

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica



**Aislamiento y mejora de la multiplicación bacteriana de la rizosfera del
tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) y su efecto fertilizante en el cultivo de la
quinua (*Chenopodium quinua* Willd)**

Tesis presentada por la Bachiller:

Cervantes Huamaní, Trilce Magdiel

ORCID: 0009-0000-3971-2564

para optar el Título Profesional de Ingeniera Biotechnóloga

Asesor (a):

Dra. Bardales Alvarez, Roxana Margarita

ORCID: 0000-0002-5137-4067

Arequipa-Perú

2024

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
INGENIERIA BIOTECNOLOGICA TITULACIÓN CON TESIS
DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 03 de Septiembre del 2024

Dictamen: 008179-C-EPIB-2024

Visto el borrador del expediente 008179, presentado por:

2013200852 - CERVANTES HUAMANI TRILCE MAGDIEL

Titulado:

**ASLAMIENTO Y MEJORA DE LA MULTIPLICACION BACTERIANA DE LA RIZOSFERA
DEL TARWI (LUPINUS MUTABILIS SWEET) Y SU EFECTO FERTILIZANTE EN EL CULTIVO
DE LA QUINUA (CHENOPODIUM QUINUA WILLD)**

Nuestro dictamen es

APROBADO

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

INGENIERO BIOTECNOLOGO

**43668681 - PAREDES FUENTES
JULITZA LINDSEY DICTAMINADOR**



**42671615 - CARPIO CARPIO
JOSE MIGUEL DICTAMINADOR**



**43679772 - LOPEZ ALVAREZ
NATALIA PAOLA DICTAMINADOR**



Aislamiento y mejora de la multiplicación bacteriana de la rizosfera del tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) y su efecto fertilizante en el cultivo de la quinua (*Chenopodium quinua* Willd)

INFORME DE ORIGINALIDAD

30%

INDICE DE SIMILITUD

29%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

10%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

hdl.handle.net

Fuente de Internet

5%

2

repositorio.unan.edu.ni

Fuente de Internet

4%

3

www.redalyc.org

Fuente de Internet

3%

4

docobook.com

Fuente de Internet

3%

5

Submitted to Universidad Católica de Santa
María

Trabajo del estudiante

1%

6

core.ac.uk

Fuente de Internet

1%

7

riull.ull.es

Fuente de Internet

1%

1library.co

Dedicatoria

A Dios, a mi madre, y a todo aquellos que estuvieron conmigo en este trayecto.



Agradecimiento

Un grato agradecimiento a mi asesora, a la clínica biotecnológica ADN Uchumayo, a los encargados de laboratorio de la universidad Católica de Santa María, a todos ellos por su guía, tiempo, paciencia y su ayuda incondicional.

A mis padres Roxana y Carlos por su apoyo, impulso y confianza; a mi abuelo Rosendo Huamaní, por su amor y cariño; a mis padrinos Brinda y Gustavo Pastor por no dejar que nunca me rinda y a mis hermanas de corazón Flor, Karen y Estaysi por su aliento y amistad incondicional.



RESUMEN

La presente tesis tuvo por finalidad obtener biofertilizante a partir de bacterias extraídas de la rizosfera del tarwi y probar su efecto en el desarrollo de la quinua en sus tres primeros meses; para ello se realizó un pretratamiento a la rizosfera, se aisló e identificó a las bacterias obtenidas de la muestra de suelo mediante pruebas de PGPR, extracción y secuenciación de ADN. Una vez identificadas se formó consorcios con ayuda de las pruebas de antagonismo en discos, se evaluaron los consorcios en tres tipos de medios (MMS, Infusión suelo y medio LB) mediante espectrofotometría para elegir el medio que permitía mejor desarrollo de las bacterias agrupadas. Finalmente se evaluó el efecto de estos fertilizantes en la planta de la quinua, esto se hizo midiendo la longitud de tallo longitud de raíz y número de hojas, estas variables se hicieron en cada tratamiento incluido el control.

Las bacterias encontradas en esta tesis fueron bacterias Gram +, en forma de bacilos, con grandes capacidades de fijar nitrógeno y solubilizar fosfato, siendo los más resaltantes el *B. Subtili*, *B. pumilus*, *B. tropicus*, *B. thuringensis*, *Lysinobacillus* y *klebsella oxitoca*; las cuales presentaron en sus curvas de crecimiento una absorbancia alta y una fase estacionaria con mayor duración en los medios de Infusión suelo y LB. Los resultados obtenidos en las variables con cada consorcio sobre todo los tratados con el consorcio 2 y 3 presentaron resultados similares a los tratados con fertilizante químico.

En definitiva, la presente investigación nos reveló la presencia de bacterias del género *Bacillus* y *Lysinobacillus* en la rizosfera de estudio, los mejores fertilizantes para la quinua son los que tienen *lysinobacillus* y *B. subtilis* las cuales tienen el mismo efecto que un fertilizante químico; solo que estos son más amigables con el medio.

Palabras claves: Biofertilizante, rizosfera, *Bacillus*, *Lysinobacillus*, infusión suelo, medio LB

ABSTRACT

The present thesis was intended obtain biofertilizer from bacteria extracted from the tarwi rhizosphere and test its effect on the development of quinoa in its first three months; For this, a pretreatment was carried out on the rhizosphere, the bacteria obtained from the soil sample were isolated and identified through PGPR tests, DNA extraction and sequencing. Once identified, consortia were formed with the help of disc antagonism tests, the consortia were evaluated in three types of media (MMS, soil infusion and LB medium) by spectrophotometry to choose the medium that allowed the best development of the grouped bacteria. Finally, the effect of these fertilizers on the quinoa plant was evaluated. This was done by measuring the stem length, root length and number of leaves. These variables were done in each treatment, including the control.

The bacteria found in this thesis were Gram + bacteria, in the form of bacilli, with great capacities to fix nitrogen and solubilize phosphate, the most notable being *B. Subtili*, *B. pumilus*, *B. tropicus*, *B. thuringensis*, *Lysinobacillu* and *klebsella oxytoca*; which presented in their growth curves a high absorbance and a stationary phase with a longer duration in the soil and LB Infusion media. The results obtained in the variables with each consortium, especially those treated with consortium 2 and 3, presented similar results to those treated with chemical fertilizer.

In short, the present investigation revealed the presence of bacteria of the genus *Bacillus* and *Lysinobacillus* in the study rhizosphere, the best fertilizers for quinoa are those that have *lysinobacillus* and *B, subtilis* which have the same effect as a chemical fertilizer; Only these are more environmentally friendly.

Keywords: Biofertilizer, rhizosphere, *Bacillus*, *Lysinobacillus*, soil infusion, LB medium

ÍNDICE

DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTO	
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN	1
HIPOTESIS	2
OBJETIVOS DE LA REVISIÓN	2
OBJETIVO GENERAL	2
OBJETIVO ESPECÍFICO	2
CAPÍTULO I: REVISIÓN DE LITARATURA	3
1.1 TARWI (Lupinus Mutabilis Sweet)	3
1.2 RIZOSFERA	5
1.3 CARACTERÍSTICAS DE LA RIZOSFERA DEL TARWI Y DE LA QUINUA	6
1.4 RHIZOBACTERIAS PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL (PGRP)	7
1.5. BIOFERTILIZANTES	8
1.6 QUINUA (Chenopodium quinoa Willd)	10
1.6.1 Absorción y remoción de nutrientes en quinua	11
1.6.2 Producción de quinua en la Región	12
CAPÍTULO II: MATERIALES Y REACTIVOS	13
Instrumentos:	13
Reactivos	14
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	16
3.1 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA	16
3.2. AISLAMIENTO Y SIEMBRA DE MICROORGANISMOS	16
3.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	16
3.3.1 Caracterización microscópica	16
3.3.2 Caracterización macroscópica	16
3.4 CARACTERIZACIÓN POR CAPACIDAD PGPR	17
3.4.1 Pruebas de producción de Ácido Indol Acético (AIA)	17

3.4.2 Prueba de fijación biológica de nitrógeno	17
3.4.3 Prueba de solubilización de fosfato	18
3.4.4 Producción de sideróforos	18
3.5 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	18
3.6 PRUEBA DE ANTAGONISMO	19
3.7 CONTRUCCION DE CURVA CINETICA DE CRECIMIENTO	20
3.7.1 Preparación de los medios para los diferentes consorcios	20
3.7.2 Preparación del pre inculo	21
3.7.3 Determinación de la Cinética de crecimiento por espectrofotómetro.....	22
3.8 FERMENTACIÓN DE LOS CONSORCIOS A NIVEL DE MATRAZ.....	23
3.9 EFECTO DEL CONSORCIO BIOFERTILIZANTE SOBRE CULTIVOS.....	24
DE QUINUA	24
3.9.1 Preparación y esterilización del sustrato.....	24
3.9.2 Preparación y llenado de macetas	25
3.9.3 Descripción de los tratamientos	25
3.9.4 Siembra e inoculación.....	26
3.9.5 Medición de variables y análisis estadístico	27
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.....	28
4.2 AISLAMIENTO Y SIEMBRA DE MICROORGANISMOS	28
4.3 CARACTERIZACION POR CAPACIDAD PGPR	29
4.3.1 Prueba de Producción de Ácido Indol Acético (AIA)	29
4.3.2 Solubilización de fosfato	30
4.3.3 Fijación biológica de nitrógeno	31
4.3.4 Producción de sideróforos	31
4.4 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	32
4.5 Integración de las capacidades promotoras de crecimiento vegetal	34
4.6 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	34
4.7 PRUEBA DE ANTAGONISMO	37
4.8 CONSTRUCCION DE CURVA DE CRECIMIENTO	39
4.8 FERMENTACIÓN DE LOS FERTILIZANTES A NIVEL DE MATRAZ.....	44

4.9 EFECTO FERTILIZANTE	45
CONCLUSIONES.....	49
RECOMENDACIONES.....	51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3: Producción de AIA por aislado bacteriano	17
Figura 4: Combinación y distribución de las bacterias confrontadas.	20
Figura 5: Muestra de la preparación de pre-inoculo	22
Figura 6: Proceso para la construcción cinética de crecimiento.	22
Figura 7: Elaboración de fermentadores a escala pequeño.	23
Figura 8: Esterilización del sustrato.	24
Figura 9: Aspecto de bolsa de siembra y del sustrato.....	25
Figura 10: Distribución de los cultivos y tratamiento con sus réplicas	26
Figura 11: Punto de recolección de los suelos del tarwi.....	28
Figura 12: Placas de disolución 10^{-5} , 10^{-6}	29
Figura 13: Resultados del ensayo de fijación de nitrógeno	31
Figura 14: Tinción Gram realizadas a los pozos con consorcio 7	38
Figura 15: Medios preparados en ente trabajo: Infusión suelo; LB; MMS	39
Figura 16: Aspecto del medio AN con los consorcios respectivos antes y después. Medio inicial, Pre inoculo	40
Figura 17: Aspecto de los medios con los consorcios antes y después	40
Figura 18 A: Curva de crecimiento del consorcio 1 en los tres diferentes medios.	41
Figura 18 B: Curva de crecimiento del consorcio 2 en los tres diferentes medios.....	42
Figura 18 C: Curva de crecimiento del consorcio 3 frente a los tres medios de estudio.....	42
Figura 18 D: Curva de crecimiento del consorcio 4 frente a los tres medios de estudio.....	43
Figura 19: Curva de crecimiento bacteriano (Absorbancia vs Tiempo) para consorcio 1, 2, 3 y 4	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla1: Taxonomía del <i>Lupinus Mutabilis</i>	4
Tabla 2: Cepas seleccionadas por producción de AIA	29
Tabla 3: IS en los aislados de bacterias para prueba de solubilización de fosfatos	30
Tabla 4: ERP de sideróforos por los aislados rizosfericas del <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet	31
Tabla 5: Caracterización macroscópica de las cepas aisladas de la rizosfera de tarwi.....	32
Tabla 6: Caracterización microscópica de las bacterias rizosfericas del tarwi.....	33
Tabla 7: Integración de los resultados en las pruebas PGPR.....	34
Tabla 8: Identificación de bacterias mediante secuenciación genética	35
Tabla 9: Resultado de Pruebas de antagonismo de las cepas seleccionadas.	37
Tabla 10: Concentración de biofertilizante mostrados la Absorbancia y concentración de cada consorcio.....	45
Tabla 11: Longitud de la planta por tres meses (cm).....	45
Tabla 12: Numero de hojas en los tres primeros meses.....	46
Tabla 13: Longitud de la raíz segundo y tercer mes (cm).....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

AG	Archivo Jurídico (Jurídico)
N₂	Nitrógeno
AIQ	Año Internacional de la Quinoa
pH	Potencial de Hidrogeno
MDCV	Microorganismo Promotores de Crecimiento Vegetal
PGPR	Rizhobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal
ACC	Amino- ciclopropano- carboxilato
AIA	Ácido Indol Acético
NO₃	Nitrato
Nfb	Medio Mínimo de Nitrógeno
NBRIP	Medio de fosfatos del National Botanical Research Institute
CAS	Medio Cromo Azul S
LB	Medio Luria (Luria Bertani)
MMS	Medio Mínimo de Sales
RPM	Revoluciones por minuto
HDTMA	Hexadeciltrimetilamonio Bromuro
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa

ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
IS	Índice de Solubilizacion
ERP	Eficiencia Relativa de Producción
DC	Diámetro de cultivo
DH	Diámetro de Halo
DP	Diámetro de producción
DB	Diámetro de crecimiento bacteriano



INTRODUCCIÓN

En la provincia La Unión como en otras localidades del país ha disminuido el cultivo de leguminosas como el tarwi (*Lupinus Mutabilis*), posiblemente por el desconocimiento de su función enriquecedora de los suelos y por la poca difusión de su gran valor alimenticio, mayor que el de la soya, en esta y otras provincias del Perú se tiene el recurso para superar niveles de desnutrición y pobreza extrema, sin embargo, no se aprovechan (1) (2).

