



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Académico Profesional de Microbiología y Parasitología

**Selección de *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. y
actinomicetos productores de Ácido Indol Acético
(AIA) aislados de “Biol” de elaboración artesanal
provenientes de Lima y Huancayo**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo
Parasitólogo

AUTOR

Gladys Liliana LINO VILLANUEVA

ASESORES

Mg. Jorge LEÓN QUISPE

Dr. Oscar ORTIZ (Co-asesor)

Lima, Perú

2011

A mis padres

Agradecimientos

A mis padres Gladys y Julio por su ejemplo de fortaleza, por enseñarme que la perseverancia y esfuerzo son el camino para lograr objetivos, por creer en mis sueños y por ser parte de ellos.

A mi familia, en especial a mi hermano Julio, por sus ánimos y por estar siempre conmigo cuando lo necesito.

A Yul por su apoyo constante, por creer siempre en mí y por estar siempre conmigo en los momentos difíciles, haciéndome ver las cosas de un modo distinto.

Al Mg. Jorge León, mi asesor, por todo su apoyo, por sus conocimientos y por su infinita paciencia.

Al Dr. Oscar Ortiz, por su apoyo y confianza al brindarme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación.

A mis amigos de siempre: Susan, Denis, Juan Carlos, Cristian por su amistad por sobre todas las cosas.

A mis nuevas amigas del CIP, Alejandra, Rosalía, Mirella por el tiempo compartido en este último año.

Al Ing. Wilmer Pérez, Sr. Elvin, Julita, Sra. Liliam y Evita, por su colaboración y consejos valiosos.

Finalmente a todas las personas que a lo largo de este camino me dieron palabras de aliento y apoyo.

INDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MARCO TEÓRICO	3
2.1	El suelo	3
2.1.1	La nutrición y el crecimiento vegetal	3
2.2	Abonos orgánicos	6
2.3	Biodigestión anaerobia	8
2.4	Biol	12
2.5	Ácido Indol Acético (AIA)	14
2.6	Rizobacterias promotoras de crecimiento de las plantas	16
2.7	Características generales del género <i>Pseudomonas</i>	19
2.7.1	Clasificación Taxonómica: (Breed <i>et al.</i> , 1957).	19
2.7.2	Descripción general	19
2.8	Características generales del género <i>Bacillus</i>	21
2.8.1	Clasificación Taxonómica: (Breed <i>et al.</i> , 1957).	21
2.8.2	Descripción general	21
2.9	Características generales del grupo Actinomiceto	23
2.9.1	Clasificación Taxonómica: (Williams <i>et al.</i> , 1989)	23
2.9.2	Descripción general	23
III.	OBJETIVOS	25
IV.	HIPÓTESIS	25
V.	MATERIAL Y MÉTODOS	26
5.1	Lugares de ejecución del proyecto	26
5.2	Muestra biológica	26
5.3	Metodología	27
5.3.1	Preparación de los bioles	27
5.3.2	Muestreo	28
5.3.3	Evaluación de las bacterias productoras de AIA en las muestras de biol	31
5.3.3.1	Descripción del procedimiento	31
5.3.3.2	Cuantificación y aislamiento de <i>Pseudomonas</i> sp.	31
5.3.3.3	Cuantificación y aislamiento de <i>Bacillus</i> sp.	31
5.3.3.4	Cuantificación y aislamiento de Actinomicetos	32
5.3.3.5	Aislamiento y purificación de las cepas bacterianas	33
5.3.3.6	Caracterización de las cepas bacterianas mediante tinción Gram	33
5.3.3.7	Conservación de las cepas seleccionadas	33
5.3.4	Determinación de la producción de ácido indol acético	34
5.3.4.1	Prueba cualitativa	34
5.3.4.2	Prueba cuantitativa	35
5.3.5	Prueba de efectividad de la germinación de semillas	36
5.3.6	Análisis fisicoquímicos de las muestras de biol	37
5.3.6.1	Temperatura ambiental	37
5.3.6.2	Relación C:N	37
5.3.6.3	Temperatura del biol	37
5.3.6.4	pH	37
5.3.6.5	Nitrógeno total	38
5.3.6.6	Fósforo total	38
5.3.6.7	Potasio total	38

VI.	RESULTADOS	39
6.1	Evaluación de las bacterias productoras de AIA en las muestras de biol	39
6.1.1	<i>Pseudomonas</i> sp.	39
6.1.2	<i>Bacillus</i> sp.	42
6.1.3	Actinomicetos	45
6.2	Determinación de la producción de ácido indol acético	48
6.3	Prueba de efectividad de la germinación de semillas	54
6.4	Análisis fisicoquímicos del biol	57
6.4.1	Temperatura ambiental	57
6.4.2	Relación Carbono-Nitrógeno (C:N)	59
6.4.3	Temperatura del biol	61
6.4.4	pH	64
6.4.5	Nitrógeno, fósforo y potasio total	67
VII.	DISCUSIÓN	70
7.1	Evaluación de las bacterias productoras de AIA en las muestras de biol	70
7.1.1	<i>Pseudomonas</i> sp.	70
7.1.2	<i>Bacillus</i> sp.	71
7.1.3	Actinomicetos	73
7.2	Determinación de la producción de ácido indol acético	74
7.3	Prueba de efectividad de la germinación de semillas	78
7.4	Análisis fisicoquímicos	80
7.4.1	Temperatura ambiental	80
7.4.2	Relación C:N	80
7.4.3	Temperatura del biol	82
7.4.4	pH	83
7.4.5	Nitrógeno, fósforo y potasio total	84
VIII.	CONCLUSIONES	86
IX.	RECOMENDACIONES	87
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
XI.	ANEXOS	99

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	El rol de los macronutrientes en el desarrollo de las plantas.	4
Tabla 2.	Algunos géneros y especies representativas hallados en biodigestores.	11
Tabla 3.	Composición bioquímica del biol.	13
Tabla 4.	Diseño de los tratamientos para los biodigestores ubicados en el CIP – Lima	29
Tabla 5.	Diseño de los tratamientos para los biodigestores ubicados en el CIP – Huancayo	30
Tabla 6.	Promedio del recuento de <i>Pseudomonas</i> sp. en UFC/ml de biol (Lima)	40
Tabla 7.	Promedio del recuento de <i>Pseudomonas</i> sp. en UFC/ml de biol (Huancayo)	40
Tabla 8.	Promedio del recuento de <i>Bacillus</i> sp. en UFC/ml de biol (Lima)	43
Tabla 9.	Promedio del recuento de <i>Bacillus</i> sp. en UFC/ml de biol (Huancayo)	43
Tabla 10.	Promedio del recuento de actinomicetos en UFC/ml de biol (Lima)	46
Tabla 11.	Promedio del recuento de actinomicetos en UFC/ml de biol (Huancayo)	46
Tabla 12.	Evaluación de la producción de AIA por cepas de <i>Pseudomonas</i> sp. y <i>Bacillus</i> sp. para la prueba cualitativa y cuantitativa (Lima).	50
Tabla 13.	Evaluación de la producción de AIA por cepas de actinomicetos para la prueba cualitativa y cuantitativa (Lima).	51
Tabla 14.	Evaluación de la producción de AIA por cepas de <i>Pseudomonas</i> sp. y <i>Bacillus</i> sp. para la prueba cualitativa y cuantitativa (Huancayo).	52
Tabla 15.	Evaluación de la producción de AIA por cepas de actinomicetos para la prueba cualitativa y cuantitativa (Huancayo).	53
Tabla 16.	Análisis de varianza (ANOVA) de la germinación de semillas de lechuga de la prueba de efectividad para el hipocotilo.	54
Tabla 17.	Análisis de varianza (ANOVA) de la germinación de semillas de lechuga de la prueba de efectividad para la radícula.	54
Tabla 18.	Prueba de Duncan para la germinación del hipocotilo.	55
Tabla 19.	Prueba de Duncan para la germinación de la radícula.	55
Tabla 20.	Temperatura ambiental promedio (°C) registrada durante el periodo de ejecución del experimento en Lima	57
Tabla 21.	Temperatura ambiental promedio (°C) registrada durante el periodo de ejecución del experimento en Huancayo	58
Tabla 22.	Valores de C:N para los bioles de Lima	60
Tabla 23.	Valores de C:N para los bioles de Huancayo	61
Tabla 24.	Promedio mensual de temperatura (en °C) para los bioles de Lima.	62
Tabla 25.	Promedio mensual de temperatura (en °C) para los bioles de Huancayo	63
Tabla 26.	Valores de pH para los bioles de Lima	64
Tabla 27.	Valores de pH para los bioles de Huancayo	66
Tabla 28.	Valores promedio de nitrógeno, fósforo y potasio totales (en %) para los bioles de Lima	67
Tabla 29.	Valores promedio de nitrógeno, fósforo y potasio totales (en %) para los bioles de Huancayo.	69

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Biodigestores instalados en los campos del CIP-Lima.	27
Figura 2.	Colonias de <i>Pseudomonas</i> sp. en agar Cetrimide y tinción Gram de <i>Pseudomonas</i> sp.	39
Figura 3.	Dinámica poblacional de <i>Pseudomonas</i> sp. en los bioles de Lima	41
Figura 4.	Dinámica poblacional de <i>Pseudomonas</i> sp. en los bioles de Huancayo	41
Figura 5.	Colonias de <i>Bacillus</i> sp. en agar TGE y tinción Gram de <i>Bacillus</i> sp.	42
Figura 6.	Dinámica poblacional de <i>Bacillus</i> sp. en los bioles de Lima	44
Figura 7.	Dinámica poblacional de <i>Bacillus</i> sp. en los bioles de Huancayo	44
Figura 8.	Colonias de actinomicetos en agar AC y tinción Gram de actinomicetos.	45
Figura 9.	Dinámica poblacional de actinomicetos en los bioles de Lima	47
Figura 10.	Dinámica poblacional de actinomicetos en los bioles de Huancayo	47
Figura 11.	Prueba cualitativa de producción de AIA de <i>Pseudomonas</i> sp.	49
Figura 12.	Semillas de <i>Lactuca sativa</i> L. después de 120 h de incubación a diferentes concentraciones de AIA en µg/ml.	56
Figura 13.	Promedio mensual de temperatura ambiental durante el periodo de elaboración de los bioles, Lima.	58
Figura 14.	Promedio mensual de temperatura ambiental durante el periodo de elaboración de los bioles, Huancayo.	59
Figura 15.	Promedio mensual de temperatura (en °C) para los bioles de Lima.	62
Figura 16.	Promedio mensual de temperatura (en °C) para los bioles de Huancayo.	63
Figura 17.	Dinámica de pH para los bioles de Lima	65
Figura 18.	Dinámica de pH para los bioles de Huancayo	66
Figura 19.	Concentraciones (%) de nitrógeno, fósforo y potasio en los bioles de Lima.	68
Figura 20.	Concentraciones (%) de nitrógeno, fósforo y potasio en los bioles de Huancayo.	69

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Tablas	99
Tabla 30. Valores promedio de microelementos para los bioles de Lima.	99
Tabla 31. Valores promedio de microelementos para los bioles de Huancayo.	99
Tabla 32. Promedio de la longitud de radícula e hipocotilo a diferentes concentraciones de AIA.	100
Tabla 33. Resultados de absorbancia a diferentes concentraciones de AIA comercial, para la curva de calibración.	101
Tabla 34. Análisis fisicoquímicos de los insumos empleados en la elaboración de los bioles de Lima.	102
Tabla 35. Análisis fisicoquímicos de los insumos empleados en la elaboración de los bioles de Huancayo	102
Anexo 2: Figuras	103
Figura 21. Preparación de los bioles de Lima	103
Figura 22. Preparación de los bioles de Lima	103
Figura 23. Cepa de <i>Pseudomonas</i> sp. en agar Cetrimide, cepa de <i>Bacillus</i> sp. en agar TGE, y cepa de un actinomiceto en agar AC.	104
Figura 24. Curva de calibración de las diferentes concentraciones de AIA comercial.	105
Figura 25. Prueba de producción de AIA <i>in vitro</i> (cualitativa) de <i>Bacillus</i> sp.	105
Figura 26. Prueba de producción de AIA <i>in vitro</i> , tubos de ensayo para prueba cuantitativa de AIA de <i>Bacillus</i> sp.	106
Figura 27. Cámara usada en la incubación de semillas para la prueba de efectividad	106
Figura 28. Bioensayo de germinación de semillas de <i>Lactuca sativa</i> L. a diferentes concentraciones de AIA a las 120 h de incubación.	107
Anexo 3: Medios de cultivo y reactivos	108
Agar Almidón Caseína (AC)	108
Agar Cetrimide	108
Agar Nutricio (AN)	109
Agar Triptona Glucosa Extracto de carne (TGE)	109
Agar Tripticasa Soya (TSA)	109
Caldo Trpticasa Soya (TSB)	110
Reactivo de Salkowsky	110
Solución de L-Triptófano	110

RESUMEN

El “biol” es un abono líquido rico en fitohormonas, como las auxinas o mejor conocido como Ácido Indol Acético (AIA). Éste ácido estimula el desarrollo de las plantas y en general, la germinación de semillas. El uso del biol, en la agricultura peruana ha cobrado mucha importancia, pues asegura mayor rendimiento de la producción, incrementando a la vez la calidad de los cultivos y sobretodo ofreciendo alimentos libres de productos químicos. Para este trabajo se prepararon 22 muestras de biol artesanal con composiciones variables instalados en Lima y Huancayo. Se realizaron 10 muestreos durante un periodo de 150 días de biodigestión para seleccionar *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. y actinomicetos productores de AIA, los cuales fueron identificados por sus características culturales y pruebas preliminares. Posteriormente con todas las cepas seleccionadas se realizó la prueba cualitativa y cuantitativa del AIA. El 20% de *Pseudomonas* sp., 17,07% de *Bacillus* sp. y 21,35% de actinomicetos aislados resultaron positivos a la prueba de AIA y fue posible cuantificar su producción. Asimismo, se realizó una prueba de efectividad del AIA producido por nueve bacterias para evaluar su efecto promotor de crecimiento sobre el hipocotilo y la radícula en semillas de *Lactuca sativa* L. (lechuga). El análisis estadístico de las pruebas señaló que los resultados son altamente significativos, mostrando los mejores resultados la cepa PSIV-1-L para el hipocótilo y la cepa PSII-7-L para la radícula. Se comprobó así la presencia de bacterias productoras de AIA en las muestras de biol de preparación artesanal y a la vez fue posible evidenciar un efecto positivo sobre la germinación *in vitro* de semillas de *Lactuca sativa* L. (lechuga).

Palabras clave: Biol, Ácido Indol Acético (AIA), *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., actinomicetos.

ABSTRACT

“Biol” is an organic fertilizer rich in phytohormones such as auxins or known as Indole Acetic Acid (IAA). This acid stimulates the growth of plants in general and seed germination. In Peruvian agriculture, biol is becoming more important, because it ensures greater production efficiency, increasing crop quality and overall offers chemical-free food. In this work we prepared 22 “biol” samples with variable compositions established in Lima and Huancayo. 150 days of biodigestion was the period to select *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp and actinomycetes producers of IAA, that were identified by their cultural characteristics and preliminary testing. Subsequently, all selected strains, we tested in qualitative and quantitative IAA test. 20% of *Pseudomonas* sp., 17,07% of *Bacillus* sp. and 21,35% of actinomycetes isolates were positive for this test and it was possible to quantify its production. Also, conducted a test of effectiveness of IAA produced by nine bacteria to assess their growth-promoting effect on the hypocotyl and radicle on *Lactuca sativa* L. seeds (lettuce). Statistical analysis of the evidence indicates that the results are highly significant. The strain PSIV-1-L showed the best results for the hypocotyl and the strain PSII-7-L to the radicle. We confirmed the presence of IAA-producing bacteria in the biol of Lima and Huancayo and it was possible to demonstrate a positive effect *in vitro* on germination of *Lactuca sativa* L. seeds (lettuce).

Key words: Biol, Indole Acetic Acid (IAA), *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., actinomycetes.

I. INTRODUCCIÓN

El suelo proporciona a las plantas varios elementos esenciales para su crecimiento; entre ellos, el soporte mecánico, agua y nutrientes (Thompson y Troeh, 2002). La agricultura convencional tiene aceptación, ya que con las innovaciones tecnológicas es posible lograr dos objetivos importantes: maximizar la producción y sobretodo aumentar las ganancias. Paradójicamente la tecnología y las prácticas que permiten incrementar la producción, a la vez abusa y degrada los recursos naturales de los que depende la agricultura (suelo y agua). Para lograr estos dos objetivos se han desarrollado 6 prácticas básicas que constituyen la columna vertebral de la agricultura moderna: labranza extensiva, monocultivo, irrigación, aplicación de fertilizantes inorgánicos, control químico de plagas y manipulación genética de los cultivos, cada una de ellas se usa de manera individual, pero a veces se usan en conjunto reforzando el sistema en el cual cada una depende de la otra (Gliessman, 2002). Este tipo de agricultura a largo plazo no tiene el potencial para producir suficiente alimento demandado por la población, en pocas palabras la agricultura moderna es insostenible.

Una buena opción para conseguir altos rendimientos en las cosechas y de buena calidad, son los abonos orgánicos. La acción de los abonos orgánicos consiste en: mejorar el suelo como sustrato nutritivo, restituir los elementos nutritivos que han sido extraídos por el propio cultivo o por algún otro motivo, favorecer la aireación y oxigenación del suelo por lo que hay mayor actividad radicular y mayor actividad de los microorganismos aerobios, mejorar la estructura y textura del suelo, mejorar la permeabilidad, disminuir la erosión y aumentar la retención de agua en el suelo (Finck, 1988).

El "biol", es un abono líquido, fuente de fitorreguladores que se produce como subproducto del proceso de la digestión microbiana anaerobia (Colque *et al.*, 2005), que aumenta y fortalece la base radicular, actúa sobre la base foliar, mejora la

floración y activa el poder germinativo de las semillas; esto implica un aumento significativo de las cosechas. Los abonos líquidos se pueden usar en una gran variedad de plantas, sean de ciclo corto, anuales, perennes, gramíneas, forrajeras, leguminosas, frutales, hortalizas, raíces, tubérculos y ornamentales, aplicándolo a las hojas, semillas, raíces o directamente al suelo (Gomero, 2005). Por tales razones, el uso y comercialización de fertilizantes orgánicos es de suma importancia; es más, los abonos líquidos como el biol, son económicos, fáciles de preparar, no demandan mucho tiempo y son de fácil aplicación.

La producción de abonos líquidos, se hace cada vez más conocida y popular entre agricultores, se elaboran manuales y se capacitan a campesinos, enseñando las técnicas básicas para la elaboración de abonos orgánicos (Gomero, 2005). Pero es necesario también conocer a los microorganismos que intervienen en el proceso y la dinámica poblacional de las mismas.

Al ser el biol una fuente de fitohormonas, llamadas también fitorreguladores, producidos como desechos del metabolismo de las bacterias típicas de éste proceso microbiano (Aparcana *et al.*, 2008), en el presente trabajo, se seleccionaron *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.* y actinomicetos productores de AIA en las muestras de biol artesanal.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 El suelo

El suelo es un complejo cambiante, dinámico, componente del agroecosistema, que puede ser alterado, degradado o manipulado responsablemente. El suelo se refiere a la porción de la corteza terrestre donde las plantas están sostenidas, es la parte superficial que está mezclada con organismos vivos y en el cual se incluye también material inorgánico (Gliessman, 2002).

El suelo está formado por la descomposición de rocas, en las que influye la acción del sol, viento, agua y las raíces de las plantas y, los minerales son justamente los fragmentos de roca descompuestos. Además de estos compuestos el suelo contiene materia orgánica, organismos vivos, agua y aire (Dalzell, 1991).

2.1.1 La nutrición y el crecimiento vegetal

La nutrición es la absorción de compuestos químicos vitales, denominados nutrientes, los cuales son esenciales para el crecimiento. Los nutrientes esenciales para las plantas verdes son aquellos que cumplen con los siguientes requisitos (Tognetti *et al.*, 2006):

- Que el nutriente sea imprescindible para el desarrollo normal o cumplimiento del ciclo de vida de la planta.
- Que sea específico e irremplazable.
- Que actúe directamente en la nutrición de la planta y no indirectamente en el suelo (p. ej. cambios en el pH para favorecer la absorción de otros elementos).

Tabla 1. El rol de los macronutrientes en el desarrollo de las plantas.

Macronutriente	Roles fisiológicos	Deficiencia	Exceso
Nitrógeno (N)	Se absorbe como nitrato (NO ₃ ⁻), que debe ser reducido para ser asimilado, o como amonio (NH ₄ ⁺). Es constituyente de las bases púricas y pirimídicas de los ácidos nucleicos (ADN y los diferentes tipos de ARN), de los compuestos en los que se almacena energía y/o poder reductor (ATP, NADP, etc.) y de otros compuestos como ureidos, poliaminas y más.	Disminución de la división y expansión celular, lo que reduce el crecimiento, las hojas inferiores se tornan amarillentas (clorosis) y mueren posteriormente, las yemas laterales mueren o quedan en reposo y se reduce la floración.	Hojas de color verde oscuro, las plantas pueden ser susceptibles al vuelco, sequía, enfermedades e invasión de insectos. La producción de frutos y semillas puede reducirse.
Fósforo (P)	Se transporta como fosfato al interior de las células y se incorpora al ADP para formar ATP y a compuestos carbonados durante la glucólisis. Forma parte de los fosfolípidos, las bases constituyentes de los ácidos nucleicos, proteínas fosforiladas y reservas como fitatos, entre otros.	Se manifiesta en hojas jóvenes al adoptar un color verde oscuro a azul-verdoso debido a una mayor concentración de clorofila.	Puede causar deficiencias de micronutrientes, especialmente de Fe y Zn.
Potasio (K)	No forma parte de ningún constituyente, pero se almacena en grandes cantidades en vacuolas. Actúa como activador o co-factor de enzimas, participa en la osmorregulación (p. ej. extensión de la pared celular, movimientos estomáticos y násticos, balance iónico, etc.) y en la síntesis de proteínas y reduce la incidencia de ciertas enfermedades.	Pequeñas manchas necróticas entre las nervaduras, quemando la punta y márgenes de las hojas viejas, que a su vez presentan signos de marchitez.	Puede causar deficiencias de Mg y posiblemente de Ca.

Fuente: Tognetti *et al.*, 2006.

Se han establecido 19 elementos esenciales, los que se clasifican en básicos, macronutrientes y micronutrientes (Tognetti *et al.*, 2006). Estos son:

- Básicos (tres): carbono (C) en forma de CO₂, hidrógeno (H) a partir del agua de suelo y oxígeno (O) tomado del aire.
- Macronutrientes (siete): nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), azufre (S) y silicio (Si) (Tabla 1).
- Micronutrientes (nueve): cloro (Cl), hierro (Fe), boro (B), manganeso (Mn), sodio (Na), zinc (Zn), cobre (Cu), níquel (Ni) y molibdeno (Mo).

De los macronutrientes, el N, P y K, son los más importantes cuando hablamos de abonos. La función de cada uno de ellos se describe en la Tabla 1.

2.2 Abonos orgánicos

Se llaman abonos orgánicos a los productos naturales resultantes de la descomposición de materiales de origen vegetal y/o animal, que tienen la capacidad de mejorar la fertilidad del suelo y por lo tanto la producción de los cultivos (Peña *et al.*, 2002).

Estos abonos ayudan no solo a mejorar el rendimiento de las cosechas, sino también a controlar otros impactos ambientales como: la reducción de los compuestos químicos tóxicos poco biodegradables usados en la agricultura, así como también la disposición final de los desechos provenientes de la misma (excretas de animales, rastrojos de plantas, etc.). Es así, que los desechos como abono, no solo permiten solucionar el problema de la eliminación de los mismos, sino que ofrecen la ventaja de hacer uso del reciclaje (Finck, 1988). Teniendo la necesidad de disminuir la dependencia de productos químicos, estamos obligados a buscar alternativas fiables y sostenibles como los abonos orgánicos.

Los suelos que se manejan orgánicamente, tienen un alto potencial para contrarrestar los efectos de la degradación del suelo (El-Hage *et al.*, 2003), se adaptan mejor a la tensión de agua y pérdida de nutrientes.

Los abonos orgánicos tienen ventajas sobre los inorgánicos. La recuperación de materia orgánica del suelo, permite aprovechar residuos orgánicos y utilizar menos energía para su producción, pero también tienen una desventaja importante y es que, si no son tratados adecuadamente pueden ser fuente de microorganismos patógenos que contaminarían los cultivos de consumo humano (MINEM, 2010).

Los abonos orgánicos, cada vez se hacen más conocidos y aceptados, como el compost, humus, gallinaza, guano y biol por ejemplo, son usados por diferentes agricultores, obteniendo buenos beneficios a bajo costo. Los abonos orgánicos están elaborados a partir de desechos y estiércol de las mismas zonas ganaderas, entonces teniendo los recursos necesarios para elaborar abonos orgánicos es necesaria siempre la capacitación de los agricultores para reducir el riesgo de contaminación de los cultivos destinados a la alimentación.

