algunas veces en tallos. Estas bacterias cumplen un rol muy importante en la fijación de nitrógeno pues incorporan un 70% de todo el nitrógeno en los ecosistemas (Moreira, et al 2012).

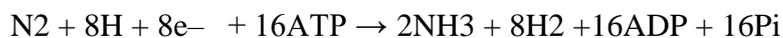
1.2.7. Funcionamiento del nódulo

Los nódulos son estructuras especializadas donde se lleva a cabo la fijación biológica de nitrógeno en el córtex radicular. En estos órganos, los rizobios fijan el nitrógeno atmosférico de forma que la planta hospedera pueda asimilar, la cual, en reciprocidad el hospedero brinda fuentes de carbono (Murray et al. 2017).

La interacción simbiótica inicia cuando el nitrógeno en el suelo es escaso, las leguminosas exudan compuestos fenólicos a la rizósfera como los flavonoides e isoflavonoides. Estas son detectadas por los rizobios, activando el regulador transcripcional de la proteína de

nodulación D (nodD), que a su vez desencadena la transcripción de los genes necesarios para la síntesis del factor Nod estas son lipoquitooligosacáridos secretados por los rizobios y percibidos por los receptores presentes en la membrana plasmática de las células de la raíz (Mayz, 2004).

La fijación simbiótica de las bacterias noduladoras se lleva a cabo en los bacteroides que se encuentran en el citoplasma de las células de los nódulos. La enzima nitrogenasa es quien cataliza la reacción:



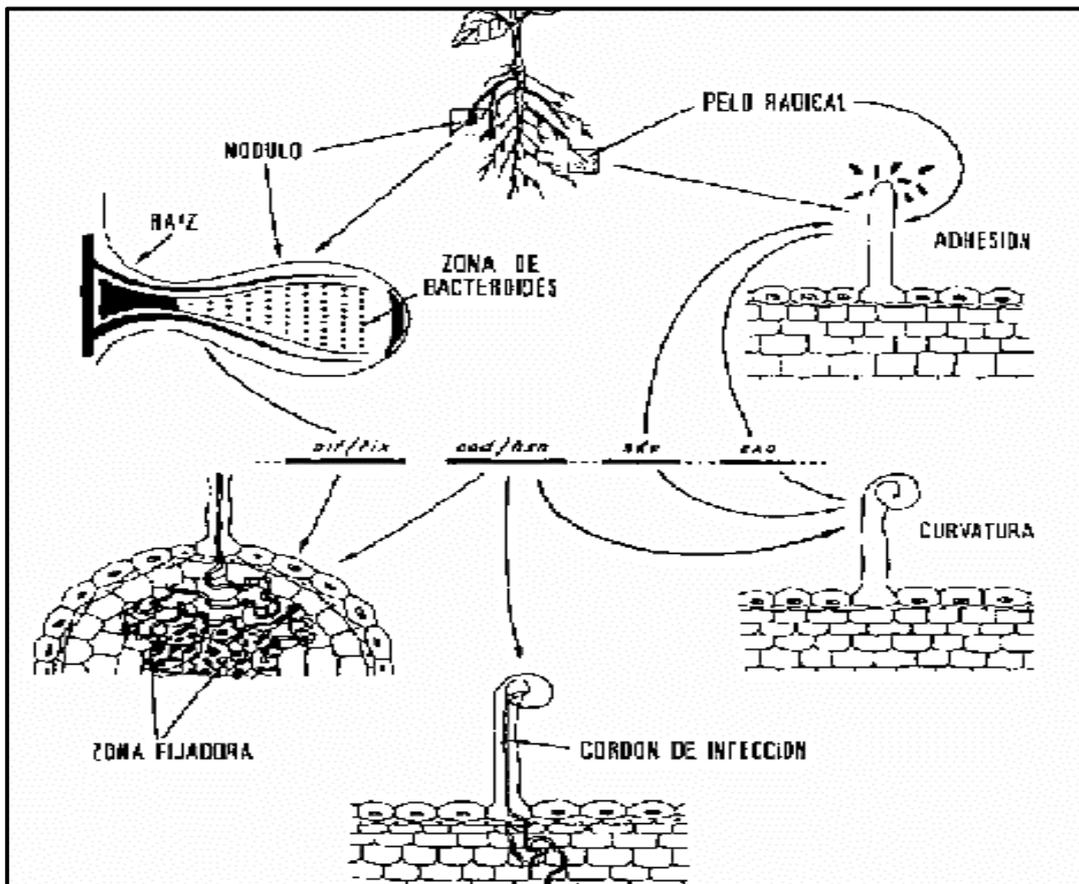
La nitrogenasa es una proteína que consiste en dos componentes, la proteína homodimérica que contiene Fe y es codificada por nifH y la proteína tetramérica que contiene Fe y molibdeno que es codificada por los genes nif D y nif K (participan en la fijación de nitrógeno) contenidos en el plásmido de Rhizobium. Los bacteroides dependen totalmente de la planta para obtener la energía necesaria para la fijación de nitrógeno. La planta durante la simbiosis expresa proteínas específicas del nódulo a las que se llaman nodulina. Entre ellas la leghemoglobina tiene la función de aportar oxígeno a los bacteroides y de controlar los niveles de O₂. Este pigmento se localiza en el citosol de las células de la planta infectadas por bacteroides y es el pigmento que da el típico color rosado de los nódulos funcionales (López, 2000).

Algunos intermediarios del ciclo de ácido cítrico como succinato, malato y fumarato son transportados al interior de la membrana peribacteroidal. Estos ácidos son empleados como donadores de electrones para la síntesis de ATP. El primer producto estable que se obtiene de fijación de N₂ es el amonio, y varias pruebas indican que la planta asimila el amonio para construir moléculas orgánicas. El amonio también se puede asimilar en los bacteroides y puede ser transferido a la planta en forma de alanina (López, 2000).

1.2.8. Fases de infección y formación de nódulo

- La fase infección consta de las siguientes etapas según maduro (Coiné, 2000):
- Reconocimiento y mezcla entre los organismos vivos (planta y bacteria) para la unión en los pelos radiculares.
- Invasión en los pelos radiculares y la formación del canal de infección.
- Desplazamiento de las bacterias mediante el canal de infección a la raíz principal.
- Diferenciación que permitirá diferenciar bacteroides con el desarrollo del estado en el proceso de fijación de nitrógeno.
- División de células bacteriana y vegetal para la formación del nódulo radical.

Figura N° 3: Infección y formación de nódulo



Fuente : (Coiné, 2000).

1.2.9. Taxonomía de bacterias fijadoras de nitrógeno en leguminosas

Según estudios y por la capacidad de formar nódulos en leguminosas se clasifican en:

α -Proteobacteria

Familia: Rhizobiaceae

Género: *Rhizobium*

Ensifer (Sinorhizobium)

Allorhizobium,

Agrobacterium,

Shinella

Familia: Bradyrhizobiaceae

Género: *Bradyrhizobium*

Familia: Xantobactereceae

Género: *Azorhizobium*

Familia: Phyllobacteriaceae

Género: *Mesorhizobium,*

Phyllobacterium

Familia: Methylobacteriaceae

Género: *Methylobacterium*

Familia: Brucellaceae

Género: *Ochrobactrum*

Familia: Hyphomicrobiaceae

Género: *Devosia*

β -Proteobacteria

Familia: Burkolderiaceae

Género: *Burkholderia*

Cupriavidus

Fuente: (Moreira, et al 2012).

1.2.10. Género *Rhizobium*

Rhizobium pertenece a la familia Rhizobiaceae, son capaces de producir nódulos en raíces de las leguminosas viviendo en simbiosis. Estas habitan en el suelo, pueden ser heterótrofos o también saprofitos al no lograr encontrar una planta hospedante, donde la su proliferación es estimulada con la existencia de una raíz de un hospedante. (Vargas, 1969; Coiné, 2000; Spaink, 2000).

Son bacilos Gram negativos que contienen granos de poli-B- hidroxiburato, presentan flagelos que pueden ser subpolares o peritricos. (Aguilar et al., 2004). Presentan colonias opacas, semitranslúcidas y mucilaginosas; miden entre 2 a 4 mm de diámetro en medio ELMA. Son quimio-organotrofas ya que utilizan gran variedad de ácidos orgánicos y carbohidratos como fuente de carbono; las cepas que pertenecen a este género son de rápido crecimiento, así como también productos de ácido en ELMA (Spaink, 2000; Mayea et al., 1998; Martínez, 1986; Coiné, 2000; Vargas, 1969).

1.2.11. Género *Bradyrhizobium*

Son bacilos Gram negativas, presentan un flagelo sub polar o polar, las cepas presentes en este género son de lento crecimiento, productoras de álcali, las formas de las colonias son circulares con un diámetro entre 1 a 2 mm, en cuanto a su color pueden ser opacas, translucidas, blancas, convexas y su textura es granulosa, se desarrollan entre los 5 a 10 días (Wang et al.2007).

1.2.12. Género *Sinorhizobium*

El género *Sinorhizobium* pertenece a la familia Rhizobiaceae, capaz de establecer asociaciones simbióticas agrupa a especies de rizobios de crecimiento Rápido, etimológicamente *Sinorhizobium* significa “rizobio chino”, presenta el mayor rango de nodulación conocido al menos 112 géneros de leguminosas (Wang et al.2007).

1.2.13. Aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno

Existen limitaciones para la obtención de aislados bacterianos debido a que las condiciones de laboratorio no se asemejan a las condiciones naturales (Schink 2002; Stams et al, 2006; Water & Bassler, 2005). Pero a pesar de la existencia de estas limitaciones, el aislamiento de microorganismos es una herramienta útil para lograr estudios de la fisiología, bioquímica y genética (Ben et al, 2009).

1.2.14. Caracterización fenotípica

Son procesos de descripción de características macroscópicas y microscópicas de cepas bacterianas aisladas bajo condiciones controladas (Reynoso, et al. 2015).

1.2.15. Características morfológicas

Para la descripción de estas características morfológicas de una cepa aislada se considera lo siguiente: diámetro, color, borde, elevación, textura, aspecto y velocidad de crecimiento (Howieson & Dilworth, 2016).

- **Tinción Gram**

Esta técnica, permite diferenciar las bacterias en dos grupos Gram negativas y Gram positiva según la tinción presente en su pared celular. El peptidoglicano es quien brinda a la pared celular su rigidez, las bacterias Gram positivas presentan una pared más gruesa que constituye entre 80 y 90% y presenta varias capas, así como los ácidos teicoicos. Mientras que las Gram negativas contiene una capa mucho más delgada de peptidoglicano de 10% a 20% además está rodeada por otra membrana exterior compuesta por fosfolípidos, lipoproteínas y lipopolisacáridos. Asimismo, se analizan diferentes características bacterianas como son:

- Forma: bacilos, cocos, cocos, bacilos, curvos, filamentosos, etc.
- Tamaño: Largos, cortos
- Disposición: racimos, cadena, parejas, tétradas, etc (Leboffe y Pierce, 2011).

1.2.16. Bacterias con potencial bioinoculante

Son microorganismos con alto potencial promotor de crecimiento y desarrollo de plantas con la capacidad de lograr un control biológico al suprimir patógenos (González & Fuentes, 2015). Varias investigaciones demuestran que la inoculación de cepas seleccionadas con alto potencial ya que logran adaptarse a situaciones hostiles dan un rendimiento igual o mejor a comparación con uso de fertilizantes nitrogenados, así como en su acción en la recuperación de áreas dañadas por diferentes actividades humanas (Rivera, 2012).

1.2.17. Crecimiento de Rhizobios a diferentes condiciones ambientales

- **pH**

Las bacterias fijadoras de nitrógeno difieren en sus habilidades para lograr tolerar niveles de estrés en cuanto a la acidez y alcalinidad. Se descubrió en bacterias ácido tolerantes la homeostasis está relacionada con las concentraciones de potasio en el citoplasma, a la composición de exopolisacáridos, lipopolisacáridos, solutos orgánicos como azúcares y aminoácidos (Ricillo et al, 2000).

En cuanto a pH es importante en el desarrollo del *Rhizobium*, ya que pueden variar su habilidad en la infección de plantas. Hay estudios con *Mesorhizobium*, que crecen en condiciones ácidas en cultivos de garbanzo, pero cuando se añade cepas en suelos altamente ácidos solo el 5% de cepas logran formar nódulos (Kellman, 2008).

- **Salinidad**

Las bacterias noduladoras que fijan nitrógeno pueden acumular agentes osmoprotectores y solutos compatibles que les permite adaptarse durante un proceso de salinización. La mayoría de estas bacterias presenta betainas, azúcares como las trehalosa, en el citoplasma que previene la deshidratación osmótica y mantiene presión turgente. Los rizobios tienen una mayor tolerancia a la sal que las leguminosas, ya que las bacterias del suelo sobreviven en ambientes mas salinos que sus socios simbióticos (Laranjo & Oliveira, 2011).

- **Temperatura**

Las bacterias noduladoras tienen una temperatura óptima de crecimiento, pero si hay variaciones por debajo o por encima altera su metabolismo. Cuando la temperatura se encuentra por debajo de 5°C, no se logra un correcto transporte de nutrientes (Santillana, 2007).

En suelos tropicales existe un rango de crecimiento para *Rhizobium* que está entre 32°C y 47°C, pero estas pueden variar de acuerdo a las especies. (Kellman, 2008), menciona que a 5 cm de profundidad del suelo la temperatura desciende en 6°C lo que reduce la población de *Bradyrhizobium*, que nodulan en cultivos de soya, lo que reduce la sobrevivencia de estas bacterias en este tipo de suelos tropicales. A temperaturas mayores a 39 ° C se reduce la emisión de factores de genes activadores de nodulación (nod), que afecta la nodulación, iniciación y liberación de bacterias fijadoras de nitrógeno al hilo de infección y acelera la senescencia del nódulo (Kellman 2008).

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

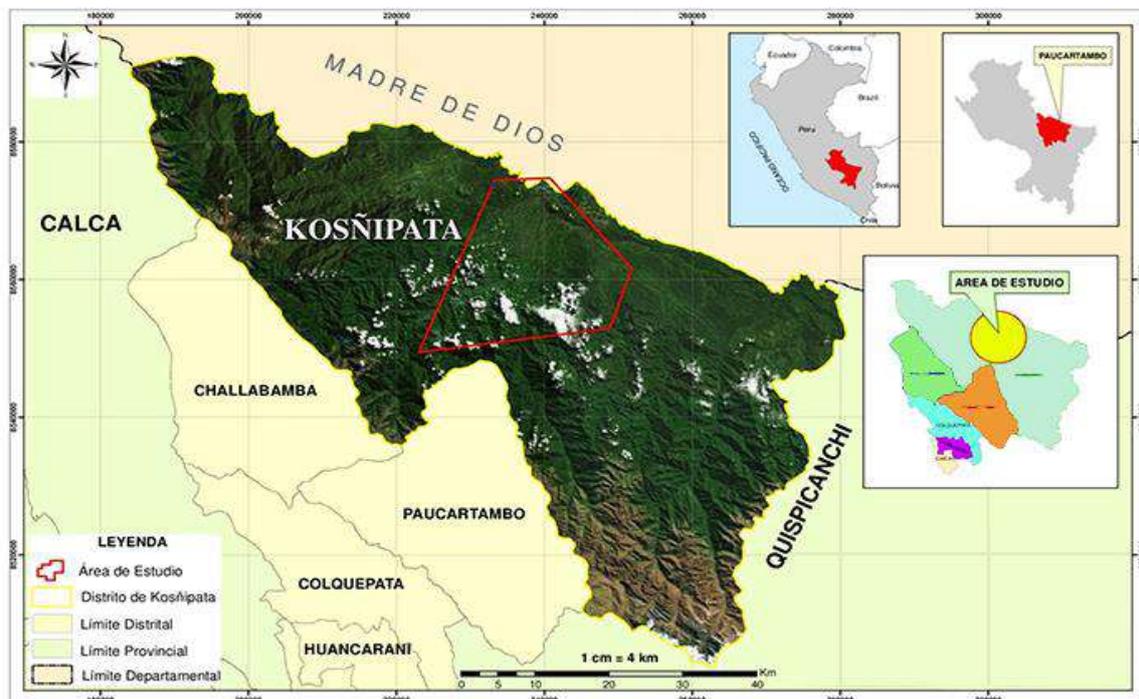
2.1. ÁREA DE ESTUDIO

2.1.1. Ubicación geográfica

La zona de estudio se encuentra dentro del sector Qoñec, entre los 468 a 1100 m de altitud con coordenadas 12°53'53" latitud sur y 73°22'25" longitud oeste que pertenece a la margen derecha del río Alto Madre de Dios a 7 km de la localidad de Pillcopata que se ubica en la Zona de Transición Amazónica de la Reserva de Biosfera del Manú, Distrito de Kosñipata, Provincia de Paucartambo y Departamento del Cusco (Huamantupa, 2010).

Figura N° 4: Mapa de ubicación del bosque amazónico Pongo de Qoñec, valle de Kosñipata

Mapa:



Fuente:(Arque & Suna, 2018).

La determinación de lugar de estudio se hizo tomándose en cuenta características geodésicas, la homogeneidad del bosque y acceso adecuado en parcelas ya establecidas de una hectárea, Se colocaron cintas en los arboles localizados, a las que se tuvieron acceso a través de trochas ya establecidas al borde de la parcela, donde se procedió con las recolecciones para su posterior identificación y depósito en el herbario (UNAMAD).

Figura N° 5: *Mapa Satelital de ubicación del área de estudio. Marcando los puntos evaluados.*



(Google earth,2022)

2.2. MATERIALES

2.2.1. Material biológico

Nódulos radiculares serán aislados de especies arbóreas de la subfamilia Caesalpinioideae del Bosque Amazónica del sector Pongo de Qoñec (80 ha), en el valle de Kosñipata, provincia Paucartambo, departamento de Cusco.

2.2.2. Materiales de campo

- ✓ Receptor de Sistema de Posicionamiento Global – GPS (Garmin 64S)
- ✓ Cámara fotográfica digital (Samsung)
- ✓ Libreta de campo
- ✓ Plumón marcador

- ✓ Cinta masking
- ✓ Cooler (para transporte de muestra)
- ✓ Botes de plástico con tapa hermética
- ✓ Wincha de 3 m.
- ✓ Pala metálica
- ✓ Tijeras
- ✓ Bolsas de polietileno oscuras

2.2.3. Material de laboratorio

- ✓ Matraz Erlenmeyer
- ✓ Probeta 100 ml
- ✓ Placas Petri 90 y 60 mm.
- ✓ Pinzas
- ✓ Mechero bunsen
- ✓ Asa y aguja de siembra
- ✓ Micropipetas graduadas de 100 μ l, 1000 μ l
- ✓ Puntas de 100 μ l y 1000 μ l
- ✓ Portaobjetos
- ✓ Guantes de látex
- ✓ Tubos eppendorf
- ✓ Tubos de Criopreservación 2ml (Marca: EPPENDORF)
- ✓ Gradillas para tubos de microcentrífuga
- ✓ Pipetas de 10ml
- ✓ pH metro

2.2.4. Equipos y aparatos de laboratorio

- ✓ Incubadora de 25°C y 37°C (H.W. Kessel.S.A, modelo EK-610)
- ✓ Refrigeradora (MADE)
- ✓ Congeladora -20°C (Marca: FRIOLUX)
- ✓ Autoclave (Phoemix modelo AV- 75 PLUS 121X 15 min)
- ✓ Microscopio (INCB, 2002)
- ✓ Balanza analítica (H.W. Kessel.S.A, modelo GR-200)
- ✓ Horno Pasteur (Mermet a 180° C/ hora)
- ✓ Destilador (Ivymen modelo- AC- L8)
- ✓ Cocinilla a gas (FRADIC)

2.2.5. Medios de cultivos y Reactivos

- ✓ Movilidad indol ornitina (MIO) Merck Aleman
- ✓ Agar hierro tres azucres (TSI) Merck Alemán
- ✓ Glicerol 80%
- ✓ Cloruro de sodio NaCl
- ✓ Hipoclorito de sodio al 2%
- ✓ Reactivo de Kovacs
- ✓ Peróxido de hidrógeno
- ✓ Antibiótico (Vancomicina)
- ✓ Azul de Bromotimol al 0.5 %
- ✓ Hidróxido de potasio 9%
- ✓ Rojo de Congo
- ✓ Peróxido de Hidrogeno
- ✓ **Composion del medio ELMA:**
 - ✓ K_2HPO_4

- ✓ MgSO₄.7H₂O
- ✓ NaCl
- ✓ Manitol
- ✓ Sacarosa
- ✓ Extracto de levadura
- ✓ Agar

2.3. METODOLOGÍA

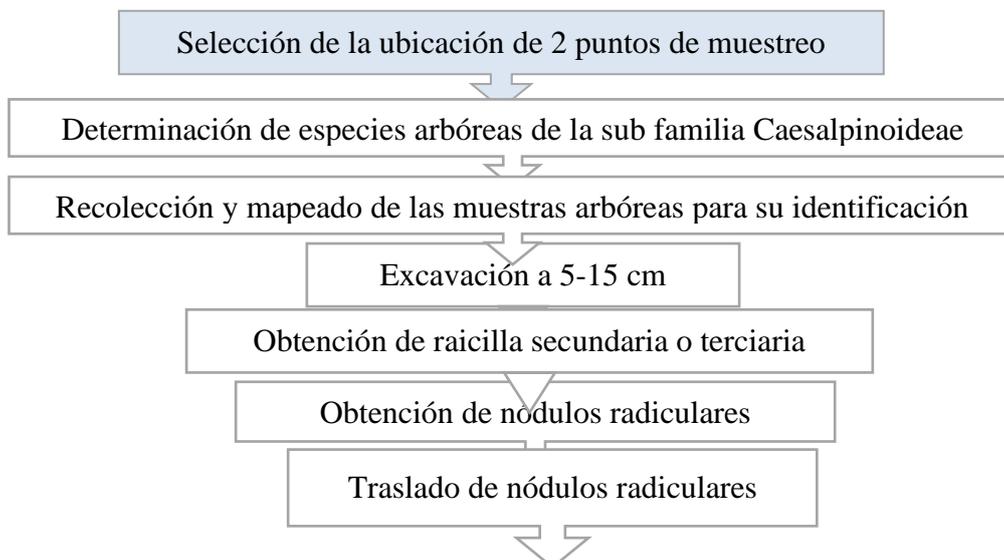
La metodología se dividió en dos etapas la primera fue el trabajo en campo que consistió en la identificación de árboles de la subfamilia Caesalpinioideae y la segunda etapa que consistió del trabajo en laboratorio donde se procedió a realizar el aislamiento e identificación fenotípica y selección de cepas con potencial bioinoculante.

2.3.1. Flujograma de la metodología de investigación

Se realizó en dos fases:

- **Fase de campo:** Se realizó en el bosque pongo Qoñeq distrito Kosñipata del departamento Cusco. En esta fase se realizó el estudio en campo para la identificación de especies arbóreas de la subfamilia Caesalpinioideae, asimismo se procedió con la recolección de nódulos para su posterior aislamiento y caracterización (figura N°5).

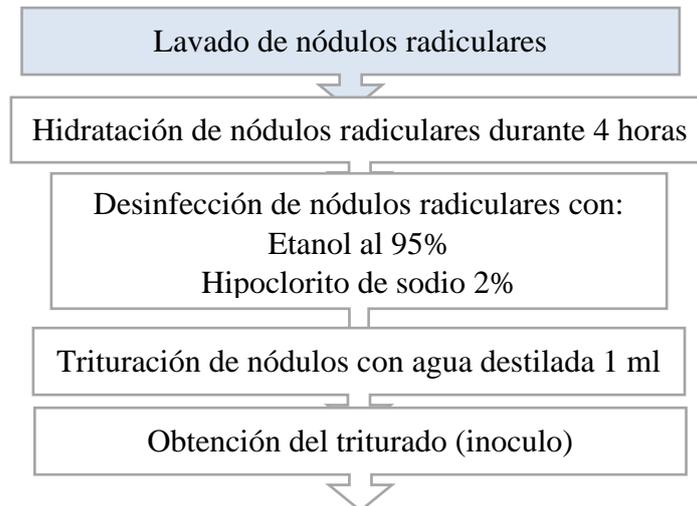
Figura N°5: *Flujograma de recolección de especies arbóreas y nódulos de la subfamilia Caesalpinioideae*



Fuente: (Huaranca, 2017), (Howieson & Dilworth, 2016).

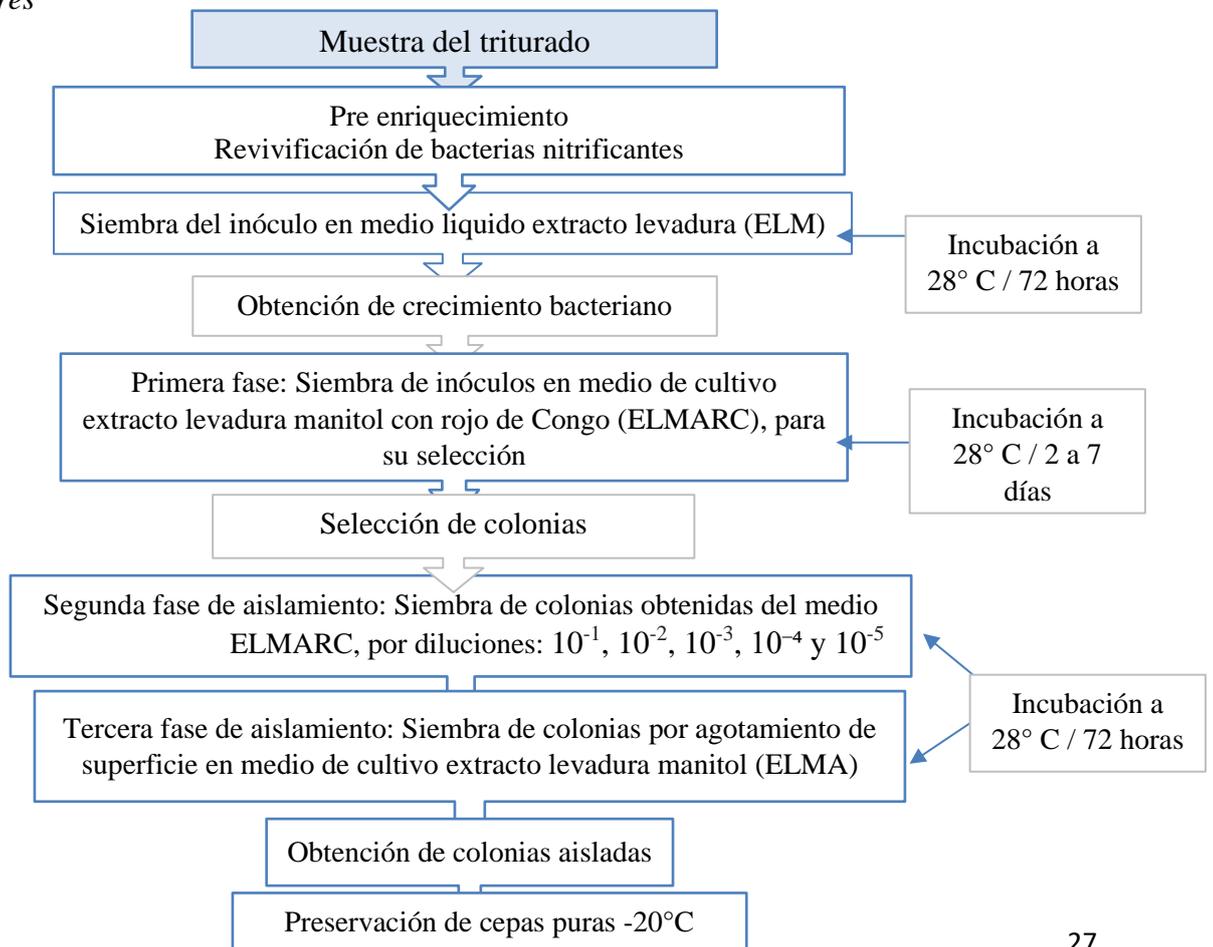
- **Fase de laboratorio:** El trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología de la Escuela Profesional de Biología - Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (figura N° 6 y 7).

Figura N°6: *Flujograma de preparación de nódulos radiculares*



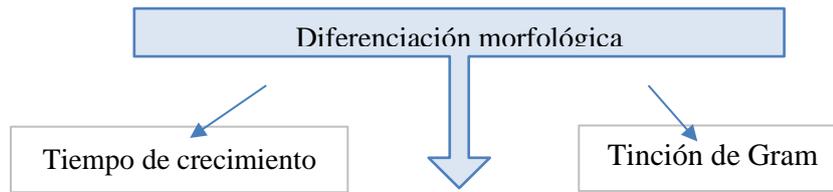
Fuente: (Howieson & Dilworth, 2016).

Figura N° 7: *Flujograma de aislamiento de bacterias nitrificantes obtenido de nódulos radiculares*

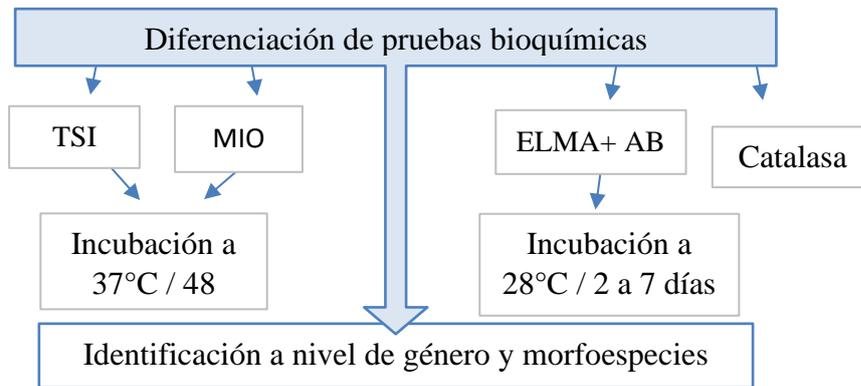


Fuente: (Howieson & Dilworth, 2016)

Figura N° 8: Flujograma de caracterización fenotípica de colonias aisladas



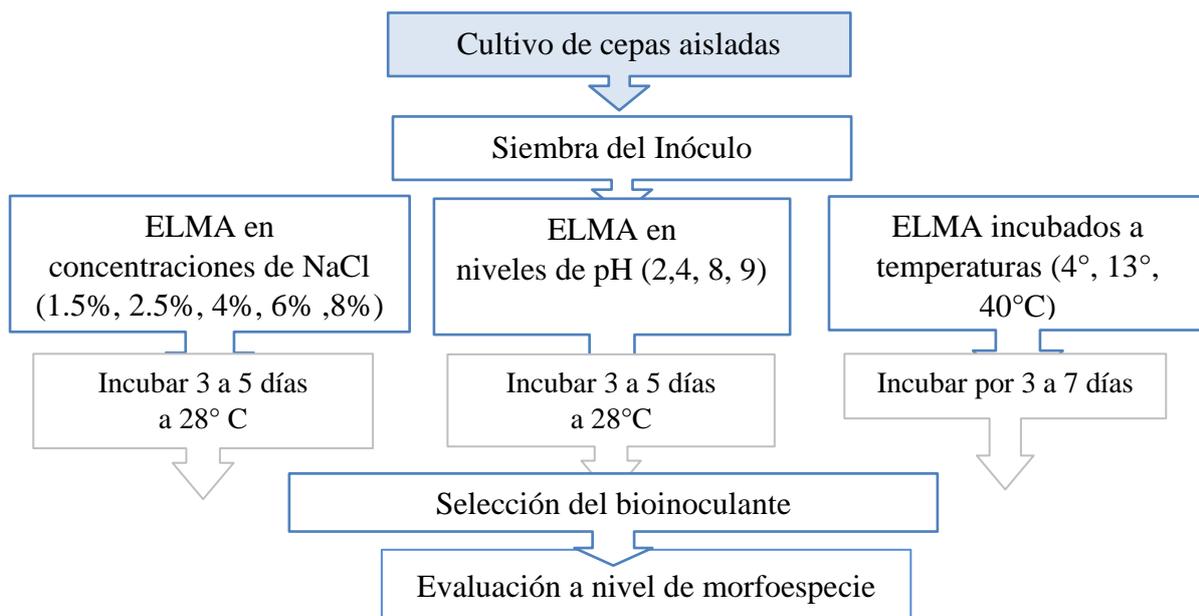
Fuente : (Howieson & Dilworth, 2016)



Fuente: (Ortiz, 2017).

Figura N° 9: Flujograma de selección del bioinoculante de bacterias nitrificantes

Ciertas cepas de *Bradyrhizobium sp.* y *Rhizobium sp.* pueden llegar a desarrollarse en suelos con problemas de fertilidad, es así que bacterias resistentes a diferentes concentraciones de NaCl, temperaturas y pH, permite la obtención de cepas con óptimas características para ser utilizados como bioinoculos por su amplio rango de adaptabilidad (Hernández et al. 2012).



Fuente: (Gonzales, 2013) y (Cuadrado et al, 2009).

2.3.2. Selección de la ubicación de los puntos de muestreo

El trabajo de campo se realizó en el mes de junio del 2022, para el reconocimiento del área de estudio se determinaron a través de caminatas por trochas establecidas y en dos parcelas de 1 hectárea cada una ya instaladas, se consideró el área que brinde una correcta evaluación y que sea representativa de la comunidad vegetal que permitió la obtención de óptimas muestras de especies arbóreas.

2.3.2.1. Método de muestreo

Se aplicó el método del muestreo aleatorio simple (MAS), el cual consiste en ubicar las subunidades muestrales (parcelas) al azar, donde cada unidad de la población posee la misma probabilidad de formar parte de la muestra. Se tomó la georreferenciación en todo el trayecto de las trochas con el GPS (Matteucci, 1982). Este tipo de muestreo aleatorio simple es una técnica que permite realizar el muestreo en la cual cada individuo de la población tiene la misma probabilidad de ser seleccionado para formar parte de la muestra esto nos asegura que todos los individuos en la población de interés tengan la misma oportunidad de ser seleccionados.

2.3.2.2. Tipo de muestreo

El método usado fue el muestreo al azar restringido, que consiste en subdividir el área de estudio, para la obtención de las especies arbóreas, así cada submuestra representa una especie en el área y tiene una mayor opción de ser seleccionada (Matteucci , 1982)

2.3.2.3. Establecimiento de área evaluada

La evaluación se realizó en parcelas permanentes de 1 hectárea de 40 m ancho y 250 m largo, se delimitaron con una pequeña trocha al borde de la parcela. y trochas donde se encuentran especies representativas de la subfamilia Caesalpinioideae y otros en el bosque Pongo Qoñec La ubicación se consideró las características topográficas, la homogeneidad del bosque y acceso adecuado. Se consideraron las especies que se encuentre a lo largo de las

trochas que permitan una evaluación correcta y representativa. Considerando una gradiente altitudinal y hábitats distribuidas desde los 490 a los 1100 msnm, ubicando las especies evaluadas a lo largo de esta gradiente (Huaranca, 2017).

2.3.3. Determinación de las especies arbóreas de la Subfamilia Caesalpinioideae.

Para la obtención de nódulos en especies de la subfamilia Caesalpinioideae, se procedió a evaluar todos los árboles seleccionados aleatoriamente en las diferentes parcelas dentro del área de estudio. El muestreo de las especies que presentan nódulos está basado en los protocolos establecidos por (Beck, Materon, & Afandi, 1993) y (Halliday & Date, 1976) que consisten en los siguientes pasos:

2.3.3.1. Observación y monitoreo del área de muestreo

La observación se realizó en las especies de la subfamilia Caesalpiniodae que fueron evaluadas entre los meses de junio y diciembre del 2023. Donde se realizaron 2 visitas al área evaluada. Las observaciones de las especies evaluadas estuvieron constituidas por las siguientes actividades:

- Caracterización de las especies evaluadas y colecta de muestras botánicas de la subfamilia Caesalpiniodae
- Observación de las características de cada especie evaluada de la subfamilia Caesalpiniodae y toma de puntos GPS.
- Búsqueda de nódulos en las raíces de cada especie evaluada, para la extracción de nódulos viables para el trabajo en laboratorio (Huaranca, 2017).