Por otro lado, en los últimos años, debido al cambio climático causado por el efecto invernadero han sufrido una reducción en el rendimiento de sus cultivos y se ha incrementado la aparición de plagas. Pero también hay una creciente demanda interna y externa de la quinua, según el Ministerio de Comercio Exterior y Turismo, el 2018 las exportaciones totales de quinua alcanzaron los US\$125 millones y tuvieron como destino más de 16 países del mundo debido a su reconocido valor alimenticio, esto ha creado la necesidad de una mejor y mayor producción de este cereal de origen andino (2). Esto ha llevado a que los agricultores empiecen a usar fertilizantes químicos para incrementar el rendimiento de sus cultivos, así como insecticidas para controlar las plagas, a pesar de que estas prácticas están prohibidas en Áreas Naturales Protegidas que es el caso de la provincia La Unión que tiene la categoría de Reserva Paisajística sub cuenca del Cotahuasi a partir del 23 de Mayo del 2005, mediante **Decreto Supremo N°027-2005AG** (3).

Frente a ello en la presente investigación de tipo experimental, se pretende aislar los microorganismos endófitos de tarwi (*Lupinus Mutabilis*) los cuales tiene una habilidad de facilitar directa e indirectamente el desarrollo de la planta debido a la capacidad de solubilizar fosfato y fijar nitrógeno, convirtiendo a la agricultura común en una agricultura sustentable. Así como también permiten extender las ventajas de la simbiosis en otras plantas no leguminosas.

HIPOTESIS

Ya que las leguminosas como el tarwi (*Lupinus Mutabilis Sweet*) poseen una extraordinaria flora que al ser mejorada sirve de biofertilizante para otras leguminosas, tubérculos y algunos cereales; es probable, que un inoculante obtenido con estas bacterias sirva también para mejorar el crecimiento de la quinua (*Chenopodium Quinoa Willd*).

OBJETIVOS DE LA REVISIÓN

OBJETIVO GENERAL

Comprobar el efecto fertilizante de las bacterias rizosféricas del *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi) en el cultivo de quinua.

OBJETIVO ESPECIFICO

- Aislar las bacterias rizosféricas de suelo cultivado con *Lupinus mutabilis Sweet*.
- Caracterizar a las bacterias mediante tinción Gram, observación macroscópica, prueba PGPR y molecular.
- Formar consorcios bacteriales mediante pruebas de antagonismo
- Elegir los mejores sustratos de fermentación mediante una evaluación espectrofotométrica.
- Evaluar el efecto fertilizante con un análisis comparativo en el cultivo de la quinua de forma in vitro.

CAPÍTULO I: REVISIÓN DE LITARATURA

1.1 TARWI (*Lupinus mutabilis* Sweet)

Desde hace cuatro mil años se cultivaban los Lupinus, encontrando evidencia de esto cereales en las tumbas y restos de las culturas egipcias y alto andinas como la Tiahuanaco y la cultura Nazca en Perú (4) (5). A nivel mundial se encuentra de 300 a 400 especies, dentro de las cuales 83 son especies silvestres estudiadas en países sur americanos como Colombia, Bolivia y Perú (6), siendo en este último país donde se ha encontrado especies silvestres con alta variabilidad y abundantes genes similares a la del *Lupinus Mutabilis* (tarwi), pero diferenciándose en el uso que le da la población, ya que algunos son usados como forraje, combustible, rituales y alimento humano (7).

El lupinos tiene un grado de toxicidad debido a la presencia de alcaloides en su estructura, estos le dan a la planta propiedades anti fúngicas y una acción insecticida, también le sirven como defensa contra microorganismo patógenos y animales herbívoros puesto que los alcaloides tienen un sabor amargo. Por ello diversos investigadores han ocupado estas características para darles usos en la agronomía (8).

A nivel nutricional el Lupinus es apreciado por su contenido de grasa (13-15%), extracto no nitrogenado (26-27%), proteínas (44-49%), fibra (57-58%) que comparado con la soya son altas (9) (7) (10). Al igual que su alto contenido de macronutrientes como fosforo, potasio, calcio, magnesio y azufre (9).

La taxonomía de la especie ha presentado algunos problemas puesto que no se conocía la procedencia de la primera planta que describieron como Lupinus y hasta la actualidad tampoco se conoce, entonces como que el origen de la especie queda en duda, otra cosa a tomar en cuenta es que en los lupinos del “nuevo mundo” ocurren hibridaciones interespecificas lo cual también se ha observado en los Lupinos Mutabilis (11).Y eso hace que la variabilidad genética del Lupinus Mutabilis sea mayor, por lo que la taxonomía de la especie podría variar (12).

Pero al día de hoy no ha habido alguna modificación de la taxonomía, por lo que se sigue utilizando la clasificación redactada por Camarena E, et al (12).

Tabla1: Taxonomía del *Lupinus Mutabilis*

TAXONOMÍA	
Orden	Fabales
Suborden	Leguminosae
Familia	Fabaceae
Subfamilia	Faboideae
Tribu	Genisteae
Género	Lupinus
Especie	Lupinus mutabilis Sweet (*)

Fuente: Camarena E et al, CONCYTEC (2012)

El *Lupinus mutabilis* Sweet crece en zonas templadas y frías del Altiplano boliviano-peruano entre 2.000 a 3.850 m.s.n.m. cuyas temperaturas oscilan entre los 20 a 25°C (13) (14) (15). Su requerimiento de precipitación fluvial se sitúa entre 350850mm, siendo cultivado exclusivamente en condiciones de secano. Es susceptible al exceso de humedad y moderadamente susceptible a la sequía durante la floración y envainado al igual que la quinua (13) (15) (16). Requiere suelo franco y franco arenoso con un pH que oscila entre 5 y 7, no necesita elevados niveles de nitrógeno, pero sí de potasio y fosforo (14).

Respecto a su descripción botánica la raíz es pivotante y robusta, puede alcanzar una profundidad de 2 m a 3m, realiza un proceso de simbiosis con bacterias nitrificantes que forman nódulos de 1cm a 3cm, en estos nódulos se alojan bacterias fijadoras de nitrógeno que pertenecen en su mayoría al género *Rhizobium* quienes se alimentan de las sustancias azucaradas cedidas por la planta y son capaces de fijar químicamente el N₂ atmosférico formando con él moléculas orgánicas que ayudaran a la planta, jugando un importante papel en el ciclo de nitrógeno en la tierra (13) (17).

El tallo es semileñoso, cilíndrico; su interior está formado por un tejido esponjoso con bastantes ramificaciones, cuya altura oscila entre 50 cm y 280 cm de alto. El color del tallo varía de verde a gris castaño, según el grado de tejido leñoso, si el contenido de antocianina de la planta es alto, el color verde de la clorofila queda cubierto por un intenso azul – rojizo. Según el tipo de ramificaciones, la planta puede ser de eje central predominante, con ramas desde la mitad de la planta, tipo candelabro, o ramas terminales; o de una ramificación desde la base con inflorescencia a la misma altura (6).

Las hojas del *Lupinus* son de forma digitada, compuestas de 5 o más folíolos que varían entre ovalados a lanceolados. En la base del pecíolo existen pequeñas hojas estipulares, muchas veces rudimentarias. El color puede variar de amarillo verdoso a verde oscuro, dependiendo del contenido de antocianina (6).

La inflorescencia es un racimo terminal con flores dispuestas en forma verticilada, donde cada flor mide alrededor de 1,2cm de longitud y tiene forma típica de las papilionáceas, conteniendo en su corola cinco pétalos, uno en el estandarte, dos en la quilla y dos en las alas. La quilla envuelve al pistilo y a los diez estambres. En una planta de lupino se llega a ver más de mil flores, cuyos pétalos varían desde el blanco, crema, azul, hasta el color púrpura (6).

Las semillas están envueltas en una vaina alargada de 5 a 12 cm y varían de forma (redonda, ovalada a casi cuadrangular), en cada una de las vainas se pueden encontrar 3 a 5 granos (12). Estos granos tienen colores variados: blanco puro, amarillo, gris, pardo, bayo, marrón, castaño, negro e incluso de color marmoteado; su forma es elipsoidal, lenticular, algunas redondeadas y otras más bien con bordes más definidos en forma semicuadrada (12) (6).

1.2 RIZOSFERA

A inicios la rizosfera se definió como un efecto de las raíces de las leguminosas sobre el suelo circundante debido a que estas plantas liberan compuesto orgánico mediante sus raíces dándole una mayor actividad microbiana. Pero no es hasta finales del siglo XX que a la rizosfera se le considero como un efecto de ecosistema entre sí, siendo considerado como uno de los ecosistemas más grandes (18) (19).

Este ecosistema está formado de bacterias los cuales son los más abundantes y son capaces de multiplicarse colonizando nichos ecológicos de raíz durante diversas etapas del crecimiento de la planta, por otra parte, presenta un flujo energético muy sustancial pues la plantas debido a sus raíces liberan entre 10 a 70% de los fotosintatos, quedándose en el suelo para ser utilizados por los siguientes cultivos (19) (20).

También está formado por la presencia de raíces, vegetales y compuestos orgánicos, las cuales pueden ser pocas o abundantes dependiendo del tipo, las condiciones ambientales, condiciones del suelo, el cultivo y edad y de sus propiedades química y físicas (21).

Debido a la abundancia de los microorganismos presentes en este ecosistema es que se considera importante la función y características de estas bacterias sobre todo la interacción microorganismo- planta. Un ejemplo de esta interacción es la del rhizobium con las leguminosas las cuales permiten la nodulación de los rizobios cuando el suelo no presenta nitrógeno o cuando los hongos micorrizicos colonizan las raíces para la fertilización fosfórica, aunque hay casos en donde las leguminosas no necesitaran de la actuación de los microorganismos correspondientes debido a que el suelo contiene alta cantidad de los minerales y no participan sus moduladores siendo los más importantes los oxidados radicales (22) (23)

1.3 CARACTERISTICAS DE LA RIZOSFERA DEL TARWI Y DE LA QUINUA

Al lupino se le reconoce como mejorador de la fertilidad del suelo, fijador de nitrógeno atmosférico y buen extractor de los nutrientes de las capas profundas del suelo debido a su desarrollo radicular profundo (24)

En los suelos cultivados previamente con tarwi y quinua se encontrará un alto contenido de fosforo debido a que la planta tiene la capacidad de liberar el fosforo que está fijado en el suelo facilitando la solubilización y movilización del fosforo que se encuentran en otras fuentes de cultivos (24) (25).

También en estos suelos se presenta un alto % de materia orgánica debido a la presencia de abonos verdes y arbustos, dándole una mayor capacidad de agua disponible en el suelo, regulando favorablemente el ambiente físico, químico y biológico de la tierra e incrementando la presencia de calcio sobre todo en la planta del Lupinus (26) (27).

Respecto al nitrógeno su cantidad es considerable puesto que las raíces del tarwi presentan rhizobium estando asociados a la fijación de nitrógeno y relacionadas con el contenido de la materia orgánica (25)

Debido a la gran cantidad de nutrientes que se presenta en los suelos es que hay una gran variedad de microorganismos. Los géneros más comunes encontrados en ecosistemas terrestres son *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum* y *Bacillus* (28).