2.3 Biodigestión anaerobia

La digestión anaerobia es el proceso de degradación de la materia orgánica presente en los sustratos mediante la acción de microorganismos específicos en ausencia de oxígeno y la obtención generalmente de tres productos finales: biogás, biosol y biol. Los productos finales de la fermentación están conformados por una mezcla gaseosa constituida principalmente por metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂), denominada biogás, un residuo semisólido, de aspecto lodoso al que se denomina biosol y un abono líquido que presenta una concentración considerable de nutrientes denominado biol (Martínez, 1984; Sotil, 2007)

Los biodigestores se desarrollan con la finalidad de producir energía y abonos orgánicos usando los desechos de cosechas y excretas de animales, pero en los últimos años esta técnica se está volviendo cada vez más común e importante entre los agricultores para la producción de bio-abono, especialmente el abono líquido o biol.

2.3.1 Fases de la biodigestión anaerobia y consorcios microbianos

Los procesos anaerobios se caracterizan por tener consorcios bacterianos muy complejos, pero las principales interacciones se dan entre el dominio Bacteria y el Archaea. La digestión anaerobia presenta 4 etapas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (Deublein *et al.*, 2008; Carrillo, 2003) que se detallan a continuación:

En la primera etapa (hidrólisis) de la biodigestión, los microorganismos hidrolizan la materia orgánica (lípidos, polisacáridos y proteínas) en compuestos más sencillos (ácidos grasos, monosacáridos y aminoácidos) para poder ser utilizados (Vargas, 2005). Las bacterias que se pueden encontrar en esta etapa son las siguientes:

Bacteroides sp., bacterias ácido lácticas, *Sphingomonas* sp., enterobacterias, *Clostridium* sp., actinomicetos, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. En la segunda fase (acidogénesis), las bacterias toman los productos de la etapa anterior y los transforman a ácido propiónico, ácido butírico y ácido láctico, también ácidos grasos volátiles y alcoholes. La fermentación acidogénica es realizada principalmente por un grupo de bacterias, que son en su mayoría anaerobias estrictas (Rolando, 2001). Por otra parte también existen en esta fase bacterias sulfito reductoras (Vargas, 2005), donde predomina el género *Clostridium*. En la tercera fase (acetogénesis), las bacterias acetogénicas son las responsables de la oxidación de los productos que han sido generados en la etapa de acidogénesis. Al igual que en la etapa anterior, éstas bacterias dejan productos de su metabolismo como el H₂ y CO₂ que van a ser aprovechados por las bacterias de la fase metanogénica (Rolando, 2001). Por último en la cuarta fase (metanogénesis), las bacterias metanogénicas producen CH₄, CO₂, trazas de H₂O, NH₃ y biomasa (pH neutro-alcalino 7,2 – 8,2).

La Tabla 2 enlista los microorganismos que intervienen en cada etapa de biodigestión anaerobia.

Los abonos líquidos fermentados son fabricados mayormente a partir de estiércol (fuente de microorganismos y N, P y K), melaza (fuente de carbono), leguminosas (fuente de nitrógeno y micronutrientes) y agua para después ser sometidos a un proceso de fermentación anaerobia antes de aplicarlos a los cultivos (Sotil, 2007).

Diversos autores destacan la incidencia de ciertos factores físico-químicos durante el proceso de biodegradación anaeróbica:

- a) pH: Es un modulador trascendental del sistema al intervenir en el desplazamiento de las reacciones químicas hacia la formación de

determinados productos, sobre todo en el equilibrio $\text{NH}_4^+ - \text{NH}_3$ ya que este último es el segundo componente que inhibe la fase metanogénica (Zeemann *et al.*, 1985). El proceso se desarrolla en forma óptima cuando el pH del medio se encuentra cercano a la neutralidad y presenta graves problemas si el pH baja a menos 6 o sube a más de 8,3; aunque el efecto podría ser revertido según la duración de la alteración y la efectividad de la sustancia tampón adicionada (Singh, 1975; Chacón, 1980; Carrillo, 2003; Saico, 2003).

- b) Temperatura: El incremento de la temperatura acelera la actividad metabólica microbiana, lo que reduce el tiempo de retención del proceso de fermentación, aunque requiere una temperatura estable para su optimización (Sotil, 2007). La temperatura óptima para la biodigestión se encuentra entre 30 y 35°C pues ofrece las mejores condiciones para el crecimiento microbiano y la producción de metano y garantiza la reducción del tiempo de retención de los desechos en el sistema (Santana, 1985; Taiganides, 1980; Jordan, 1974).
- c) Disponibilidad y concentración de nutrientes: El suministro constante y equilibrado de nutrientes apropiados beneficia a las poblaciones microbianas, por lo tanto les permite mantener una tasa de crecimiento estable y lograr, por consiguiente, una producción óptima de gas (Martínez, 1984). Ciertas relaciones entre nutrientes resultan necesarias al momento de adicionar las materias primas para la biodigestión:
- Relación C:N:P: Esta relación es óptima en 100:5:1 porque un exceso de carbono en relación al nitrógeno impide que la degradación de la materia orgánica sea eficiente, en tanto que el exceso de nitrógeno se

acumula en forma de NH₃, sustancia que inhibe a las bacterias metanogénicas (Santana, 1985; Steffen *et al.*, 1998; Carrillo, 2003).

Coronado (2010), clasifica a los bioles en tres grupos de acuerdo a su relación C:N, en baja (<10-19), óptima (20-27) y alta (>27).

Tabla 2. Algunos géneros y especies representativas hallados en biodigestores.

Grupo bacteriano	Género/Especie	Población mesófila en lodos de depuradores
Acidogénicos hidrolíticos	<i>Butyrivibrio</i>	10 ⁸ a 10 ⁹ UFC/ml
	<i>Clostridium</i>	
	<i>Ruminococcus</i>	
	<i>Acetivibrio</i>	
	<i>Eubacterium</i>	
	<i>Peptococcus</i>	
	<i>Lactobacillus</i>	
Acetogénicos	<i>Streptococcus</i>	≈ 10 ⁵ UFC/ml
	Homoacetogénicos	
	<i>Acetobacterium</i>	
	<i>Acetogenium</i>	
	<i>Eubacterium</i>	
	<i>Clostridium</i>	
	Acetogénicos reductores de protones obligados	
<i>Methanobacillus omelionskii</i>	≈ 10 ⁸ UFC/ml	
<i>Syntrophobacter wolinii</i>		
<i>Syntrophomonas wolfei</i>		
<i>Symtrophus buswellii</i>		
<i>Methanobacterium sohngeniei</i>		
<i>Methanobacterium thermoautotropicum</i>		
<i>Methanobacterium formicum</i>		
<i>Methanobacterium mobilis</i>		
<i>Methanobacterium uniproponicum</i>		
<i>Methanococcus mazei</i>		
<i>Methanospirillum hungatei</i>		
<i>Methanosarcina methagenica</i>		
<i>Methanosarcina barkerii</i>		

Fuente: Sotil, 2007.

Si bien es cierto, las bacterias estudiadas en el presente trabajo no son bacterias fermentadoras, son importantes desde otro punto de vista, pues cumplen un papel importante en la síntesis de fitohormonas como el AIA, ácido giberélico, entre otras, las cuales hacen que el biol mantenga un buen nivel de fitorreguladores y nutrientes, que aumentan la productividad en el campo y además que son de interés industrial.

2.4 Biol

El biol es un abono líquido que en su composición contiene fitorreguladores, subproducto de la digestión principalmente anaerobia de los desechos orgánicos.

La producción del biol implica la mezcla de estiércol, agua y la adición de otros insumos como rastrojos de plantas, vegetales en descomposición, leche, desechos de pescados, rumen, melaza, entre otros, que se deposita en un biodigestor y se deja fermentar. La producción varía según la estación del año, más específicamente depende de la temperatura (Colque *et al.*, 2005). La evolución de la dinámica poblacional de los microorganismos de abonos líquidos fermentados en biodigestores artesanales hecha por Sotil (2007), mostraron que a lo largo del proceso la población microbiana varía considerablemente y en el caso particular de los coliformes descendía drásticamente. Fueron también evaluadas las bacterias mesófilas, termófilas y hongos.

No existe una fórmula estandarizada para la preparación del biol, es más, la formulación es muy diversa, según la disponibilidad y condiciones de cada zona.

Entre las propiedades más importantes del biol, se sabe que aumenta la fertilidad natural del suelo, aumenta la producción y mejora la calidad de los cultivos, promueve las actividades fisiológicas y estimula el desarrollo de las plantas y mejora la nutrición, haciendo a los cultivos más resistentes a los ataques de las plagas y enfermedades (Díaz *et al.*, 2008; Álvarez, 2010).

La composición va a depender mucho de los residuos que ingresen al biodigestor, es por eso que comúnmente se dice que cada biol es "único". El uso del biol es principalmente para promover y fortalecer el crecimiento de las plantas, raíces y frutos, por la producción de hormonas vegetales, las cuales son desechos del metabolismo

de bacterias típicas de la fermentación anaerobia, estas propiedades hacen que se requiera menor cantidad de fertilizante mineral (Aparcana *et al.*, 2008).

En la composición bioquímica del biol como detalla Aparcana *et al.* en la Tabla 3, se puede apreciar dos fitorreguladores muy importantes como constituyentes principales, las auxinas y giberelinas.

Hay cinco grupos hormonales principales: auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno y ácido abscísico (Dörffling, 1982; Tsavkelova *et al.*, 2006); todas éstas estimulan la formación de nuevas raíces y su fortalecimiento, la floración, la fructificación, el crecimiento de hojas y tallos (Aparcana *et al.*, 2008).

Tabla 3. Composición bioquímica del biol.

Composición bioquímica del biol	
Componentes	Cantidad (ng/g)*
Ácido indol acético	9
Giberelina	8.4
Purinas	9.3
Citoquininas	No detectado
Adeninas	No detectado
Tiamina (Vitamina B1)	259
Riboflavina (Vitamina B2)	56.4
Ácido fólico	6.7
Ácido pantoténico	142
Triptófano	26
Inositol	No detectado
Biotina	No detectado
Niacin	No detectado
Cianocobalamina (Vitamina B12)	4.4
Piridoxina (Vitamina B6)	8.6

(*) Nanogramo/gramo.

Fuente: Modificado de Aparcana *et al.*, 2008.

2.5 Ácido Indol Acético (AIA)

Las fitohormonas tienen un rol muy importante como reguladoras del crecimiento y desarrollo de las plantas, contribuyen al funcionamiento de diversos procesos biológicos, incluyendo la regulación de la quiescencia y germinación de semillas, la formación de raíces, florescencia y la maduración del fruto. A su vez, incrementan la resistencia de las plantas a factores ambientales y pueden inducir o suprimir la expresión de genes y la síntesis de enzimas, pigmentos y metabolitos (Tsavkelova *et al.*, 2006).

El ácido indol acético (químicamente llamado ácido 3-indol-acético), es una auxina natural presente en la mayoría de las plantas y tienen como función regular diversos procesos en el desarrollo vegetal.

Auxina, deriva del griego *auxein* que significa aumento o incremento, designado a cualquier compuesto constituido por el grupo auxínico (Celis, 2008).

La síntesis microbiológica de fitohormonas puede constituir una alternativa viable en la búsqueda de la agricultura sostenible, pues la aplicación de caldos de fermentación que contengan estos productos reduce el impacto ambiental y su producción a gran escala es económicamente atractiva (Castillo *et al.*, 2005).

La auxina típica es el ácido indol acético (AIA), la promoción del desarrollo del sistema radical característico de este tipo de reguladores de crecimiento vegetal, es uno de los parámetros utilizados para determinar la efectividad de determinadas bacterias rizosféricas. El AIA es similar en estructura al aminoácido triptófano y probablemente es éste el precursor del AIA formado en la planta viva, sin embargo, en las bacterias,

la producción de AIA ocurre también a partir del triptófano pero por medio de la indol - acetamida (Patten y Glick, 2002).

La habilidad para sintetizar AIA ha sido detectada en diversos géneros bacterianos principalmente rizósfericos y epifíticos tales como: *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, (Tsavkelova, 2006), *Xanthomonas*, *Klebsiella* (Rasul, 1999) *Pseudomonas* (Rasul, 1999; Tsavkelova, 2006), *Escherichia* (Lester *et al.*, 1960), *Bacillus* (Tsavkelova, 2006; Castellanos *et al.*, 2009), así como algunas especies del género *Streptomyces* (Manulis *et al.*, 1994).

2.6 Rizobacterias promotoras de crecimiento de las plantas

Las rizobacterias promotoras de crecimiento son bacterias de vida libre o simbiótica conocidas como microorganismos PGPR por sus siglas en inglés (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) fue definido por primera vez por Kloepper y Schroth en 1978 y como su nombre lo indica estas bacterias estimulan el crecimiento de las plantas mediante diversos mecanismos de acción indirecta o directa (Kloepper *et al.*, 1989; Glick, 1995; Nowak *et al.*, 1998).

De acuerdo con Fendrick *et al.* (1995) y Martínez *et al.* (1997) las bacterias PGPR son capaces de producir sustancias fisiológicamente activas como vitaminas, giberelinas, citoquininas, ácido indol acético en cantidades considerables, las cuales mediante su acción conjunta estimulan la germinación de las semillas, aceleran el desarrollo de las plantas e incrementan el rendimiento de los cultivos (Lazarovits y Nowak, 1997) sobretodo en condiciones de estrés generando una mayor producción de estas (Lazarovits y Nowak, 1997; Torres *et al.*, 2000).

El nitrógeno y el fósforo son dos de los nutrientes esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas. La agricultura intensiva actual implica el riesgo de utilizar una fertilización artificial excesiva, por esta razón, los microorganismos son importantes, no sólo como ayuda en la asimilación de nutrientes sino para reducir en lo posible el uso de fertilizantes químicos (Cakmakci *et al.*, 2005) y de esta manera evitar la contaminación ambiental.

Las PGPRs también son utilizados para la fijación de nitrógeno y la solubilización de fosfatos, permitiendo que estos estén disponibles para la planta (Martínez y Dibut, 1996).

Las PGPR intervienen en el control de patógenos mediante la producción de antibióticos, inducción de resistencia y activación de mecanismos de defensa (Compant *et al.*, 2005).

Aunque son numerosas las capacidades encontradas que pueden poseer las PGPR los mecanismos exactos por los cuales estas actúan no están del todo entendidos. Algunos autores como Kloepper *et al.* (1989), han clasificado sus mecanismos en: bioprotectores (suprimiendo enfermedades de plantas), biofertilizantes (aumentando la capacidad de adquisición de nutrientes) y bioestimulantes (produciendo fitohormonas). Por otro lado Glick (1995) propone dos tipos de mecanismos PGPR, los mecanismos indirectos, donde se consideran la producción de metabolitos y/o antibióticos que inducen la resistencia contra diferentes fitopatógenos y los mecanismos directos que incluyen la síntesis de fitohormonas y otros mecanismos como producción de sideróforos, solubilización de fosfato y fijación biológica de nitrógeno que facilitan la toma de nutrientes del suelo. La unión de ambos mecanismos de acción resulta en la promoción evidente del crecimiento de las plantas; observándose un incremento en la emergencia, germinación, peso seco y una mejor asimilación de agua y nutrientes, así como un mayor desarrollo en el sistema radicular y un incremento de hasta el 30 % en la producción de cultivos de interés comercial, tales como papa, rábanos, trigo y soya (Dashti *et al.*, 1997; Ait Barka *et al.*, 2000).

Así mismo, contrariamente a lo que ocurre con los productos químicos, los fitopatógenos no desarrollan resistencia contra los compuestos sintetizados por los microorganismos PGPR debido a que éstos operan en micrositios ya sea en el suelo o la rizósfera de la planta (Handelsman y Stabb, 1996).

El grupo de las bacterias PGPR incluyen varios géneros bacterianos. Se destacan entre ellos los géneros *Arthobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Serratia* (Klopper *et al.*,

1989) *Azospillum* (Okon y Labandera, 1994), *Pseudomonas* (Cook y Baker, 1983; Sorensen *et al.*, 2001), *Azotobacter* (Khalid y Ashad, 2004) y los grupos micorrizas (Gosling *et al.*, 2006) y actinomicetos (Maier *et al.*, 2004).

2.7 Características generales del género *Pseudomonas*

2.7.1 Clasificación Taxonómica: (Breed *et al.*, 1957).

Phylum: Proteobacteria

Clase : Gammaproteobacteria

Orden : Pseudomonadales

Familia: Pseudomonadaceae

Género: *Pseudomonas* (Migula, 1894)

2.7.2 Descripción general

Las *Pseudomonas* son microorganismos bacilares, rectos o curvos, Gram-negativos, no esporulados y móviles por uno o varios flagelos polares, aunque algunas especies pueden formar flagelos laterales. Con dimensiones generalmente entre 0,5 µm a 1,5-4 µm. De acuerdo a sus requerimientos nutricionales, son quimiorganotróficos, tienen metabolismo respiratorio y son en su mayoría aerobios estrictos, con excepción de los denitrificantes que son anaeróbicos.

Los miembros del género *Pseudomonas* son habitantes comunes del suelo, agua dulce y ambientes marinos, donde sus actividades son importantes en la mineralización de la materia orgánica (Buchanan y Gibbons, 1974).

Actualmente las *Pseudomonas* especialmente, *P. putida* y *P. fluorescens*, generan bastante expectativa como PGPR debido a su capacidad de metabolizar múltiples fuentes de carbono, poseer una velocidad de crecimiento elevada en comparación con otras rizobacterias, lo que explica la alta densidad que poseen tanto en el suelo como

en la superficie de las plantas (Loper y Buyer, 1991; Abbass y Okon 1993; Ogata, 2006) y por la formación de microcolonias agregadas en el sistema radicular. Además del efecto positivo (como el incremento del peso seco) que genera la inoculación de las mismas en diferentes cultivos (Walley y Germinda, 1997).

Budzikiewicz (1997) y Thomashow y Weller (1990), mencionan que los mecanismos de control biológico expuestos por las *Pseudomonas* está relacionado en su mayoría con la producción de sideróforos, auxinas, antibióticos y enzimas extracelulares que inhiben el crecimiento de los fitopatógenos, contribuyendo así a la reducción de productos químicos en la agricultura (Bossis *et al.*, 2000).

2.8 Características generales del género *Bacillus*

2.8.1 Clasificación Taxonómica: (Breed *et al.*, 1957).

Phylum: Firmicutes

Clase : Bacilli

Orden : Bacillales

Familia: Bacillaceae

Género: *Bacillus* (Cohn, 1872)

2.8.2 Descripción general

Los miembros del género *Bacillus* son habitantes comunes de la tierra, fango, vegetación en descomposición y sedimentos de lagos; se les conoce por que intervienen activamente en la descomposición de la materia orgánica. Son bacterias que tienen forma de bacilos grandes Gram-positivos que miden desde 0.3 a 2.3 μm de ancho y 1.2 a 7.0 μm de largo, la mayoría son móviles y poseen flagelos laterales, crecen en cadenas y forman colonias grandes e irregulares en los medios sólidos (agar nutritivo) (Sneath *et al.*, 1986).

Una característica importante que comparten es la capacidad de formar esporas resistentes al calor y a otros agentes destructivos y ser metabólicamente muy diversos, estos dos factores les permite tener una colonización exitosa en diferentes ambientes. Son aerobios estrictos o anaerobios facultativos ya que en condiciones con medios de cultivos complejos que contienen glucosa se desarrollan como anaerobios con crecimiento débil y puede ocurrir fermentación (Folmsbee *et al.*, 2004), catalasa positivos, quimiorganótrofos con un metabolismo estrictamente respiratorio y fermentativo pudiendo utilizar una gran variedad de sustratos.

De todos los géneros de bacterias PGPR, el género *Bacillus* es uno de los más estudiados. Algunas investigaciones sugieren que las formas vegetativas de este grupo se hallan prevalentemente en ambientes ricos de nutrientes como la rizósfera donde se presentan como no patógenos. Hay numerosos reportes sobre aislamiento del género *Bacillus* provenientes de la rizósfera (Vullo *et al.*, 1991; Mahafee y Backman, 1993) e inclusive se ha llegado a encontrar concentraciones de 10^7 UFC/gr de rizósfera (Pandey y Palni, 1997). Numerosas investigaciones indican la capacidad que posee no solo de ser controlador biológico de diversas enfermedades sino también de promover el crecimiento de las plantas por diversos mecanismos (Killian *et al.*, 2001). El potencial del género *Bacillus* como promotor de crecimiento se viene estudiando desde el comienzo de los años sesenta y la relación entre *Bacillus* spp. y las plantas se viene estudiando desde 1989 cuando la cepa *Bacillus subtilis* A13 fue caracterizada como PGPR por Kloepper *et al.* (1989), el descubrió que estos *Bacillus* eran competitivos y por esta razón tenían una población importante en la rizósfera. Sin embargo son, muy pocas las investigaciones que se han realizado al nivel de su ambiente natural de vida, por lo tanto el conocimiento de la ecología de este grupo es limitada.

2.9 Características generales del grupo Actinomiceto

2.9.1 Clasificación Taxonómica: (Williams *et al.*, 1989)

Phylum: Actinobacteria

Clase : Actinobacteria

Orden : Actinomycetales (Buchanan, 1917)

2.9.2 Descripción general

Los actinomicetos representan un grupo de microorganismos ampliamente distribuido en ecosistemas naturales y tienen gran importancia en la participación de la degradación de la materia orgánica, además de ciertas propiedades fisiológicas que los hacen particulares (Ghanem *et al.*, 2000).

Estos microorganismos son abundantes en el suelo, sin embargo, son encontrados también en ambientes acuáticos, dulces y marinos (Leiva *et al.*, 2004). Dentro de sus características particulares se encuentra la de producir un olor típico a suelo húmedo debido a la producción de un metabolito denominado geosmina. Además, presentan una actividad metabólica alta, producen pigmentos y enzimas extracelulares con las que son capaces de degradar la materia orgánica de origen vegetal y animal (Ezziyani *et al.*, 2004).

Los actinomicetos constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos, son bacterias Gram-positivas (aunque esta reacción puede variar con la edad del cultivo), que se caracterizan por su capacidad de formar filamentos ramificados, que en algunos desarrollan en micelio.

El orden de los Actinomycetales comprende 63 géneros, constituyendo aproximadamente del 20 al 60 % de la población microbiana del suelo (Ezziyani *et al.*, 2004).

Actualmente, los actinomicetos se encuentran incluidos en el dominio bacteria debido a las siguientes razones: su pared celular está compuesta por peptidoglicano, el diámetro de sus hifas es inferior al de los hongos (0,5 a 2,0 μm), son sensibles a los antimicrobianos, pero presentan resistencia a los antifúngicos y la disposición de su material genético es típicamente procariótico (Sylvia, 2005). Estas bacterias son aerobias y algunas anaerobias facultativas, pudiéndose encontrar en el suelo, animales y el hombre. Frecuentemente alcanzan grandes densidades poblacionales en suelos con alto contenido de materia orgánica y amplias reservas de carbono asimilable y humus (Fernández, 1988). En el suelo, se encuentran en casi todos los tipos, su número varía según el caso, pero es común encontrarlos en suelos fértiles con concentraciones de 10^6 UFC/g de suelo seco (Tate, 2000).

El género *Streptomyces* ha sido descrito como colonizador de la rizósfera, capaz de ejercer biocontrol sobre hongos fitopatógenos, producir sideróforos, sustancias promotoras del crecimiento vegetal (fitohormonas) *in vitro*, promover la nodulación y ayudar a los bacteroides como *Rhizobium* a la asimilación del hierro en la fijación de nitrógeno en leguminosas, lo cual contribuye indirectamente a la promoción del crecimiento vegetal (PGPR) (Tokala *et al.*, 2002).

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Seleccionar *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.* y actinomicetos productores de ácido indol acético (AIA) aislados de “biol” de elaboración artesanal provenientes de Lima y Huancayo.

Objetivos específicos

- Cuantificar las poblaciones bacterianas principales productoras de AIA (*Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.* y actinomicetos) seleccionadas en cada muestreo.
- Evaluar cualitativamente y cuantitativamente la producción de Ácido Indol Acético (AIA) en las bacterias aisladas.
- Seleccionar bacterias con buenos resultados en la cuantificación de Ácido Indol Acético (AIA).
- Determinar el efecto promotor de crecimiento vegetal del Ácido Indol Acético sobre semillas de *Lactuca sativa* L. (lechuga).

IV. HIPÓTESIS

Es posible aislar y seleccionar bacterias productoras de Ácido Indol Acético (AIA) en muestras de biol y evaluar cualitativamente y cuantitativamente la producción *in vitro*.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Lugares de ejecución del proyecto

La instalación de los biodigestores para la producción del biol se realizó en los campos libres del Centro Internacional de la Papa (CIP) en dos sedes: en el distrito de La Molina, ciudad de Lima (entre 180 y 250 msnm), región Lima y en el distrito de El Tambo, ciudad de Huancayo (3,200 msnm), región Junín.

Las pruebas de laboratorio se efectuaron en el laboratorio de Micología y Patología Molecular, de la División de Manejo Integrado de Cultivos del Centro Internacional de la Papa (CIP), sede Lima.

Los análisis fisicoquímicos (pH, conductividad eléctrica, nitrógeno total, fósforo total y potasio total) se realizaron en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes (LASPAF), Departamento de Suelos, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).

5.2 Muestra biológica

- Muestras de biol de Lima y Huancayo, con la finalidad de aislar y seleccionar *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. y actinomicetos productores de AIA.
- Semillas de *Lactuca sativa* L. (lechuga) EM Green Leaf 550, de la empresa norteamericana “EMERALD SEEDS” para la prueba de efectividad del AIA.

