

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO DEL GÉNERO *Bacillus* EN SUELOS DE LA PROVINCIA DE EL COLLAO (PUNO) Y SU EFECTO EN LA GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd.) EN CONDICIONES DE INVERNADERO.

**TESIS**

PRESENTADA POR:

**Br. MARITZA YOLANDA LLANOS MACHACA**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PUNO – PERÚ

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO DEL GÉNERO *Bacillus* EN SUELOS DE LA PROVINCIA DE EL COLLAO (PUNO) Y SU EFECTO EN LA GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd.) EN CONDICIONES DE INVERNADERO.

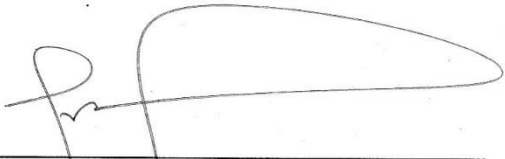
TESIS

PRESENTADA POR:

Br. MARITZA YOLANDA LLANOS MACHACA  
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
LICENCIADO EN BIOLOGIA

APROBADA POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:

PRESIDENTE

  
: M.Sc. Alfredo Ludwig Loza del Carpio

PRIMER MIEMBRO

  
: Mg. Dante Mamani Sairitupac

SEGUNDO MIEMBRO

  
: M.Sc. Maria Elena Suaña Quispe

DIRECTOR/ASESOR

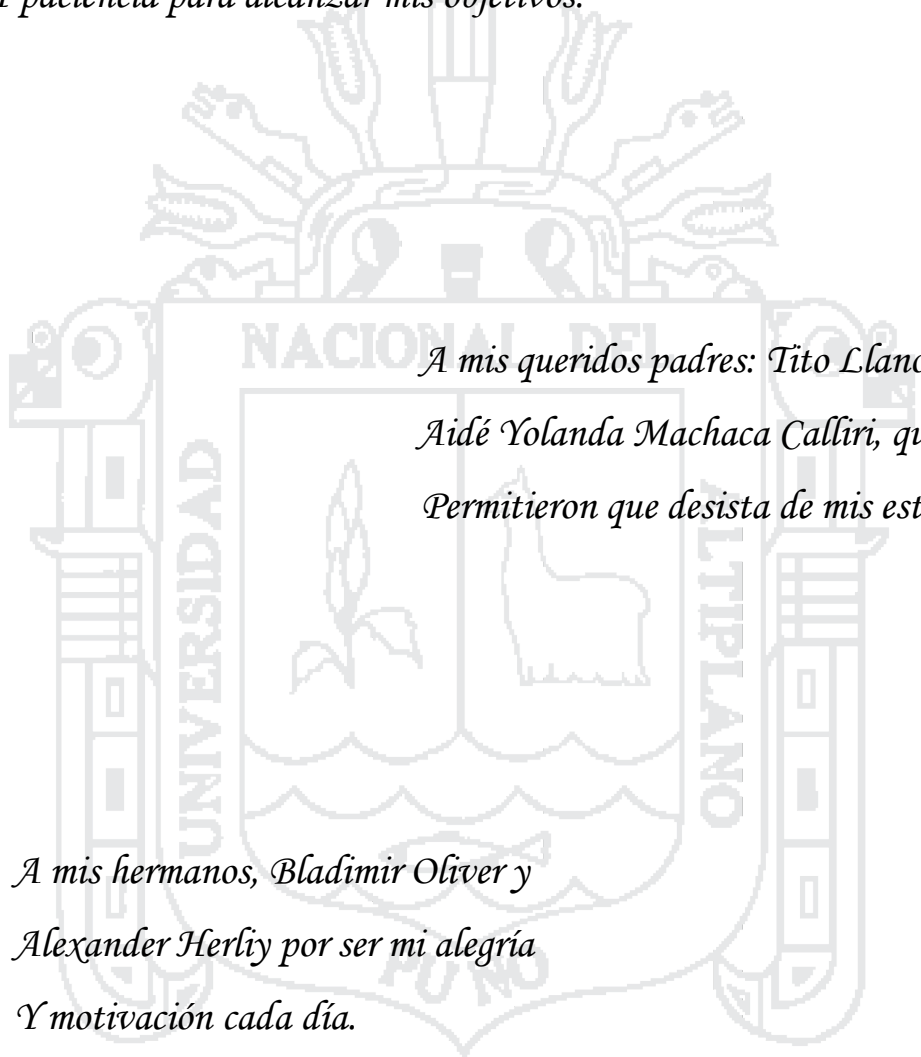
  
: M.C. Juan José Pauro Roque

AREA: Microbiología y Laboratorio Clínico  
TEMA: Biotecnología Microbiana

## DEDICATORIA

*A Dios por haberme dado la vida, salud, sabiduría*

*Y paciencia para alcanzar mis objetivos.*



*A mis queridos padres: Tito Llanos Caxi y  
Aidé Yolanda Machaca Calliri, que nunca  
Permitieron que desista de mis estudios.*

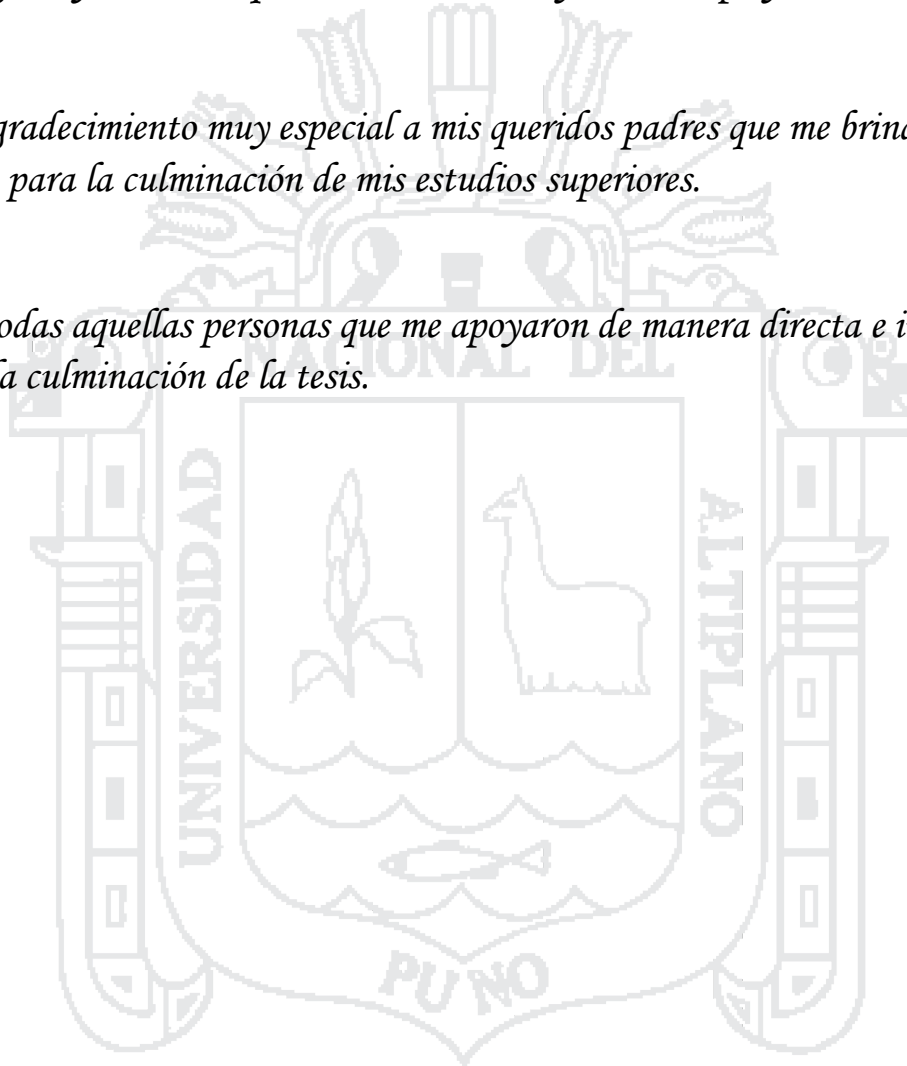
*A mis hermanos, Bladimir Oliver y  
Alexander Herliy por ser mi alegría  
Y motivación cada día.*

## AGRADECIMIENTO

*A la Universidad Nacional del Altiplano, Facultad de Ciencias Biológicas y docentes que inculcaron en mi formación profesional.*

*Un agradecimiento muy especial a mis queridos padres que me brindaron su apoyo para la culminación de mis estudios superiores.*

*Y, a todas aquellas personas que me apoyaron de manera directa e indirecta para la culminación de la tesis.*



## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE TABLAS .....	9
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS.....	10
RESUMEN.....	11
ABSTRACT .....	12
I. INTRODUCCIÓN.....	13
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	15
2.1 ANTECEDENTES.....	15
2.2 MARCO TEÓRICO .....	18
2.2.1 El fósforo.....	18
a. Ciclo del fósforo.....	18
b. Importancia del fósforo en la planta .....	18
c. Importancia del fósforo en el suelo .....	20
d. Formas del fósforo en el suelo.....	21
2.2.2 Microorganismos del suelo .....	22
2.2.3 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal.....	24
2.2.4 Microorganismos solubilizadoras de fosfato .....	25
2.2.5 Mecanismos bacterianos de solubilización .....	26
2.2.6 <i>Bacillus</i> solubilizadores de fosfato.....	28
2.2.7 La quinua ( <i>Chenopodium quinoa</i> Willd.) (Variedad Salcedo INIA).....	29
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
3.1 ÁMBITO DE ESTUDIO .....	38
3.2 TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN .....	38
a. Evaluación de la carga microbiana de bacterias solubilizadoras de fosfato en suelos.....	39

- Tinción de Wirtz para tinción de endosporas .....	41
- Tinción de Gram.....	42
- Prueba de la catalasa.....	42
- Utilización de almidón.....	42
- Utilización de citrato.....	43
b. Análisis estadístico.....	43
c. Ensayo de inoculación en semillas.....	46
d. Ensayo de crecimiento de plántulas de quinua inoculadas con bacterias solubilizadoras de fosfato.....	47
e. Análisis estadístico .....	48
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	49
4.1 Determinación de la carga de bacterias solubilizadoras de fosfato en suelos de cultivo de la provincia de El Collao – Puno.....	49
4.2 Efecto de las bacterias del género <i>Bacillus</i> en el porcentaje de germinación y crecimiento de plántulas de quinua variedad Salcedo – INIA, hasta la fase fenológica de seis hojas verdaderas, en condiciones de invernadero. ....	55
V. CONCLUSIONES.....	66
VI. RECOMENDACIONES.....	67
VII. REFERENCIAS.....	68
ANEXOS.....	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>PÁG.</b>
Figura 1. Toma de submuestras en X en cada una de las zonas de muestreo.....	38
Figura 2. Proceso de recuento de UFC de bacterias solubilizadoras de $PO_4^{-3}$ .....	40
Figura 3. Siembra de 100 semillas de quinua en bandejas de humus humedecido.....	47
Figura 4. Comparación de la carga bacteriana solubilizadora de fosfato en suelos.....	50
Figura 5.a Placas Petri con medio de cultivo NBRIP.....	53
Figura 5.b. Viraje del medio de cultivo NBRIP de color azul a amarillo.....	54
Figura 5.c. Halo transparente alrededor de la colonia.....	54
Figura 5.d. colonias puras en medio TSA.....	54
Figura 5.e. Mayor halo de solubilización alrededor de la colonia.....	54
Figura 6. Germinación de las semillas de quinua los 3 días, y a los 7 días después de la siembra.....	56
Figura 7. Efecto de las bacterias del género <i>Bacillus</i> en el porcentaje de germinación...57	57
Figura 8. Desarrollo de las plantas con las 6 hojas verdaderas los 45 días.....	58
Figura 9. Efecto de las bacterias Solubilizadoras de fosfato en la longitud de la planta.....	58
Figura 10. Efecto de las bacterias Solubilizadoras de fosfato en la longitud de raíz.....	59
Figura 11. Efecto de las bacterias Solubilizadoras de fosfato en el diámetro de tallo.....	60
Figura 12. Efecto de las bacterias Solubilizadoras de fosfato en peso fresco de la planta.....	61
Figura 13. Efecto de las bacterias Solubilizadoras de fosfato en peso seco de la planta.....	62
Figura 14. Efecto de las bacterias Solubilizadoras de fosfato en peso fresco de la raíz.....	63

Figura 15. Efecto de las bacterias Solubilizadoras de fosfato en peso seco de la raíz.....64

Figura 16. Fenología del cultivo de la quinua.....76

Figura 17. Zonas de toma de muestras de suelos.....77

Figura 18. Temperatura (°C), en que desarrollaron las plántulas de quinua en los dos meses de ensayo en invernadero.....77

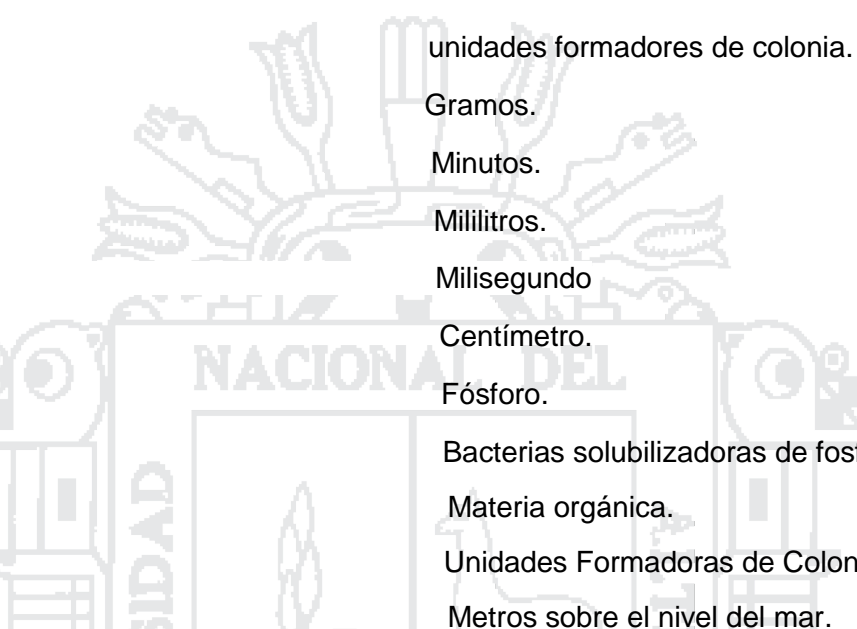




## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>PÁG.</b>
Tabla 1. Compuestos más comunes de fósforo en el suelo.....	22
Tabla 2. Poblaciones microbianas de un suelo cultivado fértil (número de organismos por gramo de suelo).....	24
Tabla 3. Resumen de los principales procesos involucrados en la solubilización de fosfatos por bacterias.....	27
Tabla 4. Clave para la taxonomía bacteriana del género <i>Bacillus</i> .....	41
Tabla 5. Cuantificación de carga bacteriana solubilizadora de fosfato en muestras de suelo a los 15 días de cultivo.....	49
Tabla 6. Análisis físico – químico de las muestras de suelo.....	51
Tabla 7. Análisis de varianza del recuento de carga bacteriana.....	78
Tabla 8. Análisis de varianza para el porcentaje de germinación.....	78
Tabla 9. Análisis de varianza de la Longitud de las plántulas.....	78
Tabla 10. Análisis de varianza de la Longitud de la raíz.....	79
Tabla 11. Análisis de varianza del diámetro de tallo.....	79
Tabla 12. Análisis de varianza del peso fresco de las plántulas.....	80
Tabla 13. Análisis de varianza del peso seco de las plántulas.....	80
Tabla 14. Análisis de varianza del peso fresco de la raíz.....	80
Tabla 15. Análisis de varianza del peso seco de la raíz.....	81
Tabla 16. Historial agronómico de los suelos de cultivo evaluados.....	88

## ÍNDICE DE ACRÓNIMOS



NBRIP	National Botanical Research Institute.
UFC	unidades formadores de colonia.
g	Gramos.
min	Minutos.
ml	Mililitros.
mS	Milisegundo
cm	Centímetro.
p	Fósforo.
BSP	Bacterias solubilizadoras de fosfato.
M.O	Materia orgánica.
UFC	Unidades Formadoras de Colonia.
Msnm	Metros sobre el nivel del mar.

## RESUMEN

El fósforo es un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, a pesar de ser abundante en los suelos, su disponibilidad para las plantas es muy limitada debido a su baja solubilidad en el suelo. Las bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF) tienen potencial para solubilizar el fósforo e incrementar la disponibilidad de este elemento. Los objetivos de esta investigación fueron: a) evaluar la carga microbiana de bacterias solubilizadoras de fosfato en tres suelos de cultivo de la provincia de El Collao – Puno y b) evaluar el efecto de las bacterias del género *Bacillus* en la germinación y crecimiento de plántulas hasta la fase fenológica de 6 hojas verdaderas de la quinua variedad Salcedo – INIA, en condiciones de invernadero. Las bacterias se aislaron, usando el medio selectivo NBRIP, posteriormente la identificación de bacterias del género *Bacillus*, se realizó mediante la tinción Gram, tinción de endosporas, prueba de catalasa, uso de almidón y la utilización de citrato. Las BSF se inocularon a las concentraciones de  $4,56 \times 10^5$  UFC/ml,  $1,96 \times 10^4$  UFC/ ml y  $0,56 \times 10^3$  UFC/ml que correspondieron a los tratamientos T1, T2 Y T3 respectivamente, Tc correspondió a semillas sin ningún tratamiento. Las semillas en germinación y plántulas de quinua fueron llevadas a un invernadero a una temperatura de  $24,5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1,71$  por un lapso de 45 días. Al finalizar el periodo se determinó la altura, el diámetro de tallo, peso fresco y seco de la planta y raíz. Los resultados fueron analizados mediante pruebas de estadística descriptiva, análisis de varianza y Tukey, con un nivel de confiabilidad del 95%. Los resultados de la carga bacteriana solubilizadora de fosfato en los suelos de las tres comunidades, presentaron diferencia estadística, siendo  $2,40 \times 10^3$  UFC/g en la comunidad Sankuta,  $1,57 \times 10^3$  UFC/g en la comunidad Sarapi Arroyo y  $1,23 \times 10^3$  UFC/g en la comunidad Pharata. El T1 presentó diferencia estadística significativa con respecto a los demás tratamientos y el tratamiento control con 97% de germinación. En la evaluación de los parámetros biométricos en la longitud de la planta, diámetro del tallo y peso seco de la planta y raíz, no hubo diferencia estadística entre T1, T2 y T3, aunque si respecto al control.

**Palabras claves:** Bacterias solubilizadoras de fosfato, género *Bacillus*, quinua, germinación, NBRIP.

## ABSTRACT

Phosphorus is an essential element for the growth and development of plants, although it is abundant in soils, its availability to plants is very limited due to its low solubility in the soil. Phosphate solubilizing bacteria (BSF) have the potential to solubilize phosphates and increase the availability of this element. The objectives of this research were: a) to evaluate the microbial load of phosphate solubilizing bacteria in three soils of culture in the province of El Collao - Puno and b) to evaluate the effect of *Bacillus* bacteria on germination and growth of seedlings until The phenological phase of 6 true leaves of the quinoa variety Salcedo - INIA, under greenhouse conditions. Bacteria were isolated using selective medium (NBRIP). Subsequently the identification of bacteria of the genus *Bacillus*, was performed by Gram staining, endospore staining, catalase test, starch use and citrate utilization. The BSF were inoculated at the concentrations of  $4,56 \times 10^5$  UFC/ml,  $1,96 \times 10^4$  UFC/ ml y  $0,56 \times 10^3$  corresponding to T1, T2 and T3 respectively, Tc corresponded to seeds without any treatment. Quinoa seedlings were transported to a greenhouse at a temperature of  $24.5^\circ \text{C} \pm 1.71$  for a period of 45 days. At the end of the period the height, stem diameter, fresh and dry weight of the plant and root were determined. The results were analyzed by tests of descriptive statistics, analysis of variance and Tukey, with a level of reliability of 95%. The results of the phosphate solubilizing bacterial load in the soils of the three communities presented a statistical difference,  $2.40 \times 10^3$  CFU / g in the Sankuta community,  $1.57 \times 10^3$  CFU / g in the Sarapi Arroyo community and  $1,23 \times 10^3$  CFU / g in the Pharata community, EL T1 presented statistically significant difference with respect to the other treatments with 97% germination. In the evaluation of the biometric parameters in plant length, stem diameter and dry weight of plant and root, there was no statistical difference between T1, T2 and T3, although with respect to the control.

**Key words:** Phosphate solubilizing bacteria, *Bacillus* genus, quinoa, germination, NBRIP.

## I. INTRODUCCIÓN

El fósforo (P), es el segundo macronutriente requerido para el desarrollo y crecimiento de las plantas y, si bien la concentración de este nutriente en el suelo es alta, un bajo porcentaje se encuentra disponible para las plantas. Esta baja disponibilidad es atribuida a que el P soluble reacciona con iones de calcio, hierro o aluminio lo que provoca su precipitación o fijación (Anzuay *et al.*, 2015).

La carencia del fósforo en el suelo influye en el tiempo de la cosecha y madurez del desarrollo de la planta, reduciendo el rendimiento de los cultivos; hecho que conlleva a la suplementación con fertilizantes químicos fosforados (Fernández *et al.*, 2006). A ello se suma que más del 75% de los fertilizantes fosforados aplicados son relativamente costosos para los agricultores y trae consigo la salinización, intoxicación y muerte de organismos benéficos, entre otras alteraciones físico - químicas, asimismo son rápidamente inmovilizados en los suelos (Ramírez, 2009).

De acuerdo a los datos provistos por la FAO, los principales países productores de quinua son Perú y Bolivia. Perú ha presentado una tendencia creciente respecto al aumento de su producción y exportación de quinua. En 2013 la producción de quinua en el Perú ascendió alrededor de 18% respecto a 2012; el mayor aumento en los últimos años. Y en el periodo 2005-2013, el Perú ha liderado la producción mundial de quinua, representando aproximadamente 52% de la producción mundial. En el Perú, en las últimas nueve campañas agrícolas la superficie sembrada de quinua a nivel nacional aumentó a una tasa promedio de 5,8% anual. Puno es la región que más hectáreas siembra, en total: 32,929 ha (Fairleji, 2016).

En la región Puno se concentra aproximadamente el 68,3% de la producción nacional de quinua, aquí se encuentra la mayor biodiversidad, superficie sembrada y cosechada. No obstante, los rendimientos aún son bajos. En Puno, las principales provincias productoras de quinua son: El Collao, Azángaro, Chucuito, Puno y San Román, que en conjunto producen el 81% del total regional. En las dos primeras provincias se concentra casi el 41% de producción (Casafranca y Pahuachón, 2014).

Más que los costos y la inmovilización del P, el problema radica en que los mercados nacionales e internacionales solicitan que el grano de quinua se produzca mediante una agricultura orgánica, entre ellas la aplicación de tecnologías microbianas a base de bacterias del género *Bacillus* que normalmente habitan los suelos.

Las poblaciones de bacterias en el suelo no se distribuyen al azar. Factores como la composición de los suelos, la materia orgánica, el pH, la humedad y la disponibilidad de

nutrientes, oxígeno, junto con la planta huésped, desempeñan un papel importante. La concentración de bacterias por gramo de suelo se halla alrededor de las raíces de las plantas cultivadas, siendo la rizósfera un ambiente propicio para la proliferación de poblaciones microbianas, esto se puede deber a los altos niveles de nutrientes que se hallan en la zona que rodea a las raíces que permiten el desarrollo de poblaciones microbianas específicas (Habib, 2010).

Es por eso que se decidió cuantificar la carga bacteriana solubilizadora de fosfato y evaluar el efecto de las bacterias del género *Bacillus* en el proceso de germinación de semillas y el crecimiento de plántulas de quinua hasta la etapa fenológica de aparición de las seis hojas verdaderas; el estudio abarcó hasta esta fase, en razón de que hasta este tiempo la plántula logra su establecimiento definitivo en el campo de cultivo, en el cual se evaluó algunos parámetros biométricos, ya que estos microorganismos constituyen un grupo importante de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal presentes en los suelos, pues están involucrados en un amplio rango de procesos que afectan la transformación del fósforo, siendo componentes integrales del ciclo edáfico de este nutriente (Fankem *et al.*, 2006), y que movilizan fosfato inorgánico insoluble desde la matriz mineral hasta el suelo donde puede ser absorbido por las raíces, y las plantas les suministran compuestos carbonados que son metabolizados para el crecimiento microbiano (Pérez *et al.*, 2007).