1.4 RHIZOBACTERIAS PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL (PGRP)

Estas son bacterias que habitan la rizosfera y que afectan positivamente el desarrollo de las plantas. Tienen la capacidad de colonizar activamente el sistema radicular para favorecer y/o mejorar su crecimiento y rendimiento a través de uno a más mecanismos. Los MPCV (microorganismos promotores de crecimiento vegetal) representan alrededor del 2 al 5 % de las bacterias rizosfericas. Los siguientes géneros de bacterias que han sido reportados como MPCV son: *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcous*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Serratia* (29) .

Por ejemplo, en algunas investigaciones se encontró que las bacterias mayormente encontradas en la rizosfera de la quinua y tarwi son de genero *Bacillus*; identificando al *Lysinibacillus macroides* como la bacteria coincidente de ambos cultivos (30) (31).

El género *Bacillus* fue descrito en primer lugar por Cohn y comprende un grupo de especies filogenética y fenotípicamente heterogéneas. Incluye más de 100 especies. En una etapa temprana de la clasificación de las especies del genero *Bacillus* se tiene en cuenta dos características: el crecimiento aerobio, la respuesta positiva a la tinción Gram, la forma bacilar y la formación de endosporas. Esto hace que existan una gran cantidad de especies de este género ocupando una gran variedad de hábitats (32) (33)

Sobre la base de estudios moleculares de la secuencia del RNAr 16S, este género se ha subdividido en cuatro grupos. El primero pertenece a *Bacillus senso stricto* en el cual se incluye *Bacillus subtilis* y otras 27 especies (34). El segundo, también conocido como *sensu lato*, incluye bacilos formadores de esporas redondeadas, en el que se destacan las especies *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. anthracis* y unidos a estos se encuentran algunos taxos asporógenos como *Caryphanon*, *Exiguobacterium*, *Kurtia* y *Planococcus* debido a que presentan cierta similitud con *Bacillus subtilis* (35). Por su parte, el grupo 3 está formado por 10 representantes, dentro de los que se encuentra *B. polymyxa* y *B. macerans*, los cuales se han reclasificado en un nuevo género, *Paenibacillus* (36). El grupo 4, se encuentra formado por especies que han sido reclasificadas en dos nuevos géneros *Aneuribacillus* y *Brevibacillus* (37)

Los miembros de este género se caracterizan por ser Gram positivos, de forma bacilar, catalasa positiva, aerobios estrictos o anaerobios facultativos y formadores de endosporas (38). Son aisladas de numerosos cultivos de interés económico como la caña de azúcar, el algodón, el trigo, el maíz, la papa, el arroz y últimamente la quinua. (39)(40)(41)(42)(43)(44)(30). Dentro de las especies que se pueden aislar de forma más frecuente asociadas a las plantas, ya sea la rizosfera o los tejidos internos, se destacan *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. Circulans*, *B. Cereus*, y *B. thuringensis*. (45)(46)(47)(48)(49)(50). Y de las menos frecuentes son las *Klebsellas* (51)(52).

Existe un amplio rango de posibilidades para la acción de las bacterias sobre el crecimiento vegetal pudiendo ser efectos directos o indirectos. La influencia directa incluye la producción de fitohormonas como, por ejemplo, de ácido Indol-acético (53), también de ácido giberélico, citoquininas y ácido abscísico; o bien la capacidad de producir la enzima 1-amino-ciclopropano 1-carboxilato (ACC) desaminase, que reduce el nivel de etileno en las raíces.

Además, los mecanismos directos incluyen la solubilización de fosfatos y la fijación biológica de nitrógeno (54). Los efectos indirectos incluyen la acción de agentes como bio-control de patógenos, producción de sideróforos, β 1,3- glucanasas, antibióticos, pigmentos fluorescentes, entre otros (55) (56). Por ello en diferentes trabajos experimentales de biofertilización se evalúan las cepas aisladas por su capacidad de producción de AIA, solubilización de fosfatos, antagonismo contra patógeno del cultivo de estudio y producción de sideróforos, mientras que, a las cepas aisladas de nódulos se evalúan por su capacidad de fijación de nitrógeno *in vitro*.

1.5. BIOFERTILIZANTES

Su importancia del biofertilizante es que se utilizan, fundamentalmente, como medida correctiva, para superar deficiencias evidentes de nutrientes, preventiva, sustitutiva, para suplir las exigencias del cultivo, complementaria, como complemento, y es un estimulante para la planta alta productividad cuando se aplican formulaciones de nitrógeno, fósforo y potasio en bajas dosis (57). Es por esto que se preparan diversos tipos de biofertilizante a partir de la fermentación y descomposición aeróbica y termofílica de materiales orgánicos, tales como estiércoles de animales, plantas verdes, frutos, etc. (58) (59) (60), por medio de microorganismos o inoculantes microbianos que después de un tiempo pueden ser aplicados directamente sobre los cultivos vía foliar o sobre los suelos durante el riego. Se puede fabricar

una gran variedad de biofertilizante que van desde el más sencillo hasta el más complejo enriquecido con algunos minerales, cenizas y harinas complementarias (29).

Para lograr el uso extensivo de biofertilizante, los agentes bacteriales deben ser susceptibles a una multiplicación masiva no dispendiosa y económicamente rentable con el fin de garantizar la disponibilidad tanto a pequeña y gran escala (61). Para la fermentación a pequeña escala los autores recomiendan un sistema discontinuo o de batch el cual permite que los nutrientes se conviertan en biomasa y que el sustrato se agote causando el inculado del cultivo del microorganismo, no habiendo renovación de nutrientes (62).

Además, la curva de crecimiento de un cultivo batch en un medio de cultivo con una única fuente de carbono limitante del crecimiento tiene aspecto sigmoideo y permite diferenciar varias fases de crecimiento: fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte (62).

A nivel piloto o industrial los sistemas utilizados son los biorreactores tipo tanque agitado que son usados para producir biomasa y enzimas a partir de alguna bacteria, por lo que el conocimiento y la predicción del mezclado y la transferencia de masa en biorreactores agitados son fundamentales para desarrollar bioprocesos biotecnológicos y su escalamiento (63). Sin embargo, este tipo de sistemas presentan diversos inconvenientes, ya que el estrés hidrodinámico excesivo, generado por la agitación mecánica, provoca la ruptura y daño celular, disminuyendo así su rendimiento (62).

Ya sea a pequeña o a gran escala la producción de los biofertilizante va depender de la aireación, agitación, pH, tipo de bacteria y sustrato (64). Los sustratos utilizados para las especies de *Bacillus* mayormente son el caldo de soya, el lacto suero y levadura activada, en la mayoría de bacterias utilizadas en procesos industriales pueden asimilar fuentes orgánicas e inorgánicas. El nitrógeno orgánico puede ser suministrado por medio de aminoácidos, subproductos o destilados de carnes y levaduras (65). En *B. subtilis* diversas fuentes de nitrógeno como la peptona tienen un significativo efecto de sustancias anti fúngicas (66).

Las bacterias también necesitan de elementos minerales como hierro, cobre, molibdeno, magnesio y zinc denominados oligoelementos son muy importantes en actividades enzimáticas es por ello que un adecuado medio sería la tierra de donde se aisló ya que este presenta los minerales necesarios y no se necesita de un mayor costo, para mejorar este sustrato se le debe agregar sacarosa o glucosa para mejorar su potencial (67) (68). Para otras bacterias como el

Azotobacter, *Pseudomas* o *klebsellas* el sustrato a utilizar suele ser extracto de soya, caldo de papa, medio selectivo (69) (70).

La obtención del biofertilizante se da por proceso de una fermentación del algún sustrato con bacterias, habiendo dos tipos: la fermentación líquida que es la que más utiliza para la multiplicación de bacterias, y es de fácil manipulación, requiere solo de agua y sustrato sólido; además permite identificar las capacidades de las bacterias y la fase de desarrollo de estos microorganismos, siendo más utilizada para hacer fertilizantes o peptocidas (71) (72). Otra es la fermentación sumergida que es utilizada para producción de enzimas y su manipulación es un poco más compleja pues requiere de más parámetros (73) (74).

Además, los biofertilizante microbianos deben tener una estabilidad a largo plazo y una eficacia alta para el cultivo respectivo. También, se debe considerar el uso de materiales disponibles en la región ya sea residuos de otros procesos o el uso de las bacterias propias de las plantas o de la zona (61).

Respecto a la utilización de fertilizantes en el Perú tenemos que los más utilizados son la Urea, fosfato dinámico, fosfato mono amoniacal, fosfato triple, potasio, zinc, calcio, los cuales son importados por Estados Unidos, China y Europa; siendo la zona del norte y de la costa los que más utilizan fertilizantes químicos por su alta cantidad de terreno y sembrío (75) (76).

Pero a nivel de investigación las universidades nacionales están haciendo estudios, evaluaciones respecto a biofertilizante microbianos como micro algas, hongos y bacterias obtenidas y extraídas de lagunas, mar, suelos rizosféricas y de la misma planta (75) (77). Siendo muy beneficiosas y satisfactorias para los diferentes tipos de ambiente y suelo de nuestro país. Hoy en día debido al Covid 19 y problemas en los países exportadores, es que el estado peruano ha optado por el aprovechamiento de nuestros recursos para obtener fertilizantes orgánicos fáciles y rentables para los agricultores y la población en general (75).

1.6 QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd)

La quinua, fue domesticada y sembrada durante miles de años en zonas que van desde el nivel de mar o costa (0 a 500 m.s.n.m.), la yunga (500 hasta 2500 m.s.n.m.); sierra media – zona quechua o valles interandinos (2500 – 3500 m.s.n.m.) y hasta la sierra alta, Suni o Altiplano (3500 a 4000 m.s.n.m.); dando lugar al surgimiento de diversos tipos de quinuas llamados eco

tipos y de los cuales deben ser elegidas las variedades a sembrar; para lograr una buena productividad y calidad de granos (78).

La quinua, por su alta variabilidad genética, se adapta a diferentes climas, desde aquellos calurosos y secos como el clima de la costa desértica, a aquellos templados lluviosos o secos de los valles interandinos y aquellos fríos y lluviosos o secos de la sierra alta y el altiplano. Las temperaturas óptimas de crecimiento y desarrollo, dependiendo de las variedades, están en el rango de 15 a 25°C (79). Puede tolerar las heladas y temperaturas altas durante las fases de desarrollo vegetativo y la formación de la inflorescencia y no desde la floración hasta el estado de grano pastoso. Tanto las bajas como las altas originan esterilidad de polen y afectan el desarrollo y crecimiento de la planta, dando lugar a esterilidad o granos inmaduros, arrugados o de bajo peso; dependiendo del momento en que se produce el estrés de temperatura (80).

1.6.1 Absorción y remoción de nutrientes en quinua

Para un buen crecimiento la quinua necesita muchos nutrientes, sobre todo macro elementos como el oxígeno, carbono, hidrógeno, nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre. También necesita pequeñas cantidades de micro elementos como hierro, boro, zinc, cobre, sodio, molibdeno, cloro, cobalto y sílice. El oxígeno, carbono e hidrógeno provienen del aire, los restantes 16 elementos deben ser manejados por aplicaciones al suelo directamente o a la planta; dependiendo del tipo y fertilidad del suelo y el uso del fertilizante por el cultivo (81) (82).

El nitrógeno es un elemento importante para la quinua, y es uno de los que a menudo limita los rendimientos. El nitrógeno incrementa el crecimiento vegetativo y la capacidad fotosintética de la planta; es decir, determina el número de hojas, el número de semillas por inflorescencia y por lo tanto determina el potencial de rendimiento (83).

Como en el suelo sucede una serie de reacciones químicas para cambiar estas diversas formas al tipo de nitrógeno que es tomada por las plantas y es la forma Nitrato (NO_3). El síntoma más común para reconocer la deficiencia de nitrógeno en la quinua y otras plantas es el color verde pálido o amarillo de las hojas. Adicionalmente la inflorescencia es pequeña y el contenido de proteína del grano disminuye y algunos granos no alcanzan su tamaño normal. Se puede mejorar la disponibilidad de nitrógeno para la quinua a través de la rotación con leguminosas bien establecidas y con alta nodulación que asegure disponibilidad de nitrógeno, o después de papas conducidas con alta fertilización o uso de abono verde, este nitrógeno adicional

beneficiará el cultivo de quinua y se podría reducir la cantidad de fertilizantes a aplicar, disminuyendo los costos de producción y la contaminación ambiental (84).