5.3 Metodología

5.3.1 Preparación de los bioles

Se diseñaron 12 tratamientos de abonos líquidos fermentados para Lima (Tabla 4 y Figura 1) y 10 tratamientos para Huancayo (Tabla 5) según la técnica para la elaboración de biol establecida por Gomero (2005). Los bioles fueron preparados de acuerdo a los elaborados artesanalmente por campesinos, así se seleccionaron los ingredientes.

La variación de los ingredientes entre tratamientos se realizó con la finalidad de determinar el efecto que tienen sobre las poblaciones microbianas, la relación C:N y la producción de biogás.

La agitación manual de los biodigestores 10; 11 y 12 para Lima y el biodigestor 10 para Huancayo se realizó con una manija incorporada a cada biodigestor con la finalidad de dispersar los gases y homogenizar los bioles.



Figura 1. Biodigestores instalados en los campos del CIP-Lima, 2010

5.3.2 Muestreo

Los muestreos de los bioles se ejecutaron cada 15 días durante un periodo de 150 días en fermentación anaeróbica. Se realizaron mediante la apertura de los caños instalados en los biodigestores para evitar la oxigenación de los mismos y el volumen de cada muestra fue de 290 mL (aproximadamente) en frascos de vidrio estériles.

Las muestras de biol fueron trasladadas al laboratorio inmediatamente después de la toma de muestra para ser analizadas en el laboratorio de Micología y Patología Molecular y posteriormente al LASPAF.

Tabla 4. Diseño de los tratamientos para los biodigestores ubicados en el CIP – Lima, 2010

Ingredientes	Bioles											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C:N	21	21	21	21*	21*	10	10*	30	30	21	10	30
Agua (L)	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90
Estiércol (Kg)	10+5+5	10+2+8	10+0+10	10+5+5	10+5+5	10+5+5	10+5+5	8+12+0	7+13+0	10+0+10	10+5+5	8+12+0
Melaza (Kg)		2,5	5	2,5	5	5	5	2,5	2,5	5	5	2,5
Alfalfa (Kg)	-	-	1	-	-	1	-	1	3	1	1	1
Leche (L)	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-
Ceniza (Kg)	-	-	1	-	1	1	1	1	0,5	1	1	1
Levadura (Kg)	-	-	0,25	-	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Nitrógeno (Kg)	-	-	-	0,04	0,06	-	0,55	-	-	-	-	-
Harina de pescado (Kg)	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	10	-
Rumen (Kg)	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-
Sales minerales (Kg)	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
Agitación manual	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Si	Si	Si
Capacidad (L)	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120

Nota: La proporción de estiércol es la siguiente: Vacuno+Ovino+Gallina.

(*) Relación C:N inorgánico, demás tratamientos relación C:N orgánico.

Tabla 5. Diseño de los tratamientos para los biodigestores ubicados en el CIP – Huancayo, 2010

Ingredientes	Bioles									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C:N	21	21	21	21*	21*	10	10*	30	30	21
Agua (L)	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90
Estiércol (Kg)	10+5+5	10+0+10	5+0+15	10+5+5	10+5+5	10+5+5	10+5+5	5+15+0	0+20+0	5+0+15
Melaza (Kg)	-	2,5	5	2,5	5	5	5	2,5	2,5	5
Alfalfa (Kg)	-	-	1	-	-	1	-	1	3	1
Leche (L)	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-
Ceniza (Kg)	-	-	1	-	1	1	1	1	0,5	1
Levadura (Kg)	-	-	0,25	-	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Nitrógeno (Kg)	-	-	-	0,03	0,06	-	0,35	-	-	-
Harina de pescado (Kg)	-	-	-	-	-	6	-	-	-	-
Rumen (Kg)	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-
Sales minerales (Kg)	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Agitación manual	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Si
Capacidad (L)	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120

Nota: La proporción de estiércol es la siguiente: Vacuno+Ovino+Gallina/Pollo.

(*) Relación C:N inorgánico, demás tratamientos relación C:N orgánico.

5.3.3 Evaluación de las bacterias productoras de AIA en las muestras de biol

5.3.3.1 Descripción del procedimiento

Obtenida las muestras de bioles, se procedió a hacer las diluciones seriadas de cada una de las muestras, se realizaron 10 diluciones decimales sucesivas de cada muestra (10^{-10}) para el primer muestreo. Conforme transcurrió el tiempo de biodigestión, las diluciones fueron menores.

5.3.3.2 Cuantificación y aislamiento de *Pseudomonas* sp.

Para la cuantificación y aislamiento de *Pseudomonas* sp. se usó la metodología citada por United States Pharmacopeia (2006). Se sembró por diseminación 0,1 ml de las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} (por duplicado) en agar Cetrimide (ver Anexo 3.2) (pH $7,2 \pm 0,2$) y se incubó a 28°C por 48 a 72 horas, recomendado por Lowbury (1951). Se cuantificaron las placas que mostraron entre 30 y 300 colonias y se expresaron en UFC/mL de biol. Las colonias fueron identificadas por sus características culturales, tinción Gram y pruebas primarias de identificación (catalasa, oxidasa y motilidad). Posteriormente se procedió al aislamiento para la obtención de cultivos puros.

5.3.3.3 Cuantificación y aislamiento de *Bacillus* sp.

Para la cuantificación y aislamiento del género *Bacillus* sp., se siguió la técnica recomendada por APHA-AWWA-WPCF (1975). Las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} se sometieron a choque térmico, se colocaron los tubos a baño María de 75 a 80°C durante 15 minutos y pasado el tiempo se enfriaron bruscamente colocando los tubos

bajo chorro continuo de agua de caño. Se sembraron por diseminación 0,1 ml de cada una de las diluciones (por duplicado) en agar Triptona Glucosa Extracto de carne (TGE) (pH 7,2 ± 0,2) ver Anexo 3.4 y las placas fueron incubadas a 30°C por 24 a 48 horas en aerobiosis (conforme transcurrió el tiempo de biodigestión, las diluciones fueron menores). Se cuantificaron las placas que mostraron entre 30 y 300 colonias y se expresaron en UFC/mL de biol. Posteriormente se procedió al aislamiento. La identificación presuntiva se realizó por características culturales, como tinción Gram y pruebas primarias de identificación.

5.3.3.4 Cuantificación y aislamiento de Actinomicetos

Para determinar la cantidad de Actinomicetos presentes en cada muestra, se usó la metodología citada por APHA-AWWA-WPCF (1998), se sembró 0,1 ml de las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} (por duplicado) en agar Almidón Caseína (AC) (pH 7,0 ± 0,2), ver Anexo 3.1, suplementado con fluconazol al 0,25% (p/v) para evitar el crecimiento de hongos (conforme transcurrió el tiempo de digestión, las diluciones fueron menores). Las placas fueron incubadas a 28°C de 7 a 10 días. Para la cuantificación de actinomicetos se tomaron en cuenta las placas que presentaron un crecimiento entre 30 y 300 colonias y se expresaron en UFC/mL de biol. Posteriormente se seleccionaron las colonias según las características morfológicas que permitirán determinar los de actinomicetos (textura, coloración del micelio aéreo y del sustrato, forma y tamaño de la colonia) y se estriaron en placas nuevas de AC para su aislamiento.

5.3.3.5 Aislamiento y purificación de las cepas bacterianas

Una vez evaluado el crecimiento de las colonias características, se aislaron según la siguiente metodología: se picaron las colonias seleccionadas de bacterias y actinomicetos con un asa de siembra en aro y se estriaron en el medio de cultivo correspondiente para cada una de los microorganismos en estudio y fueron incubados a la temperatura y periodo de tiempo establecido anteriormente.

Este proceso se repitió una o dos veces más para lograr la adecuada purificación de las cepas bacterianas.

5.3.3.6 Caracterización de las cepas bacterianas mediante tinción Gram

Se caracterizaron las cepas bacterianas mediante tinción Gram (Madigan *et al.*, 2004).

La identificación de las bacterias se efectuó por las claves ofrecidas en el manual de Bergey's (Sneath *et al.*, 1986).

5.3.3.7 Conservación de las cepas seleccionadas

Las cepas seleccionadas durante el proyecto, previamente purificadas se conservaron en agar Tripticasa Soya (TSA) (Anexo 3.5) en plano inclinado a 4°C.

5.3.4 Determinación de la producción de ácido indol acético

Para determinar la producción de ácido indol acético (AIA) de cada cepa aislada, tanto para *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. y actinomicetos, se utilizó un método cualitativo y cuantitativo:

5.3.4.1 Prueba cualitativa

Para la determinación de ácido indol acético se usó la técnica colorimétrica descrita por Gordon y Weber (1951). Cada cultivo puro de las bacterias seleccionadas se sembró en caldo de cultivo Tripticasa Soya (TSB) (Anexo 3.6), el cual fue suplementado con L-Triptófano 1,02% (Anexo 3.8) para inducir la producción de ácido indol acético. Cada caldo inoculado se mantuvo a 150 rpm a 28°C por 3 días para *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. y 6 días para actinomicetos. Pasado el tiempo de incubación, se colocó 100 µl del caldo en cada pocillo de la placa de ELISA, seguidamente se agregó 200 µl del reactivo de Salkowsky (Anexo 3.7), además de un control negativo (caldo + reactivo), este procedimiento se realizó por duplicado.

Se dejó actuar el reactivo en total oscuridad por 15 minutos. Pasado el tiempo se siguió con la lectura. Las bacterias AIA positivas fueron reconocidas por un cambio de color de los pocillos de amarillo (inicial) a diversas tonalidades desde rosado hasta fucsia (dependiendo de la concentración).

En base a estos resultados se seleccionaron todas las cepas positivas en esta prueba y fueron sometidas a la prueba cuantitativa.

5.3.4.2 Prueba cuantitativa

Para cuantificar la producción de AIA en $\mu\text{g/ml}$ de las cepas que resultaron positivas en la prueba descrita anteriormente, se realizó una curva de calibración control del caldo de crecimiento (TSB) a diferentes concentraciones de AIA puro (desde 5 $\mu\text{g/ml}$ hasta 180 $\mu\text{g/ml}$) luego se midió la absorbancia de cada concentración a una longitud de onda de 530 nm en el espectrofotómetro (Rico, 2009; Martínez, 2010).

Posteriormente se cultivaron las cepas de *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. y actinomicetos en caldo TSB suplementado con L- triptófano 1,02% y un control negativo. Se tomó 5 ml de cultivo y se centrifugó dos veces por 15 y 10 min a 8000 rpm utilizando solo el sobrenadante. Luego se extrajo una alícuota de 1 ml del sobrenadante final y se colocó en tubos de ensayo, posteriormente se adicionaron 2 ml de reactivo de Salkowsky, para luego colocarlos en oscuridad por 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó la medición de cada muestra en el espectrofotómetro, utilizando un control sin bacteria. Se midió la absorbancia al espectrofotómetro (530 nm) y se determinó la concentración en $\mu\text{g/ml}$ diariamente durante los cinco primeros días para *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. y al 4to, 8vo, 12vo y 15vo día para los actinomicetos (Rico, 2009; Martínez, 2010).

Por último, para calcular la cantidad de AIA producido por cada bacteria en $\mu\text{g/ml}$, se tomó como referencia la curva control realizada al inicio del experimento (Glick, 1995).

5.3.5 Prueba de efectividad de la germinación de semillas

Nueve bacterias productoras de AIA fueron seleccionadas al azar y se sembraron nuevamente en caldo de cultivo TSB, el cual fue suplementado con L-Triptófano 1,02% para inducir la producción de ácido indol acético. La muestra se centrifugó pasado el tiempo óptimo de incubación a 8000 rpm por 30 minutos a 25°C (Rojas *et al.* 2010). Las semillas de *Lactuca sativa* L. (previamente desinfectadas con lejía al 3,0% durante 5 minutos) se colocaron con pinzas estériles dentro de los tubos de ensayo con la muestra ya centrifugada que contenía el AIA y se mantuvieron en agitación durante 10 minutos, pasado el tiempo requerido se distribuyeron uniformemente sobre el papel filtro Whatman N° 3 (estéril) impregnado con 4 mL de agua destilada estéril dentro de una placa Petri (Coronado, 2010). Las placas Petri fueron incubadas por 120 horas (5 días) a una temperatura de 22±2 °C (Sobrero y Ronco, 2004). Cada placa Petri contuvo 20 semillas y se realizaron 3 repeticiones por muestra.

Pasado el tiempo de incubación, se tomaron las medidas en centímetros del tamaño de la radícula y del hipocotilo, para ser llevados a la estadística con la prueba de Duncan y el análisis de varianza (ANOVA), tanto para el hipocotilo como para la radícula, que nos va a mostrar si existe significancia estadística entre los resultados mostrados.

La prueba de Duncan es una prueba estadística muy usada en investigación agraria, que permite comparar resultados de dos o más tratamientos y que tiene como requisitos principales que: las muestras son extraídas al azar y el ANOVA es significativo.

5.3.6 Análisis fisicoquímicos de las muestras de biol

5.3.6.1 Temperatura ambiental

Los datos de la temperatura ambiental fueron registrados cada hora en las estaciones meteorológicas del CIP Lima (La Molina) y CIP Huancayo (La Victoria) y se obtuvieron los promedios de temperatura máxima y mínima.

5.3.6.2 Relación C:N

La relación C:N se realizó a partir de los análisis fisicoquímicos de los insumos incorporados a cada biodigestor bajo la forma de carbono total y nitrógeno total (Chapman y Pratt, 1997).

5.3.6.3 Temperatura del biol

Las temperaturas de los bioles fueron registradas tres veces por semana a las 14:00 horas, usando un termómetro bimetálico de reloj con un rango de temperatura de 15 a 70°C, los cuales fueron tomados para obtener la temperatura media mensual.

5.3.6.4 pH

El pH de las muestras de biol se midió usando un potenciómetro portátil de lectura directa Hanna pH211 cada quince días, durante un periodo de 150 días.

5.3.6.5 Nitrógeno total

La determinación del nitrógeno total se realizó mediante el método Kjeldahl (Chapman y Pratt, 1997).

5.3.6.6 Fósforo total

La determinación del fósforo total se efectuó en digestión ácida y lecturas con espectrometría ultra violeta visible (UV-Vis) (Chapman y Pratt, 1997).

5.3.6.7 Potasio total

La determinación del potasio total se efectuó en digestión ácida y fueron leídas con espectrofotometría de absorción atómica.

VI. RESULTADOS

6.1 Evaluación de las bacterias productoras de AIA en las muestras de biol

Se detalla a continuación los resultados de los análisis microbiológicos para la búsqueda de bacterias productoras de AIA en las muestras de biol estudiadas.

6.1.1 *Pseudomonas* sp.

Las colonias típicas de *Pseudomonas* sp. son pequeñas, brillantes, de color predominante amarillo y en algunos casos con un ligero color verdoso, producto de los pigmentos, (Figura 2).

Las Tablas 6 y 7 exhiben los datos del recuento en placa del género *Pseudomonas* expresadas en UFC/mL de biol para los bioles de Lima y Huancayo respectivamente, mientras que las Figuras 3 y 4 evidencian la curva de crecimiento de este género, expresadas en logaritmo decimal.

Se observa en las Figuras 3 y 4, una caída en la curva de crecimiento para la mayoría de bioles a los setenta y cinco días de evaluación, tanto para los bioles de Lima y Huancayo, los motivos se discutirán más adelante.

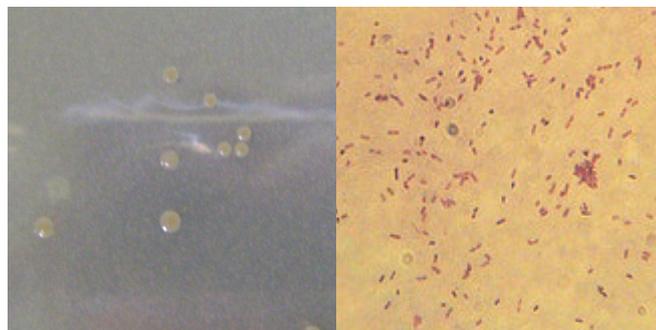


Figura 2. Izquierda, colonias de *Pseudomonas* sp. en agar Cetrimide. Derecha: Tinción Gram de *Pseudomonas* sp. (Aumento 1000x).

Tabla 6. Promedio del recuento de *Pseudomonas* sp. en UFC/ml de biol (Lima)

Biol	Días transcurridos									
	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150
1	1,3E+05	8,0E+04	7,0E+03	3,2E+02	2,6E+02	1,2E+02	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01
2	2,1E+05	1,0E+04	4,0E+03	2,0E+02	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01
3	1,7E+06	9,0E+04	2,1E+03	1,6E+02	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01
4	1,9E+06	6,4E+05	3,7E+03	3,6E+02	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01
5	4,3E+05	2,1E+04	1,3E+03	3,0E+02	2,7E+02	5,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01
6	2,7E+06	1,2E+05	9,0E+02	2,1E+02	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01
7	1,6E+05	6,9E+04	4,7E+03	3,2E+02	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01
8	2,3E+05	2,0E+04	8,5E+03	1,7E+02	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01
9	1,8E+05	7,1E+04	2,9E+03	5,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01
10	2,9E+06	7,0E+04	5,8E+03	5,3E+02	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01
11	2,7E+05	1,0E+04	2,0E+03	5,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01
12	1,2E+05	2,9E+04	6,2E+03	1,3E+03	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01

Tabla 7. Promedio del recuento de *Pseudomonas* sp. en UFC/ml de biol (Huancayo)

Biol	Días transcurridos									
	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150
1	4,0E+04	1,0E+04	2,7E+04	1,6E+03	1,1E+02	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01
2	1,3E+06	7,0E+05	5,8E+03	5,3E+02	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01
3	4,7E+06	2,7E+05	3,1E+03	1,6E+02	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01
4	9,8E+06	4,8E+06	5,0E+03	3,0E+02	1,7E+02	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01
5	1,2E+06	4,0E+04	7,0E+02	1,2E+02	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01
6	5,2E+06	1,8E+06	2,0E+03	4,7E+02	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01
7	2,1E+06	3,4E+06	2,8E+03	2,9E+02	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01
8	1,4E+06	6,0E+05	3,1E+03	1,7E+02	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01
9	1,4E+06	2,1E+04	2,0E+02	2,3E+02	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01
10	7,4E+05	4,5E+05	2,1E+03	1,4E+02	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01	<1,0E+01

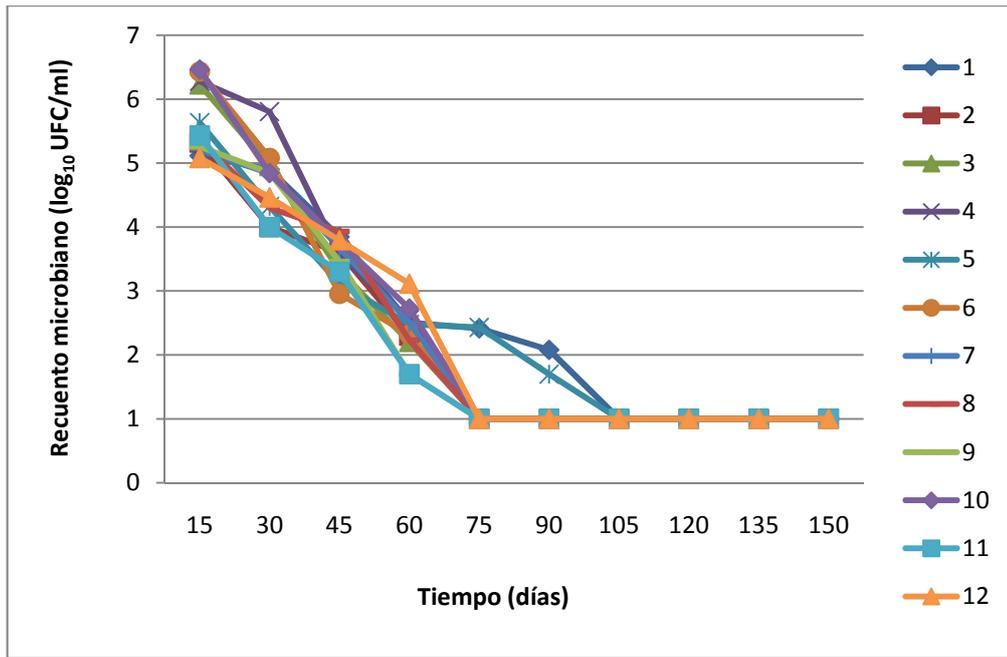


Figura 3. Dinámica poblacional de *Pseudomonas* sp. en los bioles de Lima

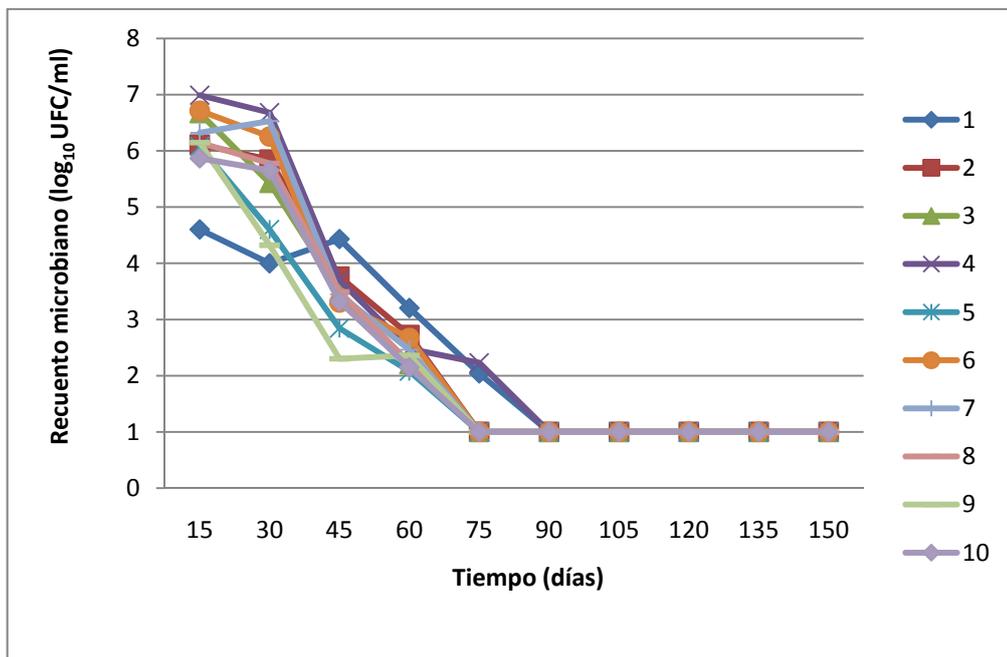


Figura 4. Dinámica poblacional de *Pseudomonas* sp. en los bioles de Huancayo

6.1.2 *Bacillus* sp.

Las colonias de *Bacillus* sp. en agar TGE, fueron reconocidas por sus características culturales, colonias grandes de bordes irregulares, rugosas, blanquecinas e invasivas (Figura 5).

Las Tablas 8 y 9 exhiben los datos del recuento en placa del género *Bacillus* expresadas en UFC/ml de biol para los bioles de Lima y Huancayo respectivamente, mientras que las Figuras 6 y 7 evidencian la dinámica poblacional de este género expresadas en logaritmo decimal.

En las Figuras 6 y 7, se observa que la población microbiana es constante en el tiempo, con ligeros descensos en algunos casos, los motivos se discutirán más adelante.