2.3.3.3. Colecta y conservación de muestras botánicas de la Subfamilia Caesalpinioideae.

Para la identificación y determinación de las especies evaluadas se procedió a coleccionar muestras botánicas del árbol hospedero o fitobionte para la determinación taxonómica de cada especie. Para la colecta y la posterior conservación se describen los siguientes pasos:

- Para el proceso se usaron tijeras de podar para cortar la muestra, teniendo en cuenta las características específicas para su reconocimiento, se tomó tres ejemplares por cada especie luego ser codificadas y se fotografió cada muestra.
- Se evaluó los datos en un registro a todos los especímenes de la subfamilia Caesalpinioideae; considerándose los siguientes datos: localización geográfica, altitud, fecha, especie, altura.
- Luego de las anotaciones en el registro de las especies evaluadas, estas fueron trasladadas y luego apiladas en una prensa botánica con periódicos cocidas y conservadas con solución alcohol metílico y agua (1:2) almacenándose en bolsas para que se mantengan y no se dañen para finalmente ser secados (Huarancca, 2017).

2.3.3.4. Determinación taxonómica de las muestras botánicas.

La determinación taxonómica de las muestras botánicas del presente estudio se trabajó en el Herbario de la UNAMAD, bibliografía especializada y consulta a especialistas del grupo de *Fabaceae*.

Figura N° 10: *Recolección de especies arbóreas de la Subfamilia Caesalpinioideae que presentan nódulos*



2.3.4. Selección y recolección de nódulos radiculares

- **Excavación del suelo para obtención de raíces con nódulos**

Se procedió a escarbar en el suelo a una profundidad de 10 a 30 cm , a una distancia de 1 metro desde la especie arbórea y ubicar raíces laterales o superficiales finas de preferencia buscar una plántula joven, de donde se reconocerán y se recolectaron entre 8 a 10 nódulos de tamaño mediano que se encuentren ubicados en la parte superior de la raíz (Howieson & Dilworth, 2016) (Figura N° 11).

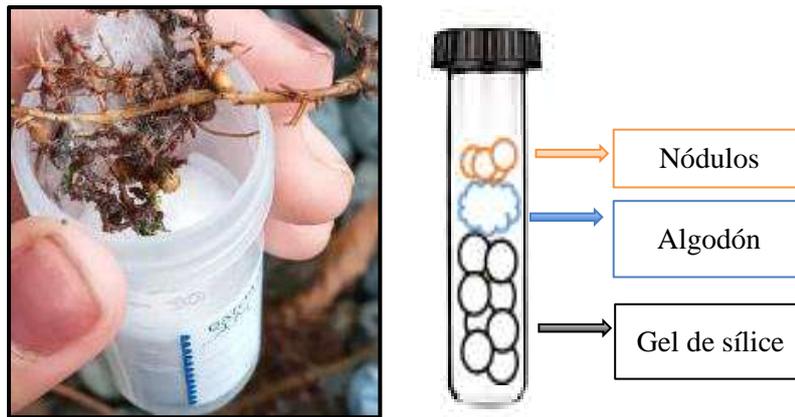
Figura N° 11: *Excavación del suelo para obtención de nódulos*



- **Obtención y traslado nódulos radiculares**

Se seleccionaron aquellos nódulos funcionales que al ser cortados presenten un color rojizo o rosado por dentro, que son las más óptimas para recolectar y por ende realizar el aislamiento. Los nódulos fueron extirpados a partir de un tamaño de raíz entre 2 a 5 mm de largo, luego se almacenaron en frascos de plástico con tapa rosca que contiene material desecante como el gel de sílice con capa de algodón (Figura N° 12) para evitar la presencia de humedad y la infección por hongos (Howieson & Dilworth, 2016).

Figura N° 12: Obtención y transporte nódulos bacterianos

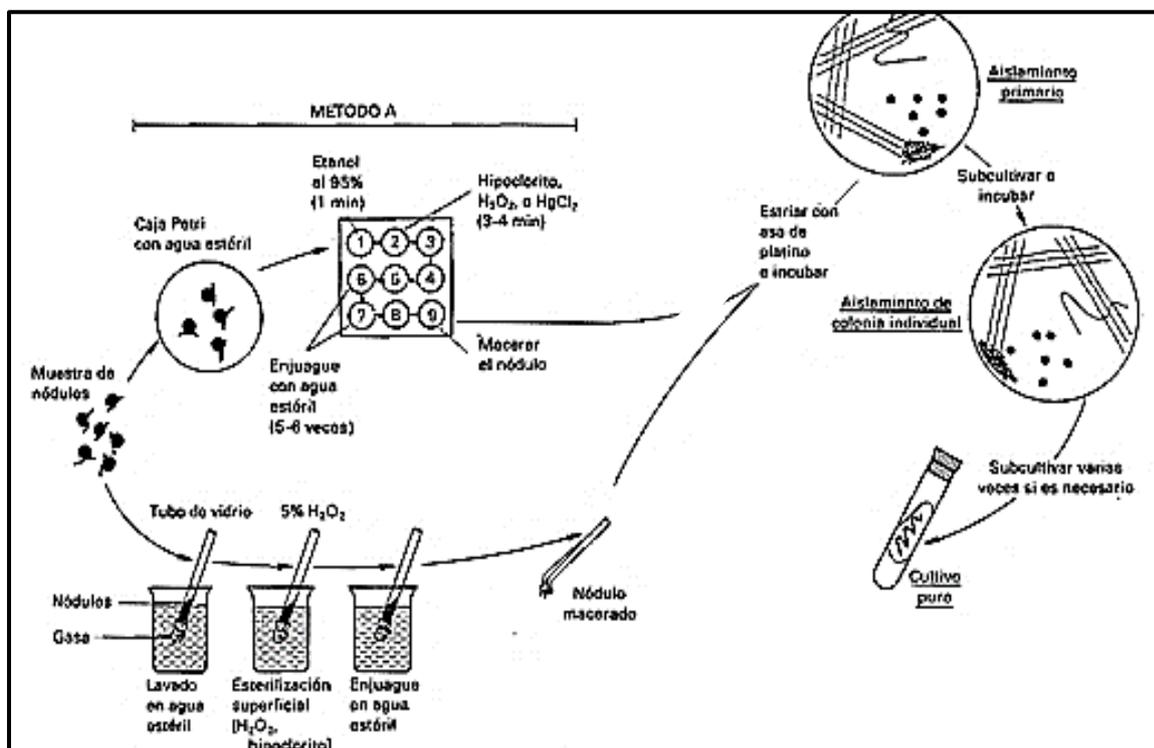


2.3.5. Aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno

Para el aislamiento se utilizó la metodología sugerida por (CIAT, 1988) y (Howieson & Dilwoth, 2016).

Para realizar el este proceso previo a ello se realizaron distintos procedimientos los cuales son descritas a continuación.

Figura N° 13: Proceso de aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno.



Fuente: (CIAT, 1988).

2.3.5.1. Preparación de nódulos radiculares

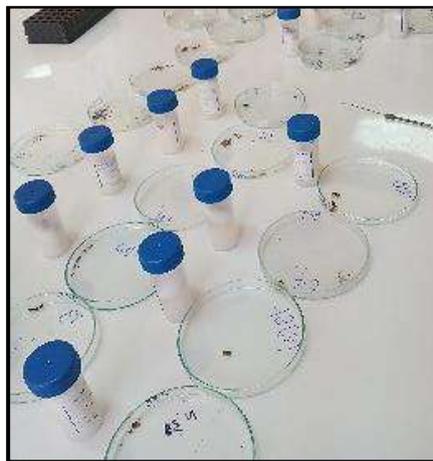
- **Lavado de nódulos radiculares**

Para este procedimiento se realizaron lavados con agua estéril con la finalidad de quitar contaminantes adheridos a los nódulos. Ver figura N° 13.

- **Hidratación de nódulos**

Los nódulos se sumergen en solución tampón PBS en una placa Petri durante 4 horas, donde de este modo logran recuperar el aspecto inicial. (Ortiz, 2017).

Figura N° 14: *Hidratación de nódulos*



- **Desinfección de nódulos radiculares**

Para la esterilización de nódulos, se realizó el siguiente procedimiento: fueron sumergidos en alcohol al 70 % durante un minuto e hipoclorito de sodio al 2% durante 3 min, después se enjuagaron 7 veces cuidadosamente con agua destilada estéril. (Howieson & Dilworth, 2016).

- **Trituración de nódulos radiculares**

Después del último enjuague, se trituró con una gota de agua esteril con una varilla de vidrio esterilizada asépticamente los nódulos individuales. De este modo se obtuvo el triturado (inoculo) de los nódulos. (Howieson & Dilworth, 2016).

Figura N° 15: *Desinfección y trituración de nódulo*



2.3.5.2. Aislamiento de bacterias nitrificantes obtenidas de nódulos radiculares

- **Preparación de medios de cultivo para el aislamiento de nódulos bacterianos**

Para darle las condiciones adecuadas de crecimiento para el aislamiento y además le brinden condiciones químicas que son propias de bacterias fijadoras de nitrógeno se utilizaron los siguientes medios de cultivo.

- **Extracto de Levadura-Manitol Agar (ELMA):** Medio de cultivo universal que permite cultivar bacterias fijadoras de nitrógeno (Fred y Waksman 1928) y (Vicent, 1970). Cuya descripción se aprecia en la (tabla N° 1).

Tabla N° 1: *Medio de cultivo Extracto de levadura-Manitol (ELMA) en un pH 6.8.*

Compuesto	Cantidad
K ₂ HPO ₄	0.655 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Manitol	2,5 g
Sacarosa	7,5 g
Extracto de levadura	0,5 g
Agua destilada	1000 ml
Agar	15 g

Fuente: Vincent (1975); Ferrera et al. (1993).

- **Extracto de Levadura-Manitol-Agar-Rojo Congo (ELMARC).** Este medio de cultivo es similar al ELMA con una diferencia y es la adición suplementada con rojo Congo (0,00125 mg/kg). Este compuesto permite diferenciar las bacterias nitrificantes de los contaminantes como las bacterias Gram-positivas, donde estas no absorben el colorante. Para la preparación de la solución se agrega 0,25 g/100 ml, finalmente se añadirá 10 ml de solución por litro de medio de cultivo (concentración final: 25 mg/l) antes del autoclave ver tabla N° 2 (Howieson & Dilworth, 2016).

Tabla N° 2: Medio de cultivo Extracto de levadura-Manitol-Agar-Rojo Congo (ELMARC)

Compuesto	Cantidad
K ₂ HPO ₄	0,655 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Manitol	2,5 g
Sacarosa	7,5 g
Extracto de levadura	0,5 g
Soluc. Rojo congo	10 ml
Agua destilada	1000 ml
Rojo congo	1 g
Agua destilada	1000 ml
Agar	15 g

Fuente: Vincent (1975); Ferrera et al. (1993).

Para evitar contaminación y lograr la autenticidad de cepas. Se utilizó el siguiente antibiótico.

- **Vancomicina:** este antibiótico inhibe el crecimiento de bacterias Gram-positivas. Para la solución madre, se disolvió 9 mg de cloruro de vancomicina en 3 mL de agua destilada. Agregar 100 uL de solución madre por 300 mL de medio de cultivo (concentración final, 1mg/L) (Howieson & Dilworth, 2016).

- **Pre enriquecimiento**

Para este procedimiento se dispuso en colocar los triturados de los nódulos radiculares en tubos eppendorf de 1 ml con caldo extracto levadura manitol (ELM) por duplicado, en esta fase de aislamiento se buscó revivificar las bacterias que se encontraban en los nódulos, donde fueron incubadas a 28 °C por un periodo entre 3 a 5 días según (Alva, 2013).

- **Primera fase de aislamiento: Siembra del inóculo en el medio ELMARC**

A partir del medio ELM de pre enriquecimiento inoculado se realizó siembras en placas Petri con medio de cultivo ELMARC (Figura N° 16) mediante la técnica agotamiento en superficie por estrías por duplicado (Alva, 2013), para este procedimiento se utilizó este medio de cultivo ya que el indicador Rojo de Congo permite diferenciar Gram negativas de Gram positivas a través de la asimilación de este compuesto. Donde se incubaron a 28°C entre 2 a 7 días. (Howieson & Dilworth, 2016).

Las placas donde hubo crecimiento se realizaron repiques de aquellas colonias seleccionadas tomando en cuenta el color, forma y tamaño para ser posteriormente inoculadas en medio líquido del medio ELM dentro de tubos eppendorf a 27°C entre 3 a 7 días, para su masificación

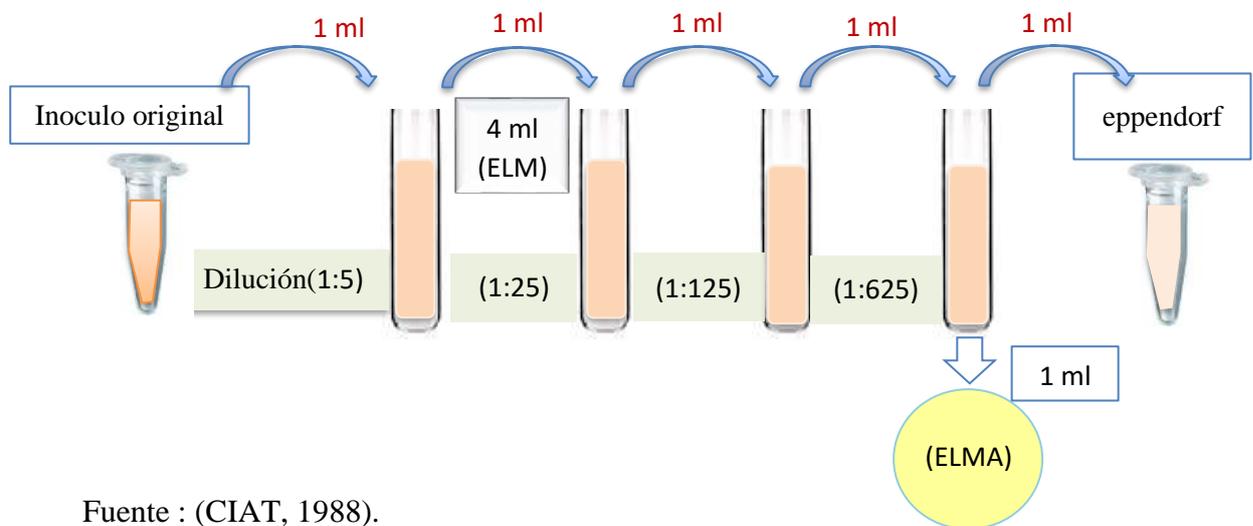
Figura N° 16: *Siembra en la placa en el medio ELMARC por agotamiento de superficie*



- **Segunda fase de aislamiento: Siembra de colonias obtenidas del medio de cultivo ELMARC**

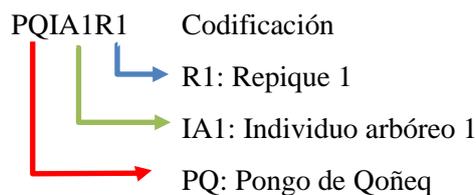
Para esta fase de aislamiento se tomaron la muestra de inóculos de las colonias aisladas en medio ELMARC, esto con el fin de aislar colonias con morfologías diferentes. En este proceso se tomaron inóculos de los tubos eppendorf para realizar diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-5} en el medio ELM (Vicent, 1970) y (CIAT, 1988).

Figura N° 17: Diluciones en el medio de cultivo (ELM)



Fuente : (CIAT, 1988).

Los cultivos se realizaron por duplicado y cada placa Petri estuvo codificada de la siguiente manera:



- **Tercera fase de aislamiento: Siembra de colonias por agotamiento de superficie en medio de cultivo extracto levadura manitol (ELMA)**

De aquellas cepas donde no se observó aislamiento de inóculos obtenidos por diluciones se procedió a sembrar por agotamiento en superficie en el medio ELMA, se incubaron a 28°C entre 2 a 7 días (Figura N°18), con el fin de aislar colonias puras así tener una descripción más precisa de la morfología de cada colonia aislada y estas a su vez también

fueron inoculadas en el medio liquido (ELM), para la obtención de un cepario y su conservación para posteriores estudios (Alva, 2013).

Figura N° 18: *Siembra de inoculos en el medio ELMA*



Figura N° 19: *Siembra en el medio ELMA por agotamiento en superficie*



- **Preservación de cepas aisladas**

Se realizó la preservación para un mantenimiento de cepas aisladas a largo plazo a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en congelador eléctrico, los cuales previo a su almacenamiento se mantuvo en medio de cultivo caldo ELMA y glicerol al 80% en un criotubo con un volumen final de 1ml en concentraciones 85:15 (Howieson & Dilworth, 2016).

Figura N° 20: *Preservación de cepas aisladas en glicerol al 80% a una temperatura de -20°C*



2.3.6. Caracterización fenotípica de colonias aisladas

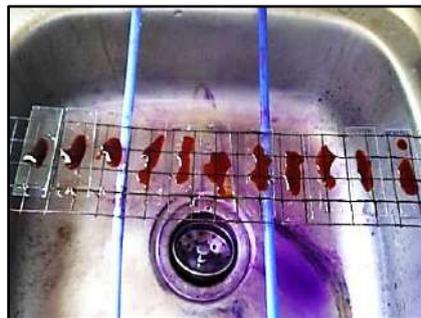
2.3.6.1. Diferenciación morfológica de colonias aisladas

Las colonias que fueron aisladas se clasificaron de acuerdo a las siguientes características: diámetro, color, borde, elevación, textura, aspecto y tiempo de crecimiento (CIAT, 1988).

- Diferenciación mediante tinción Gram

Se tomaron muestras de colonias ya aisladas, con un asa flameada donde se tomó la muestra del cultivo puro, el cual se extiende en una lámina portaobjetos con la adición de suero fisiológico y se fija con la ayuda de la llama del mechero; donde al tener ya la muestra fijada se procedió primero con la adicción cristal violeta sobre la lámina (un minuto), después se lavó con agua destilada y se agregó solución de yodo (un minuto) , se realizó un segundo lavado decolorando con alcohol-acetona al 95 % (treinta segundos); finalmente se tiñe con safranina y se lava por tercera vez; para luego ser observado al microscopio en una resolución de 1000X (Contreras et al. 2007).

Figura N° 21: *Tinción Gram.*



2.3.6.2. Diferenciación de pruebas bioquímicas

Una vez obtenidas las colonias aisladas, se procedió a realizar las pruebas bioquímicas

- **Prueba de TSI (Agar hierro triple azúcar)**

Este medio se usó para ver la reacción de fermentación (sacarosa, lactosa y dextrosa) y la producción de ácido sulfhídrico y producción de gas. Se preparó el medio de cultivo 65 gr /L Se dejó solidificar así formando un pico de flauta. A partir de una colonia pura se realizó la siembra con una asada de cada cepa en la superficie inclinada picando hasta la mitad del medio y enseguida se procedió a extender sobre la superficie del medio de cultivo. Se incubó a 37 °C durante 24 horas a un pH de 7.3 (Das et al., 2018). Las siguientes reacciones se representan de la siguiente forma: viraje rojo (K/K): indica que la cepa no fermenta glucosa, sacarosa y lactosa; cuando muestra viraje Amarillo/Rojo (K/A): fermenta glucosa y cuando presenta un viraje de color amarillo (A/A): indica la asimilación de glucosa, sacarosa y lactosa. Si se observa desplazamiento del medio de cultivo junto a formación de burbujas dentro del tubo indica la formación de gas. Para la reacción de Sulfuro de hidrógeno (H₂S) tiene una reacción característica y es que en el medio de cultivo presenta ennegrecimiento esto nos indica que existe reacción de. Formación de sulfuro de hidrógeno por la reacción del H₂S con el ión ferroso en el medio (en ausencia de reacción extrema ácida) (Delgado, 2013).

Tabla N° 3: *Composición para la preparación de 1 litro del medio (TSI) en un pH 7.3.*

Composición	(gramos / litro): L
Extracto de carne	3.00
Pluripeptona	20.00
cloruro de sodio	5.00
Lactosa	10.00
Sacarosa	10.00
glucosa	1.0
sulfato de hierro y amonio	0.2
tiosulfato de sodio	0.2
rojo de fenol	0.025
Agar	13.00
pH final:	7.3 ± 0.2

Fuente: (Contreras, 2017).

- **MIO (Movilidad Indol Ornitina)**

Se preparó el medio de cultivo 31 gr /L siendo este un medio semisólido donde se preservó de forma vertical. Para ello se sembraron los aislados para identificar movilidad y Ornitina a partir de una colonia pura, se tomó un asa estéril y se inoculó el medio de cultivo, picando el fondo. Se incubó a 37 °C durante 24 hrs. para la prueba de Indol se consideró positiva si, al adicionar el reactivo de Kovacs, presenta un halo rojizo en la superficie, para la prueba de Ornitina se considerará positivo si vira a púrpura y negativo si es amarillo (Ortiz, 2017).

La prueba de Indol permite comprobar si el microorganismo reacciona, provocado por la degradación del aminoácido triptófano mediante el enzima triptofanasa, la prueba Ornitina se verá los microorganismos fermentadores de glucosa que acidifican el medio de cultivo y producen viraje del color púrpura (medio alcalino) al amarillo (medio ácido) (Fernández, et al. 2010)

Tabla N° 4: *Composición para la preparación de 1 litro del medio (MIO)*

Composición	(gramos / litro):
Extracto de levadura	3.00
Peptona de caseína	10.00
Triptona	10.00
Ornitina HCl	5.00
Dextrosa	1.00
Púrpura de Bromocresol	0.02
Agar	2.00
pH final	6.5 +/- 0.2

Fuente: (Ortiz, 2017).

- **Prueba de catalasa**

Se realizó las pruebas donde se tomó colonias puras y aisladas de la placa; para ello a una se le aplica una gota de H₂O₂, se consideró positiva si después de aplicar H₂O₂, después de un minuto produce burbujeo (Ortiz, 2017).

Figura N° 22: *Prueba de catalasa.*



2.3.6.3. Identificación de géneros de bacterias nitrificantes de la subfamilia

Caesalpinioideae

Para realizar la identificación de los géneros de cepas aisladas se evaluaron los siguientes parámetros:

- **Tiempo de crecimiento**

Se evaluó el tiempo de crecimiento para lograr diferenciar cada cepa aislada en dos grupos, aquellas de rápido y lento crecimiento, siendo una característica resaltante en bacterias nitrificantes según (Howieson & Dilwoth, 2016) y (Lopez, 2017), descritas a continuación:

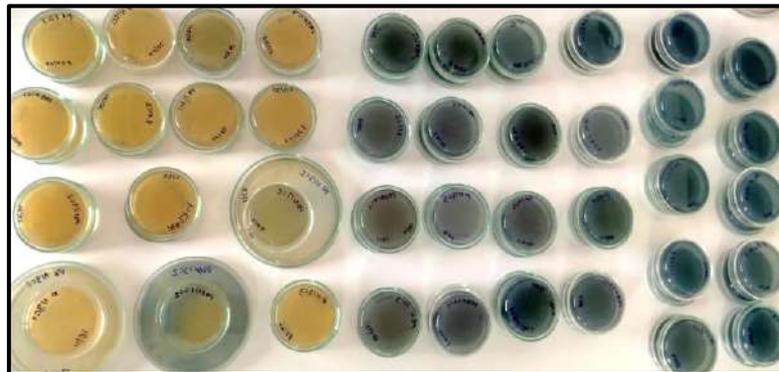
- *Burkholderia* y *Cupriavidus*: Uno o dos días de crecimiento muy rápido.
- *Rhizobium* y *Sinorhizobium* : Dos a cuatro días de crecimiento rápido clásico.
- *Mesorhizobium* : Tres a cinco días
- *Bradyrhizobium*: Seis a catorce días

- **Producción de acidez o alcalinidad**

El indicador muestra reacciones ácidas o alcalinas en medios de cultivo ELMA. Se prepara una solución de azul de bromotimol al 0,5% (p/v) en KOH 0,2 M y se agrega 5 mL/L de la solución para obtener una coloración verde justo antes de la autoclave (Howieson & Dilworth, 2016).

Para esta prueba se tomó un inóculo y se sembró en el medio ELMA+AB (ABT 0.5%) el cual fue incubado a 28°C durante 7 días. El cual indica la presencia de bacterias nitrificantes pertenecientes los géneros: *Rhizobium* cuyo crecimiento es rápido y el viraje es de verde a amarillo indicando acidez, a diferencia de *Bradyrhizobium* su crecimiento es lento y el viraje es de verde a azul indicando alcalinidad (Howieson & Dilworth, 2016).

Figura N° 23: *Reacción de acidez o alcalinidad.*



Nota: Según el viraje de este indicador las cepas productoras de acidez (color amarillo del medio) se calificaron como *Rhizobium*; mientras que las cepas productoras de alcalinidad (color azul del medio) como *Bradyrhizobium*(Lopez, 2017) y (Beck et al., 1993).

- **Morfología fenotípica de colonias aisladas**

Se evaluaron de acuerdo a las características morfológicas descritas por (Howieson & Dilworth, 2016).

Figura N°24 : Morfología de colonias y rasgos característicos de bacterias formadoras de nódulos cultivados en medio ELMA.

Género	Morfología de la colonia y rasgos característicos
	contrario) a 28°C
<i>Aminobacter</i>	Las colonias que aparecen en YMA a los dos o tres días de incubación a 28°C son circulares, opacas, convexas, tienen un color cremoso y suelen tener un diámetro de 2-3 mm.
<i>Azorhizobium</i>	Las colonias en agar son circulares y de color crema.
<i>Bradyrhizobium</i>	Las colonias son circulares, convexas y a menudo translúcidas en su primera aparición, y cuando tienen menos de 1 mm de diámetro (aproximadamente de cinco a ocho días), pero luego son fuertemente opacas y tienden al gris oscuro con la maduración posterior. Las colonias de algunas cepas tienen 3 mm de diámetro o más
<i>Devosia</i>	Las colonias son mucoides y de color blanco perla en el medio YMA; típico de los rizobios de crecimiento rápido.
<i>Mesorhizobium</i>	después de cuatro a siete días. Rara vez son gomosas. Colonias como para <i>Rhizobium</i> pero visibles 24-48 horas después, débilmente opacas después de 72 horas, aumentando con la edad.
<i>Methylobacterium</i>	Colonias visibles en cuatro a siete días. Las colonias son brillantes, lisas, elevadas, con márgenes enteros, de 0,5-1 mm de diámetro tras cuatro a siete días de incubación. Después de 7 días, las colonias de algunas cepas de especies de <i>Listia</i> son de color rosa pálido a rojo anaranjado brillante.
<i>Microvirga</i>	Colonias visibles en 24 horas. Muchas colonias son de color rosa claro o naranja pálido a marrón, convexas, lisas, redondas y la coloración se desarrolla 72 horas después de que emerjan las colonias visibles, débilmente opacas y ligeramente gomosas. Algunas cepas pueden mostrar manchas marrones al cabo de siete a diez
<i>Neorhizobium</i>	Las colonias son circulares, convexas, de color blanco o crema, semitranslúcidas u opacas, con un diámetro de 1-4 mm en un plazo de dos a cuatro días en YMA a 28°C.
<i>Ochrobactrum</i>	Las células forman colonias mucoides blancas en medio YMA.
<i>Phyllobacterium</i>	Las colonias son pequeñas, puntiformes o circulares, de color blanco perla con borde regular y diámetro de la colonia <1 mm tras uno o dos días de crecimiento en YMA a 28°C.
<i>Rhizobium</i>	Las colonias suelen ser visibles en 48 horas. Las colonias suelen ser blancas o beige, circulares, convexas, semitranslúcidas u opacas, elevadas y mucilaginosas, de 2-4 mm de diámetro en un plazo de tres a cinco días en YMA.
<i>Sinorhizobium/Ensifer</i>	Colonias visibles en 48 horas, débilmente opacas tras 72 horas y gomosas. Morfología de rosquilla (Figura 3.6) en <i>S. medicae</i> cuando se aísla por primera vez de los nódulos.
<i>Shinella</i>	Las colonias son circulares, de color crema, semitranslúcidas y de 2-4 mm de diámetro tras tres días de incubación a 28°C en medio YMA
<i>Burkholderia</i>	Colonias visibles en 24 horas. Las colonias son blancas, lisas, redondas, convexas, en su mayoría con márgenes enteros, de 0,5-2,0 mm de diámetro tras 24 horas de incubación. Las colonias pueden adquirir un tinte amarillo-marrón después de 48

Fuente: (Howieson & Dilworth, 2016).

Finalmente, ya identificados los géneros se evaluó la identificación de morfoespecies para correlacionar características morfológicas (forma, color, tamaño) donde se aplicó un análisis de correspondencias múltiples y de componentes principales (ACP). Para obtener grupos de características compatibles entre las morfoespecies, todo ello se realizó a través de procesos de diferenciación y comparación de caracteres morfológicos que destacaron (Pérez, 2011).

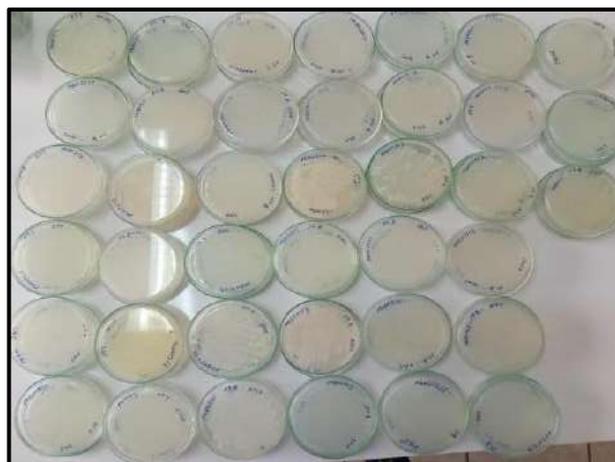
2.3.7. Selección del potencial bioinoculante de bacterias nitrificantes

Para el proceso de determinación del potencial bioinoculante se seleccionaron cepas aisladas y puras. Los criterios a considerar en el proceso de selección es la capacidad de adaptación para lograr crecimiento y tolerancia a condiciones de estrés (Cuadrado, Rubio, & Santos, 2009). Aquellas cepas que resulten adaptarse y tolerar en condiciones de estrés, fueron seleccionadas como potencial bioinoculante, donde se evaluó la capacidad de tolerar los siguientes factores: NaCl, pH y temperatura.

2.3.7.1. Tolerancia a pH

Para determinar la capacidad de crecimiento de las cepas aisladas se sometió a diferentes pH: 2, 4, 8, 9, donde se evaluó utilizando medio ELMA el cual se ajustó los valores de pH con las soluciones NaOH 0.1N y HCl 0.1 N. Después fueron incubadas a 28°C durante 5 a 7 días. Si hay crecimiento en las placas, se consideró como un resultado positivo y si no hay crecimiento se indica un resultado negativo (Alva, 2013).

Figura N° 25: *Siembra en placas en el medio ELMA a diferentes pHs*



2.3.7.2. Tolerancia a Salinidad

Se tomaron en cuenta las concentraciones de acuerdo a las investigaciones de Cuadrado et, al 2009, donde señala que existen rizobios que pueden crecer por encima de los 5.5% de

NaCl, Por ello para este procedimiento se realizó la siembra de cepas aisladas en diferentes concentraciones de NaCl al 1.5, 2.5, 4, 6 y 8 % en el medio ELMA. Donde se usa un control positivo en concentración normal de NaCl al 0.02%. Dicho resultado se evalúa en un periodo de tiempo de 7 y 14 días de incubación a 28°C (Alva, 2013).

Figura N° 26: *Siembra en placas en el medio ELMA a diferentes concentraciones de NaCl.*



2.3.7.3. Tolerancia a Temperatura

La tolerancia a diferentes grados de temperatura se evaluó el crecimiento de cepas aisladas en medio ELMA e incubadas a temperaturas de: 4, 13, 40 °C. Se hizo un seguimiento del crecimiento en las placas a los 7 y 14 días de incubación (Alva, 2013). Además, se buscó ver el rango de crecimiento y adaptabilidad a diferentes temperaturas (Cuadrado et al 2009).

Figura N° 27: *Siembra en placas en el medio ELMA a diferentes temperaturas*



2.3.8. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se realizaron gráficas para el estudio de los porcentajes y tablas de distribución de frecuencias (Cuadrado, Rubio & Santos, 2009). Y en cuanto a uno de los objetivos para conocer el potencial Bioinoculante de las poblaciones de bacterias de las morfoespecies de los tres géneros registrados, se hizo el análisis del crecimiento y desarrollo en cada una de las dosis de salinidad, pH y grados de temperatura. También para conocer si existe algún patrón de ordenamiento asociado alguna de las variables se ha realizado el ACP (Análisis de Componentes Principales). Para correlacionar características entre los diferentes morfoespecies así obtener grupos de características compatibles, esta permite investigar conjuntos de datos multidimensionales con variables cuantitativas, tiene como ventajas: la visualización de las correlaciones entre variables para poder limitar el número de variables a medir posteriormente. La obtención de factores no correlacionados que son combinaciones lineales de las variables iniciales para poder utilizar estos factores en métodos de modelización como la regresión lineal, la regresión logística o el análisis discriminante, visualizar las observaciones en un espacio bidimensional o tridimensional para identificar grupos uniformes o atípicos de observaciones (James et al. 2002). Para el presente estudio se utilizaron las medidas de las tolerancias y desarrollo a las diferentes medidas de temperatura, pH y salinidad. El análisis y producción de gráficos se realizó con el Software R, R Core Team (2022).

- **Investigación descriptiva** comprende el registro, recopilación de datos, análisis, observación de los fenómenos e interpretación, ya que se trabaja sobre realidades de hechos presentes.
- **Investigación experimental** consiste en someter a un objeto o grupo de individuos en determinadas condiciones, estímulos o tratamiento (variable independiente), para observar los efectos o reacciones que se producen (variable dependiente)” también

se manipula una o más variables de estudio, para controlar el aumento o disminución de esas variables y su efecto en las conductas observadas. (Arias, 2015).

- **Análisis de Componentes Principales (ACP)**, es una técnica estadística utilizada para el análisis de datos multivariados. Se usó la metodología para la elaboración de un índice versátil, el cual proporciona las componentes que explican la mayor parte de las variables e indicadores, estas agrupaciones tienen una alta correlación entre sí. El objetivo es hallar combinaciones lineales de variables representativas de ciertos fenómenos multidimensionales, con la propiedad de que exhiban varianza máxima y a la vez no estén correlacionadas entre sí y también reducir la dimensionalidad de un conjunto de observaciones con una gran cantidad de variables. A partir de la proyección de observaciones iniciales sobre las direcciones de máxima varianza se obtiene un nuevo espacio de representación de los elementos iniciales donde se puede eliminar fácilmente aquellas componentes con menor varianza, así garantiza la mínima pérdida de información (Giraldo, 2021).