1.6.2 Producción de quinua en la Región

Con respecto a la producción según los informes del MINAGRI los máximos niveles de producción fueron el 2013 que fue declarado “Año Internacional de la Quinua” (AIQ), en el que Arequipa superó a Puno siendo en el 2014 donde Puno recobra el liderazgo junto con Ayacucho, Apurímac y Cuzco. En el resto del Perú en el 2016 se exportó 77,7 mil toneladas al precio promedio de S/. 10 a los mercados norteamericanos, a la Unión Europea, así como al resto del mundo sobre todo Canadá (tercer importador) (85). Esta cifra en el 2019 tuvo un significativo crecimiento pues había alcanzado las 95 mil toneladas, logrando un crecimiento de 9,9%, consecuencia de la mayor demanda de los mercados de EE.UU., Canadá, Reino Unido y China, en respuesta a la tendencia de consumo vegetariano y vegano en estos países, que privilegia la alimentación orgánica y la sustitución de proteínas animales por vegetales; así lo señaló el último “Informe del Mercado de Quinua” de la consultora MAXIMIXE (CASER) (86)

Podemos mencionar adicionalmente que en esto últimos años ha habido mejora en la calidad, debido a que años anteriores entre 2006 hubo una baja cantidad de producción y precio, al que se sumó la negativa del ingreso a EE.UU. por tener ciertos contenidos de plaguicidas, además por cuestiones socio-culturales que hacen vigente su cultivo en el Perú (86).

Adicionalmente, la exportación de quinua convencional a menor precio puede ser posible si se mejorar la calidad y presentación de la quinua peruana, así como promover el cultivo de quinua orgánica andina, que es la más apreciada en el mercado mundial (85).

CAPÍTULO II: MATERIALES Y REACTIVOS

Instrumentos:

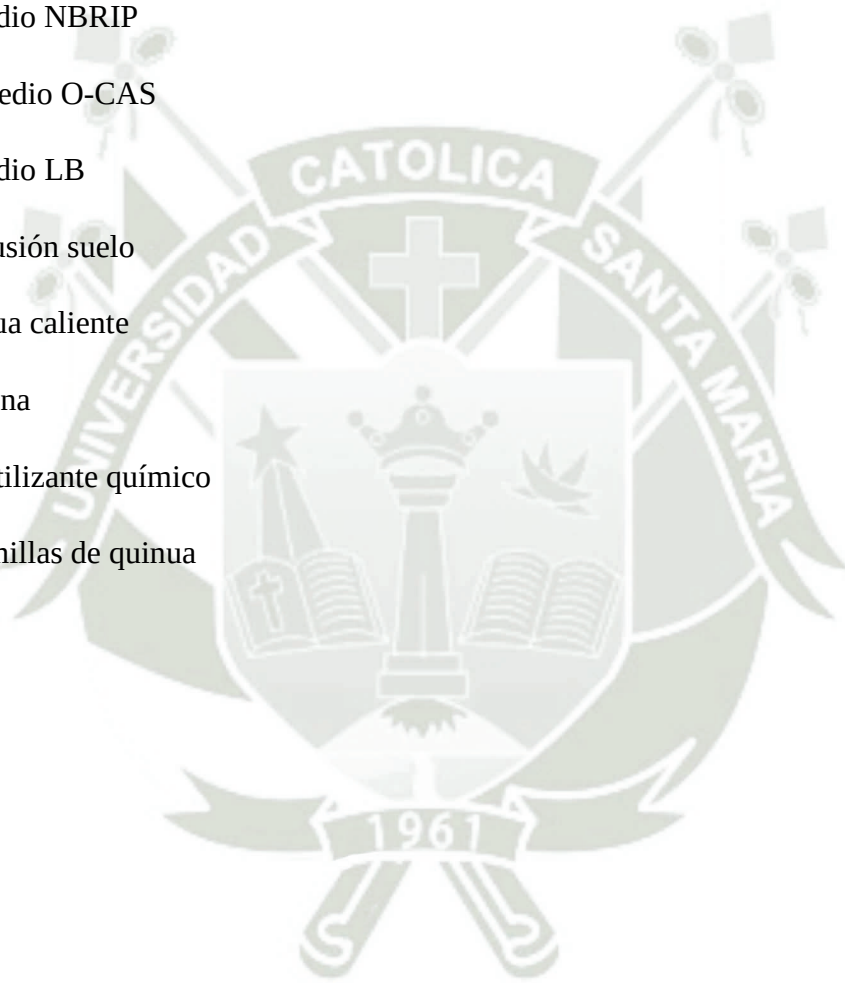
- Lampa
- Bolsas de polietileno
- Marcador
- Colador
- Regla
- Recipiente mediano
- Cocina Eléctrica
- Matraz de 200 ml
- Equipo de Baño Maria P y S
- Tubos eppendorf de 15 ml
- Tubos eppendorf de 50 ml
- Micro pipeta
- Puntas (tips) para micro pipeta de 2.0 - 200 ul
- Puntas de 50 – 1000ul
- Mechero
- Asa de cole
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Microscopio
- Placas de cultivo
- Incubadora
- Gradilla plástica para tobos

- Tubos de vidrio
- Centrifuga
- Papel filtro
- Papel aluminio
- Erlenmeyer 200ml
- Erlenmeyer de 100ml
- Autoclave
- Filtrador al vacío
- Agitador magnético
- Agitador Vortex
- Balanza
- Shaker o agitador orbital
- Lavador de plástico de 10 litros
- Olla grande de 12 litros
- Bolsas negras de siembra
- Frascos de vidrio con tapa

Reactivos

- NaCl
- Tierra de cultivo
- Alcohol
- Agua destilada
- Agar Nutritivo
- Reactivos de tinción Gram

- Medio mínimo de sales
- Triptófano
- Reactivo de Salkowski
- Medio libre de nitrógeno
- Azul de Bromotimol
- Medio NBRIP
- Medio O-CAS
- Medio LB
- Infusión suelo
- Agua caliente
- Arena
- Fertilizante químico
- Semillas de quinua



CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras de rizosfera del cultivo de tarwi (chocho) se recolectaron de los campos cultivados de Tomepampa- Provincia La Unión- Arequipa. El procedimiento se llevó a cabo delimitando superficies de 20cm² en la base de la planta y la extracción se realizó de forma manual considerando 10-30 cm de profundidad (Anexo 1).

3.2. AISLAMIENTO Y SIEMBRA DE MICROORGANISMOS

La tierra recolectada se rotuló y fue conservada en medio fresco durante 48 horas. Trascurrido los días se llevó a laboratorio y se tamizó con ayuda de un colador para quitar palitos, piedras o cualquier impureza; después se tomó 10 g de suelo, se colocó en un matraz de 200 ml, el cual contenía 45ml de NaCl 98%, se homogenizó; posteriormente se le sometió a Shock térmico llevándolo a 81°C durante 5 minutos en baño maría (Anexo 2); luego se realizó diluciones seriadas hasta 10⁻⁷ y se inoculó 0.1 ml de las tres últimas diluciones mediante siembra por superficie en placas con medio AN a 28°C por 24 horas.

3.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

3.3.1 Caracterización microscópica

Las cepas de bacterias que fueron aisladas se sembraron en medio de cultivo AN y se incubaron a 28°C por 24 horas. Transcurrido este tiempo se extrajo una colonia aislada con un asa de Colle y se procedió a fijarla en un portaobjeto previamente preparado con una gota de agua. Se realizó una tinción Gram para determinar la forma de la bacteria y su coloración Gram. Para la observación de las bacterias se utilizó un microscopio óptico y el objetivo de 100X.

3.3.2 Caracterización macroscópica

La característica de crecimiento a nivel macroscópico se observó luego de 1 día de incubación en medio AN para esto se tuvo en cuenta la forma, elevación, margen, color.

3.4 CARACTERIZACIÓN POR CAPACIDAD PGPR

Para medir su capacidad se hicieron estas pruebas:

3.4.1 Pruebas de producción de Ácido Indol Acético (AIA)

Para esta prueba se procedió siguiendo el protocolo colorimétrico de Gordon- Webwer descrito en el trabajo de Huasasquiche (31), junto con los pasos de Glickmann y Dessaux descrito en la tesis de Ochoa (100) el cual consiste en preparar pre inóculos de cada cepa, por una vez crecidos agregarles 4ml de MMS (Medio mínimo de sales) suplementado con triptófano (Anexo 4) en tubos.

Una vez inoculadas, se dejaron incubando a 26°C durante 4 días. Tras el periodo de incubación se tomó 2ml de cada tubo y se pasaron a nuevos tubos para centrifugar a 500 RPM por 10 minutos, trascurrida la centrifuga se extrajo 1ml del sobrenadante y se colocó en un tubo de vidrio el cual contenía 1ml del Reactivo de Salkowski (Anexo 4). Finalmente se incubo a 26°C por 30 minutos. Una vez trascurrido el tiempo la evaluación se hizo mediante la observación de tonalidades de los resultados comparándolos con la imagen (Figura 3)

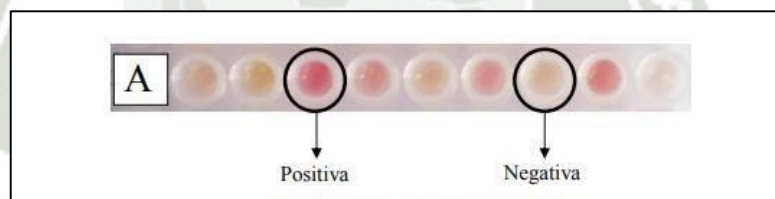


Figura 3: Producción de AIA por aislado bacteriano

Fuente: Huasasquiche, L. (Tesis). 2020

3.4.2 Prueba de fijación biológica de nitrógeno

Las cepas aisladas crecidas en medio AN fueron sembradas en un nuevo medio Nfb (Medio libre de nitrógeno) por agotamiento y estrías, agregándole azul de Bromotimol (Anexo 5). Tras esto las placas se incubaron a 26°C durante 7 días. Pasado los días se observó si había presencia de un color azul en el medio.

3.4.3 Prueba de solubilización de fosfato

Para evaluar la solubilización se hizo mediante los pasos descritos por Ochoa (100). Para lo cual se tomó una asada de la biomasa previamente crecida en AN y se sembró en el centro de las placas que contenían medio NBRIP. Estas placas fueron incubadas a 26°C por 7-10 días según la cepa. La capacidad de solubilización de fosfato, se manifiesta con la presencia de halos de clarificación del medio alrededor de las colonias. Para la lectura de la prueba, se midieron los diámetros de las colonias positivas, después se midió los diámetros de los halos de clarificación de las cepas positivas. Por último, para conocer el índice de solubilización de las cepas positivas se empleó la siguiente fórmula:

$$IS= (\text{Diámetro de colonias} + \text{Diámetro de halo}) / \text{Diámetro de colonias}$$

3.4.4 Producción de sideróforos

El método más empleado es el descrito por Schwyn y Neilands que utiliza como medio CAS, bromuro y HDTMA. Pero el que se utilizó para este ensayo es el modificado por Pérez descrito en el trabajo de Ochoa (100) en dónde utiliza O-CAS (Anexo 6). Al contrario del medio original, el medio se elaboró con ausencia de nutrientes y se trabajó con una baja concentración de agar (0.9%).

Las cepas bacterianas (con 24 horas después de la siembra) fueron cultivadas en medio O-CAS e incubadas a 28°C durante 4 o 6 días. La formación de un halo naranja a amarillo alrededor de las colonias confirmó la producción de sideróforos por la cepa. Se midió el diámetro de los halos a los 6 días de incubación y se evaluó la eficiencia relativa de producción.

$$ERP= (\text{Diámetro de producción} / \text{Diámetro de crecimiento}) * 100$$

3.5 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Los microorganismos aislados y seleccionados fueron enviados al Instituto de Biotecnología del ADN-Uchumayo, donde se contrataron los servicios de extracción de ADN y secuenciación de ADN genómico bacterial para identificarlas.

Para llevar a cabo la identificación molecular de especies procariontes, se siguió la siguiente metodología. En primer lugar, se realizó la extracción de ADN de la muestra utilizando el kit

"The MasterPure™ DNA Purification". Una vez obtenido el ADN, se procedió a la amplificación de la región ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) contenida en la subunidad 30S de los ribosomas procariontes mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para la PCR, se utilizaron dos primers: el primer forward 27F con la secuencia 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y el primer reverse 1492R con la secuencia 5'-TACCTTGTTACGACTT-3'. El proceso de amplificación se llevó a cabo en las siguientes condiciones: Desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, alineamiento a 50°C durante 30 segundos y finalmente elongación a 72°C durante 45 segundos.