En este sentido se plantearon los siguientes objetivos:

#### Objetivo general

Determinar el efecto de las bacterias solubilizadoras de fosfatos del género *Bacillus* aislados de suelos de la provincia de El Collao – Puno, en la germinación y crecimiento de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) en condiciones de invernadero.

#### Objetivos específicos

Determinar la carga de bacterias solubilizadoras de fosfato en suelos de cultivo de la provincia de El Collao – Puno.

Determinar el efecto de las bacterias del género *Bacillus* en el porcentaje de germinación y crecimiento de plántulas de quinua variedad Salcedo – INIA, hasta la fase fenológica de seis hojas verdaderas, en condiciones de invernadero.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 ANTECEDENTES

Lara y Negrete (2015), evaluaron la capacidad solubilizadora de fosfatos de consorcios formados por bacterias nativas, con el fin de encontrar el más eficiente en el crecimiento del pasto Angletón (*Dichanthium aristatum*). Los tratamientos experimentados fueron: T1, semillas que no presentaron tratamiento alguno; T2, semillas tratadas con bioinoculantes, en las concentraciones de  $10^6$ ,  $10^7$  y  $10^8$  UFC/ml; y T3, semillas tratadas con fertilizantes químicos. A los 7 días del ensayo observaron que los valores promedios de los índices de solubilización oscilaron entre 2,3 a 4,8 mm (halos de solubilización). En esta etapa destacaron los consorcios *Burkholderia cepacia* + *Pantoea sp* + *Pseudomona sp* a la concentración de  $10^8$  UFC/ml, *Pseudomona luteola* + *Pseudomona sp* a la concentración de  $10^7$  UFC/ml y *Burkholderia cepacia* + *Pantoea sp* a la concentración de  $10^6$  UFC/ml. Luego de 21 y 35 días, las longitudes de las plantas (cm), estadísticamente no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos; sin embargo se evidenció mayor longitud para T3 y T2 con 45 y 38 cm respectivamente, en comparación con T1. La cantidad de hojas a los 21 días, observaron mejores resultados promedios para el T3 mostrando diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). La longitud de la raíz (cm), luego de 35 días, el tratamiento T2 logró una mayor longitud de raíz, con un valor superior a 6 cm, mientras que el tratamiento T1 y T3 mostró una longitud alrededor 5,27 cm.

Ávila *et al.* (2015), aislaron y caracterizaron bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF) asociadas a la rizósfera de *Baccharis macrantha* y *Viburnum triphyllum*, y evaluaron su capacidad para solubilizar fosfatos en condiciones *in vitro*. Entre sus resultados, reportaron que el mayor número de BSF aisladas para *B. macrantha* y *V. triphyllum* se presentaron en el período de lluvia con un promedio de  $5,5 \times 10^4$  ( $\pm 2,3 \times 10^4$ ) y  $6,9 \times 10^4$  ( $\pm 3,6 \times 10^4$ ) UFC/g de suelo respectivamente. Sin embargo, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre el número de BSF (UFC/g de suelo) aisladas de la rizosfera de *B. macrantha* y *V. triphyllum* en los dos períodos climáticos ( $p = 0,595$ ). Por otro lado, los porcentajes de germinación de semillas de *B. macrantha* fueron mayores cuando estas fueron inoculadas con los tratamientos bacterianos, alcanzado valores superiores al 50% de germinación (65, 56 y 56% para *Pseudomona fluorescens*, *B. firmus* + *P. fluorescens* y *B. firmus* respectivamente), en tanto que el control tan solo alcanzó el 7% de germinación. La mayoría de las bacterias aisladas (114) formaron halos de solubilización con diámetro entre 0 y 2 mm, mientras solo seis

originaron halos con diámetro mayor a 6 mm; 43 cepas aisladas formaron halos de solubilización con diámetro entre 2 y 4 mm y las 11 cepas restantes formaron halos de solubilización entre los 4 y 6 mm.

Martínez *et al.* (2013), evaluaron el efecto de las bacterias solubilizadoras de fosfato en la promoción del crecimiento vegetal y la germinación y crecimiento de plántulas de tomate y pimiento. Los resultados que obtuvieron por la inoculación de semillas de tomate mostraron que las cepas *Bacillus* sp. (MA04) y *Bacillus megaterium* (MA17) aumentaron la germinación en 5 y 6%, respectivamente. En cuanto al crecimiento de las plántulas, encontraron que a los 30 días de haberse iniciado el ensayo, cada una de las cepas había tenido un efecto positivo en al menos una de las variables evaluadas. Las cepas *Bacillus megaterium* (MA06) y *Bacillus subtilis* (MA12) aumentaron de manera significativa ( $P \leq 0,05$ ) el diámetro del tallo y el peso fresco y seco del vástago, lo que se reflejó en aumentos de biomasa de 17 y 20% en tallo y vástago, respectivamente. La cepa MA17 solo mejoró ( $P \leq 0,05$ ) el peso seco del vástago y la biomasa en 12%. Pero ninguna cepa tuvo efecto significativo en el peso de la raíz.

Kumar *et al.* (2011), realizaron estudios de diversidad microbiana identificando a *B. subtilis* y *B. megaterium* dentro de las poblaciones cultivables de suelos agrícolas, cuya abundancia oscila entre  $10^3$  a  $10^6$  UFC/g de suelo.

Lara *et al.* (2013), evaluaron la actividad solubilizadora de fosfato de algunas bacterias nativas sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de rábano (*Raphanus sativus* L.). Los tratamientos fueron: T0, control sin bioinoculante; T1, T2 y T3: bioinoculantes que contenían la bacteria Z32 (*Enterobacter cloacae*), a  $10^6$ ,  $10^7$  y  $10^8$  UFC/ml respectivamente; T4, T5 y T6: bioinoculantes que contenían la bacteria Z42 (*Klebsiella oxytoca*), a  $10^6$ ,  $10^7$  y  $10^8$  UFC/ml respectivamente; T7: fertilizante mineral sintético comercial, que contenía P2O5. La altura de las plantas, a los 25 días del ensayo fue más evidente el crecimiento de las plantas con los tratamientos T2 (bioinoculante con el aislado Z32 de *E. cloacae*,  $10^6$  UFC/ml) y T7 (fertilizante mineral sintético comercial), tenían las mayores alturas, sin diferencias significativas entre ellos. En la segunda evaluación (50 días después de la siembra), el tratamiento T7 favoreció un mayor crecimiento que fue estadísticamente diferente respecto a los demás. Con respecto a la cantidad de hojas, a los 25 días no hubo diferencias significativas entre el tratamiento con fertilizante químico y los tratamientos con bioinoculantes. A los 50 días, el T6 (bioinoculante con el aislado Z42, de *K. oxytoca*,  $10^8$  UFC/ml), estimuló la mayor longitud de la raíz principal con diferencias significativas respecto a los demás tratamientos,



incluyendo el fertilizante químico y el control, en relación al peso seco los tratamientos T1, T5 y T7 influyeron en los mejores resultados de materia seca del rábano.

Lara et al. (2011), evaluaron bacterias nativas solubilizadoras de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de Córdoba - Colombia. Emplearon como planta modelo el rábano (*Raphanus sativus*) y utilizaron la bacteria *Burkholdelia cepacia*. Reportaron que la longitud de la planta (cm) y la longitud de la raíz, denotaron valores más altos para los tratamientos T2 (semillas tratadas con bioinoculante  $10^6$  UFC/ml) Y T4 (semillas tratadas con bioinoculante  $10^8$  UFC/ml), sin embargo no observaron diferencias estadísticamente significativas para el caso de peso fresco.

Guzmán. (2011), Reporta que en los suelos de la provincia de Chimborazo (Riobamba – Ecuador), los recuentos de bacterias solubilizadoras de fosfatos oscilaron entre  $4,16 \times 10^8$  y  $5,87 \times 10^8$  UFC/g. Asimismo que de las 100 bacterias que demostraron la capacidad de solubilización de fósforo en condiciones *in vitro*, ochenta presentaron una forma bacilar, mientras que 20 fueron identificadas como cocos. Por otro lado los resultados de la reacción de Gram, determinaron que la mayoría de las bacterias fueron Gram positivas 95%, mientras que 5% fueron Gram negativas.

Yauyo. (2015), evaluó el efecto de la inoculación con microorganismos solubilizadores de fosfato (MSF) *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp. y *Penicillium* sp., en plantas de haba cultivados en un suelo calcáreo. Según la prueba de comparación de medias, ninguna de las plantas de haba que fueron inoculadas con las cepas estimularon valores estadísticamente superiores con respecto al tratamiento sin inoculo; sin embargo hay una ligera diferencia entre ellas. Para la altura de planta *Penicillium* sp. y *Clostridium* sp. Presentaron valores superiores con respecto a *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. En peso fresco los mejores resultados fueron obtenidos con la inoculación de *Bacillus* sp. y *Clostridium* sp. La cepa que incrementó el peso seco fue *Bacillus* sp.

## 2.2 MARCO TEÓRICO

### 2.2.1 El fósforo

#### a. Ciclo del fósforo

Se considera que el elemento es de ciclo cerrado, también llamado sedimentación, porque sus mayores depósitos o reservorios, se encuentran en forma de rocas fosfóricas, el fósforo presenta un ciclo muy lento y para que algunos depósitos sean accesibles a las plantas y a otros organismos se requiere levantamientos que expongan las rocas fosfóricas a la erosión. La erosión e hídrica, así como la acción de microorganismos solubilizadores de fosfato inorgánico liberan fósforo a la solución soluble del suelo. Es allí donde muchos microorganismos y plantas lo absorben e integran a sus estructuras biológicas. Al morir, la materia orgánica de cualquier organismo se convierte en un reservorio de fósforo que, mediante la acción de enzimas fosfatasas microbianas, es liberado nuevamente a la solución del suelo (Morales, 2012).

Los fosfatos no permanecen en el suelo, la mayoría de veces son impulsados por las corrientes de agua (Mar), donde los organismos vivos que hacen parte de este medio (peces, aves marinas, algas) dan lugar de este elemento en el fondo formándose así mismo rocas fosfatadas. También hay un reciclaje de este elemento ya que los organismos lo mantienen circulando gracias a que migran a lo largo de la columna de agua. Una parte de este elemento es llevado de nuevo, cerca de la superficie gracias a las migraciones en la columna de agua. Las aves marinas llevan parte del fósforo de estos ecosistemas tierra adentro, donde los microorganismos son los principales movilizadores (Vargas, 2012; Morales, 2012).

#### b. Importancia del fósforo en la planta

El fósforo (P) es uno de los tres macronutrientes esenciales de la vida en la tierra, componente clave de moléculas como ácidos nucleicos, fosfolípidos y ATP; además cumple un papel importante en la regulación postraduccional de enzimas y en el control de cascadas de señalización durante la transducción, participa en la fosforilación y desfosforilación, en la señalización de proteínas, lo

que hace del P el segundo factor nutricional limitante después del nitrógeno en plantas (White *et al.*, 2008).

Este elemento apoya al almacenamiento de energía obtenida a partir de la fotosíntesis y del metabolismo de carbohidratos en forma de polifosfatos, los cuales a continuación son usados para el crecimiento y la reproducción vegetal (Prada, 2013). La mayor parte del P las plantas lo absorben en forma de  $\text{PO}_4\text{H}_2$  y en menor proporción como  $\text{PO}_4\text{H}^{-2}$ . De hecho, la absorción del primero es diez veces más rápida que el segundo, aunque hay que tener en cuenta que en ello influye notablemente el pH del suelo (Navarro y Navarro, 2003).

Una concentración adecuada de P es responsable de un aumento en el crecimiento de las raíces, lo que significa que la planta pueda explorar más el suelo por los nutrientes y la humedad, por estas razones este elemento se presenta en la mayoría de las plantas en concentraciones entre 0,5 y 1% de materia seca. Por el contrario, con una deficiencia de P se desacelerará el crecimiento global de la planta, debido a los cambios en la tasa de división celular, elongación y la reducción en el número y tamaño de semillas y flores (Prada, 2013; Navarro y Navarro, 2003), Así mismo es posible observar cambios fenológicos y dormancia en las plantas, lo que disminuye en gran medida el desarrollo vegetal.

La insuficiencia de este elemento se evidencia en muchas ocasiones por cambios en la arquitectura de la raíz, lo cual implica su morfología, topología y patrones de distribución. De igual manera el P interviene en la formación de azúcares de cinco carbonos (ciclo de las pentosas), por tal motivo cuando hay falta de este elemento los carbonos utilizados en este ciclo no pueden formar azúcares. Estos carbonos son desviados a la formación excesiva de antocianinas lo que se observa fenotípicamente por un cambio gradual en la coloración del follaje empezando desde un verde oscuro en las hojas jóvenes a un púrpura en las hojas mayores, como consecuencia de la acumulación de dichos compuestos (White *et al.*, 2008).

Pero el fósforo, además de formar parte de los elementos plásticos de la planta, se encuentran también en ella como constituyente esencial de numerosos coenzimas como: NAD (nicotinamida-adenin-dinucleotido), NADP (nicotinamida-dinucleotidofosfato), FAD (flavin-adenin-dinucleotido), CoASH (coenzima A),

LIPS<sub>2</sub> (ácido lipoico o tioctico), UDP (urindin-difosfato), TPP (pirofosfato de tiamina), PAL (fosfato de peridoxal) (Navarro y Navarro, 2003).

c. Importancia del fósforo en el suelo

El fósforo (P) es el segundo nutriente esencial para el desarrollo y crecimiento de las plantas (Lara y Negrete, 2015), y microorganismos y además, en el suelo es un factor limitante del desarrollo vegetal a pesar de ser abundante tanto en formas inorgánicas como orgánicas (Ceballo, 2012). El fósforo en el suelo es un elemento que sufre varias reacciones con iones de calcio, hierro o aluminio lo que induce su precipitación o fijación (Anzuay *et al.*, 2015). La cantidad total de fósforo en el suelo puede ser alta, sin embargo este puede estar presente en forma indisponible o en formas que estén solo disponibles fuera de la rizósfera. En algunos suelos, más del 80% del fósforo aplicado al suelo se vuelve inmóvil, y por lo tanto no asimilable para la absorción por parte de las plantas (Guzman, 2011), Las plantas deben absorberlo del suelo, donde se encuentra en muy baja concentración, normalmente en niveles que varían entre 5 y 30 mg/kg (Ceballo, 2012).

La disponibilidad del fósforo se ve afectada por los procesos de precipitación dependiendo del pH, el cual influye en la solubilización de los hidróxidos de hierro y aluminio. A un valor de pH por debajo de 6,5 se precipitan los iones H y Al<sup>3+</sup> generándose como productos fosfatos amorfos de hierro y aluminio, así mismo a un valor de pH entre 7,5 y 8,5 se pueden formar sales sódicas de fosfato, las cuales aunque son más solubles en agua, tampoco son asimiladas por las plantas, cuando hay altas concentraciones de calcio, a valores de pH mayores de 7,5, la concentración de H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>=</sup> es muy baja y el ión HPO<sub>4</sub><sup>=</sup> precipita por acción del calcio formando fosfato dicálcico, el cual es relativamente insoluble en agua, sin embargo estos precipitados amorfos son moderadamente disponibles para las plantas (Holford, 1983; Rodríguez y Fraga 1999) citado por (Prada, 2013).

La cantidad de materia orgánica en el suelo es otra característica que interviene sobre el P disponible para las plantas, debido a que esta materia orgánica presenta más cargas negativas que positivas, por lo cual los compuestos negativos se combinan con los hidróxidos de hierro y aluminio impidiendo que

actúen sobre el  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  con  $\text{Fe}^{3+}$  lo que deja en forma disponible el fósforo, para que sea asimilado por plantas y microorganismos. Finalmente, un nivel de humedad elevado influye de forma directa en la disponibilidad del elemento, pues a medida que hay más agua disponible, más fosfato estará disuelto en solución, por lo cual aumenta la probabilidad de que el fósforo pueda ser absorbido por las plantas (Thompson, 1974) citado por (Prada, 2013).

#### d. Formas del fósforo en el suelo

El fósforo se encuentra en el suelo de manera orgánica e inorgánica y continuamente se va transformando. Las formas inorgánicas del fósforo son pH dependientes, mientras que el fósforo orgánico obedece a otros factores como el clima, la vegetación, la textura del suelo, prácticas de manejo e irrigación (Osorio, 2000).

##### d.1 Fósforo orgánico

El fósforo orgánico proviene de restos vegetales y animales que al ser degradadas por los microorganismos del suelo liberan compuestos fosfatados, constituye del 29 al 65% del fosforo presente en la superficie del suelo (Arzuaga *et al.*, 2006) que ha sido identificado específicamente en el suelo se encuentra, sobre todo, bajo tres formas más o menos degradadas: fosfolípidos, ácidos nucleicos, fitina y derivados. Constituyen, junto a otros compuestos no identificados, entre el 20 y 80 % del fósforo total del suelo, pero su proporción en la disolución del suelo es probablemente pequeña (Navarro y Navarro, 2003).

##### d.2 Fósforo inorganico

El fósforo inorgánico es casi siempre predominante, excepto en los suelos donde la materia orgánica se halla en una gran proporción (Navarro y Navarro, 2003). Está representado en los suelos por las rocas y minerales primarios como apatitas, hidroxiapatitas y oxiapatitas, estas formas se caracterizan por ser insolubles, sin embargo bajo condiciones apropiadas pueden ser solubilizadas y convertirse en formas disponibles para las plantas y los microorganismos, sin embargo se calcula que entre el 95-99% de fósforo insoluble se encuentra presente en el suelo y no puede ser utilizado por las plantas (Khan *et al.*, 2009).

Son muy numerosos los compuestos inorgánicos que se encuentran en los suelos. Pero la mayor parte pueden clasificarse en dos grandes grupos: 1°) Los que contienen calcio; y 2°) Los que contienen hierro y aluminio. Los primeros son los que verdaderamente predominan y los que, bajo un punto de vista agronómico, tienen mayor importancia (Navarro y Navarro, 2003).

**Tabla 1.** Compuestos más comunes de fósforo en el suelo

COMPUESTOS QUE CONTIENEN CALCIO	COMPUESTOS QUE CONTIENEN HIERRO Y ALUMINIO
Flúor apatito: $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3\text{F}_2\text{Ca}$	Variscita: $\text{PO}_4\text{Al}_2\text{H}_2\text{O}$
Cabonato apatito: $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3\text{Co}_3\text{Ca}$	Stremgita: $\text{PO}_4\text{Fe}_2\text{H}_2\text{O}$
Hidroxi-apatito: $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3\text{Ca}(\text{OH})_2$	Vivianita: $(\text{PO}_4)_2\text{Fe}_3\cdot 8\text{H}_2\text{O}$
Oxi-apatito: $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3\text{CaO}$	Dufrenita: $\text{PO}_4\text{Fe}_2(\text{OH})_3$
Fosfato tricálcico: $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$	Wavellita: $(\text{PO}_4)_4\text{Al}_3(\text{OH})_3\cdot 5\text{H}_2\text{O}$
Fosfato bicálcico: $\text{PO}_4\text{HCa}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Taranakita: $(\text{PO}_4)_8\text{H}_6\text{Al}_5\text{K}_3\cdot 18\text{H}_2\text{O}$
Fosfato monocálcico: $(\text{PO}_4\text{H}_2)_2\text{Ca}\cdot \text{H}_2\text{O}$	

**Fuente:** Navarro y Navarro, (2003).

Entre los fosfatos de calcio, el flúor-apatito es el más insoluble del grupo y, por consiguiente, el que contiene el fósforo en forma menos aprovechable. Sólo los fosfatos mono y di cálcico son fácilmente asimilables por las plantas; pero excepto en suelos recientemente fertilizados, estos compuestos están presentes en cantidades extremadamente pequeñas, ya que con facilidad se transforman en compuestos más insolubles (Navarro y Navarro, 2003).

### 2.2.2 Microorganismos del suelo

La actividad de los microorganismos es pertinente a la agricultura en la medida que afectan factores relevantes del suelo tales como su estructura, la disponibilidad de nutrimentos, la degradación de los residuos orgánicos frescos, la circulación de nutrientes, la disponibilidad de los nutrimentos a nivel de rizósfera, la formación y degradación de humus y la actividad supresiva de la microflora sobre la sobrevivencia y actividad de propágulos de patógenos o plagas. Las prácticas de manejo afectan la actividad de los microorganismos de una manera directa al alterar parámetros fisicoquímicos tales como la temperatura del suelo, la humedad, la aireación, el estado de oxidoreducción, el contenido y composición de los gases del espacio poroso, la accesibilidad a los substratos, el pH. Los anteriores factores afectan también el

crecimiento de las plantas, e indirectamente la actividad microbiana al variar el aporte de la materia orgánica a través de la cantidad y calidad de los residuos que ingresan al suelo, su disponibilidad para la degradación microbiana y a los efectos rizosféricos (Coyne, 2000).

Los suelos contienen una amplia variedad de formas biológicas, con tamaños muy diferentes, como los virus, bacterias, hongos, algas, colémbolos, ácaros, lombrices, nematodos, hormigas. Un suelo naturalmente fértil es aquel en el que los organismos edáficos van liberando nutrientes orgánicos, a partir de las reservas orgánicas, con velocidad suficiente para mantener un crecimiento rápido de las plantas, el suelo contiene el más alto número de grupos filogenéticos existentes, aproximadamente hay > 10<sup>9</sup> células bacterianas por gramo de suelo, pero existe una gran problemática, no es cantidad de microorganismo, es la sensibilidad de una fracción de grupos bacterianos muy alterables al cambio de condiciones ambientales, el más pequeño cambio climático y en respuesta dejan de producir metabolitos y enzimas muy importantes en el campo científico (Julca *et al.*, 2006; Madigan *et al.*, 2003).

#### **a. Bacterias**

La mayoría de la población bacteriana organotrófica aerobia de gran parte de los suelos está compuesta por Gram Positivos. No sería correcto generalizar los porcentajes de varios grupos, pero no es extraño encontrar que hasta el 70% de la totalidad de los aislamientos bacterianos del suelo se clasifican dentro de las denominadas bacterias Gram positivas del Género *Arthobacter* sp., siendo la mayoría de la microflora restante *Bacillus* sp. y *Micrococcus* sp (Larrea, 2001).

La población Gram negativa generalmente está compuesta en su mayor parte por *Pseudomonas* sp y *Flavobacterium* sp. Otros géneros relativamente frecuentes considerados nativos incluyen *Acinetobacter* sp, *Agrobacterium* sp, *Alcaligenes* sp y *Nocardia* sp (Larrea, 2001). La variabilidad de las comunidades microbianas en el suelo depende mayormente de la viabilidad por metabolizar una fuente de carbono, la disponibilidad de macro y micro elementos, el contenido de agua, el pH y el tamaño de las partículas. Cuando estas características se alternan se producen ambientes anaerobios, saturados o tóxicos según sea el nivel de presencia, es donde se encuentran especies bacterianas con propiedades metabólicas incomparables y procesos adaptativos regidos por componentes enzimáticos desconocidos (Hansel *et al.*, 2008).

## b. Hongos

Los hongos son organismos esenciales para la naturaleza, dada su capacidad para mineralizar toda clase de materia orgánica con lo que contribuyen al equilibrio de los ciclos biogeoquímicos. Por el potencial enzimático que tienen codificado en su genoma, tienen incluso uso para eliminar xenobióticos que dañan el equilibrio natural. En suelos agrícolas cultivados de textura que permita la aereación los hongos constituyen la mayor parte de la biomasa microbiana total en ese ambiente. Sin embargo las técnicas en microbiología del tipo cuenta viable en placa para el conteo de otros grupos como bacterias y algas sugieren lo contrario, que los hongos no son los habitantes más dominantes del suelo, aunque si se usan otros métodos para medir el crecimiento microbianos, los hongos aportan más del 50% de la biomasa en el suelo (Astier *et al.*, 2002).

**Tabla 2.** Poblaciones microbianas de un suelo cultivado fértil (número de organismos por gramo de suelo).

ORGANISMO	NÚMERO
Eubacterias:	
Por recuento microscópico directo	2 500 000 000
Por recuento de bacterias viables sobre agar común	15 000 000
Actinomicetos	700 000
Hongos	400 000
Algas	50 000
Protozoos	30 000

**Fuente:** Burgues (1958).

### 2.2.3 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) constituyen una amplia variedad de bacterias del suelo, las cuales cuando crecen en asociación con las plantas estimulan su crecimiento y productividad vegetal (Ferrera y Alarcón, 2007). Los medios por los cuales las BPCV pueden mejorar el estado nutricional de las plantas son: 1) fijación biológica de N, 2) producción de reguladores del crecimiento, vitaminas y otras sustancias, 3) disponibilidad de nutrimentos en la rizosfera, 4) incremento en el área superficial de la raíz y 5) control de microorganismos patogénicos (Rueda *et al.*, 2009).