CAPÍTULO III

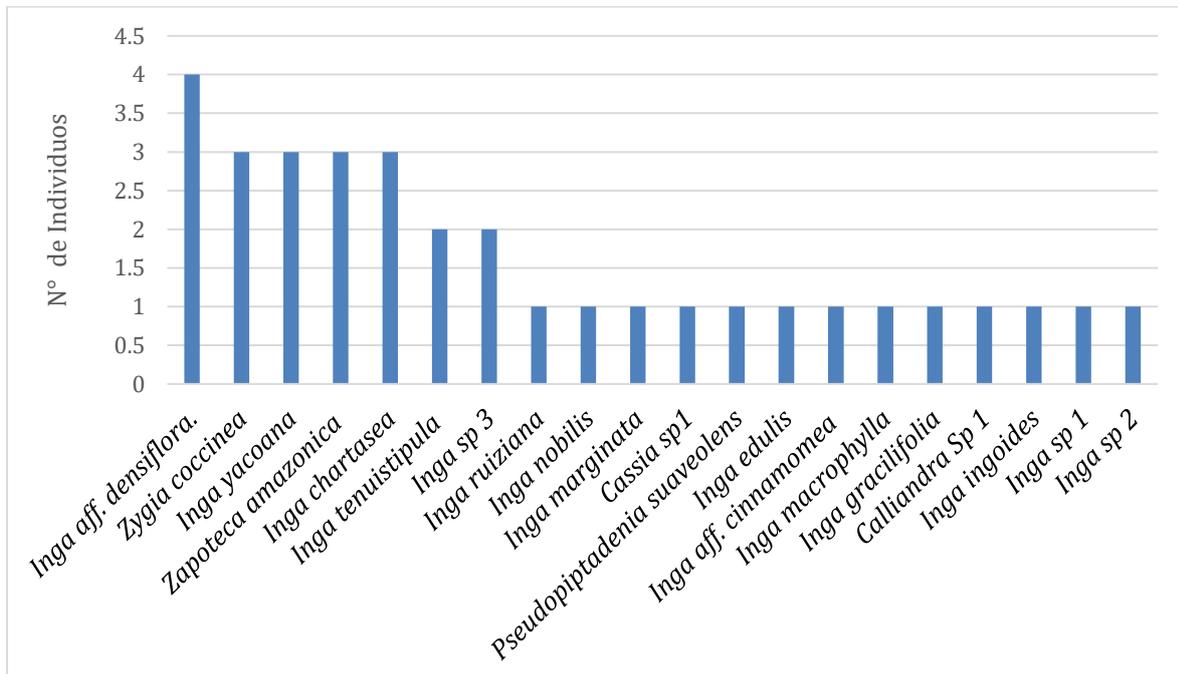
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. RESULTADOS

3.1.1. Identificación de especies arbóreas de la subfamilia Caesalpinioideae

Para la identificación se procedió a recolectar tres muestras por especie arbórea para su posterior identificación en el herbario UNAMAD, donde se lograron identificar a 33 individuos de las cuales se obtuvo la identificación de 20 especies que pertenecen a la subfamilia *Caesalpinioideae* que son las siguientes: *I. ruiziana*, *I. nobilis*, *I. marginata*, *I. chartacea*, *I. aff. densiflora*, *I. yacoana*, *I. tenuistipula*, *I. gracilifolia*, *I. edulis*, *I. aff. cinnamomea*, *I. ingoides*, *I. macrophylla*, *Inga sp1*, *Inga sp2*, *Inga sp3*, *Zapoteca amazónica*, *Cassia sp1*, *Calliandra sp1*, *Pseudopiptadenia sp1* y *Zygia coccinea* (Figura N°28) y tabla N°6.

Figura N° 28: Identificación de especies arbóreas de la subfamilia *Caesalpinioideae*



Nota: Se diferenció 20 especies donde: 4 individuos (12%) pertenecen a *Inga aff. densiflora*; 3 individuos (9%) pertenecen a las especies *Zygia coccinea*, *Inga yacoana*, *Zapoteca amazónica*, *Inga chartasea*; 2 individuos (6%) pertenecen a las especies *Inga tenuistipula* *Inga sp3* y los demás solo se obtuvo un individuo por especie (3%).

- **Descripción morfológica especies arbóreas de la Subfamilia Caesalpinioideae**

Se obtuvieron 20 especies en la zona de muestreo donde se evaluaron características morfológicas de cada individuo. Según los resultados obtenidos de cada especie se pueden observar en la tabla N°5.

Tabla N° 5: Características morfológicas de las especies arbóreas

Características morfológicas de especies arbóreas de la subfamilia <i>Caesalpinioideae</i>					
Código	Especie	Característica			
		Altura (m.)	Tipo	D.A.P (m)	Altitud (m.s.n.m.)
PQIA1	<i>Inga nobilis</i>	30	adulto	60	518
PQIA2	<i>Inga marginata</i>	20	adulto	50	523
PQIA3	<i>Inga ruiziana</i>	20	adulto	40	533
PQIA4	<i>Inga chartacea</i>	25	adulto	60	552
PQIA5	<i>Inga aff. densiflora</i>	5	juvenil	8	552
PQIA6	<i>Zygia coccinea</i>	10	juvenil	9	560
PQIA7	<i>Pseudopiptadenia sp1</i>	25	adulto	30	562
PQIA8	<i>Inga tenuistipula</i>	10	juvenil	9	563
PQIA9	<i>Inga macrophylla</i>	30	adulto	65	563
PQIA10	<i>Inga sp1</i>	25	adulto	15	573
PQIA11	<i>Inga yacoana</i>	20	adulto	20	573
PQIA12	<i>Zapoteca amazonica</i>	4	juvenil	3	575
PQIA13	<i>Inga aff. densiflora</i>	5	juvenil	5	578
PQIA14	<i>Inga yacoana</i>	25	adulto	50	620
PQIA15	<i>Inga aff. densiflora.</i>	25	adulto	60	623
PQIA16	<i>Inga tenuistipula</i>	25	adulto	48	623
PQIA17	<i>Inga aff. densiflora.</i>	4	juvenil	5	630
PQIA18	<i>Inga edulis.</i>	13	juvenil	18	630
PQIA19	<i>Inga yacoana</i>	28	adulto	67	630
PQIA20	<i>Inga aff. cinnamomea</i>	8	juvenil	10	635
PQIA21	<i>Inga ingoides</i>	30	adulto	1.2	635
PQIA22	<i>Zygia coccinea</i>	10	juvenil	20	640
PQIA23	<i>Inga chartacea</i>	15	juvenil	12	647
PQIA24	<i>Inga sp2</i>	8	juvenil	10	647
PQIA25	<i>Inga sp3</i>	6	juvenil	8	647
PQIA26	<i>Zygia coccinea</i>	4	juvenil	6	650
PQIA27	<i>Inga sp3</i>	6	juvenil	7	650
PQIA28	<i>Inga gracilifolia</i>	3	juvenil	10	650
PQIA29	<i>Zapoteca amazonica</i>	5	juvenil	4	650
PQIA30	<i>Cassia sp1</i>	11	juvenil	7	650
PQIA31	<i>Zapoteca amazonica</i>	8	juvenil	5	650
PQIA32	<i>Calliandra sp1</i>	9	juvenil	6	656
PQIA33	<i>Inga chartacea</i>	8	juvenil	15	670

Fuente: Elaboración propia.

Nota: En esta tabla se evidencio 20 especies arboreas que fijan nitrógeno a través de la formación de los nódulos como son los mencionados, lo que se corrobora en gran medida lo manifestado por (Pennington, 2003) y (Huarancca, 2017).

3.1.2. Caracterización morfológica de nódulos radiculares presentes en especies arbóreas de la subfamilia Caesalpinioideae

Los nódulos extraídos de especies arbóreas, fueron descritas según su morfología, tomando en cuenta la forma, tamaño y color, donde en cuanto al color presentaron: amarillo cremoso (38%), blanco cremoso (8%), crema (50%) y amarillo y rosa (4%). Ver figura N°29 y tabla N° 6.

Figura N° 29: Identificación de especies arbóreas y codificación de nódulos radiculares de la subfamilia Caesalpinioidea

Código de nódulos radiculares	Especie arbórea
<p>PQIA1</p> 	<p><i>Inga nobilis</i></p> 
<p>PQIA2</p> 	<p><i>Inga marginata</i></p> 

Código de nódulos radiculares

Especie arbórea

PQIA3

Inga ruiziana



PQIA4

Inga chartacea



PQIA5

Inga aff. densiflora



PQIA6

Zygia coccinea



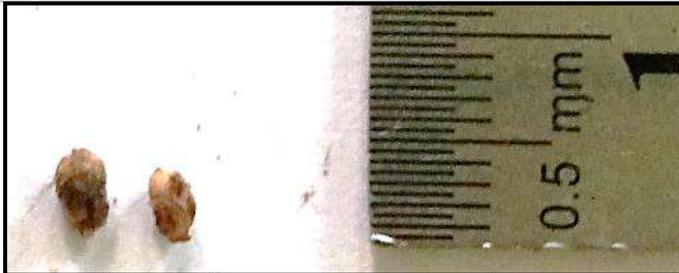
PQIA7



Pseudopiptadenia sp1



PQIA8



Inga tenuistipula



PQIA11



Inga yacoana



Código de nódulos radiculares

Especie arbórea

PQIA12



Zapoteca amazonica



Código de nódulos radiculares

PQIA13



Especie arbórea

Inga aff. densiflora



PQIA14



Inga yacoana



PQIA15



Inga aff. densiflora



PQIA16



Inga tenuistipula



Código de nódulos radiculares	Especie arbórea
<p>PQIA17</p> 	<p><i>Inga aff. densiflora</i></p> 
<p>PQIA18</p> 	<p><i>Inga edulis</i></p> 
<p>PQIA19</p> 	<p><i>Inga yacoana</i></p> 
<p>PQIA20</p> 	<p><i>Inga aff. cinnamomea</i></p> 

Código de nódulos radiculares

PQIA21



Especie arbórea

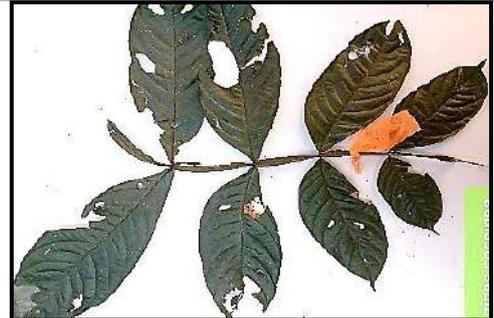
Inga ingoides



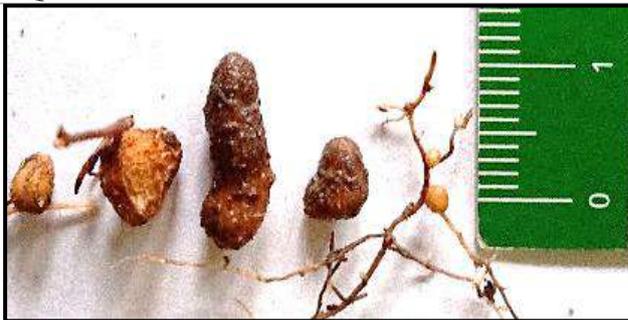
PQIA25



Inga sp3



PQIA27



Inga sp3



PQIA29



Zapoteca amazonica



PQIA33



Inga chartacea



Especies arbóreas que no presentaron nódulos radiculares			
PQIA9	<i>Inga macrophylla</i>	PQIA10	<i>Inga sp1</i>
			
PQIA24	<i>Inga sp2</i>	PQIA28	<i>Inga gracilifolia</i>
			

(Elaboración propia)

Nota: Se observa 26 especies que presentan nódulos lo cual indica que fijan nitrógeno a través de la formación de los nódulos como son los mencionados, lo que corrobora en gran medida lo manifestado por (Pennington, 2003) y (Huaranca, 2017), sin embargo 7 especies arbóreas no registraron nódulos y estas son: *Inga macrophylla*, *Inga gracilifolia*, *Cassia sp1*, *Zapoteca amazonica*, *Calliandra sp1*, *Inga sp1e* *Inga sp2* esto podría deberse a diferentes factores relacionados con la edad del árbol y su necesidad de asimilar nitrógeno.

Algunas investigaciones sobre la fijación de *Rhizobium* en las leguminosas como el estudio de (Bécquer, 2004) establecen que existe una diversidad de especies y han sido reconocidas como bacterias presentes en estos tipos de especies, sus nódulos suelen ser grandes (escasos), pequeños generalmente abundantes y ampliamente dispersos en la raíz (Coiné, 2000). Esto concuerda con los datos obtenidos ya que se encontraron mayor cantidad de nódulos pequeños. Según los estudios de (Dart & Mercer, 1966) algunas células bacterianas de

Rhizobium se expanden poco a medida que se desarrolla el nódulo y retienen su forma bacilar, pero otras se expanden ampliamente y pierden dicha estructura. De estos dos tipos de desarrollo se derivan morfológicamente varios tipos de bacteroides de *Rhizobium* como son: esferoides, elipsoides, ramificadas o irregulares o en forma de bacilo, cabe resaltar que su morfología de todos los *Rhizobium* tienen la misma función dentro del nódulo. Comparando con las observaciones microscópicas realizadas coincide con las estructuras morfológicas irregulares que presentan los *Rhizobium*.

Tabla N°6: Características morfológicas de nódulos radiculares

Características morfológicas de nódulos radiculares								
Código	Especie	Nódulo				Raíz		
		Tamaño (Cm)	Color	Forma	Cantidad	Color	Profundidad (Cm)	Ubicación
PQIA1	<i>Inga nobilis</i>	0.1-1.5	AC	O, C	10-20	Cf	S	3°
PQIA2	<i>Inga marginata</i>	0.5	AC	R, O	5-10	Cf	S	3°
PQIA3	<i>Inga ruiziana</i>	0.3	BC	R	2-3	Cf	S	2°
PQIA4	<i>Inga chartacea</i>	0.5-1	AC	R, O	1-2	MR	5	3°
PQIA5	<i>Inga aff. densiflora</i>	0.5	BC	R, O	1-3	Cf	10	2°
PQIA6	<i>Zygia coccinea</i>	0.5	Cr	O	1-2	Cr	2-5	3°
PQIA7	<i>Pseudopiptadenia sp1</i>	0.5	Cr	R	1-2	Cr	1-5	3°
PQIA8	<i>Inga tenuistipula</i>	0.5	Cr	R	1	Cf	1-5	3°
PQIA11	<i>Inga macrophylla</i>	10-20	Cr	O, C	1-3	Cr	1-7	3°
PQIA12	<i>Inga sp1</i>	0.5	Cr	R	0-1	Cr	1-5	3°
PQIA13	<i>Inga yacoana</i>	0.5-1	AC	R	2-3	AC	1-2	2°
PQIA14	<i>Zapoteca amazonica</i>	0.5-1	Cr	O	1-3	AC	2-5	2°
PQIA15	<i>Inga aff. densiflora</i>	1-2	AC	O,R, C	10-15	Cr	1-2	3°
PQIA16	<i>Inga yacoana</i>	0.2-0.5	AC	R	5-10	AC	2-3	3°
PQIA17	<i>Inga aff. densiflora.</i>	0.4-0.7	AC	R, O	1-2	AC	1-2	3°
PQIA18	<i>Inga tenuistipula</i>	0.1 -0.2	Cr	R	0-2	Cr	1-5	3°
PQIA19	<i>Inga aff. densiflora.</i>	0.5-1	Cr	R	5-7	Cr	1-3	3°
PQIA20	<i>Inga edulis.</i>	0.5	Cr, A, R	R	1-2	Cr,Mr	2-5	2°
PQIA21	<i>Inga yacoana</i>	0.1	Cr	R	1-2	Cr	3	3°
PQIA22	<i>Inga aff. cinnamomea</i>	0.01	Cr	R	1-2	Cr	3	3°
PQIA23	<i>Inga ingoides</i>	0.01	Cr	R	1-2	Cr	3	3°
PQIA25	<i>Zygia coccinea</i>	0.5-0.7	AC	R, O	2-3	Mr	2	3°
PQIA26	<i>Inga chartacea</i>	0.5-1	Cr	R	5-8	Mr	3	2°
PQIA27	<i>Inga sp2</i>	0.5-1	AC	R, O	2-3	Mr	5	3°
PQIA29	<i>Inga sp3</i>	0.5-0.8	AC	R	2-4	MC	3	2°
PQIA33	<i>Zygia coccinea</i>	0.3-0.5	Cr	R	4-6	MC	3	2°

Fuente: Elaboración propia

Leyenda: R: Redondo, O: Ovalado, C: Corazonado, S: superficial.

AC: Amarillo cremoso, Cr: Crema, BC: Blanco cremoso, A: Amarillo, R: Rosa.

Cf: café, Mr: Marrón, MC: Marrón cremoso, MR: Marrón rojizo.

3.1.3. Aislamiento de cepas fijadoras de nitrógeno presentes en especies arbóreas de la subfamilia Caesalpinioideae

3.1.4.1. Primera fase de aislamiento

En esta fase se usó el medio ELMARC donde se inocularon por duplicado los extractos de los nódulos de los 26 individuos arbóreos en las placas, donde se buscó primero revivificar las bacterias que se encontraban en los nódulos. Ver ANEXO N°3. Para la selección de las colonias, el elemento esencial fue la absorción del colorante rojo Congo en el medio ELMARC ya que permitió diferenciar las bacterias Gram negativas de las Gram positivas así reafirmando (Howieson JG & Dilworth MJ, 2016).

Se obtuvieron el crecimiento de colonias en las placas, pero cabe destacar que en una misma placa se observaron más de un solo tipo de colonias, a excepción de las placas PQIA8, PQIA9, PQIA14 que no presentaron crecimiento, de las cuales a estas placas se les dio más de 7 días de incubación y siguieron presentando crecimiento nulo.

Las placas donde si hubo crecimiento se realizaron repiques de aquellas colonias que previamente fueron pre seleccionadas tomando en cuenta el color, forma y tamaño para que posteriormente fueran inoculadas en medio líquido del medio ELM en tubos eppendorf para su masificación y finalmente se incubaron a 28°C entre 3 a 5 días.

3.1.4.2. Segunda fase de aislamiento

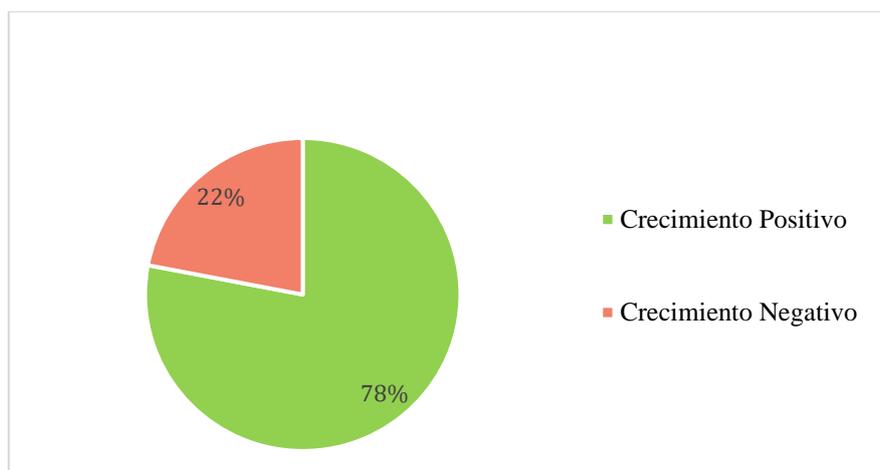
Se realizó un segundo aislamiento ya que no se lograron aislar todas las muestras en estudio, es así que en este proceso se tomaron inóculos de los tubos eppendorf para realizar diluciones hasta 10⁻⁵ que posteriormente fueron inoculadas al medio de cultivo ELMA de las

diluciones 10^{-4} y 10^{-5} de este modo solo se logró el aislamiento de un segundo grupo las cuales fueron las 61 siguientes cepas: PQIA1R3, PQIA1R4, PQIA2R2, PQIA4R1, PQIA4R2, PQIA4R4, PQIA11R2, PQIA16R1, PQIA25R1, PQIA26R1, PQIA27R1, PQIA27R2 y PQIA33R1.

3.1.4.3. Tercera fase de aislamiento

Para aquellas placas donde no se logró obtener colonias aisladas se procedió a realizar otra técnica de aislamiento que es agotamiento en superficie las cuales fueron para las siguientes cepas: PQIA1R1, PQIA1R2, PQIA2R1, PQIA3R1, PQIA5R1, PQIA6R1, PQIA7R1, PQIA7R2, PQIA7R3, PQIA11R3, PQIA12R1, PQIA12R3, PQIA13R2, PQIA13R2, PQIA15R1, PQIA15R2, PQIA15R3, PQIA16R2, PQIA16R3, PQIA17R1, PQIA18R1, PQIA19R2, PQIA20R1, PQIA20R2, PQIA26R2, PQIA29R1, PQIA29C2. Las placas se dejaron en incubación a 28°C de 3 a 5 días, donde el control de crecimiento se realizó todos los días, debido a que el tiempo de crecimiento fue una de las características principales que permitió distinguirlas en grupos de género. Mediante estas técnicas de aislamiento ya mencionadas se lograron obtener colonias puras. Ver figura N° 30 y tabla N° 7.

Figura N° 30: *Crecimiento y aislamiento de cepas*



Nota: De aquellas 50 cepas iniciales que presentaron un crecimiento se aislaron 39 cepas (78%) con un crecimiento positivo y 11 cepas(22%) no presentaron crecimiento.

Tabla N° 7: Aislamiento de colonias obtenidas de nódulos

Lista de crecimiento de cepas					
N°	Código	Crecimiento	N°	Código	Crecimiento
1	PQIA1R1	Positivo	26	PQIA13R3	Positivo
2	PQIA1R2	Positivo	27	PQIA15R1	Positivo
3	PQIA1R3	Positivo	28	PQIA15R2	Positivo
4	PQIA1R4	Positivo	29	PQIA15R3	Positivo
5	PQIA2R1	Positivo	30	PQIA16R1	Positivo
6	PQIA2R2	Positivo	31	PQIA16R2	Positivo
7	PQIA3R1	Positivo	32	PQIA16R3	Positivo
8	PQIA4R1	Positivo	33	PQIA17R1	Positivo
9	PQIA4R2	Positivo	34	PQIA17R2	Negativo
10	PQIA4R3	Negativo	35	PQIA17R3	Negativo
11	PQIA4R4	Positivo	36	PQIA18R1	Positivo
12	PQIA4R5	Negativo	37	PQIA18R2	Negativo
13	PQIA5R1	Positivo	38	PQIA19R1	Negativo
14	PQIA6R1	Positivo	39	PQIA19R2	Positivo
15	PQIA7R1	Positivo	40	PQIA20R1	Positivo
16	PQIA7R2	Positivo	41	PQIA20R2	Positivo
17	PQIA7R3	Positivo	42	PQIA25R1	Positivo
18	PQIA11R1	Negativo	43	PQIA26R1	Positivo
19	PQIA11R2	Positivo	44	PQIA26R2	Positivo
20	PQIA11R3	Positivo	45	PQIA27R1	Positivo
21	PQIA12R1	Positivo	46	PQIA27R2	Negativo
22	PQIA12R2	Negativo	47	PQIA29R1	Positivo
23	PQIA12R3	Positivo	48	PQIA29R2	Positivo
24	PQIA13R1	Negativo	49	PQIA33R1	Positivo
25	PQIA13R2	Positivo	50	PQIA33R2	Negativo

Fuente: Elaboración propia.

3.1.4. Identificación a nivel de género y morfoespecies de bacterias nitrificantes presentes en la subfamilia *Caesalpinioideae*

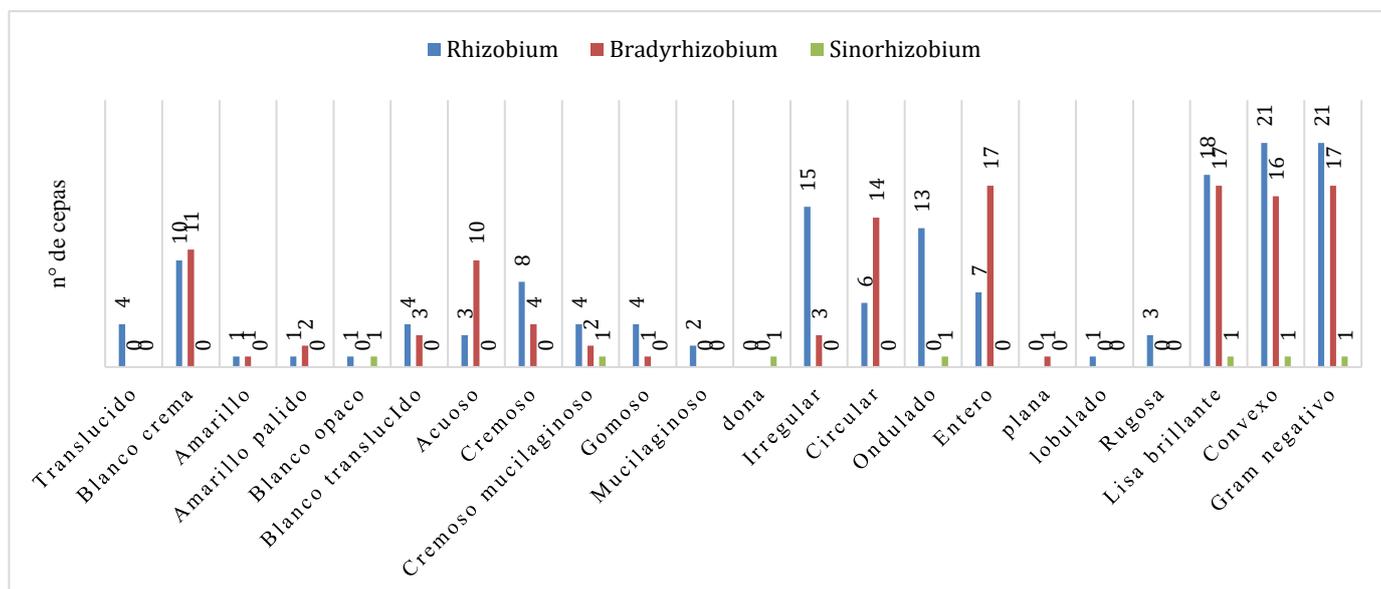
Como resultado se aislaron 39 cepas lo que permitió caracterizar fenotípicamente de acuerdo a sus características morfológicas tales como tamaño, color, forma, tiempo de crecimiento (rápido crecimiento y lento crecimiento) y coloración Gram, ya que estas características fueron importantes para poder identificar a nivel de género y morfoespecies.

3.1.4.1. Caracterización fenotípica de colonias aisladas

Para la caracterización de las 39 cepas bacterianas aisladas del medio de cultivo ELMA se obtuvo que el 51% (20 cepas) desarrollaron colonias circulares, el 46% (18 cepas) colonias irregulares y 3% (1 colonia) colonias en forma de dona; en cuanto al borde el 62% (24 cepas) desarrollaron colonias con borde entero, el 36% (14 cepas) con borde ondulado y el 3% (1 cepa) con borde lobulado; respecto a la elevación el 97% (38 cepas) presentaron elevación convexa y el 3% (1 cepa) presentó borde plano; respecto a la superficie el 92% (36 cepas) presentaron superficie lisa y brillante mientras que el 8% (3 cepas) presentaron superficie rugosa; respectó a la consistencia el 33% (13 cepas) presentaron consistencia acuoso, el 31% (12 cepas) consistencia cremoso, el 18% (7 cepas) fueron cremosos mucilaginosos, el 13% (5 cepas) consistencia gomoso, el 5% (2 cepas) mucilaginoso. Ver la tabla N° 8.

Una de las características necesarias para la identificación también fue el color que presentaban cada colonia aislada donde un 54% (21 cepas) presentaron color blanco crema, el 18% (7 cepas) presentaron el color blanco translucido, el 10% (4 cepas) con color translucido, el 8% (3 cepas) color amarillo claro, el 5% (2 cepas) color amarillo y el 5% (2 cepas) blanco opaco. Ver tabla N° 8 , Figura N° 31 y el ANEXO N°3.

Figura N° 31: Características fenotípicas de cepas aisladas



Nota: Se observan colonias características para el género *Rhizobium* donde se observan colonias blancas o rosadas, debido a que no absorben el rojo de Congo; sin embargo (Rojas et al., 2009) señala que si se tornan al color rojo intenso luego de 8 días de incubación; evento que se registra en los aislados nos indica la absorción de rojo Congo y esto es una característica típica del género *Agrobacterium sp.*, a diferencia de *Rhizobium sp.*, que no lo absorbe tal como menciona (Howieson JG & Dilworth MJ, 2016).

Para la identificación del género *Bradyrhizobium* en cuanto las características morfológicas estas presentaron colonias circulares que miden menos de 1 mm, de color blancas translucidas, convexas enteras y además de que presentaron crecimiento lento de 5 a 7 días dando resultados similares por el autor (Cuadrado et al., 2009), donde se tuvo como sustento estos parámetros descritos para poder identificar este tipo de colonias dentro del género *Bradyrhizobium*.

Para la identificación del Género *Sinorhizobium* se tomó en cuenta la característica más connotativa para poder identificarla ya que las colonias aisladas presentaron forma de rosquilla de la misma forma descrita por los autores (Howieson & Dilworth, 2016).

- **Tinción Gram**

Se realizó este procedimiento para las 39 cepas aisladas. Donde la observación microscópica confirmó que todas las cepas aisladas son Gram negativas y sus características morfológicas son bacilares, coco bacilos y formas irregulares. Ver tabla N°8 y ANEXO N°3.

Tabla N°8: Características morfológicas de colonias aisladas

Características morfológica de colonias aisladas								
Código	Color	Consistencia	Diámetro (mm)	Forma	Borde	Elevación	Superficie	Gram
PQIA1R1	Blanco translúcido	Cm	0.1-10	I	O	C	LB	Negativo
PQIA1R2	Translúcido	M	0.1-5	I	O	C	LB	Negativo
PQIA1R3	Blanco crema	Cr	0.8 -2	I	O	C	LB	Negativo
PQIA1R4	Blanco crema	Ac	0.05-0.1	I	E	C	LB	Negativo
PQIA2R1	Blanco translúcido	Ac	0.05-0.1	Ci	E	C	LB	Negativo
PQIA2R2	Amarillo pálido	Cr	0.5-1	Ci	E	C	LB	Negativo
PQIA3R1	Blanco crema	Cr	1-2	I	O	C	LB	Negativo
PQIA4R1	Blanco crema	Cr	0.1 a 0.8	Ci	E	C	LB	Negativo
PQIA4R2	Translúcido	M	0.1-5	I	O	C	LB	Negativo
PQIA4R4	Blanco crema	Cr	0.8 -2	I	O	C	LB	Negativo
PQIA5R1	Blanco translúcido	G	0.1-0.5	Ci	E	C	LB	Negativo
PQIA6R1	Blanco crema	Cr	0.1-1	Ci	E	C	LB	Negativo
PQIA7R1	Blanco crema	G	0.1-0.5	Ci	E	C	LB	Negativo
PQIA7R2	Blanco translúcido	G	0.1-0.5	Ci	E	C	R	Negativo
PQIA7R3	Blanco translúcido	Ac	0.01-0.1	Ci	E	C	LB	Negativo
PQIA11R2	Blanco crema	Cr	0.1-1	Ci	E	C	LB	Negativo
PQIA11R3	Translúcido	Ac	0.1-0.7	I	O	C	LB	Negativo
PQIA12R1	Blanco crema	Cm	0.05-0.1	I	E	C	LB	Negativo
PQIA12R3	Amarillo pálido	Ac	0.05	Ci	E	C	LB	Negativo
PQIA13R2	Blanco opaco	Cm	0.1-2	I	O	C	LB	Negativo
PQIA13R3	Blanco crema	Cr	0.8 - 2	I	O	C	LB	Negativo
PQIA15R1	Translúcido	G	0.1-10	I	O	C	R	Negativo
PQIA15R2	Amarillo pálido	Ac	0.05	Ci	E	C	LB	Negativo
PQIA15R3	Amarillo	Ac	0.1-10	I	L	C	LB	Negativo
PQIA16R1	Blanco translúcido	Ac	0.01-0.2	I	E	P	LB	Negativo
PQIA16R2	Blanco crema	Cr	0.1-0.8	Ci	E	C	LB	Negativo
PQIA16R3	Blanco crema	Cr	2- 4	Ci	E	C	LB	Negativo
PQIA17R1	Blanco crema	G	0.5-10	I	O	C	R	Negativo
PQIA18R1	Blanco crema	Cm	0.05-0.1	I	E	C	LB	Negativo
PQIA19R2	Blanco crema	Ac	0.05-0.1	Ci	E	C	LB	Negativo
PQIA20R1	Blanco crema	Ac	0.05-0.2	Ci	E	C	LB	Negativo
PQIA20R2	Blanco crema	Ac	0.05-0.1	Ci	E	C	LB	Negativo
PQIA25R1	Blanco crema	Ac	0.05-0.1	Ci	E	C	LB	Negativo
PQIA26R1	Amarillo	Cr	0.1-0.2	Ci	E	C	LB	Negativo
PQIA26R2	Blanco crema	Cr	0.1- 0.8	Ci	E	C	LB	Negativo
PQIA27R1	Blanco translucido	Cm	0.1-10	I	O	C	LB	Negativo
PQIA29R1	Blanco opaco	Cm	0.1-0.5	d	O	C	LB	Negativo
PQIA29R2	Blanco crema	Cm	0.1-10	I	O	C	LB	Negativo
PQIA33R1	Blanco crema	Ac	0.05-0.1	Ci	E	C	LB	Negativo

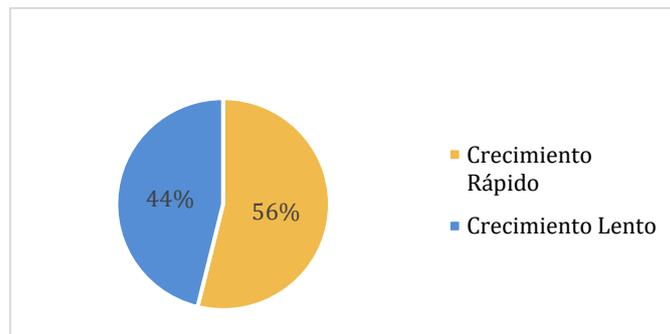
Fuente: Elaboración propia

Leyenda: C: Convexo, P: Plana, LB Lisa brillante, R rugosa, O: ondulado, E: entero, L: lobulado, Ci: circular, d: Dona, I: irregular, CM: cremoso mucilaginoso, Cr: Cremoso, Ac: Acuoso, G: Gomoso: M: Mucilaginoso.

- **Tiempo de crecimiento**

Respecto a la evaluación del tiempo de crecimiento de las 39 cepas aisladas, se determinaron los valores de acuerdo a los días incubación que les tomo en presentar crecimiento, de las cuales presentaron el 22 cepas (56%) presentaron crecimiento rápido donde presentaron un rango de crecimiento entre 1 a 3 días, mientras que 17 cepas (44%) presentaron lento crecimiento donde presentó un rango de crecimiento entre 5 a 7 días (Figura N°32). Ver tabla N° 9 .

Figura N° 32: Tiempo de crecimiento rápido y lento.



Nota: Para determinar a las cepas aisladas dentro del género *Rhizobium* se tomó en cuenta el tiempo de crecimiento ya que estas presentan crecimiento rápido, como lo indica (Lopez et al., 2017) donde se reportan que las colonias aisladas del género *Rhizobium* son de crecimiento rápido 2 a 3 días, blancas o ligeramente rosadas colonias circulares, convexas, lisas y de aspecto translúcido así confirmando con los autores (Alva, 2013) y (Howieson & Dilworth, 2016). Mientras que para el género *Bradirhizobium* presenta crecimiento lento en un intervalo de 5 a 7 días según (Alva, 2013) y (Howieson & Dilworth, 2016).