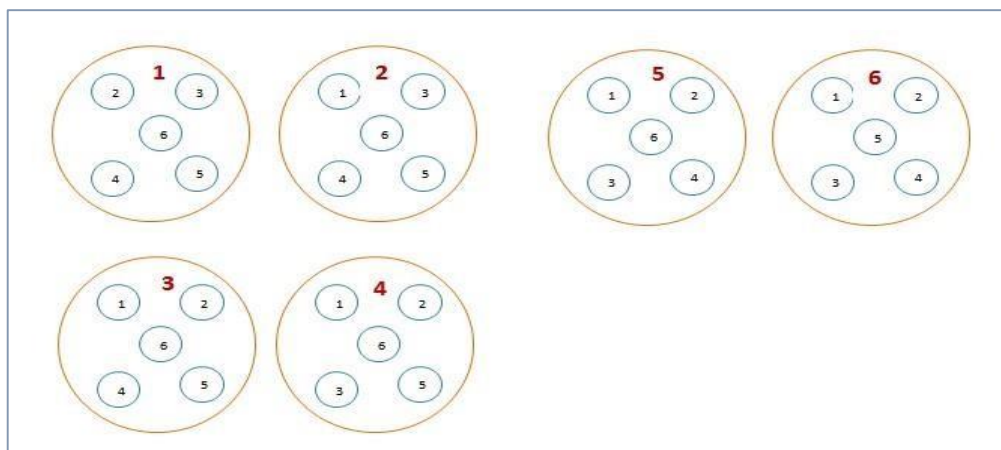
Una vez obtenidos los productos de la PCR, se procedió a su purificación utilizando el kit "Qiagen PCR Purification" siguiendo las instrucciones proporcionadas por la compañía. Posteriormente, estos productos purificados fueron secuenciados utilizando la técnica Sanger, la cual utiliza colorantes de Big Dye V3.1. La secuenciación se llevó a cabo en un equipo ABI 3730xl. Finalmente, las secuencias se analizaron con la herramienta básica de búsqueda de alineación local BLAST® de nucleótido estándar.

3.6 PRUEBA DE ANTAGONISMO

Para realizar las pruebas se tomaron a las bacterias ya identificadas y se les asignó nuevos códigos. Esta prueba se hizo mediante técnica de difusión de pozos.

Lo primero que se hizo fue una siembra masiva, que consiste en colocar en las placas Petri con AN un hisopado de las diferentes bacterias en tres direcciones y alrededor de la periferia del agar para conseguir una siembra uniforme, se deja reposar por unos 10 minutos. Mientras, se preparó, se cortó los discos de papel filtro con 0,4mm de diámetro y ya cortados se les remojó en alcohol hasta su uso.

Pasado los 10 minutos, estos discos fueron remojados en los tubos que contenían las bacterias de estudio, siendo un disco para cada bacteria y una placa para los diferentes discos, como muestra la figura 4 donde se ilustra la distribución y combinación de las bacterias confrontadas en este ensayo, luego se dejó reposar durante 30 minutos para finalmente incubarlos de forma invertida a 35°C por 24 horas. el criterio para la selección consistió en la observación de la presencia de halos de inhibición.



* El número **rojo** representa las bacterias sembradas en forma masiva; los números negros representan cada bacteria identificada sembradas en discos.

Figura 4: Combinación y distribución de las bacterias confrontadas.

(Fuente: Elaboración propia)

3.7 CONTRUCCION DE CURVA CINETICA DE CRECIMIENTO

3.7.1 Preparación de los medios para los diferentes consorcios

Finalizada la selección de los microorganismos y las pruebas de antagonismo, con las que se determinaron las especies que conforman el consorcio microbiano se procedió a desarrollar los caldos que serán utilizados para cada consorcio formado. Para ello se realizó una búsqueda bibliográfica de diversos solutos utilizados en la fermentación de bacterias rizosfericas, con el objetivo de seleccionar a aquellos solutos más óptimos para las diferentes bacterias que conforman los consorcios, especialmente de *Bacillus* y *klebsellas*.

Debido a que los tres medios utilizados en esta investigación ya han sido estudiados por otros investigadores, se aplicó la temperatura, agitación y PH utilizadas por ellos al igual que su procedimiento de elaboración.

Los medios escogidos fueron tres:

Medio Mínimo de sales:

Para la preparación se colocó MMS modificado (Anexo 7) en 100ml de agua destilada en un matraz con capacidad de 200ml y se mezcló, para finalmente ser llevado a autoclave a 121°C por 20 min. Terminado el auto clavado se dejó enfriar.

Cultivo Broth Liquid

Se preparó el caldo en base al anexo 8 para 100ml. Se le añadió esta preparación a un frasco de Erlenmeyer de 200 ml, se mezcló y se dejó reposar por 5 minutos, transcurrido este tiempo se le calentó agitando frecuentemente por 1-2 min hasta que se diluyera. Para terminar, se esterilizó en autoclave a 121°C por 60min.

Infusión Suelo

Para este medio, el protocolo a seguir fue el descrito en el trabajo de Morales et al (68). Primero se cernió la tierra, después se pesó 50 g del cernido, 75g de residuos vegetales y 200ml de agua destilada, seguidamente se esterilizó a 121 C por 20 min, después, se dejó enfriar y se filtró al vacío.

3.7.2 Preparación del pre inoculo

En seis frascos con capacidad de 100 mL, se preparó soluciones de 45-50 mL de medio de caldo nutritivo. A partir de las placas incubadas con cultivo de: *Bacillus thuringensis*, *Bacillus tropicus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Lisynobacillus macroide*, *Klebsella oxitoca*, se tomó una pequeña porción con el asa de siembra y se inoculó en los frascos de vidrio (Figura 5a), las bacterias se dejaron en crecimiento por 48 horas, con agitación constante en un shaker de laboratorio, a una velocidad de 121rpm hasta que presentara un cambio de color en el medio.(Figura 5b).

Trascurrido el tiempo se pipeteó 3 ml de cada cepa a un nuevo caldo (Figura 5c), después de inocular cada bacteria en otros 6 frascos, se colocó nuevamente en el shaker con las mismas condiciones anteriormente nombradas (figura 5d).

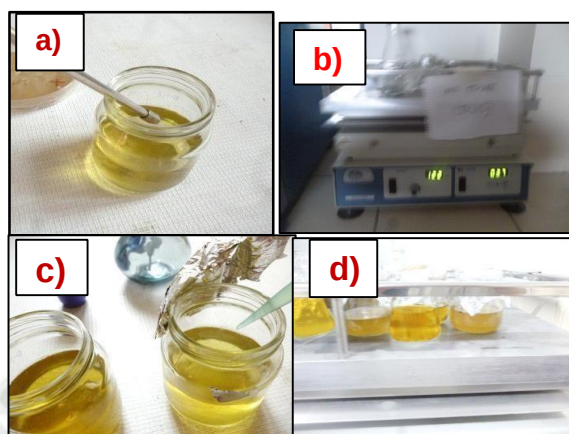


Figura 5: Muestra de la preparación de pre-inoculo. a) Inoculación de bacterias seleccionadas en caldo nutritivo; b) Crecimiento de las bacterias en Shaker por 48 horas a 121RPM; c) Segunda inoculación de bacterias en un nuevo medio; d) Crecimiento de las diferentes cepas en Shaker con condiciones anteriores.

(Fuente: Elaboración propia)

3.7.3 Determinación de la Cinética de crecimiento por espectrofotómetro

Del pre inoculo que se dejó la noche anterior se tomó 3 ml y se inoculo en cada uno de los medios (LB, MMS, Infusión suelo) preparados anteriormente para cada consorcio (Figura 6A) y se llevó al Shaker (Figura 6B) a una velocidad de 121 RPM por 48 horas, anotando el tiempo cero y habiendo hecho una primera lectura de absorbancia a 540nm para los medios MMS, LB, y 600nm para la infusión suelo (Figura 6C). La evaluación duro unas 13 horas y cada 15 minutos se tomaron 1ml de las muestras y se les midió la absorbancia.



Figura 6: Proceso para la construcción cinética de crecimiento.

A) Inoculación a un volumen mayor; B) Crecimiento en Shaker durante 8 días; C) Medición de la Absorción en espectrofotómetro

(Fuente: Elaboración Propia)

3.8 FERMENTACIÓN DE LOS CONSORCIOS A NIVEL DE MATRAZ

Una vez elegido los medios óptimos para cada consorcio, en un Shaker se dispuso el medio para cada uno de los consorcios.

Para esto los pre inóculos de las bacterias (preparados anteriormente) que fueron almacenados, se inocularon 3 ml de cada pre-inóculo que conformaban cada consorcio en Erlenmeyer que contenían 135 ml del medio de cultivo MMS, LB e infusión suelo (Figura 7a). El cultivo se mantuvo a una agitación de 120 PRM y 35 °C de temperatura optimizados por O'Connor (93) y Morales (68), hasta que alcanzaron valores altos de absorbancia (Figura 7b). Adicionalmente, a lo largo de la fermentación se tomaron muestras para medir su pureza por medio de la tinción Gram al igual que su absorbancia. Una vez terminado el proceso se determinó su concentración final de cada consorcio microbiano en sus específicos medios.

Luego estos Erlenmeyer se almacenaron en refrigeración 10 °C hasta su uso, que en este caso fueron durante 10 días.



Figura 7: Elaboración de fermentadores a escala pequeño.

a) Inoculación final en medios selectos para cada consorcio; b) Crecimiento final de cada consorcio en Shaker.

(Fuente: Elaboración Propia)

3.9 EFECTO DEL CONSORCIO BIOFERTILIZANTE SOBRE CULTIVOS DE QUINUA

3.9.1 Desinfección y preparación del sustrato

Se utilizó tierra abonada producida en los campos de cultivo del distrito de Tomepampa y arena en proporción 50-50 (50% de tierra y 50 % de arena). Para la desinfección del suelo agrícola se utilizó un método natural, mediante agua hirviendo; es decir agua a temperatura de 70-80°C; para ello extrajimos 20kl aprox. de tierra, hervimos agua limpia en un recipiente apropiado, la tierra la colocamos en un recipiente estéril, luego, regamos el suelo seco con el agua caliente hasta alcanzar unos 5 a 15 cm de profundidad, finalmente cubrimos la superficie del recipiente con un plástico (permite mantener la temperatura por más tiempo) y lo dejamos durante 24 horas. La arena fue lavada hasta presentar un color transparente (Figura 8).



Figura 8: Esterilización del sustrato. A) Hervida del agua; B) regado del suelo con agua hervida; C) Forrado del suelo para mantener la temperatura; D y E lavado de arena.

(Fuente: Elaboración propia)

3.9.2 Preparación y llenado de macetas

Para este ensayo se utilizaron bolsas de siembra con capacidad de 3 kilos, las cuales ya vienen con perforaciones al costado (Figura 9). Se llenaron las bolsas con las mismas proporciones de tierra y arena como se menciona en el punto 3.9.1.



Figura 9: Aspecto de bolsa de siembra y del sustrato
(Fuente: Elaboración propia)

3.9.3 Descripción de los tratamientos

En esta investigación se fertilizó la semilla de la quinua, aplicando los cuatro consorcios bacterianos. Así mismo, se aplicó fertilización química (Fertilizante líquido Npk, Codipa) con fórmula completa 10-10-10 (fuente de los tres macro nutrientes primarios N-P-K) para darle a la planta la mayor cantidad de nutrientes en una sola aplicación. También se consideró un testigo absoluto sin ninguno de los tipos de fertilización. La Figura 10, muestra los diversos tratamientos y sus repeticiones.