La importancia que poseen los microorganismos en la naturaleza y en sus relaciones con el hombre es cada día más evidente. Cuando la agricultura tiene la necesidad de adoptar medidas conservacionistas, los microorganismos utilizados como biofertilizantes tienen un papel sustancial. El desarrollo y uso de los biofertilizantes se contempla como una importante alternativa para la sustitución parcial o total de los fertilizantes minerales.

Los beneficios que presenta el uso de microorganismos en la agricultura pueden concretarse de la siguiente manera: a) Fitoestimulantes, estimulan la germinación de las semillas y el enraizamiento por la producción de reguladores del crecimiento, vitaminas y otras sustancias; b) Biofertilizantes, incrementan el suministro de los nutrimentos por su acción sobre los ciclos biogeoquímicos, tales como la fijación de N, la solubilización de elementos minerales o la mineralización de compuestos orgánicos; c) Mejoradores, mejoran la estructura del suelo por su contribución a la formación de agregados estables; d) Agentes de control biológico de patógenos, desarrollan fenómenos de antagonismo microbio-microbio; e) Biorremediadores, eliminan productos xenobióticos tales como pesticidas, herbicidas y fungicidas; y f) Mejoradores ecofisiológicos, incrementan la resistencia al estrés tanto biótico como abiótico (Rueda *et al.*, 2009).

#### 2.2.4 Microorganismos solubilizadoras de fosfato

Dentro de los microorganismos solubilizadores de fosfato las bacterias constituyen de 1% a 50%, mientras que los hongos solubilizadores solo el 0,1 a 0,5% de la población (Chen *et al.*, 2006)

Entre los géneros bacterianos más estudiados por su capacidad para solubilizar fosfatos se encuentran: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Mesorhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Erwinia* (Gallegos *et al.*, 2014). Entre ellas destacan especies de bacterias más importantes: *B. megaterium*, *B. circulans*, *B. subtilis*, *B. polymixa*, *B. sircalmous*, *Pseudomonas striatay* y *Enterobacter*, constituyendo el 30% de la población de microorganismos que forman la rizosfera (Rodas, 2006). Igualmente, se ha documentado la actividad fosfato solubilizadora por diferentes hongos saprófitos del suelo tales como *Aspergillus niger*, *Penicillium bilaii*, *P. simplicissimun*, *Trichoderma harzianum*, *Cladosporium herbarum* y hongos micorrizos, principalmente del género *Glomus* (Gallegos *et al.*, 2014).

Se reportó que los géneros bacterianos como: *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Rhizobium* se caracterizan por tener mayor potencial de solubilización de fósforo. Estos efectos benéficos trabajan sobre las plantas en sus procesos de segregación de reguladores de crecimiento como: citoquinas, giberilinas, auxinas, aumenta su producción, mejoran su nutrición mineral, sus procesos de germinación y desarrollo de raíces (Gallegos *et al.*, 2016).

### 2.2.5 Mecanismos bacterianos de solubilización

Las bacterias transforman los fosfatos insolubles a formas solubles por la acción de diferentes mecanismos directos o indirectos. Entre ellos se destacan: i) la acción de ácidos orgánicos producidos por microorganismos ii) quelación de los elementos responsables de la insolubilidad de los fosfatos presentes y iii) asimilación directa de fosfatos insolubles por microorganismos que lo acumulan en sus células y los liberan posteriormente (Restrepo *et al.*, 2015).

El mecanismo más común de solubilización del fósforo mineral es la acción de ácidos orgánicos sintetizados por las bacterias solubilizadoras de fósforo (BSP) además de la producción de un grupo de enzimas denominadas fosfatasas. La concentración de los ácidos orgánicos en la solución del suelo normalmente es baja, variando de 1 a 50  $\mu\text{M}$ , pero las BSP podrían aumentar estos contenidos a nivel de la rizósfera favoreciendo la solubilización del fósforo adsorbido. Los ácidos glucónico y 2-cetoglucónico son los compuestos reportados repetidamente como solubilizadores de fósforo que producen las BSP. Además otros ácidos orgánicos con capacidad solubilizadora de fosfatos son los ácidos oxálico, cítrico, butírico, malónico, láctico, succínico, málico, acético, fumárico, adípico, e indolacético (Ceballos, 2012). Entre los géneros bacterianos con capacidad de producir ácidos orgánicos que solubilizan fósforo se tienen: *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Aereobacter*, *Flavobacterium*, *Yarrowia*, *Streptosporangium* y *Erwinia*.

Un resumen de los principales procesos involucrados en la solubilización de fosfatos por bacterias se muestra en la Tabla 3 (Restrepo *et al.*, 2015).

**Tabla 3.** Resumen de los principales procesos involucrados en la solubilización de fosfatos por bacterias

<b>Tipo de proceso</b>	<b>Principal causa de disolución mineral</b>	<b>Principal reacción que lleva a la disolución mineral</b>	<b>Aplicabilidad a fosfatos minerales</b>
Acidificación del medio	Liberación de protones (H <sup>+</sup> ) o producción de ácidos inorgánicos fácilmente dissociables	Disminución del pH del medio, formación de hidrofosfatos de mayor solubilidad	Fosfato de Ca <sup>2+</sup>
Formación de complejos metálicos	Liberación de ácidos orgánicos o complejos (quelantes)	Formación de complejos metálicos (incluyendo quelatos en el caso de ácidos dicarboxílicos o hidrocarboxílicos)	Fosfato de Ca, Al <sup>3+</sup> y Fe <sup>3+</sup>
Reducción de metales	Actividades redox de bacterias o sus exudados (metabolitos secundarios)	Reducción de metales Con estados de oxidación variable (ligados a fosfatos) a un bajo estado de oxidación (resultando en un fosfato más soluble)	Fe <sup>3+</sup> fosfato
Disolución de fosfatos mediada por enzimas	Liberación extracelular de enzimas específicas (fosfatasas)	Hidrolisis enzimática de esterres de fosfato orgánicos pobremente solubles liberando fosfatos inorgánicos	Varios esterres de fosfatos orgánicos (fitatos, fosfolípidos)
Disolución indirecta de fosfatos	Estimulación microbiana de exudación de ácidos orgánicos a la planta	El mismo mecanismo para el tipo 2 (formación de complejos metálicos) pero liberación por la interacción planta-microorganismo	Fosfatos de Ca <sup>2+</sup> , Al <sup>3+</sup> y Fe <sup>3+</sup>

**Fuente:** Restrepo *et al.* (2015).

### 2.2.6 *Bacillus* solubilizadores de fosfato

El género *Bacillus* fue descrito por primera vez por Cohn y comprende un grupo de especies filogenética y fenotípicamente heterogéneas. Incluye más de 100 especies y sus miembros son considerados ubicuos (Tejera *et al.*, 2011).

#### Taxonomía

Dominio: Bacteria

Filo: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Bacillaceae

Género: *Bacillus*

Desde el punto de vista microbiológico, las bacterias del género *Bacillus* se consideran Gram positivas. Tienen forma de bastoncillo y están agrupadas en cadenas, son móviles y tienen flagelación peritrica. Forman endosporas, son anaerobias estrictas o facultativas, son catalasa positivos (Pérez y Bocourt, 2008). Las células bacterianas de este género tienen un amplio tamaño que varía entre 0,5 a 2,5  $\mu\text{m}$  x 1,2-10  $\mu\text{m}$  (Cuervo, 2010).

Su ciclo de vida se divide en dos fases: crecimiento vegetativo y esporulación. Durante el primer estado, la bacteria crece de forma exponencial cuando se encuentra en un medio donde las condiciones son favorables. Cuando los nutrientes comienzan a reducir, la bacteria esporula, formando una endospora, la cual puede permanecer viable durante una gran cantidad de tiempo hasta que las condiciones sean favorables para volver a su forma vegetativa (Tejera *et al.*, 2011). Estas endosporas pueden sobrevivir independientemente de la célula madre y pueden ser aisladas desde una gran variedad de sustratos, dada su resistencia al aire seco, temperaturas extremas de desecación pues pueden llegar a soportar desde 80°C a 100°C de temperatura, pH entre otros. La endospora de los *Bacillus* generalmente está formada por proteínas deshidratadas utilizando el ácido poli- $\beta$ -hidroxibutírico en aerobios y polisacáridos en los anaerobios (Tejera *et al.*, 2011; Márquez, 2007).

El género *Bacillus* es uno de los más estudiados respecto a su capacidad solubilizadora y dentro de él destacan las especies *B. megaterium* y *B. subtilis* debido a que excretan

al medio ácidos orgánicos como principal mecanismo de solubilización, sin embargo también pueden actuar enzimas como las fitasas (Rajankar, 2007).

### 2.2.7 La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) (Variedad Salcedo INIA)

La información que se menciona a continuación fue reportada por (Mujica, 2000; León, 2003).

#### a. Taxonomía

Dominio: Eucariota

Reyno: Vegetal

División: Fanerogamas

Clase: Dicotiledoneae

Sub – clase: Angiospermae

Orden: Centrospermales

Familia: Chenopodiaceae

Género: *Chenopodium*

Sección: Chenopodia

Subsección: Cellulata

Especie: *Chenopodium quinoa* Willd.

**b. Origen.** Se atribuye su origen a la zona andina del Altiplano Peruano – Boliviano, por estar caracterizada por la gran cantidad de especies silvestres y la gran variabilidad genética, principalmente en ecotipos, reconociéndose cinco categorías básicas (León, 2003).

**c. Quinuas altiplánicas.** Crecen en lugares aledaños al lago Titicaca a una altura de 3800 msnm, estos cultivos se caracterizan por tener buena resistencia a las heladas, son bajos en tamaño, no ramificados (tienen un solo tallo y panoja terminal que es glomerulada densa), alcanzan a tener una altura de 1 a 2 m, con periodo vegetativo corto, se tiene quinuas precoces como: Illpa-INIA y Salcedo – INIA, semi – tardías: blanca de Juli, tardías: como la kancolla, chewecca, tahuaco, amarilla de Marangani (León, 2003).

**d. Variabilidad genética.** La quinua es una especie tetraploide, formado por 36 cromosomas somáticas, está constituido por 4 juegos cromosómicos, con un número básico de 9 cromosomas ( $4n = 4 \times 9 = 36$ ). El color de las plantas de quinua es un carácter de herencia simple; en cambio el color de los granos es por la acción de agentes adicionales, siendo el color blanco un carácter recesivo (León, 2003).

En quinua el tipo de inflorescencia puede ser amarantiforme o glomerulada, siendo la última dominante sobre la primera. El contenido de saponina en quinua es heredable, siendo recesivo el carácter dulce. La saponina se ubica en la primera membrana. Su contenido y adherencia en los granos es muy variable y ha sido motivo de varios estudios y técnicas para eliminarla, por el sabor amargo que confiere al grano, el carácter amargo o contenido de saponina estaría determinado por un simple gen dominante. Sin embargo, la presencia de una escala gradual de contenido de saponina indicaría más bien su carácter poligénico (León, 2003).

**e. Variedad Salcedo - INIA.** Esta variedad fue obtenida mediante la selección surco – panoja a partir de las variedades “real boliviana” y “sajama”, en la estación experimental de Patacamaya e introducido en Puno en 1989. El grano que posee es grande y tiene un tamaño de 1,8 a 2 mm de diámetro, son de color blanco, su panoja es glomerulada, su periodo vegetativo es de 160 días (precoz), su rendimiento es de 2500 Kg /ha, son resistente a las heladas (-2 °C) y tolerantes al mildiú. Se recomienda su cultivo en la zona circunlacustre (León, 2003).

#### **f. Descripción botánica**

- **Raíz.** El tipo de raíz varía de acuerdo a las fases fenológicas. Empieza con raíz pivotante terminando en raíz ramificado con una longitud de 25 a 30 cm, según el ecotipo, profundidad del suelo y altura de la planta; la raíz se caracteriza por tener numerosas raíces secundarias y terciarias (León, 2003).

- **Tallo.** Es cilíndrico y herbáceo anual, de una forma angulosa a la altura donde se insertan las ramas y hojas, quedando dispuestas en las cuatro caras del tallo, la altura es variable de acuerdo a las variedades y siempre terminan en una inflorescencia; cuando la planta es joven tiene una médula blanca y cuando va madurando se vuelve esponjosa, hueca sin fibra, sin embargo la corteza se lignifica, el color del tallo es variable, puede ser púrpura como la Pasankalla, blanco cremoso (Blanca de Juli) y con las axilas coloreadas como la blanca de Juli, en toda su longitud; colorada como la

kancolla y otros colores según el ecotipo de cada zona (el color varía de acuerdo a las fases fenológicas, se pueden diferenciar bien los colores en la floración). Cuando se tiene plantas monopodicas (de un solo tallo), se puede inducir cortando la yema apical para tener plantas simpodicas (de varios tallos); esta técnica se debe realizar antes del inicio de panojamiento (León, 2003).

- **Hojas.** Son simples, enteras, esparcidas, glabras, pecioladas, sin estipulas, pinnatinervadas, presentan oxalatos de calcio o vesículas granulosas en el envés a veces en el haz; las cuales impiden la transpiración excesiva en caso de que se presentaran sequías. En la quinua, podemos notar que la hoja está formada por una lámina y un pecíolo, los pecíolos son largos acanalados y finos, las hojas son polimorfas, las hojas inferiores son de forma romboidal o de forma triangular y las hojas superiores son lanceoladas que se ubican cerca de las panojas. Pueden tomar diferentes coloraciones, va del verde al rojo o púrpura (dependiendo de la variedad) (León, 2003).

La inserción de las hojas en el tallo es alterna, en cada nudo se observan de 5 a 12 hojas de acuerdo a cada variedad y la distancia entre nudos es de 0,8 a 4 cm. La hoja es por excelencia el órgano clorofiliano fundamental de la respiración y la asimilación de CO<sub>2</sub> (anhídrido carbónico). El número de dientes por hoja varía de 2 a 14 dependiendo de la variedad (León, 2003).

- **Inflorescencia.** Es de tipo racimosa y por la disposición de las flores en el racimo se le denomina como una panoja, por el hábito de crecimiento algunas inflorescencias difieren por que pueden ser axilares y terminales. En algunas variedades no se tiene una diferencia clara y pueden ser ramificadas teniendo una forma cónica, el eje principal de la inflorescencia es de forma angulosa o piramidal y tiene dos surcos, donde se ubican las flores. De acuerdo a la forma de panoja; se le considera amarantiforme, cuando sus glomérulos están insertados en el eje secundario y glomérulada, cuando los glomérulos están insertos en el eje primario o principal y toda la panoja tiene la forma, de un solo glomérulo. De acuerdo a la densidad de panoja que se presentan estas son considerados: compactas, semicompactas o semilaxas y laxas (León, 2003).

- **Flores.** En una misma inflorescencia pueden presentar flores hermafroditas (perfectas), femeninas y androésteriles (imperfectas). Habitualmente se encuentra 50 glomérulos en una planta y cada glomérulo está conformado por 18 a 20 granos aproximadamente. Las flores son pequeñas de 1 a 2 mm de diámetro como en todas las Quenopodiáceas, son flores incompletas porque carecen de pétalos. Hay un grupo

intermedio como la blanca de Juli, originaria de Puno, en el cual el grado de cruzamiento depende del porcentaje de flores pistiladas (León, 2003).

**g. Tipo de reproducción.** La quinua es una especie autógama (autofecundación) con un cierto porcentaje de alogámia (cruzamiento con otras plantas de la misma especie). El porcentaje de cruzamiento depende de la variedad y de la distancia a las plantas con que se pueda cruzar, y oscila entre 2 al 10% (León, 2003).

**h. La androesterilidad.** En las quinuas nativas se encuentran frecuentemente plantas androestériles, siendo éste carácter recesivo. Plantas androestériles: En toda la planta hay solamente flores femeninas o androestériles pero ninguna flor hermafrodita. Como faltan los órganos masculinos, la planta androestéril necesita siempre otra planta con polen viable para ser fecundada y producir semilla. Esta androesterilidad tiene un aspecto económico muy importante: Una forma para subir drásticamente los rendimientos de una especie es mediante la creación de híbridos. La obtención de ellos requiere la eliminación de los órganos masculinos, una operación tediosa y costosa, especialmente en especies con flores pequeñas como la quinua. Como esta operación. No hace falta en las plantas estériles, la esterilidad masculina es un factor importante y de alto interés económico en la producción de híbridos comerciales. En éste contexto la variedad androestéril más famosa es la variedad nativa boliviana Apelawa, sobre la cual se dio a nivel internacional una discusión básica y fuerte respecto la posibilidad y la honestidad de patentar recursos genéticos encontrados en países ajenos (León, 2003).

**i. Fase de la floración.** En los glomérulos la floración inicia en la parte apical y sigue hasta la base. En cada parte del glomérulo se abren primero las flores hermafroditas y después las femeninas. Cada flor está abierta de 5 a 13 días. A partir de la apertura de la primera flor, las demás flores se abren dentro de 15 días. Así la fase total de floración de una panoja se demora 3 a 4 semanas (León, 2003).

**j. Floración en el transcurso del día.** La máxima intensidad de la floración en días de sol se presenta entre las 10.00 am hasta las 14.00 pm, cuando el 25 a 40% de flores están abiertas y cuando hay una fuerte radiación solar. Una floración de mínima intensidad se da en horas de lluvia. El pistilo es receptivo durante 2 horas (León, 2003).

**k. Fruto.** Es aquenio, el que se encuentra cubierto por el perigonio, que cuando se encuentra en estado maduro es de forma estrellada por los cinco tépalos que tiene la flor. El perigonio cubre solo una semilla y se desprende con facilidad al frotarlo; el color



del grano está dado por el perigonio y se asocia directamente con el color de la planta, el pericarpio del fruto se encuentra pegado a la semilla y es donde se encuentra la saponina que es un glucósido de sabor amargo; se ubica en la primera membrana (León, 2003).

**I. Semilla.** Tiene forma lenticelada, que se encuentra envuelta por el perisperma, el tamaño de la semilla (grano) se considera grande cuando el diámetro es mayor a 2 mm Ej. Var. Sajama, Salcedo – INIA, Illpa INIA; mediano de diámetro 1,8 a 1,9 mm Ej. Var. Kancolla, tahuaco, chewecca y pequeño menos de 1,7 mm de diámetro Ej. Blanca de Juli (León, 2003).

El pericarpio, está formado por tres capas, pegado a la semilla y contiene saponina en rango de 0,2 - 5,1%. El pericarpio es suave en los ecotipos chilenos y duro en los demás ecotipos. Directamente bajo del pericarpio está el episperma, una membrana delgada que cubre al embrión. El embrión está formado por los dos cotiledones y la radícula envuelve al perisperma en forma de anillo. El perisperma presenta la sustancia de reserva y contiene pequeños granos de almidón. Su color es siempre blanco (León, 2003).

Cabe destacar que el embrión presenta la mayor proporción de la semilla (30 % de peso), mientras que en los cereales corresponde solamente al 1%. De allí resulta el alto valor nutritivo de la quinua. Las semillas vienen dispuestas en panojas, éstas tienen entre 15 y 70 cm, puede llegar a un rendimiento de 220 g de granos por panoja. Los colores varían según la variedad y el estado fisiológico de la planta, así van del púrpura al rosado amarillo, del verde al amarillo pálido, etc. Los granos, cuyo color también varía (blanco, gris, rosado) (León, 2003).

La capa externa que la cubre es rugosa y seca, se desprende con facilidad al ser puesta en contacto con agua caliente o hervida, en esta capa (pericarpio) se almacena la sustancia amarga denominada saponina que al ser lavada se elimina en forma de espuma. El grado de amargor varía según los tipos de quinua. El contenido de la saponina en la quinua es de entre 0 – 6% dependiendo de la variedad (León, 2003).

**m. Fases fenológicas.** La duración de las fases fenológicas depende mucho de los factores medio ambientales que se presenta en cada campaña agrícola por ejemplo; si se presenta precipitación pluvial larga de 4 meses continuas (enero, febrero, marzo y

abril), sin presentar veranillos las fases fenológicas se alarga por lo tanto el periodo vegetativo es largo y el rendimiento disminuye (León, 2003).

Cuando hay presencia de veranillos sin heladas, la duración de las fases fenológicas se acorta y el periodo vegetativo también es corto y el rendimiento es óptimo. Asimismo influye la duración de la humedad del suelo, por ejemplo en un suelo franco arcilloso, las fases fenológicas se alargan debido al alto contenido de humedad en el suelo o alta capacidad de retener agua; en cambio en un suelo franco arenoso sucede todo lo contrario (León, 2003).

- **Germinación.** La germinación de semillas puede ser definida como una serie de acontecimientos metabólicos y morfogénicos que tienen como resultado la transformación de un embrión en una plántula que sea capaz de valerse por sí sola y transformarse en una planta adulta. En la germinación se dan procesos secuenciados y sincronizados, en un esquema tan organizado que los procesos anabólicos y catabólicos son simultáneos. Como norma general, con la germinación de la semilla la testa se rompe y la radícula emerge. Una vez fuera, la radícula penetra en el suelo, produce pelos absorbentes y a veces raíces laterales, comenzando los procesos de absorción de nutrientes del suelo (Barceló *et al.*, 2007).

En muchas semillas los cotiledones y el ápice caulinar emergen cuando el hipocotileo se alarga como resultado de un crecimiento intercalar; este tipo de germinación se llama epigea; como ejemplos podemos citar *Ricinus communis*, *Allium cepa*, *Phaseolus vulgaris*, *Curcubita pepo*, *Lactuca sativa*. En muchas otras plantas, como en *Vicia faba* y *Pisum sativum*, los cotiledones que contienen las sustancias de reserva permanecen dentro de la testa y bajo el suelo, el hipocótilo no se alarga o apenas si lo hace. Este tipo de germinación se llama hipogea. En este caso, la yema terminal del embrión es empujada hacia afuera por alargamiento del epicótilo, que es el entrenudo que hay sobre los cotiledones. En las gramíneas, si consideramos que el escutelo, que no es más que el cotiledón modificado, nunca se eleva por encima del endospermo durante la emergencia de la plántula, se da este tipo de germinación hipogea (Barceló *et al.*, 2007).

Desde el punto de vista fisiológico, la germinación comprende cuatro fases:

- Imbibición de agua
- Elongación celular
- División celular
- Diferenciación de células y tejidos

**Fase I:** se caracteriza por un rápido incremento en la respiración, que generalmente se produce antes de transcurridas 12 h desde el inicio de la imbibición. El aumento en la actividad respiratoria es proporcional al incremento de la hidratación de los tejidos de la semilla. El principal sustrato utilizado en esta fase es, posiblemente, la sacarosa.

**Fase II:** la actividad respiratoria se estabiliza entre las 12 y 24 h desde el inicio de la imbibición. Probablemente las cubiertas seminales, que todavía permanecen intactas, limitan la entrada de O<sub>2</sub>. La eliminación de la testa puede acortar o anular esta fase.

**Fase III:** se produce un segundo incremento en la actividad respiratoria, que se asocia a la mayor disponibilidad de O<sub>2</sub>, como consecuencia de la ruptura de la testa producida por la emergencia de la radícula. Otro factor que contribuye a ese aumento es la actividad de las mitocondrias, recientemente sintetizadas en las células del eje embrionario.

**Fase IV:** en esta última fase tiene lugar una acusada disminución de la respiración, que coincide con la desintegración de los cotiledones, después que han exportado las reservas almacenadas (Doria, 2010).

- **Emergencia.** Es cuando la plántula emerge del suelo y extiende las hojas cotiledonales, pudiendo observarse en el surco las plántulas en forma de hileras nítidas, esto depende de la humedad del suelo; si el suelo está húmedo, la semilla emerge al cuarto día o sexto día de la siembra. En esta fase la planta puede resistir a la falta de agua, siempre dependiendo del tipo de suelo; si el suelo es franco – arcilloso. Si el suelo es franco – arenoso, puede resistir aproximadamente, hasta 7 días. También la resistencia depende mucho, del tipo de siembra; si es al voleo sin hacer surco, no resistirá a la sequía; si se siembra también al voleo pero dentro del surco, podrá resistir a la sequía (León, 2003).

- **Dos hojas verdaderas.** Es cuando dos hojas verdaderas, extendidas que ya poseen forma lanceolada y se encuentra en la yema apical el siguiente par de hojas, ocurre a los 10 a 15 días después de la siembra y muestra un crecimiento rápido en las raíces. En esta fase la planta también es resistente a la falta de agua, pueden soportar de 10 a 14 días sin agua, siempre dependiendo de los factores ya indicados en la emergencia (León, 2003).