Tabla N° 9: *Identificación morfológica de colonias aisladas en tiempo de crecimiento*

Identificación morfológica de colonias aisladas respecto al tiempo de crecimiento					
Características					
Código	Días de Crecimiento	Crecimiento o Rápido / Lento	Código	Días de Crecimiento	Crecimiento o Rápido /Lento
PQIA1R1	1 a 3	Rápido	PQIA13R2	1 a 3	Rápido
PQIA1R2	1 a 3	Rápido	PQIA13R3	1 a 3	Rápido
PQIA1R3	1 a 3	Rápido	PQIA15R1	1 a 3	Rápido
PQIA1R4	1 a 3	Rápido	PQIA15R2	5 a 7	Lento
PQIA2R1	5 a 7	Lento	PQIA15R3	1 a 3	Rápido
PQIA2R2	1 a 3	Rápido	PQIA16R1	5 a 7	Lento
PQIA3R1	1 a 3	Rápido	PQIA16R2	5 a 7	Lento
PQIA4R1	5 a 7	Lento	PQIA16R3	1 a 3	Rápido
PQIA4R2	1 a 3	Rápido	PQIA17R1	1 a 3	Rápido
PQIA4R4	1 a 3	Rápido	PQIA18R1	5 a 7	Lento
PQIA5R1	1 a 3	Rápido	PQIA19R2	5 a 7	Lento
PQIA6R1	1 a 3	Rápido	PQIA20R1	5 a 7	Lento
PQIA7R1	5 a 7	Lento	PQIA20R2	5 a 7	Lento
PQIA7R2	1 a 3	Rápido	PQIA25R1	5 a 7	Lento
PQIA7R3	5 a 7	Lento	PQIA26R1	5 a 7	Lento
PQIA11R2	1 a 3	Rápido	PQIA26R2	5 a 7	Lento
PQIA11R3	1 a 3	Rápido	PQIA27R1	1 a 3	Rápido
PQIA12R1	5 a 7	Lento	PQIA29R1	1 a 3	Rápido
PQIA12R3	5 a 7	Lento	PQIA29R2	1 a 3	Rápido
Fuente: Elaboración propia			PQIA33R1	5 a 7	Lento

3.1.4.2. Diferenciación de pruebas bioquímicas

Se realizaron pruebas bioquímicas correspondientes a las 39 cepas que fueron aisladas como se muestra en la tabla N° 10.

- **Prueba de TSI (Agar hierro tres azúcares)**

Para esta prueba las cepas mostraron reacciones de asimilación de glucosa , sacarosa , lactosa, producción de ácido sulfhídrico y producción de gas, dando a entender el metabolismo, en cuanto a la asimilación de estos azúcares, teniendo como resultado lo siguiente: 4 cepas mostraron fermentación de glucosa, sacarosa y lactosa (**A/A**) , son las siguientes: PQIA3R1, PQIA11R2, PQIA15R1 y PQIA27R1 aquí se observó el viraje de un color amarillo donde los azúcares son asimilados, degradándose completamente hasta CO₂ que se elimina (Charlie, 2007) ; mientras que 18 cepas no fermentaron ningún azúcar (**K/K**)siendo las siguientes: (PQIA4R1, PQIA4R4, PQIA5R1, PQIA7R1, PQIA7R3, PQIA12R1, PQIA12R3, PQIA15R3, PQIA16R1, PQIA16R2, PQIA17R1, PQIA18R1, PQIA19R2, PQIA20R1, PQIA20R2 , PQIA26R1, PQIA26R2, PQIA29R1) aquí no se observó ninguna reacción , donde permitió corroborar el metabolismo exclusivos de los rizobios , característica importante de éste grupo de bacterias aerobias como señala el autor (Quevedo , 2015) y 17 cepas fermento glucosa (**K/A**) siendo las siguientes: PQIA1R1, PQIA1R2, PQIA13,PQIA1R4, PQIA2R1, PQIA2R2, PQIA4R2, PQIA6R1, PQIA7R2, PQIA11R3, PQIA13R2, PQIA13R3, PQIA152, PQIA16R3, PQIA25R1, PQIA29R2 y PQIA33R1.

Para la reacción de ácido sulfúrico fue negativo en las 39 cepas donde se ve un viraje de color negro en la base del tubo coincidiendo con el autor (Contreras, 2017) y finalmente se observó producción de gas siendo las siguientes: PQIA3R1, PQIA1RC2, PQIA15R1 y PQIA27R1, las restantes se mostraron negativas (Figura N° 33) y tabla N° 10 .

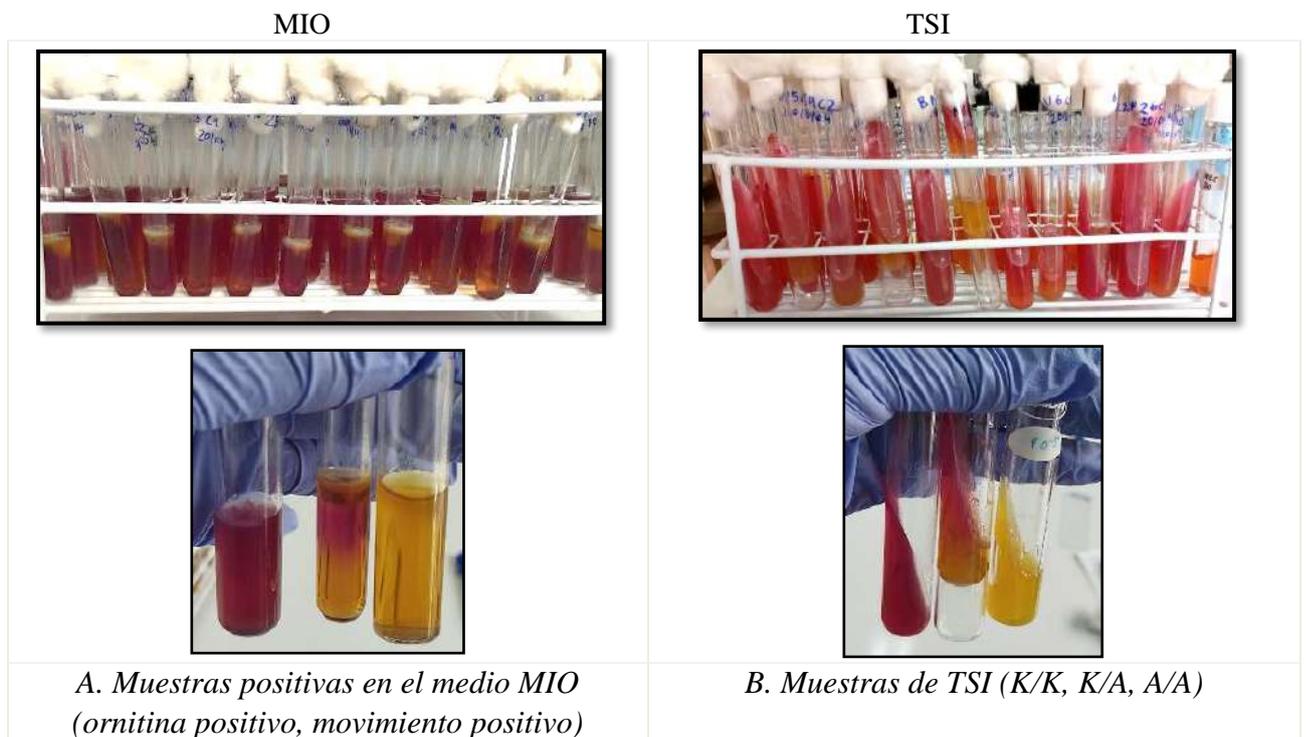
No obstante, esta prueba se ha realizado en algunas investigaciones de aislados *Rhizobium spp.* en donde se han obtenido resultados positivos, como indica el autor (Das & Dash, 2018) el cual identificó esta bacteria a través de la prueba TSI demostrando que se produjo fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa, sin embargo, realizando una comparación entre resultados y los de esta investigación se podría decir que esta prueba varía dependiendo

de la especie según (Morales,2023) ya que por lo general en la mayoría de investigaciones esta prueba se aplica en *Rhizobium spp.* y generalmente en la subfamilia Caesalpinioideae los rizobios son variados.

- **Prueba MIO (Movimiento Indol Ornitina)**

Para esta prueba las 39 cepas aisladas resultaron positivas en la prueba de movilidad mostrando turbidez; para la prueba de Indol todas resultaron negativas debido a que no hubo reacción al adicionar el reactivo de Kovacs, confirmando con (Quevedo, 2015) señala que la prueba de Indol son negativas siendo característico de *Rhizobium* y la prueba Ornitina el sustrato para detección de la enzima ornitina descarboxilasa se evidenció 9 cepas que presentaron una reacción positiva con un viraje purpura como consecuencia el medio se convierte alcalino , mientras que 30 cepas reaccionaron negativas dando un viraje amarillo convirtiéndose el medio ácido así corroborando con los autores. (Ortiz, 2017) y (Quevedo, 2015) ver (Figura N° 33) y tabla N° 10 .

Figura N° 33: Pruebas bioquímicas TSI y MIO



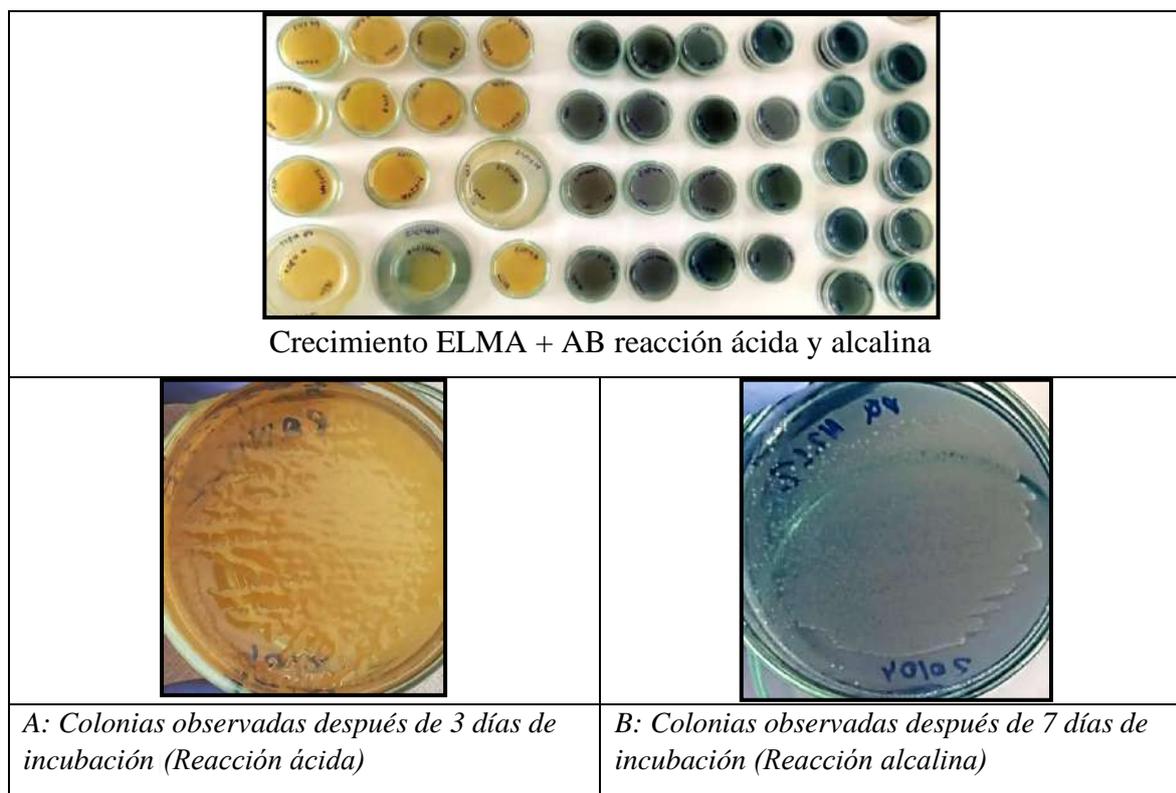
- **Azul de bromotimol**

En esta prueba se evidenció el cambio de coloración del medio a un color amarillo permitiendo ubicarlos como ácidos productores, esta reacción ocurre debido a la fermentación de azúcares y de crecimiento rápido (1 a 3 días) donde generalmente producen metabolitos ácidos (Matos et al. 2001), de acuerdo a los análisis estas características son aquellas cepas que pertenecen al género *Rhizobium* (Wang et al.2007).

De las 39 cepas aisladas se pudo clasificar 22 cepas que mostraron reacción ácida donde señala (Alva, 2013) que encontró cepas de crecimiento rápido e intermedio, según sus características son pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* estos producen ácidos a partir de los azúcares utilizados como fuentes de carbono como el manitol, la glucosa y la sacarosa. La característica de acidificar en el medio está relacionada con la capacidad de estos microorganismos de producir diferentes tipos de exopolisacáridos mucilaginosos extracelulares en medio LMA, que son secretados al medio a través de la pared celular, siendo una cualidad, lo que permite sobrevivir a condiciones adversas y estar relacionada con la composición del medio (Alva, 2013).

Respecto a la reacción de esta prueba permitió diferenciar aquellas cepas aisladas que presentaron un viraje a un color azul mostrando una reacción alcalí, además de presentar un crecimiento lento (5 a 7días), estas características son pertenecientes al género *Bradyrhizobium* según (Matos et al. 2001) y (Alva, 2013). De las 39 cepas aisladas obteniéndose 17 cepas que produjeron alcalinidad las cuales pertenecen al género ser *Bradyrhizobium* por tanto coincide con el autor (Alva, 2013). Esta reacción ocurre debido a la producción de amonio provenientes de la degradación de compuestos nitrogenados ya que este compuesto es proveniente del extracto de levadura en el medio ELMA según (Marsudi, 1999) y (Marquina et al 2011). Como se observa en la Figura N°34 y tabla N° 10.

Figura N° 34: Prueba de alcalinidad y acidez en ELMA+AB



Nota: Los resultados de las pruebas bioquímicas se puede observar que, en el caso de los *Rhizobium*, el 100% de las pruebas de Indol resultaron negativas y 100% mostraron turbidez coincidiendo con lo mencionado (Ortiz, 2017). Por otra parte, las pruebas de TSI donde la asimilación de glucosa fueron el 53% mientras que para la asimilación de sacarosa fueron el 30%, para la reacción de la producción de ácido sulfhídrico todas fueron negativas, en cuanto a las pruebas realizadas para la catalasa fueron en su 100% reacción positiva y para la prueba en medio ELMA +AB resultaron acidas en un 56% y un 44% presentaron alcalinidad.

- Prueba de catalasa

Los resultados para esta prueba se observó 39 cepas que confirman que todas son bacterias, coincidiendo con (Rodríguez et al.2006), también indica que las bacterias producen la enzima catalasa que asevera que las bacterias se diferencian de otros microorganismos por hidrolizar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso, el cual se liberó en forma de burbujas. (Ortiz, 2017) tabla N° 10.

Tabla N° 10: Pruebas bioquímicas de cepas aisladas purificadas.

Código	Pruebas Bioquímicas						
	Azul de Bromotimol	Catalasa	TSI		MIO		
			TSI	Gas	Movimiento	Indol	Ornitina
PQIA1R1	Ácido	(+)	K/A	(+)	(+)	(-)	(+)
PQIA1R2	Ácido	(+)	K/A	(+)	(+)	(-)	(+)
PQIA1R3	Ácido	(+)	K/A	(+)	(+)	(-)	(+)
PQIA1R4	Ácido	(+)	K/A	(-)	(+)	(-)	(-)
PQIA2R1	Alcalino	(+)	K/A	(+)	(+)	(-)	(-)
PQIA2R2	Ácido	(+)	K/A	(-)	(+)	(-)	(-)
PQIA3R1	Ácido	(+)	A/A	(+)	(+)	(-)	(+)
PQIA4R1	Alcalino	(+)	K/K	(+)	(+)	(-)	(-)
PQIA4R2	Ácido	(+)	K/A	(+)	(+)	(-)	(-)
PQIA4R4	Ácido	(+)	K/K	(+)	(+)	(-)	(-)
PQIA5R1	Ácido	(+)	K/K	(-)	(+)	(-)	(-)
PQIA6R1	Ácido	(+)	K/A	(-)	(+)	(-)	(+)
PQIA7R1	Alcalino	(+)	K/K	(-)	(+)	(-)	(-)
PQIA7R2	Ácido	(+)	K/A	(-)	(+)	(-)	(-)
PQIA7R3	Alcalino	(+)	K/K	(-)	(+)	(-)	(-)
PQIA11R2	Ácido	(+)	A/A	(+)	(+)	(-)	(-)
PQIA11R3	Ácido	(+)	K/A	(-)	(+)	(-)	(-)
PQIA12R1	Alcalino	(+)	K/K	(-)	(+)	(-)	(-)
PQIA12R3	Alcalino	(+)	K/K	(-)	(+)	(-)	(-)
PQIA13R2	Ácido	(+)	K/A	(-)	(+)	(-)	(-)
PQIA13R3	Ácido	(+)	K/A	(-)	(+)	(-)	(+)
PQIA15R1	Ácido	(+)	A/A	(+)	(+)	(-)	(+)
PQIA15R2	Alcalino	(+)	K/A	(-)	(+)	(-)	(-)
PQIA15R3	Acido	(+)	K/K	(-)	(+)	(-)	(-)
PQIA16R1	Alcalino	(+)	K/K	(-)	(+)	(-)	(-)
PQIA16R2	Alcalino	(+)	K/K	(-)	(+)	(-)	(-)
PQIA16R3	Ácido	(+)	K/A	(-)	(+)	(-)	(-)
PQIA17R1	Ácido	(+)	K/K	(-)	(+)	(-)	(-)
PQIA18R1	Alcalino	(+)	K/K	(-)	(+)	(-)	(-)
PQIA19R2	Alcalino	(+)	K/K	(-)	(+)	(-)	(-)
PQIA20R1	Alcalino	(+)	K/K	(-)	(+)	(-)	(-)
PQIA20R2	Alcalino	(+)	K/K	(-)	(+)	(-)	(-)
PQIA25R1	Alcalino	(+)	K/A	(+)	(+)	(-)	(-)
PQIA26R1	Alcalino	(+)	K/K	(-)	(+)	(-)	(-)
PQIA26R2	Alcalino	(+)	K/K	(+)	(+)	(-)	(-)
PQIA27R1	Ácido	(+)	A/A	(+)	(+)	(-)	(+)
PQIA29R1	Alcalino	(+)	K/K	(-)	(+)	(-)	(-)
PQIA29R2	Ácido	(+)	K/A	(+)	(+)	(-)	(+)
PQIA33R1	Alcalino	(+)	K/A	(+)	(+)	(-)	(-)

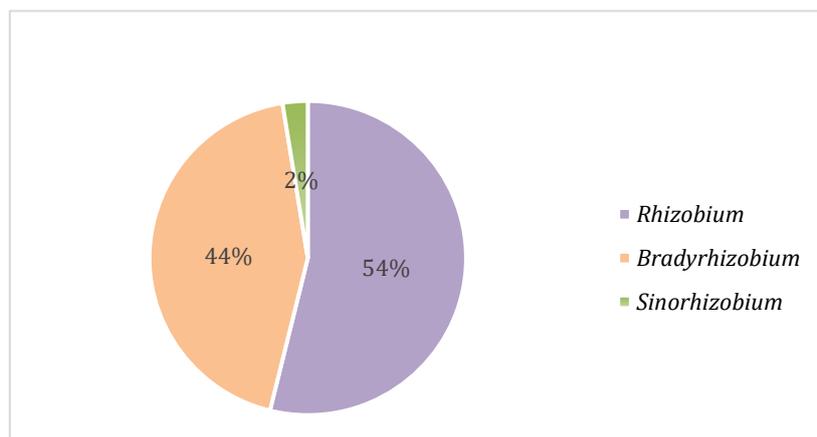
Fuente: Elaboración propia

3.1.4.3. Géneros y morfoespecies identificadas

- **Géneros identificados**

De los datos obtenidos de las 39 cepas aisladas se evaluaron de acuerdo a sus características más relevantes que fueron: características morfológicas, tiempo de crecimiento y reacción en medio ELMA+AB tomando como referencia los autores (Agahm M. et al. 2016), (Howieson & Dilworth, 2016) y (Holt et al., 1994), por lo que se logró identificar los géneros *Bradyrhizobium* (44%), *Rhizobium* (54%) y *Sinorhizobium* (2%) como se muestra en (Figura N° 35). Ver tabla N° 11.

Figura N° 35: Identificación de géneros fijadores de nitrógeno



- **Morfoespecies identificadas**

En cuanto a la identificación de las morfoespecies se hicieron a través de procesos de diferenciación que consiste en el desarrollo de procesos de comparación de los caracteres morfológicos que fueron observables, en dicho proceso de identificación se llevó a cabo un análisis detenido tomando en cuenta aspectos morfológicos que destacaron el cual se analizó de forma cuidadosa, donde se logró identificar 22 morfoespecies en la cual para el género *Rhizobium* se obtuvieron 13 morfoespecies, mientras que para el género *Bradyrhizobium* se

obtuvieron 8 morfoespecies y para el género *Sinorhizobium* una sola morfoespecie (Figura N° 36). Ver tabla N°11 .

Figura N° 36: Morfoespecies de bacterias fijadoras de nitrógeno

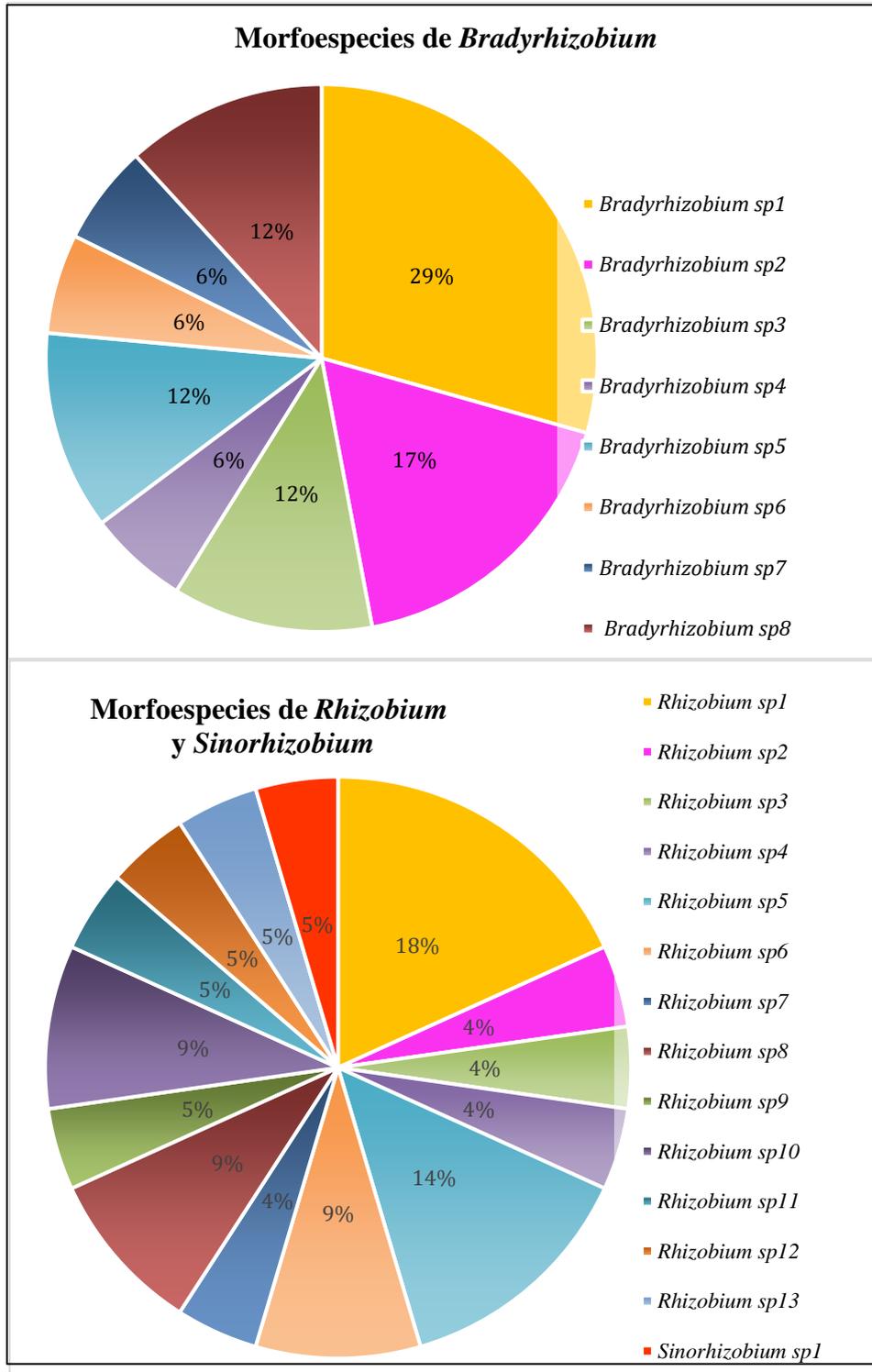


Tabla N° 11: Identificación de género y morfoespecie

Identificación de género y morfoespecie												
Código	Características morfológicas							Gram	ELMA+AB	T. Crecimiento	Genero	Morfoespecie
	Color	Consistencia	Diámetro (mm)	Forma	Borde	Elevación	Superficie					
PQIA1R1	BT	Cm	0.1-10	I	O	C	LB	N	Áci	R	<i>Rhizobium</i>	" <i>Rhizobium sp6</i> "
PQIA1R2	T	M	0.1-5	I	O	C	LB	N	Áci	R	<i>Rhizobium</i>	" <i>Rhizobium sp10</i> "
PQIA1R3	BC	Cr	0.8 -2	I	O	C	LB	N	Áci	R	<i>Rhizobium</i>	" <i>Rhizobium sp1</i> "
PQIA1R4	BC	Ac	0.05-0.1	I	E	C	LB	N	Áci	R	<i>Rhizobium</i>	" <i>Rhizobium sp2</i> "
PQIA2R1	BT	Ac	0.05-0.1	Ci	E	C	LB	N	Al	L	<i>Bradyrhizobium</i>	" <i>Bradyrhizobium sp5</i> "
PQIA2R2	AP	Cr	0.5-1	Ci	E	C	LB	N	Áci	R	<i>Rhizobium</i>	" <i>Rhizobium sp12</i> "
PQIA3R1	BC	Cr	1- 2	I	O	C	LB	N	Áci	R	<i>Rhizobium</i>	" <i>Rhizobium sp1</i> "
PQIA4R1	BC	Cr	0.1- 0.8	Ci	E	C	LB	N	Al	L	<i>Bradyrhizobium</i>	" <i>Bradyrhizobium sp2</i> "
PQIA4R2	T	M	0.1-5	I	O	C	LB	N	Áci	R	<i>Rhizobium</i>	" <i>Rhizobium sp10</i> "
PQIA4R4	BC	Cr	0.8 -2	I	O	C	LB	N	Áci	R	<i>Rhizobium</i>	" <i>Rhizobium sp1</i> "
PQIA5R1	BT	G	0.1-0.5	Ci	E	C	LB	N	Áci	R	<i>Rhizobium</i>	" <i>Rhizobium sp7</i> "
PQIA6R1	BC	Cr	0.1-1	Ci	E	C	LB	N	Áci	R	<i>Rhizobium</i>	" <i>Rhizobium sp5</i> "
PQIA7R1	BC	G	0.1-0.5	Ci	E	C	LB	N	Al	L	<i>Bradyrhizobium</i>	" <i>Bradyrhizobium sp4</i> "
PQIA7R2	BT	G	0.1-0.5	Ci	E	C	R	N	Áci	R	<i>Rhizobium</i>	" <i>Rhizobium sp8</i> "
PQIA7R3	BT	Ac	0.01-0.1	Ci	E	C	LB	N	Al	L	<i>Bradyrhizobium</i>	" <i>Bradyrhizobium sp5</i> "
PQIA11R2	BC	Cr	0.1-1	Ci	E	C	LB	N	Áci	R	<i>Rhizobium</i>	" <i>Rhizobium sp5</i> "
PQIA11R3	T	Ac	0.1 -0.7	I	O	C	LB	N	Áci	R	<i>Rhizobium</i>	" <i>Rhizobium sp11</i> "
PQIA12R1	BC	Cm	0.05-0.1	I	E	C	LB	N	Al	L	<i>Bradyrhizobium</i>	" <i>Bradyrhizobium sp3</i> "
PQIA12R3	AP	Ac	0.05	Ci	E	C	LB	N	Al	L	<i>Bradyrhizobium</i>	" <i>Bradyrhizobium sp8</i> "
PQIA13R2	BO	Cm	0.1-2	I	O	C	LB	N	Áci	R	<i>Rhizobium</i>	" <i>Rhizobium sp13</i> "
PQIA13R3	BC	Cr	0.8 - 2	I	O	C	LB	N	Áci	R	<i>Rhizobium</i>	" <i>Rhizobium sp1</i> "
PQIA15R1	T	G	0.1-10	I	O	C	R	N	Áci	R	<i>Rhizobium</i>	" <i>Rhizobium sp9</i> "
PQIA15R2	AP	Ac	0.05	Ci	E	C	LB	N	Al	L	<i>Bradyrhizobium</i>	" <i>Bradyrhizobium sp8</i> "
PQIA15R3	A	Ac	0.1-10	I	L	C	LB	N	Áci	R	<i>Rhizobium</i>	" <i>Rhizobium sp8</i> "
PQIA16R1	BT	Ac	0.01-0.2	I	E	P	LB	N	Al	L	<i>Bradyrhizobium</i>	" <i>Bradyrhizobium sp6</i> "
PQIA16R2	BC	Cr	0.1- 0.8	Ci	E	C	LB	N	Al	L	<i>Bradyrhizobium</i>	" <i>Bradyrhizobium sp2</i> "
PQIA16R3	BC	Cr	2- 4	Ci	E	C	LB	N	Áci	R	<i>Rhizobium</i>	" <i>Rhizobium sp5</i> "
PQIA17R1	BC	G	0.5-10	I	O	C	R	N	Áci	R	<i>Rhizobium</i>	" <i>Rhizobium sp3</i> "
PQIA18R1	BC	Cm	0.05-0.1	I	E	C	LB	N	Al	L	<i>Bradyrhizobium</i>	" <i>Bradyrhizobium sp3</i> "
PQIA19R2	BC	Ac	0.05-0.1	Ci	E	C	LB	N	Al	L	<i>Bradyrhizobium</i>	" <i>Bradyrhizobium sp1</i> "
PQIA20R1	BC	Ac	0.05-0.2	Ci	E	C	LB	N	Al	L	<i>Bradyrhizobium</i>	" <i>Bradyrhizobium sp1</i> "
PQIA20R2	BC	Ac	0.05- 0.1	Ci	E	C	LB	N	Al	L	<i>Bradyrhizobium</i>	" <i>Bradyrhizobium sp1</i> "
PQIA25R1	BC	Ac	0.05-0.1	Ci	E	C	LB	N	Al	L	<i>Bradyrhizobium</i>	" <i>Bradyrhizobium sp1</i> "
PQIA26R1	A	Cr	0.1-0.2	Ci	E	C	LB	N	Al	L	<i>Bradyrhizobium</i>	" <i>Bradyrhizobium sp7</i> "
PQIA26R2	BC	Cr	0.1 - 0.8	Ci	E	C	LB	N	Al	L	<i>Bradyrhizobium</i>	" <i>Bradyrhizobium sp2</i> "
PQIA27R1	BT	Cm	0.1-10	I	O	C	LB	N	Áci	R	<i>Rhizobium</i>	" <i>Rhizobium sp6</i> "
PQIA29R1	BO	Cm	0.1-0.5	d	O	C	LB	N	Al	R	<i>Sinorhizobium</i>	" <i>Sinorhizobium sp1</i> "
PQIA29R2	BC	Cm	0.1-10	I	O	C	LB	N	Áci	R	<i>Rhizobium</i>	" <i>Rhizobium sp4</i> "
PQIA33R1	BC	Ac	0.05-0.1	Ci	E	C	LB	N	Al	L	<i>Bradyrhizobium</i>	" <i>Bradyrhizobium sp1</i> "

Fuente: Elaboración propia

Leyenda:

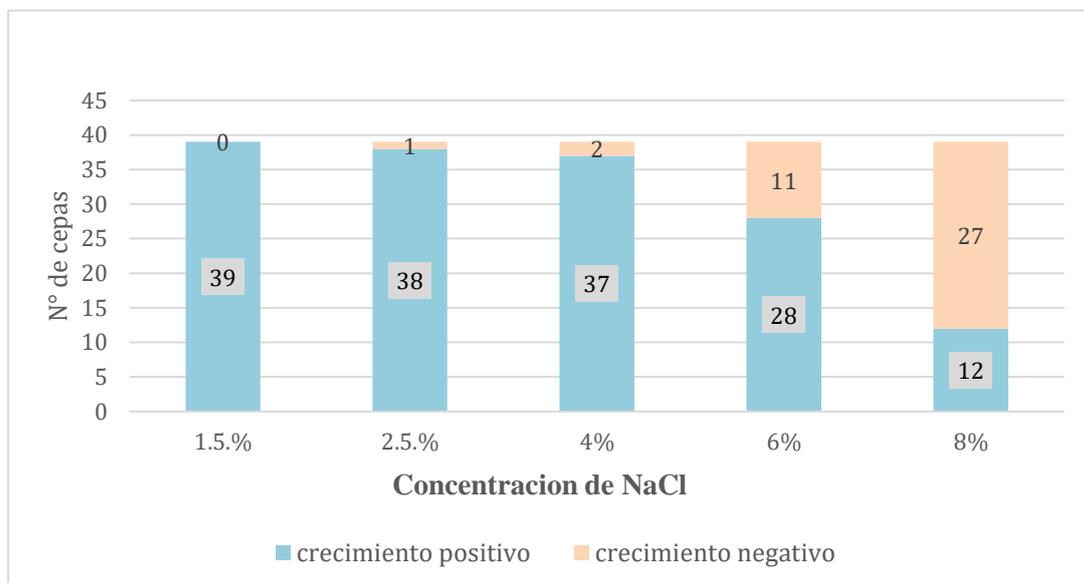
- Blanco translúcido: BT, Blanco crema: BC, Amarillo: A, Blanco opaco: BO, Amarillo pálido: AP, Translúcido: T
 - Convexo: C, Plana: P
 - Lisa brillante: LB, Rugosa: R, Ondulado: O, Entero: E, Lobulado: L, circular: Ci, Irregular: I, Dona: d
 - Cremoso: Cr, mucilaginoso: Cm, Acuoso: Ac, Gomoso: G Mucilaginoso: M, Negativo: N
 - Lento: L, Rápido: R, Acido: Acid, Alcalino: Al
- Crecimiento rápido: 1 a 3 días; Crecimiento lento: 4 a 7 días

3.1.5. Determinación del potencial bioinoculante de bacterias nitrificantes de nitrógeno aisladas de especies arbóreas de la subfamilia Caesalpinioideae

3.1.5.1. Tolerancia a concentraciones de NaCl (1.5, 2.5, 4, 6 y 8%)

De las 39 cepas aisladas todas presentaron crecimiento al 1.5% de NaCl, mientras que al 2.5% de NaCl crecieron 38 cepas (97%) y solo una cepa no logró crecer en esta concentración, para el 4% de NaCl lograron crecer 37 cepas(95%) mientras que 2 no consiguieron crecer, mientras que al 6% de NaCl 28 cepas (72%) presentaron crecimiento óptimo, 6 cepas presentaron crecimiento muy escaso y 5 cepas no lograron crecer y finalmente a la concentración de 8% de NaCl solo 11 cepas pudieron crecer, 1 cepa presentó crecimiento bajo y 27 cepas no presentaron crecimiento. De acuerdo a los análisis lograron crecer 12 cepas (31%) en las concentraciones de NaCl, lo que indica que estas cepas son tolerantes a concentraciones de NaCl las cuales podrían ser usadas como posibles bioinoculos (Figura N° 37. Ver tabla N°12 .