TB1-W: Planta tratada con el consorcio microbiano 1	TB1-W	R.B1-W	R.B2-W
TB2-W: Planta tratada con el consorcio 2	TB2-W	R.C2-W	R.B2-W
TB3- W: Planta tratada con el consorcio 3	TB3-W	R ₁ B3-W	R ₂ B3-W
TB4- W: Planta tratada con el consorcio 4	TB4-W	R ₂ B4-W	R ₂ B4-W
TQ-W: Planta tratada con fertilización química	TQ-W	R ₁ Q-W	R ₂ Q-W
To - W: Planta sin fertilizantes (Testigo)	To-W	Ro ₁ -W	Ro ₂ -W

Figura 10: Distribución de los cultivos y tratamiento con sus réplicas

(Fuente: Elaboración Propia)

3.9.4 Siembra e inoculación

Se dejó durante una semana el sustrato (tierra agrícola + arena) sin siembra para observar algún crecimiento de una plántula o presencia de algún hongo. En seguida se realizó la siembra de forma manual, en donde se hizo cuatro perforaciones de 3 cm de profundidad en cada maceta, haciendo la primera inoculación de tres. La primera consistió en agregar 2 ml del fertilizante en cada hoyo de las macetas (7ml / kg), inmediatamente, se colocó una semilla de quinua en cada cavidad, luego completamos con 1 ml de inóculo correspondiente adicional, y para terminar cubrimos los hoyos con tierra. La segunda inoculación se hizo la quinta semana de crecimiento, para la que se agregó 2 ml de consorcio a cada tratamiento y repetición. La última inoculación se hizo a las 15 semanas agregándoles 3 ml a cada plantita. En el caso del tratamiento control se le regó diariamente durante las tres primeras semanas, en las semanas siguientes, la regada fue interdiaria y finalmente dos veces por semana. El tratamiento con fertilizante químico tuvo dos inoculaciones una al principio junto con la semilla y otra a la décima semana tal como indica su etiqueta de producción.

3.9.5 Medición de variables y análisis estadístico

Se realizó mediciones a los 30 días de germinación, 60 días y 120 días, en cada muestreo se escogió tres plantas al azar de cada repetición para observar los valores dado en cada variable. Las variables que se midieron fueron: Numero de hojas, color de hoja, longitud de tallo, y tamaño de raíz. En el caso de esta última se tomó una réplica, se extrajo la plantita con mucho cuidado para no romper o maltratar la raíz, para después medir con la regla y apuntar los valores respectivos.

Los datos de cada variable fueron recopilados en cuadros y se compararon los resultados entre los tratamientos de estudio.



CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

El muestreo se realizó en el campo llamado Cultivo del distrito de Tomepampa (Anexo 9), durante el mes de agosto del año 2023. Se fijaron cinco puntos dentro del campo y de cada uno se recolectó dos plantas con sus tierras, teniendo un total de diez muestras. De las cuales solos cinco se utilizaron para la siembra en placas (Figura 11).

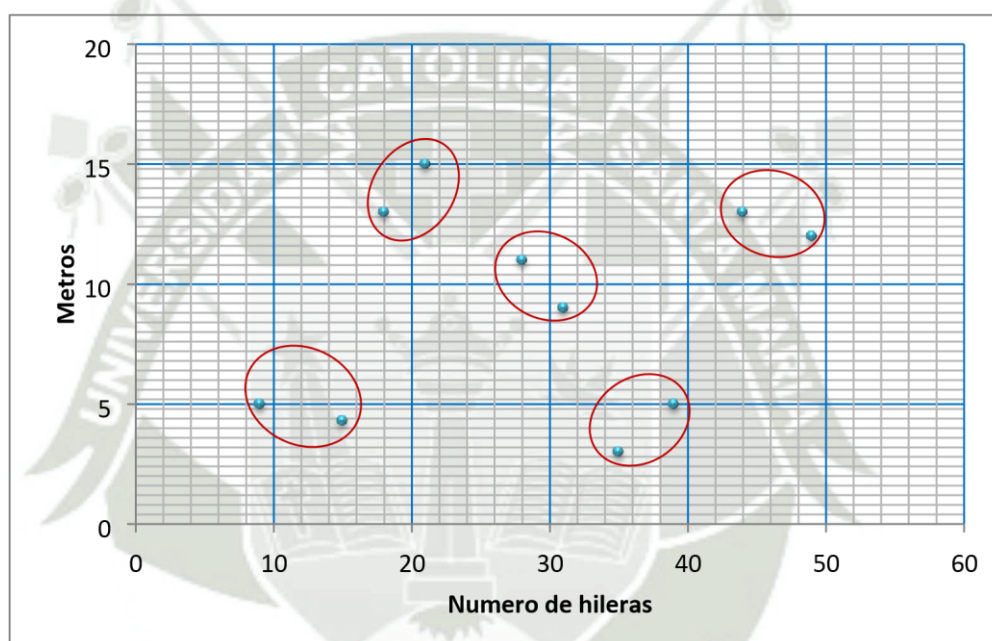
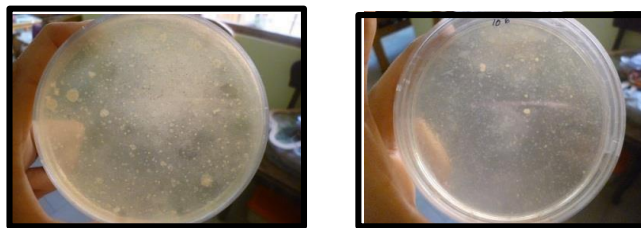


Figura 11: Punto de recolección de los suelos del tarwi

(Fuente: Elaboración Propia)

4.2 AISLAMIENTO Y SIEMBRA DE MICROORGANISMOS

Tras hacer las diluciones hasta 10^{-7} y utilizar las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} para sembrar en placas se observó que las más adecuadas eran las 10^{-5} , 10^{-6} puesto que en la última hubo muy poco crecimiento microbiano y en el 10^{-4} había exceso de cepas y no se podían identificar para aislarlos (Figura 12). Estas diluciones seleccionadas coinciden con estudios realizados por Huasasquiche (31), Salazar y otros, en donde aislaron bacterias rizosfericas a partir de diluciones 10^{-5} y 10^{-6} dándoles buenas cepas que fácilmente se identificaban y se extraían.

**Figura 12: Placas de disolución 10^{-5} , 10^{-6}** *(Fuente: Elaboración propia)*

4.3 CARACTERIZACION POR CAPACIDAD PGPR

4.3.1 Prueba de Producción de Ácido Indol Acético (AIA)

Una vez obtenida los resultados se observó que de los 14 microorganismos aislados (Anexo 10), solo 10 presentaron una concentración de valor 2 y 3 (Tabla 2), las cuales fueron consideradas para las siguientes pruebas.

Los resultados mostraron una alta cantidad de bacterias con capacidad de producir esta sustancia, sugiriendo que las condiciones de este campo o terreno son muy eficientes para una diversidad microbiana de este tipo. También vimos, que estos resultados coincidían con los de Huasasquiche (31) y Soler (87) los cuales encontraron microorganismo con un alto valor de producción de AIA presentando niveles 2 y 3, siendo en su mayoría organismos libres del genero *Bacillus*.

Finalmente, para facilitar los demás análisis faltantes, se les asigno nueva codificación a las cepas, que indica a la B de bacteria y la S del lugar de donde se extrajo que sería el suelo (Tabla 2).

Tabla 2: Cepas seleccionadas por producción de AIA

Aislado bacteriano	Código	Nivel Asignado
B-1.1	BS01	2
B-1.2	BS02	3
B-1.3	BS03	2
B-1.5	BS04	3
BC-01	BS05	2
BC-02	BS06	3
BC-04	BS07	3
BC-05	BS08	2
BC-08	BS09	2
TC-09	BS10	2

4.3.2 Solubilización de fosfato

Transcurrido el tiempo se revisó la presencia de halos en las diferentes placas. Observándose que de las 11 aisladas 6 presentaron halos alrededor de las colonias (Anexo 11), indicándonos su capacidad de transformar al fosforo a partir de fosfato tricalcico. Huasasquiche (31) y Patiño et el (88) llegaron a la conclusión de que las bacterias con esta capacidad en su mayoría provenían de suelo rizosfericas, esto debido a que en el suelo se encuentra mayor cantidad de fosfatos insolubles, obligando a las bacterias a utilizarlas esta fuente de nutrientes en las condiciones que normalmente se encuentran llegando a solubilizarlas para su sobrevivencia.

Las cepas alcanzaron un halo constante a los 13 días y los valores de IS se encontraron en un valor entre 2.6 y 3.5 (Tabla 2). Respecto a los resultados de IS encontrados en este trabajo comparados con los de Esquirol (89) difieren, ya que, los IS de su trabajo fueron entre 3.5- 4.5, y la constante de halo alcanzaron en 20 días; sin embargo, no se puede rechazar los datos obtenidos en esta investigación, porque, presentaron un aumento de halos cada día y una conservación en el tamaño de colonias, las cuales hubieran sido mayores si se hubiera incubado por más tiempo.

Tabla 3: IS en los aislados de bacterias para prueba de solubilización de fosfatos

Aislado bacteriano	DC	DH	IS
BS01	0.3	0.5	2.6
BS02	0,4	1.1	3.8
BS03	0.5	0.6	2.2
BS04	0.4	0.7	2.7
BS05	0.6	1	2.7
BS06	0.3	0.5	2.6
BS07	0.5	1	3
BS08	0.5	1.2	3.4
BS09	0.3	0.5	2.2
BS10	0.7	0.9	2.3

También se observó que las IS y el halo de solubilizarían presentaron relación directa, pues las cepas que obtuvieron un mayor halo como BS 02, BS 04, BS 06, BS 07, obtuvieron la mayor IS.

4.3.3 Fijación biológica de nitrógeno

Con respecto a la fijación biológica de nitrógeno. La cepa BS02, presenta una capacidad alta como fijadora biológica de nitrógeno (Figura 13). Pues en la placa de esta cepa se evidencio presencia de colonias blancas con bordes irregulares. Investigaciones como la de Liceta (90) y Huasasquiche (31) han descrito que las bacterias con esta capacidad son en su mayoría de vida libre, con la capacidad de catalizar el rompimiento de enlace de nitrógeno y activarlo para que se combine con hidrogeno u oxígeno.



Figura 13: Resultados del ensayo de fijación de nitrógeno. A) BC-6: Cepa bacteriana no fijadora; B) B-1.2; C) B-1.1: Cepas bacterianas muy fijadoras.

(Fuente: Elaboración propia)

4.3.4 Producción de sideróforos

De las cepas aisladas, todos resultaron positivos. Aunque hubo cepas que presentaron menor producción de sideróforos (Anexo 12), pero siendo en su minoría, ya que 8 de los aislados superaron sus valores de producción.

Tabla 4: ERP de sideróforos por los aislados rizosfericas del *Lupinus mutabilis* Sweet

Aislado bacteriano	DP	DB	ERP
BS01	3.4	1.5	226.7
BS02	2.8	1.3	215.4
BS03	2.1	1.6	131.3
BS04	5.0	2.5	200.0
BS05	2.9	1.2	241.7
BS06	5.0	2.3	217.4
BS07	3.9	1.1	354.5

BS08	3.4	1.3	261.5
BS09	1.8	1.1	163.6
BS10	1.1	0.7	157.1

* DP: diámetro de producción de sideróforos o halo, DB: diámetro crecimiento bacteriano

Aquellos que tenían alta producción presentaron valores entre 200 % - 350% (Tabla 4) y uno halos aproximados de 2 a 3 cm, siendo el BS07 el que presento el ERP mas alto con 354.5 y un halo de 3.9 cm ; comparado con otras investigaciones cuyas bacteria eran del suelo de tarwi (31) y bacteria endófitas de maíz (91) , siendo valores de 4 cm y 2.3, respectivamente, nuestro valor se encuentra en el intermedio , esto debido a que nuestro trabajo también usa bacterias rizosfericas y son pertenecientes a la familia *Bacillus*.

4.4 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Se realizó la caracterización morfológica a las 10 colonias seleccionadas luego de la prueba de producción de AIA. En la tabla 5 se muestra las características observadas a las 24 horas de incubación. La mayoría presenta coloración crema y margen ondulado.

Tabla 5: Caracterización macroscópica de las cepas aisladas de la rizosfera de tarwi

CODIGO	Forma	Elevación	Margen	Color
BS01	Irregular	Plano convexo	ondulado	Blanco
BS02	Irregular	Plano	ondulado	Crema
BS03	Irregular	Convexo	ondulado	Crema naranja
BS04	Circular	Plana	entero	Crema blanco
BS05	Irregular	Plano convexo	ondulado	Blanco
BS06	circular	Plano	entero	Crema blanco
BS07	Circular	Plano	entero	Blanco traslucido
BS08	circular	Plano convexo	ondulado	Crema blanco

BS09	circular	Elevado	entero	Blanco
BS10	Irregular	Plano	ondulado	Blanco

La caracterización microscópica se hizo a las 10 cepas: observándose que la mayoría fueron bacilos y cocobacilos. En la tabla 6 se muestra los resultados de las cepas seleccionadas.