- **Cuatro hojas verdaderas.** Se observan dos pares de hojas extendidas y aún están presentes las hojas cotiledonales de color verde, encontrándose en la yema apical las siguientes hojas del ápice; en inicio de formación de yemas axilares del primer par de hojas; ocurre aproximadamente a los 25 a 30 días después de la siembra (León, 2003).
  
- **Seis hojas verdaderas.** Se observan tres pares de hojas verdaderas extendidas y las hojas cotiledonales se tornan de color amarillento. Esta fase ocurre aproximadamente a los 35 a 45 días después de la siembra, en la cual se nota claramente una protección del ápice vegetativo por las hojas más adultas (León, 2003).
  
- **Ramificación.** Se observa ocho hojas verdaderas extendidas con presencia de hojas axilares hasta el tercer nudo, las hojas cotiledonales se caen y dejan cicatrices en el tallo, también se nota presencia de inflorescencia protegida por las hojas sin dejar al descubierto la panoja, ocurre aproximadamente a los 45 a 50 días de la siembra. Durante esta fase se efectúa el aporque y fertilización complementaria. Desde la fase de cuatro hojas verdaderas hasta fase se puede consumir las hojas en reemplazo a la espinaca (León, 2003).
  
- **Inicio de panojamiento.** La inflorescencia se nota que va emergiendo del ápice de la planta, observado alrededor aglomeración de hojas pequeñas, las cuales van cubriendo la panoja en sus tres cuartas partes; ello puede ocurrir aproximadamente a los 55 a 60 días de la siembra, así mismo se puede apreciar amarillamiento del primer par de hojas verdaderas (hojas que ya no son fotosintéticamente activas) y se produce una fuerte elongación del tallo, así como engrosamiento (León, 2003).
  
- **Inicio de floración.** Es cuando la flor hermafrodita apical se abre mostrando los estambres separados, aproximadamente puede ocurrir a los 75 a 80 días después de la siembra, en esta fase es bastante sensible a la sequía con helada; se puede notar en los glomérulos las anteras protegidas por es un perigonio de un color verde limón (León, 2003).
  
- **Floración.** Se considera a esta fase cuando el 50% de las flores de la inflorescencia de las panojas se encuentran abiertas, puede ocurrir aproximadamente a los 90 a 80 días después de la siembra, esta fase es muy sensible a las heladas y granizadas, debe observarse la floración a medio día cuando hay intensa luminosidad solar, ya que en horas de la mañana y al atardecer se encuentra cerradas, así mismo la planta comienza

a eliminar las hojas inferiores que son menos activas fotosintéticamente, se ha observado que en esta etapa cuando se presentan altas temperaturas que superan los 38 °C se causa aborto de las flores, sobre todo en invernaderos o zonas desérticas calurosas. Cuando hay presencia de veranillos o sequías de 10 a 15 días de duración en esta fase es beneficioso para una buena polinización; cruzada o autopolinizada, siempre en cuanto no haya presencia de heladas (León, 2003).

- **Grano lechoso.** El estado de grano lechoso es cuando los frutos que se encuentran en los glomérulos de la panoja, al ser presionados explotan y dejan salir un líquido lechoso, aproximadamente ocurre a los 100 a 130 días de la siembra, en esta fase el déficit hídrico es sumamente perjudicial para el rendimiento disminuyéndolo drásticamente el llenado de grano (en suelos franco-arenoso), pero en suelos francoarcilloso es normal (León, 2003).

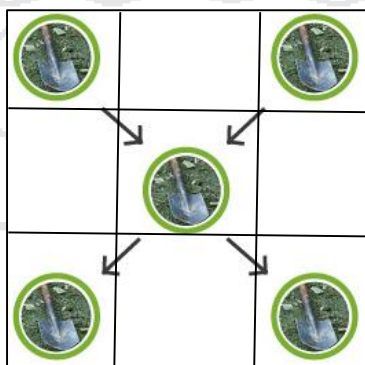
- **Grano pastoso.** El estado de grano pastoso es cuando los granos al ser presionados presentan una consistencia pastosa de color blanco, puede ocurrir aproximadamente a los 130 a 160 días de la siembra, en esta fase el ataque, de Kcona – kcona (*Eurysacca quinoae*) y aves (gorriones, palomas) causa daños considerables al cultivo, formando nidos y consumiendo el grano. En esta fase ya no son necesario las precipitaciones pluviales (lluvia) (León, 2003).

- **Madurez fisiológica.** Es cuando el grano formado es presionado por las uñas, muestra resistencia a la penetración, aproximadamente ocurre a los 160 a 180 días a más después de la siembra, el contenido de humedad del grano varía de 14 a 16%, el lapso comprendido de la floración a la madurez fisiológica viene a constituir el periodo de llenado del grano, asimismo en esta etapa ocurre un amarillamiento y defoliación completa de la planta. En esta fase la presencia de lluvia es perjudicial porque hace perder la calidad y sabor del grano (León, 2003).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 ÁMBITO DE ESTUDIO

La investigación se realizó en el distrito de Ilave, provincia El Collao, de la región Puno. Las muestras de suelos de cultivo de tres comunidades campesinas: Sarapi Arroyo, Sankuta y Pharata, las cuales se encuentran localizados en 19L 444622 8216785, 19L 443136 8218501, 19L 448033 822843, coordenadas UTM respectivamente (Figura 17), fueron colectadas de manera aleatoria, es decir el campo de cultivo delimitado en cada comunidad fue aproximadamente de 100 m<sup>2</sup>, dicho terreno se dividió en nueve cuadrantes y a partir de éstos cuadrantes indicados se colectaron las muestras en puntos al azar a profundidades de 5 a 20 cm con la ayuda de un pico y una pala (Figura 1), se muestreó 500 g de suelo de cada punto, posteriormente, fueron colocadas en bolsas de cierre hermético nuevas (ZIFLOC), las que se rotularon debidamente. A continuación las bolsas fueron colocadas en una caja de tecnopor con bolsas de hielo para mantenerlas a temperatura interna de 4°C aproximadamente (Zúñiga, 2010), hasta que las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UNA Puno. Los terrenos de donde se obtuvieron las muestras en la campaña agrícola previa tuvieron el siguiente historial agronómico los cuales se muestran en el Anexo 3.



**Figura 1.** Diagramas de puntos de sub muestreo en X en cada una de las zonas de muestreo.

#### 3.2 TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN

El tipo de investigación fue experimental y analítico, ya que se estableció la carga bacteriana solubilizadora de fosfato presente en suelos de cultivo de tres comunidades y se realizó la inoculación en semillas de quinua para evaluar su desarrollo por 45 días.

### 3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

La población de tipos de suelos de cultivo es muy amplia, es por eso que se planificó un muestreo al azar, por conveniencia. El número total de muestras evaluadas fueron de 9, en cada comunidad se muestrearon 3 suelos de cultivo en cada comunidad.

#### a. Evaluación de la carga microbiana de bacterias solubilizadoras de fosfato en suelos.

**Método.** Recuento en placa.

**Fundamento:**

La técnica se basa en contar las “unidades formadoras de colonias” o UFC presentes en un g o ml de muestra. Se considera que cada colonia que desarrolla en el medio de cultivo de elección después de un cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada, proviene de un microorganismo o de un agregado de ellos, de la muestra bajo estudio; ese microorganismo o microorganismos son capaces de formar la colonia, es decir una UFC. Para que las colonias puedan contarse de manera confiable, se hacen las diluciones decimales necesarias de la muestra, antes de ponerla en el medio de cultivo (Camacho *et al.*, 2009). En esta investigación se utilizó el medio National Botanical Research Institute (NBRIP), ya que es un medio selectivo que permite el crecimiento de microorganismos solubilizadores de fosfato ( $PO_4^{-3}$ ).

**Procedimiento:**

Para cuantificar las bacterias solubilizadoras de fósforo (P) a partir de muestras de tierra, se aplicó la metodología de diluciones seriadas, realizada por Tejera *et al.* (2013), para ello se pesó en balanza analítica de precisión marca Mettler Toledo 1 g del suelo y se adicionó a un tubo de ensayo que contenía 9 ml de solución salina (NaCl al 0,85%), se agitó manualmente por un periodo de un minuto. Seguidamente se obtuvo diluciones decimales seriadas desde  $10^{-1}$  hasta llegar a  $10^{-6}$ , se sembraron 0,1 ml por diseminación mediante asa de Drigalsky en medio National Botanical Research Institute (NBRIP) y se incubaron en la incubadora BINDER serie BD a 37 °C durante 72 horas, tal como se observa en la Figura 2.

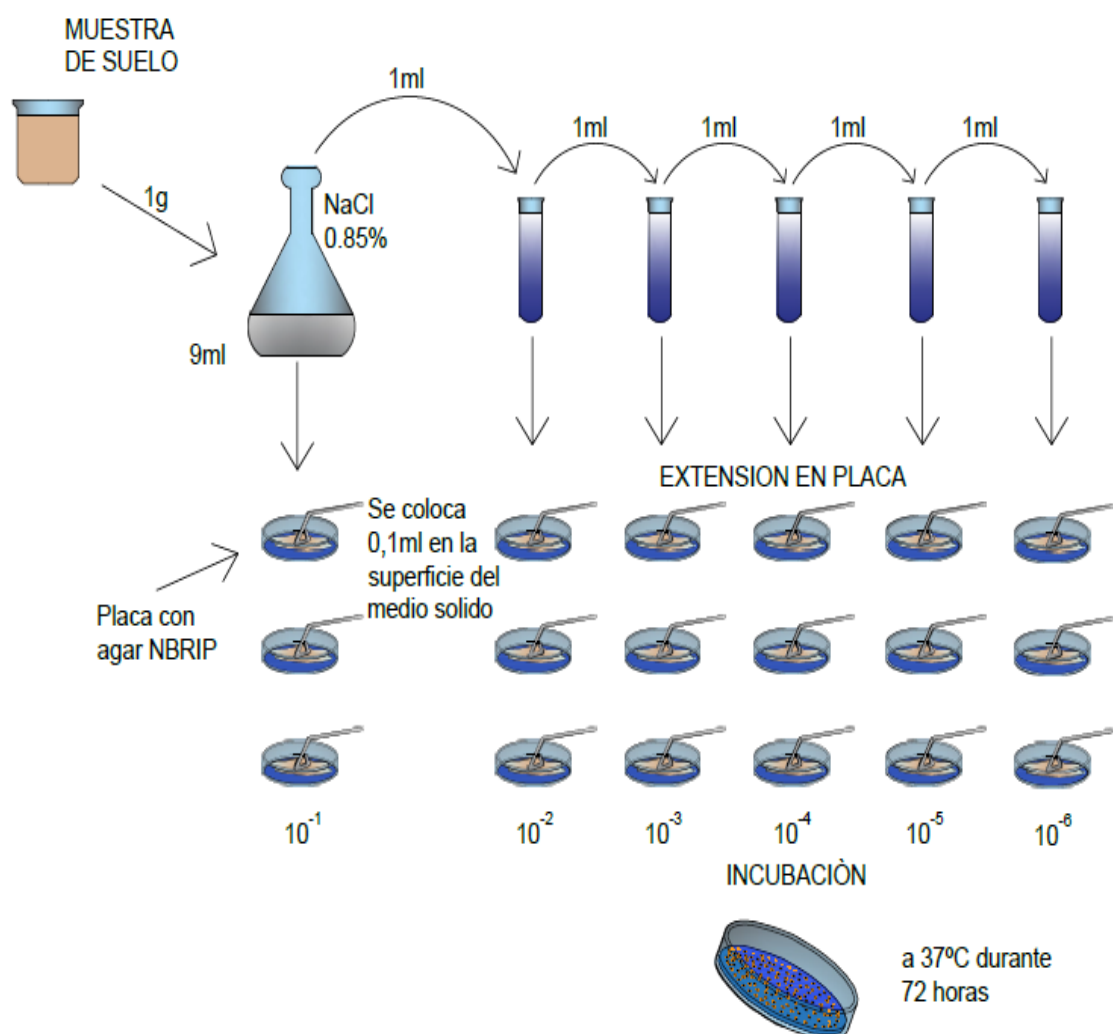


Figura 2. Proceso de recuento de UFC de bacterias solubilizadoras de  $PO_4^{3-}$ .



## b. Identificación del género *Bacillus*.

Antes de realizar la inoculación de bacterias en las semillas de quinua, las bacterias fueron plenamente identificadas hasta género, según la clave para la taxonomía bacteriana de *Bacillus*, tal como se muestra en la tabla 4 (Márquez, 2007).

**Tabla 4.** Clave para la taxonomía bacteriana del género *Bacillus*.

Cepa bacteriana	Catalasa	V.P	Nitrato	Citrato	Gas Pack	Almidón	Glucosa	Manitol	Xylosa	Arabinosa	Endospora
<i>B.subtilis</i> var. <i>Niger</i>	+	V	-	-	+	V	+	V	V	V	1
<i>B. cereus</i>	+	V	+	-	+	V	+	-	-	-	1
<i>B. laterosporus</i>	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	6
<i>B. subtilis</i>	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	1
<i>B. lichiniiformis</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	1
<i>B. pumilus</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	V	-	1
<i>B. firmus</i>	+	V	+	-	-	+	+	+	+	-	1 o 3
<i>B. alvei</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	3 o 4
<i>B.stearothermophilus</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	3
<i>B. coagulans</i>	+	+	V	-	+	-	+	+	-	-	4
<i>B. sphaericus</i>	+	V	-	-	-	+	-	-	-	-	5
<i>B. megaterium</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	1
<i>B. circulans</i>	+	+	V	-	+	V	+	-	-	-	3
<i>B. brevis</i>	+	-	V	+	-	-	V	V	-	-	4
<i>B. cereus</i> var. <i>Micoide</i>	+	V	+	-	+	+	+	-	-	-	1

+: Prueba positiva; -: Prueba negativa; V: variable; 1: espora central; 3: espora terminal, célula madre hinchada; 4: espora central, célula madre hinchada; 5: espora terminal redonda, célula madre hinchada; 6: espora lateral, célula madre hinchada fusiforme.

De todas estas pruebas bioquímicas las que se utilizaron para identificar bacterias del género *Bacillus* fueron: La determinación de endosporas, la prueba de la catalasa, la prueba de citrato y la prueba de almidón. Los procedimientos para cumplir esta identificación fueron los siguientes:

- **Tinción de Wirtz para tinción de endosporas**, Esta tinción permitió observar la presencia de endosporas bacterianas.

Fundamento.

Se fundamenta en que los constituyentes de esta estructura retienen fuertemente el colorante verde de malaquita al 7,6% tomando un color verde, y posteriormente se tiñe

con safranina al 0,25% para que de un contraste a la célula bacteriana (Valenzuela, 2003).

Procedimiento.

Un inóculo de la muestra se extendió en una lámina portaobjeto con la ayuda de un asa de siembra y se pasó por la flama de un mechero para fijarla, luego se procedió a teñir con verde de malaquita al 7,6% por 8 minutos, posteriormente se lavó con agua por unos 15 segundos, a continuación se agregó safranina al 0,25% por 15 segundos, después se lavó con agua y se procedió a secar la muestra teñida.

- **Tinción de Gram.** Esta tinción permitió ver si las bacterias en estudio pertenecieron a bacterias Gram positivas o Gram negativas. Para esto se utilizó: cristal violeta, lugol, alcohol acetona y safranina (Valenzuela, 2003).

Procedimiento.

Un inóculo de muestra se extendió en un portaobjeto con la ayuda de un asa de siembra y se fijó con la flama del mechero. Posteriormente se agregó violeta de genciana por un minuto, a continuación se lavó con abundante agua y se agregó lugol por un minuto. Posteriormente se lavó con abundante agua y se agregó alcohol acetona por 15 segundos, se volvió a lavar y se agregó safranina por 30 segundos. Una vez pasado el tiempo se lavó con agua y se procedió a secar la muestra en la flama del mechero. Las preparaciones teñidas se observaron al microscopio óptico compuesto marca Karl Zeiss. con un aumento de 100X.

- **Prueba de la catalasa.** La catalasa es una enzima que tienen la mayoría de las bacterias, cuya función es catalizar la ruptura del agua oxigenada, liberando oxígeno al ambiente (Valenzuela, 2003).

Procedimiento.

Para esta prueba se tomó un portaobjeto y se depositó un inóculo de las bacterias a examinar, sobre éstas se agregó una gota de agua oxigenada, la reacción fue positiva si existió liberación de burbujas.

- **Utilización de almidón.** El resultado de esta prueba permitió observar si la cepa bacteriana en estudio fue capaz de utilizar el almidón, secretando amilasas para la degradación de éste (Valenzuela, 2003).

Procedimiento. La cepa bacteriana se sembró con una asa en punta en forma ordenada sobre el agar almidón al 1% que se encontraba en placas Petri, posteriormente se

incubaron a 23 °C por 10 días, pasado el tiempo de incubación se agregó al interior de la placa solución de yodo para ver si la reacción es positiva (color yodo) o negativa (color azul o violeta).

- **Utilización de citrato.** Permitió determinar si la bacteria fue capaz de utilizar el citrato como única fuente de energía y carbono (Valenzuela, 2003).

#### Procedimiento

Se sembró un inóculo de la cepa bacteriana a estudiar en tubos que contenían agar Citrato Simmon inclinado, se dejó incubar a 23 °C por 24 horas. La reacción fue positiva si el medio de cultivo cambiaba del color verde original a azul. (Britania Lab, 2016).

- **Determinación de la solubilización de fosfatos.**

Preparación del medio: National Botanical Research Institute (NBRIP)

Primero se pesó: glucosa, 10 g;  $\text{Ca}_3\text{PO}_4$ , 5 g;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 5 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,25 g; KCl, 0,2 g;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1 g; Agar agar, 25 g; mezclando en 1000 ml de agua destilada y en ese orden, la solución se esterilizó en autoclave marca AESA por 30 min. Luego se agitó el recipiente (matraz) para mantener homogéneo el medio, pues el fosfato tricálcico tiende a precipitarse. En este punto se añadió azul de bromofenol como indicador de pH a una concentración de 0,025 g/l. se disolvió antes que solidifique el medio y se vertió en placas Petri plásticas estériles de 47 mm de diámetro, 3 cajas de 100 unidades (Millipore PD10 047 00).

La determinación cualitativa de la solubilización de fosfatos se llevó a cabo por siembra directa en el medio de cultivo de fosfatos National Botanical Research Institute (NBRIP), Las placas se incubaron a 37 °C durante 72 horas en incubadora BINDER serie BD, luego por un periodo de 20 días se siguieron incubando en una caja de tecnopor a temperatura ambiente; tiempo en que se observó el halo transparente alrededor de la colonias y las que presentaron un halo más grande, se aislaron y purificaron en Agar TSA marca BRITANIC para su identificación y posterior inoculación.

#### c. Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente aleatorio, los tratamientos correspondieron a las zonas de donde procedieron las muestras de suelo (tres comunidades campesinas, cada uno de ellos con tres puntos de muestreo) que formaron un total de 9 unidades experimentales. Los recuentos de bacterias solubilizadoras de P, fueron sujetos a pruebas descriptivas (media) y de dispersión (desviación estándar y coeficiente de

variación), posteriormente se realizaron los análisis de varianza y prueba de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) para su comparación entre zonas, todos los análisis estadísticos se realizaron con un nivel de confianza del 95%. Los datos se procesaron con el paquete estadístico INFOSTAT versión estudiantil 2016 para Windows.

**Fórmula de la media:** se obtiene sumando todos los valores en una población y dividiendo el total entre el número de valores que se sumaron.

$$Media = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N}$$

Donde  $\sum_{i=1}^N x_i$  indica que se deben sumar todas las (x) disponibles desde  $x_i$  hasta  $x_N$ . La secuencia de valores que debe sumarse se especifica mediante los símbolos N e  $i = 1$  que aparecen arriba y debajo de la letra griega  $\Sigma$  (sigma). El resultado tiene la misma unidad de medida que las lecturas individuales. La media se representa simbólicamente por la letra griega  $\mu$  (mu) cuando se obtiene de datos poblacionales, y mediante  $\bar{X}$  cuando se estima a partir de una muestra aleatoria simple.

**Fórmula de desviación estándar:** es la raíz cuadrada de la varianza

$$s = \sqrt{S^2}$$

Dónde: S indica desviación estándar y  $S^2$  varianza

**Formula de coeficiente de variación:** es el cociente entre la desviación estándar y la media muestral, expresado en porcentaje.

$$cv = \frac{s}{\bar{X}} 100\%$$

Dónde:

CV= coeficiente de variación

s= desviación estándar de la muestra

$\bar{X}$ = media aritmética de la muestra

**Modelo matemático análisis de varianza:** es un procedimiento que descompone la variabilidad total en la muestra (suma de cuadrados total de las observaciones) en

componentes (sumas de cuadrados) asociados cada uno a una fuente de variación reconocida

$$Y_{ij} = \mu + t_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = observación del tratamiento

$\mu$  = Promedio general

$t_i$  = efecto del tratamiento  $i$

$\varepsilon_{ij}$  = término de error aleatorio asociado a la observación  $Y_{ij}$

Las pruebas estadísticas se evaluaron:

Si el resultado es  $p < 0,05$  las pruebas son significativas

Si el resultado es  $p > 0,05$  las pruebas no son significativas

**Fórmula para prueba de Tukey:** calculó como valor crítico para la identificación de diferencias significativas, una cantidad (DMS) basada en el cuantil correspondiente de la distribución de rangos estudentizados.

$$W_{ij} = q \times \frac{CME}{r}$$

Donde:

$W_{ij}$  = comparador para el par de tratamientos  $ij$

$q$  = valor de la tabla de tukey, con grados de libertad de tratamientos y grados de libertad del error

CME = cuadrado medio del error

$r$  = son las repeticiones de los tratamientos.

**Evaluación del efecto de las bacterias del género *Bacillus* en la germinación y crecimiento de quinua en condiciones de invernadero.**

#### d. Ensayo de inoculación en semillas

Para la prueba se escogió la bacteria que mejor resultado demostró cualitativamente en la solución de fosfatos es decir la de mayor índice de solubilización. Para realizar este ensayo se realizó los procedimientos recomendados por Martínez *et al.* (2013)

Método: Inoculación al vacío

Se fundamentó en colocar un número definido de semillas previamente desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio 1% y etanol 25% por 2 min, en matraces independientes que contenían una suspensión predeterminada de bacterias cuantificadas en UFC/ml de cada cepa (Fryda y Otta, 1978; Valencia *et al.*, 2007).

Técnica: microgota

Se fundamentó en colocar en placas Petri microgotas de suspensión bacteriana de diluciones seriadas 1:10, el número de colonias consideradas ideal para el conteo es de 5 a 100 colonias por microgota, se puede realizar el conteo con relativa facilidad hasta 300 colonias por microgota. El número final de colonias que se obtuvo por la media aritmética de las repeticiones se corrigió a la dilución, concluyendo después que la suspensión original contenía UFC/ml (Da silva, 2010).

Procedimiento

Para evaluar el efecto de la inoculación sobre la germinación y desarrollo de plántulas, las cepas bacterianas fueron cultivadas en 500 ml de caldo nutritivo a una temperatura de 28 °C. Se produjeron inóculos de concentraciones de  $4,56 \times 10^5$  UFC/ml,  $1,96 \times 10^4$  UFC/ml y  $0,56 \times 10^3$ , las cuales fueron realizadas a través de diluciones seriadas en tubos que contenían 9 ml de solución salina estéril y cuantificadas por el método de la microgota, para el cual se sembró 50µl y 3 repeticiones por muestra en el medio de cultivo TSA (Lara y Negrete 2015).

Para cada concentración celular, 100 semillas de quinua (*Chenopodium quinoa Willd.*) VAR. Salcedo INIA certificadas, durante un tiempo de 60 minutos fueron embebidas en los bioinoculantes hasta cubrirlas y posteriormente fueron sembradas en bandejas de germinación con humus humedecido como se observa en la (Figura 3).



**Figura 3.** Siembra de 100 semillas de quinua en bandejas de humus humedecido.

Se realizaron cuatro tratamientos como son:

**Tratamiento C (control):** semillas embebidas en solución salina, sin ningún tipo de tratamiento

**Tratamiento 1:** semillas tratadas con el bioninoculante  $4,56 \times 10^5$  UFC/ml.

**Tratamiento 2:** semillas tratadas con el bioninoculante  $1,96 \times 10^4$  UFC/ml.

**Tratamiento 3:** semillas tratadas con el bioninoculante  $0,56 \times 10^3$  UFC/ml.

Diez días después de la siembra se registró el porcentaje de germinación para las semillas de quinua.