Figura N° 37: Crecimiento a concentraciones de NaCl (1.5, 2.5, 4, 6 y 8%)



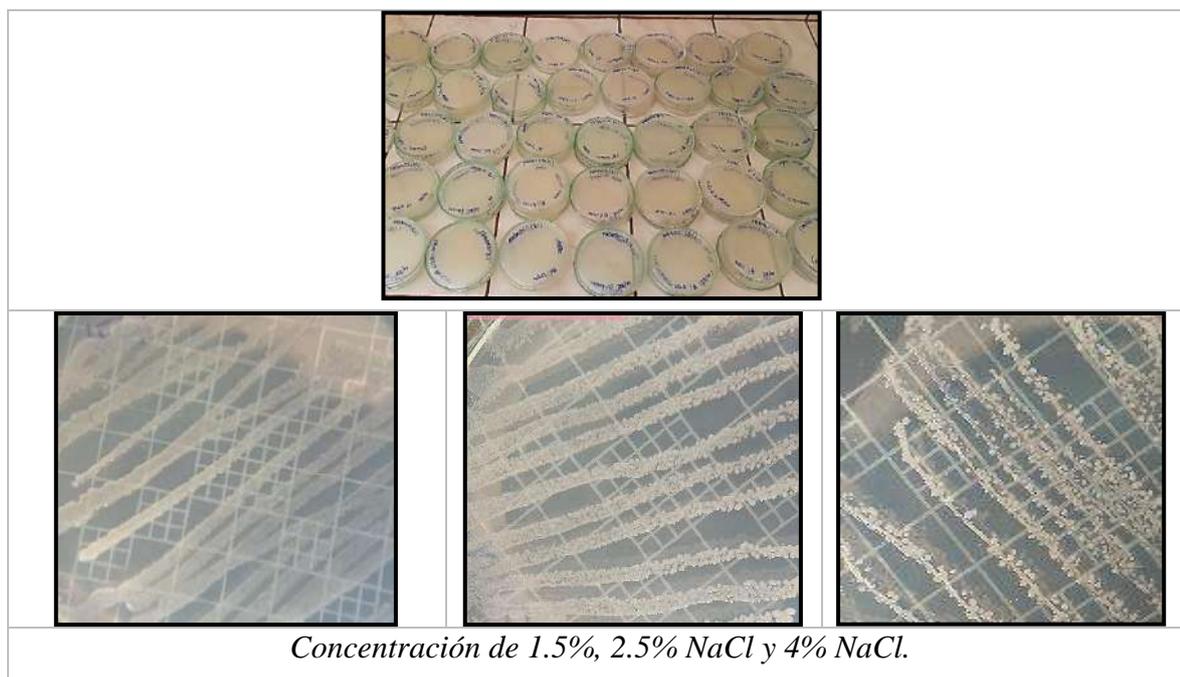
Nota: De las cepas aisladas, un total de 27 cepas presentaron disminución en cuanto a su crecimiento bacteriano a medida que las concentraciones de NaCl aumentaron hasta el punto de no presentar crecimiento al 8%, así como también lo reportaron en bibliografía, donde

indican que a medida que las concentraciones de NaCl va en aumento el crecimiento bacteriano decrece drásticamente (Berrada et al., 2012), (Cuadrado et al., 2009). Aislaron cepas de *Rhizobium* de *V. unguiculata* tolerantes a concentraciones por encima de 5,5% de NaCl, (Ghittoni & Bueno, 1996), describieron que los rizobios de rápido crecimiento son más tolerantes que los de lento crecimiento; es decir que *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* han demostrado marcada variación en la tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl, ya que 11 cepas aisladas lograron crecer en todas las concentraciones de NaCl descritas.

Debido a la tolerancia a diferentes concentraciones de salinidad de las cepas obtenidas están relacionadas con la acumulación de NaCl en su interior. La trehalosa es un osmoprotector que le brinda a la membrana celular protección que evita la desecación por procesos de secado. Además, que los polisacáridos como los EPS (Exopolisacáridos) están presentes en la tolerancia del efecto osmótico, pero no es primordial en la sobrevivencia de rizobios (Gonzales, 2013).

Por otra parte (Shamseldin & Werner, 2005) señalaron que dos de las cepas de *R. etli*, aisladas de los suelos de Egipto mostraron ser tolerantes a elevadas concentraciones salinas (4% NaCl) y altas temperaturas (42°C).

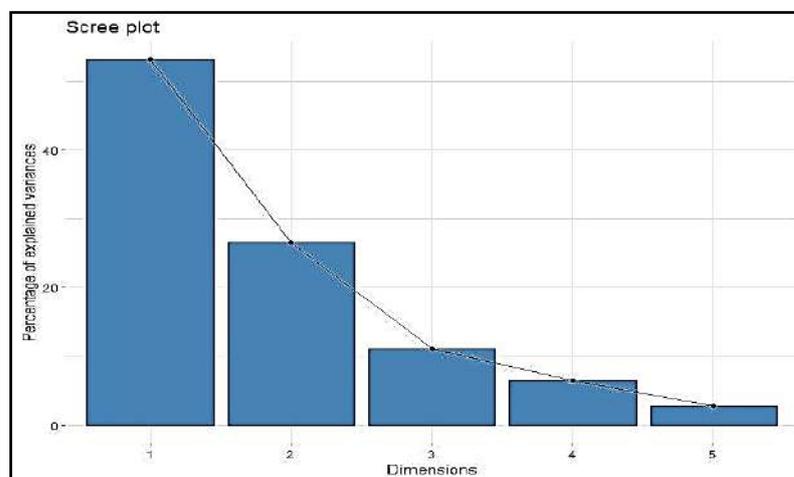
Figura N° 38: Tolerancia a concentraciones de NaCl



- **Análisis de componentes principales (NaCl)**

Según el análisis de componentes principales, la primera componente o dimensión (eje) explica que el más del 53.2% de la varianza en torno a la media (Figura N° 39), la segunda componente explica el 26,5% de la varianza entorno a la media, las demás componentes explican en menor proporción la varianza a esta segunda.

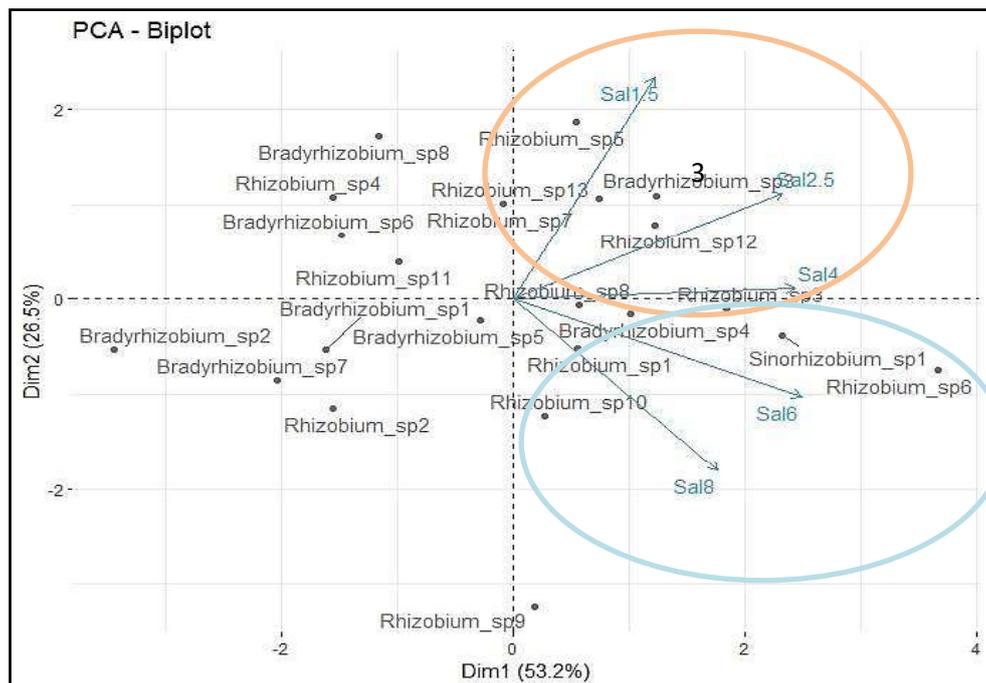
Figura N° 39: Aporte del porcentaje de las varianzas al análisis de componentes principales (NaCl)



Nota: Se observa el aporte de la varianza según el número de componentes o dimensiones, en este caso se prioriza los dos componentes principales, que agrupan casi el 80% del total.

El gráfico de PCA, muestra que en el componente 1, se agrupa la concentración donde la mayor parte de las morfoespecies está relacionada a las concentraciones de 1.5, 2.5 y 4% de salinidad, en ella estas tres variables están bien correlacionadas, donde *Bradyrhizobium sp3*, *Rhizobium sp3*, *sp5*, *sp8* y *sp12*, son las que mejor respondieron en cuanto a su crecimiento en estas concentraciones. Las que están a concentraciones de 6 y 8% de salinidad son menores. A nivel taxonómico se evidencia que las morfoespecies de los 3 géneros indistintamente están en diferentes concentraciones (Figura N° 40).

Figura N° 40: Análisis de componentes principales (PCA) de las morfoespecies sometidas a dosis de salinidad



Nota: Se observa el aporte de cada variable (concentración) y la correlación entre ellas y las morfoespecies.

Tabla N° 12: Tolerancia a concentraciones de NaCl

Tolerancia a concentraciones de NaCl						
Código	Salinidad %					Morfoespecie
	1.5	2.5	4	6	8	
PQIA1R1	(++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	"Rhizobium sp6"
PQIA1R2	(++)	(++)	(+)	(+++)	(+++)	"Rhizobium sp10"
PQIA1R3	(++)	(+)	(+)	(++)	(++)	"Rhizobium sp1 "
PQIA1R4	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	"Rhizobium sp2"
PQIA2R1	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	"Bradyrhizobium sp5"
PQIA2R2	(++)	(++)	(++)	(++)	(-)	"Rhizobium sp12"
PQIA3R1	(++)	(++)	(++)	(+)	(-)	"Rhizobium sp1"
PQIA4R1	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	"Bradyrhizobium sp2"
PQIA4R2	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	"Rhizobium sp10 "
PQIA4R4	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	"Rhizobium sp1"
PQIA5R1	(++)	(++)	(+)	(+)	(-)	"Rhizobium sp7"
PQIA6R1	(+++)	(++)	(+)	(+)	(-)	"Rhizobium sp5 "
PQIA7R1	(++)	(++)	(+)	(++)	(+)	"Bradyrhizobium sp4"
PQIA7R2	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	"Rhizobium sp8"
PQIA7R3	(++)	(++)	(++)	(+)	(+/-)	"Bradyrhizobium sp5"
PQIA11R2	(+++)	(++)	(+++)	(+)	(-)	"Rhizobium sp5 "
PQIA11R3	(++)	(+)	(+)	(+)	(-)	"Rhizobium sp11"
PQIA12R1	(++)	(++)	(++)	(-)	(-)	"Bradyrhizobium sp3"
PQIA12R3	(++)	(++)	(++)	(+)	(-)	"Bradyrhizobium sp8"
PQIA13R2	(++)	(++)	(++)	(+)	(-)	"Rhizobium sp13"
PQIA13R3	(++)	(++)	(++)	(+++)	(++)	"Rhizobium sp1 "
PQIA15R1	(+)	(+)	(+)	(++)	(+++)	"Rhizobium sp9 "
PQIA15R2	(+++)	(+)	(-)	(-)	(-)	"Bradyrhizobium sp8"
PQIA15R3	(++)	(+)	(+)	(+)	(-)	"Rhizobium sp8"
PQIA16R1	(++)	(+)	(+)	(+/-)	(-)	"Bradyrhizobium sp6"
PQIA16R2	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)	"Bradyrhizobium sp2"
PQIA16R3	(++)	(+)	(+)	(+)	(-)	"Rhizobium sp5"
PQIA17R1	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	"Rhizobium sp3"
PQIA18R1	(++)	(+++)	(++)	(++)	(+)	"Bradyrhizobium sp3"
PQIA19R2	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	"Bradyrhizobium sp1"
PQIA20R1	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	"Bradyrhizobium sp1"
PQIA20R2	(++)	(++)	(++)	(+/-)	(-)	"Bradyrhizobium sp1"
PQIA25R1	(+)	(+)	(+)	(+/-)	(-)	"Bradyrhizobium sp1"
PQIA26R1	(+)	(+)	(+)	(+/-)	(-)	"Bradyrhizobium sp7"
PQIA26R2	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	"Bradyrhizobium sp2 "
PQIA27R1	(++)	(++)	(++)	(+++)	(++)	"Rhizobium sp6 "
PQIA29R1	(++)	(++)	(++)	(++)	(+++)	"Sinorhizobium sp1"
PQIA29R2	(++)	(++)	(++)	(+/-)	(-)	"Rhizobium sp4 "
PQIA33R1	(+)	(+)	(+)	(+/-)	(-)	"Bradyrhizobium sp1"

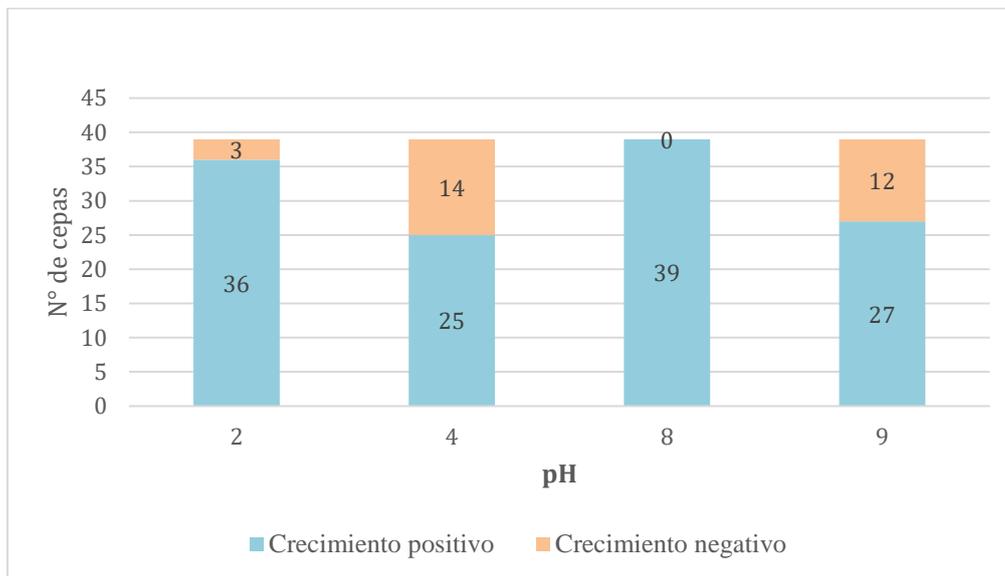
Fuente: Elaboración propia

Leyenda: (-): crecimiento nulo, (+): poco crecimiento, (++) : regular crecimiento), (+++): abundante crecimiento.

3.1.5.2. Tolerancia a diferentes valores de pH (2, 4, 8 y 9)

De las 39 cepas aisladas que fueron estudiadas a pH 2: 36 cepas presentaron crecimiento muy bajo y 3 cepas no presentaron crecimiento; mientras que a pH 4: 25 cepas presentaron crecimiento y 14 cepas presentaron muy bajo crecimiento; por otro lado, a pH 8 las 39 cepas lograron crecer y finalmente a pH 9: 27 cepas presentaron crecimiento y 12 cepas tuvieron crecimiento muy bajo. De acuerdo al análisis de los resultados 17 cepas aisladas lograron crecer de manera óptima en los diferentes pH descritos las cuales serían de mucho interés para usarlas como potenciales bioinoculos. Ver tabla N° 13 y (Figura N° 41).

Figura N° 41: Crecimiento a diferentes pH (2, 4, 8 y 9)

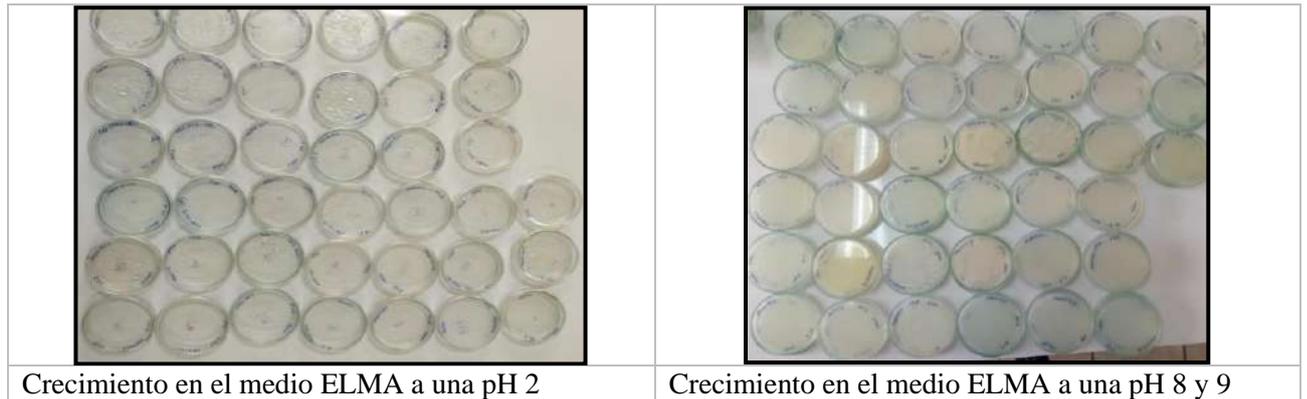


Nota: Hubo mejor adaptación de las cepas bacterianas en comparación con la salinidad, Donde de las 39 cepas aisladas, sólo 3 cepas bacterianas no lograron crecer en un pH de 2 y 37 presentaron crecimiento escaso a este pH. Mientras que a pH 9; 12 cepas tuvieron crecimiento escaso y 27 cepas sí presentaron crecimiento. De las cuales 16 cepas aisladas presentaron crecimiento en todos los niveles de pH. Demostrando que estas 16 cepas presentan tolerancia a pH ácidos y alcalinos. Resultados que también fueron reportados por (Cuadrado et al 2009).

Los aislados evaluados que se habían desarrollado en medio ácido se observó el 70 % de crecimiento, mientras que el aislado a un pH 2 no presentó desarrollo en este medio siendo

escaso. Estos resultados concuerdan con (Quevedo, 2015), quienes identificaron cepas de *Bradyrhizobium* sp. crecen en un pH ajustado a 5,5, m. De la misma forma (Marquina et al. ,2011) mencionan que obtuvieron buen desarrollo de cepas de *Bradyrhizobium* aisladas, en un rango óptimo de pH 5.2 a 6.8, lo que les confiere alto potencial para su aplicación futura.

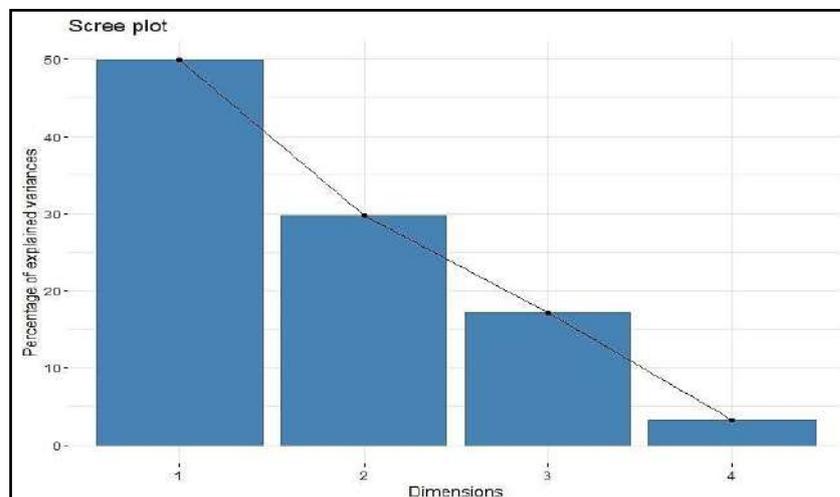
Figura N° 42: Tolerancia a diferentes pH



- **Análisis de componentes principales (pH)**

De acuerdo al análisis de componentes principales (PCA), el primer componente o dimensión (eje) explica cerca del 50% de la varianza y el segundo componente el 30% de la varianza que en conjunto hacen el 80% (Figura N°43), las otras dimensiones explican en menor proporción la varianza al 30%.

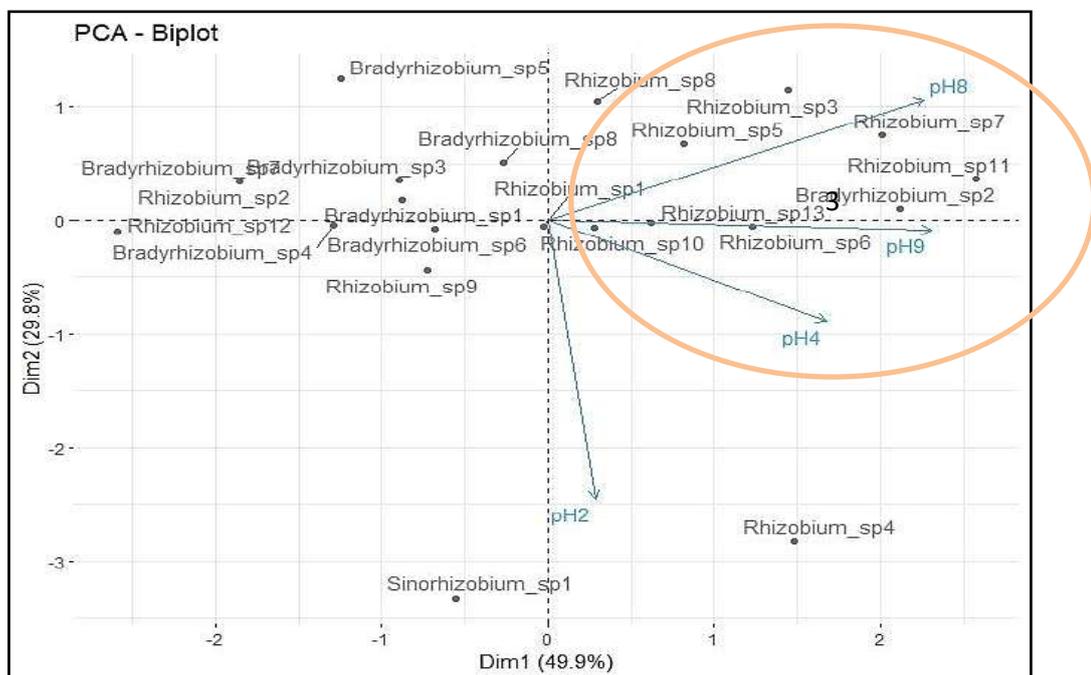
Figura N° 43: Aporte del porcentaje de las varianzas al análisis de componentes principales (pH)



Nota: Se observa el aporte del porcentaje de varianza según el número de componentes o dimensiones, donde se prioriza los dos componentes principales con mayor porcentaje de varianza, esto debido a su mayor correlación de adaptabilidad de las morfoespecies. que agrupan el 80% del total

El gráfico de PCA, muestra la concentración de la mayor parte de las morfoespecies con crecimiento exitoso y mayoritario, está asociada a pH 8 y 9, los cuales además están mejor correlacionados, lo que indica que hay una mayor preferencia a medios alcalinos y menor a los medios ácidos. A nivel taxonómico se evidencia *Rhizobium sp1, sp3, sp5, sp6, sp7, sp10, sp11, sp13* y *Bradyrhizobium sp2*, son las que mejor se desarrollan en los pH 8 y 9, en cuanto a las demás no tienen una preferencia por alguno de los pH e indistintamente tienen crecimientos bajos (Figura N°44).

Figura N° 44: Análisis de componentes principales (PCA) de las morfoespecies sometidas a diferentes pHs.



Nota : Se observa el aporte de cada variable (concentración) y la correlación entre ellas y las morfoespecies.

Tabla N° 13: Tolerancia a diferentes valores de pH

Tolerancia a diferentes valores de pH					
Código	pH				MORFOESPECIE
	2	4	8	9	
PQIA1R1	(+/-)	(++)	(++)	(++)	"Rhizobium sp6"
PQIA1R2	(+/-)	(++)	(++)	(++)	"Rhizobium sp10"
PQIA1R3	(+/-)	(++)	(++)	(++)	"Rhizobium sp1 "
PQIA1R4	(+/-)	(+/-)	(+)	(+/-)	"Rhizobium sp2"
PQIA2R1	(+/-)	(+/-)	(++)	(+)	"Bradyrhizobium sp5"
PQIA2R2	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	"Rhizobium sp12"
PQIA3R1	(+/-)	(+)	(++)	(++)	"Rhizobium sp1"
PQIA4R1	(+/-)	(++)	(++)	(+)	"Bradyrhizobium sp2"
PQIA4R2	(+/-)	(+)	(+)	(+)	"Rhizobium sp10 "
PQIA4R4	(+/-)	(+)	(+)	(+/-)	"Rhizobium sp1"
PQIA5R1	(+/-)	(+)	(+++)	(+++)	"Rhizobium sp7"
PQIA6R1	(+/-)	(+/-)	(++)	(++)	"Rhizobium sp5 "
PQIA7R1	(+/-)	(+)	(+)	(+/-)	"Bradyrhizobium sp4"
PQIA7R2	(+/-)	(+/-)	(+++)	(+++)	"Rhizobium sp8"
PQIA7R3	Negativo	(+/-)	(+)	(+/-)	"Bradyrhizobium sp5"
PQIA11R2	Negativo	(++)	(++)	(++)	"Rhizobium sp5 "
PQIA11R3	(+/-)	(++)	(+++)	(+++)	"Rhizobium sp11"
PQIA12R1	(+/-)	(+/-)	(++)	(+)	"Bradyrhizobium sp3"
PQIA12R3	(+/-)	(+/-)	(+)	(++)	"Bradyrhizobium sp8"
PQIA13R2	(+/-)	(++)	(++)	(+)	"Rhizobium sp13"
PQIA3R3	(+/-)	(++)	(+)	(+/-)	"Rhizobium sp1 "
PQIA15R1	(+/-)	(++)	(+)	(+/-)	"Rhizobium sp9 "
PQIA15R2	(+/-)	(+/-)	(++)	(++)	"Bradyrhizobium sp8"
PQIA15R3	Negativo	(++)	(+)	(+/-)	"Rhizobium sp8"
PQIA16R1	(+/-)	(+)	(+)	(+)	"Bradyrhizobium sp6"
PQIA16R2	(+/-)	(++)	(+++)	(+++)	"Bradyrhizobium sp2"
PQIA16R3	(+/-)	(++)	(++)	(++)	"Rhizobium sp5"
PQIA17R1	(+/-)	(+/-)	(+++)	(+++)	"Rhizobium sp3"
PQIA18R1	(+/-)	(+)	(+)	(+/-)	"Bradyrhizobium sp3"
PQIA19R2	(+/-)	(+/-)	(+)	(+)	"Bradyrhizobium sp1"
PQIA20R1	(+/-)	(+)	(+)	(+)	"Bradyrhizobium sp1"
PQIA20R2	(+/-)	(+)	(++)	(+)	"Bradyrhizobium sp1"
PQIA25R1	(+/-)	(+/-)	(+)	(+/-)	"Bradyrhizobium sp1"
PQIA26R1	(+/-)	(+/-)	(+)	(+/-)	"Bradyrhizobium sp7"
PQIA26R2	(+/-)	(+++)	(+++)	(+++)	"Bradyrhizobium sp2 "
PQIA27R1	(+/-)	(++)	(++)	(++)	"Rhizobium sp6 "
PQIA29R1	(+/-)	(++)	(+)	(+/-)	"Sinorhizobium sp1"
PQIA29R2	(+/-)	(++)	(++)	(++)	"Rhizobium sp4 "
PQIA33R1	(+/-)	(+/-)	(+)	(+)	"Bradyrhizobium sp1"

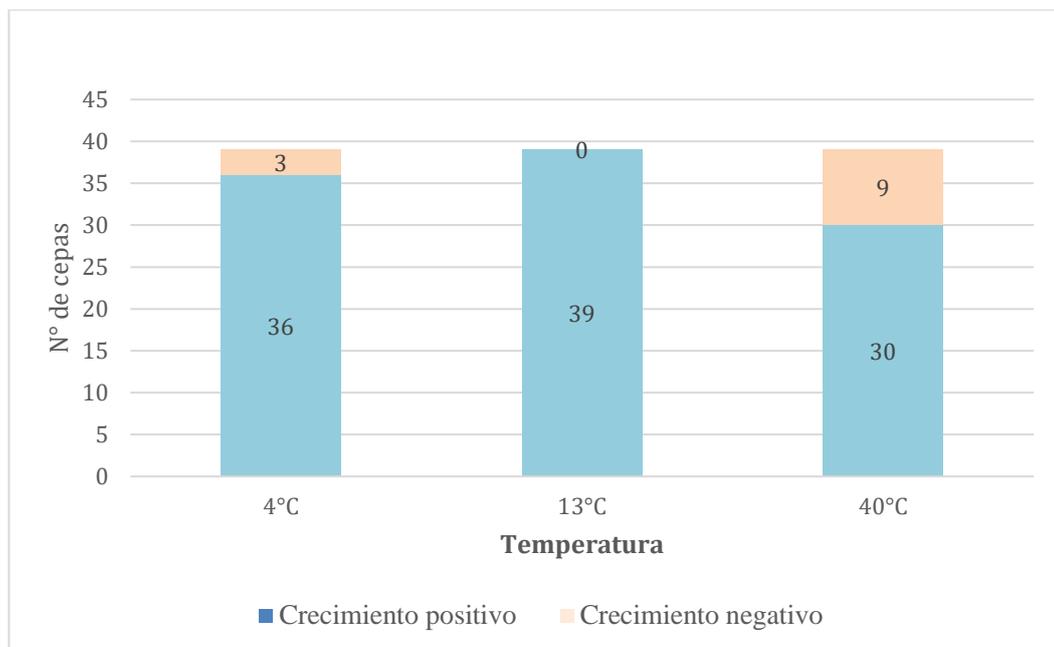
Fuente: Elaboración propia

Leyenda: (+/-) escaso crecimiento, (+) poco crecimiento, (++) regular crecimiento, (+++) abundante crecimiento

3.1.5.3. Crecimiento a diferentes temperaturas (4, 13 y 40°C)

Del total de 39 cepas que fueron estudiadas, se obtuvo lo siguiente: a temperatura de 4°C solo 18 cepas presentaron crecimiento, 18 cepas presentaron escaso crecimiento y 3 cepas no lograron crecer; mientras que a 13°C todas las cepas lograron crecer sin excepción y finalmente a 40°C fueron 22 cepas que presentaron crecimiento, mientras que 8 cepas presentaron crecimiento escaso y 9 cepas no lograron crecer. Según los datos obtenidos en esta investigación indican que 20 cepas fueron capaces de crecer en diferentes parámetros de temperatura lo que las convierte por su capacidad de desarrollo en potenciales bioinóculos. Como se muestra en la tabla N° 14 y (Figura N° 45).

Figura N° 45: Crecimiento a diferentes temperaturas (4, 13 y 40°C)



Nota: De las 39 cepas que fueron estudiadas, 3 cepas no lograron crecer a 4°C mientras que 18 presentaron crecimiento escaso y 18 cepas sí presentaron crecimiento. Casi los mismos resultados se observaron a 40°C donde 9 cepas no presentaron crecimiento, 8 cepas presentaron crecimiento escaso y 22 cepas si presentaron crecimiento.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la investigación (Halliday & Date, 1976) expusieron que la temperatura máxima para rizobios de zonas tropicales es de 42°C, además

indicó que los rizobios son capaces de crecer entre 27 y 45°C, sin embargo, *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* presentan un amplio rango de crecimiento que van desde 4°C hasta los 45°C lo que hace muy atractivas para su selección como bioinoculantes (Cuadrato et al. 2009).

Según (Contreras et al. 2007), los rizobios pueden crecer en un rango de temperatura de 20 a 31 °C. Sin embargo (Beck, Materon, & Afandi, 1993) caracterizó cepas de *Bradyrhizobium* que crecieron a 40 °C, lo cual demuestra una amplia diversidad de estas bacterias y corrobora los resultados obtenidos en este estudio evidenciando el crecimiento de 30 cepas que se desarrollaron a 40°C. Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos por (Florentino et al. 2010), quien menciona que no es sorpresa su adaptación.

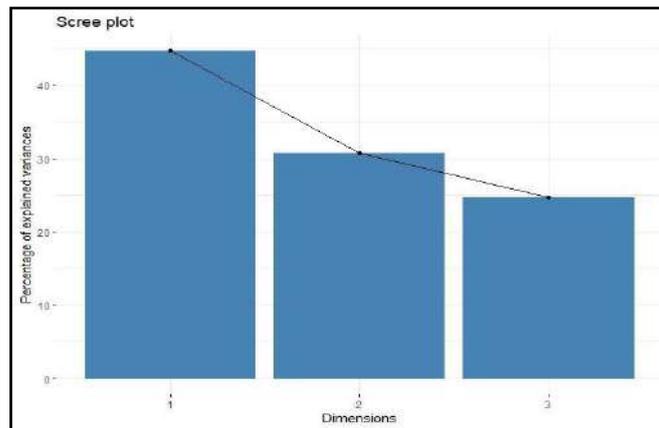
Figura N° 46: Crecimiento a diferentes temperaturas (Placas con medio ELMA a una temperatura de 4, 13 y 40°C)



- **Análisis de componentes principales (temperatura)**

De acuerdo al análisis de componentes principales (PCA), el primer componente o primera dimensión (eje) concentra o explica el 44.7% de la varianza y el segundo componente explican el 30% de la varianza (Figura N°47), lo que indica que ambas dimensiones explican la mayor proporción de la varianza más del 75%. Por tanto, también indica que los otros componentes explican en menos del 40% de la varianza, los que en este caso no se están considerando.

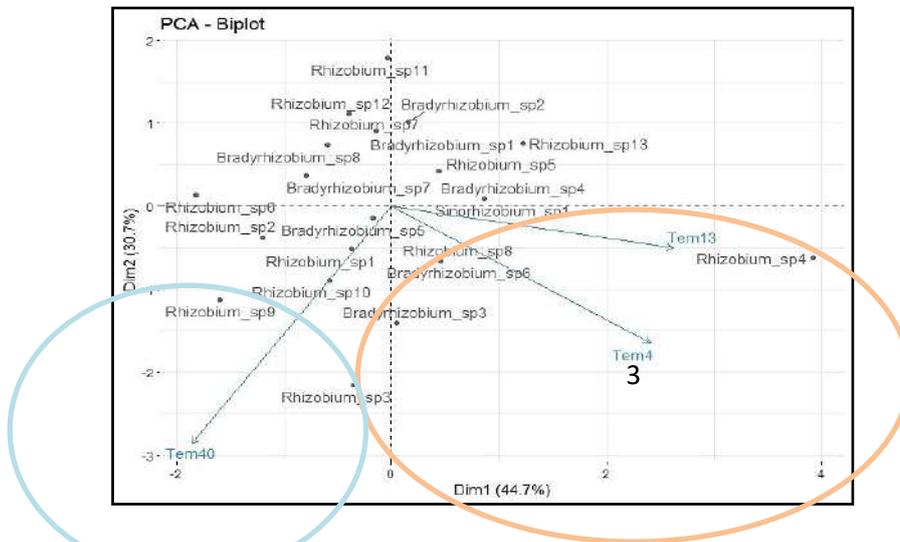
Figura N° 47: Aporte del porcentaje de las varianzas al análisis de componentes principales (temperatura)



Nota: Se observa el aporte de la varianza según el número de componentes o dimensiones, en este caso se prioriza los dos componentes principales, que agrupan cerca del 75% del total.