Tabla 6: Caracterización microscópica de las bacterias rizosfericas del tarwi

CODIGO DE CEPAS	Tinción Gram	Forma
BS01	positiva	Diplobacilo
BS02	positiva	Bacilo
BS03	negativa	Bacilo
BS04	negativa	Cocobacilo
BS05	positiva	Bacilo
BS06	negativa	Diplobacilo
BS07	positiva	Diplobacilo
BS08	positivo	Bacilo
BS09	positivo	Cocobacilo
BS10	positiva	Bacilo

De la aplicación de las pruebas de tinción diferencial Gram se obtuvieron los siguientes resultados: 5 bacterias de forma de bacilos Gram positiva, 3 de forma diplobacilos (1 Gram negativa y 2 Gram positiva) y 1 de forma cocobacilo Gram negativa.

De las 10 se observó que 9 son de forma de bacilar y diplobacilo, predominando la presencia de bacilos Gram positivos, estos resultados concuerdan con las obtenidas por Huasasquiche (31) y Orberá (92) ya que del total de cepas aisladas la mayoría presentaba de forma bacilar y diplobacilar, además, de las 23 aisladas y 60 respectivamente, 22 y 58 fueron identificadas morfológicamente como parte del genero Bacillus las cuales fueron Gram positiva.

Al respecto O'Connor (93) menciona que esto puede deberse a que los Bacillus con forma de bacilo y diplobacilos, son los que abundan más en el planeta; ocupando el mayor porcentaje de la rizosfera aquellas Bacillus Gram Positivo.

Los resultados de la observación macroscópica y tinción Gram de las cepas bacterianas de detallan en el Anexo 13.

4.5 Integración de las capacidades promotoras de crecimiento vegetal

En la tabla 7 se resume los resultados de las cepas para las pruebas PGPR. Se consideró a la producción de AIA y solubilización de fosfato para la elección de cepas que serían caracterizadas de forma molecular. Para la producción de AIA se distinguió con una "x" en aquellas que tuvieron los mayores niveles de AIA, mientras que, en las pruebas de solubilización, se marcó con una "x" a las que resultaron positivas y presentaron mayor índice de solubilización, en la prueba de fijación de nitrógeno se consideró aquella que presento mayor fijación.

Tabla 7: Integración de los resultados en las pruebas PGPR

Aislados	Capacidad PGPR			
	Producción AIA	Fijación de Nitrógeno	Solubilización de fosfatos	Producción sideróforos
BS01		X	X	X
BS02	X	Mayor	Mayor IS	X
BS03				X
BS04	X		X	X
BS05	X		X	X
BS06				X
BS07	X		X	X
BS08			X	X
BS09				X
BS10		X	X	X

4.6 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

De los 10 aisladas bacterianos de suelo rizosfericas, en este trabajo se secuenciaron 7, siendo aquellos que dieron positivo a las tres primeras características PGPR.

Las secuencias corregidas y alineadas en formato FASTA se muestran en el Anexo 14.

La tabla 8 obtenida a partir de la purificación de la PCR y extracción de ADN bacterial de cada cepa, detalla las 6 bacterias identificadas.

Tabla 8: Identificación de bacterias mediante secuenciación genética

<i>Código de Secuencia</i>	<i>Código de microorg.</i>	<i>Vecino cercano</i>	<i>Max puntuación</i>	<i>Max Identidad %</i>	<i>Identidad final</i>
1T_27F	BS-04	Klebsella oxitoca (MT808551.1)	1733	100%	Klebsella oxitoca
2T_27F	BS- 01	Bacillus Subtilis (MF680182.1)		100%	Bacillus subtilis
3T_27F	BS- 02	Bacillus pumilus (MF680187.1)	1528	99.88%	Bacillus pumilus
4T_27F	BS- 05	Bacillus thuringensis	1580	100 %	Bacillus thuringensis
5T_27F	BS-06	Klebsella oxitoca (MT 808851.1)	1727	99.98%	Klebsella oxitoca
6T_27F	BS-07	Lysinobacillus Macroides (MK942418.1)	1531	99.52 %	Lysinobacillus Macroides
7T_27F	BS-08	Bacillus tropicus (CP 119875.1)	1602	99.54 %	Bacillus tropicus

Las especies encontradas en esta investigación fueron: *Klebsella oxitoca*, *Bacillus thuringensis*, *Bacillus Tropicus*, *Bacillus Subtilis*, *Bacillus Pumilus* y *Lysinobacillus Macroides*.

Las bacterias de este trabajo han sido reportadas en otros trabajos, como el de Huasasquiche (31), en su aislamiento de micro flora asociada al tarwi y Liceta (90), en sus aislados de la rizosfera de la quinua (las cuales reportaron especies de *Bacillus* y *Lysinobacillus*). De la Vega, (94) y Hernández (95) encontraron especies de *Klebsellas* y *Bacillus tropicus* en suelo de cultivos de maíz. Castañeda (47) y Díaz (96) aislaron especies de *Bacillus* en rizosfera de plantas aromáticas y de papa. Así mismo Romero et al. y De la Vega (97) (94) aislaron e identificaron *Bacillus thuringensis* y *Bacillus sp* en suelos de plátano y maíz.

Klebsella oxitoca presenta actividad promotora de crecimiento vegetal. Para ilustrar esta condición existen investigaciones donde la describen como una rizobacteria capaz de promover el crecimiento de plantas en condiciones extremas. Así mismo, otros estudios han demostrado la efectividad de esta bacteria en consorcio con *Bacillus* y *Pseudomonas* para proteger a la planta de enfermedades, mejorar su desarrollo y potenciar su producción agrícola. (52) (51)

Bacillus thuringensis es reportado como un alto solubilizador de fosfato, además, se ha reportado que al inocularse en plantas frutales como el plátano incrementan su protección contra agentes patógenos propios de la plántula (97) (94).

Bacillus tropicus es conocido por ser una bacteria PGPR tolerante a Pb y Cd por ello es usado para promocionar el crecimiento de aquellas plantas cultivada en suelos contaminados y así disminuir la presencia de metales pesados permitiendo el óptimo crecimiento vegetal y garantizando la seguridad alimentaria.

Lysinobacillus macroides fue encontrado en rizosfera de quinua y tarwi. Además, se ha reportado que la inocularse en plantas leguminosas se incrementó su altura y el peso seco de la planta como su longitud de inflorescencia. (31) (90)

Bacillus subtilis fue reportado como potencial biofertilizante, debido a su capacidad de solubilizar fosfato, producir sideróforos y fijar nitrógeno. Es utilizado en pesticidas por su actividad anti fúngica, también se le puede usar como suplemento para fortalecer el suelo de cultivo. (47)

Bacillus pumilus también ha sido reportado como potencial biofertilizante produciendo importantes mejoras en tarwi, tomate, plantas aromáticas, en caso de las plantas como pepino,

melón, estas bacterias han presentado una reducción memorable frente a diversas enfermedades que las atacaron. (46) (47)

4.7 PRUEBA DE ANTAGONISMO

Después de la identificación de las diferentes cepas, se les hizo las pruebas de antagonismo para observar el deterioro o muerte de un microorganismo por acción de otra.

En esta etapa se observó los siguientes comportamientos: la presencia de crecimiento de cepas sembrados en pozos sobre las cepas masivas, indicando una coexistencia entre ambas; presencia de halos de inhibición indicando que existe un efecto antagónico; una duda de antagonismo. Esto se representa en la tabla 9. En el anexo 15 se muestran los resultados observados en placas.

Tabla 9: Resultado de Pruebas de antagonismo de las cepas seleccionadas.

Cepas sembradas de forma masiva	Cepas sembradas en pozos						
	1	2	3	4	5	6	7
1. <i>Bacillus Subtilis</i>		-	-	+	+	-	+
2. <i>Bacillus Pumilus</i>	-		+	-	-	-	+/-
3. <i>Bacillus Thuringensis</i>	+	+		+	-	-	+
4. <i>Klebsella Oxitoca</i>	+/-	+/-	+		-	-	+/-
5. <i>Lysinobacillus</i>	-	+	-	-		+	+/-
6. <i>Bacillus tropicus</i>	-	-	-	-	+/-		+
7. <i>Klebsella oxitoca</i>	+	+/-	+	+/-	-	+/-	

* (+) Presencia de antagonismo; (-) Ausencia de antagonismo o coexistencia entra ambas; (+/-) Duda de antagonismo

En la tabla se observa que la cepa 1 cultivada de forma masiva es capaz de coexistir con las cepas 2, 3, 6, así como las cepas 6 y 2 masivamente son capaces de existir con la cepa 1. Por lo cual estas cepas forman un consorcio.

Otro consorcio fue formado por las cepas 1, 3 y 5, puesto que presentan coexistencia entre ellas tanto en su forma masiva como en pozos. Pero también se observa que la cepa 5 presenta ausencia de antagonismo frente a las cepas 6, 4 y 1, aunque la cepa 6 y 1 cultivados de forma

masiva no son capaces de coexistir con la cepa 5; por lo que estas cepas formaron dos grupos de consorcio, uno formado por la cepa 5 y 1, y otro consorcio formado por la cepa 5, 4 y 6.

Debido a que la cepa 7 presento dudas de antagonismo frente a las demás cepas se verifico su coexistencia mediante la observación en tinción Gram, cuyo resultaron reflejaron: Presencia de antagonismo: **Figura 14 AI:** cepa masiva 7 y cepas 2; **Figura 14 A II:** Cepa masiva 7- 4 en pozos; **Figura 14 B I:** cepa masiva 2 y cepas 7 en pozos; **Figura BII:** Cepa masiva 7. 6 en pozos, en este último si hubo coexistencia entre ambas bacterias.

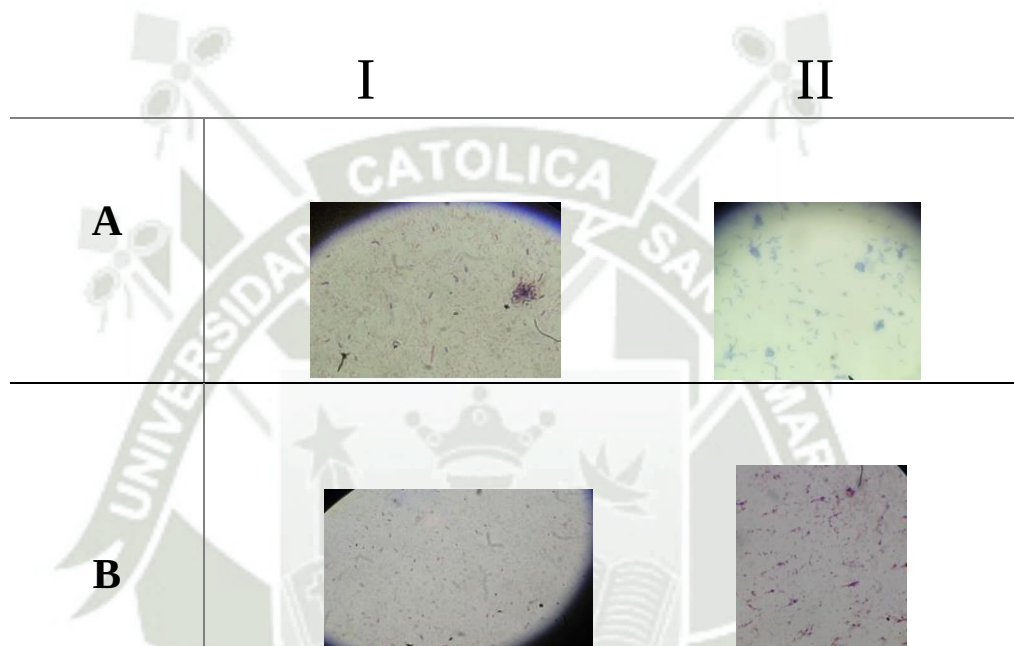


Figura 14: Tinción Gram realizadas a los pozos con consorcio 7

(Fuente: Elaboración Propia)

Finalmente, los consorcios formados fueron verificados mediante la tinción Gram donde los resultaron reflejaron la usencia de antagonismos (Anexo 16).

Otros de los resultados de las pruebas de antagonismos, fue que el *Bacillus pumilus* y *Bacillus subtilis* no presentaron antagonismo entre ellas, mientras, que frente al resto de las bacterias presentaron alta actividad antagónica, tal como los trabajos obtenidos por Stein (98) y O' Connor (93) donde explican que esta característica se debe a que estas bacterias poseen una actividad antimicrobiana haciéndolas masivas frente a otras bacterias y pudiendo coexistir entre ellas.