#### **Cálculo del porcentaje de germinación (PG)**

$$PG = ((\text{semillas germinadas}) / (\text{número total de semillas en prueba})) \times 100$$

#### **e. de crecimiento de plántulas de quinua inoculadas con bacterias solubilizadoras de fosfato.**

Como sustrato para el desarrollo de las plántulas se utilizó el suelo proveniente de la comunidad Sarapi Arroyo (B-II-A) al cual se le agregó humus de lombriz. Las macetas fueron rellenas con aproximadamente 2 kg de sustrato a la cual se le agregó 800 ml de agua destilada, en cada maceta se cultivó 50 semillas, las cuales fueron llevadas a condiciones de invernadero por un lapso de 45 días con 12 horas de luz diurna y una temperatura promedio de  $24,5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1,71$ . Las macetas se cambiaron al azar de lugar periódicamente, fueron fertilizadas periódicamente manteniendo siempre la capacidad de campo con una solución nutritiva con la siguiente composición: Nitrato de potasio,

nitrate de amonio, superfosfato triple de calcio, sulfato de magnesio y micronutrientes (hierro, boro, manganeso, cobre, zinc, molibdeno y cloro) el cual fue diluido 5 ml en 1 litro de agua. Al término del periodo, a los 45 días, donde se observó el desarrollo de la quinua con 6 hojas verdaderas se realizó la medición de los parámetros biométricos establecidos para este ensayo en cada planta y así como compararlas según el recuento bacteriano inoculado.

- ✓ **La longitud de la planta:** se midió en cm desde la raíz hasta el extremo superior.
- ✓ **El diámetro del tallo:** se midió en cm, en la mitad de la planta.
- ✓ **Longitud de la raíz:** se midió la raíz principal en cm.
- ✓ **Peso fresco de la planta:** se pesó el vástago hasta la parte aérea menos la raíz principal.
- ✓ **Peso seco de la planta:** se pesó en g, para obtener el peso seco constante se dejó secar en una mufla a 60 °C durante una hora.
- ✓ **Peso fresco de la raíz:** se pesó la raíz principal en g.
- ✓ **Peso seco de la raíz:** se pesó en g, para obtener el peso seco constante se dejó secar en una mufla a 60 °C durante una hora.

#### f. Análisis estadístico

Los tratamientos correspondieron a las concentraciones bacterianas inoculadas en las semillas, más un testigo sin inocular. La unidad experimental fue constituida por 32 unidades experimentales. Los datos obtenidos fueron analizados mediante pruebas estadísticas descriptivas (media) y de dispersión (desviación estándar y coeficiente de variación) y prueba de normalidad (Shapiro – Wilks modificado). Seguidamente para determinar si existieron o no diferencia estadística significativa entre los tratamientos, se aplicaron pruebas de análisis de varianza, seguidamente se realizaron pruebas de contraste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ), todos los análisis estadísticos se realizaron con un nivel de confianza del 95%.



## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 4.1 Determinación de la carga de bacterias solubilizadoras de fosfato en suelos de cultivo de la provincia de El Collao – Puno.

De la totalidad de BSF aisladas de los suelos de las comunidades, el 70 % de colonias aisladas correspondieron a bacilos Gram negativos, el 30 % a bacilos Gram positivos.

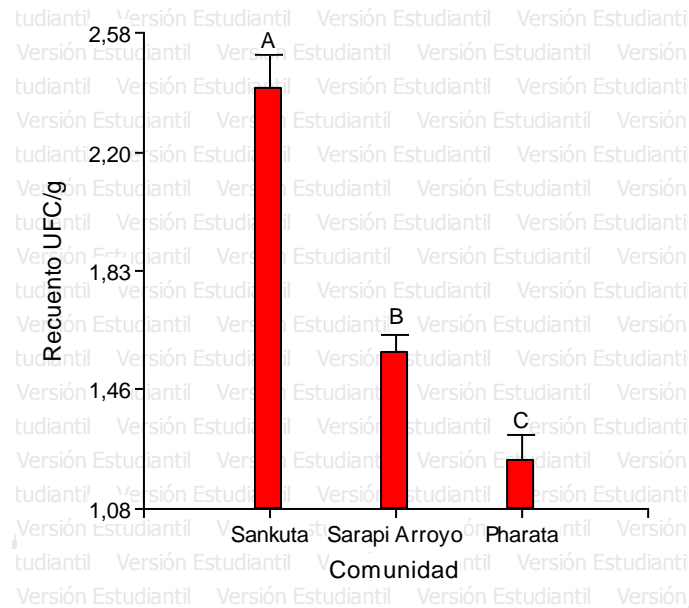
La carga bacteriana solubilizadora de fosfato en los suelos de las tres comunidades, oscilaron entre los promedios de  $2,40 \times 10^3$  UFC/g en la comunidad Sankuta,  $1,57 \times 10^3$  UFC/g en la comunidad Sarapi Arroyo y  $1,23 \times 10^3$  UFC/g en la comunidad Pharata, la mayor carga bacteriana encontrada en la comunidad de Sankuta se deba probablemente a que dicha comunidad actualmente está buscando la acreditación de la producción de quinua orgánica; por el cual han disminuido el uso de los fertilizantes químicos, tal como indican los productores de quinua de la zona (comunicación personal), en relación al historial agronómico se encontró mayor carga bacteriana en cultivos de la anterior campaña de cebada, quinua y habas.

**Tabla 5.** Cuantificación de carga bacteriana solubilizadora de fosfato en muestras de suelo a los 15 días de cultivo.

Comunidad	Carga bacteriana solubilizadora de fosfato (UFC/g) promedio de tres repeticiones			$\bar{X}$	D.E. (%)	C.V (%)
	A	B	C			
<b>Sarapi Arroyo</b>	$1,56 \times 10^3$	$1,77 \times 10^3$	$1,38 \times 10^3$	$1,57 \times 10^3$	0,17	11,03
<b>Sankuta</b>	$2,51 \times 10^3$	$2,71 \times 10^3$	$1,98 \times 10^3$	$2,40 \times 10^3$	0,33	13,79
<b>Pharata</b>	$1,16 \times 10^3$	$1,55 \times 10^3$	$0,99 \times 10^3$	$1,23 \times 10^3$	0,25	20,40

Dónde:  $\bar{X}$ = promedio; D. E. = desviación estándar; C. V. = coeficiente de variación.

Según el análisis de varianza y prueba de Tukey realizado a la carga bacteriana solubilizadora de fosfato, las tres comunidades evaluadas presentaron diferencia estadística significativa ( $F = 48,00$ ;  $GL = 2$ ;  $P = 0,0001$ ) (Tabla 7). Estos resultados también se representan gráficamente en la figura 4, en ella se muestra que los suelos de la comunidad Sankuta presentaron el mayor promedio de carga bacteriana solubilizadora de fosfato, seguida de la comunidad Sarapi Arroyo, siendo menor en la comunidad Pharata.



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Figura 4.** Comparación de la carga bacteriana solubilizadora de fosfato en suelos.

Se obtuvo un recuento bajo de carga bacteriana solubilizadora de fosfato a comparación de lo reportado por Guzmán (2011), que encontró en los suelos de la provincia de Chimborazo (Riobamba – Ecuador), los recuentos de bacterias solubilizadoras de fósforo que oscilaron entre  $4,16 \times 10^8$  y  $5,87 \times 10^8$  UFC/g, Ávila *et al.* (2015) encontró un promedio de  $5,5 \times 10^4$  ( $\pm 2,3 \times 10^4$ ) y  $6,9 \times 10^4$  ( $\pm 3,6 \times 10^4$ ) UFC/g de suelo asociadas a la rizósfera de *Baccharis macrantha* y *Viburnum triphyllum* respectivamente, por otro lado Kumar *et al.* (2011) Realizaron estudios de diversidad microbiana identificando a *B. subtilis* y *B. megaterium* dentro de las poblaciones cultivables de suelos agrícolas, cuya abundancia oscila entre  $10^3$  a  $10^6$  UFC/g de suelo.

Para comprender la diferencia de la carga bacteriana, que se realizó Análisis físico – químico de las muestras de suelo aplicando los métodos vigentes (Anexo 1), se obtuvo los resultados que se muestran en la (tabla 6).

El análisis del suelo se apoya en el hecho de que el suelo es el medio o fuente nutritiva por excelencia de las plantas. Por lo tanto la determinación de alguna característica de ese suelo, o del nivel de los bioelementos en él existentes, puede definir la posible alteración deficitaria de la planta sobre él cultivada (Navarro y Navarro, 2003).

**Tabla 6.** Análisis físico – químico de las muestras de suelo de las tres comunidades.

ANÁLISIS DE SUELOS							
#	CLAVE DE CAMPO	LUGAR	M.O	N.T	pH	C.E.	P
			%	%	U	mS/cm	Ppm
1	B-I-A	Sankuta	1,28	0,16	6,47	0,14	3,63
2	B-I-B	Sankuta	1,21	0,19	6,50	0,13	4,20
3	B-I-C	Sankuta	1,00	0,18	6,20	0,10	3,07
4	B-II-A	Sarapi Arroyo	0,88	0,21	6,25	0,06	4,30
5	B-II-B	Sarapi Arroyo	0,74	0,19	6,38	0,09	1,96
6	B-II-C	Sarapi Arroyo	0,80	0,17	6,30	0,07	2,52
7	B-III-A	Pharata	0,10	0,08	6,60	0,09	0,90
8	B-III-B	Pharata	1,27	0,22	6,59	0,11	4,25
9	B-III-C	Pharata	0,47	0,21	6,47	0,13	0,40

**Dónde:** M.O = materia orgánica, N.T = nitrógeno total, C.E = conductividad eléctrica, P= fosforo, U = unidades

**Fuente:** Anexo 2

Se observa que los suelos de cultivo de la comunidad Sankuta tienen materia orgánica y P disponible superior a los otros dos. Analizando la cantidad de microorganismos con las propiedades del suelo, se infiere que el mayor número de microorganismos solubilizadoras de fosfato podría ser el responsable de la mayor disponibilidad de P.

La variabilidad en el número de microorganismos solubilizadores de fosfato descrita previamente puede responder a múltiples causas, porque las poblaciones bacterianas en el suelo no se distribuyen al azar, factores como la composición de los suelos, la materia orgánica, el pH y el agua. Desempeñan un papel importante (Calvo, 2010; García *et al.*, 2015).

Los suelos de las tres comunidades analizadas fueron de tipo franco arenoso, presentaron materia orgánica (M.O) entre los valores de 0,74 – 1,28 % clasificados como suelos de bajo contenido de materia orgánica, excepto los suelos B-III-A y B-III-C de la comunidad Pharata que presentaron 0,10 y 0,47 % incluidos dentro de los suelos de muy bajo contenido de M.O (Andrades y Martines, 2014). Las funciones del suelo son directamente afectadas por la cantidad y la calidad de la materia orgánica que contiene, ya que es un constituyente y un indicador de la calidad del suelo y tiene incidencia sobre

propiedades físicas, químicas, biológicas dando lugar a múltiples interrelaciones (Casanellas *et al.*, 2003).

Los suelos de las comunidades Sankuta, Sarapi Arroyo y B-III-C Pharata presentaron un pH ácido ( $< 6,5$ ) que disminuye la asimilación del fósforo y lo precipita dando formas insolubles con magnesio, aluminio y hierro; mientras que B-III-A y B-III-B Pharata presentaron un pH neutro que fue favorable para la asimilación de la mayoría de los nutrientes (Andrades y Martínez., 2014). La reacción del suelo condiciona de forma decisiva no sólo la vida de los microorganismos y los importantes procesos en que ellos intervienen, sino también la mayor o menor asimilabilidad de muchos elementos químicos que para la planta son esenciales. Entre los microorganismos, está suficientemente reconocido que las bacterias y los actinomicetos actúan mejor en suelos minerales con valores de pH intermedios y elevados. Su actividad se reduce notablemente cuando el pH es inferior a 5,5 (Navarro y Navarro, 2003).

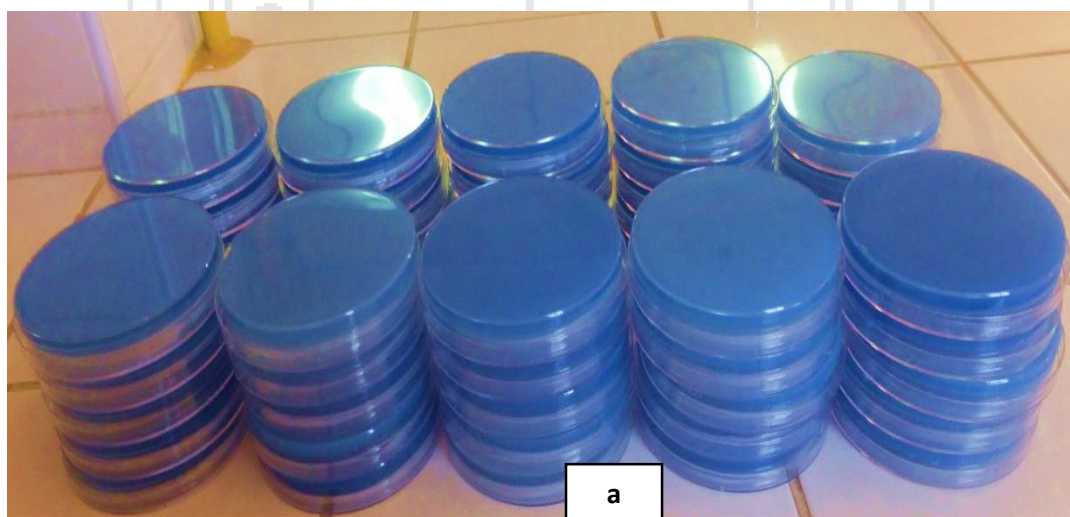
Los suelos de las tres comunidades presentaron, conductividad eléctrica por debajo de 0,14 mS/cm valores dentro de la clasificación como suelo no salino. La solución del suelo contiene siempre sales solubles en mayor o menor proporción pero si la cantidad de estas aumenta y alcanza un límite, la vegetación no puede subsistir (Andrades y Martínez, 2014).

Los suelos de las tres comunidades presentaron, fósforo disponible por debajo de 4.30 ppm, valores incluidos dentro de los suelos de bajo contenido de p (Andrades y Martines, 2014). Para un buen crecimiento la quinua necesita muchos nutrientes, sobre todo macro elementos como el oxígeno, carbono, hidrógeno, nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre. También necesita pequeñas cantidades de micro elementos como hierro, boro, zinc, cobre, sodio, molibdeno, cloro, cobalto y sílice (Gomes y Aguilar, 2016).

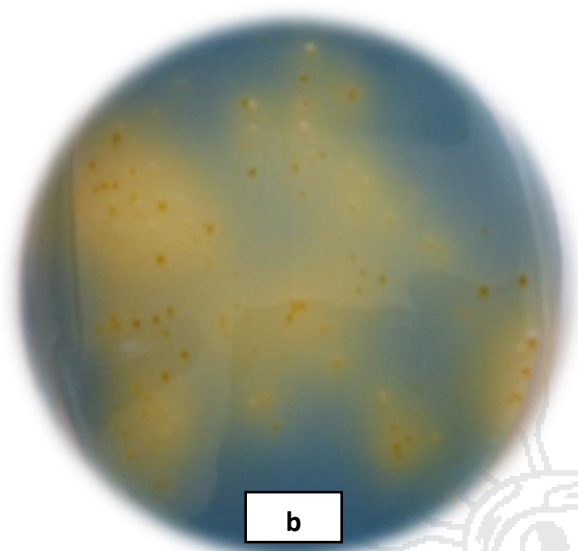
De acuerdo a los análisis, los suelos de las comunidades Sankuta, Sarapi Arroyo y Pharata presentaron una baja fertilidad, sin embargo la quinua puede crecer en un rango amplio de diferentes tipos de suelos, siendo los óptimos los de buen drenaje franco, con un alto contenido de materia orgánica. Se puede encontrar variedades de quinua cultivadas en suelos con pH desde 4,5 (en los valles interandinos del Norte del Perú) hasta 9,0 (altiplano peruano boliviano y los salares de Bolivia). La quinua es una planta exigente en nutrientes, principalmente en nitrógeno, calcio, fósforo y potasio; por ello requiere un buen abonamiento y fertilización (Gómez y Aguilar, 2016). En relación al

perfil agronómico de los suelos de cultivo evaluados en la campaña anterior se habían sembrado cultivos de avena, papa, quina y habas, se sugiere que la rotación en el altiplano sea de papa - quinua – habas (Tarwi) – cebada (avena) - forrajes, de esta manera aprovechar lo desmenuzado del terreno y los nutrientes residuales. Se debe evitar el monocultivo; pues permite que el suelo se esquilme y la incidencia de plagas y enfermedades se incrementen (Mujica *et al.*, 2013).

El crecimiento en placa de las colonias de bacterias solubilizadoras de fosfato, las cuales se caracterizaron por virar el medio de cultivo NBRIP (5.a) de color azul a amarillo (5.b) y por formar un halo transparente alrededor de la colonia (5.c). Aquellas colonias que presentaban los mayores halos de solubilización se purificaron en el medio TSA (5.d) y repicaron en el medio NBRIP para observar el mejor halo de solubilización y se eligió la cepa que presentó mayor halo de solubilización (5.e).

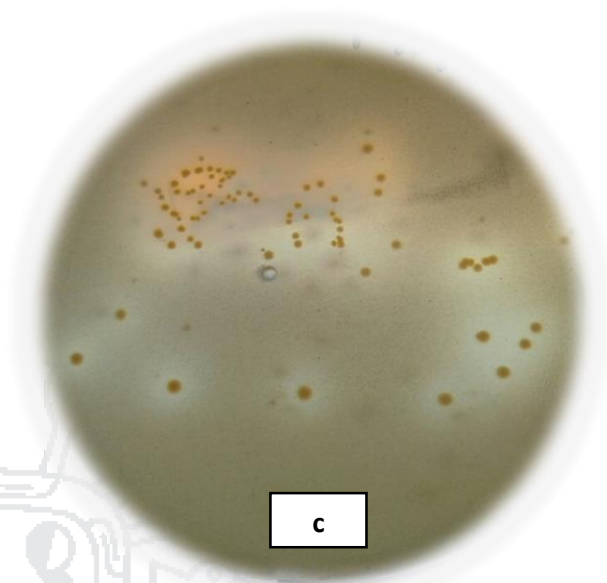


**Figura 5.a.** Placas Petri con medio de cultivo NBRIP.



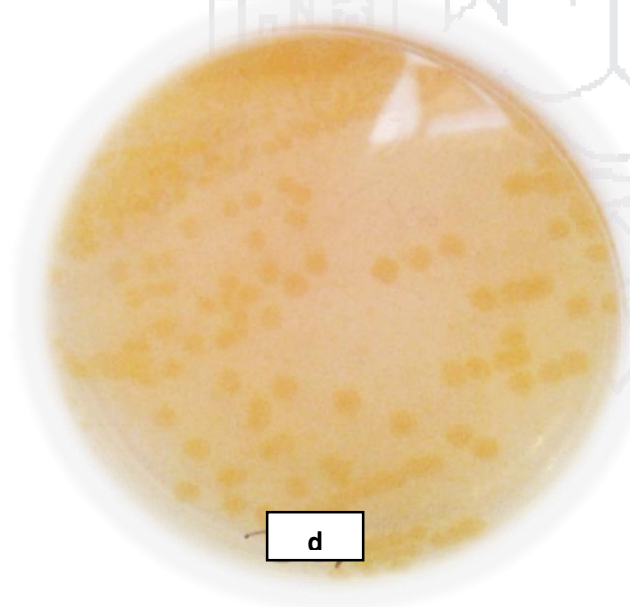
**b**

**Figura 5.b.** Viraje del medio de cultivo NBRIP de color azul a amarillo.



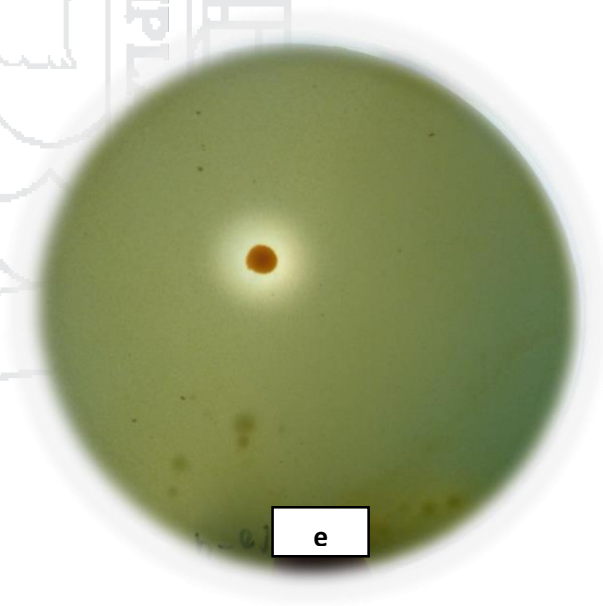
**c**

**Figura 5.c.** Halo transparente alrededor de la colonia.



**d**

**Figura 5.d.** colonias puras en medio TSA.



**e**

**Figura 5.e.** Mayor halo de solubilización alrededor de la colonia.

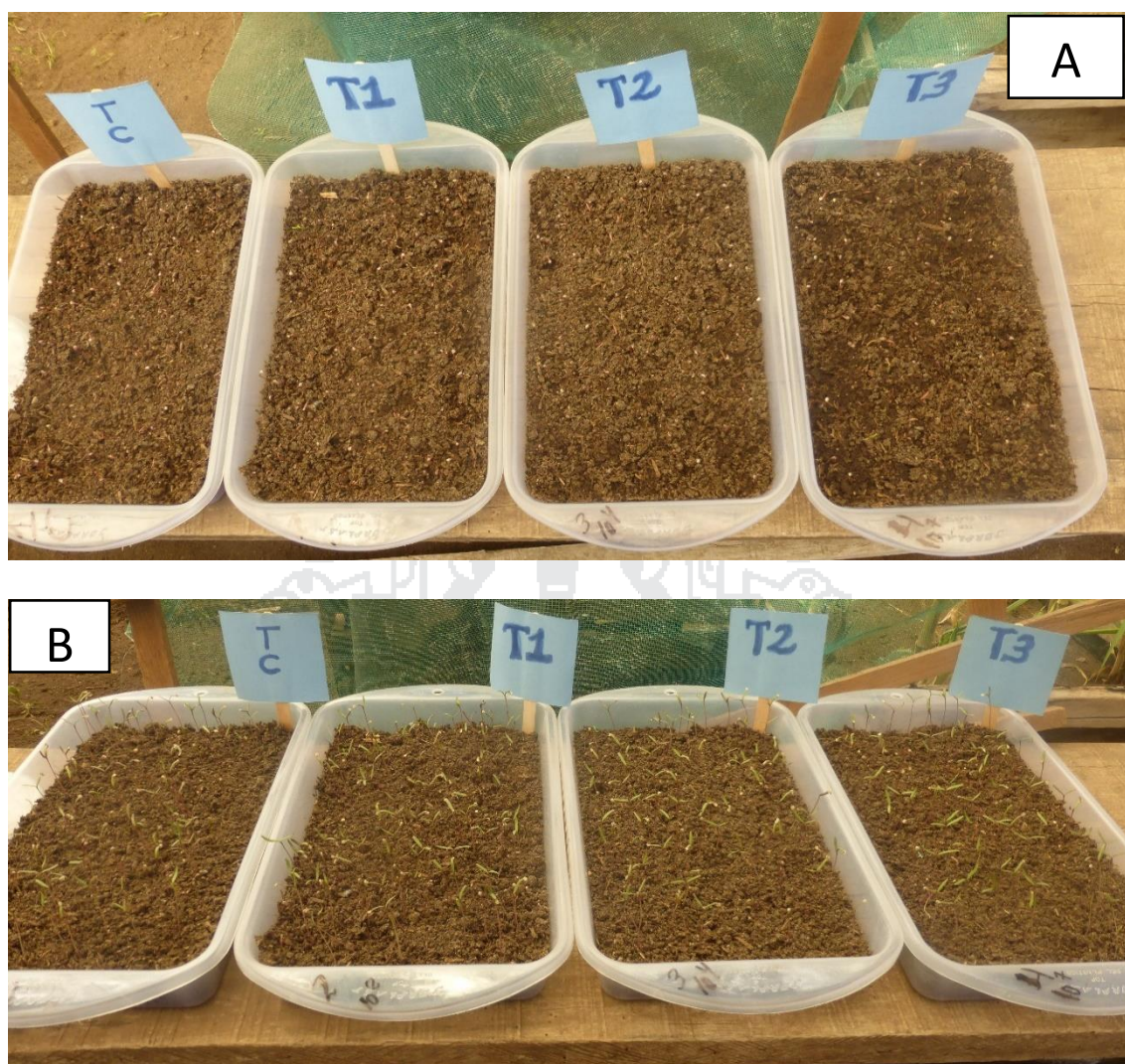
En esta investigación según las características de las colonias obtenidas en el medio NBRIP, crecieron colonias anaranjadas, redondas, borde irregular, consistencia cremosa, se colorearon como Gram positivos, forma bacilar, catalasa positiva, esporas esféricas y centrales. Estos rasgos de cultivo y pruebas bioquímicas, apoyan en afirmar que corresponden a bacterias del género *Bacillus spp.* En contraste a estos resultados Calvo *et al.* (2008), en la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*), reportan a bacterias del género *Bacillus* como el principal grupo y su presencia constante se debe a que poseen la capacidad de formar endosporas, y que las cepas bacterianas adaptadas a altitudes de la provincia de Puno, se deberían a que poseen genes de shock térmico inducibles que incluyen chaperonas y proteasas, y que entre sus beneficios fisiológicos para las plantas, se mencionan la capacidad de solubilizar los fosfatos, la síntesis de fitohormonas (ácido indol acético) y la capacidad de controlar hongos patógenos en la rizósfera.