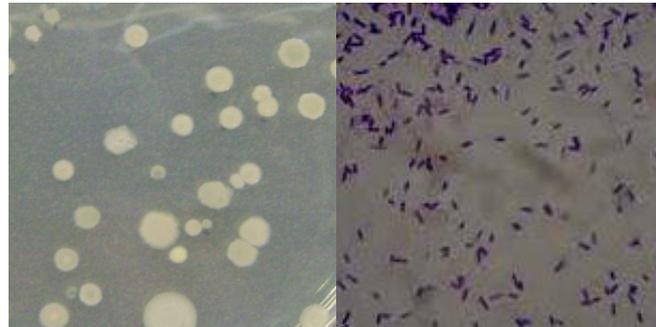


Figura 5. Izquierda, colonias de *Bacillus* sp. en agar TGE. Derecha: Tinción Gram de *Bacillus* sp. (Aumento 1000x)

Tabla 8. Promedio del recuento de *Bacillus* sp. en UFC/ml de biol (Lima)

Biol	Días transcurridos									
	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150
1	4,1E+07	4,9E+07	4,0E+06	1,3E+05	7,3E+04	6,6E+04	7,3E+04	9,2E+04	2,3E+05	2,2E+05
2	3,3E+07	3,6E+07	3,0E+06	2,0E+05	4,1E+04	2,2E+04	2,3E+04	2,5E+04	2,5E+04	2,6E+04
3	2,8E+07	3,8E+07	3,2E+06	1,5E+05	7,4E+04	9,0E+04	7,1E+04	5,7E+04	3,9E+04	8,0E+03
4	9,0E+06	2,1E+07	1,4E+06	1,0E+05	8,5E+04	9,6E+04	7,3E+04	7,1E+04	8,1E+04	7,9E+04
5	1,3E+07	2,8E+07	1,7E+06	6,0E+04	2,4E+04	2,6E+04	2,2E+04	2,0E+04	1,9E+04	1,5E+04
6	3,9E+07	5,3E+07	5,1E+06	4,0E+06	2,6E+05	2,2E+05	2,0E+05	1,7E+05	1,6E+05	9,4E+04
7	7,2E+07	7,2E+07	7,0E+06	3,0E+05	2,1E+04	2,9E+04	2,6E+04	2,5E+04	3,3E+04	3,0E+04
8	9,7E+07	7,9E+07	1,0E+06	2,4E+05	1,9E+05	2,1E+05	1,9E+05	1,4E+05	1,9E+05	3,5E+04
9	1,3E+08	1,7E+08	1,4E+07	4,0E+06	3,6E+05	3,1E+05	2,7E+05	2,6E+05	8,7E+04	2,8E+04
10	7,3E+07	9,8E+07	9,8E+06	6,1E+05	1,8E+05	2,0E+05	2,0E+05	2,1E+05	3,4E+05	2,4E+05
11	1,6E+07	1,5E+07	1,4E+06	8,0E+05	1,1E+05	1,7E+05	1,8E+05	1,9E+05	2,0E+05	1,7E+05
12	8,1E+07	7,2E+07	7,1E+06	3,4E+05	2,2E+05	2,3E+05	2,7E+05	3,0E+05	2,5E+05	2,1E+05

Tabla 9. Promedio del recuento de *Bacillus* sp. en UFC/ml de biol (Huancayo)

Biol	Días transcurridos									
	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150
1	1,9E+05	2,0E+05	2,2E+05	2,2E+05	1,8E+05	2,7E+05	3,0E+05	3,4E+05	3,1E+05	3,0E+05
2	1,7E+05	1,0E+05	7,6E+04	6,4E+04	6,1E+04	3,1E+04	3,4E+04	2,1E+04	1,9E+04	2,0E+04
3	3,0E+04	6,1E+05	8,9E+04	2,7E+04	2,5E+04	1,7E+04	1,3E+04	1,3E+04	1,2E+04	1,3E+04
4	2,0E+04	9,0E+04	8,5E+04	6,2E+04	4,7E+04	3,6E+04	3,7E+04	3,9E+04	3,8E+04	4,0E+04
5	1,1E+05	1,8E+05	5,3E+04	2,3E+04	2,3E+04	4,3E+04	1,6E+04	1,7E+04	3,9E+04	4,1E+04
6	5,0E+04	6,0E+04	3,0E+04	2,7E+04	1,6E+04	2,3E+04	5,0E+03	7,0E+03	1,0E+04	1,7E+04
7	1,0E+05	1,4E+05	9,0E+04	9,8E+04	9,1E+04	4,1E+04	4,3E+04	4,8E+04	4,4E+04	4,7E+04
8	5,9E+05	3,4E+05	9,9E+04	5,8E+04	3,9E+04	1,9E+04	2,2E+04	2,7E+04	2,7E+04	2,9E+04
9	2,9E+06	1,1E+05	5,3E+04	1,9E+04	9,0E+03	3,0E+03	9,0E+03	1,1E+04	2,0E+03	2,2E+04
10	1,6E+05	9,0E+04	8,1E+04	1,1E+04	1,0E+04	1,0E+04	1,2E+04	1,5E+04	1,4E+04	1,7E+04

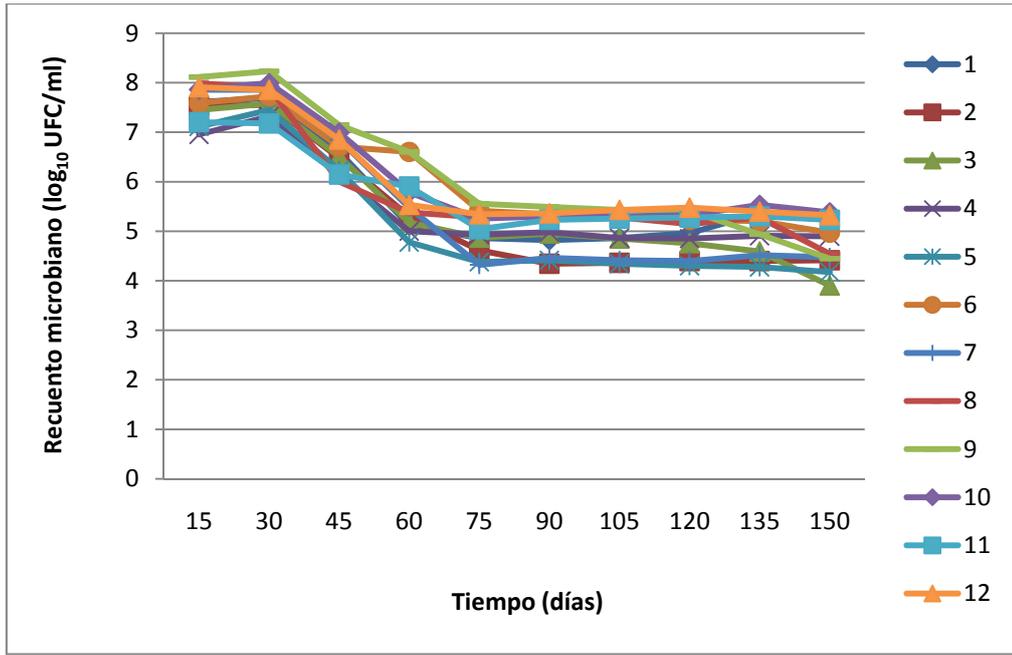


Figura 6. Dinámica poblacional de *Bacillus* sp. en los bioles de Lima

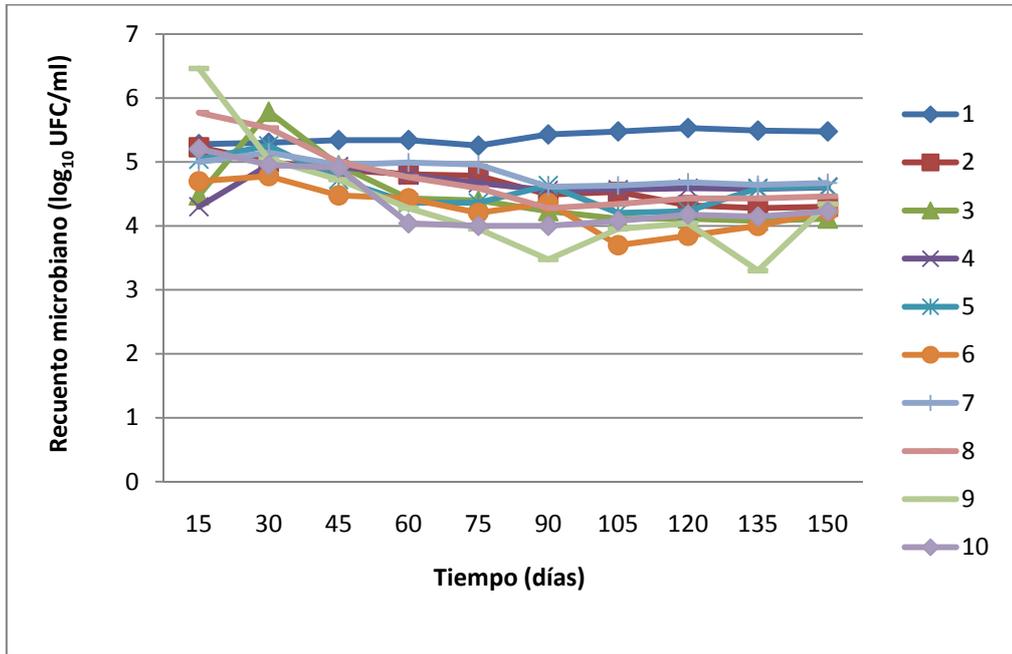


Figura 7. Dinámica poblacional de *Bacillus* sp. en los bioles de Huancayo

6.1.3 Actinomicetos

Las colonias de actinomicetos poseen morfologías diferentes; inicialmente de superficie suave, luego al desarrollar micelio, se tornaron de apariencia aterciopelada, granulosa o pulverulenta además se observó tanto el micelio aéreo como basal en relación a la amplia variedad de pigmentos (Figura 8).

Las Tablas 10 y 11 exhiben los datos del recuento en placa expresadas en UFC/ml de biol para las muestras de Lima y Huancayo respectivamente, mientras que las Figuras 9 y 10 evidencian la dinámica poblacional de este género expresadas en logaritmo decimal.

Las Figuras 9 y 10, muestran las curvas de crecimiento que descienden durante el tiempo de evaluación, demostrando ser más sensibles que los *Bacillus*.

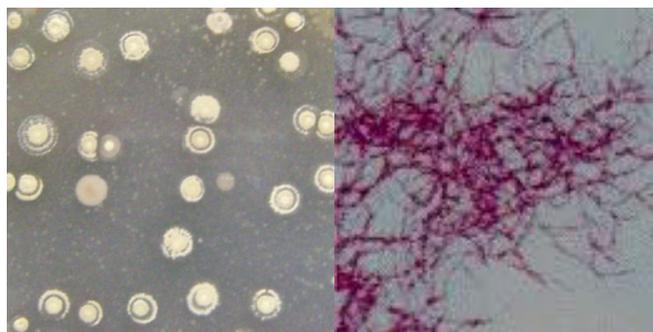


Figura 8. Izquierda, colonias de actinomicetos en agar AC. Derecha: Tinción Gram de actinomicetos (Aumento 1000x).

Tabla 10. Promedio del recuento de actinomicetos en UFC/ml de biol (Lima)

Biol	Días transcurridos									
	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150
1	2,0E+05	1,8E+05	3,9E+05	3,6E+05	3,4E+05	5,4E+05	6,2E+05	3,6E+05	2,4E+05	1,8E+05
2	1,4E+05	2,7E+05	4,6E+05	3,9E+05	2,1E+05	5,9E+04	4,0E+04	3,0E+04	1,6E+04	9,7E+03
3	1,4E+05	9,0E+04	1,2E+05	1,0E+05	9,1E+04	4,7E+04	2,1E+04	3,2E+03	1,0E+03	8,4E+02
4	4,1E+05	1,2E+05	1,2E+05	1,1E+05	4,2E+05	3,8E+05	3,2E+05	2,7E+05	2,3E+05	2,0E+05
5	4,7E+05	4,2E+05	1,5E+05	1,1E+05	8,0E+04	3,0E+04	1,6E+04	1,8E+04	1,1E+04	5,9E+03
6	5,2E+05	4,5E+05	6,1E+05	5,9E+05	5,3E+05	3,6E+05	2,3E+05	1,7E+05	8,0E+04	3,9E+04
7	2,1E+05	1,2E+05	4,4E+05	4,1E+05	3,1E+05	1,0E+05	7,3E+04	4,7E+04	3,1E+04	1,6E+04
8	1,1E+05	1,2E+05	9,0E+04	8,0E+04	6,0E+04	5,0E+04	2,6E+04	9,0E+03	4,0E+03	1,1E+03
9	1,2E+06	1,0E+05	2,9E+05	2,0E+04	3,0E+04	2,0E+04	1,0E+04	3,0E+03	1,0E+03	5,0E+02
10	1,4E+05	1,0E+05	1,0E+05	9,0E+04	1,0E+05	1,0E+05	8,9E+04	3,9E+04	1,8E+04	8,2E+03
11	4,9E+05	2,2E+05	2,5E+05	2,1E+05	2,7E+05	3,5E+05	3,0E+05	1,9E+05	1,3E+05	5,3E+04
12	2,8E+05	2,1E+05	2,9E+05	3,1E+05	3,7E+05	2,1E+05	2,3E+05	2,1E+05	1,2E+04	5,2E+03

Tabla 11. Promedio del recuento de actinomicetos en UFC/ml de biol (Huancayo)

Biol	Días transcurridos									
	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150
1	9,2E+05	9,4E+05	9,8E+05	2,0E+06	1,4E+06	1,6E+06	6,7E+05	1,8E+05	1,5E+05	1,2E+05
2	5,2E+05	4,7E+05	4,1E+05	3,2E+05	2,3E+05	8,1E+04	5,8E+04	4,8E+04	3,9E+04	2,8E+04
3	1,3E+05	2,8E+05	3,0E+05	3,1E+05	1,6E+05	5,3E+04	2,0E+04	3,1E+04	2,0E+04	1,7E+04
4	4,1E+05	4,8E+05	4,7E+05	4,8E+05	2,0E+05	1,0E+05	5,5E+04	9,1E+04	6,5E+04	2,8E+04
5	3,1E+05	3,4E+05	2,8E+05	2,5E+05	1,9E+05	9,6E+04	2,3E+04	3,7E+04	1,0E+04	1,2E+04
6	5,2E+05	7,6E+05	6,1E+05	4,7E+05	2,5E+05	8,7E+04	6,9E+04	3,9E+04	2,1E+04	8,1E+03
7	7,1E+05	6,6E+05	5,9E+05	4,6E+05	3,3E+05	1,7E+05	1,2E+05	1,3E+05	1,1E+05	7,9E+04
8	1,3E+06	1,2E+05	1,6E+05	2,0E+04	1,0E+04	7,0E+03	9,0E+03	9,0E+03	7,0E+03	2,4E+03
9	3,4E+05	4,6E+05	3,2E+05	2,0E+04	8,7E+03	6,0E+03	4,0E+03	1,3E+03	6,1E+02	5,0E+02
10	1,5E+05	3,0E+05	2,6E+05	1,7E+05	8,0E+04	7,8E+04	3,1E+04	2,8E+04	1,0E+04	4,0E+03

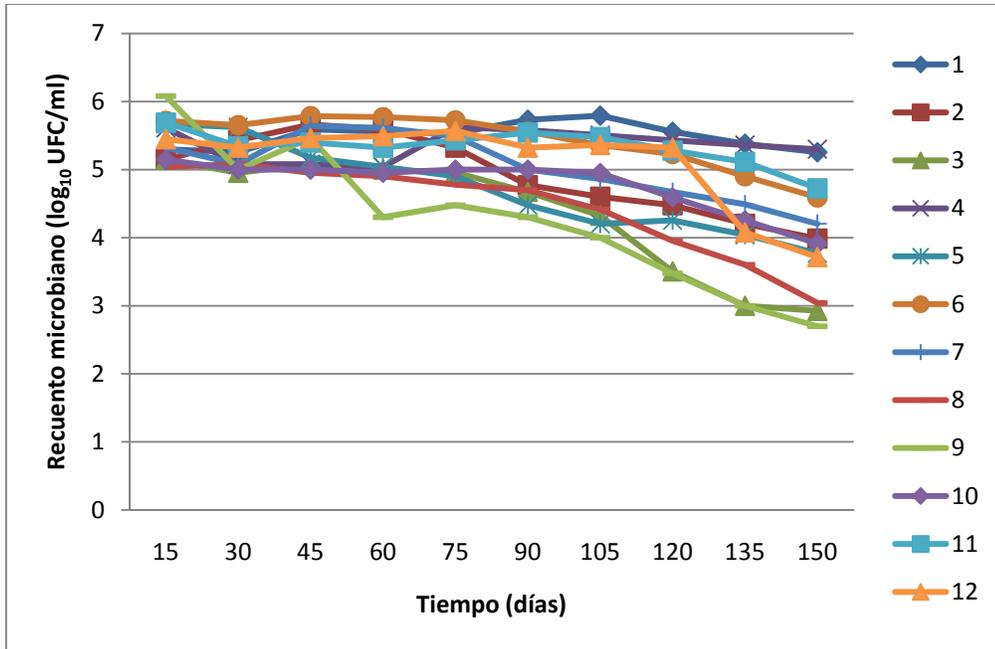


Figura 9. Dinámica poblacional de actinomicetos en los bioles de Lima

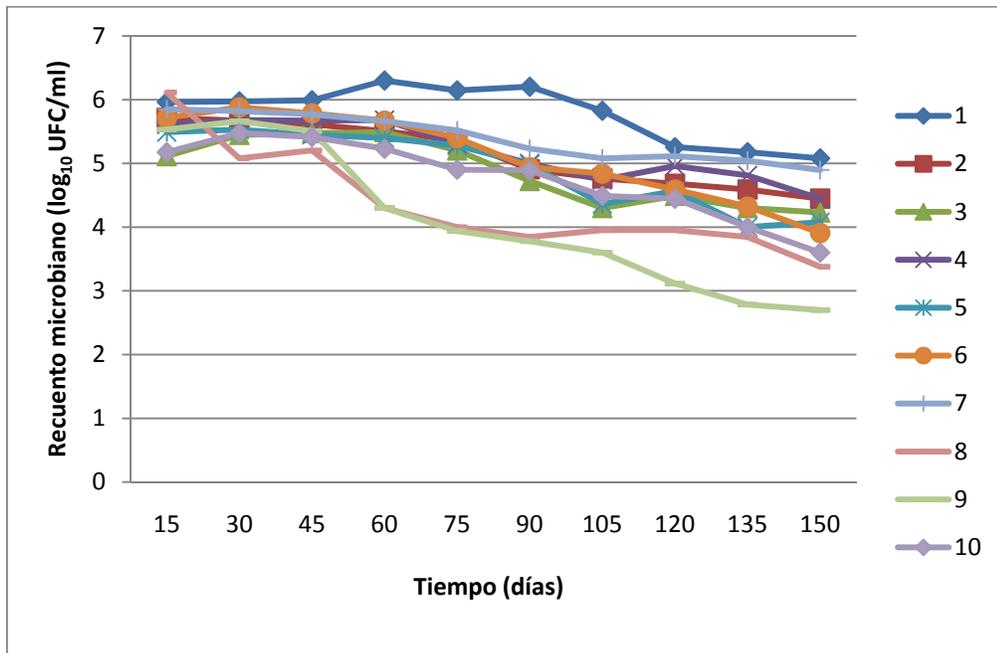


Figura 10. Dinámica poblacional de actinomicetos en los bioles de Huancayo

6.2 Determinación de la producción de ácido indol acético

La capacidad de *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. y actinomicetos para producir esta auxina fue evaluada mediante una prueba de carácter cualitativo y posteriormente mediante una prueba de carácter cuantitativo.

La positividad de las cepas productoras de AIA fue evidenciada por un viraje de color, del amarillo (inicial) a diversas tonalidades desde rosado hasta fucsia, dependiendo de la concentración de la misma (Figura 11).

En el caso del género *Pseudomonas*, de las 44 cepas evaluadas para la ciudad de Lima el 20,45% (9) resultaron positivas, mientras que para la ciudad de Huancayo de las 36 cepas evaluadas el 20,59% (7) resultaron positivas a la prueba cualitativa.

Para los *Bacillus*, fueron evaluadas las 111 cepas seleccionadas para la ciudad de Lima del cual se obtuvo el 18,91% de cepas positivas (21); mientras que para la ciudad de Huancayo del total de 94 cepas evaluadas el 14,89% (14) resultaron positivas en la prueba cualitativa.

Por último, para la prueba cualitativa de los actinomicetos fueron seleccionados para Lima un total de 106 cepas las cuales fueron sometidas a esta prueba, resultando positivas el 23,58% (25), mientras que para Huancayo de las 86 cepas seleccionadas inicialmente resultaron positivas el 18,60% (16).

Para la prueba cuantitativa se realizaron mediciones durante los cinco primeros días para *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. y al 4to, 8vo, 12vo y 15vo día para los actinomicetos, los resultados se muestran en la Tabla 12 (*Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp.) y 13 (actinomicetos) para Lima y Tabla 14 (*Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp.) y 15 (actinomicetos) para Huancayo.

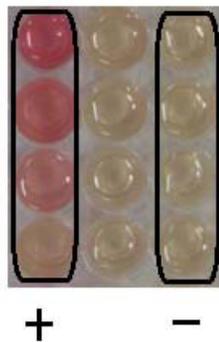


Figura 11. Prueba cualitativa de producción de AIA de *Pseudomonas* sp. Pocillos rosados (cepas positivas), pocillos amarillos (cepas negativas).

Tabla 12. Evaluación de la producción de AIA por cepas de *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. para la prueba cualitativa y cuantitativa (Lima).

Género	Código	AIA					
		Cualitativo		Cuantitativo (µg/ml)			
		3° día	1° día	2° día	3° día	4° día	5° día
<i>Pseudomonas</i> sp.	PSI-1-L	+	15,57	17,17	16,15	14,82	12,18
	PSI-2-L	+	12,79	19,89	17,38	16,35	15,76
	PSI-4-L	+	12,48	19,41	18,71	18,04	16,35
	PSI-5-L	+	21,95	20,39	18,48	18,48	15,19
	PSII-5-L	+	12,79	18,04	16,96	12,79	11,46
	PSII-7-L	+	21,95	20,89	16,55	16,15	14,82
	PSII-12-L	+	15,57	19,89	17,17	15,19	11,32
	PSIV-1-L	+	16,35	18,04	17,82	13,77	12,64
	PSIV-2-L	+	10,39	16,35	18,48	16,35	15,00
<i>Bacillus</i> sp.	BCI-9-L	+	11,03	12,65	19,04	15,38	13,17
	BCII-3b-L	+	8,13	18,94	18,71	16,15	14,46
	BCII-9-L	+	11,89	15,19	18,04	13,94	12,18
	BCII-12-L	+	8,03	15,95	15,38	15,00	13,27
	BCIII-1b-L	+	8,96	15,57	18,04	16,55	15,19
	BCIII-2-L	+	11,04	12,48	18,71	15,76	13,60
	BCIII-6a-L	+	13,11	14,11	16,76	18,04	16,55
	BCIII-6b-L	+	14,11	15,19	18,04	17,38	15,76
	BCIII-7a-L	+	15,95	15,95	18,48	17,17	15,95
	BCIII-8a-L	+	15,19	15,95	18,48	13,44	12,03
	BCIII-10c-L	+	13,77	15,57	18,26	17,17	16,15
	BCIV-3-L	+	13,11	15,76	18,04	11,32	10,01
	BCIV-4-L	+	12,79	15,95	18,35	14,64	11,46
	BCIX-2-L	+	9,53	17,17	18,48	17,60	15,95
	BCIX-3-L	+	8,13	13,11	17,17	16,55	15,19
	BCIX-4-L	+	8,43	18,48	18,26	17,60	16,55
	BCIX-6-L	+	11,03	13,11	12,64	11,76	11,17
	BCIX-7-L	+	9,04	13,48	15,43	14,54	13,60
	BCIX-10-L	+	8,53	15,95	14,76	13,60	11,32
	BCX-3-L	+	10,51	11,04	14,11	13,11	12,33
BCX-10-L	+	10,39	10,78	12,64	11,89	11,03	

Tabla 13. Evaluación de la producción de AIA por cepas de actinomicetos para la prueba cualitativa y cuantitativa (Lima).

Género	Código	AIA				
		Cualitativo		Cuantitativo (µg/ml)		
		6° día	4° día	8° día	12° día	15° día
Actinomicetos	ACIII-2-L	+	7,83	16,35	16,76	17,60
	ACIII-5-L	+	8,23	11,04	50,53	42,50
	ACIII-7b-L	+	8,64	14,11	16,96	23,62
	ACIII-11-L	+	8,13	12,48	18,71	20,14
	ACIV-2-L	+	8,54	11,60	13,11	17,17
	ACIV-6a-L	+	8,13	11,32	12,64	17,38
	ACIV-6b-L	+	8,75	9,53	12,03	18,71
	ACIV-6d-L	+	8,03	13,11	15,00	22,49
	ACIV-11b-L	+	8,64	10,51	15,95	20,14
	ACV-1-L	+	8,75	9,53	10,78	18,71
	ACV-4-L	+	9,08	11,04	14,29	17,17
	ACV-8-L	+	7,83	15,19	16,35	20,39
	ACV-12-L	+	7,93	9,65	11,46	19,89
	ACVI-2-L	+	8,03	16,35	21,41	25,42
	ACVI-4-L	+	8,23	12,33	18,04	23,62
	ACVI-8-L	+	8,03	9,53	19,41	19,65
	ACVI-11-L	+	12,48	14,11	14,82	23,05
	ACVII-1-L	+	8,13	14,82	16,35	16,76
	ACVII-4-L	+	8,33	10,51	14,64	16,55
	ACVII-5-L	+	7,93	9,77	17,82	18,48
	ACVII-11-L	+	9,08	9,89	14,29	17,17
	ACVIII-4-L	+	10,39	10,78	11,74	26,38
	ACVIII-10-L	+	8,64	11,04	13,60	17,38
	ACIX-5-L	+	8,53	15,95	18,48	21,41
	ACX-11-L	+	11,03	15,95	19,89	22,49

Tabla 14. Evaluación de la producción de AIA por cepas de *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. para la prueba cualitativa y cuantitativa (Huancayo).