La concentración de la mayor parte de las morfoespecies con crecimiento exitoso y mayoritario, se concentran principalmente en las temperaturas de 13 son *Rhizobium* sp3, sp5 y sp13, *Sinorhizobium* sp1, pero sin embargo tampoco muestran un crecimiento alto. *Bradyrhizobium* sp3, sp6 *Rhizobium* sp8 evidencia que a los 40 °C desarrolla mejor su crecimiento y desarrollo de colonias, las demás no muestran una clara tendencia (Figura N°48).

Figura N° 48: Análisis de componentes principales (PCA) de las morfoespecies sometidas a diferentes temperaturas.



Nota: Se observa el aporte de cada variable (concentración) y la correlación entre ellas y las morfoespecies.

Por lo tanto, para la selección del potencial bioinoculante se consideró por la capacidad de tolerar condiciones de estrés por presentar resistencia y adaptabilidad a los factores que fueron estudiados tales como: Temperatura, NaCl y pH. Donde del total de las 39 cepas que fueron estudiadas sólo 10 cepas pudieron tolerar a estas condiciones de estrés y esas mismas se fijan como potenciales bioinoculantes.

Las cepas que fueron estudiadas evidencian la presencia de variabilidad y alto potencial bioinoculante las cuales fueron resistentes a condiciones de estrés. Esto se basa en la información presentada por (Hernandez et al. 2012) y también como por (Abera et al. 2015), quienes indican que los factores de adaptación, supervivencia y competitividad confieren a los rizobios ventajas adaptativas para sobrevivir y competir con otros microorganismos presentes en el suelo, brindándoles facilidad en la colonización de raíces en leguminosas, así como la fijación de nitrógeno atmosférico.

Tabla N° 14: Crecimiento a diferentes temperaturas

Código	Temperatura °C			Morfoespecie
	4	13	40	
PQIA1R1	(+/-)	(+)	(++)	" <i>Rhizobium sp6</i> "
PQIA1R2	(+/-)	(+)	(++)	" <i>Rhizobium sp10</i> "
PQIA1R3	(+)	(+)	(+++)	" <i>Rhizobium sp1</i> "
PQIA1R4	(+/-)	(+)	(++)	" <i>Rhizobium sp2</i> "
PQIA2R1	(+)	(+)	(++)	" <i>Bradyrhizobium sp5</i> "
PQIA2R2	(+/-)	(+)	(+/-)	" <i>Rhizobium sp12</i> "
PQIA3R1	(+/-)	(+)	(+/-)	" <i>Rhizobium sp1</i> "
PQIA4R1	(+)	(+)	(+)	" <i>Bradyrhizobium sp2</i> "
PQIA4R2	(+)	(+)	(++)	" <i>Rhizobium sp10</i> "
PQIA4R4	(+)	(+)	(+/-)	" <i>Rhizobium sp1</i> "
PQI5IAR1	(+/-)	(+)	(+/-)	" <i>Rhizobium sp7</i> "
PQI6IAR1	(+)	(+)	(++)	" <i>Rhizobium sp5</i> "
PQIA7R1	(+)	(+)	(+/-)	" <i>Bradyrhizobium sp4</i> "
PQIA7R2	(+)	(+)	(++)	" <i>Rhizobium sp8</i> "
PQIA7R3	(+/-)	(+)	(+/-)	" <i>Bradyrhizobium sp5</i> "
PQIA11R2	(+/-)	(+)	Negativo	" <i>Rhizobium sp5</i> "
PQIA11R3	(+/-)	(+)	Negativo	" <i>Rhizobium sp11</i> "
PQIA12R1	(+)	(+)	(++)	" <i>Bradyrhizobium sp3</i> "
PQIA12R3	(+)	(+)	(++)	" <i>Bradyrhizobium sp8</i> "
PQIA13R2	(+)	(+)	Negativo	" <i>Rhizobium sp13</i> "
PQIA13R3	(+/-)	(+)	(+++)	" <i>Rhizobium sp1</i> "
PQIA15R1	(+/-)	(+)	(+++)	" <i>Rhizobium sp9</i> "
PQIA15R2	Negativo	(+)	Negativo	" <i>Bradyrhizobium sp8</i> "
PQIA15R3	(+)	(+)	(+/-)	" <i>Rhizobium sp8</i> "
PQIA16R1	(+)	(+)	(+)	" <i>Bradyrhizobium sp6</i> "
PQIA16R2	(+/-)	(+)	Negativo	" <i>Bradyrhizobium sp2</i> "
PQIA16R3	(+)	(+)	Negativo	" <i>Rhizobium sp5</i> "
PQIA17R1	(+)	(+)	(+++)	" <i>Rhizobium sp3</i> "
PQIA18R1	(+)	(+)	(++)	" <i>Bradyrhizobium sp3</i> "
PQIA19R2	(+/-)	(+)	(+/-)	" <i>Bradyrhizobium sp1</i> "
PQIA20R1	Negativo	(+)	(+)	" <i>Bradyrhizobium sp1</i> "
PQIA20R2	(+/-)	(+)	Negativo	" <i>Bradyrhizobium sp1</i> "
PQIA25R1	(+)	(+)	Negativo	" <i>Bradyrhizobium sp1</i> "
PQIAR26R1	(+/-)	(+)	(+)	" <i>Bradyrhizobium sp7</i> "
PQIA26R2	(+/-)	(+)	Negativo	" <i>Bradyrhizobium sp2</i> "
PQIA27R1	Negativo	(+)	(++)	" <i>Rhizobium sp6</i> "
PQIA29R1	(+)	(+)	(+)	" <i>Sinorhizobium sp1</i> "
PQIA29R2	(+/-)	(+)	(++)	" <i>Rhizobium sp4</i> "
PQIA33R1	(+/-)	(+)	(+)	" <i>Bradyrhizobium sp1</i> "

Fuente: Elaboración propia

Leyenda: (+/-) escaso crecimiento, (+) poco crecimiento, (++) regular crecimiento), (+++) abundante crecimiento.

CONCLUSIONES

1. Se identificaron 20 especies arbóreas que presentaron nódulos radiculares, donde para el género *Inga* se identificaron las siguientes especies: (*I. ruiziana*, *I. nobilis*, *I. marginata*, *I. chartacea*, *I. aff. densiflora*, *I. yacoana*, *I. tenuistipula*, *I. gracilifolia*, *I. edulis*, *I. aff. cinnamomea*, *I. ingoides*, *I. macrophylla*, *Inga sp1*, *Inga sp2*, *Inga sp3*), *Zapoteca amazónica*, *Cassia sp1*, *Calliandra sp1*, *Pseudopiptadenia sp1* y *Zygia coccínea*.
2. Se determinó la morfología de nódulos radiculares presentando una coloración externa: amarillo cremoso (38%), blanco cremoso (8%), crema (50%) y amarillo y rosa (4%), redondos, ovalados, corazonada y ramificados con estructuras costrosas, con superficies lisas, lo que determina una asociación de la planta con bacterias.
3. Se aislaron 39 cepas positivas de bacterias nitrificantes a partir de nódulos radiculares en medio ELMA.
4. Se caracterizó fenotípicamente en condiciones de laboratorio donde se tomaron en cuenta las características morfológicas, tiempo de crecimiento, producción de acidez y alcalinidad y coloración Gram, donde se obtuvo que las cepas aisladas que pertenecen a los géneros: *Rhizobium* 51%, *Bradyrhizobium* 46% y *Sinorhizobium* 3%, además se obtuvieron 22 morfoespecies para el género *Rhizobium* se obtuvo 13 morfoespecies siendo las siguientes: *Rhizobium sp1*, *sp2*, *sp3*, *sp4*, *sp5*, *sp6*, *sp7*, *sp8*, *sp9*, *sp10*, *sp11*, *sp12* y *sp13*; mientras que para el género *Bradyrhizobium* se obtuvo 8 morfoespecies siendo las siguientes: *Bradyrhizobium sp1*, *sp2*, *sp3*, *sp4*, *sp5*, *sp6*, *sp7* y *sp8* y *Sinorhizobium sp1*.
5. Se determinó que de las 39 cepas aisladas solo 3 morfoespecies lograron adaptarse a todas las condiciones de estrés siendo las siguientes: *Rhizobium sp13*, *sp5* y *sp1*, estas cepas tienen potencial bioinoculante por su mejor adaptación a estas condiciones de estrés.

RECOMENDACIÓN

- Realizar estudios similares en otras regiones del país que incrementen la colección de cepas nativas y evaluarlas en diferentes condiciones de suelo y clima
- Continuar con el estudio de cepas aisladas eficientes con el fin de establecer su potencial bioinoculante ya que son ideales para estudios en inoculación en leguminosas y biorremediación
- Complementar las técnicas de aislamiento, así como la clasificación más precisa de los aislados con el empleo de otras técnicas de taxonomía de aislamiento y caracterización morfológica y bioquímica con microscopía electrónica y análisis molecular.
- Continuar con la investigación para observar la resistencia a metales pesados.

BIBLIOGRAFÍA

- Abera T., E. Semu, T. Debele, D. Wegary and H. Kim (2015). Determination of soil Rhizobium populations, intrinsic antibiotic resistance, nodulation and seed yield of faba bean and soybean in Western Ethiopia. *World Journal of Agricultural Sciences* 11:311-324.
- Agahm M.V., Orji, J.O., Chukwu, O.S., Udu-Ibiam, O.E., y Olaosebikan, O.O. (2016). *Isolation and Identification of Rhizobium species from Root Nodules of Arachis Hypogaea L. and Telfaria occidentalis in South-East, Nigeria*. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 5(6), pp. 227-230.
- Alexander, M. (1980). *Introducción a la microbiología del suelo*. DF, México AGT. 492 p.
- Allan, D. & Graham, P. (2002). *Simbiotic Nitrogen Fixation, other N₂-fixing symbiosis*. Dep. of soil, water, and climate. University of Minesota. *Soil Biology and Fertility*. Soil 5611. Disponible: <http://www.soils.agri.umn.edu/academics/classes/soil3612/SymbioticNitrogenFixation/Other.htm>.
- Alva, G. N. (2013). *Caracterización de Rhizobios simbióticos fijadores de nitrógeno a partir de un cultivar de Pisum sativum "arveja" de la localidad de Contumazá, Departamento de Cajamarca - Perú en los meses de agosto- octubre del 2012*. Trujillo, Perú: *Biblioteca Digital- Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación- Universidad Nacional de Trujillo*.
- Araujo, V. (2015). *Biodiversidad Florística del Jardín Botánico de la Universidad Nacional de Ucayali*. *Revista de Investigación Científica "Apuntes Ciencia & Sociedad"* 2015: 05(02), Universidad Continental, Perú.
- Arce, R. (1990). *Estudio Dendrológico del género Inga en la Selva Central, departamento de Pasco*. *Bol. Lima* 67: 47-78.

- Arias, F. (2015). El proyecto de investigación (Sexta ed.). Caracas: Episteme. Obtenido de <https://es.slideshare.net/fidiasarias/fidias-g-arias-el-proyecto-de-investigacin-6ta-edici3n>.
- Arque, L., & Suna, L. (2018). Evaluaci3n de la diversidad y utilidades de la familia Marantaceae en el valle de Kosñipata, reserva de bi3sfera del Manu, Paucartambo - Cusco. *UNSAAC*.
- Baca, B., Soto, L. y Prado, P. (2000). Fijaci3n Biol3gica de Nitr3geno. Ciencia y cultura elementos. Versi3n impresa. Puebla, M3xico. Pgs 43-49.
- Bai, Z., Dent, D., Olsson, L., & Schaeoman, M. (2008). *Proxy global assessment of land degradation*. Soil use and management. 223-234.
- Beck, D., Materon, L., & Afandi, F. (1993). *Practical rhizobium-legume technology manual*. Syria: ICARDA.
- Ben_E, Kramarsky-Winter E, Kushmaro A. (2009). An in situ method for cultivating microorganisms using a double encapsulation technique. *FEMS Microbiology Ecology*, pp 363-371.
- Beck, D. (1993). *Practical Rhizobium-Legume Technology Manual*. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA). Aleppo. 389 pp
- B3cquer, C. (2004). Descripci3n y clasificaci3n de Rhizobios: Enfoque hist3rico, m3todos y tendencias actuales. *Revista Biolog3a*, 9.
- BIOFAG, (2007). Red Iberoamericana de Biofertilizantes microbianos para la agricultura. Biofertilizantes en Iberoam3rica visi3n t3cnica, cient3fica y empresarial. Montevideo. Uruguay.
- Calvo, S. (2011). Bacterias simbi3ticas fijadoras de nitr3geno. Universidad de Salamanca, DIALNET, CT 3 173- 186.

- CIAT. (1987). Simbiosis leguminosa Rhizobio; *Manual de métodos de evaluación, selección y manejo*. Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Contreras C., Martínez J., Muñoz A. (2007). Aislamiento y caracterización bioquímica, fisiológica y morfológica de géneros *Rhizobium* sp. y *Bradyrhizobium* sp. en leguminosa *Cajanus cajan*. Sucre
- Coiné, M. (2000). Microbiología del suelo: Un enfoque Exploratorio. España, Paraninfo. 416.p.
- Contreras Ch., Iriarte J., & Muñoz A. (2007). Aislamiento y caracterización bioquímica, fisiológica y morfológica de géneros *Rhizobium* sp. y *Bradyrhizobium* sp. asociados a la leguminosa *Cajanus cajan* en parcelas agrícolas del municipio de Sampués, departamento de Sucre. [Tesis de Pregrado]. Universidad de Sucre.
- Crespo L., & Julio A. (2012). Identificación y caracterización de *Rhizobium* para la producción de biofertilizante en la provincia de Santa Elena. [Tesis de Pregrado]. Universidad Estatal Península de Santa Elena.
- Cuadrado, B., Rubio, G., & Santos, W. (2009). Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de fríjol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. Colombiana Ciencia Química Farmacia Vol 38(1), 78 - 104.
- Elsheikh, E. & Wood. M. (1990). Rhizobia and bradyrhizobia under salt stress: possible role of trehalose in osmoregulation. Letters in Applied Microbiology. 10, 127-129.
- FAO. (2015). Status of the World's Soil Resources (SWSR)—technical summary. *Food and Agriculture Organization of the United Nations and Intergovernmental Technical Panel on Soils*. Rome, Italy.
- Faria, B., Lewis, G., Sprent, J., & Sutherland, J. (1989). Occurrence of nodulation in the Leguminosae. *New phytol*, 607-619.

- F. Munévar y A. G. Wollum II, (1981). Effect of high root temperature and Rhizobium strain on nodulation, nitrogen fixation, and growth of soybeans, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 45, 1113
- Fassbender, H., & Bornemisza, E. (1994). *Química de suelos con énfasis en suelos*. Costa Rica: San Jose.
- Ferrera, R., González, M., Rodríguez, M. 1993. *Manual de Agromicrobiología*. Editorial Trillas. México. p.p. 45-46.
- Franche, C., Lindstrom, K., & Elmerich, C. (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. En *Plant Soil* 321 (págs. 35-59).
- Ghittoni, N.E & Bueno M. A. (1996). Changes in the cellular content of trehalose in four peanut rhizobia strains cultured under hypersalinity, *Simbiosis*, 20, 117.
- Giraldo, J. (2021). Estudio de las técnicas de reducción de dimensión basadas en componentes principales: Análisis de componentes principales no lineales. Universidad Nacional de Colombia Manizales.
- González, H. & Fuentes, N. (2016). Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal. *Revista de ciencias agrícolas*.
- Halliday, J., & Date, R. (1976). *Manual para la colección, preservación y caracterización de recursos forrajeros tropicales*. Colombia: CIAT.
- Hernández F. I., Nápoles G., Pérez H., Rosales J. y Ramírez P. (2012). Caracterización fenotípica de aislados de rizobios procedentes de la leguminosa forrajera *Canavalia ensiformis*. *Cultivos Tropicales* 33:21-28.
- Howieson, J., & Dilworth, M. (2016). *Working with rhizobia*. Australian Centre for International Agricultural Research: Australian: Canberra.

- Huarancca, B. (2017). Evaluación de las especies del género *Inga* (Fabaceae) para el mejoramiento de suelos agrícolas en el Bosque Amazónico del Pongo de Qoñec, Valle de Kosñipata, Cusco. Perú: Biblioteca General de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. Baltimore, Maryland (USA): Williams & Wilkins*, pp 95-97-112-113.
- Huamantupa, I. (2010). Inusual riqueza, composición y estructura arbórea en el Bosque de tierra firme del Pongo de Qoñec, Sur Oriente peruano. *Peruana de Biología*, 2, 167-171.
- Kellman, A. W. (2008). Rhizobium inoculation, cultivar and management Effects on the growth, development and yield of Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Thesis for the Degree of Doctor of Philosophy at Lincoln University. Canterbury New Zealand.
- Leboffe M, Pierce B (2011). A photographic Atlas for the Microbiology Laboratory EEUU. Morton, pp. 256.
- Lewis, M. (1986). Plants and Nitrogen. The Institute of Biology's Studies in Biology. London, Publishers. p. 166.
- Lewis, D. (2005). Phytoremediation of toxic trace elements in soil and water. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32: 514-520.
- López-Lara, I. (2000). Rhizobium y su destacada simbiosis con las leguminosas. Versión virtual. Centro de Investigación sobre fijación de Nitrógeno. UNAM México. pp 1-9.
- Lopez, J., Lépiz, R., González, D., Rodríguez, R., & Olalde, V. (2017). Caracterización morfológica y bioquímica de cepas *Rhizobium* colectadas en frijol común silvestre domesticado. *Fitotec. Mex. Vol. 40(1)*, 73-81.

- The Legume Phylogeny Working Group. (2017). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon*, 66(1), 44-77.
- Madigan, M. (2000). *Biología de los microorganismos de Brock*. 9 ed. Prentice - Hall.
- Mayz, Figueroa, J. (2004). Fijación Biológica de Nitrógeno. *Revista UDO Agrícola* 4(1):1-20.
- Martinez, E. (1988). *Rhizobium y su destacada simbiosis con plantas. Centro de investigación sobre fijación, UNAM.*
- Marsudi, N., Glemm, A y Dilworth, M. (1999). Identificación y caracterización de Bacterias de nódulos de raíz de crecimiento rápido y lento de suelos capaz de nodular *Acacia saligna* . Australia .
- Marquina, M., González, N. y Castro, (2011). Caracterización fenotípica de doce rizobios aislados de diversas regiones geográficas de Venezuela. *Revista de Biología Tropical*. 59(3):1017-1036.
- Matteuci, S. D., & Colma, A. (1982). *Metodología para el estudio de la vegetación*. La Plata-Argentina: Eva Chasneau.
- Mayea, S, et al., (1998). *Microbiología Agropecuaria*. Tomo II. Ed. Félix Varela. La Habana. pp 156-178.
- Moreira, F., E. J. Huisin y D. E. Bignell. (2012). *Manual de biología de suelos tropicales. Muestreo y caracterización de la biodiversidad bajo suelo*. Instituto Nacional de Ecología, México, 337 pp., México.
- Morales, C. (2023). Caracterización de *Rhizobium* spp. a partir de haba (*Vicia faba* L.) en cuatro localidades del cantón Tisaleo .Universidad Técnica De Ambato.

- Ortiz, S. (2017). Puesta a punto de un método de aislamiento de los Rhizobium simbiotes radiculares en una leguminosa de la Flora Valenciana. Universidad Politécnica de Valencia,.
- Pérez, A. (2011). Determinación de morfotipos nativos de Rhizobium asociados a la leguminosa *Teramnus volubilis* Sw en fincas ganaderas en el municipio de Tolú en el departamento de Sucre. *Revista Colombiana de Ciencia Animal* 3(1): 62-89.
- Pennington, T.D. (1997). The genus Inga. Botany. Royal Botanic Gardens, Kew 844 p.
- Pennington, D. Reynel, C.(2003). Arboles utiles de la Amazonía peruana y sus usos. 536 p.
- R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Reynoso, M., Magnoli, C., Barrios, G., Demo, M. (2015). Manual de microbiología general. Río Cuarto, Argentina 2015 - 105p
- Ricillo, P., Munglia C., Brujin, F, Row, A., Booth, I., Aguilar, O. (2000). Glutathione is involved in environmental stress responses in Rhizobium tropici, including acid tolerance. *Journal of Bacteriology* 182: 1748-1753.
- Polhill, R., & Raven, P. (1981). Advances in Legume Systematic. *Royal Botanic Gardens*, Parts 1 and 2.
- Rivera, D. (2012). Formulación de un prototipo de biofertilizante con base en Rhizobium s. Tesis de Maestría. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia
- Rodríguez C., Sevillano F. y Subramaniam P. (1984). La Fijación de Nitrógeno Atmosférico. Una Biotecnología en la producción Agraria. Instituto de Recursos Naturales y Agro Biología. Salamanca, España. 1ed. En línea. disponible en: http://www.ceresnet.com/ceresnet/esp/servicios/teleformacion/agroambiente/nitrogeno_atmosferico.pdf.

- Romero, I. (2019). Producción y comercio de Tara en el Perú. Obtenido de <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/419835/produccion-comercio-de-la-tara-peru.pdf>
- Mpepereki, S. Makonese F. y A. G. Wol (1997). Physiological characterization of indigenous rhizobia nodulating *Vigna unguiculata* in Zimbabwean soils, *Symbiosis* 22, 275
- Schink B (2002). Synergistic interactions in the microbial world. *Antonie Van Leeuwenhoek*. pp. 257-261.
- Stams AJ, Bok FA, Plugge CM., Van Eekert MH., Dolfing J., Schraa G. (2006). Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities. *Environmental Microbiology*. pp. 271-382.
- Santillana, N. (2007). Caracterización de cepas de *Rhizobium* aisladas de *Vicia Faba* y *Pisum sativum* var. *Macrocarpum*. Tesis Doctoral. Programa Doctoral en Ciencias Biológicas e Ingeniería Biológica de la Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Sadowsky, M., & Graham, P. (2002). The prokaryotes involving electronic resource for the microbiological community. *Springer Verlag*.
- Salisbury, F. (1992). Fisiología vegetal. Ed. Iberoamericana S.A. de C.V. México. 319-338.
- Schrire, B., Lavin, M., & Lewis, G. (2005). Patrones de distribución global de las leguminosas: conocimientos de filogenias recientes. Reino Unido.
- Shamseldin, A., & Werner, D. (2005). High salt and high pH tolerance of new isolated *Rhizobium etli* strains from Egyptian soils. *Curr. Microbiol.* P 50:11 - 6..
- Sinyanya, K. (2016). *Researgate*. Obtenido de: https://www.researchgate.net/publication/306039771_Phenotypic_characterization_of_rhizobia_isolates_and_distribution_of_Burkholderia_rhizobia_in_the_Core_Cape_Subregion.

- Spaink, H. (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 54: 257-288.
- Strugaard, J. (2000). Regulators and Regulation of legume root nodule development. *Plant physiol*, 532-540.
- Quispel, A. (1974). The biology of nitrogen fixation. Amsterdam: *North-Holland Publishing*.
- Quevedo, M. (2015). Simbiosis y procesos biotecnológicos: El biofertilizante *Rhizobium sp* como alternativa para la simbiosis con *Phaseolus vulgaris*. Colombia: Universidad Pedagógica Nacional Bogotá.
- Ulibarri, E. (2008). Los géneros de *Caesalpinioideae (Leguminosae)* presentes en Sudamérica. Buenos Aires: *Darwiniana*, vol. 46.
- Taiz, L., & Zeiger E, (2006). Fisiología vegetal. Vol 1. 3 ed. Universidad Jaume. Colección Ciencias experimentales. 1338 p.
- Vargas de Roza, E (1969). Aspectos microbiológicos de la fijación simbiótica del nitrógeno por el *Rhizobium*. Instituto Geográfico Agustín Codazzi. Bogotá Colombia. 198 pp.
- Vásquez, R., Rojas, R., Monteagudo, A., Gamarra, L., Humantupa, I. (2018). Catálogo de los Árboles del Perú. *Revista Q'EUÑA*.
- Vincent, JM. (1975). Manual Práctico de Rizobiología. Editorial hemisferio sur. Buenos Aires. Argentina. p.p. 4.
- Vriezen, J., Bruijin, F., Nusslein, K. (2007). Response of Rhizobia to desiccation in relation to Osmotic stress, Oxygen and Temperature 73:11. 3451-3459.

Wang, T. & Martínez, J. (2007). Taxonomía de los rizobios.). En:
(<http://www.microbiología.org.mx/microbiosenlinea>).

Zúñiga, D. (2006). Biofertilizantes una visión técnica, científica y empresaria. Red Biofag.
Lodrina. Brasil.

ANEXO

ANEXO N° 1: FASE DE CAMPO

Determinación de especies arbóreas de la sub familia *Caesalpinioidea*



Escavacion de nódulos radiculares



Obtencion y almacenamiento de nódulos radiculares



Resultados de la identificación de las especies arbóreas colectadas



UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZONICA DE MADRE DE DIOS
 "Madre de Dios, Capital de la Biodiversidad del Perú"
 Año de la unidad, la paz y el desarrollo



Centro Investigación Herbario Alwyn Gentry (HAG)

El que suscribe, director del Centro de Investigación Herbario Alwyn Gentry (HAG) de la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios (UNAMAD), deja:

CONSTANCIA

Que las Bachilleres Wendina Yoshin Colque Pineda y Yesenia Katerin Percca Lipe, Tesistas de la carrera de Biología de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, han presentado 33 especímenes pertenecientes a la familia Fabaceae para su identificación. Los ejemplares presentados provienen del valle de Kosñipata, provincia de Paucartambo, región Cusco, estas fueron verificadas e identificadas en este Centro de Investigación HAG-UNAMAD.

Los especímenes en mención se detallan en el siguiente cuadro:

Familia Segun APG IV (2016)	Nombre científico	Número Colección
Fabaceae	<i>Inga nobilis</i> Willd.	PQIA1
Fabaceae	<i>Inga marginata</i> Willd.	PQIA2
Fabaceae	<i>Inga ruiziana</i> G. Don	PQIA3
Fabaceae	<i>Inga chartacea</i> Poepp. & Endl.	PQIA4
Fabaceae	<i>Inga aff. densiflora</i> Benth.	PQIA5
Fabaceae	<i>Zygia coccinea</i> (G. Don) L. Rico	PQIA6
Fabaceae	<i>Pseudopiptadenia sp1</i>	PQIA7
Fabaceae	<i>Inga tenuistipula</i> Ducke	PQIA8
Fabaceae	<i>Inga macrophylla</i> Humb. & Bonpl. ex Willd.	PQIA9
Fabaceae	<i>Inga sp1</i>	PQIA10
Fabaceae	<i>Inga yacoana</i> J.F. Macbr.	PQIA11
Fabaceae	<i>Zapoteca amazonica</i> (Benth.) H.M.Hern.	PQIA12
Fabaceae	<i>Inga aff. densiflora</i> Benth.	PQIA13
Fabaceae	<i>Inga yacoana</i> J.F. Macbr.	PQIA14
Fabaceae	<i>Inga aff. densiflora</i> Benth.	PQIA15
Fabaceae	<i>Inga tenuistipula</i> Ducke	PQIA16
Fabaceae	<i>Inga aff. densiflora</i> Benth.	PQIA17
Fabaceae	<i>Inga edulis</i> Mart.	PQIA18
Fabaceae	<i>Inga yacoana</i> J.F. Macbr.	PQIA19
Fabaceae	<i>Inga aff. cinnamomea</i> Spruce ex Benth.	PQIA20





UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZONICA DE MADRE DE DIOS

"Madre de Dios, Capital de la Biodiversidad del Perú"

Año de la unidad, la paz y el desarrollo



Fabaceae	<i>Inga ingoides</i> (Rich.) Willd.	PQIA21
Fabaceae	<i>Zygia coccinea</i> (G. Don) L. Rico	PQIA22
Fabaceae	<i>Inga chartacea</i> Poepp. & Endl.	PQIA23
Fabaceae	<i>Inga sp2</i>	PQIA24
Fabaceae	<i>Inga sp3</i>	PQIA25
Fabaceae	<i>Zygia coccinea</i> (G. Don) L. Rico	PQIA26
Fabaceae	<i>Inga sp3</i>	PQIA27
Fabaceae	<i>Inga gracilifolia</i> Ducke	PQIA28
Fabaceae	<i>Zapoteca amazonica</i> (Benth.) H.M.Hern.	PQIA29
Fabaceae	<i>Cassia sp1</i>	PQIA30
Fabaceae	<i>Zapoteca amazonica</i> (Benth.) H.M.Hern.	PQIA31
Fabaceae	<i>Calliandra sp1</i>	PQIA32
Fabaceae	<i>Inga chartacea</i> Poepp. & Endl.	PQIA33

Se expide la presente constancia a solicitud de la interesada para los fines que considere conveniente.

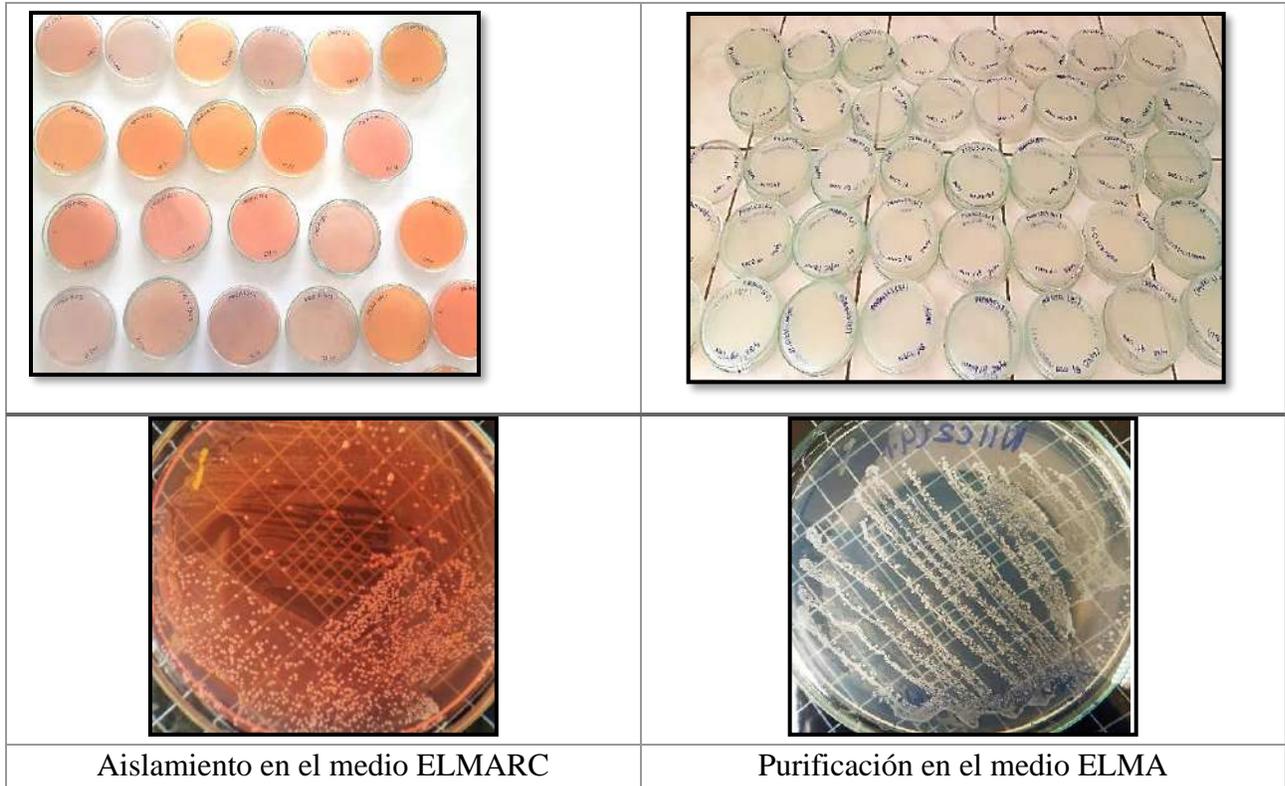
Puerto Maldonado, 19 octubre de 2023

Atentamente

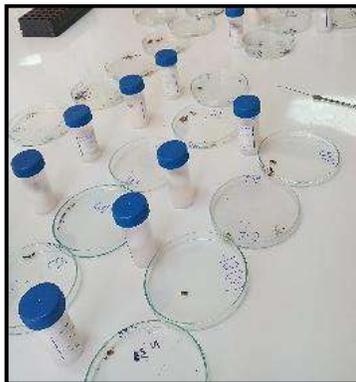

Mg. Sufre Bdez Quisppe
DIRECTOR DEL HERBARIO

ANEXO N°2: FASE DE LABORATORIO

- Medios de cultivo para purificación de bacterias noduladoras



-Primera fase de aislamiento



Hidratación de nódulo



Trituración de nódulo

-Procedimiento



Siembra en el medio ELMA



Inoculación por diluciones en el medio ELMA

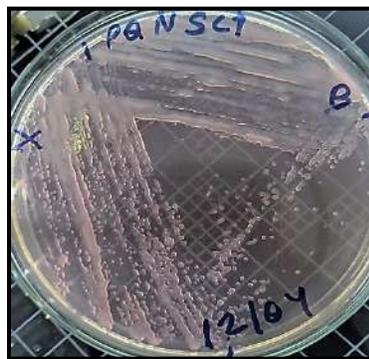


Incubación a 28°C

Segunda fase de aislamiento



Siembra en el medio ELMA



Aislamiento por agotamiento en superficie

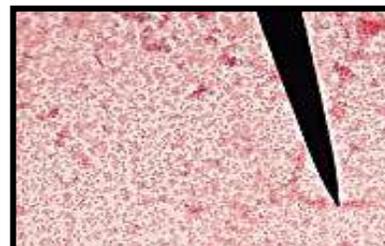


Incubación a 28°C

- Prueba de catalasa



Coloración Gram



- **Medios de cultivo para pruebas bioquímicas**

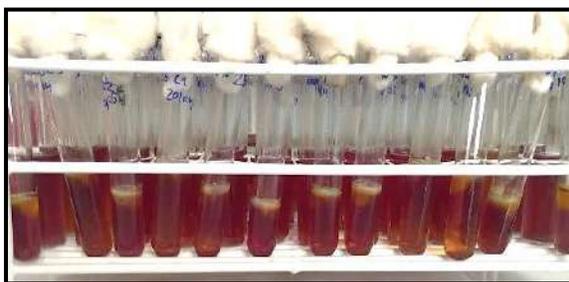


Preparación de placas con los medios de cultivo, ELMA+AB, TSI, MIO y caldo extracto levadura.