Las bacterias acidificaron el medio de cultivo, por lo que se puede afirmar que la solubilización de fosfatos se lleva a cabo mediante un mecanismo que involucra la producción de ácidos orgánicos; lo que se ha descrito para bacterias de las especies *Bacillus megaterium* y *Pseudomonas fluorescens* (Badia *et al.*, 2011).

#### **4.2 Efecto de las bacterias del género *Bacillus* en el porcentaje de germinación y crecimiento de plántulas de quinua variedad Salcedo – INIA, hasta la fase fenológica de seis hojas verdaderas, en condiciones de invernadero.**

La cepa que se inoculó, primeramente fue identificada mediante pruebas bioquímicas, seguidamente se eligió aquella cepa del género *Bacillus spp* que presentó mayor halo de solubilización en el medio NBRIP.

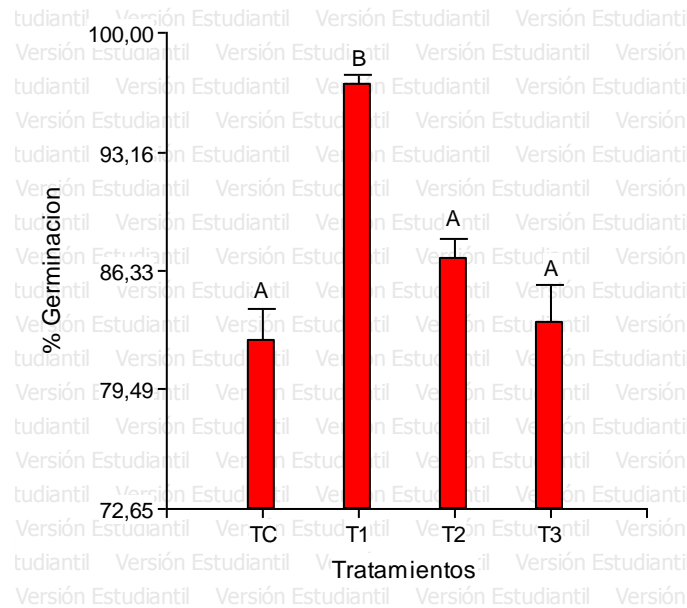
Al 7mo día de tratamiento de las semillas de quinua con bacterias solubilizadoras de fosfato, se obtuvo hasta el 97% de germinación que presentó el tratamiento 1, seguida del tratamiento 2 con 87%, el tratamiento 3 con 83% y el tratamiento control con 82% de germinación.



**Figura 6.** Germinación de las semillas de quinua los 3 días (A), y a los 7 días después de la siembra, donde se observa el tratamiento control y los tratamientos 1, 2 y 3 inoculadas con bacterias solubilizadoras de fosfato.

Luego de realizar el análisis de varianza y prueba de Tukey, los porcentajes de germinación variaron estadísticamente, siendo mayores en semillas inoculadas con el tratamiento 1, seguidas del tratamiento 2, 3 y tratamiento control que no presentaron diferencia estadística ( $F = 18,77$ ;  $GL = 3$ ;  $P = 0,0006$ ) (Tabla 8).





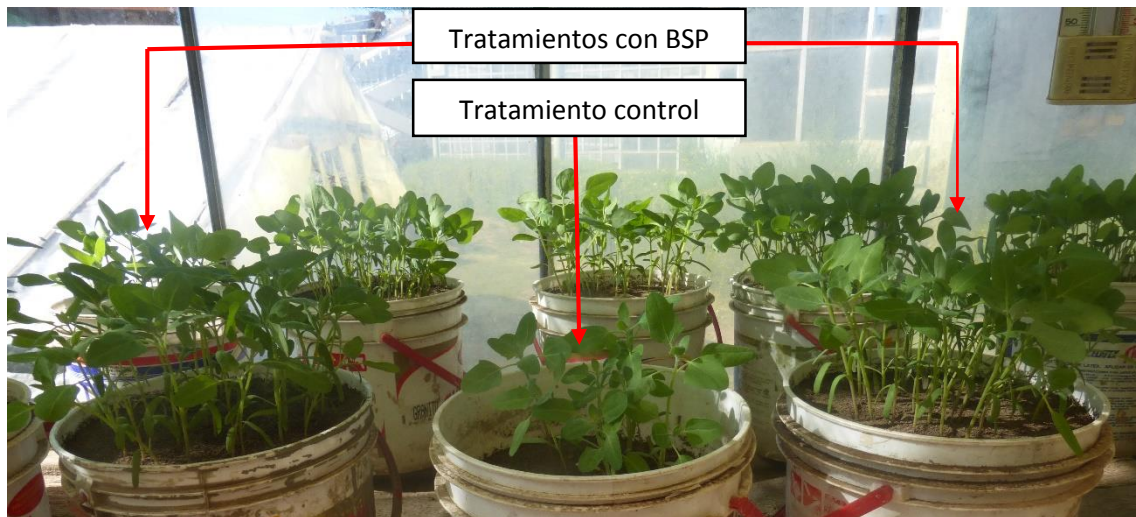
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Figura 7.** Efecto de las bacterias del género *Bacillus* en el porcentaje de germinación.

Los resultados obtenidos en la germinación de las semillas son similares a los obtenidos por Ávila *et al.* (2015), donde indica que los porcentajes de germinación de semillas de *B. macrantha* fueron mayores cuando estas fueron inoculadas con los tratamientos bacterianos, alcanzado valores superiores al 50% de germinación (65, 56 y 56% para *P. fluorescens*, *B. firmus* + *P. fluorescens* y *B. firmus* respectivamente), en tanto que el control tan solo alcanzó el 7% de germinación. Por otro lado Martínez *et al.* (2013), indican que en la inoculación de semillas de tomate mostraron que las cepas MA04 y MA17 aumentaron la germinación en 5 y 6%, respectivamente.

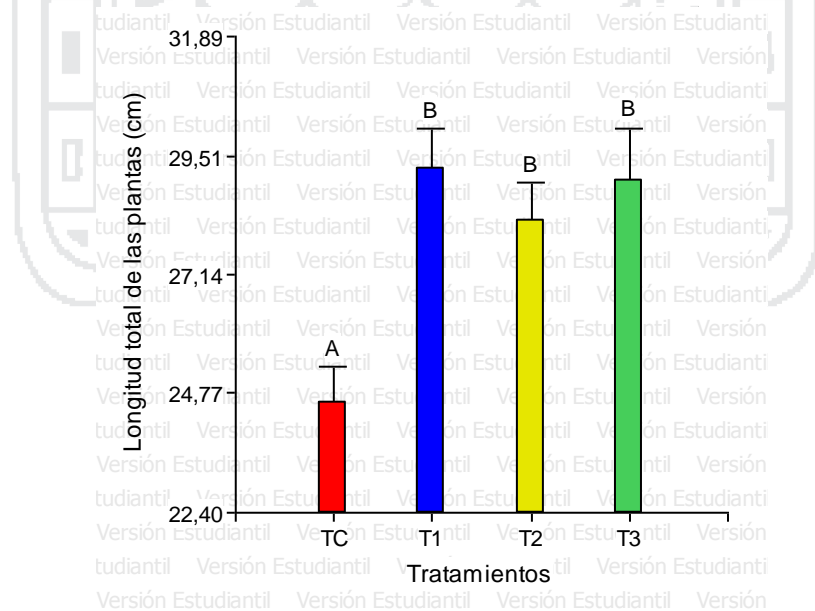
### Longitud de la planta (cm)

A los 45 días del ensayo fue más evidente el crecimiento de las plantas con los tratamientos 1, 2 y 3 con respecto al tratamiento control.



**Figura 8.** Desarrollo de las plantas con las 6 hojas verdaderas a los 45 días.

El efecto de las BSP en cuanto a la longitud de la planta el tratamiento 1 presentó la mayor longitud de 29,26 cm, seguida del tratamiento 3 con 29 cm y el tratamiento 2 con 28,20 cm, las plantas que fueron inoculadas con BSP con los diferentes tratamientos fue notoriamente superior al grupo control que presentó una longitud de 24,58 cm. Luego de realizar el análisis de varianza y prueba de Tukey, la longitud de la planta no presentó variación estadística entre los tres tratamientos, sin embargo entre los tratamientos y el grupo control hubo variación estadística, siendo mayores en plantas inoculadas con BSP ( $F = 6,66$ ;  $GL = 3$ ;  $P = 0,0015$ ) (Tabla 9).



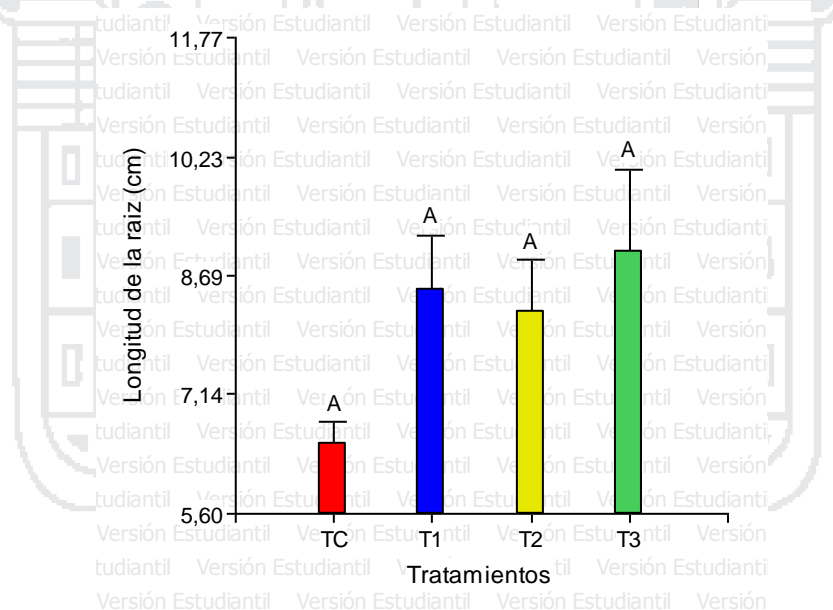
*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

**Figura 9.** Efecto de las bacterias Solubilizadoras de fosfato en la longitud de las plántulas.

Los resultados obtenidos en cuanto a la longitud de la planta están en concordancia con las investigaciones realizadas por Lara *et al.* (2013) quienes reportaron incremento en la altura de las plantas de rábano (*Raphanus sativus* L.). Con los tratamientos T2 (bioinoculante con el aislado Z32 de *E. cloacae*,  $10^6$  UFC/ml) y T7 (fertilizante mineral sintético comercial); resultados similares obtuvieron Lara *et al.* (2011) Reportan que la longitud de la planta (*Raphanus sativus*) (cm), denotaron valores más altos para los tratamientos T2 (semillas tratadas con bioinoculante  $10^6$  UFC/ml) Y T4 (semillas tratadas con bioinoculante  $10^8$  UFC/ml).

### Longitud de la raíz (cm)

Según el análisis de varianza y prueba de Tukey realizado a la longitud de raíz, los tratamientos evaluados no presentaron diferencia estadística significativa ( $F = 2,16$ ;  $GL = 3$ ;  $P = 0,1114$ ) (Tabla 10), sin embargo aritméticamente el tratamiento 3 presentó la mayor longitud de raíz con 9 cm, seguida del tratamiento 1 con 8,51 cm y el tratamiento 2 con 8,23 cm y el grupo control presentó una longitud de 6,51 cm.



*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

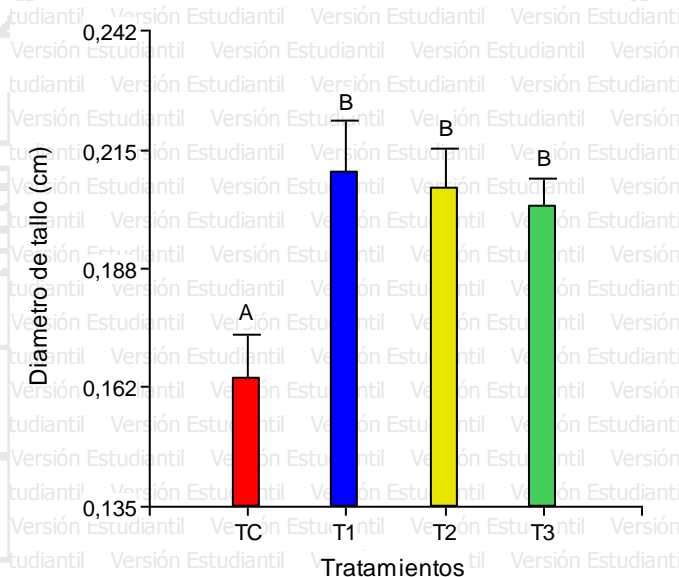
**Figura 10.** Efecto de las bacterias Solubilizadoras de fosfato en la longitud de raíz.

Los resultados obtenidos en longitud de la raíz, son similares a los obtenidos por Lara y Negrete (2015), indican que la longitud de la raíz (cm), luego de 35 días, el tratamiento T2 (semillas tratadas con bioinoculantes, en las concentraciones de  $10^6$ ,  $10^7$  y  $10^8$  UFC/m) logró una mayor longitud de raíz, con un valor superior a 6 cm, mientras que el

tratamiento T1 (semillas que no presentaron tratamiento alguno) y T3 (semillas tratadas con fertilizantes químicos) mostró una longitud alrededor 5,27 cm.

### Diámetro de tallo (cm)

El efecto de las BSP en cuanto al diámetro del tallo el tratamiento 1 presentó el mayor diámetro de tallo con 0,210 cm, seguida del tratamiento 2 con 0,206 cm y el tratamiento 3 con 0,202 cm y el grupo control presentó un diámetro de 0,164 cm. las plantas que fueron inoculadas con BSP con los diferentes tratamientos fue notoriamente superior al grupo control. Luego de realizar el análisis de varianza y prueba de Tukey, el diámetro del tallo no presentó variación estadística entre los tres tratamientos, sin embargo entre los tratamientos y el grupo control hubo variación estadística significativa, siendo mayores en plantas inoculadas con BSP ( $F = 5,23$ ;  $GL = 3$ ;  $P = 0,0054$ ) (Tabla 11).



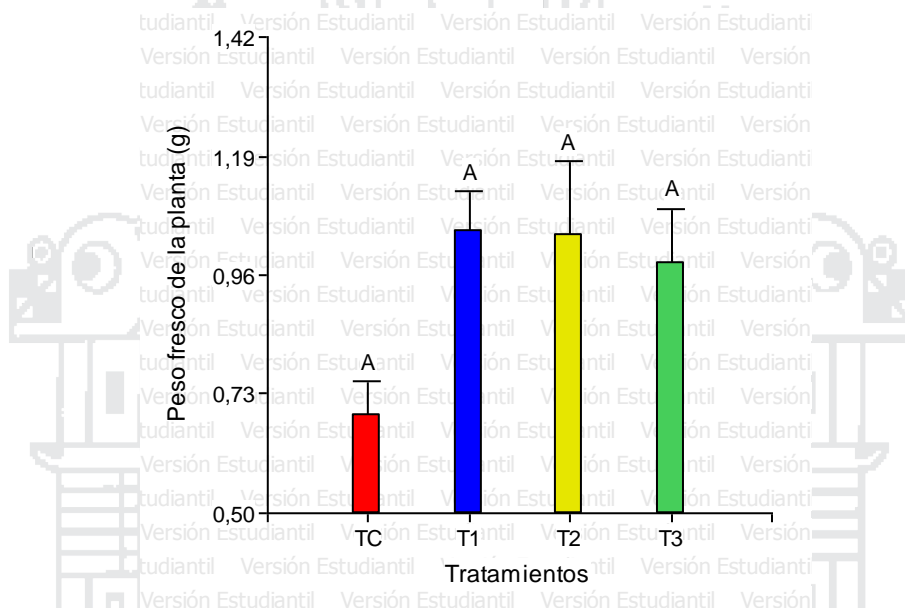
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Figura 11.** Efecto de las bacterias Solubilizadoras de fosfato en el diámetro de tallo.

Los resultados obtenidos en esta investigación están en concordancia con la investigación realizada por Martínez *et al.* (2013), indican que obtuvieron un aumento de manera significativa en relación al diámetro del tallo cuando inocularon las semillas de tomate con cepas de *Bacillus megaterium* (MA06) y *Bacillus subtilis* (MA12).

### Peso fresco de la planta (g)

Según el análisis de varianza y prueba de tukey realizado para el peso fresco de la planta, los tratamientos evaluados no presentaron diferencia estadística significativa ( $F = 2,16$ ;  $GL = 3$ ;  $P = 0,0655$ ) (Tabla 12). Estos resultados también se representan gráficamente en la figura 12 y en ella se muestra que aritméticamente el tratamiento 1 presentó el mayor peso con 1,05 g, seguida del tratamiento 2 con 1,04 g y el tratamiento 3 con 0,98 g y el grupo control presentó 0,69 g.



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

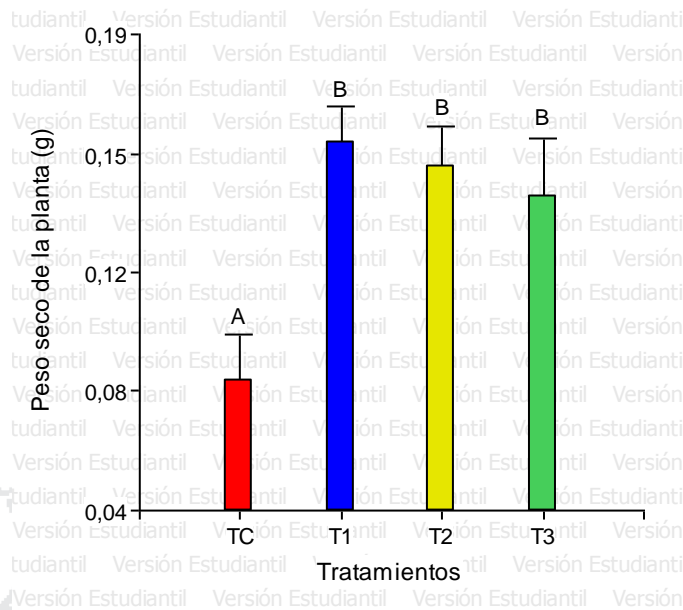
**Figura 12.** Efecto de las bacterias Solubilizadoras de fosfato en peso fresco de las plántulas.

Los resultados obtenidos en relación al peso fresco de la planta, están en concordancia con la investigación realizada por Lara et al. (2011), que reportan que no observaron diferencias estadísticamente significativas para el caso de peso fresco (mg) en plantas de rábano (*Raphanus sativus* L.).

### Peso seco de planta (g)

El efecto de las BSP en cuanto al peso seco el tratamiento 1 presentó el mayor peso con 0,153 g, seguida del tratamiento 2 con 0,147 g, el tratamiento 3 con 0,138 g y el tratamiento control presentó un peso seco de 0,084 g. Las plantas que fueron inoculadas con BSP con los diferentes tratamientos fueron notoriamente superiores al grupo control. Luego de realizar el análisis de varianza y prueba de Tukey, el peso seco de la planta no presentó variación estadística entre los tres tratamientos con BSP, sin

embargo si hubo variación estadística significativa con respecto al control, siendo mayores en plantas inoculadas con BSP ( $F = 5,47$ ;  $GL = 3$ ;  $P = 0,0044$ ) (Tabla 13).



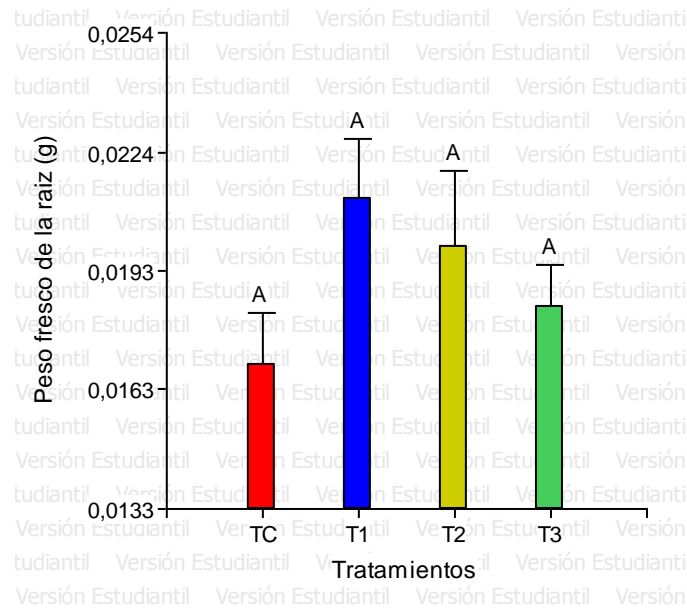
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Figura 13.** Efecto de las bacterias Solubilizadoras de fosfato en peso seco de las plántulas.

Los resultados obtenidos del peso seco de la planta, son similares a lo obtenido por Martínez *et al.* (2013), que indican que La cepa MA17 solo mejoró el peso seco del vástago y la biomasa en 12%, por otro lado Yauyo (2015), evaluó el efecto de la inoculación con microorganismos solubilizadores de fosfato (MSF) en plantas de haba y la cepa que incrementó el peso seco fue *Bacillus* sp.

### Peso fresco de la raíz (g)

Según el análisis de varianza y prueba de tukey realizado al peso fresco de la raíz, los tratamientos evaluados no presentaron diferencia estadística significativa ( $F = 1,16$ ;  $GL = 3$ ;  $P = 0,3430$ ) (Tabla 14). Estos resultados también se representan gráficamente en la figura 14 y en ella se muestra que aritméticamente el tratamiento 1 presentó el mayor peso con 0,0211 g, seguida del tratamiento 2 y 3 con 0,0199 y 0,0197 respectivamente y el tratamiento control presento 0,0169 g.



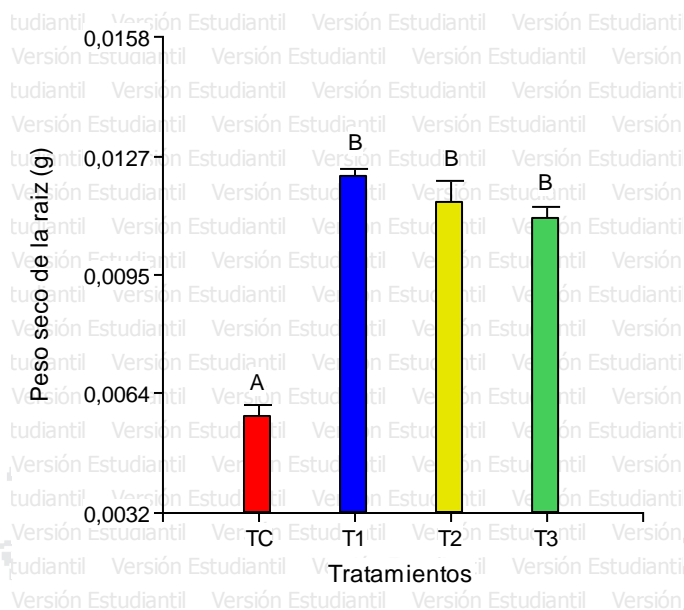
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Figura 14.** Efecto de las bacterias Solubilizadoras de fosfato en peso fresco de la raíz.