Género	Código	AIA					
		Cualitativo		Cuantitativo (µg/ml)			
		3° día	1° día	2° día	3° día	4° día	5° día
<i>Pseudomonas</i> sp.	PSI-1-H	+	15,19	17,60	16,55	14,64	11,46
	PSI-2-H	+	11,46	19,89	17,60	14,46	12,03
	PSI-5-H	+	15,19	18,48	16,55	14,64	11,46
	PSII-6-H	+	12,79	18,48	16,55	12,64	10,51
	PSIII-4-H	+	14,64	18,48	17,60	15,19	11,46
	PSIII-5-H	+	10,39	16,35	18,48	17,82	14,82
	PSIV-1-H	+	12,18	16,55	17,82	13,77	12,64
<i>Bacillus</i> sp.	BCI-8b-H	+	15,95	17,17	18,48	16,96	14,29
	BCII-5-H	+	13,11	14,11	15,95	13,27	12,48
	BCIII-3-H	+	13,77	19,41	16,96	16,35	14,64
	BCIII-6-H	+	8,13	15,57	18,04	16,55	14,46
	BCIII-9-H	+	13,27	14,29	16,15	18,48	16,55
	BCIV-4-H	+	14,11	16,76	17,82	13,11	11,89
	BCIV-7-H	+	8,96	15,76	18,04	16,35	15,19
	BCIV-8-H	+	11,32	12,64	18,48	15,76	13,17
	BCV-5-H	+	10,51	18,04	17,60	16,55	15,00
	BCVIII-8-H	+	8,53	15,95	18,04	16,15	14,29
	BCIX-3-H	+	11,32	11,89	14,46	12,03	10,39
	BCIX-8-H	+	10,01	12,18	15,76	13,27	11,32
	BCX-8-H	+	9,04	11,04	14,11	14,54	12,33
	BCX-9-H	+	11,46	12,18	16,15	13,60	12,64

Tabla 15. Evaluación de la producción de AIA por cepas de actinomicetos para la prueba cualitativa y cuantitativa (Huancayo).

Género	Código	AIA				
		Cualitativo		Cuantitativo (µg/ml)		
		6° día	4° día	8° día	12° día	15° día
Actinomicetos	ACI-4-H	+	8,13	11,46	42,50	31,70
	ACIII-5-H	+	9,08	16,55	18,04	21,95
	ACIII-8-H	+	9,04	12,03	16,15	21,68
	ACIV-3-H	+	7,93	10,01	18,04	22,77
	ACIV-6-H	+	9,42	14,64	21,68	25,11
	ACV-7-H	+	7,83	9,08	15,38	20,39
	ACVI-5-H	+	8,86	11,04	18,94	23,05
	ACVI-6-H	+	9,12	11,74	18,04	24,81
	ACVI-9-H	+	10,26	10,51	15,95	22,22
	ACVII-1-H	+	8,54	9,77	17,60	19,65
	ACVII-4-H	+	7,83	9,77	13,44	18,04
	ACVII-7-H	+	11,04	11,04	11,74	17,60
	ACVIII-6-H	+	8,54	14,46	21,41	26,38
	ACIX-7-H	+	10,01	12,54	16,55	23,05
	ACX-5-H	+	10,26	15,19	24,81	21,41
	ACX-6-H	+	9,30	13,44	21,41	24,81

6.3 Prueba de efectividad de la germinación de semillas

Se efectuó una prueba de efectividad en lechuga (*Lactuca sativa* L.), basada en diferentes concentraciones de AIA.

Los análisis estadísticos de los datos del bioensayo se exhiben en las Tablas 16 y 17 para el análisis de varianza (ANOVA) y las Tablas 18 y 19 para la prueba de Duncan (Significancia <.0001).

Tabla 16. Análisis de varianza (ANOVA) de la germinación de semillas de lechuga de la prueba de efectividad para el hipocotilo.

Fuente	GL	SC	MC	F	Significancia
Tratamiento	10	2.36521818	0.23652182	66.39	<.0001
Error	22	0.07838333	0.00356288		
Total corregido	32	2.44360152			

GL: Grados de libertad; SC: Suma de cuadrados; MC: Media cuadrática; F: Valor de F.

R-Cuadrado	Coefficiente de Variabilidad
0.967923	3.177041

Tabla 17. Análisis de varianza (ANOVA) de la germinación de semillas de lechuga de la prueba de efectividad para la radícula.

Fuente	GL	SC	MC	F	Significancia
Tratamiento	10	39.13794697	3.9137947	1502.24	<.0001
Error	22	0.05731667	0.0026053		
Total corregido	32	39.19526364			

GL: Grados de libertad; SC: Suma de cuadrados; MC: Media cuadrática; F: Valor de F.

R-Cuadrado	Coefficiente de Variabilidad
0.998538	4.231077

Tabla 18. Prueba de Duncan para la germinación del hipocotilo.

Test de Duncan	N	Media	Cepa
A	3	2.26333	PSIV-1-L
A B	3	2.19500	ACIV-6d-L
B	3	2.11167	PSI-2-L
C	3	1.94833	ACIII-5-L
C	3	1.94167	PSII-7-L
C	3	1.94000	BCIII-8a-L
C D	3	1.86333	BCIV-4-L
D	3	1.81833	ACV-4-L
E	3	1.66167	BCIII-1b-L
E	3	1.65500	Control Agua
F	3	1.26833	Control Caldo

N: Número de repeticiones.

Medias con las mismas letras no son significativamente diferentes.

Tabla 19. Prueba de Duncan para la germinación de la radícula.

Test de Duncan	N	Media	Cepa
A	3	3.56667	PSII-7-L
B	3	3.42500	PSIV-1-L
C	3	0.98167	ACV-4-L
D	3	0.83167	ACIV-6d-L
D	3	0.80000	BCIII-8a-L
D E	3	0.77167	BCIV-4-L
E	3	0.72000	BCIII-1b-L
F	3	0.63833	ACIII-5-L
G	3	0.53167	PSI-2-L
G	3	0.50333	Control Caldo
G	3	0.50000	Control Agua

N: Número de repeticiones.

Medias con las mismas letras no son significativamente diferentes.

Los valores ANOVA para la germinación y elongación de hipocotilo y radícula son altamente significativos (<0.0001), para ambos caso: hipocotilo y radícula.

Los resultados de la prueba de Duncan revelan lo siguiente:

Hipocotilo: La cepa PSIV-1-L (*Pseudomonas* sp.) mostró los mejores resultados para el hipocotilo (A) exhibiendo las diferencias más significativas en comparación con el control agua (E) y el control caldo (F).

Radícula: La cepa PSII-7-L (*Pseudomonas* sp.) mostró los mejores resultados para la radícula (A) exhibiendo las diferencias más significativas en comparación con el control agua (G) y el control caldo (G).

Los resultados de la germinación de las semillas después de 120 h de incubación se pueden observar en la Figura 27, un representante de *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. y actinomicetos en contraste con los dos controles (agua y caldo).



Figura 12. Semillas de *Lactuca sativa* L. después de 120 h de incubación a diferentes concentraciones de AIA en $\mu\text{g/ml}$. De izquierda a derecha: control con agua, control con caldo, AIA producido por actinomicetos, AIA producido por *Bacillus* sp. y AIA producido por *Pseudomonas* sp.

6.4 Análisis fisicoquímicos del biol

Se muestran a continuación los datos registrados para cada análisis fisicoquímico de las muestras de biol.

6.4.1 Temperatura ambiental

Los valores promedios de temperatura fueron registradas en la estaciones meteorológicas del CIP-Lima (La Molina) y CIP-Huancayo (La Victoria) y se exhiben en las Tablas 20 y 21 y en las Figuras 13 y 14 respectivamente.

La Tabla 20 muestra las diferencias existentes entre las temperaturas máxima y mínima promedio de distrito La Molina (Lima) y se manifiestan como curvas superpuestas en la Figura 13, lo que indica una mínima variabilidad en la temperatura ambiental.

Tabla 20. Temperatura ambiental promedio (°C) registrada durante el periodo de ejecución del experimento en Lima (junio-octubre 2010).

Meses	Temperatura máxima promedio		Temperatura mínima promedio	
	Temperatura (°C)	Desviación estándar (°C)	Temperatura (°C)	Desviación estándar (°C)
Junio	15,83	0,16	15,48	0,17
Julio	14,41	0,14	14,05	0,16
Agosto	14,47	0,16	14,02	0,15
Setiembre	15,32	0,18	14,77	0,16
Octubre	15,28	0,14	14,80	0,16

Fuente: Estación meteorológica del CIP- Lima (La Molina).

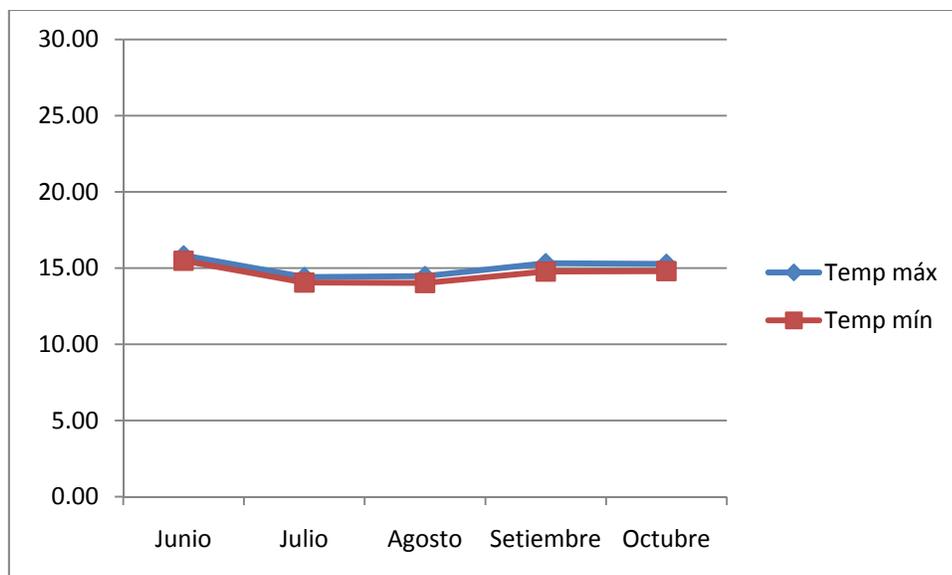


Figura 13. Promedio mensual de temperatura ambiental durante el periodo de elaboración de los bioles, Lima (junio-octubre 2010).

La Tabla 21 refleja las diferencias existentes entre las temperaturas máximas y mínimas promedio del distrito La Victoria y se manifiestan en forma de curvas paralelas (Figura 14), revelando así las variaciones de los registros térmicos acumulados a lo largo del día.

Tabla 21. Temperatura ambiental promedio (°C) registrada durante el periodo de ejecución del experimento en Huancayo (julio-noviembre 2010).

Meses	Temperatura máxima promedio		Temperatura mínima promedio	
	Temperatura (°C)	Desviación estándar (°C)	Temperatura (°C)	Desviación estándar (°C)
Julio	11,55	0,19	9,48	0,18
Agosto	12,08	0,21	10,02	0,22
Setiembre	13,58	0,17	11,84	0,19
Octubre	13,56	0,18	11,99	0,20
Noviembre	14,46	0,17	12,83	0,19

Fuente: Estación meteorológica del CIP- Huancayo (La Victoria)

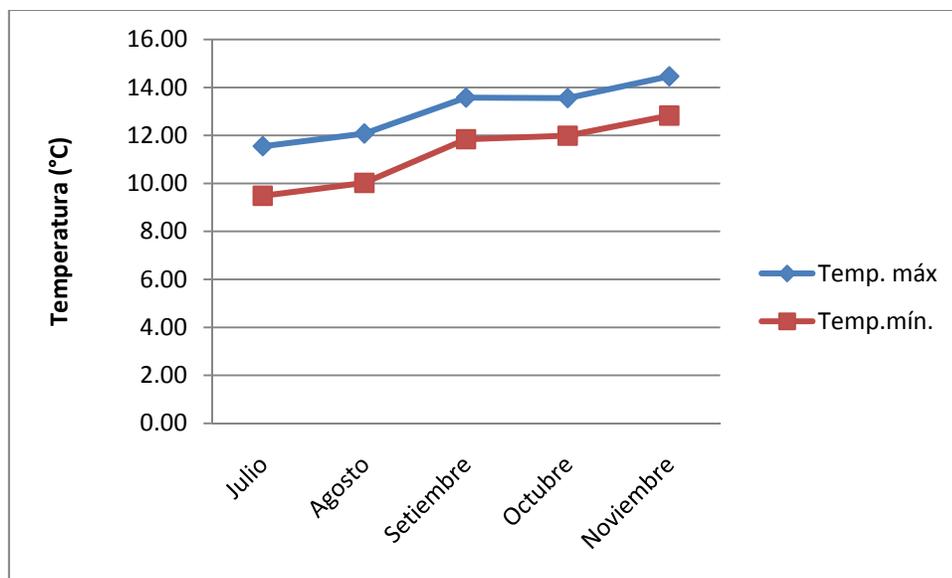


Figura 14. Promedio mensual de temperatura ambiental durante el periodo de elaboración de los bioles, Huancayo (julio-noviembre 2010).

6.4.2 Relación Carbono-Nitrógeno (C:N)

La relación C:N de los bioles de Lima y Huancayo se muestran en las Tablas 22 y 23 respectivamente.

Los datos de la relación C:N para los bioles de Lima (Tabla 22) permite distinguir dos grupos: relación C:N baja (tres bioles) y relación C:N óptima (nueve bioles).

El grupo de relación C:N baja está representado por tres bioles (6; 7; y 11) y son aquellos que presentan valores menores de 17.

El grupo de relación C:N óptima está representado por nueve bioles (1; 2; 3; 4; 5; 8; 9; 10 y 12) y son aquellos que presentan valores de entre 18 y 30.

No se registran bioles con relación C:N alta (valores mayores a 30).

Tabla 22. Valores de C:N para los bioles de Lima

Biol	C:N
1	21 orgánico
2	21 orgánico
3	21 orgánico
4	21 inorgánico
5	21 inorgánico
6	10 orgánico
7	10 inorgánico
8	30 orgánico
9	30 orgánico
10	21 orgánico
11	10 orgánico
12	30 orgánico

Los datos de la relación C:N para los bioles de Huancayo (Tabla 23) permite distinguir dos grupos: relación C:N baja (dos bioles) y relación C:N óptima (ocho bioles).

El grupo de relación C:N baja lo constituyen dos bioles (6 y 7).

El grupo de relación C:N óptima está representado por ocho bioles (1; 2; 3; 4; 5; 8; 9 y 10).

No se registran bioles con relación C:N alta (valores mayores a 30).

Tabla 23. Valores de C:N para los bioles de Huancayo

Biol	C:N
1	21 orgánico
2	21 orgánico
3	21 orgánico
4	21 inorgánico
5	21 inorgánico
6	10 orgánico
7	10 inorgánico
8	30 orgánico
9	30 orgánico
10	21 orgánico

6.4.3 Temperatura del biol

Los valores promedio de temperatura de los bioles de Lima y Huancayo, registrados durante el experimento se muestran en las Tablas 24 y 25 respectivamente, mientras que las Figuras 15 y 16 muestran las tendencias para ambos casos.

La Tabla 24 muestra homogeneidad en los datos de temperatura mensual de los bioles de Lima. La temperatura máxima alcanzada se registró el mes de setiembre con 24,21°C (biol 4) y la mínima alcanzada se registró en el mes de julio con 19,75 (bioles 2 y 9).

Tabla 24. Promedio mensual de temperatura (en °C) para los bioles de Lima correspondiente al periodo del 7 de junio al 11 de octubre de 2010.

Biol	Meses transcurridos				
	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
1	21,44	19,76	21,80	22,29	23,00
2	21,06	19,75	21,25	22,29	23,13
3	21,75	19,95	21,90	22,29	22,75
4	21,25	20,27	22,60	24,21	23,25
5	21,75	20,05	21,55	22,86	23,25
6	21,63	20,50	21,55	22,50	23,00
7	21,38	20,15	21,60	21,57	23,00
8	21,13	21,25	21,50	21,14	21,25
9	21,31	19,75	21,25	23,17	23,50
10	21,75	19,89	21,95	23,14	23,25
11	21,44	19,89	21,40	23,17	23,75
12	21,75	20,28	22,45	23,50	24,00

Nota: El registro de temperatura se realizó a las 14:00 horas

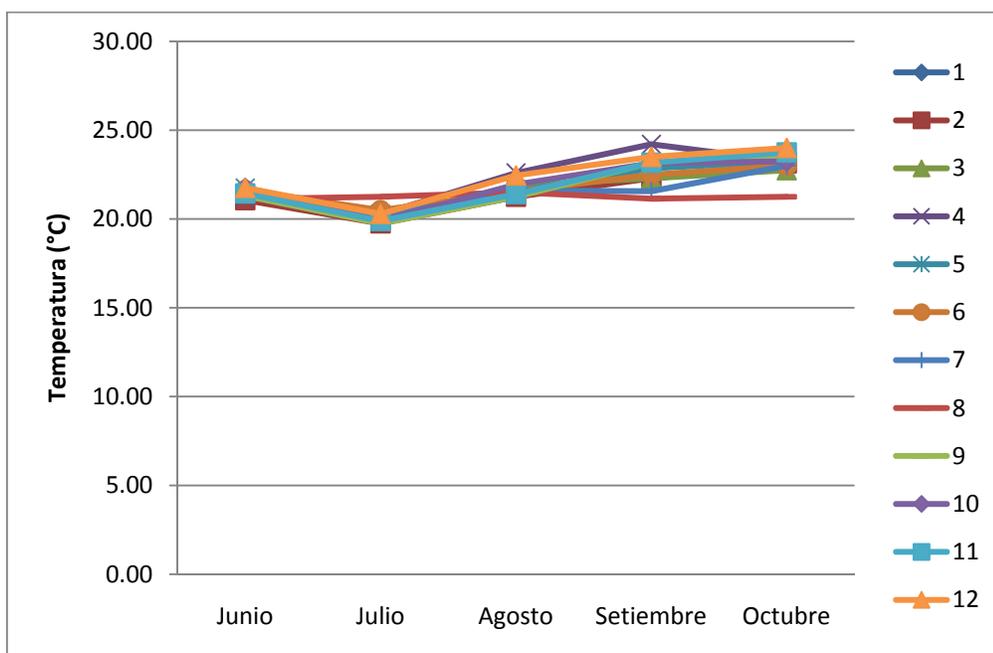


Figura 15. Promedio mensual de temperatura (en °C) para los bioles de Lima (7 de junio al 11 de octubre de 2010).

La Tabla 25 muestra una dispersión del promedio de los datos de temperatura para el mes de julio (ciudad de Huancayo) y fluctúan desde 27,25°C (biol 1) hasta 20,33 (bioles 3 y 5). Los datos se homogenizan a partir del mes de setiembre.

Tabla 25. Promedio mensual de temperatura (en °C) para los bioles de Huancayo correspondiente al periodo del 7 de julio al 10 de noviembre de 2010.

Biol	Meses transcurridos				
	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre
1	27,25	24,00	21,77	22,29	23,50
2	21,50	21,08	21,08	21,63	21,33
3	20,33	20,96	20,96	21,29	21,33
4	21,17	21,04	20,69	21,63	21,33
5	20,33	20,46	20,85	21,08	21,67
6	24,50	24,04	24,46	24,17	23,67
7	21,50	21,00	23,96	23,92	21,67
8	21,08	21,04	22,27	22,38	21,50
9	21,67	21,00	23,04	22,88	21,33
10	23,50	22,58	22,62	23,25	22,17

Nota: El registro de temperatura se realizó a las 14:00 horas

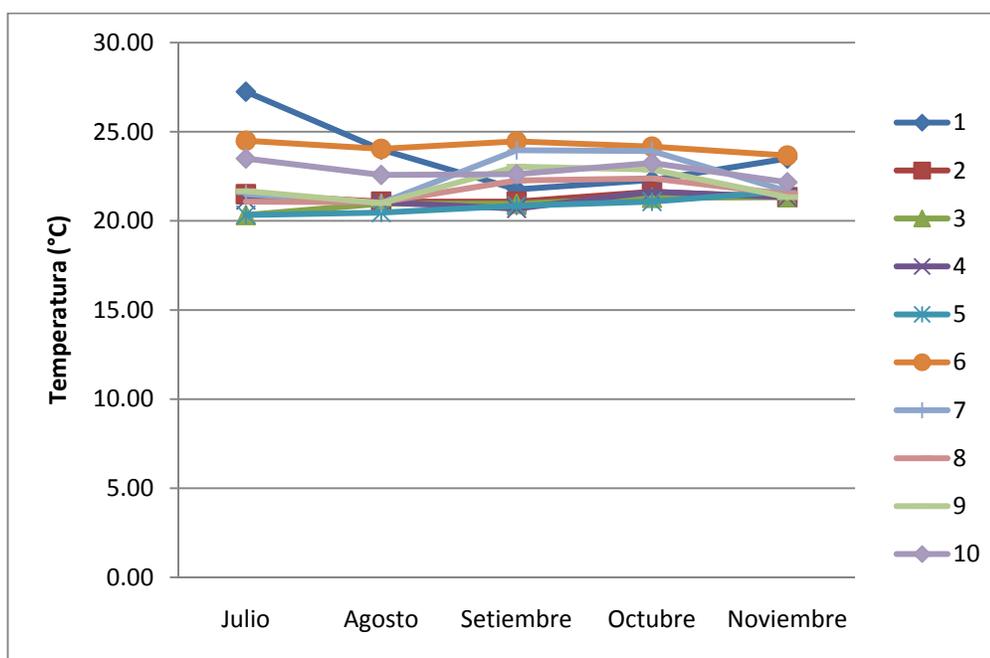


Figura 16. Promedio mensual de temperatura (en °C) para los bioles de Huancayo (7 de julio al 10 de noviembre de 2010).

6.4.4 pH

Los valores de pH de los bioles de Lima y Huancayo, registrados durante el experimento se muestran en las Tablas 26 y 27 respectivamente, mientras que las Figuras 17 y 18 muestran las tendencias para ambos casos.

La dinámica de pH para los bioles de Lima (Figura 17) muestra dos grupos: acidófilo (once bioles) y neutrófilo (un biol).

Los bioles acidófilos son aquellos que presentan valores de pH por debajo de 6,5 durante los 150 días de evaluación y constituyen la mayoría de bioles (2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; y 12).

Los bioles neutrófilos son aquellos que mantienen un pH entre 6,5 y 7,5 durante los 150 días de evaluación y están representados por un único biol (1).

No se registran bioles alcalófilos (pH mayor a 7,5).

Tabla 26. Valores de pH para los bioles de Lima

Biol	Días transcurridos									
	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150
1	6,97	7,93	6,73	6,62	6,22	6,85	7,11	7,40	7,35	7,44
2	5,63	7,05	6,14	6,21	5,71	5,90	5,99	6,07	5,89	6,15
3	6,04	6,48	6,02	6,03	5,59	5,80	5,90	5,94	5,80	6,07
4	6,02	7,62	6,27	6,49	5,85	6,14	6,28	6,52	6,98	7,40
5	6,44	6,56	6,35	6,31	5,92	6,19	6,20	6,31	6,26	6,38
6	6,19	7,38	6,33	6,56	5,97	6,00	6,07	6,16	6,22	6,28
7	6,46	6,58	5,95	6,00	5,54	5,75	5,87	5,86	5,78	5,93
8	6,39	5,85	5,31	5,24	4,79	4,89	4,93	4,88	4,80	5,01
9	6,23	5,69	5,09	4,92	4,72	4,81	4,87	4,81	4,75	4,95
10	5,89	7,12	5,86	5,27	4,88	4,99	5,00	4,93	4,85	5,06
11	5,94	6,09	6,24	6,00	5,77	6,00	6,16	6,26	6,14	6,36
12	6,45	5,60	5,15	5,01	4,83	4,98	5,01	4,97	4,94	5,16

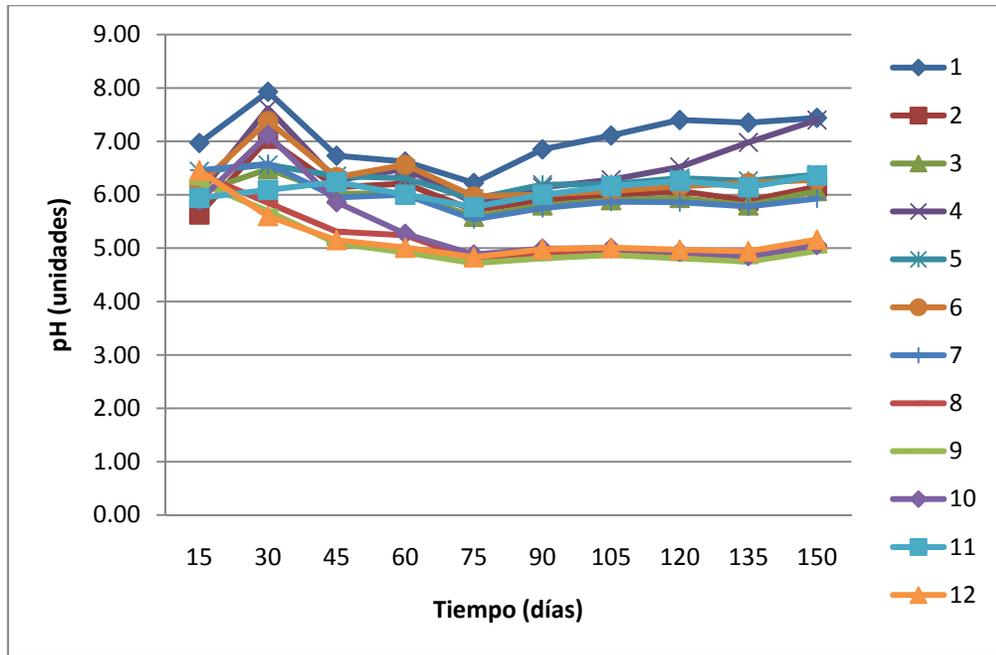


Figura 17. Dinámica de pH para los bioles de Lima

La dinámica de pH para los bioles de Huancayo (Figura 18) muestra dos grupos: acidófilo (nueve bioles) y neutrófilo (un biol).