- **Pruebas bioquímicas**

MIO

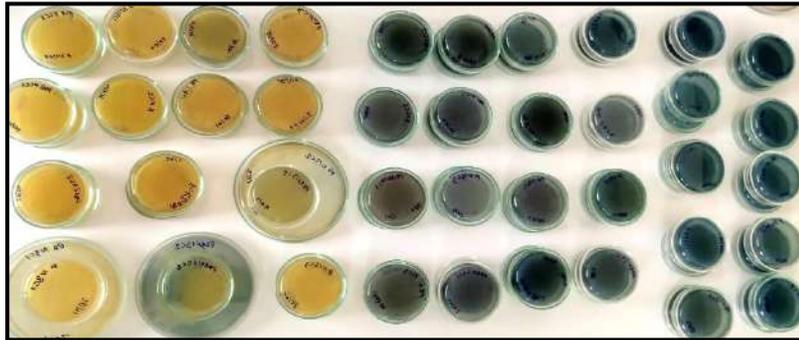
TSI



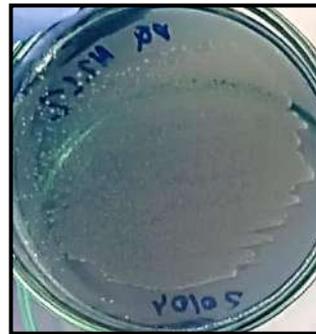
A. Muestras positivas en el medio MIO (ornitina positivo, movimiento positivo)

B. Muestras de TSI (K/A, K/K, K/A)

- Prueba de alcalinidad y acidez en ELMA+AB



Crecimiento ELMA + AB reacción ácida y alcalina



A: Colonias observadas después de 3 días de incubación

B: Colonias observadas después de 7 días de incubación.

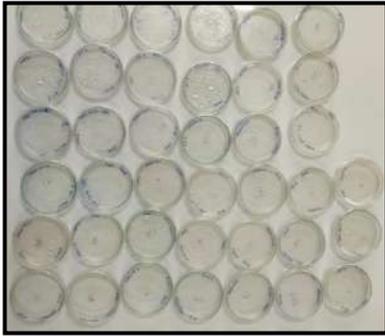
PRUEBAS PARA DETERMINACION DEL POTENCIAL BIOINOCULANTE

- Temperatura

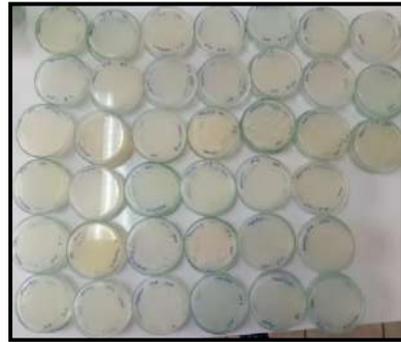


Placas con medio ELMA a una temperatura de 4, 13 y 40°C

- pH



Crecimiento en el medio ELMA a una pH 2



Crecimiento en el medio ELMA a una pH 8 y 9

Salinidad



Concentración de 1.5%, 2.5% NaCl y 4% NaCl.

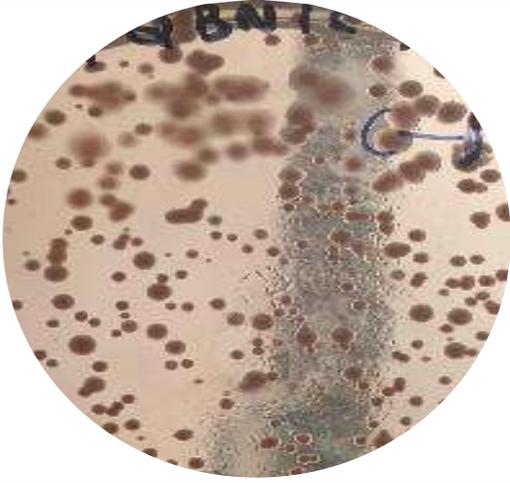
CRIOPERESERVACIÓN

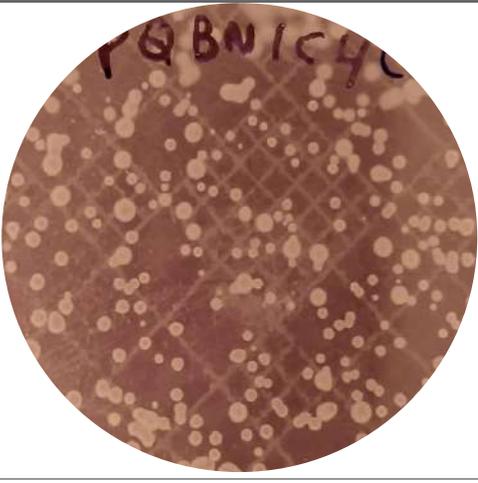


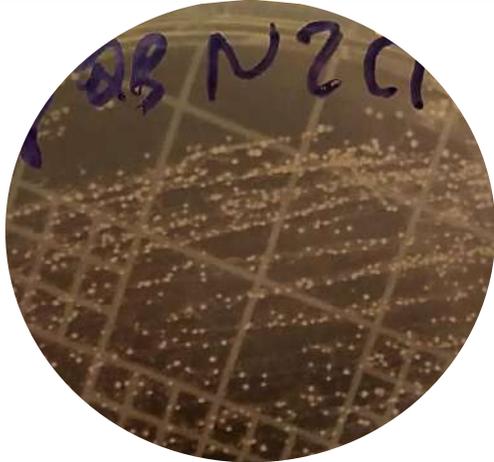
Preservación de cepas aisladas en glicerol al 80% a una temperatura de -40°C

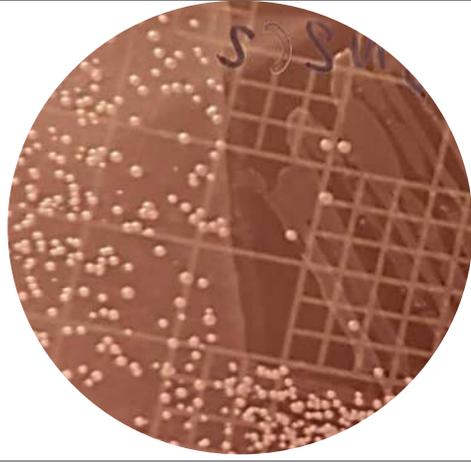
ANEXO N°3. Lista de observación macroscópica de colonias aisladas en el medio ELMARC y observación microscópica de las cepas aisladas.

<p>Cepa: PQIA1R1 (aislado de <i>Inga nobilis</i>)</p>	<p>Macrofotografía</p>
<p>Descripción:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colonia: Color: Blanco translucido Diámetro (mm): 0.1-10 Forma: irregular Superficie: Lisa brillante Borde: Ondulado Elevación: Convexo Consistencia: Cremoso mucoide • Tiempo de aparición: 1 a 3 días (Crecimiento rápido) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Rhizobium</i> 	<div data-bbox="951 369 1442 852" data-label="Image"> </div> <p>Microfotografía (Obj. 100 X)</p> <div data-bbox="1019 894 1377 1108" data-label="Image"> </div>
<p>Cepa: PQIA1R2 (aislado de <i>Inga nobilis</i>)</p>	<p>Macrofotografía</p>
<p>Descripción:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: translucido Diámetro (mm): 0.1-5 Forma: irregular Superficie: Lisa brillante Borde: Ondulado Elevación: Convexo Consistencia: Mucilaginoso • Tiempo de aparición: 1 a 3 días (crecimiento rápido) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Rhizobium</i> 	<div data-bbox="951 1194 1442 1650" data-label="Image"> </div> <p>Microfotografía (Obj. 100 X)</p> <div data-bbox="1010 1692 1334 1906" data-label="Image"> </div>

Cepa: PQIA1R3 (aislado de <i>Inga nobilis</i>)	Macrofotografía
<p>Descripción:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Blanco crema Diámetro (mm): 0.8 -2 Forma: irregular Superficie: Lisa brillante Borde: Ondulado Elevación: Convexo Consistencia: Cremoso • Tiempo de aparición: 1 a 3 días (crecimiento rápido) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Rhizobium</i> 	 <p>Microfotografía (Obj. 100 X)</p> 

Cepa: PQIA1R4(aislado de <i>Inga chartacea</i>)	Macrofotografía
<p>Descripción:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Blanco crema Diámetro (mm): 0.05-0.1 Forma: irregular Superficie: Lisa brillante Borde: Entero Elevación: Convexo Consistencia: Acuoso • Tiempo de aparición: 1 a 3 días (crecimiento rápido) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Rhizobium</i> 	 <p>Microfotografía (Obj. 100 X)</p> 

Cepa: PQIA2R1 (aislado de <i>Inga marginata</i>)	Macrofotografía
<p>Descripción:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Blanco translucido Diámetro (mm): 0.05-0.1 Forma: Circular Superficie: Lisa brillante Borde: Entero Elevación: Convexo Consistencia: Acuoso • Tiempo de aparición: 1 a 3 días (crecimiento rápido) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Bradyrhizobium</i> 	 <p>Microfotografía (Obj. 100 X)</p> 

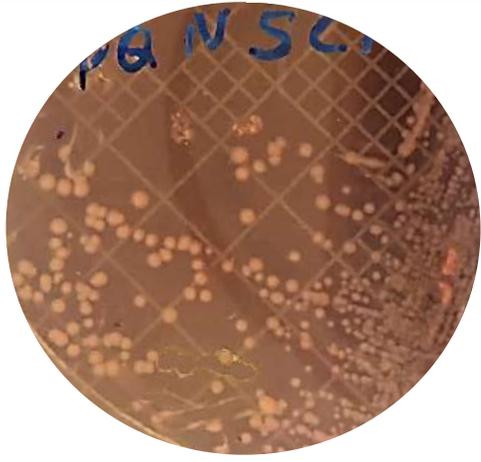
Cepa: PQIA2R2 (aislado de <i>Inga marginata</i>)	Macrofotografía
<p>Descripción:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Amarillo pálido Diámetro (mm): 0.5-1 Forma: Circular Borde: Entero Superficie: Lisa brillante Elevación: Convexo Consistencia: Cremoso • Tiempo de aparición: 1 a 3 días (crecimiento rápido) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Rhizobium</i> 	 <p>Microfotografía (Obj. 100 X)</p> 

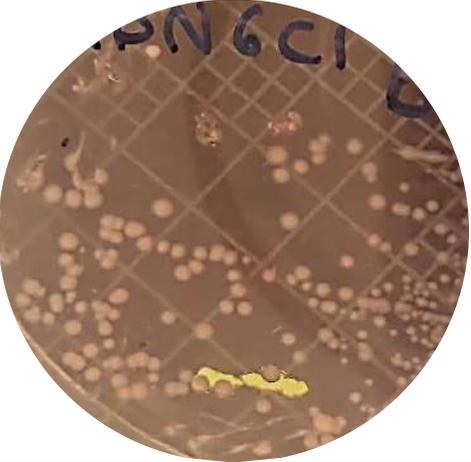
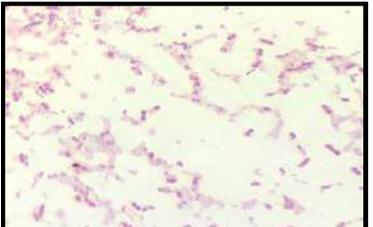
Cepa: PQIA3R1 (aislado de <i>Inga ruiziana</i>)	Macrofotografía
Descripción: <ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Blanco crema Diámetro (mm): 1 - 2 Forma: Irregular Superficie: Lisa brillante Borde: Ondulado Elevación: Convexo Consistencia: Cremoso • Tiempo de aparición: 1 a 3 días (crecimiento rápido) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Rhizobium</i> 	 Microfotografía (Obj. 100 X) 

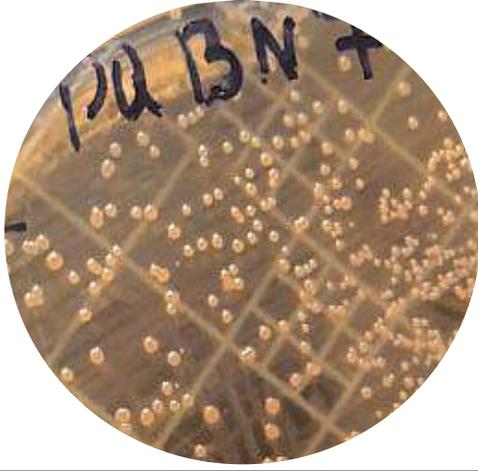
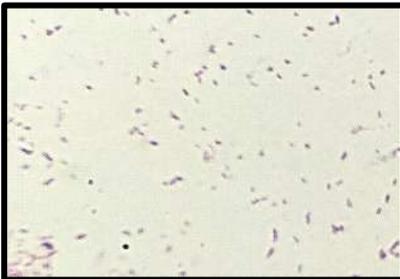
Cepa: PQIA4R1 (aislado de <i>Inga chartacea</i>)	Macrofotografía
Descripción: <ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Blanco crema Diámetro (mm): 0.1 a 0.8 Forma: Circular Superficie: Lisa brillante Borde: Entero Elevación: Convexo Consistencia: Cremoso • Tiempo de aparición: 5 a 7 días (crecimiento lento) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Bradyrhizobium</i> 	 Microfotografía (Obj. 100 X) 

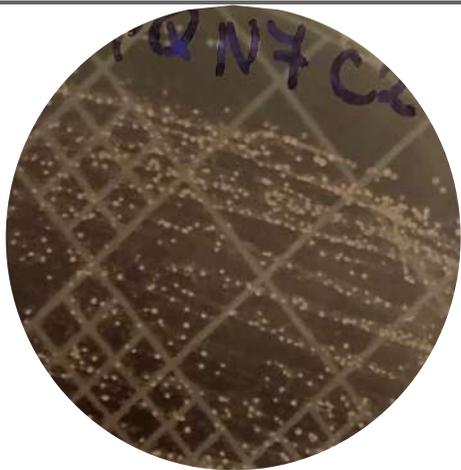
Cepa: PQIA4R2 (aislado de <i>Inga chartacea</i>)	Macrofotografía
<p>Descripción:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Translucido Diámetro (mm): 0.1-5 Forma: Irregular Superficie: Lisa brillante Borde: Ondulado Elevación: Convexo Consistencia: Mucilaginoso • Tiempo de aparición: 1 a 3 días (Crecimiento rápido) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Rhizobium</i> 	 <p>Microfotografía (Obj. 100 X)</p> 

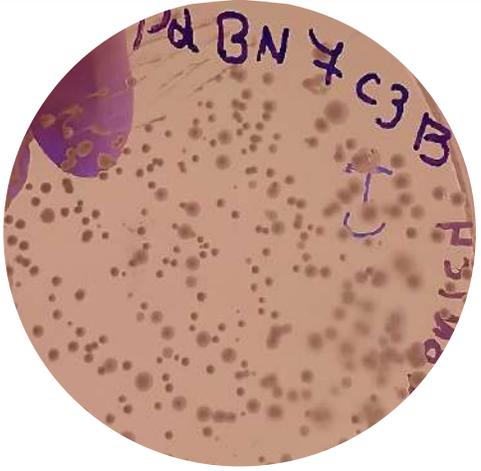
Cepa: PQIA4R4 (aislado de <i>Inga chartacea</i>)	Macrofotografía
<p>Descripción:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Blanco crema Diámetro (mm): 0.8 -2 Forma: irregular Superficie: Lisa brillante Borde: Ondulado Elevación: Convexo Consistencia: Cremoso • Tiempo de aparición: 1 a 3 días (Crecimiento rápido) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Rhizobium</i> • Especie arbórea: <i>Inga chartacea</i> 	 <p>Microfotografía (Obj. 100 X)</p> 

Cepa: PQIA5R1 (aislado de <i>Inga aff. densiflora</i>)	Macrofotografía
<p>Descripción:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Blanco translucido Diámetro (mm): 0.1-0.5 Forma: Circular Superficie: Lisa brillante Borde: Entero Elevación: Convexo Consistencia: Gomoso • Tiempo de aparición: 1 a 3 días (Crecimiento rápido) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Rhizobium</i> 	<div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;"> <p>Microfotografía (Obj. 100 X)</p>  </div>

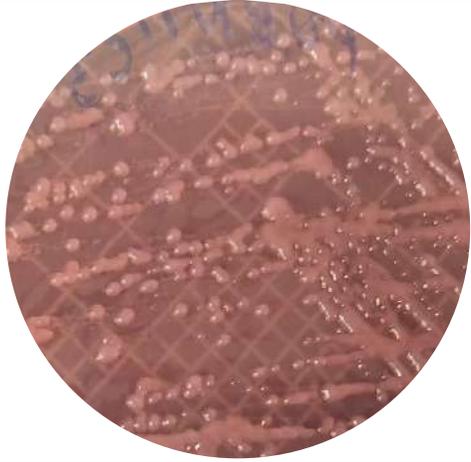
Cepa: PQIA6R1 (aislado de <i>Zygia coccinea</i>)	Macrofotografía
<p>Descripción:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: blanco translucido Diámetro (mm): 0.1-1 Forma: Circular Superficie: Lisa brillante Borde: Entero Elevación: Convexo Consistencia: Cremoso • Tiempo de aparición: 1 a 3 días (Crecimiento rápido) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Rhizobium</i> 	<div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;"> <p>Microfotografía (Obj. 100 X)</p>  </div>

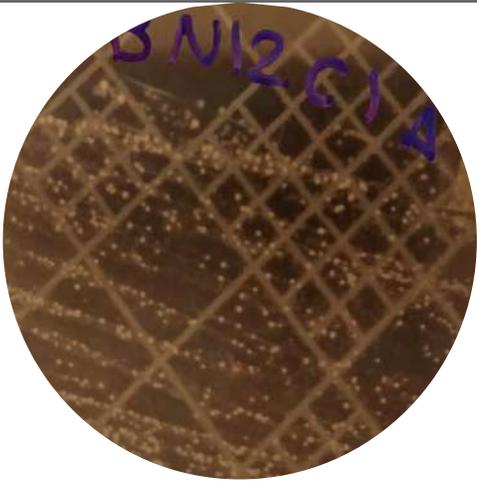
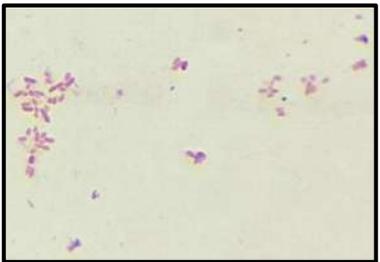
Cepa: PQIA7R1 (aislado de <i>Pseudopiptadenia sp1</i>)	Macrofotografía
Descripción: <ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Blanco crema Diámetro (mm): 0.1-0.5 Forma: Circular Superficie: Lisa brillante Borde: Entero Elevación: Convexo Consistencia: Gomoso • Tiempo de aparición: 5 a 7 días (crecimiento lento) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Bradyrhizobium</i> 	<div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;"> Microfotografía (Obj. 100 X)  </div>

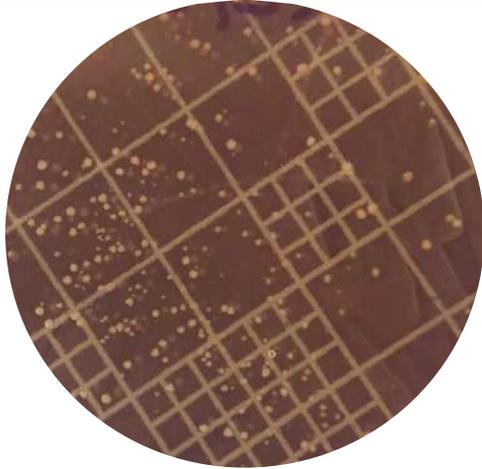
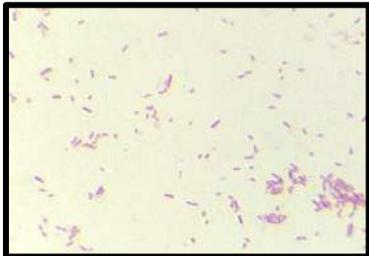
Cepa: PQIA7R2 (aislado de <i>Pseudopiptadenia sp1</i>)	Macrofotografía
Descripción: <ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Blanco translucido Diámetro (mm): 0.1-0.5 Forma: Circular Superficie: Rugosa Borde: Entero Elevación: Convexo Consistencia: Gomoso • Tiempo de aparición: 1 a 3 días (crecimiento rápido) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Rhizobium</i> 	<div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;"> Microfotografía (Obj. 100 X)  </div>

Cepa: PQIA7R3 (aislado de <i>Pseudopiptadenia sp1</i>)	Macrofotografía
Descripción: <ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Blanco translucido Diámetro (mm): 0.01-0.1 Forma: Circular Superficie: Lisa brillante Borde: Entero Elevación: Convexo Consistencia: Acuoso • Tiempo de aparición: 5 a 7 días (crecimiento lento) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Bradyrhizobium</i> 	<div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> Microfotografía (Obj. 100 X)  </div>

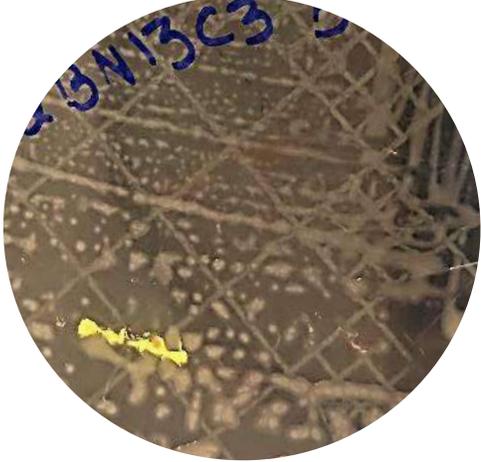
Cepa: PQIA11R2 (aislado de <i>Inga yacoana</i>)	Macrofotografía
Descripción: <ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Blanco crema Diámetro (mm): 0.1-1 Forma: Circular Borde: Entero Superficie: Lisa brillante Elevación: Convexo Consistencia: Cremoso • Tiempo de aparición: 1 a 3 días (crecimiento rápido) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Rhizobium</i> 	<div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> Microfotografía (Obj. 100 X)  </div>

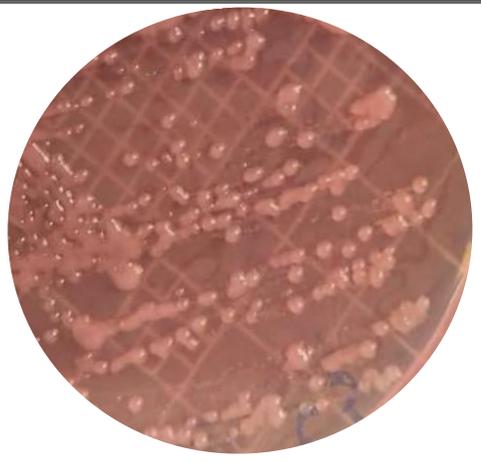
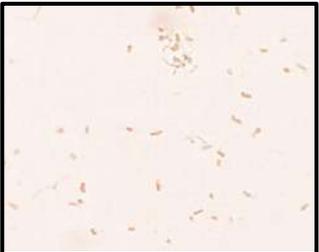
Cepa: PQIA11R3 (aislado de <i>Inga yacoana</i>)	Macrofotografía
<p>Descripción:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Translucido Diámetro (mm): 0.1 -0.7 Forma: Irregular Superficie: Lisa brillante Borde: Ondulado Elevación: Convexo Consistencia: Acuoso • Tiempo de aparición: 1 a 3 días (crecimiento rápido) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Rhizobium</i> 	 <p>Microfotografía (Obj. 100 X)</p> 

Cepa: PQI12R1 (aislado de <i>Zapoteca amazonica</i>)	Macrofotografía
<p>Descripción:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Blanco crema Diámetro (mm): 0.05-0.1 Forma: Irregular Superficie: Lisa brillante Borde: Ondulado Elevación: Convexo Consistencia: Cremoso mucilaginoso • Tiempo de aparición: 5 a 7 días (crecimiento lento) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Bradyrhizobium</i> 	 <p>Microfotografía (Obj. 100 X)</p> 

Cepa: PQI12R3 (aislado de <i>Zapoteca amazonica</i>)	Macrofotografía
<p>Descripción:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Amarillo pálido Diámetro (mm): 0.05 Forma: Circular Superficie: Lisa brillante Borde: Entero Elevación: Convexo Consistencia: Acuoso • Tiempo de aparición: 5 a 7 días (crecimiento lento) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Bradyrhizobium</i> 	 <p>Microfotografía (Obj. 100 X)</p> 

Cepa: PQI13R2 (aislado de <i>Inga aff. densiflora</i>)	Macrofotografía
<p>Descripción:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Blanco opaco Diámetro (mm): 0.1-2 Forma: Irregular Superficie: Lisa brillante Borde: Ondulado Elevación: Convexo Consistencia: Cremoso mucilaginoso • Tiempo de aparición: 1 a 3 días (crecimiento rápido) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Rhizobium</i> 	 <p>Microfotografía (Obj. 100 X)</p> 

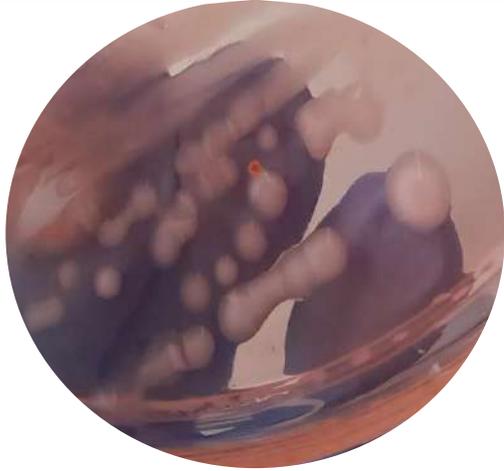
Cepa: PQI13R3 (aislado de <i>Inga aff. densiflora</i>)	Macrofotografía
<p>Descripción:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colonia <ul style="list-style-type: none"> Color: Blanco crema Diámetro (mm): 0.8 - 2 Forma: Irregular Superficie: Lisa brillante Borde: Ondulado Elevación: Convexo Consistencia: Cremoso • Tiempo de aparición: 1 a 3 días (crecimiento rápido) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Rhizobium</i> 	 <p>Microfotografía (Obj. 100 X)</p> 

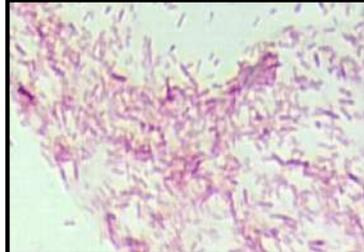
Cepa: PQI15R1 (aislado de <i>Inga aff. densiflora</i>)	Macrofotografía
<p>Descripción:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colonia <ul style="list-style-type: none"> Color: Translucido Diámetro (mm): 0.1-10 Forma: Irregular Superficie: Rugosa Borde: Ondulado Elevación: Convexo Consistencia: Gomoso • Tiempo de aparición: 1 a 3 días (crecimiento rápido) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Rhizobium</i> 	 <p>Microfotografía (Obj. 100 X)</p> 

<p>Cepa: PQIA15R2 (aislado de <i>Inga aff. densiflora</i>)</p>	<p>Macrofotografía</p>
<p>Descripción</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Amarillo pálido Diámetro (mm): 0.05 Forma: Circular Superficie: Lisa brillante Borde: Entero Elevación: Convexo Consistencia: Acuoso • Tiempo de aparición: 5 a 7 días (crecimiento lento) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: bGénero: <i>Bradyrhizobium</i> 	<div data-bbox="943 243 1446 726" data-label="Image"> </div> <p data-bbox="997 737 1393 772">Microfotografía (Obj. 100 X)</p> <div data-bbox="1008 779 1382 1016" data-label="Image"> </div>
<p>Cepa: PQIA15R3 (aislado de <i>Inga aff. densiflora</i>)</p>	<p>Macrofotografía</p>
<p>Descripción</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Amarillo Diámetro (mm): 0.1-10 Forma: Irregular Superficie: Lisa brillante Borde: Lobulado Elevación: Convexo Consistencia: Acuoso Tiempo de aparición: 1 a 3 días (crecimiento rápido) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Rhizobium</i> 	<div data-bbox="954 1073 1435 1549" data-label="Image"> </div> <p data-bbox="997 1560 1393 1596">Microfotografía (Obj. 100 X)</p> <div data-bbox="1000 1602 1390 1860" data-label="Image"> </div>

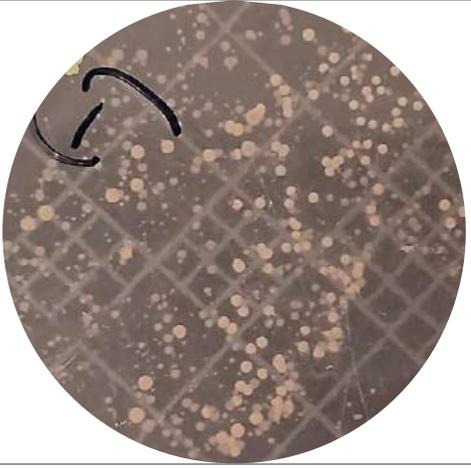
Cepa: PQIA16R1 (aislado de <i>Inga tenuistipula</i>)	Macrofotografía
<p>Descripción</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Blanco translucido Diámetro (mm): 0.1-0.2 Forma: irregular Superficie: Lisa brillante Borde: Entero Elevación: plana Consistencia: Acuoso • Tiempo de aparición: 5 a 7 días (crecimiento lento) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Bradyrhizobium</i> 	<div data-bbox="943 226 1409 709" style="text-align: center;"> </div> <div data-bbox="980 726 1377 760" style="text-align: center;"> <p>Microfotografía (Obj. 100 X)</p> </div> <div data-bbox="992 768 1360 995" style="text-align: center;"> </div>

Cepa: PQIA16R2 (aislado de <i>Inga tenuistipula</i>)	Macrofotografía
<p>Descripción</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Blanco crema Diámetro (mm): 0.1-0.5 Forma: Circular Superficie: Lisa brillante Borde: Entero Elevación: Convexo Consistencia: Cremoso • Tiempo de aparición: 5 a 7 días (crecimiento lento) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Bradyrhizobium</i> 	<div data-bbox="951 1119 1433 1591" style="text-align: center;"> </div> <div data-bbox="995 1608 1391 1642" style="text-align: center;"> <p>Microfotografía (Obj. 100 X)</p> </div> <div data-bbox="1013 1650 1373 1898" style="text-align: center;"> </div>

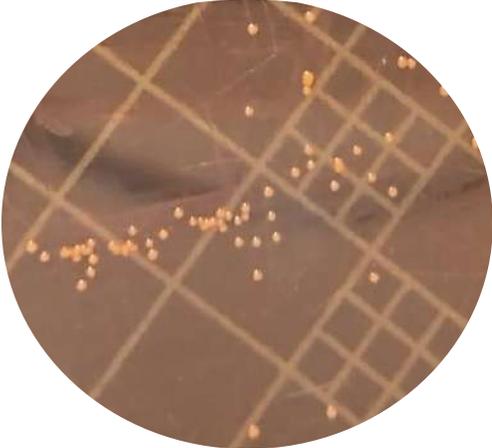
Cepa: PQIA16R3 (aislado de <i>Inga tenuistipula</i>)	Macrofotografía
<p>Descripción</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Blanco crema Diámetro (mm): 2 - 4 Forma: Circular Superficie: Lisa brillante Borde: Entero Elevación: Convexo Consistencia: Cremoso • Tiempo de aparición: 1 a 3 días (crecimiento rápido) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Rhizobium</i> 	 <p>Microfotografía (Obj. 100 X)</p> 

Cepa: PQIA17R1 (aislado de <i>Inga aff. densiflora</i>)	Macrofotografía
<ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Blanco crema Diámetro (mm): 0.5-10 Forma: Irregular Superficie : Rugosa Borde: Ondulado Elevación: Convexo Consistencia: Gomoso • Tiempo de aparición: 1 a 3 días (crecimiento rápido) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: • Género: <i>Rhizobium</i> 	 <p>Microfotografía (Obj. 100 X)</p> 

Cepa: PQIA18R1 (aislado de <i>Inga edulis</i>)	Macrofotografía
<p>Descripción</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Blanco crema Diámetro (mm): 0.05-0.1 Forma: Irregular Superficie: Lisa brillante Borde: Ondulado Elevación: Convexo Consistencia: Cremoso mucilaginoso • Tiempo de aparición: 5 a 7 días (crecimiento lento) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Bradyrhizobium</i> 	 <p>Microfotografía (Obj. 100 X)</p> 

Cepa: PQIA19R2 (aislado de <i>Inga yacoana</i>)	Macrofotografía
<ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Blanco crema Diámetro (mm): 0.05-0.1 Forma: Circular Borde: Entero Superficie: Lisa brillante Elevación: Convexo Consistencia: Acuoso • Tiempo de aparición: 5 a 7 días (crecimiento lento) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Bradyrhizobium</i> 	 <p>Microfotografía (Obj. 100 X)</p> 

Cepa: PQIA20R1 (aislado de <i>Inga aff. cinnamomea</i>)	Macrofotografía
<p>Descripción</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Blanco crema Diámetro (mm): 0.05-0.2 Forma: Circular Superficie: Lisa brillante Borde: Entero Elevación: Convexo Consistencia: Acuoso • Tiempo de aparición: 5 a 7 días (crecimiento lento) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Bradyrhizobium</i> 	<div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;"> Microfotografía (Obj. 100 X)  </div>

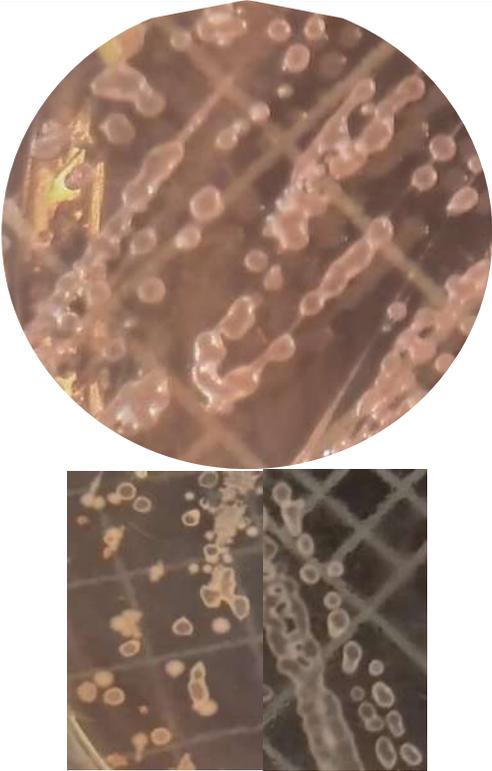
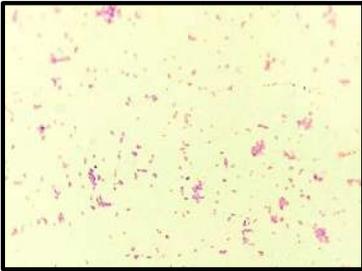
Cepa: PQIA20R2 (aislado de <i>Inga aff. cinnamomea</i>)	Macrofotografía
<ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Blanco crema acuoso Diámetro (mm): 0.05-0.1 Forma: Circular Superficie: Lisa brillante Borde: Entero Elevación: Convexo Consistencia: Acuoso • Tiempo de aparición: 5 a 7 días (crecimiento lento) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Bradyrhizobium</i> 	<div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;"> Microfotografía (Obj. 100 X)  </div>

Cepa: PQIA25R1 (aislado de <i>Inga sp3</i>)	Macrofotografía
<ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Blanco crema Diámetro (mm): 0.05-0.1 Forma: Circular Superficie: Lisa brillante Borde: Entero Elevación: Convexo Consistencia: Acuoso • Tiempo de aparición: 5 a 7 días (crecimiento lento) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Bradyrhizobium</i> 	<div data-bbox="938 226 1435 705" style="text-align: center;"> </div> <div data-bbox="987 709 1386 747" style="text-align: center;"> Microfotografía (Obj. 100 X) </div> <div data-bbox="1010 751 1367 987" style="text-align: center;"> </div>