Los resultados obtenidos de peso fresco de raíz, se asemejan a lo reportado por Martínez *et al.* (2013), que indican que ninguna cepa tuvo efecto significativo en el peso de la raíz de plántulas de tomate y pimiento; asimismo, Lara *et al.* (2011), indican que no observaron diferencias estadísticamente significativas para el caso de peso fresco en la planta *Raphanus sativus*.

#### Peso seco de la raíz

El efecto de las BSP en cuanto al peso seco de la raíz el tratamiento 1 presentó el mayor peso con 0,0125 g, seguida del tratamiento 2 y 3 con 0,0119 y 0,0117g respectivamente, el grupo control presentó un peso seco de 0,0058 g. las plantas que fueron inoculadas con BSP con los diferentes tratamientos fue notoriamente superior al tratamiento control. Luego de realizar el análisis de varianza y prueba de Tukey, el peso fresco de la raíz, no presento variación estadística entre los tres tratamientos, sin embargo si hubo variación estadística significativa con respecto al grupo, siendo mayores en plantas inoculadas con BSP ( $F = 57,57$ ;  $GL = 3$ ;  $P = 0,0001$ ) (Tabla 15).



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Figura 15.** Efecto de las bacterias Solubilizadoras de fosfato en peso seco de la raíz.

Los resultados obtenidos en relación al peso seco de la raíz, son similares a los obtenidos por Lara *et al.* (2013), que indican que los tratamientos T1 (bioinoculantes que contenían la bacteria Z32 *Enterobacter cloacae*, a  $10^6$  UFC/ml), T5 (bioinoculantes que contenían la bacteria Z42 (*Klebsiella oxytoca*), a  $10^7$  UFC/m) y T7 (fertilizante químico comercial), influyeron en los mejores resultados de materia seca del rábano.

Los tratamientos que presentaron mejores resultados en la germinación de las semillas, la longitud de la planta, el diámetro de tallo, el peso seco de la planta y raíz fueron inoculados con bacterias solubilizadoras de fosfato. Estos tuvieron diferencias significativas con respecto a las semillas, plantas control sin inoculación bacteriana.

El efecto beneficioso reside que La promoción del crecimiento vegetal por parte de las especies del género *Bacillus* puede ocurrir de forma directa o indirecta. Un efecto directo sobre la promoción del crecimiento vegetal se observa en bacterias rizosféricas que poseen la capacidad de producir sustancias, sideroforos, llevar a cabo la fijación biológica del nitrógeno, la solubilización de minerales como el fósforo y la producción de hormonas reguladoras del crecimiento vegetal, Por su parte, la forma indirecta de promoción del crecimiento vegetal está relacionada con la producción de sustancias como los antibióticos que actúan como antagonistas de patógenos o induciendo resistencia en las plantas. (Torriente, 2010; Tejera *et al.*, 2011).



Dentro de los reguladores del crecimiento vegetal se encuentran las fitohormonas, formadas por un grupo de sustancias con actividad biológica que actúan sobre una determinada parte de la planta causando un efecto de crecimiento específico o de diferenciación. Entre ellas, se pueden hallar auxinas, giberelinas y citoquininas. En el caso del género *Bacillus*, se ha demostrado la producción de fitohormonas por las especies *Bacillus pumilus* y *Bacillus licheniformis* en la rizosfera de la planta *Alnus glutinosa*. Por otra parte se ha informado la producción de este tipo de metabolitos en *Bacillus subtilis* aislados de la planta *Dioscorea rotundata* L. en la que ejerce un efecto positivo en el crecimiento vegetal (Tejera *et al.*, 2011).

La elongación de las raíces, de la radícula podría atribuirse a la producción de algún metabolito bacteriano como el ácido indol acético (AIA). En las condiciones ensayadas, la inoculación no provocó en ninguno de los casos, un crecimiento significativo en el largo de la raíz principal en relación a las semillas no inoculadas. A pesar de que las cepas en estudio poseen la capacidad de producir AIA, puede ser que no lo estén expresando en estas condiciones, o que este provocando un aumento en el Largo de la radícula (cm).

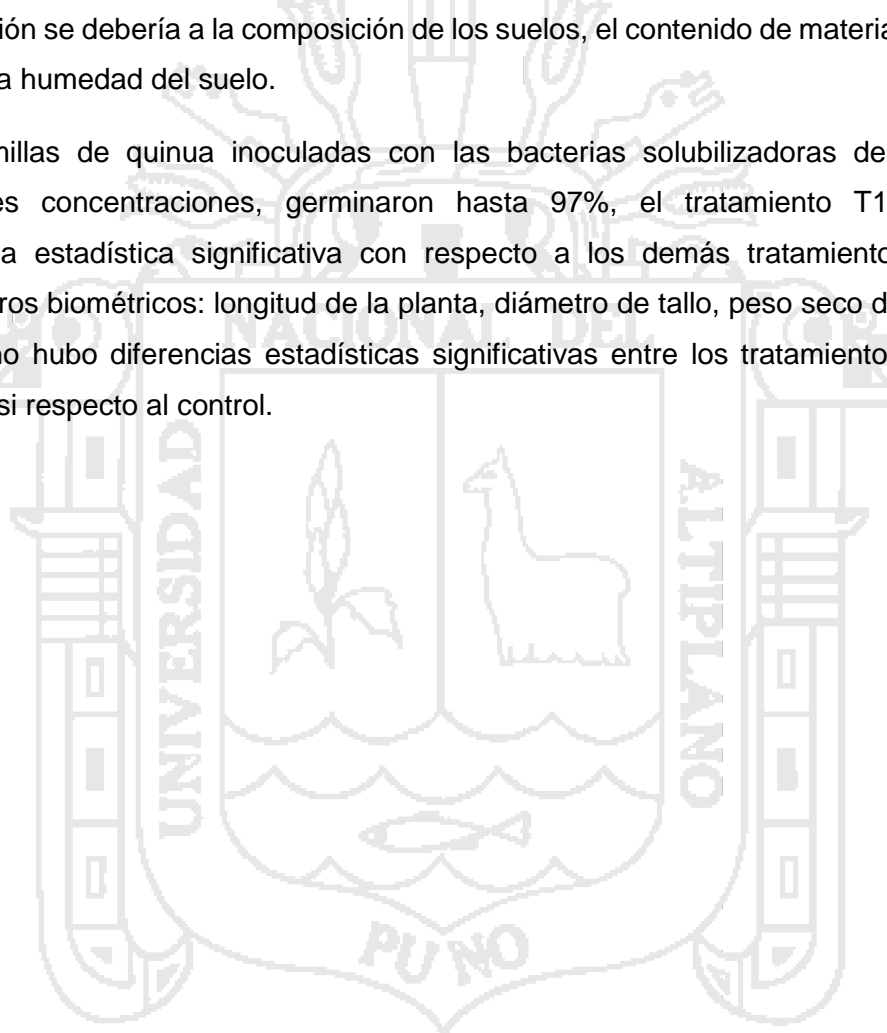
Xie *et al.* (1996) indican que la producción de AIA por las bacterias en bajas cantidades promueve la elongación de la raíz principal, mientras que cantidades altas de AIA provocan el aumento de la formación de raíces laterales y adventicias pero inhiben el crecimiento de la raíz principal. Las bacterias del presente estudio son productoras de AIA, en las condiciones del ensayo en la variedad de quinua pudieron haber producido altas concentraciones de AIA lo cual podría explicar el efecto inhibitorio observado sobre las raíces principales de dicha variedad. También el efecto de la inoculación en la elongación de las raíces depende del genotipo de las bacterias pero también del genotipo vegetal. Aunque, para verificar esto, deberían realizarse más repeticiones de los ensayo (Kapulnik *et al.*, 1985; Spaepen *et al.*, 2008).

La asimilación de fosfatos por los vegetales contribuye al aumento de su metabolismo, y ello se manifiesta en un mayor contenido de materia orgánica. La asimilación de una mayor cantidad de fósforo influye positivamente en la rápida formación y crecimiento de las raíces en estado de plántula, acelera la maduración, estimula la coloración de los frutos, ayuda a la formación de semillas, es un componente de los ácidos nucleicos, de los fosfolípidos (esenciales para la membrana celular) y de las moléculas de transferencia de energía como el trifosfato de adenosina (Madigan, 2003).

## V. CONCLUSIONES

La carga bacteriana solubilizadora de fosfato en las tres comunidades fue de  $2,40 \times 10^3$  UFC/g en Sankuta,  $1,57 \times 10^3$  UFC/g en Sarapi Arroyo, y de  $1,23 \times 10^3$  UFC/g en Pharata, existiendo diferencia estadística significativa entre los recuentos bacterianos, la variación se debería a la composición de los suelos, el contenido de materia orgánica, el pH y la humedad del suelo.

Las semillas de quinua inoculadas con las bacterias solubilizadoras de fosfato a diferentes concentraciones, germinaron hasta 97%, el tratamiento T1 presentó diferencia estadística significativa con respecto a los demás tratamientos. En los parámetros biométricos: longitud de la planta, diámetro de tallo, peso seco de la planta y raíz, no hubo diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos 1, 2 y 3 aunque si respecto al control.



## VI. RECOMENDACIONES

Ajustar las concentraciones bacterianas por el método Mc Farland para su posterior inoculación en semillas.

Realizar investigaciones de recuentos bacterianos en campañas de siembra de diferentes cultivos.

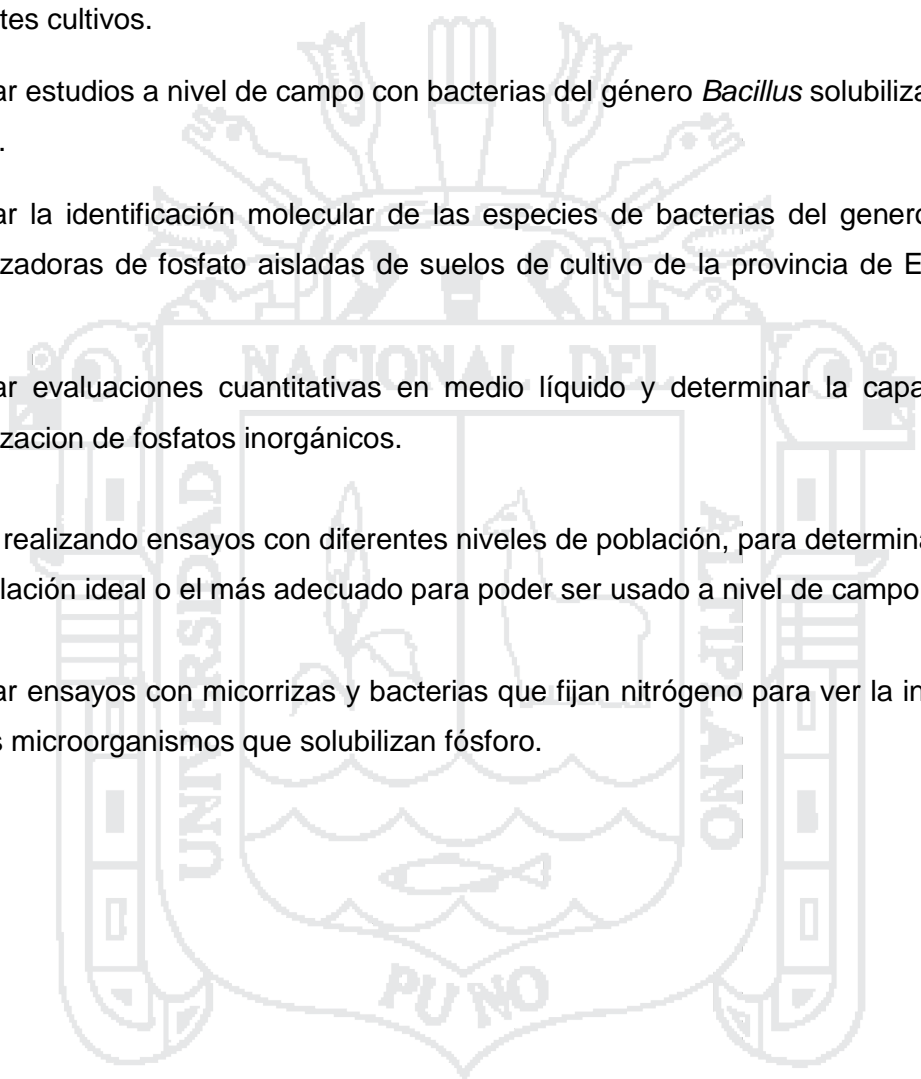
Realizar estudios a nivel de campo con bacterias del género *Bacillus* solubilizadoras de fosfato.

Realizar la identificación molecular de las especies de bacterias del género *Bacillus* solubilizadoras de fosfato aisladas de suelos de cultivo de la provincia de El Collao - Puno.

Realizar evaluaciones cuantitativas en medio líquido y determinar la capacidad de solubilización de fosfatos inorgánicos.

Seguir realizando ensayos con diferentes niveles de población, para determinar el nivel de población ideal o el más adecuado para poder ser usado a nivel de campo.

Realizar ensayos con micorrizas y bacterias que fijan nitrógeno para ver la interacción con los microorganismos que solubilizan fósforo.



## VII. REFERENCIAS

- Andrades M. y Maritnez E. 2014. Fertilidad del suelo y parámetros que la definen. 3ra edición.
- Anzuay M., Angelini J., Ludueña L., Fabra A. y Taurian T. 2016. Efecto de la inoculación de bacterias solubilizadoras de fosfato sobre el crecimiento de plantas de maní en ensayos en microcosmos. Artículo presentado a la 30 Jornada Nacional del Maní. Centro Ingenieros Agrónomos General Cabrera y Zona. Página web: [www.ciacabrera.com.ar/jornada\\_del\\_maní/](http://www.ciacabrera.com.ar/jornada_del_maní/).
- Astier M., Maass M. y Etchevers J. 2002. Derivación de indicadores de calidad del suelo en el contexto de la agricultura sustentable. Rev. Agrociencia. Vol. 36: p. 605 – 620.
- Ávila E., Lizarazo L. y Cortés F. 2015. Promoción del crecimiento de *Baccharis macrantha* (Asteraceae) con bacterias solubilizadoras de fosfatos asociadas a su rizósfera). Acta Biol. Colomb. Vol. 20(3): 121-131.
- Badia M., Hernadez B., Murrel J., Mahillon J. y Pérez M. 2011. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Revista Brasileira de Agroecología. Vol. XI (1): 90-99.
- Barceló J., Nicolás G., Sabater B. y Sánchez R. 2007. Fisiología vegetal. Edición. Pirámide. 553 p.
- Britania Lab. Tripteina Soya Agar. Medios de cultivo. Página web. <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/tripteinasoyagar.htm>. Revisado el día 2 de Junio del 2016.
- Burgues A. 1958. Micro-organisms in the soil.
- Calvo P., Meneses L. y Zúñiga D. 2008. Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. Revista Ecología Aplicada, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima – Perú. Vol. 7 (1,2): 141 – 148
- Camacho A., Giles M., Ortegón A., Palao M., Serrano B. y Velásquez O. 2009. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2da Edición. Facultad de Química. UNAM. México.
- Cano M., Torres C., Vargas M., Moreno H. y Cruzado A. 1984. Análisis de suelos, tejido vegetal, aguas y fertilizantes. Manual tecnico. Departamento de suelos de la estacion experimental Agrícola la Molina. Lima – Perú.

- Casafranca M. y Pahuachón m. 2014. Factores que limitan la competitividad de las asociaciones de productores quinua orgánica. Revista de Ciencias Empresariales de la Universidad De San Martin de Porres. Vol. (5): 39-52.
- Casanellas J., López R., Roquero de Laburu C. 2003. Edafología: para la agricultura y el medio ambiente (3a. ed.). Madrid, ES: Mundi-Prensa.
- Ceballos C. 2012. Efecto de la inoculación de bacterias solubilizadoras de fósforo a través de bioencapsulados en trigo (*Triticum aestivum* L.). Tesis para optar Título de Ingeniero Agrónomo. Valdivia – Chile.
- Coyne M. 2000. Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. Editorial Paraninfo. ITP An International Thomson Publishing company. Madrid – España.416 p.
- Cuervo J. 2010. Aislamiento y caracterización de *bacillus spp* como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales.
- Da silva R.2010. Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão. Universidad Federal De Vicosa. Departamento de fitopatología-Brasil.
- De Freitas J., Banerjee M. y Germida J. 1997. Phosphate – solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). Biology Fertility Soils. Vol. 24: 358-364.
- Doria J. 2010. Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. Rev. Cultivos tropicales. Vol. 31: 74-85.
- Fairlie A. 2016. La quinua en el Perú cadena exportadora y políticas de gestión ambiental. Lima - Perú. 86p.  
[file:///F:/quinua/Nro\\_6\\_Fairlie\\_quinua\\_Per%C3%BA.pdf](file:///F:/quinua/Nro_6_Fairlie_quinua_Per%C3%BA.pdf)
- Fankem H., Nwaga D., Deubel A., Dieng W. y Merbach W. Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon. African Journal of Biotechnology. Vol. 5(24): 2450-2460.
- Fernandez, L., Zalba, P., Gomez, M., y Sagardoy, M. 2005. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. Ciencia del suelo. Vol. 23(1), 31-37.
- Ferrera R. y Alarcón A. 2007. Microbiología Agrícola, hongos, bacterias y micro y macrofauna, control biológico y planta – microorganismo. Editorial Trillas. México. 568.

- Fryda S. and Otta J. 1978 Epiphytic movement and survival of *Pseudomonas syringae* on spring wheat. Rev. Phytopathology. Vol. 68: 1064 – 1067.
- Gallegos F., González A., Aguilar V., Cristóbal N., 2014. Biofertilizantes microbianos. Distrito Federal, México.
- García R., Lovaisa N. y Ulla E. 2015. Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfatos de Noroeste Argentino y su efecto en la promoción de crecimiento en maíz (*Zea mays* L.). Rev. Agron. Noroeste Argent. Vol. 35 (1): 19-28.
- Goitia Y. 2014. Aislamiento de bacterias diazotróficas en suelos de cultivo, virgen y humus de lombriz del distrito de puno y su efecto *in vitro* en la germinación de la quinua (*chenopodium quinoa* willd.). Tesis para optar grado de licenciado en biología. Puno - Perú
- Gomes L y Aguilar E. 2016. Guía de cultivo de la quinua. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura, universidad nacional agraria la molina Lima- Perú.
- Gómez Y. y Zabala M. 2001. Determinación de la capacidad solubilizadora de P en hongos aislados de la rizósfera del maní (*Arachis hypogaea* L.) Saber. Universidad de Oriente, Venezuela. Vol. 13(1): 8-13.
- González L. y Orozco A. 1996. Métodos de análisis de datos en la germinación de semillas, un ejemplo: *Manfreda brachystachya*. Bol. Soc. Bot. Mex. Vol. 58: 15 – 30.
- Guzmán E. 2011. Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fósforo a partir de cuatro suelos de la provincia de Chimborazo. Tesis de Licenciatura. Escuela de Ingeniería Agronómica, Facultad de Recursos Naturales, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba – Ecuador. 73 p.
- Habib Y. 2010. Evaluación de la diversidad de bacterias degradadoras de hidrocarburos aisladas de suelos de las cuencas de los ríos otún y la vieja. Trabajo de grado presentado como requisito Final para optar al título de Magister Scientiae en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia.
- Hansel C., Fendorf S., Jardine P. y Francis C. 2008. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. Department of Geological and Environmental Sciences, Stanford University, Standford, California. USA.
- Julca A., Meneses L., Blas R. y Bello S. 2006. La materia organica, importancia y experiencias de su uso en la agriculturata. Idesia Chile. Vol 24 (1) 49 – 61.

- Kapulnik Y., Okon Y. and Henis Y. 1985. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. *Can. J. Microbiol.* 31: 881 – 887.
- Khan M, Zaidi A. y Wani A. 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – A review. *Agronomy for Sustainable Development.* vol 27: 29-43.
- Kumar A., Prakash A. y Johri B. 2011. *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem. In: *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems.* D. Maheshwari (ed). Springer. Heidelberg. Germany. p. 37 – 59.
- Lara C. y Negrete J. 2015. Efecto de un bioinoculante a partir de consorcios microbianos nativos fosfato solubilizadores, en el desarrollo de pastos Angleton (*Dichantium aristatum*). *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol. XVII (1): 122 – 130.
- Lara C., Esquivel L. y Negrete G. 2011. Bacterias nativas solubilizadoras de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de córdoba - Colombia. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial.* Vol. IX (2): 114 – 120.
- Lara C., Sanes S. y Oviedo L. 2013. Impacto de bacterias nativas solubilizadoras de fosfato en el crecimiento y desarrollo de plantas de rábano (*Raphanus sativus* L.). *Rev. Biotecnología Aplicada.* Cuba. Vol. 30: 271-275.
- Larrea O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica).* Vol. 62: p. 96 – 100.
- León J. 2003. Cultivo de la quinua en Puno – Perú, descripción, manejo y producción. Texto universitario de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Altiplano. Puno – Perú. 62 p.
- Madigan M., Martinko J. y Parker J. 2003. *Brock Biología de los Microorganismos.* 10 ma edición. Editorial Prentice – Hall. Madrid – España.
- Márquez. J. 2007. Aislamiento y taxonomía de bacterias del género *Bacillus* recolectadas en suelos de un bosque de *Pinus radiata* y una permanente en distintas épocas de muestreo. Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de Licenciado en Ciencias Biológicas. Valdivia, Chile.
- Martínez L., Martínez R., Hernández M., Arvizu S. y Pacheco J. 2013. Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 36(1): 63-69.
- Morales H. 2012. Aislamiento y Caracterización de Fosfobacterias. Tesis presentada para obtener grado de licenciado en biología. Querétaro, México.

- Mujica A. 2000. Quinoa *Chenopodium quinoa* Willd. Ancestral Cultivo Andino, alimento del presente y futuro. Santiago, Chile.
- Mujica A., Canahua A. y Saravia R. 2013. Agronomía del cultivo de la Quinoa.
- Nautiyal S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganism. FEMS Microbiology Letters. Vol. 170: 265-275.
- Navarro S. y Navarro G. 2003. Química agrícola: el suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal, editorial mundi prensas, segunda edición. pág. 487
- Osorio N. 2007. Efectos benéficos de bacterias rizosféricas en la disponibilidad de nutrientes en el suelo y la absorción de nutrientes por las plantas. Facultad Nacional de Agronomía. Medellín, Colombia. Vol. 60 (1): 3621-3643.
- Pérez M., y Bocourt R. 2008. Empleo de probióticos basado en *Bacillus sp* y de sus endosporas en la producción avícola. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. Vol. 42(2):117-122, 2008. La Habana, CU: Instituto de Ciencia Animal.
- Pérez E., Sulbaran M., Balla M. y Yarzabal L. 2007. Isolation and characterization of mineral phosphate – solubilizing bacteria naturally colonizing an limonitic crust in the south – easterns Venezuelan región. Soil. Biol. Biochem. Vol. 39: 2905-2914.
- Prada L. 2013. Identificación de ácidos orgánicos causantes de la solubilización de fósforo inorgánico sintetizados por actinomicetos aislados de suelos en los andes orientales colombianos. Tesis, Posgrado De Microbiología Bogotá - Colombia.
- Rajankar P., Tambekar D. y Wate S. 2007. Study of phosphate solubilization efficiencies of fungi and bacteria isolated from saline belt of Purna river basin. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. Vol. (6):701-3.
- Ramírez T. 2009. Efectos de agroquímicos en las propiedades físico – químicas y biológicas en suelos del Táchira – Venezuela. Monografía de grado. Informe de Especialidad en Química Ambiental. Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga – Colombia. 106 p.
- Restrepo G., Marulanda S., Fe - P., Días A., Luisa V. y Hernández A. 2015. Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica.
- Rodas, A. 2006. La agricultura y Microorganismos. Revista electrónica Engormix. [Versión electrónica], 13-27
- Rodríguez H. Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Research review paper. Biotechnology Advances. Vol. 17:319-339.