Los bioles acidófilos constituyen la mayoría de bioles (2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 y 10).

El biol 1 se comporta del mismo modo que su homólogo de Lima (neutrófilo).

No se registran bioles alcalófilos (pH mayor a 7,5).

Tabla 27. Valores de pH para los bioles de Huancayo

Biol	Días transcurridos									
	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150
1	7,23	6,38	6,31	6,35	7,12	7,17	7,44	7,43	7,34	7,32
2	5,05	4,99	5,76	5,13	5,22	5,17	5,15	5,25	5,16	5,27
3	5,34	5,93	5,93	5,76	5,62	4,92	4,85	4,97	4,87	4,97
4	5,92	5,41	6,18	5,73	5,96	5,87	5,91	5,95	5,88	5,93
5	5,86	6,38	5,72	5,59	5,62	5,07	5,07	5,18	5,12	5,18
6	5,63	6,03	5,97	5,71	5,66	5,10	5,03	5,13	5,08	5,14
7	6,38	6,09	5,85	5,82	5,99	5,82	5,91	6,02	5,89	6,00
8	5,73	5,77	5,25	5,07	4,97	4,86	4,85	4,99	4,91	5,00
9	5,50	5,88	5,00	4,95	5,01	4,85	4,88	5,03	4,94	5,01
10	5,51	5,77	5,21	5,19	5,26	5,13	5,12	5,21	5,08	5,08

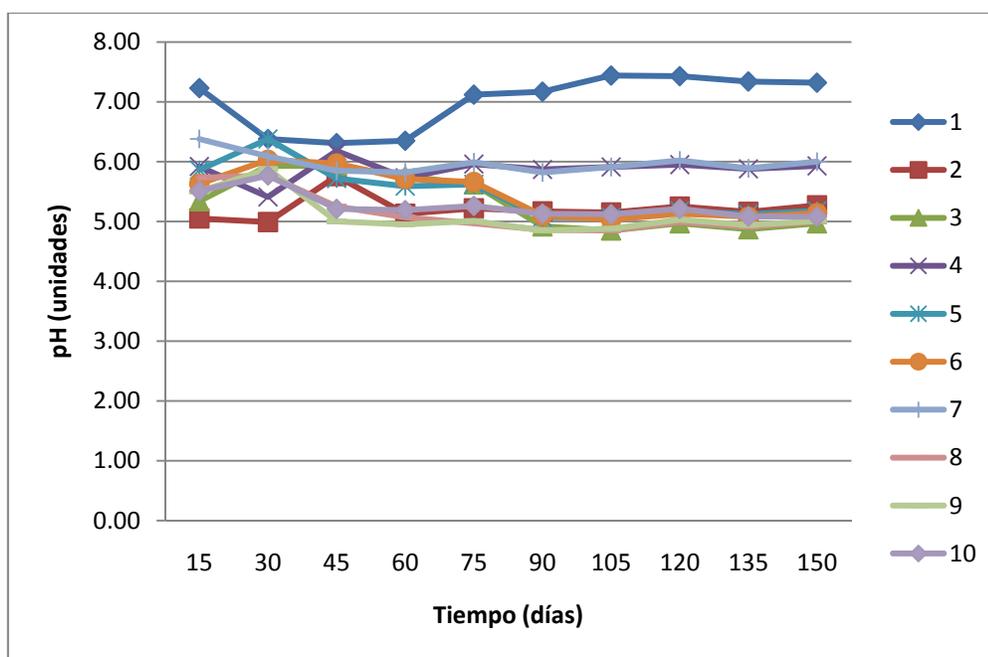


Figura 18. Dinámica de pH para los bioles de Huancayo

6.4.5 Nitrógeno, fósforo y potasio total

Los valores promedio de nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) total registrados para los bioles de Lima y Huancayo se encuentran en las Tablas 28 y 29, mientras que las Figuras 19 y 20 revelan las comparaciones entre los tres minerales para ambos casos.

Los valores promedio de N de los bioles de Lima (Figura 19) muestra tres picos correspondientes a los bioles 6; 7 y 11, con 0,380%, 0,376% y 0,358% respectivamente.

Los valores de P, resultan bajos en todos los bioles fluctuando entre 0,010% y 0,049%, mientras que los resultados de K muestran valores entre 0,154% y 0,266%.

Tabla 28. Valores promedio de nitrógeno, fósforo y potasio totales (en %) para los bioles de Lima

Biol	Nutrientes		
	N (%)	P (%)	K (%)
1	0,143	0,010	0.206
2	0,156	0,027	0.224
3	0,256	0,041	0.266
4	0,162	0,014	0.224
5	0,202	0,021	0.260
6	0,380	0,020	0.256
7	0,376	0,036	0.252
8	0,090	0,049	0.208
9	0,101	0,048	0.172
10	0,149	0,046	0.242
11	0,358	0,027	0.254
12	0,088	0,054	0.154

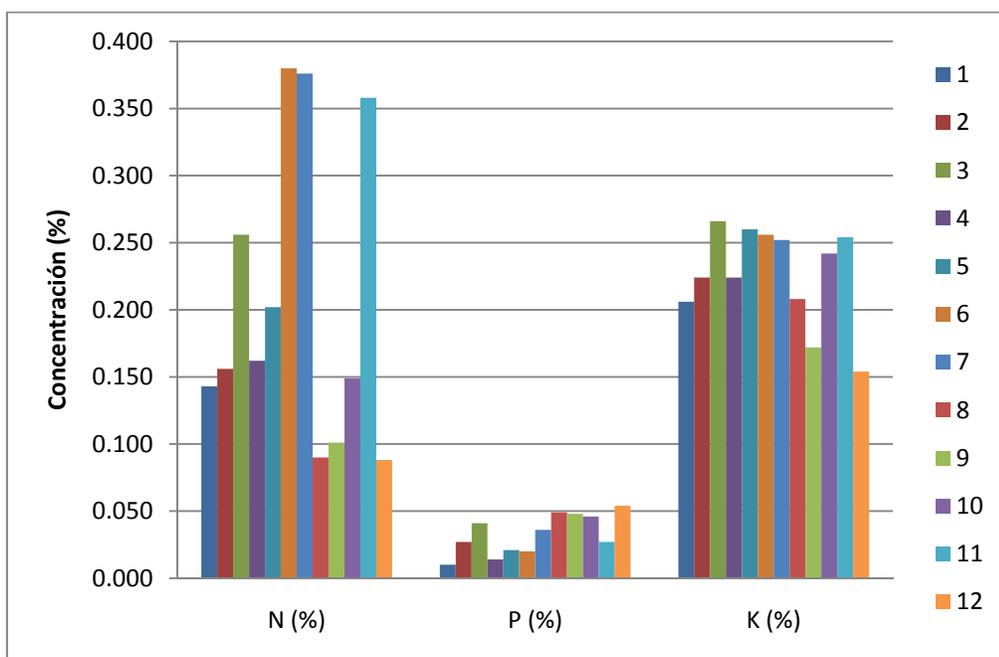


Figura 19. Concentraciones (%) de nitrógeno, fósforo y potasio en los bioles de Lima.

Los valores promedio de N de los bioles de Huancayo (Figura 20), muestra un pico correspondiente al biol 7, con un valor de 0,428%.

Los valores de P, son igualmente bajos en todos los bioles fluctuando entre 0,020% y 0,061%, mientras que los resultados de K resultan más homogéneos entre sí, pero con valores bajos comparado con los datos de Lima, fluctuando entre 0,019% y 0,049%.

Tabla 29. Valores promedio de nitrógeno, fósforo y potasio totales (en %) para los bioles de Huancayo.

Biol	Nutrientes		
	N (%)	P (%)	K (%)
1	0,111	0,020	0,019
2	0,106	0,051	0,021
3	0,113	0,041	0,049
4	0,191	0,043	0,024
5	0,157	0,032	0,026
6	0,177	0,043	0,030
7	0,428	0,028	0,022
8	0,094	0,052	0,022
9	0,136	0,061	0,030
10	0,168	0,054	0,031

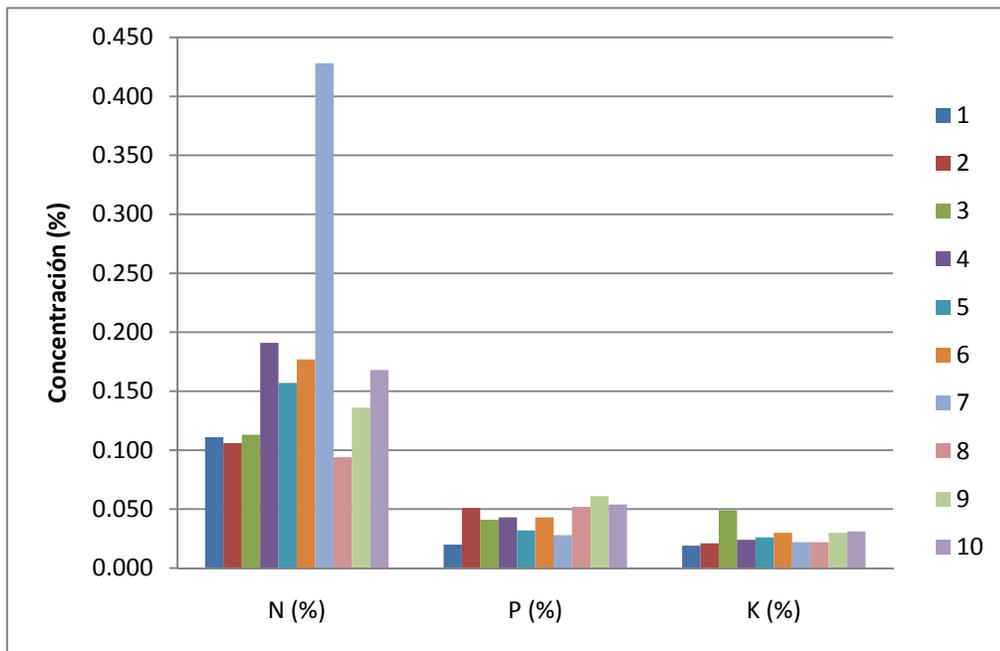


Figura 20. Concentraciones (%) de nitrógeno, fósforo y potasio en los bioles de Huancayo.

VII. DISCUSIÓN

7.1 Evaluación de las bacterias productoras de AIA en las muestras de biol

7.1.1 *Pseudomonas* sp.

La población de *Pseudomonas* decrece desde los 15 días según la gráficas tanto para la ciudad de Lima como para Huancayo, esto está estrechamente relacionado a la producción de sulfuro de hidrógeno en los biodigestores en los primeros días de biodigestión. Las curvas de dinámica poblacional desaparecen alrededor de los 75 días, atribuyéndolo a la etapa metanogénica, que probablemente se inicie alrededor de este tiempo y siendo las *Pseudomonas* microorganismos aerobios que no poseen estructuras de resistencia en condiciones desfavorables para su supervivencia, su población desaparece.

No se cuenta con información detallada de cuando un biol ingresa a la etapa metanogénica, pero se puede deducir, pues los bioles incrementan (en su mayoría) el pH a los noventa días (Tabla 26) para la ciudad de Lima, mientras que para los bioles de Huancayo (Tabla 27) no se observa un incremento considerable, pero el pH se mantiene estable desde los noventa días hasta los ciento cincuenta días de experimentación; y uno de los factores determinantes de esta etapa (metanogénica) consiste en que el pH no sea ácido (rango de 7,2 – 8,2) (Zeemann *et al.* 1985).

7.1.2 *Bacillus* sp.

En los bioles de Lima (en general), se observa un tenue aumento de la población en la mayoría de bioles a los 30 días (segundo muestreo), para decaer a partir de los 45 días (tercer muestreo) hasta los 75 días, e igualmente puede estar relacionado con el inicio de la etapa metanogénica y además a causa que hasta los 75 días el pH decrece progresivamente, como se puede apreciar en la Figura 6.

Los resultados de población microbiana aumentan ligeramente a partir de los 90 días (Tabla 8), esta variabilidad se puede relacionar directamente con el aumento de pH en el medio, como se puede observar en la Tabla 26.

Los bacilos hasta los 150 días pudieron ser contabilizados y el cambio en la dinámica poblacional del inicio al final del experimento no fue tan variable como para las *Pseudomonas* por ejemplo y se debe a la forma de resistencia de los bacilos y su capacidad de adaptación a condiciones adversas.

En la Figura 7, se observa un comportamiento casi lineal en el tiempo para los *Bacillus* aislados de los bioles de Huancayo.

Al igual que en el caso anterior, los *Bacillus* aumentaron ligeramente a los 30 días (segundo muestreo), para luego decaer levemente hasta los 75 días. a partir de este momento se puede observar un zigzagado (Tabla 9) en los resultados de la dinámica poblacional, esto se debe principalmente a que el pH de las muestras de Huancayo (Tabla 27) no fue ascendiendo como en el caso de Lima, sino fue aumentando y cayendo levemente en lo que restaba del proceso.

El biol 1 de Huancayo muestra una curva muy lineal en el tiempo, mostrando un resultado casi idéntico de los datos del inicio ($1,9 \times 10^5$ UFC/ml) y los datos del final ($3,0 \times 10^5$ UFC/ml) del experimento y se le atribuye al pH neutro (7,01 en promedio), relación C:N óptima (21) y valores de N,P y K favorables.

El biol 9 de Huancayo muestra una curva muy irregular en el tiempo, además de poseer la mayor carga microbiana a comparación con el resto de bioles a los quince días de experimentación (primer muestreo) con $2,9 \times 10^6$ UFC/ml, muestra una caída significativa a los 135 días (noveno muestreo), para luego sufrir un aumento repentino a los 150 días de experimentación (décimo muestreo) y también es atribuido al pH. Del octavo al noveno muestreo muestra una baja de pH de 5,03 a 4,94, para posteriormente incrementar el pH al décimo muestreo con 5,01.

Este biol es el que registra el más bajo pH de los bioles de Huancayo con 5,11 y posee una relación C:N de 30.

7.1.3 Actinomicetos

Los bioles en general inician con una carga homogénea, a los 15 días del experimento (primer muestreo) y conforme transcurre el tiempo muestra un descenso considerable para la mayoría bioles.

El biol 1 de Lima, muestra una curva casi lineal en el tiempo, iniciando con $2,0 \times 10^5$ UFC/ml, se observa además que durante el tiempo de biodigestión la carga microbiana aumenta ligeramente hasta los 105 días (séptimo muestreo), para luego decaer ligeramente hasta los 150 días (decimo muestreo) con un total de $1,8 \times 10^5$ UFC/ml, esto es atribuido al pH neutro de este biol (7,01 en promedio), relación C:N óptima (21) y valores de N,P y K favorables.

El biol 9 de Lima, muestra una curva decreciente en el tiempo, iniciando con $1,2 \times 10^6$ UFC/ml, se observa además que durante el tiempo de biodigestión la carga microbiana aumenta ligeramente hasta los 45 días (tercer muestreo), para luego decaer hasta los 150 días (decimo muestreo) con un total de $5,0 \times 10^2$ UFC/ml, cabe recalcar que este es el resultado más bajo para los bioles de Lima y es atribuido principalmente a que este biol posee el pH más ácido para esta ciudad (5,08 en promedio).

En la Figura 10, se observa un comportamiento decreciente en el tiempo para los actinomicetos de la ciudad de Huancayo.

Los bioles de Huancayo (en general) inician con una carga homogénea, a los 15 días del experimento (primer muestreo) y conforme transcurre el tiempo muestra un descenso considerable para la mayoría de bioles.

El biol 1 de Huancayo, muestra una curva casi lineal en el tiempo, iniciando con $9,2 \times 10^5$ UFC/ml, se observa además que durante el tiempo de biodigestión la carga microbiana

aumenta ligeramente hasta los 90 días (sexto muestreo), para luego decaer ligeramente hasta los 150 días (decimo muestreo) con un total de $1,2 \times 10^5$ UFC/ml, esto es atribuido al pH neutro de este biol (7,06 en promedio), relación C:N óptima (21) y valores de N,P y K favorables.

El biol 9 de Huancayo, muestra una curva decreciente en el tiempo, iniciando con $3,4 \times 10^5$ UFC/ml, se observa además que durante el tiempo de biodigestión la carga microbiana aumenta ligeramente hasta los 30 días (segundo muestreo), para luego decaer hasta los 150 días (décimo muestreo) con un total de $6,1 \times 10^2$ UFC/ml. Cabe recalcar que este es el resultado más bajo para las muestras de bioles de Huancayo y es atribuido principalmente a que este biol posee el pH más ácido (5,11 en promedio).

7.2 Determinación de la producción de ácido indol acético

Existen investigaciones donde se reporta a las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, así como también algunos actinomicetos como productores de AIA, una de las auxinas mas estudiadas hasta el momento (Tsavkelova *et al.*, 2006; Ahmad *et al.*, 2005).

El 20 % de las cepas de *Pseudomonas* sp evaluadas resultaron positivas. La producción de AIA se evaluó durante los cinco primeros días de inoculación para esta prueba, tal y como se observa en la Tablas 12 y 14, la producción de AIA se dio de manera progresiva, alcanzado su pico máximo al segundo día de evaluación (en la mayoría de los casos) con valores que fluctúan entre 10,39 µg/ml y 21,95 µg/ml. Nuestros resultados coinciden con los reportados por Torres *et al.* (2000) que encontraron la mayor producción de AIA (28,67 µg/ml) durante la fase estacionaria alcanzada a los tres días de incubación en diferentes cepas de *Pseudomonas*. Sin embargo, los resultados mostrados por Martínez (2010) sobre *Pseudomonas* fluorescentes muestran resultados bajos a comparación de los expuestos en este trabajo. Martínez afirma que el pico máximo alcanzado fue encontrado al 5to día de evaluación con una concentración de 8,36 µg/ml. En todo caso la variabilidad y divergencia entre los datos es atribuida a las especies *Pseudomonas* estudiadas.

Si bien los géneros de bacterias PGPR más asociados a la producción de AIA son *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* (Ahmad *et al.*, 2005), se han reportado especies de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus subtilis* capaces de producir AIA en diversas cantidades (Elsorra *et al.*, 2004).

Entre las especies de *Bacillus* que se han reportado como productoras de AIA se encuentran: *B. megaterium*, *B. sphaericus*, *B. brevis*, *B. polymyxa*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, la producción de AIA registrada por estas especies va desde 5,30 µg/ml hasta

9,43 $\mu\text{mol/ml}$ (De Freitas *et al.*, 1997). Sin embargo, en éste trabajo, el 17,07% de *Bacillus* aislados producen concentraciones de AIA que fluctúan entre 8,03 $\mu\text{g/ml}$ y 19,41 $\mu\text{g/ml}$, alcanzando el pico máximo de producción al tercer día de evaluación (para la mayoría de las cepas).

Como se puede observar la capacidad de producción de AIA es muy variable entre las cepas de *Bacillus* sp. aisladas, esta diferencia se puede atribuir diversos factores como la diversidad de vías biosintéticas, ubicación de genes involucrados en la síntesis, secuencias regulatorias, la presencia de enzimas capaces de convertir las formas libres de AIA en formas conjugadas y por último la influencia de las condiciones ambientales (Patten y Glick, 1996).

La producción tanto *in vitro* como *in vivo* de estas fitohormonas, depende de la composición del medio utilizado, la diversidad de vías biosintéticas, la presencia de enzimas capaces de convertir las formas libres de AIA en formas conjugadas y por último la influencia de las condiciones del cultivo y ambientales (Patten y Glick, 2002).

Por otro lado, al evaluar las cepas de actinomicetos (106 de Lima y 86 de Huancayo) previamente aisladas, se obtuvo como resultado que el 21,35% de éstas fueron positivas. En el este trabajo se evaluó la producción de AIA de actinomicetos en el 4to, 8vo, 12vo y 15vo día de incubación. Sin embargo, en la investigación realizada por Franco (2008), las mediciones fueron realizadas en el día 8vo, 9no, 10mo y 11vo, es por ello que solo se compararon los resultados obtenidos en el 8vo día de evaluación, valores que varían entre 0,945 $\mu\text{g/ml}$ y 13,193 $\mu\text{g/ml}$ de AIA, los cuales coinciden parcialmente con los presentados en este trabajo, con excepción de las cepas ACIII-2-L (16,35 $\mu\text{g/ml}$), ACIII-7b-L (14,11 $\mu\text{g/ml}$), ACV-8-L (15,19 $\mu\text{g/ml}$), ACVI-2-L (16,35 $\mu\text{g/ml}$), ACVI-11-L (14,11 $\mu\text{g/ml}$), ACVII-1-L (14,82 $\mu\text{g/ml}$), ACIX-5-L (15,95 $\mu\text{g/ml}$) y ACX-11-L (15,95 $\mu\text{g/ml}$) para

Lima y las cepas ACIII-5-H (16,55 µg/ml), ACIV-6-H (14,64 µg/ml), ACVIII-6-H (14,46 µg/ml), ACX-5-H (15,19 µg/ml) y ACX-6-H (13,44 µg/ml) para Huancayo.

Así mismo, los altos valores de AIA registrados en algunas de las cepas como ACIII-5-L (50,53 µg/ml) y ACI-4-H (42,50 µg/ml), ambos al 12vo día, podría deberse según Manulis *et al.* (1994) y Da Silva *et al.* (2008), a otros productos derivados del indol, pues para la síntesis del ácido indol acético (AIA), participan más de una ruta metabólica, como la ruta Indol-3-acetamida, Indol-3-etanol, ácido Indol-3-láctico, Indol-3-acetaldehido, siendo la primera, la más común entre los microorganismos y plantas.

Por otro lado, en la investigación hecha por Rico (2009), las mediciones realizadas a los actinomicetos para la producción de AIA fueron al 4to, 8vo, 12vo y 15vo día y los resultados obtenidos fueron muy parecidos a los presentados en este trabajo. Las máximas concentraciones obtenidas por Rico fueron de 50,53 µg/ml, 26,38 µg/ml y 25,42 µg/ml, mientras que las demás cepas evaluadas fluctuaron entre 6,91 µg/ml y 16,63 µg/ml.

7.3 Prueba de efectividad de la germinación de semillas

Existen diversas experiencias relacionadas con bioensayos en lechuga y se mencionan a continuación las más relacionadas con esta investigación:

Selvadurai *et al.* (1991) reportaron que la producción del AIA incrementa la longitud radical y el número de raíces secundarias aún a bajas concentraciones y no siempre las altas concentraciones garantizan mejor promoción de crecimiento, por lo tanto es importante tener en cuenta las señales y mecanismos de regulación que posee la planta para la producción de AIA.

Khalid y Arshad (2004) inocularon caldos de rizobacterias que producían bajas concentraciones de auxinas *in vitro* a diferentes campos de trigo, encontrando un incremento considerable en la productividad y desarrollo del cultivo.

En el caso del hipocótilo, la medida más alta alcanzada fue por la cepa PSIV-1-L (16,35 µg/ml) (*Pseudomonas* sp.), en el segundo lugar la cepa ACIV-6d-L (8,03 µg/ml) (actinomiceto), mientras la cepa PSII-7-L (21,95 µg/ml) (*Pseudomonas* sp.) se ubicó en el quinto lugar, a pesar de ser la cepa con la más alta concentración de AIA. Según Tsavkelova *et al.* (2006), los más eficientes productores de auxinas son las bacterias habitantes de la rizósfera de las plantas. El AIA producido por las bacterias representa una capacidad PGPR importante ya que beneficia a la planta contribuyendo con el crecimiento radicular; pues esta auxina es capaz de promover la formación de raíces laterales y adventicias, estimular la germinación de semillas, entre otros, sin embargo el efecto de ésta sobre la planta depende de su concentración, el tipo de cultivo en el que éste se evalúe y del microorganismo (Vestergård *et al.*, 2007).

Por el contrario, en el caso de la radícula, la mejor cepa fue la PSII-7-L (21,95 µg/ml), seguida por la cepa PSIV-1-L (16,35 µg/ml), en este caso los dos primeros lugares fueron las dos cepas de *Pseudomonas* sp. con las más altas concentraciones de AIA.

La relación entre la producción de ácido indol acético y la promoción de crecimiento en la planta ha sido comprobada por diversos autores, utilizando cepas mutantes deficientes del gen productor de AIA, las cepas mutantes no promovieron el crecimiento vegetal mientras que las que si lo poseían presentaron diferencias significativas (Dobbelaere *et al.*, 1999; Patten y Glick, 2002).

Los resultados de las pruebas estadísticas, tanto para el ANOVA como para la prueba de Duncan, muestran que son altamente significativos, corroborando los ya mostrados en la Figura 12.

De la misma manera los coeficientes de variabilidad para el hipocotilo y la radícula son de 3.177041 y 4.231077 y los valores del R-cuadrado son 0.967923 y 0.998538 respectivamente. Mostrando de esta manera la significancia del experimento, y aceptándose además que el AIA tuvo un efecto positivo sobre las semillas de *Lactuca sativa* L.

7.4 Análisis fisicoquímicos

7.4.1 Temperatura ambiental

Se observa en la Figura 13, que las curvas de temperatura máxima y mínima (Lima) se encuentran superpuestas, lo que indica una mínima variabilidad de la temperatura ambiental.

La oscilación mensual de temperatura, declina en los meses de julio y agosto, para luego incrementarse ligeramente a partir del mes de setiembre, lo que coincide con la transición del invierno hacia la primavera en la ciudad de Lima.