Cepa: PQIA26R1 (aislado de <i>Zygia coccinea</i>)	Macrofotografía
<ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Amarillo Diámetro (mm): 0.1-0.2 Forma: Circular Superficie: Lisa brillante Borde: Entero Elevación: Convexo Consistencia: Cremoso Tiempo de aparición: 5 a 7 días (crecimiento lento) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Bradyrhizobium</i> 	<div data-bbox="954 1104 1435 1583" style="text-align: center;"> </div> <div data-bbox="993 1587 1393 1625" style="text-align: center;"> Microfotografía (Obj. 100 X) </div> <div data-bbox="1013 1629 1373 1864" style="text-align: center;"> </div>

Cepa: PQIA26R2 (aislado de <i>Zygia coccinea</i>)	Macrofotografía
<ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Blanco crema Diámetro (mm): 0.1-0.5 Forma: Circular Borde: Entero Superficie: Lisa brillante Elevación: Convexo Consistencia: Cremoso • Tiempo de aparición: 5 a 7 días (crecimiento lento) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Bradyrhizobium</i> 	<div data-bbox="954 226 1425 697" style="text-align: center;"> </div> <div data-bbox="990 709 1388 745" style="text-align: center;"> Microfotografía (Obj. 100 X) </div> <div data-bbox="1006 751 1367 987" style="text-align: center;"> </div>

Cepa: PQIA27R1 (aislado de <i>Inga sp3</i>)	Macrofotografía
<p>Descripción</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Blanco translucido Diámetro (mm): 0.1-10 Forma: Irregular Superficie: Lisa brillante Borde: Ondulado Elevación: Convexo Consistencia: Cremoso mucilaginoso • Tiempo de aparición: 1 a 3 días (crecimiento rápido) • Observación Microscópica: Se Presenta como Coco Bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación Taxonómica: Género: <i>Rhizobium</i> 	<div data-bbox="938 1117 1409 1579" style="text-align: center;"> </div> <div data-bbox="977 1591 1375 1627" style="text-align: center;"> Microfotografía (Obj. 100 X) </div> <div data-bbox="987 1633 1367 1866" style="text-align: center;"> </div>

<p>Cepa: PQIA29R1 (aislado de <i>Zapoteca amazonica</i>)</p>	<p>Macrofotografía</p>
<p>Descripción</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Blanco opaco Diámetro (mm): 0.1-0.5 Forma: Dona Superficie: Lisa brillante Borde: Ondulado Elevación: Convexo Consistencia: Cremoso mucilaginoso • Tiempo de aparición: 4-6 días (crecimiento moderado) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Sinorhizobium</i> 	
<p>Cepa: PQIA29R2 (aislado de <i>Zapoteca amazonica</i>)</p>	<p>Macrofotografía</p>
<p>Descripción</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Blanco crema Diámetro (mm): menor a 0.1 – 10 Forma: Irregular Superficie: Lisa brillante Borde: Ondulado Elevación: Convexo Consistencia: Cremoso • Tiempo de aparición: 1 a 3 días (crecimiento rápido) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Rhizobium</i> 	<p>Microfotografía (Obj. 100 X)</p> 

Cepa: PQIA33R1 (aislado de <i>Inga chartacea</i>)	Macrofotografía
<p>Descripción</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colonia Color: Blanco crema Diámetro (mm): 0.05-0.1 Forma: Circular Borde: Entero Superficie: Lisa brillante Elevación: Convexo Consistencia: Acuoso • Tiempo de aparición: 5 a 7 días (crecimiento lento) • Observación microscópica: Se presenta como coco bacilos • Coloración Gram: Gram Negativo • Determinación taxonómica: Género: <i>Bradyrhizobium</i> 	<div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> <p>Microfotografía (Obj. 100 X)</p>  </div>

Tabla N° 15: Resultados de especies arbóreas y rizobios identificados

Resultados de especies arbóreas y rizobios identificados				
Especie arbórea		Rizobios		
Código	Especie	Código	Género	Morfoespecie
PQIA1	<i>Inga nobilis</i>	PQIA1R1	<i>Rhizobium</i>	“ <i>Rhizobium sp6</i> ”
		PQIA1R2	<i>Rhizobium</i>	“ <i>Rhizobium sp10</i> ”
		PQIA1R3	<i>Rhizobium</i>	“ <i>Rhizobium sp1</i> ”
		PQIA1R4	<i>Rhizobium</i>	“ <i>Rhizobium sp2</i> ”
PQIA2	<i>Inga marginata</i>	PQIA2R1	<i>Bradyrhizobium</i>	“ <i>Bradyrhizobium sp5</i> ”
		PQIA2R2	<i>Rhizobium</i>	“ <i>Rhizobium sp12</i> ”
PQIA3	<i>Inga ruiziana</i>	PQIA3R1	<i>Rhizobium</i>	“ <i>Rhizobium sp1</i> ”
PQIA4	<i>Inga chartacea</i>	PQIA4R1	<i>Bradyrhizobium</i>	“ <i>Bradyrhizobium sp2</i> ”
		PQIA4R2	<i>Rhizobium</i>	“ <i>Rhizobium sp10</i> ”
		PQIA4R4	<i>Rhizobium</i>	“ <i>Rhizobium sp1</i> ”
PQIA5	<i>Inga aff. densiflora</i>	PQIA5R1	<i>Rhizobium</i>	“ <i>Rhizobium sp7</i> ”
PQIA6	<i>Zygia coccinea</i>	PQIA6R1	<i>Rhizobium</i>	“ <i>Rhizobium sp5</i> ”
PQIA7	<i>Pseudopiptadenia sp1</i>	PQIA7R1	<i>Bradyrhizobium</i>	“ <i>Bradyrhizobium sp4</i> ”
		PQIA7R2	<i>Rhizobium</i>	“ <i>Rhizobium sp8</i> ”
		PQIA7R3	<i>Bradyrhizobium</i>	“ <i>Bradyrhizobium sp5</i> ”
PQIA11	<i>Inga macrophylla</i>	PQIA11R2	<i>Rhizobium</i>	“ <i>Rhizobium sp5</i> ”
		PQIA11R3	<i>Rhizobium</i>	“ <i>Rhizobium sp11</i> ”
PQIA12	<i>Inga sp1</i>	PQIA12R1	<i>Bradyrhizobium</i>	“ <i>Bradyrhizobium sp3</i> ”
		PQIA12R3	<i>Bradyrhizobium</i>	“ <i>Bradyrhizobium sp8</i> ”
PQIA13	<i>Inga yacoana</i>	PQIA13R2	<i>Rhizobium</i>	“ <i>Rhizobium sp13</i> ”
		PQIA13R3	<i>Rhizobium</i>	“ <i>Rhizobium sp1</i> ”
PQIA15	<i>Inga aff. densiflora</i>	PQIA15R1	<i>Rhizobium</i>	“ <i>Rhizobium sp9</i> ”
		PQIA15R2	<i>Bradyrhizobium</i>	“ <i>Bradyrhizobium sp8</i> ”
		PQIA15R3	<i>Rhizobium</i>	“ <i>Rhizobium sp8</i> ”
PQIA16	<i>Inga yacoana</i>	PQIA16R1	<i>Bradyrhizobium</i>	“ <i>Bradyrhizobium sp6</i> ”
		PQIA16R2	<i>Bradyrhizobium</i>	“ <i>Bradyrhizobium sp2</i> ”
		PQIA16R3	<i>Rhizobium</i>	“ <i>Rhizobium sp5</i> ”
PQIA17	<i>Inga aff. densiflora.</i>	PQIA17R1	<i>Rhizobium</i>	“ <i>Rhizobium sp3</i> ”
PQIA18	<i>Inga tenuistipula</i>	PQIA18R1	<i>Bradyrhizobium</i>	“ <i>Bradyrhizobium sp3</i> ”

PQIA19	<i>Inga aff. densiflora.</i>	PQIA19R2	<i>Bradyrhizobium</i>	" <i>Bradyrhizobium sp1</i> "
PQIA20	<i>Inga edulis.</i>	PQIA20R1	<i>Bradyrhizobium</i>	" <i>Bradyrhizobium sp1</i> "
		PQIA20R2	<i>Bradyrhizobium</i>	" <i>Bradyrhizobium sp1</i> "
PQIA25	<i>Zygia coccinea</i>	PQIA25R1	<i>Bradyrhizobium</i>	" <i>Bradyrhizobium sp1</i> "
PQIA26	<i>Inga chartacea</i>	PQIA26R1	<i>Bradyrhizobium</i>	" <i>Bradyrhizobium sp7</i> "
		PQIA26R2	<i>Bradyrhizobium</i>	" <i>Bradyrhizobium sp2</i> "
PQIA27	<i>Inga sp2</i>	PQIA27R1	<i>Rhizobium</i>	" <i>Rhizobium sp6</i> "
PQIA29	<i>Inga sp3</i>	PQIA29R1	<i>Sinorhizobium</i>	" <i>Sinorhizobium sp1</i> "
		PQIA29R2	<i>Rhizobium</i>	" <i>Rhizobium sp4</i> "
PQIA33	<i>Zygia coccinea</i>	PQIA33R1	<i>Bradyrhizobium</i>	" <i>Bradyrhizobium sp1</i> "

Fuente: Elaboración propia

**SERFOR**

Firmado digitalmente por ARELLANO
OLANO Williams FAU 20562836927
soft
Cargo: Director
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 11.10.2024 15:22:25 -05:00

RESOLUCIÓN DIRECTORAL

Magdalena Del Mar, 11 de Octubre del 2024

RD N° D000156-2024-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS-DGSPF

VISTOS:

La carta s/n, registrada con número de expediente 2024-0034884 (2024-0034842, 2024-0041230, 2024-0044614), de fecha 24 de julio de 2024, conteniendo la solicitud de autorización con fines de investigación científica de flora silvestre, fuera de áreas naturales protegidas (ANP), presentada por la señora **YESENIA KATERIN PERCCA LIPE**¹ (en adelante, la administrada), identificada con DNI N° 70420462, así como, el Informe Técnico N° D000045-2024-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS-DGSPF-ICV de fecha 11 de octubre de 2024, y;

CONSIDERANDO:

Que, el artículo 66° de la Constitución Política del Perú de 1993 establece que los recursos naturales, renovables y no renovables, son patrimonio de la Nación; y el Estado es soberano en su aprovechamiento;

Que, el artículo 9° de la Ley N° 26821, Ley Orgánica para el aprovechamiento sostenible de los Recursos Naturales, establece que el Estado promueve la investigación científica y tecnológica sobre la diversidad, calidad, composición, potencialidad y gestión de los recursos naturales. Promueve, asimismo, la información y el conocimiento de los recursos naturales. Para estos efectos, podrán otorgarse permisos para investigación;

Que, mediante el artículo 13° de la Ley N° 29763, Ley Forestal y de Fauna Silvestre, se creó el Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre - SERFOR, como un organismo público técnico especializado con personería jurídica de derecho público interno, como pliego presupuestal adscrito al Ministerio de Agricultura, actualmente el Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego; artículo en el que además se señala que el SERFOR es la autoridad nacional forestal y de fauna silvestre, ente rector del Sistema Nacional de Gestión Forestal y de Fauna Silvestre, constituyendo su autoridad técnico normativa a nivel nacional, encargada de dictar las normas y establecer los procedimientos relacionados a su ámbito;

Que, el artículo 137° de la precitada Ley N° 29763, Ley Forestal y de Fauna Silvestre, declara de interés nacional realizar la investigación, el desarrollo tecnológico, la mejora del conocimiento y el monitoreo del estado de conservación del patrimonio forestal y de fauna silvestre de la Nación;

Que, según lo dispuesto por el artículo 140° de la Ley en mención, señala que el SERFOR evalúa y otorga la autorización para extracción de recursos forestales y de fauna silvestre con fines de investigación científica cuando: (i) se incluye especies

¹ Tesista de Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC)



RESOLUCIÓN DIRECTORAL

amenazadas^{2,3}, (ii) especies consideradas en los Apéndices de CITES⁴, (iii) se realiza acceso a recursos genéticos sin fines de lucro; y (iv) propósitos culturales. Asimismo, en el citado artículo de la Ley indica que la colecta o extracción de recursos forestales y de fauna silvestre con fines de investigación orientada a determinación de genotipo, filogenia, sistemática y biogeografía es autorizada siguiendo procedimientos simplificados establecidos por el SERFOR;

Que, mediante el artículo 1° de la Resolución de Dirección General N° D000627-2021-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS, de fecha 15 de noviembre de 2021, la Dirección General de Gestión Sostenible del Patrimonio Forestal y de Fauna Silvestre (DGGSPFFS) del SERFOR resolvió delegar en la Dirección de Gestión Sostenible del Patrimonio Forestal (DGSPF), las funciones de otorgar permisos de investigación o de difusión cultural con o sin colecta de flora silvestre y sus recursos genéticos, contenida en el literal g) del artículo 53° del Reglamento de Organización y Funciones del SERFOR, aprobado por Decreto Supremo N° 007-2013-MINAGRI y modificado por Decreto Supremo N° 016-2014-MINAGRI; delegación efectuada en aplicación del numeral 78.1 del artículo 78° del Texto Único Ordenado - TUO de la Ley N° 27444, Ley del Procedimiento Administrativo General, aprobado por Decreto Supremo N° 004-2019-JUS;

Que, a través del Decreto Supremo N° 018-2015-MINAGRI, que aprueba el Reglamento para la Gestión Forestal, en el artículo 154°, señala que regula el procedimiento de otorgamiento de autorizaciones con fines de investigación científica, señalando que la investigación del Patrimonio Forestal, se aprueban mediante autorizaciones, salvaguardando los derechos del país respecto a su patrimonio genético nativo; y establece para tal efecto los requisitos y consideraciones para su otorgamiento, de acuerdo con los lineamientos aprobados por el SERFOR, concordante con el numeral 5.3.2 de los lineamientos aprobados por Resolución de Dirección Ejecutiva N° 060-2016-SERFOR/DE; así como, las obligaciones materia de cumplimiento por parte del titular de la autorización;

Que, mediante la Cuarta Disposición Complementaria Transitoria del Decreto Legislativo N° 1497, publicado el 10 de mayo de 2020, se dispuso la suspensión hasta el 31 de diciembre de 2020, de la aplicación del numeral 134.3 del artículo 134° del Texto Único Ordenado - TUO de la Ley N° 27444, Ley del Procedimiento Administrativo General, aprobado por Decreto Supremo N° 004-2019-JUS, respecto a la obligación de la presentación física del escrito o documentación por parte de los administrados; suspensión que mediante Decreto Supremo N° 187-2021-PCM, fue prorrogada hasta el 31 de diciembre de 2024;

Que, en ese contexto mediante carta s/n, registrada con expedientes 2024-0034884 y 2024-0034842, de fecha 24 de julio de 2024, la administrada solicitó a la Dirección de Gestión Sostenible del Patrimonio Forestal (DGSPF), la autorización con fines de investigación científica de flora silvestre, fuera de áreas naturales protegidas (ANP), para desarrollar el proyecto titulado **Caracterización fenotípica y selección de bioinoculantes de bacterias nitrificantes de la sub familia Caesalpinioideae del Pongo de Qoñec, Valle de Kosñipata, Cusco**;

² Decreto Supremo N° 043-2006-AG. Aprueban categorización de especies amenazadas de flora silvestre.

³ Decreto Supremo N° 004-2014-MINAGRI. Actualización de la lista de clasificación y categorización de las especies amenazadas de fauna silvestre.

⁴ Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres.



RESOLUCIÓN DIRECTORAL

Que, en el actual Texto Único de Procedimientos Administrativos - TUPA del SERFOR, aprobado por Decreto Supremo N° 001-2016-MINAGRI y modificado por Resolución Ministerial N° 613-2016-MINAGRI, Resolución Ministerial N° 026-2019-MINAGRI, Resolución de Dirección Ejecutiva N° D000103-2020-MINAGRI-SERFOR-DE y Resolución de Dirección Ejecutiva N° D000099-2021-MIDAGRI-SERFOR-DE; no se contempla el procedimiento de autorización para realizar investigación científica fuera de ANP;

Que, en observancia del principio de impulso de oficio, el cual se encuentra previsto en el numeral 1.3 del artículo IV del Título Preliminar del Texto Único Ordenado - TUO de la Ley N° 27444, Ley del Procedimiento Administrativo General, aprobado por Decreto Supremo N° 004-2019-JUS; se desprende que las autoridades deben dirigir e impulsar de oficio el procedimiento y ordenar la realización o práctica de los actos que resulten convenientes para el esclarecimiento y resolución de las cuestiones necesarias;

Que, de acuerdo con el artículo 140° de la Ley Forestal y de Fauna Silvestre, Ley N° 29763, es competencia del SERFOR la evaluación de la presente solicitud, puesto que la investigación se desarrollará fuera de áreas naturales protegidas e involucrará el estudio de especies de flora silvestre de la subfamilia Caesalpinioideae que posiblemente se encuentren amenazadas según Decreto Supremo N° 043-2006-AG;

Que, por tanto, en ese sentido, la solicitud en evaluación aplica lo dispuesto en el numeral 9 del ANEXO N° 1 del Reglamento para la Gestión Forestal, establece los requisitos para la solicitud de autorizaciones con fines de investigación de flora silvestre; en concordancia con el numeral 6.6 de los lineamientos aprobados por Resolución de Dirección Ejecutiva N° 060-2016-SERFOR/DE, señalan los siguientes requisitos para la autorización con fines de investigación científica fuera de ANP: i) Solicitud con carácter de declaración jurada que contenga información sobre el investigador, según formato; ii) Hoja de vida del investigador principal y plan de investigación, según formato; iii) Carta de presentación de los investigadores participantes, emitida por la institución académica u organización científica nacional o extranjera de procedencia; iv) Documento que acredite el consentimiento informado previo, expedido por la respectiva organización comunal representativa, de corresponder; y v) Documento que acredite el acuerdo entre las instituciones que respaldan a los investigadores nacionales y extranjeros, en caso la solicitud sea presentada por un investigador extranjero;

Que, como parte de la evaluación se encontraron observaciones referidas al plan de investigación, las cuales fueron remitidas por la DGSPF a la dirección electrónica autorizada por la administrada en la solicitud remitida (134112@unsaac.edu.pe) a través de la Carta N° D000687-2024-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS-DGSPF, notificada el 22 de agosto de 2024. La administrada remitió el levantamiento de observaciones mediante carta s/n, registrada con expediente N° 2024-0041230, de fecha 29 de agosto de 2024, para su evaluación correspondiente, evidenciándose que las observaciones no fueron absueltas satisfactoriamente, siendo comunicada a través de la Carta N° D000705-2024-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS-DGSPF, notificada el 4 de septiembre de 2024;

Que, mediante carta s/n, registrada con expediente 2024-0044614, de fecha 17 de septiembre de 2024, la administrada remitió a la DGSPF el levantamiento de observaciones recaídas para su evaluación correspondiente, con lo cual subsana las observaciones efectuadas por esta Dirección;



RESOLUCIÓN DIRECTORAL

Que, en ese sentido, la Dirección de Gestión Sostenible del Patrimonio Forestal a través del Informe Técnico N° D000045-2024-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS-DGSPF-ICV, emitido de fecha 11 de octubre de 2024; concluye que, la solicitud de investigación científica cumple con los requisitos establecidos en el numeral 9 del Anexo N° 1 del Reglamento para la Gestión Forestal y con los *Lineamientos para el otorgamiento de la autorización con fines de investigación científica de flora y/o fauna silvestre*, aprobado mediante Resolución de Dirección Ejecutiva N° 060-2016-SERFOR/DE; así como, las condiciones mínimas y los criterios técnicos para su ejecución, considerándose procedente el plazo propuesto para el desarrollo de las actividades con fines de investigación de flora silvestre, esto es, por el periodo de tres (3) meses;

Que, asimismo, a través de dicho Informe Técnico, se recomienda la emisión del acto administrativo que aprueba la solicitud de investigación científica de flora silvestre, fuera de ANP, para el desarrollo del proyecto titulado **Caracterización fenotípica y selección de bioinoculantes de bacterias nitrificantes de la sub familia Caesalpinioideae del Pongo de Qoñec, Valle de Kosñipata, Cusco**;

Que, finalmente, en dicho informe se señala que la presente investigación permitirá caracterizar las bacterias nitrificantes que viven en simbiosis con especies arbóreas de la subfamilia Caesalpinioideae, así como determinará las cepas aisladas que presenten potencial bioinoculante, lo cual contribuirá con información para estudios futuros en la generación de alternativas y soluciones sobre la degradación del suelo;

Que, por otro lado, el artículo 158° del Reglamento para la Gestión Forestal, aprobado mediante Decreto Supremo N° 018-2015-MINAGRI, establece como obligaciones del investigador en flora silvestre que son las siguientes:

- a. No extraer especímenes, ni muestras biológicas, de flora silvestre no autorizadas; no ceder los mismos a terceras personas, ni utilizarlos para fines distintos a lo autorizado.*
- b. Entregar al SERFOR un informe final en idioma español y en versión digital, como resultado de la autorización otorgada, así como copia de las publicaciones producto de la investigación realizada, e indicar el número de la Autorización en las publicaciones generadas. Esta información es ingresada al SNIFFS.*
- c. Solicitar el correspondiente permiso de exportación ante el SERFOR a través de la Ventanilla Única de Comercio Exterior - VUCE, así como pasar el control respectivo, en caso se requiera enviar al extranjero parte del material colectado, por razones científicas acotadas. Los ejemplares únicos de los grupos taxonómicos colectados y holotipos solo podrán ser exportados en calidad de préstamo.*

Que, asimismo, en el marco de la autorización otorgada, la administrada considerará los siguientes compromisos:

- a. Comunicar con la debida anticipación a la Administración Técnica Forestal y de Fauna Silvestre Cusco del SERFOR y a la jefatura de la Reserva Comunal Amarakaeri, el ingreso y salida a campo.*
- b. Indicar el número de la resolución en las publicaciones generadas a partir de la autorización concedida.*



RESOLUCIÓN DIRECTORAL

- c. *Solicitar anticipadamente ante la Dirección de Gestión Sostenible del Patrimonio Forestal del SERFOR y dentro del periodo del cronograma de trabajo del plan de investigación, cualquier cambio en las características del estudio aprobado (por ejemplo, cronograma, inclusión de especialistas, etc.), que demande la modificación de la presente resolución.*
- d. *En caso sobrevenga algún hecho o evento que imposibilite la ejecución de la investigación autorizada o que origine que no se pueda continuar con el desarrollo de la misma, corresponde a la administrada solicitar por escrito ante la Dirección de Gestión Sostenible del Patrimonio Forestal del SERFOR, la renuncia a la autorización otorgada; renuncia que deberá ser solicitada dentro del plazo de vigencia de la autorización, precisándose el hecho o evento que origina la imposibilidad de ejecutar o de continuar ejecutando la investigación aprobada, debiendo además la administrada adjuntar la documentación de sustento que estime necesaria, de ser el caso.*

Que, por otro lado, el artículo 100° del Reglamento para la Gestión Forestal y de Fauna Silvestre en Comunidades Nativas y Comunidades Campesinas, señala lo siguiente:

“Investigaciones científicas realizadas dentro de las tierras de comunidades campesinas y comunidades nativas

Toda investigación científica en materia forestal y de fauna silvestre a realizarse dentro de tierras de comunidades campesinas o comunidades nativas, requiere de la autorización expresa de la comunidad y autorización otorgada por la autoridad correspondiente. (...).”

Que, en adición a ello, debemos precisar que, la presente autorización no habilita el ingreso a predios privados, áreas de conservación privada (ACP), áreas de conservación regional (ACR) y títulos habilitantes en cuyos casos, deberán gestionar la autorización de ingreso correspondiente ante la autoridad o titular del área, según corresponda;

Que, en ese sentido, en caso la ejecución de la investigación comprenda el ingreso a territorios de Comunidades Campesinas o Comunidades Nativas, previamente deberá solicitarse la autorización correspondiente;

Que, en conformidad con la Ley Forestal y de Fauna Silvestre, aprobada por Ley N° 29763; el Reglamento para la Gestión Forestal, aprobado mediante Decreto Supremo N° 018-2015-MINAGRI; el Decreto Supremo N° 004-2019-JUS que aprueba el Texto Único Ordenado de la Ley N° 27444 Ley del Procedimiento Administrativo General; el literal g) del Artículo 53° del Reglamento de Organización y Funciones aprobado por Decreto Supremo N° 007-2013-MINAGRI, y su modificatoria mediante Decreto Supremo N° 014-2016-MINAGRI; la Resolución de Dirección Ejecutiva N° 060-2016-SERFOR/DE; así como, en ejercicio de la función delegada a través del artículo 1 de la Resolución de Dirección General N° D000627-2021-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS;



RESOLUCIÓN DIRECTORAL

SE RESUELVE:

Artículo 1.- OTORGAR la autorización con fines de investigación científica de flora silvestre, fuera de áreas naturales protegidas (ANP), a favor de la señora **Yesenia Katerin Percca Lipe**, identificada con DNI N° 70420462, correspondiéndole el Código de Autorización N° **AUT-IFL-2024-075**; a efectos de desarrollar el proyecto titulado **Caracterización fenotípica y selección de bioinoculantes de bacterias nitrificantes de la sub familia Caesalpinioideae del Pongo de Qoñec, Valle de Kosñipata, Cusco**; a realizarse en el distrito de Kosñipata, provincia de Paucartambo, departamento de Cusco, en conformidad con lo señalado en la Tabla N° 1 del **Anexo 1** cuya vigencia se contabilizará desde la fecha de emisión de la presente resolución⁵.

Artículo 2.- Autorizar la participación de los investigadores señalados por la administrada, conforme con lo indicado en la Tabla N° 2 del **Anexo 2** de la presente resolución.

Artículo 3.- El ingreso y desarrollo de las actividades de investigación científica que se realicen dentro de títulos habilitantes que abarque el ámbito de estudio, deberán ser autorizadas previamente por el titular y/o autoridad correspondiente, por lo que es responsabilidad de la administrada obtener la autorización de ingreso respectiva, antes de la ejecución de la presente investigación.

Artículo 4.- La administrada se encuentra sujeta al cumplimiento de lo presentado en el plan de investigación y al plazo correspondiente a tres (3) meses, así como la colecta de material biológico de la subfamilia Caesalpinioideae y nódulos radiculares asociados a los árboles de esta subfamilia, de acuerdo con lo señalado en la Tabla N° 3 del **Anexo 3**. Los ejemplares de flora silvestre serán depositados en el Herbario Vargas (CUZ) de la Escuela Profesional de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, el cual está registrado como una de las Instituciones Científicas Nacionales Depositarias de Material Biológico (ICNDBM) ante el SERFOR. Asimismo, deberán cumplir con las obligaciones establecidas en la legislación forestal y de fauna silvestre, según lo señalado en la parte considerativa de la presente resolución.

Artículo 5.- La presentación del Informe Final, en versión digital como resultado de la autorización otorgada, se realizará de acuerdo con los términos señalados en el **Anexo 4** de la presente resolución, y deberá ser presentado dentro de los noventa (90) días calendarios posteriores a la culminación de la investigación.

Artículo 6.- La presente autorización no limita el ejercicio de las funciones y/o requisitos de las entidades, en los ámbitos en los que se realice la investigación (ARFFS, ACR, ACP y otros).

Artículo 7.- Toda modificación en el desarrollo de la investigación será comunicada al SERFOR dentro del plazo de vigencia de la presente resolución.

⁵ Decreto Supremo N° 004-2019-JUS. Texto Único Ordenado de la Ley 27444 "Ley del Procedimiento Administrativo General"

Artículo 16. El acto administrativo que otorga beneficio al administrado se entiende eficaz desde la fecha de su emisión, salvo disposición diferente del mismo acto.



RESOLUCIÓN DIRECTORAL

Artículo 8.- La presente autorización no habilita la exportación de muestras biológicas, en caso se requiera realizar esta actividad, la administrada y los investigadores identificados en la presente resolución, podrán gestionar el correspondiente Permiso de Exportación ante la Dirección General de Gestión Sostenible del Patrimonio Forestal y de Fauna Silvestre del SERFOR.

Artículo 9.- La contravención a las obligaciones y/o condiciones establecidas en la presente resolución conllevará a la comisión de las infracciones tipificadas en el numeral 5) del Anexo 1 del Cuadro de Infracciones y Sanciones en materia forestal, aprobado mediante Decreto Supremo N° 007-2021-MIDAGRI.

Artículo 10- Notificar la presente resolución directoral a la señora Yesenia Katerin Percca Lipe, a efectos de que tome conocimiento de su contenido. Contra la presente Resolución es posible la interposición de los recursos impugnativos contemplados en el Texto Único Ordenado de la Ley N° 27444, Ley del Procedimiento Administrativo General, aprobado mediante Decreto Supremo N° 004-2019-JUS, dentro del plazo de quince (15) días hábiles más el término de la distancia en caso corresponda, contados a partir del día siguiente de notificada la misma.

Artículo 11.- Remitir la presente resolución directoral a la Dirección de Control de la Gestión del Patrimonio Forestal y de Fauna Silvestre y a la Administración Técnica Forestal y de Fauna Silvestre Cusco del SERFOR, así como a la jefatura de la Reserva Comunal Amarakaeri, para su conocimiento y fines pertinentes; asimismo, la Dirección de Gestión Sostenible del Patrimonio Forestal deberá cargar la presente resolución en el Directorio de la Dirección de Información y Registro.

Artículo 12.- Disponer la publicación de la presente resolución en el portal web del SERFOR: www.gob.pe/serfor

Regístrese y comuníquese,

Documento Firmado Digitalmente

WILLIAMS ARELLANO OLANO

Director

Dirección de Gestión Sostenible del
Patrimonio Forestal

Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre - SERFOR



RESOLUCIÓN DIRECTORAL

ANEXO 1

Tabla N° 1. Coordenadas UTM referenciales de los vértices del área de estudio para el desarrollo de la investigación

Departamento	Provincia	Distrito	Coordenadas UTM - Datum WGS84				Detalle de Superposición
			Vértices	Zona	Este	Norte	
Cusco	Paucartambo	Koñispata	1	19	242630.111	8572770.736	ZA Reserva Comunal Amarakaeri, título habilitante
			2	19	242700.213	8572680.701	
			3	19	242750.323	8572730.812	
			4	19	242690.323	8572830.622	

Leyenda. ZA: Zona de amortiguamiento



RESOLUCIÓN DIRECTORAL

ANEXO 2

Tabla N° 2. Datos de los investigadores que participarán en la presente investigación

Nombres y Apellidos	Nacionalidad	Documento de identidad	Participación en el proyecto	Institución de procedencia
Yesenia Katerin Percca Lipe	Peruana	DNI N° 70420462	Investigadora principal-tesista	Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco
Wendina Yoshin Colque Pineda	Peruana	DNI N° 73763120	Colaboradora	
Heldy Yiyi Espinoza Carrasco	Peruana	DNI N° 23826797	Asesora de tesis	
Isau Huamantupa Chuquimaco	Peruana	DNI N° 42341964	Co-asesor	Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios



RESOLUCIÓN DIRECTORAL

ANEXO 3

Tabla N° 3. Lista de muestras de flora silvestre de la subfamilia Caesalpinioideae y nódulos radiculares asociados a estas para ser colectadas durante el desarrollo de la investigación

Subfamilia	Tipo de muestra	Cantidad de muestras	Finalidad de la colecta
Caesalpinioideae (familia Fabaceae)	Ejemplares con estructuras vegetativas y reproductivas	03 ejemplares por especie por ámbito de estudio	Determinación taxonómica y depósito en herbario
-	Nódulos radiculares asociados a las especies de árboles de la subfamilia Caesalpinioideae	04 nódulos radiculares por especie arbórea por ámbito de estudio	Estudio de relación de simbiosis existentes entre microorganismos de flora silvestres y las especies arbóreas de la subfamilia



RESOLUCIÓN DIRECTORAL

ANEXO 4

FORMATO DE INFORME FINAL

Como parte del cumplimiento de obligaciones adquiridas en el marco de la autorización de investigación científica de flora y/o fauna silvestre, fuera de áreas naturales protegidas, el(la) administrado(a) deberá presentar la siguiente información:

- a. Indicar el número de la Resolución Directoral que autorizó la investigación y el(los) número(s) de resolución de modificación, de corresponder. Tener en cuenta que el título del proyecto debe coincidir con la autorización otorgada.
- b. Resumen para ser publicado en la web del SERFOR (donde se deberá señalar los resultados y la relevancia del estudio, entre otros, de forma sintetizada respecto de lo encontrado en la investigación realizada, hasta 3000 caracteres o 500 palabras). Se adjunta un modelo en el siguiente enlace: https://drive.google.com/drive/folders/1E0Y-u0UdEjwy1p76GhhiKC7AaOTYPwyH?usp=drive_link
- c. Resultados (Se debe indicar los resultados más relevantes tomando en cuenta los objetivos planteados para la investigación).
- d. Conclusiones (En esta sección se deberá incorporar los enunciados generados producto del análisis de resultados, los cuales responderán las interrogantes u objetivos planteados).
- e. **Anexos**
 - ✓ Adjuntar la(s) copia(s) de las(s) constancia(s) de depósito del material biológico⁶, en caso de haber realizado colectas. La(s) constancia(s) deberá(n) ser emitida(s) por una institución científica nacional depositaria de material biológico-ICNDMB, registrada por el SERFOR. Si desea visualizar el registro de ICNDMB autorizadas, puede ingresar al siguiente enlace: <https://sniffs.serfor.gob.pe/estadistica/es/tableros/recursos-geneticos/instituciones-cientificas-nacionales-depositarias-de-material-biologico>
 - ✓ Material fotográfico, en formato original. Se resguardará los derechos de autor.
 - ✓ Adjuntar las autorizaciones de ingreso a territorios comunales, ACR, ACP, títulos habilitantes, predios rurales cuando corresponda.
 - ✓ Listado taxonómico de las especies de flora y/o fauna silvestre objeto de investigación (colectadas, capturas temporalmente, registros mediante registros directos e indirectos, etc.), de acuerdo con el formato indicado en el siguiente enlace: https://drive.google.com/drive/folders/1E0Y-u0UdEjwy1p76GhhiKC7AaOTYPwyH?usp=drive_link
 - ✓ En caso de no haber realizado colectas, remitir la información del ámbito de estudio, de acuerdo con el formato indicado en el siguiente enlace: https://drive.google.com/drive/folders/1E0Y-u0UdEjwy1p76GhhiKC7AaOTYPwyH?usp=drive_link
 - ✓ Entregar la(s) publicación(es), producto de la investigación realizada en formato digital, (se podrá adjuntar el enlace de acceso al artículo, DOI, etc.) o de lo contrario señalar que no cuenta con publicación. En caso de contar con publicación de tesis de pre o posgrado, indicar el enlace del repositorio en donde se encuentra depositado.

Dicha información podrá ser entregada en formato digital a través de la Mesa de Partes Virtual (<https://apps.serfor.gob.pe/mesadepartesvirtual/#/>) o físico en formato impreso en mesa de partes presencial del SERFOR (Av. Javier Prado Oeste 2442, Magdalena del Mar).

⁶ Artículo 155 y el Artículo 135 del Reglamento para la Gestión Forestal y el Reglamento para la Gestión de Fauna Silvestre, aprobados con Decreto Supremo N° 018-2015-MINAGRI y Decreto Supremo N° 019-2015-MINAGRI, respectivamente; señalan que el material biológico colectado debe ser depositado en Instituciones Científicas Nacionales registradas ante el SERFOR.