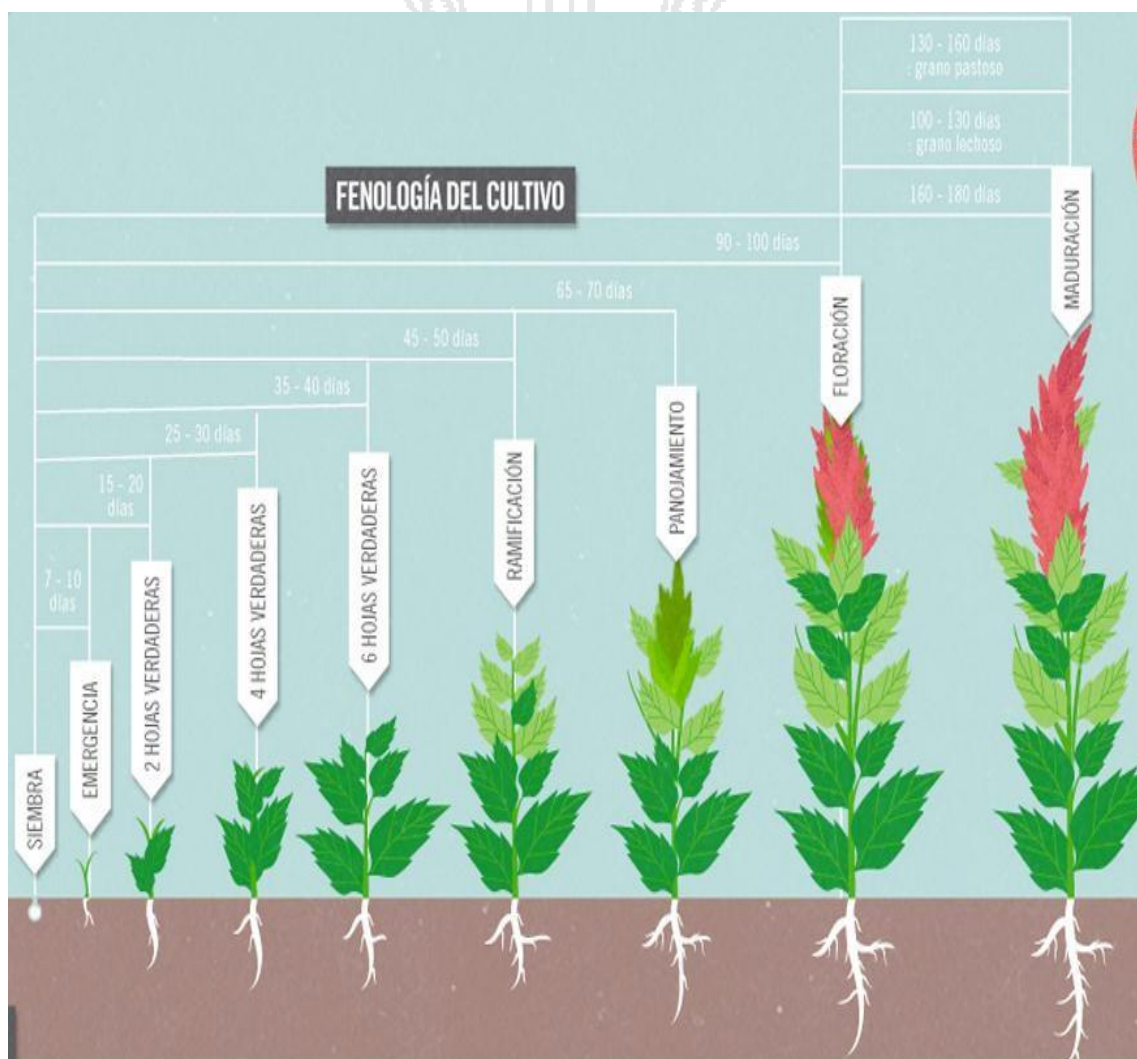
- Rueda E., Barrón J. y Hallmann J. 2009. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal. 1ra edición. 144 pág.
- Spaepen S., Dobbelaere S., Croonenborghs A. y Vanderleyden J. 2008. Effects of *Azospirillum brasilense* indole – 3 – acetic acid production on inoculated wheat plants. Plant Soil. 312: 15 – 23
- Tejera B., Heydrich M. y Rojas M. 2013. Aislamiento de *Bacillus* solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo de arroz. Rev. Agronomía Mesamericana. Costa Rica. Vol. 24 (5): 357 – 364.
- Tejera B., Rojas M. y Heydrich M. 2011. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. Revista CENIC. Ciencias Biológicas. Centro Nacional de Investigaciones Científicas la Habana - Cuba. Vol. 42, No. 3, pp. 131-138.
- Torriente, D. 2010. Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de la caña de azúcar. Perspectivas de su uso en Cuba. Cultivos Tropicales. Vol. 31 (1):19.
- Valencia A., Mendoza L., Silva H., Córdova L., Espinosa D., Valadez E. y Villaseñor H. 2007. Indicadores de agresividad y métodos de inoculación con bacterias fitopatógenas en plántulas y semillas de trigo “Seri M82”. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 30 (3): 255 – 259.
- Valenzuela E. 2003. Guía Pasos Prácticos Microbiología 112. Instituto de Microbiología. Universidad Austral de Chile. 40 p.
- Valero N. 2003. Potencial biofertilizante de bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fosfato asociadas al cultivo de arroz (*Oriza sativa*). Tesis de Maestría en Ciencias – Microbiología. Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.
- Vargas, S. 2012. Microorganismos solubilizadores de fosfato en suelos. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga.
- White P., Hammond J. 2008. Phosphorus nutrition of terrestrial plants. *The Ecophysiology of Plant-Phosphorus Interactions*, Vol. 7 Springer Netherlands. pp. 51-81.
- Xie H., Pasternak J. and Glick R. 1996. Isolation and characterization of mutants of plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2 that over produce indole acetic acid. Curr. Microbiol. Vol. 32: 67 – 71.

Yauyo M. 2015. Efecto de la inoculación con microorganismos solubilizadores de fósforo sobre el crecimiento y nutrición de frijol castilla, maíz, trigo y haba. Universidad nacional agraria la molina Lima- Perú

Zúñiga D. 2010. Caracterización y selección de bacterias promotoras de crecimiento en el cultivo orgánico de maca como herramienta biotecnológica para mejorar su calidad productiva. Perú biodiverso. Lima – Perú. 207 p.







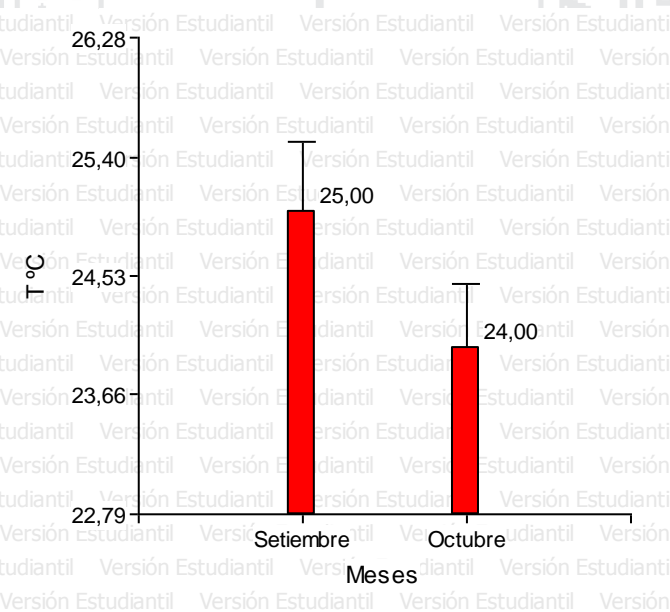
**Figura 16.** Fenología del cultivo de la quinua

**Fuente:** Goitia (2014).



**Figura 17.** Zonas de toma de muestras de suelos

Fuente. Google Eart (2013)



**Figura 18.** Temperatura (°C), en que desarrollaron las plántulas de quinua en los dos meses de ensayo en invernadero.

**Tabla 7.** Análisis de varianza del recuento de carga bacteriana.

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RECuento	27	0,80	0,78	14,99

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6,49	2	3,25	48,00	<0,0001
COMUNIDAD	6,49	2	3,25	48,00	<0,0001
Error	1,62	24	0,07		
Total	8,11	26			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,30608**

Error: 0,0676 gl: 24

COMUNIDAD	Medias	n	E.E.	
Pharata	1,23	9	0,09	A
Sarapi Arroyo	1,57	9	0,09	B
Sankuta	2,40	9	0,09	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

**Tabla 8.** Análisis de varianza para el porcentaje de germinación.

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
% Germinación	12	0,88	0,83	3,06

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	403,58	3	134,53	18,77	0,0006
Tratamientos	403,58	3	134,53	18,77	0,0006
Error	57,33	8	7,17		
Total	460,92	11			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=6,99974**

Error: 7,1667 gl: 8

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
TC	82,33	3	1,55	A
T3	83,33	3	1,55	A
T2	87,00	3	1,55	A
T1	97,00	3	1,55	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

**Tabla 9.** Análisis de varianza de la Longitud de la planta.

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
LONGITUD TOTAL	32	0,42	0,35	8,57

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	113,06	3	37,69	6,66	0,0015
TRATAMIENTOS	113,06	3	37,69	6,66	0,0015
Error	158,39	28	5,66		
Total	271,46	31			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,24692**

Error: 5,6569 gl: 28

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	
TC	24,58	8	0,84	A
T2	28,20	8	0,84	B
T3	29,00	8	0,84	B
T1	29,26	8	0,84	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Tabla 10.** Análisis de varianza de la Longitud de la raíz.

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
LONGITUD DE RAIZ	32	0,19	0,10	25,64

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	28,08	3	9,36	2,19	0,1114
TRATAMIENTOS	28,08	3	9,36	2,19	0,1114
Error	119,69	28	4,27		
Total	147,78	31			

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,82252**

Error: 4,2747 gl: 28

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	
TC	6,51	8	0,73	A
T2	8,23	8	0,73	A
T1	8,51	8	0,73	A
T3	9,00	8	0,73	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Tabla 11.** Análisis de varianza del diámetro de tallo.

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
DIAMETRO DE TALLO	32	0,36	0,29	13,57

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,01	3	0,0037	5,23	0,0054
TRATAMIENTOS	0,01	3	0,0037	5,23	0,0054
Error	0,02	28	0,0007		
Total	0,03	31			

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,03623**

Error: 0,0007 gl: 28

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	
TC	0,164	8	0,01	A
T3	0,202	8	0,01	B
T2	0,206	8	0,01	B
T1	0,210	8	0,01	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Tabla 12.** Análisis de varianza del peso fresco de la planta.

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PESO FRESCO DE LA PLANTA	32	0,22	0,14	30,91

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,68	3	0,23	2,69	0,0655
TRATAMIENTOS	0,68	3	0,23	2,69	0,0655
Error	2,36	28	0,08		
Total	3,04	31			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,39611**

Error: 0,0842 gl: 28

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	
TC	0,69	8	0,10	A
T3	0,98	8	0,10	A
T2	1,04	8	0,10	A
T1	1,05	8	0,10	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Tabla 13.** Análisis de varianza del peso seco de la planta.

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PESO SECO DE LA PLANTA	32	0,37	0,30	29,58

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,02	3	0,01	5,47	0,0044
TRATAMIENTOS	0,02	3	0,01	5,47	0,0044
Error	0,04	28	1,5E-03		
Total	0,07	31			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,05261**

Error: 0,0015 gl: 28

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	
TC	0,084	8	0,01	A
T3	0,138	8	0,01	B
T2	0,147	8	0,01	B
T1	0,153	8	0,01	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Tabla 14.** Análisis de varianza del peso fresco de la raíz.

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Columna2	32	0,11	0,02	23,98

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7,5E-05	3	2,5E-05	1,16	0,3430
Columna1	7,5E-05	3	2,5E-05	1,16	0,3430
Error	6,1E-04	28	2,2E-05		
Total	6,8E-04	31			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,00636**

Error: 0,0000 gl: 28

Columna1	Medias	n	E.E.
----------	--------	---	------



TC	0,0169	8	1,6E-03	A
T3	0,0197	8	1,6E-03	A
T2	0,0199	8	1,6E-03	A
T1	0,0211	8	1,6E-03	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Tabla 15.** Análisis de varianza del peso seco de la raíz.

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Peso seco raíz (g)	32	0,86	0,85	10,70

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,0E-04	3	6,7E-05	57,57	<0,0001
Tratamientos	2,0E-04	3	6,7E-05	57,57	<0,0001
Error	3,3E-05	28	1,2E-06		
Total	2,3E-04	31			

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,00147**

Error: 0,0000 gl: 28

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
TC	0,0058	8	3,8E-04	A
T3	0,0110	8	3,8E-04	B
T2	0,0115	8	3,8E-04	B
T1	0,0121	8	3,8E-04	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )



## DETERMINACION DE MATERIA ORGANICA (Método Walkey – Black Modificado)

### 1. Principio

La materia orgánica del suelo es evaluado por el medio del carbono orgánico, el cual se determina en forma directa por combustión cuantitativa o indirecta basada en la reducción del ion  $\text{Cr}_2 \text{O}_7^{-2}$  por la materia orgánica. Esta última forma es la que empleamos.

### 2. Fundamento

Consiste en oxidar la materia orgánica mediante dicromato de potasio, la materia oxidable por  $\text{Cr}_2 \text{O}_7^{-2}$ . El exceso de este ion es determinado por titulación con una solución valorada de  $\text{FeSO}_4$ , y la cantidad de sustancia oxidada es calculada de la cantidad de  $\text{Cr}_2 \text{O}_7^{-2}$  reducida (Cano *et al.*, 1984).

### 3. Procedimiento

- a. Llevar 1 g. (el volumen tomado) de muestra de suelo a un Erlenmeyer de 500 ml.
- b. Adicionar 10 ml. De dicromato de potasio 1 N.
- c. Mezclar mediante un movimiento de giro manual.
- d. Adicionar 20 ml. De ácido sulfúrico Q.P. mezclando mediante un giro manual durante un minuto (con el fin de asegurar el contacto íntimo del reactivo con el suelo). Dejar en reposo 30'.
- e. Se diluye la disolución a 200 ml. Con agua destilada.
- f. Agregar 10 ml de ácido fosfórico.
- g. Añadir 4 ml. de la disolución de indicador de difenilamina.
- h. Titular con sulfato ferroso amoniacal.  
A medida que se titula, el color verde oscuro vira hacia un azul turbio.
- i. En el punto final de la titulación el color vira bruscamente a verde brillante, con una gota, o aun con media gota de sulfato ferroso amoniacal.

## DETERMINACION DE NITROGENO TOTAL (Método Kjeldahl)

### 1. Principio

Cuando se trata una sustancia orgánica con ácido sulfúrico hirviendo, hay un derrumbamiento molecular por oxidación de la materia orgánica, formándose  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}_2$ ; el N se transforma en  $\text{NH}_3$ , que con el  $\text{H}_2\text{SO}_4$  forma  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ .

### 2. Fundamento

La determinación comprende 2 etapas

- a. Ataque o digestión de la muestra para convertir en amoniaco.
- b. Determinación del amoniaco en la muestra atacado o digerida.

El ataque es efectuado por calentamiento con ácido sulfúrico; además se incluyen sustancias que ayudan y favorecen la oxidación y conversión de N orgánico a amoniaco. Entre las que se tienen el  $\text{K}_2\text{SO}_4$  o  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  que incrementan la temperatura de la

digestión; catalizadores tales como: Hg, Cu o S<sub>e</sub>, que incrementan la rapidez de oxidación de la materia orgánica (Cano *et al.*, 1984).

3. Procedimiento
  - a. Pesar 5 g de la muestra de suelo y llevar a un balón de Kjeldahl de 800 cc.
  - b. Agregar la mezcla de catalizadores.
  - c. Añadir 30 cc. de ácido sulfúrico concentrado Q.P.
  - d. Llevar al ataque o digestión durante 1 hora más o menos, hasta que el contenido del balón tome un color claro.
  - e. Dejar enfriar por una media hora más o menos.
  - f. A continuación, se transvasa por decantación el líquido, sobrenadante a otro balón, cuidando que el residuo arenoso no sea transvasado.
  - g. Se lava el residuo del primer balón una o dos veces con agua de caño, y en cada vez se transvasa por decantación el líquido sobrenadante al segundo balón, como hay calentamiento, hay que hacerlo con cuidado. La cantidad de agua usada en los lavados no debe ser mayor de 400 o 500 cc.
  - h. Se añade al 2do. balón 100 cc. de soda (hidróxido de sodio) concentrado.
  - i. Inmediatamente llevar a destilación.
  - j. El destilado se recibe en un Erlenmeyer de 500 cc. el que contiene: 10 cc. de ácido sulfúrico 0.2 N, unos 100 cc. de agua destilada (para formar volumen) y 2 gotas de rojo de metilo.
  - k. Después de unos 15 a 20 minutos, se comprueba la terminación de la destilación con papel de fenolftaleína (si ha terminado, el papel permanecerá blanco, en caso contrario se coloreará de rojo o rosado).
  - l. Se titula el contenido del Erlenmeyer con hidróxido de sodio 0,2 N hasta viraje del color rojo a anaranjado.

### DETERMINACION DE pH (método electrométrico)

#### 1. Principio

El pH expresa la concentración de iones de hidrogeno (H<sup>+</sup>) de una solución acuosa y se define como el recíproco de la concentración del ion H<sub>i</sub><sup>+</sup> por lo tanto  $pH = \log. \frac{1}{CH^+}$

#### 2. Fundamento del método

En el método electrométrico se emplea el potenciómetro, en el cual se combinan un electrodo de comparación y un electrodo de medición formando una cadena de electrodos bipolar. Como electrodo de comparación se utiliza un electrodo de potencial constante llamado de calomel (CIK); como electrodo de medida se utiliza generalmente un electrodo de plata – hidrógeno (Cano *et al.*, 1984).

#### 3. Procedimiento

- a. Transferir 10 g de tierra fina, secada al aire (TFSA) pasada por tamiz 2mm. A un vaso plástico.
- b. Adicionar 22 ml de agua destilada. Relación tierra – agua 1:2.2
- c. Mezclar mediante el uso de una vagueta.
- d. Dejar en reposo 10 a 15 minutos.
- e. Calibrar el potenciómetro usando soluciones buffer de pH 7 y 10, de acuerdo a las instrucciones del equipo.
- f. Lavar los electrodos y secar con papel filtro después de cada lectura.

- g. Introducir los electrodos en la suspensión agua – suelo. Los extremos de los electrodos no deben tocar el fondo del vaso.
- h. Presionar el botón de lectura dl potenciómetro, esperar 30 segundos y registrar el valor del pH en la escala.

### **DETERMINACION DE FOSFORO DISPONIBLE (P) (Método Olsen Modificado)**

#### 1. Principio

La determinación del fósforo disponible consiste en la extracción del fósforo por medio de una solución extractiva (generalmente sales de ácidos débiles)

#### 2. Fundamento del método

Se basa en la determinación cuantitativa del P obtenido por la solución extractaste en forma colorimétrica. Los métodos del azul de molibdeno son los más sensitivos y por tanto los más usados para extractos de suelo que contienen pequeñas cantidades de P. estos métodos se basan en el principio de que en una solución acida de molibdato, conteniendo iones orto fosfato, se forma un complejo fosfomolibdato que puede ser reducido por ácido ascórbico y otros reductores, para dar un color azul de molibdato. La intensidad de color varía con las cantidades de P (Cano *et al.*, 1984).

#### 3. Procedimiento

- a. Tomar 2,0 g de suelo en un frasco o botella de 100 o 125 ml.
- b. Añadir igual cantidad de carbón
- c. Agregar 20 ml de la solución extractora de bicarbonato de sodio.
- d. Agitar durante 15 minutos.
- e. Filtrar usando un papel de filtro Whatman No 40.
- f. Del filtro tomar un alícuota de 3 ml
- g. Agregar 10 cc de la solución A.
- h. Dejar en reposo 30 minutos, para que desarrolle el color azul.
- i. Finalmente leer en el espectrofotómetro en banda de 660.

### **DETERMINACIÓN DE LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA (método conductimetria)**

#### 1. Fundamento

La conductividad eléctrica es la habilidad que tiene tiene una sustancia para transmitir o conducir una corriente eléctrica; generalmente se expresa en unidades de milisiemens por metro (mS/m). En algunas ocasiones se reporta la CE en unidades de decisiemens por metro (dS/m), que equivalen al valor de mS/m dividido por 100 (Cano *et al.*, 1984).

- a. Procedimiento
- b. Transferir 10 g de tierra fina
- c. Adicionar 22 ml de agua destilada. Relación tierra – agua 1:2.2
- d. Mezclar mediante el uso de una vagueta.
- e. Introducir el electrodo del conductímetro, hasta que el equipo se estabilice.
- f. Luego anotar el valor obtenido.





**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO – PUNO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**  
**LABORATORIO DE AGUAS Y SUELOS**



**ANÁLISIS DE SUELOS**

PROCEDENCIA : DISTRITO ILAVE EL COLLAO-PUNO.  
 INTERESADO : Maritza Yolanda Llanos Machaca  
 MOTIVO : Análisis Fertilidad  
 MUESTREO : 19/10/2016.  
 ANÁLISIS : 19/10/2016

# ORD	CLAVE DE CAMPO	ANÁLISIS MECÁNICO			CLASE TEXTURAL	CO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	M.O.	N. TOTAL
		LUGAR	ARENA %	ARCILLA %	LIMO %	%	%	%
01	B-I-A	Sancuta	NC	NC	NC	NC	1.28	0.16
02	B-I-B	Sancuta	NC	NC	NC	NC	1.21	0.19
03	B-I-C	Sancuta	NC	NC	NC	NC	1.00	0.18
04	B-II-A	Sarapi Arroyo	NC	NC	NC	NC	0.88	0.21
05	B-II-B	Sarapi Arroyo	NC	NC	NC	NC	0.74	0.19
06	B-II-C	Sarapi Arroyo	NC	NC	NC	NC	0.80	0.17
07	B-III-A	Pharata	NC	NC	NC	NC	0.10	0.08
08	B-III-B	Pharata	NC	NC	NC	NC	1.27	0.22
09	B-III-C	Pharata	NC	NC	NC	NC	0.47	0.21

# ORD	pH	C.E. mS/cm	C.E. (e) mS/cm	ELEMENTOS DISPONIBLES	
				P ppm	Aluminio me/100 g
01	6.47	0.14	0.70	3.63	0.00
02	6.50	0.13	0.65	4.20	0.00
03	6.20	0.10	0.50	3.07	0.00
04	6.25	0.06	0.30	4.30	0.00
05	6.38	0.09	0.45	1.96	0.00
06	6.30	0.07	0.35	2.52	0.00
07	6.60	0.09	0.45	0.90	0.00
08	6.59	0.11	0.56	4.25	0.00
09	6.47	0.13	0.65	0.40	0.00

FArA = Franco arcillo arenoso  
 Ar = Arcilloso  
 FArA = Franco arcillo arenoso  
 CIC = Capacidad Intercambio Catiónico  
 N = Nitrógeno total  
 K<sup>+</sup> = Potasio cambiante  
 A = Arena  
 Ca<sup>2+</sup> = Calcio cambiante  
 Na<sup>+</sup> = Sodio cambiante  
 CO<sub>3</sub><sup>+</sup> = Carbonatos  
 me = mili equivalente.

FAr = Franco arcilloso  
 M.O.=Materia orgánica  
 P = Fósforo disponible  
 K = Potasio disponible  
 C.E. = Conductividad eléctrica  
 SB = Saturación de bases  
 Mg<sup>2+</sup> = Magnesio cambiante  
 mS/cm = mili Siemens por centímetro  
 C.E. (e) = Conductividad eléctrica del extracto  
 Al<sup>3+</sup> = Aluminio cambiante  
 NC = No corresponde al tipo de análisis solicitado

*[Handwritten signatures and official stamps]*  
 TEC. Benito Fernández Collao  
 ANALISTA DE LAS COMISAS DE CALIDAD DE AGUA  
 PLANTAL BIOMATELÓLOGA DE AGUAS Y FERTILIZAN  
 Ing. M.Sc. Angiel Carr Chiriquel  
 JEFE DE LABORATORIO DE AGUAS, SUELOS Y PL.



ANEXO 3



**Tabla 16.** Historial agronómico de los suelos de cultivo evaluados

#	CLAVE DE CAMPO	LUGAR	CULTIVO	USO DE FERTILIZANTE
1	B-I-A	Sankuta	Avena	-
2	B-I-B	Sankuta	Quinoa	-
3	B-I-C	Sankuta	Quinoa	-
4	B-II-A	Sarapi Arroyo	Quinoa	-
5	B-II-B	Sarapi Arroyo	Cebada	-
6	B-II-C	Sarapi Arroyo	Papa	Urea
7	B-III-A	Pharata	Quinoa	-
8	B-III-B	Pharata	Habas	-
9	B-III-C	Pharata	Papa	Urea

**Fuente:** comunicación personal con los agricultores de la comunidad.