En la Figura 14 las curvas se muestran de forma paralela (Huancayo), lo que indica una fuerte variabilidad de los registros térmicos acumulados a lo largo del día.

Las curvas de temperatura así mismo muestran un registro bajo para los meses de julio y agosto, incrementándose a partir del mes de setiembre, situación que corresponde con la transición de la estación seca (mayo a octubre) hacia la estación húmeda (noviembre a abril) en la ciudad de Huancayo.

7.4.2 Relación C:N

Los bioles con relación C:N baja (10) corresponden a los números 6; 7 y 11 (Tabla 22) para la ciudad de Lima, valores que coinciden con la adición de dos insumos. Para el biol 7 se agregó 0,55 Kg de nitrógeno y como resultado obtuvo una relación C:N de 10 inorgánico. Para los bioles 6 y 11 se agregaron 10 Kg de harina de pescado a cada uno y

como resultado, obtuvieron una relación C:N de 10 orgánico. Éstos dos insumos incrementaron el N total y por consiguiente disminuyó el valor de la tasa C:N al ser una relación inversamente proporcional.

A los bioles 4 y 5 también se les agregó nitrógeno pero en cantidades muy bajas 0,04 Kg y 0,06 Kg respectivamente, por ese motivo mantuvieron una relación C:N óptima (21) pero de naturaleza inorgánica.

Los bioles de Huancayo con relación C:N baja (10) corresponden a los números 6 y 7 (Tabla 23), valores que coinciden con la adición de los dos insumos mencionados anteriormente. Para el biol 6 se agregó 6 Kg de harina de pescado y como resultado obtuvo una relación C:N de 10 orgánico. Para el biol 7 se agregó 0,35 Kg de nitrógeno y como resultado obtuvo una relación C:N de 10 inorgánico.

De la misma manera a los bioles 4 y 5 también se les agregó nitrógeno pero en cantidades muy bajas 0,03 Kg y 0,06 Kg respectivamente, por ese motivo mantuvieron una relación C:N óptima (21) pero de naturaleza inorgánica.

Los bioles con relación C:N óptima corresponden a los números 1; 2; 3; 4; 5 y 10 para la ciudad de Lima y los bioles 1; 2; 3; 4; 5 y 10 para la ciudad de Huancayo, lo que revela que existe una adecuada proporción de nutrientes para el proceso de biodigestión, aunque no se cuenta con mayor información sobre su biodisponibilidad.

Los tratamientos de alta relación C:N corresponden a los números 8; 9 y 12 de Lima y 8 y 9 de Huancayo, lo que indica un déficit de N total con respecto al contenido de C. Esta información es trascendental ya que perjudicaría la adecuada degradación de la materia

orgánica y produciría la inmovilización microbiana del N disuelto, lo que podría reducir su aprovechamiento por parte de los cultivos (Santana; 1985; Steffen *et al.*, 1998; Myrold, 1999; Carrillo, 2003; Paneque y Calaña, 2004).

7.4.3 Temperatura del biol

Los datos de temperatura de los bioles de Lima, son homogéneos entre sí en cada mes evaluado (Figura 15), sin embargo los bioles 4; 8 y 12 muestran un ligero aumento en la temperatura dependiendo del mes evaluado, esto es atribuido a la distribución de los biodigestores y la sobre exposición a la radiación solar durante la toma de la temperatura para ese periodo (14:00 h).

De igual forma, los bioles de Lima siguen una tendencia ascendente a partir del mes de julio, que coincide con una transición estacional del invierno a la primavera.

En el caso de los biodigestores de Huancayo, se evidencia una dispersión en los datos de temperatura (Figura 16) durante los meses de evaluación, mostrando el biol 1 un pico máximo en el mes de julio de 27,25 °C, seguido de los bioles 6 y 10, probablemente atribuida a una sobreexposición de la exposición solar durante la toma de temperatura para ese periodo (14:00 h).

La variabilidad de los datos de temperatura de los bioles de Huancayo puede responder a diversos factores, como la influencia de la distribución espacial de los biodigestores sobre la exposición a la radiación solar durante el registro de datos, así como el calor generado producto de las reacciones bioquímicas al interior de los biodigestores.

Es necesario resaltar que existe una considerable oscilación de temperatura ambiental (o atmosférica) entre la sombra y el sol para ciudades como Huancayo y además debe tenerse en cuenta la estacionalidad correspondiente al momento de las mediciones (estación seca entre mayo y octubre y estación húmeda entre noviembre y abril) (Coronado, 2010).

Las alteraciones de temperatura ambiental entre el día y la noche en Huancayo también deberían ser consideradas dentro del análisis y pese a que no se cuentan con registros de temperatura nocturna de los bioles, se considera que los cilindros de polipropileno compacto son buenos aislantes térmicos (Plasticbages Industrial, 2011), lo que impide que la temperatura del líquido se altere bruscamente y altere las poblaciones microbianas mesófitas. El agua presente en los bioles también favorece la estabilidad de la biomasa microbiana gracias al papel termorregulador que cumple.

7.4.4 pH

Los bioles acidófilos son aquellos que presentan melaza como principal fuente de C fermentable y en algunos casos otras fuentes de C y N asimilables como la leche y levadura, lo que contribuye al descenso del pH.

Para el caso de Lima los bioles acidófilos son los bioles número 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11 y 12, siendo el biol 9, el que se registró con el más bajo pH (5,08 en promedio) y se le atribuye a las tres fuentes antes mencionadas (melaza, leche y levadura) y, además del rumen que fue colocado a este biol (Figura 17).

Para el caso de Huancayo (Figura 18) los bioles acidófilos también corresponden a la mayoría (2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 y 10) y de la misma manera el biol 9 fue el que registró el pH

más bajo (5,11 en promedio) y se le atribuye a la misma causa mencionada anteriormente, pues fue al único biol que se le colocaron estos tres ingredientes juntos.

El biol 1, tanto para Lima como para Huancayo se comportó como neutrófilo, ya que no se le ha adicionado fuente de C de rápida fermentación ni minerales como N inorgánico, por lo tanto se mantiene relativamente estable en el tiempo.

7.4.5 Nitrógeno, fósforo y potasio total

En la Figura 19 para la ciudad de Lima, se puede apreciar tres picos correspondientes a los bioles 6; 7 y 11 con 0,380%, 0,376% y 0,358% respectivamente, respecto al N y se le atribuye a la adición de N inorgánico (biol 7) y harina de pescado (bioles 6 y 11), estos dos insumos incrementaron el N total y por consiguiente disminuyó el valor de la tasa C:N al ser una relación inversamente proporcional, manteniendo un relación C:N baja (10).

En la Figura 20 para la ciudad de Huancayo, se puede apreciar un pico correspondiente al biol 7 con 0,428% respecto al N y se le atribuye a la adición de N inorgánico. Mientras que los bioles 4; 5 y 6 muestran valores ligeramente por encima del promedio y se debe a la adición de N inorgánico (bioles 4 y 5) y harina de pescado (biol 6).

En el caso del P en la ciudad de Lima (Figura 19), se registran valores muy homogéneos, excepto los bioles 1 y 4 que registraron los valores más bajos para esta prueba, asociándolo a una relación inversamente proporcional al pH (Azabache, 2003).

En el caso de los bioles de Huancayo (Figura 20), el P muestra valores muy similares a los de Lima y de manera homogénea (sin picos), esto está atribuido a la cantidad de P de los insumos que también mostraron valores bajos (Tablas 36 y 37 del Anexo 1) y de la misma manera, el valor de P más bajo registrado para la ciudad de Huancayo, es el del biol 1,

que posee un pH neutro, mientras que los pH más ácidos muestran valores ligeramente más altos para el P.

El porcentaje de K para los bioles de Lima también se muestran de una manera homogénea, mientras que los bioles de Huancayo, muestran valores muy por debajo que los valores mostrados en Lima, esto se puede explicar debido al tipo de estiércol utilizado, ya que el K está relacionado con el tipo de alimentación del ganado estabulado (alimento concentrado para Lima, en contraste con forraje para Huancayo).

VIII. CONCLUSIONES

- Fue posible aislar cantidades considerables de bacterias, de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y del grupo de los actinomicetos de las muestras de biol artesanal.
- El pH ha demostrado ser uno de los factores más trascendentales para el desarrollo de la biomasa microbiana en las condiciones de biodigestión anaerobia, ya que inhibe o favorece según los rangos de tolerancia para cada grupo estudiado.
- La determinación de la producción *in vitro* de AIA pudo ser evidenciada utilizando las pruebas cualitativas y cuantitativas.
- Las cepas PSII-7-L y PSIV-1-L productoras de AIA del género *Pseudomonas* mostraron los mejores efectos en la elongación del hipocotilo y la radícula respectivamente.
- Se comprobó la presencia de bacterias productoras de AIA en los bioles de Lima y Huancayo y a la vez fue posible evidenciar un efecto positivo sobre la germinación *in vitro* de semillas de *Lactuca sativa* L. (lechuga), corroborando los resultados estadísticos del ANOVA y la prueba de Duncan.

IX. RECOMENDACIONES

- Se aconseja la aplicación de las pruebas confirmativas para definir con precisión la especie bacteriana de las cepas halladas con mayor frecuencia en los biodigestores.
- Hacer un estudio molecular de las cepas aisladas en este trabajo para su respectiva clasificación.
- Evaluar otras capacidades PGPR como la producción de metabolitos volátiles, producción de sideróforos, solubilización de fosfatos, antagonismo, ácido giberélico, entre otros, que influyen de manera positiva el crecimiento y desarrollo de las plantas.
- Realizar pruebas de fitopatogenicidad a las cepas seleccionadas como AIA positivas.
- Se recomienda métodos de extracción y purificación de AIA como cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía líquida de alta presión (HPLC), entre otros.
- Hacer un bioensayo de efectividad en el que las cepas produzcan una concentración de AIA muy similar y evaluar si existen diferencias entre los AIA producidos por diferentes géneros bacterianos.

- Además del bioensayo con semillas de lechuga en el laboratorio, se recomienda experimentar en condiciones de invernadero y campo, además de probar el AIA en otros cultivos.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASS, Zahera and OKON, Yaacov. Plant growth promoting by *Azotobacter paspali* in rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*. 1993, vol. 25, n° 8, p. 1075-1083.

AHMAD, Farah; AHMAD, Iqbal and KHAN, Mohd. Indole Acetic Acid Production by The Indigenous Isolates of *Azotobacter* and Fluorescent *Pseudomonas* in the Presence and Absence of Tryptophan. *Turkey Journal of Biology*. 2005, vol. 29, p. 29-34.

AIT BARKA, Essaid; BELARBI, Abdel; HACHET, Cathy; NOWAK, Jerzy and AUDRAN, Jean Claude. Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth – promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 2000, vol. 186 p. 92-95.

ÁLVAREZ, Fernando. *Preparación y uso del biol*. Perú. Ed. Soluciones Prácticas 2010. 30 p.

APARCANA, Sandra y JANSEN, Andreas. Estudio sobre el valor fertilizante de los productos del proceso “Fermentación anaeróbica” para producción de biogás. Boletín German ProfEC 2008. 10 p.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION AND WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION: (APHA AWWA-WPCF). *Standard Methods for examination of water and waste water*. 14 ed. Washington DC. EEUU. 1975.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION AND WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION: (APHA AWWA-WPCF). *Standard Methods for examination of water and waste water*. 20 ed. Washington DC. EEUU. 1998.

AZABACHE, Andrés. *Fertilidad de Suelos para una agricultura sostenible*. Ed. Universidad Nacional del Centro. Primera edición. Perú. 2003. 225 p.

BOSSIS, Emmanuel; LEMANCEAU, Phippe; LATOUR, Xavier and GARDAN, Louis. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie*. 2000, vol. 20 p. 51-63.

BREED, Robert; MURRAY, E. and SMITH Nathan. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Ed. Williams and Wilkins Co Séptima edición. U.S.A. 1957. 1094 p.

BUCHANAN, Robert and GIBBONS, Norman. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Ed. Williams and Wilkins Co. Octava edición. U.S.A, 1974. 1268 p. ISBN 0-683-01117-0.

BUDZIKIEWICZ, H. Siderophores of fluorescent pseudomonads. *Z. Naturforsch.* 1997, vol. 52 p. 713-720.

CAKMAKCI, Razaman; DÖNMEZ, Figen; AYDIN, Adil and SAHIN, Fikrettin. Growth promotion of plants by plant growth promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biology and Biochemistry Journal*. 2005, vol. 38 p. 1482-1487.

CARRILLO, Leonor. Rumen y biogás. Capítulo 5. *Microbiología Agrícola* Universidad Nacional de Salta-Argentina. 2003, 16 p. ISBN: 987-9381-16-5.

CASTELLANOS, Diana; CUBILLOS, R y ARGÜELLO, Heliodoro. Selección de microorganismos promotores de crecimiento vegetal (ácido indolacético) a partir de muestras de suelo rizosférico, como primera etapa en el desarrollo de un biofertilizante. *Revista Brasileira De Agroecología*. 2009, vol. 4 n° 2, p. 1720-1723.

CASTILLO, Grolamys; ALTUNA, Beatriz; MICHELENA, Georgina; SÁNCHEZ-BRAVO; José y ACOSTA, Manuel. Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. *Anales de Biología* 2005, vol. 27 p. 137-142.

CELIS BAUTISTA, Lina y RICARDO GALLARDO, Iván. “Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) en cultivos microbianos”. Asesor: María Rodríguez. Tesis para optar el título de Microbiólogo Agrícola y Veterinario. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. 2008, 140p.

CHACÓN, V. G. *Digestores de biogás*. Costa Rica. Ed. Tecnológica de Costa Rica. 1980. p. 273–280.

CHAPMAN, Homer and PRATT, Parker. *Métodos de análisis para suelos, plantas y aguas*. México. Editorial Trillas, 1997. 195 p. ISBN: 9789682402623

COLQUE, Tomás; RODRÍGUEZ, David; MUJICA, Angel; CANAHUA, Alipio; APAZA, Vidal y JACOBSEN, Sven-Erik. Producción de biol, abono líquido natural y ecológico. Manual Illpa-Puno e INIA Perú. 2005. 16 p.

COMPANT, Stéphane; DUFFY, Brion; NOWAK, Jerzy and CLEMENT, Christophe. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, vol. 71 p. 4951-4959

COOK, James and BAKER, Kenneth. *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. 2 ed. U.S.A. American Phytopathological Society 1983. 150 p. ISBN: 9780890540534.

CORONADO LEON, Catherine. “Efecto de factores físico-químicos sobre las poblaciones microbianas mesófilas nativas provenientes de biodigestores artesanales”. Asesores: Juan Juscamaita, Andreas Oswald. Tesis para optar el título de Biólogo. Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú. 2010. 164 pp.

DALZELL, H.W.; BIDDISTONE, A.J., GRAY, K.R. y THURAIRAJAN, K. 1991. Manejo del suelo, producción y uso del compostaje en ambientes tropicales y subtropicales. Boletín 56 de suelos de la FAO. 177 p.

DASHTI, N.; ZHANG, F.; HYNES, R. and SMITH, D. Application of plant growth-promoting rhizobacteria to soybean (*Glycine max* L. Merr.) increases protein and dry matter yield under short-season conditions. *Plant Soil*. 1997, vol. 188, p. 33-41.

DA SILVA, Carla; FERMINO, Ana. and DA SILVA, Marlon. Characterization of Streptomycetes with potencial to promote plant growth and biocontrol. *Scientia Agricola*. 2008, vol. 65, p. 50-55.

DE FREITAS, J.; BANERJEE, M. and GERMIDA, J. Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus up take of canola (*Brasica napus* L.). *Biological Fertilizer Soils* 1997, vol. 24, p. 358- 363.

DEUBLEIN, Dieter and STEINHAUSER, Angelika. *Biogas from waste and renewable resources: An introduction*. 2 ed. Alemania. Wiley VCH. 2008. 572 p. ISBN: 3527327983

DÍAZ, Percy; CAMPOS, Nadia y CALDERÓN, Constantino. Elaboración de fertilizante líquido biol. Boletín Asociación para la conservación de la cuenca amazónica. 2008. 4 p.

DÖRFFLING, Karl. *Das Hormonsystem der Pflanzen*, Alemania. Editorial Thieme. 1982. 236 p. ISBN: 3136185013.

EL-HAGE, N. y HATTAM, C. Agricultura orgánica, ambiente, y seguridad alimentaria. Serie sobre medio ambiente y recursos naturales. 2003. Número 4. Roma FAO.

ELSORRA, E.; BOCHOW, H.; ROSS, R. and BORRISS, T. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. VI. Phytohormonelike action of culture filtrates prepared from plant growth promoting *Bacillus amyloliquefaciens* *Bacillus subtilis* FZB24, FZB42, FZB45 and FZB37. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 2004. vol. 111 p. 583–597.

EZZIYYANI, Mohammed; PÉREZ, Consuelo; REQUENA, María; AHMED, Sid y CANDELA, María. Evaluacion del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. *Anales de Biología*. 2004, vol. 26, p. 61-68.

FENDRIK, L.; DEL GALLO J. and DE ZAMAROCZY J. *Azospirillum V and relate microorganism*. Alemania. Ed. Springer-Verlag. 1995. 307-312 p.

FERNÁNDEZ, C. y NOVO R. La vida microbiana en el suelo. Tomo II. Ed. Pueblo y Educación. Cuba. 1988 306-331 p.

FINCK, Arnold. *Fertilizantes y fertilización*. Versión en español. Traductor: Valentín Hernando. España Editorial Reverté. 1988. 439 p.

FRANCO CORREA, Marcela. "Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas". Asesor: José Barea. Tesis para optar el Grado de Doctor. Universidad de Granada. Facultad de Ciencias. España. 2008. 260 p.

FOLMSBEE, Martha; MCINERNEY, Michael and NAGLE, David. Anaerobic Growth of *Bacillus Mojavensis* and *Bacillus subtilis* Requires Deoxyribonucleosides or DNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004, vol. 70, nº 9, p. 5252-5257.

GHANEM, Nevine; SABRY, Soraya; EL-SHERIF, Zeinab; and EL-ELA, Gehan. Isolation and Enumeration of marine Actinomicetes from seawater and sediments in Alexandria. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 2000, vol. 46, nº 3 p. 105-111.

GLICK, Bernard. The enhancement of plant growth by free- living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 1995, vol. 41 nº 2 p. 109-117.

GLIESSMAN, Stephen. *Agroecología: Procesos ecológicos en agricultura sostenible*. Costa Rica. Versión en español. Editorial LILOCAT.2002. 359 p. ISBN: 997757-385-9

GOMERO, Luis. Los biodigestores campesinos, una innovación para el aprovechamiento de los recursos orgánicos. *LEISA Revista de Agroecología*. 2005, vol. 21, nº 1, p. 25-27.

GORDON, Solon and WEBER, Robert. Colorimetric estimation of indole acetic acid. *Plant Physiology*. 1951, vol. 26, nº 1, p. 192-195.

GOSLING, P.; HODGE, A.; GOODLASS, G. and BENDING, G. D. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 2006, vol. 113 p. 17-35.

HAEHN, Hugo. *Bioquímica de las fermentaciones*. Traductor: Ignacio Bolívar y Dámaso Alonso. España. Editorial Aguilar. 1956. 653 p.

HANDELSMAN, Jo. and STABB, Eric. Biocontrol of Soilborne Plant pathogens. *The Plant Cell*. 1996, vol. 8 p. 1855-1869.

JORDAN, H.C. Production of methane from poultry manure. Symposium on poultry waste conversion. The Pennsylvania State University. USA.1974.

KHALID, A.; ARSHAD, M. and ZAHIR, Z.A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*. 2004, vol. 96, p. 473-480.

KILLIAN, M.; STEINER, U.; KREBS, B.; JUNGE, H.; SCHMIEDEKNECHT, G. and HAIN, R. FZB24 *Bacillus subtilis* mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. *Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer*. 2001, vol. 1 p. 72-93.

KLOEPPER, J. W. and SCHROTH, M. N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: Proceedings of the fourth international conference on plant pathogenic bacteria, INRA. Francia. 1978, vol. 2 p. 879-882.

KLOEPPER, Joseph; LIFSHITZ, Ran and ZABLOTOWILZ, Robert. Free-Living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology*. 1989. vol. 7, p. 39-44.

LAZAROVITS, George and NOWAK, Jerzy. Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. *Scientia Horticulturae*. 1997, vol. 32, n° 2, p. 188-192.

LEIVA, Sergio; YAÑEZ, Marisa; ZAROR, Luis; RODRÍGUEZ, Héctor y GARCÍA, Héctor. Actividad Antimicrobiana de actinomicetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. *Revista médica de Chile*. 2004, vol. 132 n° 2, p. 151-159.

LESTER, Gabriel and YANOSKY, Charles. Influence of 3-methylantranilic and anthranilic acids on the formation of tryptophan synthase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1960. vol. 81, n° 1, p. 81-90.

LOPER, Joyce and BUYER, Jeffrey. Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 1991, vol. 4, n° 1, p. 5-13.

LOWBURY, Edward. Improved culture methods for the detection of *Ps. pyocyanea*. *Journal of Clinical Pathology*. 1951, vol. 4, n° 1, p. 66-72.

MADIGAN, Michael; MARTINKO, John and PARKER, Jack. *Brock – Biología de los microorganismos*. Décima edición. España. Pearson Education. 2004. 1011 p. ISBN: 9788420536798.

MAHAFEE, Walter and BACKMAN, Paul. Effect of seed factors on spermosphere and rhizosphere colonization of cotton by *Bacillus subtilis* GB03. *Phytopathology*. 1993, vol. 83 p. 1120-1125.

MAIER, Andreas; RIEDLINGER, Julia; FIEDLER, Hans and HAMPP, Rüdiger. Actinomycetales bacteria from a spruce stand: characterization and effects on growth of root symbiotic and plant parasitic soil fungi dual culture. *Mycological Progress*. 2004, vol. 3, n° 2, p. 129-136.

MANULIS, Shulamit; SHAFRIR, Hadas; EPSTEIN, Ephraim; LICHTER, Amnon. and BARASH Isaac. Biosíntesis of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in *Streptomyces* spp. *Micriobiology*. 1994, vol. 140, p. 1045-1050.

MARTÍNEZ MENDOZA, HJ. "Construcción y prueba de una planta de biogás de producción intermitente para uso doméstico en zonas rurales". Tesis para optar al título de Ingeniero agrícola. Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú. 1984. 58 p.

MARTÍNEZ R. Y DIBUT, B. Los biofertilizantes como pilares básicos de la agricultura sostenible. En INIFAT. Curso Taller "Gestión Medio Ambiental del desarrollo rural". 1996. p. 63-81.

MARTÍNEZ R.; DIBUT B. y ORTEGA, M. Acción estimuladora de *Azotobacter chroococcum* sobre el cultivo del tomate en suelo Ferralítico Rojo. Efecto sobre los semilleros. *Agrotecnia de Cuba*. 1997, vol. 27, p. 23-26.

MARTÍNEZ TUPPIA, Ccori. "Diversidad y selección de *Pseudomonas* fluorescentes provenientes de la rizósfera y suelo como promotoras de crecimiento y desarrollo de plantas de papa (*Solanum tuberosum*)". Tesis para optar el título de Biólogo. Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú. 2010. 168 p.

MINISTERIO DE ENERGÍA Y MINAS (MINEM). 2010. Ley General de Aguas - Decreto Ley N° 17752. Disponible desde Internet en:
<<http://intranet2.minem.gob.pe/web/archivos/dgaam/publicaciones/compendio99/17752.pdf>> (Acceso: 2 de agosto de 2010).

MYROLD, D.D. Transformation of nitrogen.. En: SYLVIA, D.M.; FUHRMANN, J.J.; HARTEL, P.G. and ZUBERER, D.A. *Principles and applications of soil microbiology*. Second edition. USA. Prentice Hall, Inc. 1999. p. 259–294.

NOWAK J.; ASIEDU S.; BENSALIM S.; RICHARDS J.; STEWART A.; SMITH C.; STEVENS D. and STURZ A.V. From laboratory to applications: challenges and progress with in vitro dual cultures of potato and beneficial bacteria. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 1998, vol. 52, n°1-2, p. 97- 103.

NUTRITIONAL VALUE OF DIFFERENT FRESH MILK-TYPES. 2010. Australia. En línea (Citado: 17-08-10). Disponible en: <http://users.sa.chariot.net.au/~dna/milk-types.htm>

OGATA GUTIERREZ, Katty. "Diversidad de Microorganismos en la rizósfera de la "tara" (*Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze), y su efecto en el crecimiento del cultivo". Tesis para optar al título de biólogo. Universidad Nacional Agraria La Molina. 2006. 126 p.

OKON, Yaacov and LABANDERA, Carlos. Agronomic applications of Azospirillum: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry* 1994, vol. 26, n° 12, p. 1591-1601.

PANDEY, A. and PALNI, L. Bacillus species: The dominant bacteria of the rhizosphere of established tea bushes. *Microbiology Research*. 1997, vol. 152 n° 4 359-365.

PANEQUE, V.M. y CALAÑA, J.M. *Abonos orgánicos – Conceptos básicos para su evaluación y aplicación*. Folleto técnico. Asociación Cubana de Técnicos Agrícolas y Forestales. 2004. Cuba. 54 p.

PATTEN, Cheryl and GLICK, Bernard. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology* 1996, vol. 42, nº 3, p. 207-220.

PATTEN, Cheryl and GLICK, Bernard. Role of *Pseudomonas putida* Indolacetic acid in Development of the Host Plant Root System. *Applied and Environmental Microbiology* 2002, vol. 68, p. 3795-3801.

PLASTICBAGES INDUSTRIAL, 2011. España. Polipropileno y sus características. En línea. (Citado 10-01-11). Disponible en: <http://www.plasticbages.com/polipropileno.html>

PEÑA, Elizabeth; CARRION, Miriam; MARTINEZ, Francisco; RODRIGUEZ, Adolfo y COMPANIONI, Nelso. *Manual para la producción de abonos orgánicos en la agricultura urbana*. Edición: INIFAT. 2002. Cuba. 65 p.

RASUL, Ghulam. "Production of growth hormones and nitrogenase by diazotrophic bacteria and their effect on plant growth" Asesor: Kauser Malik. Ph D thesis. University of the Punjab, Lahore. Pakistan. 1999. 226 p.

RICO GALLEGOS, Marvic. "Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género *Azotobacter* y actinomicetos aislados de cultivos de *Solanum tuberosum* Linnaeus, 1753 (papa) cultivados en zonas altoandinas del Perú". Asesores: Jorge León y Andreas Oswald. Tesis para optar el título de Biólogo. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú. 2009. 152 p.

ROJAS, Adriana; RODRÍGUEZ, María; MONTES, Silvano; PÉREZ, Sandra; RODRÍGUEZ, Aida y GUERRERO, Angélica. Evaluación de la promoción del crecimiento de *Cynodon dactylon* L. por rizobacterias productoras de fitohormonas aisladas de un suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. *Polibotánica*. 2010, vol. 29, p. 131-147.

ROLANDO, Aida. "Tratamiento anaeróbico de los residuos de la obtención del aceite esencial de coriandro y del principio activo del cardo mariano. Determinación de la cinética de la digestión anaerobia". Asesor: Jorge Durán. Tesis para optar al grado de Magíster. Universidad Tecnológica Nacional. Argentina. 2001. 127 p.

SANTANA, A. Factores que afectan la población microbiana de los biodigestores. Págs. En: *Diseño y construcción de biodigestores*. Costa Rica. Segunda edición. Editorial Tecnológica de Costa Rica. 1985. p. 17– 24.

SAICO ZEBALLOS, L.K. "Determinación de sustratos óptimos para la producción de biogás a partir del estiércol de ganado ovino, vacuno y porcino de los corrales de crianza del a UNALM". Tesis para optar al grado de *Magister Scientiae* en Ciencias ambientales. Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú. 2003. 107 p.

SELVADURAI, L.; BROWN, E. and HAMILTON, G. Production of indole- 3- acetic acid analogues by strains of *Bacillus cereus* in relation to their influence on seedling development. *Soil Biology and Biochemistry*. 1991, vol. 23 n° 4, p. 401-403.

SINGH, R.B. *Bio-gas plant*. Gobar Gas Research Station. Ajitmal, Etawah, India. 1975. 94 p.

SNEATH, Peter; MAIR, Nicholas; SHARPE, Elisabeth and HOLT, John. *Bergey's manual of systematic bacteriology* – Vol. II. USA. Williams & Wilkins Co. 1986. 965-1600 p. ISBN: 0-683-07893-3.

SOBRERO, María y RONCO, Alicia. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. En: Castillo G. (Ed.). 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Canadá. IDRC, IMTA. 2004. p. 55-67.

SORENSEN, Jan; JENSEN, Linda and NYBROE, Ole. Soil and rhizosphere as habitats for *Pseudomonas* inoculants: new knowledge on distribution, activity and physiological state derived from micro-scale and single-cell studies. *Plant and Soil*. 2001, vol. 232 p. 97-108.

SOTIL PEREZ PALMA, F.J. “Dinámica poblacional de los microorganismos del grupo coliforme en el proceso de biodegradación aeróbica y anaeróbica de los abonos líquidos orgánicos: Biol y purín”. Tesis para optar el título de Ingeniero ambiental. Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú. 2007. 140 p.

STEFFEN, R.; SZOLAR, O. and BRAUN, R. *Feedstocks for anaerobic digestion*. Institute for Agrobiotechnology Tulln, University of Agricultural Sciences, Vienna, Austria. 1998. 29 p.

SYLVIA, D.; FUHRMANN, J.; HARTEL, P. and ZUBERER D. *Principles and applications of soil microbiology*. Second Edition. U.S.A. Pearson/Prentice Hall. 2005. 550 p. ISBN: 0-13-459991-8.

TAIGANIDES, E.P. Biogás: recuperación de energía de los excrementos animales. *Zootecnia*. 1980. vol. 35. p. 2-12.

TATE, Robert. *Soil Microbiology*. Second Edition. Wiley. 2000. U.S.A. 398 p. ISBN: 0471578681

TELLEZ, D. “Caracterización de las melazas empleadas en el proceso fermentativo de la destilería San Martín-Industria de licores del Valle”. Tesis para optar el título de Bacteriólogo. Universidad del Valle. Colombia. 2004. 79 p.

THOMPSON, L.M. and TROEH, F.R. *Los suelos y su fertilidad*. Traductor: Juan Puigdefábregas Editorial Reverté. 4ta edición, España. 2002. 649 p. ISBN: 9788429110418.

THOMASHOW, Linda and WELLER, David. Role of phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. Tritici. *Journal of Bacteriology*. 1990, vol. 170, nº 8, p. 3499-3508.

TOGNETTI, J.A.; AGUIRREZÁBAL, LAN y ASSUERO, S.G. 2006. *Funciones de los nutrientes en el crecimiento vegetal*. Págs. 19–42. En: Echeverría HE y García FO. (Eds.). Fertilidad de suelo y fertilización de cultivos. Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina. 525 p.

TOKALA, Ranjeet; STRAP, Janice; JUNG, Carina; CRAWFORD, Don; SALOVE, Michelle; DEOBALD, Lee; BAILEY, Franklin and MORRA, M. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Applied and Environmental Microbiology*. 2002, vol. 68, nº 5, p. 2161-2171.

TORRES, María; VALENCIA, Sandra; BERNAL, Jaime y MARTÍNEZ, Patricia. Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., producers of Indol-3- Acetic Acid and Siderophores from Colombian Rice Rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 2000, vol. 42 p. 171-176.

TSAVKELOVA, E.; KLIMOVA, S.; CHERDYNTSEVA, T and NETRUSOV, A. Microbial Producers of Plant Growth Stimulators and Their Practical Use: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2006, vol. 42, nº 2, p. 117-126.

UNITED STATES PHARMACOPEIA 29 - NF 24. *Chapter 62, Microbial examination of nonsterile products: Tests for specified microorganisms*. 2006.

VARGAS PARRA, Gisela. “Estudio de la generación de biogás a partir de la sinergia en mezcla de algas marinas biodegradadas en un sistema de bioconversión anaerobia de dos etapas”. Asesor: Nelson Alarcón. Tesis para optar el título de Ingeniero Ambiental. Universidad Católica de Temuco. Chile. 2005. 95 p.

VESTERGÅRD, Mette; BJØRNLUND, Lisa; HENRY, Frédéric and RØNN, Regin. Decreasing prevalence of rhizosphere IAA producing and seedling root growth promoting bacteria with barley development irrespective of protozoan grazing regime. *Plant and Soil*. 2007, vol. 295, nº 1-2, p. 115-125.

VULLO, Diana; COTO, Celia and SINERIZ, Faustino. Characteristics of an inulinase produced by *Bacillus subtilis* - 430a, a strain isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Vell-Rusby). *Applied and Environmental Microbiology*. 1991, vol. 57, nº 8, p. 2392-2394.

WALLEY, F. and GERMIDA, J. Response of spring wheat (*Triticum aestivum*) to interactions between *Pseudomonas* species and *Glomus clarum* NT4. *Biology and Fertility of Soils*. 1997, vol. 24, p. 365-371.

WILLIAMS, Stanley; SHARPE, Elisabeth and HOLT, John. *Bergey's manual of systematic bacteriology* – Vol. IV. USA. Williams & Wilkins Co. 1989. 2299-2648 p. ISBN: 0-683-09061-5.

YEPEZ, Y. "Selección de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* con alta productividad de etanol y que tolere mayores niveles de azúcar que los usados en la Planta Alcoquímica Sucromiles S.A". Tesis para optar al grado de magíster. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. 1995.

ZEEMANN, G.; WIEGANT, W.M.; KOSTER-TREFFERS, M.E. and LETTINGA, G. The influence of total ammonia concentration on thermophilic digestion of cow manure. *Agricultural Wastes*. 1985. vol. 14. p.19–35.

XI. ANEXOS

Anexo 1: Tablas

Tabla 30. Valores promedio de microelementos para los bioles de Lima.

Biol	Microelementos								
	Mg	Ca	Na	Cu	Zn	Mn	Fe	B	S
	%			ppm					
1	372	449	993	1,20	4,00	2,10	11,08	59,67	268,23
2	670	1201	1050	0,79	1,29	3,66	24,50	93,53	411,75
3	930	1820	1130	0,50	1,31	4,46	31,56	156,04	840,83
4	616	895	960	0,47	0,87	1,97	12,36	84,90	161,67
5	545	1093	930	0,65	1,47	2,67	23,17	141,87	462,20
6	810	1563	18100	0,70	1,73	2,39	102,51	165,58	591,08
7	441	1232	1160	0,51	1,66	4,05	25,69	104,75	626,04
8	544	1675	906	1,52	2,85	5,78	36,44	96,42	536,13
9	531	1595	926	1,74	3,71	8,89	45,20	135,51	482,85
10	483	1722	844	0,96	3,52	14,53	102,40	162,40	536,13
11	620	1234	13100	0,86	2,06	3,77	57,30	160,81	636,03
12	526	1575	1310	1,14	2,92	9,05	54,40	91,47	567,77

Tabla 31. Valores promedio de microelementos para los bioles de Huancayo.

Biol	Microelementos								
	Mg	Ca	Na	Cu	Zn	Mn	Fe	B	S
	%			ppm					
1	268	523	528	1,98	4,20	11,60	22,61	46,21	127,21
2	530	1431	798	2,96	4,82	17,70	86,80	130,38	764,24
3	530	869	906	2,44	3,76	7,22	71,40	128,14	852,48
4	490	992	612	1,41	2,55	28,80	49,60	65,43	469,53
5	520	965	552	1,84	2,82	27,90	33,80	81,42	727,61
6	600	1252	5170	1,23	1,87	21,30	38,00	132,81	852,48
7	500	984	785	3,00	2,90	22,20	35,50	103,13	795,87
8	570	876	434	1,44	2,51	68,20	51,80	79,42	522,81
9	660	1458	890	0,82	2,48	108,80	91,10	68,85	496,17
10	640	1145	990	1,92	6,06	13,03	47,10	159,45	656,01

Tabla 32. Promedio de la longitud de radícula e hipocotilo a diferentes concentraciones de AIA.

Cepa ug/ml AIA	Repetición 1		Repetición 2		Repetición 3	
	H (cm)	R (cm)	H (cm)	R (cm)	H (cm)	R (cm)
PSI-2-L 12.79	2,02	0,54	2,16	0,54	2,17	0,52
PSII-7-L 21.95	1,89	3,69	1,96	3,49	1,99	3,53
PSIV-1-L 16.35	2,28	3,44	2,26	3,39	2,26	3,45
BCIII-1b-L 8.96	1,65	0,70	1,67	0,74	1,67	0,72
BCIII-8a-L 15.19	1,86	0,78	1,97	0,77	2,00	0,86
BCIV-4-L 12.79	1,86	0,76	1,93	0,77	1,81	0,80
ACIII-5-L 8.23	1,93	0,64	1,98	0,61	1,95	0,67
ACIV-6d-L 8.03	2,33	0,83	2,16	0,82	2,11	0,86
ACV-4-L 9.08	1,87	1,11	1,80	0,91	1,79	0,94
Control Caldo	1,30	0,48	1,25	0,51	1,26	0,52
Control Agua	1,64	0,51	1,61	0,49	1,72	0,50

H: Hipocotilo; R: Radícula.

Tabla 33. Resultados de absorbancia a diferentes concentraciones de AIA comercial, para la curva de calibración.

Concentración µg/ml	Absorbancia
5	0,032
10	0,110
12	0,115
15	0,220
18	0,349
20	0,429
30	0,472
40	0,614
50	0,618
60	0,694
70	0,918
80	0,932
90	1,058
100	1,089
120	1,165
140	1,280
160	1,312
180	1,320

Tabla 34. Análisis fisicoquímicos de los insumos empleados en la elaboración de los bioles de Lima.

Insumos	Análisis fisicoquímicos														
	% Hd	pH	CE (dS/m)	% MO	N	P	K	Ca	Mg	Na	Cu	Zn	Mn	Fe	B
	%										ppm				
Estiércol ovino	35,16	8,30	14,06	75,73	1,17	1,37	2,64	2,22	0,69	0,55	86,00	169	228	3600	1441
Estiércol vacuno	10,90	7,77	18,07	66,63	1,92	0,86	2,13	1,96	0,43	0,49	34,00	116	125	2185	649
Guano de gallina	8,16	7,48	10,93	71,10	2,44	0,84	1,52	3,42	0,54	0,31	37,50	177	415	2220	882
Ceniza	-	9,50	28,40	-	-	0,77	1,55	-	-	-	-	-	-	-	-
Harina de pescado	-	6,05	18,01	83,16	7,98	0,90	0,27	12,35	0,24	12,10	25,50	65	90	3800	7975
Leguminosa	-	-	-	89,65	3,47	0,40	0,90	3,80	0,41	0,56	15,50	70	41	450	854
Melaza	3,49	5,45	2,16	84,80 ^a	0,85 ^a	0,09 ^a	3,97 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-
Leche	87,20	6,61	5,76	-	0,51 ^b	0,20 ^b	0,22 ^b	-	-	-	-	-	-	-	-
Levadura	75,00	6,50	-	-	0,60 ^c	0,60 ^c	0,69 ^d	-	-	-	-	-	-	-	-

^a Tellez (2004); ^b Nutritional value of different fresh milk (2010); ^c Haehn (1991); ^d Yepez (1995).

Tabla 35. Análisis fisicoquímicos de los insumos empleados en la elaboración de los bioles de Huancayo.

Insumos	Análisis fisicoquímicos														
	% Hd	pH	CE (dS/m)	% MO	N	P	K	Ca	Mg	Na	Cu	Zn	Mn	Fe	B
	%										ppm				
Estiércol ovino	74,00	7,51	2,71	75,46	1,68	0,98	1,20	1,20	0,43	0,18	64,50	83	1330	592	443
Estiércol vacuno	78,00	8,52	8,96	77,24	1,90	0,58	2,80	1,30	0,46	0,23	50,50	75	245	2635	854
Guano de pollo	6,39	7,98	12,92	47,34	1,41	0,76	1,50	2,30	0,51	0,53	162,50	240	455	10085	1584
Ceniza	-	10,74	36,50	-	-	1,00	5,10	3,20	0,70	0,45	88,00	215	585	20450	18436
Harina de pescado	4,17	5,34	70,02	42,36	3,37	1,10	0,42	5,30	0,20	22,00	30,50	51	77	5210	2255
Leguminosa	82,70	-	-	88,01	2,97	0,44	1,15	1,70	0,56	0,18	3,50	7	143	3340	1082
Melaza	3,49	5,45	2,16	84,80 ^a	0,85 ^a	0,09 ^a	3,97 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-
Leche	87,20	6,61	5,76	-	0,51 ^b	0,20 ^b	0,22 ^b	-	-	-	-	-	-	-	-
Levadura	75,00	6,50	-	-	0,60 ^c	0,60 ^c	0,69 ^d	-	-	-	-	-	-	-	-

^a Tellez (2004); ^b Nutritional value of different fresh milk (2010); ^c Haehn (1991); ^d Yepez (1995).

Anexo 2: Figuras



Figura 21. Preparación de los bioles de Lima



Figura 22. Preparación de los bioles de Lima



Figura 23. De arriba abajo: Cepa de *Pseudomonas* sp. en agar Cetrimide, cepa de *Bacillus* sp. en agar TGE, y cepa de un actinomiceto en agar AC.

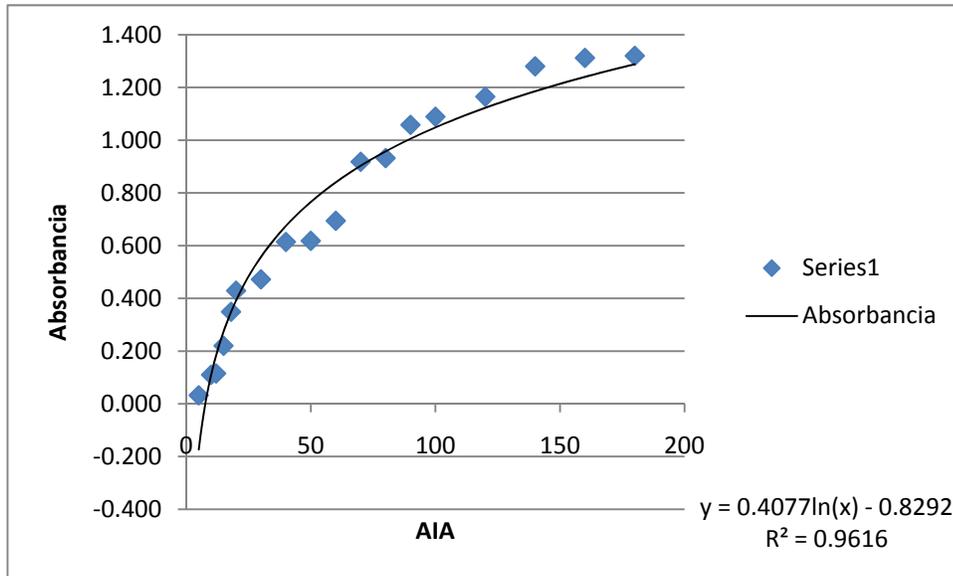


Figura 24. Curva de calibración de las diferentes concentraciones de AIA comercial.

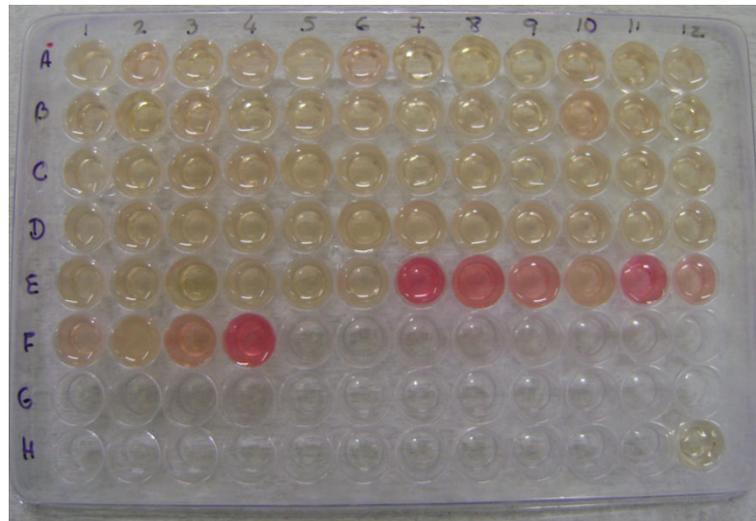


Figura 25. Prueba de producción de AIA *in vitro* (cualitativa) de *Bacillus* sp.



Figura 26. Prueba de producción de AIA *in vitro*, tubos de ensayo para prueba cuantitativa de AIA de *Bacillus* sp.



Figura 27. Cámara usada en la incubación de semillas para la prueba de efectividad.

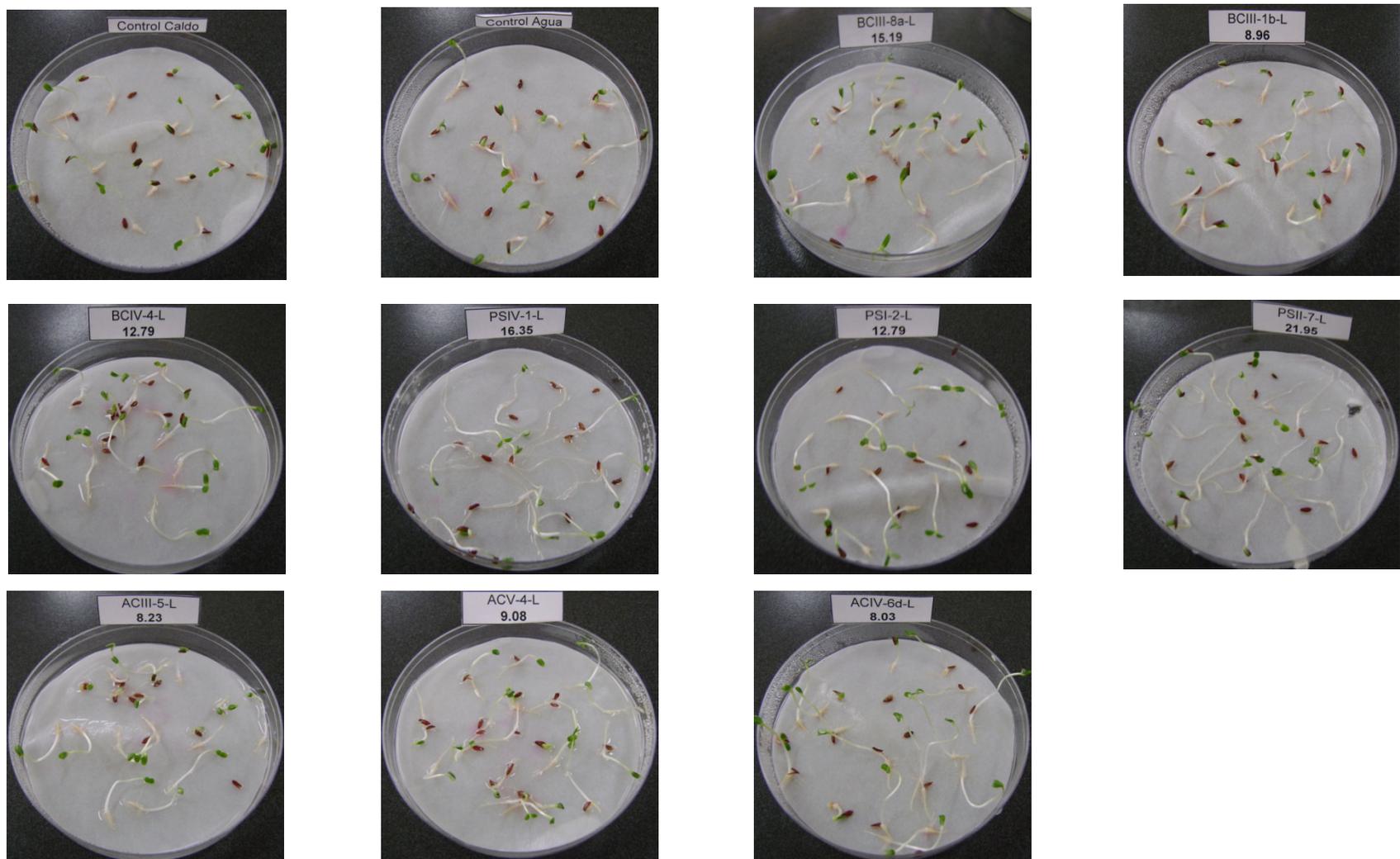


Figura 28. Bioensayo de germinación de semillas de *Lactuca sativa* L. a diferentes concentraciones de AIA a las 120 h de incubación.

Anexo 3: Medios de cultivo y reactivos

1. Agar Almidón Caseína (AC) - g/L

Almidón	10,0
Caseína	0,30
Nitrato de Potasio	2,00
NaCl	2,00
K ₂ HPO ₄	2,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05
CaCO ₃	0,02
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
Agar	15,0
Agua destilada	1000 ml
pH	7,0 ± 0,2

2. Agar Cetrimide - g/L

Peptona de gelatina	20,0
Cloruro de magnesio	1,40
Sulfato de potasio	10,0
Cetrimide	0,30
Agar	15,0
Glicerol	10,0
Agua destilada	1000 ml
pH	7,2 ± 0,2

3. Agar Nutricio (AN) - g/L

Extracto de carne	1,5
Extracto de levadura	1,5
Peptona	5,0
Cloruro de sodio	5,0
Agar	15,0
Agua destilada	1000 ml
pH	7,0 ± 0,2

4. Agar Triptona Glucosa Extracto de carne (TGE) - g/L

Triptona	5,0
Extracto de carne	3,0
D-Glucosa	1,0
Agar	15,0
Agua destilada	1000 ml
pH	7,4 ± 0,2

5. Agar Tripticasa Soya (TSA) - g/L

Triptona	15,0
Peptona de soya	5,0
Cloruro de Sodio	5,0
Agar	15,0
Agua destilada	1000 ml
pH	7,3 ± 0,2

6. Caldo Trpticasa Soya (TSB) - g/L

Tripticasa	17,0
Peptona	3,0
Cloruro de sodio	5,0
Fosfato dipotásico	2,5
Dextrosa	2,50
Agua destilada	1000 ml
pH	7,3 ± 0,2

7. Reactivo de Salkowsky (100ml)

FeCl ₃	0,16 g
H ₂ SO ₄	37,1 ml
Agua destilada	62,9 ml

8. Solución de L-Triptófano (100 ml)

L-Triptófano	1,02 g
Agua destilada	100 ml