Mientras que el *Lysinobacillus* y *Bacillus Tropicus* no presentaron antagonismo con la mayoría de las bacterias estudiadas, además que tienen propiedades promotoras de crecimiento vegetal

e incrementan los niveles de N y P; es por eso que en este trabajo se tomó a todas las que coexistían con ellas, siendo una de ellas *la klebsella oxitoca*, la cual cuenta con propiedades de crecimiento y han sido utilizadas en biofertilizante comerciales combinadas con *Lactobacilos* y otras especies de *Bacillus*.

Finalmente se armaron cuatro consorcios en su mayoría formadas por *B. Tropicus*, *B. subtilis* y *Lysinobacillus macroide*. siendo el consorcio 1 formado por *B. subtilis*, *B. subtilis*; *B. tropicus*, *B. thuringensis*; Consorcio 2: *B. Subtilis*, *B. thuringensis*, *Lysinobacillus macroide*; Consorcio3: *Lysinobacillus macroide*, *B. subtilis*; Consorcio 4: *B. trpicus*, *Lysinobacillus macroide*, *Klebsella oxitoca*.

4.8 CONSTRUCCION DE CURVA DE CRECIMIENTO

Después de identificar y formar los consorcios; a continuación, se presentan los resultados obtenidos en las diferentes etapas para la construcción de la curva, descritas así: elaboración de los medios para fermentación; preparación del pre inculo y determinación de la cinética de crecimiento.

Preparación de los medios.

En la figura 15 se observa los tres medios: infusión suelo, BL y MMS preparados según la metodología anteriormente descrita en la metodología, mostrando tres diferentes colores como café, amarillo y transparente.



Figura 15: Medios preparados en este trabajo: Infusión suelo; LB; MMS

(Fuente: Elaboración Propia)

Preparación del pre inculo

Cada bacteria que formaban los consorcios fueron pre inoculados y mostraron un aspecto oscuro a comparación del color antes de la fermentación tal como muestra la figura 16. Este aspecto indicaba que hubo crecimiento bacterial.



**Figura 16: Aspecto del caldo nutritivo con los consorcios respectivos antes y después.
Medio inicial, Pre inculo**

(Fuente: Elaboración propia)

Determinación de la cinética de crecimiento por espectrofotometría

Después de ser inoculados en los diferentes medios ya preparados e incubados en agitación constante a 120RPM por 48 horas, se observó un cambio de color en estos medios, la infusión suelo inoculada con los 4 consorcios mostro un color café claro, el LB se volvió más opaco-blancuecino y el MMS mostro un aspecto blanco traslucido (Figura 16).

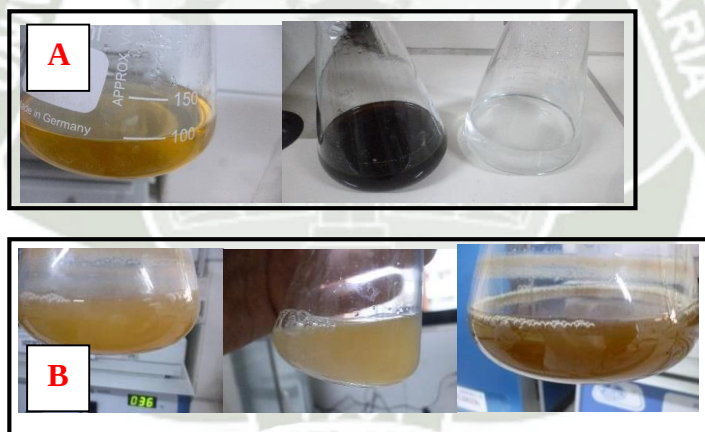


Figura 17: Aspecto de los medios con los consorcios

A) Medio LB, Inf. Suelo, MMS antes de la incubación; B) Medio LB, MMS; Inf. Suelo después de la incubación con color más opaco

(Fuente: Elaboración Propia)

Pasado los dos días (48 horas), se midió la absorbancia cada media hora durante 13 horas haciendo uso de un espectrofotómetro. Cada dato se colocó en un cuadro (Anexo 17) y se construyó las curvas cinéticas (Abs x tiempo).

Cada consorcio en cada medio mostro características diferentes, siendo: Figura 17A el consorcio 1 mostro un mayor crecimiento en las tres primeras horas en el medio infusión suelo al igual que en el medio LB, mientras que en el medio MMS no se presentó un crecimiento

notorio durante las trece horas de medición. Otra cosa que se observó fue que las bacterias tuvieron una alta velocidad de crecimiento y una baja velocidad de muerte en la infusión suelo y una alta velocidad de muerte en la LB; respecto a las fases de la curva de crecimiento en el medio LB e infusión suelo se observó las tres fases (fase de latencia, fase estacionaria y fase de muerte) ,presentando una fase estacionaria por mayor tiempo en la infusión suelo que n el medio LB, siendo este el medio donde en el número de bacteria permaneció constante por más horas. Por todo ello el mejor medio para el consorcio 1 fue la Inf. Suelo.

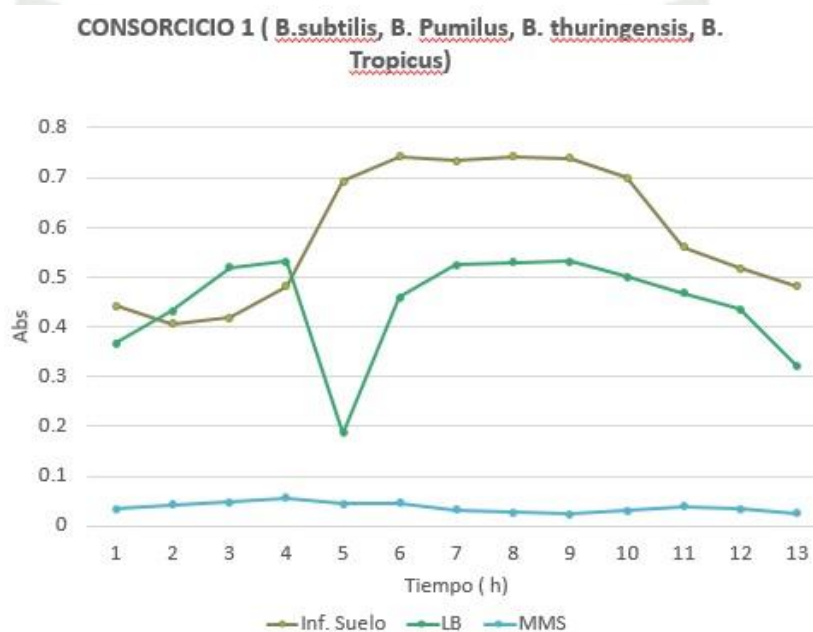


Figura 18 A: Curva de crecimiento del consorcio 1 en los tres diferentes medios.

En la figura 17 B, el consorcio 2 tuvo un mayor crecimiento en infusión suelo que en los demás medios. Respecto a las fases, en la infusión suelo tuvo una mayor fase estacionaria, teniendo una duración de cinco horas mientras que en la LB no presentó tal fase, siendo la hora 8 en donde llegando a su máxima absorbancia, así como empezó su decrecimiento de manera rápida. Frente al medio MMS, si presentó una actividad bacteriana, pero no siendo mayor a las mostradas por los otros dos medios, por lo que la mejor opción para este grupo de bacteria fue la infusión suelo.

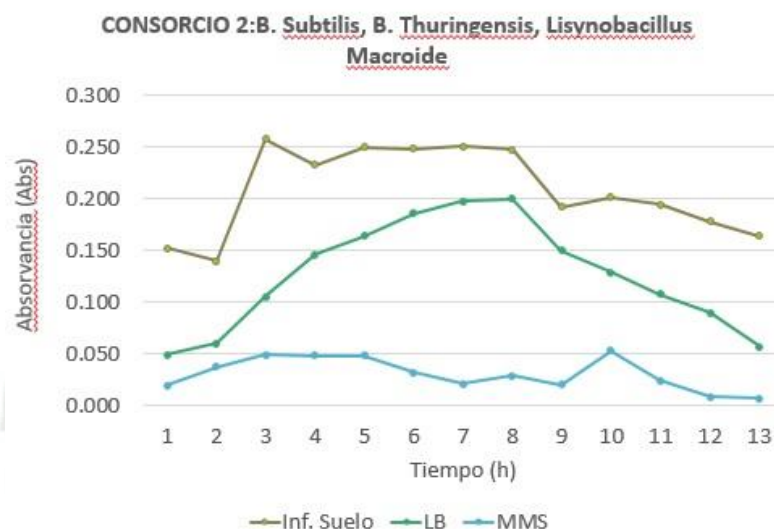


Figura 18 B: Curva de crecimiento del consorcio 2 en los tres diferentes medios.

La figura 17 C mostro un constante crecimiento, no mostro una caída de velocidad, de los cuatro consorcios este fue el que mantuvo una velocidad de crecimiento constante durante varias horas en la Infusión suelo y LB, sin embargo, cuando se midió la absorbancia en los diferentes medios, el grupo de bacteria presentes en el LB eran mayores al de la infusión suelo.

En la Figura 17 D: en el consorcio 4 hubo una mayor absorbancia en el medio LB y su velocidad de crecimiento fue constante, mientras que en el medio infusión suelo hubo un crecimiento de velocidad, pero no supero la de la LB además que su fase estacionaria duro muy poco tiempo siendo en la hora 9 donde su velocidad de crecimiento de las bacterias fue descendente y rápida.

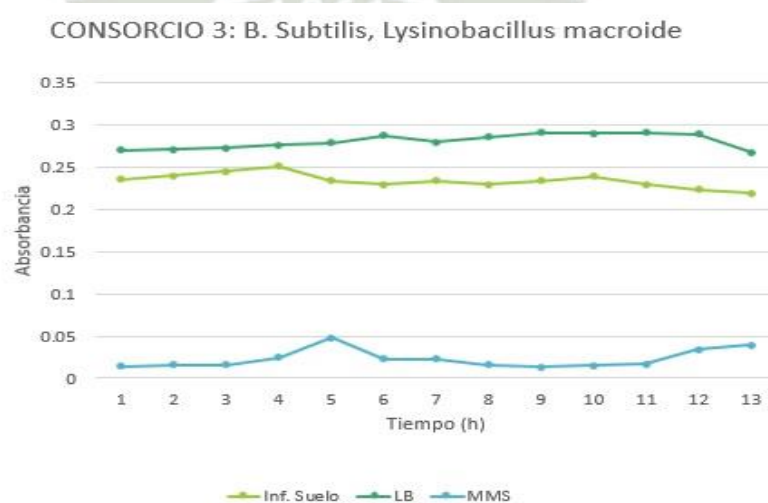


Figura 18 C: Curva de crecimiento del consorcio 3 frente a los tres medios de estudio

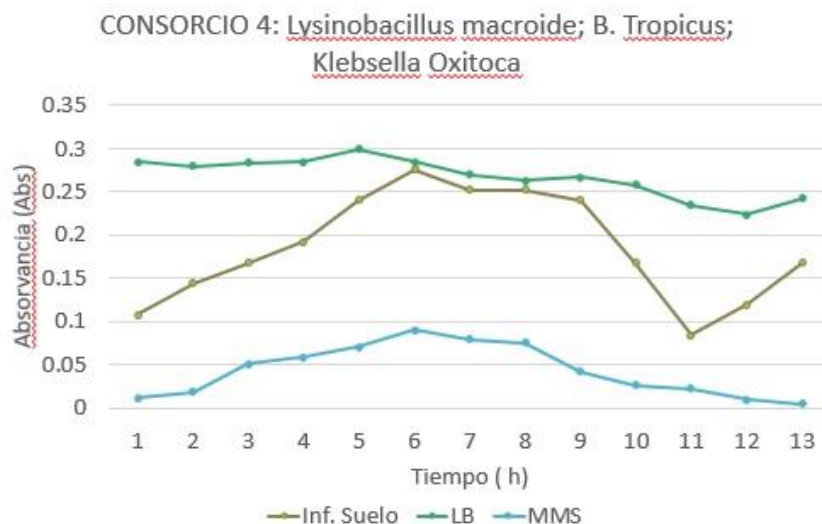


Figura 18 D: Curva de crecimiento del consorcio 4 frente a los tres medios de estudio

Debido a estos resultados se armó cuatro fertilizantes con dos tipos de medio: Sustrato 1F: consorcio 1- medio Infusión suelo; Sustrato 2F: consorcio 2- medio Infusión suelo; Sustrato 3F: consorcio 3- medio liquido LB; Sustrato 3F: Consorcio 4- medio LB.

De estos resultados también podemos indicar, que para las cepas de *Bacillus*, la infusión suelo parece proveer los nutrientes necesarios para su desarrollo, aunque hay estudios como el de Morales et al. (68) donde estas especies no crecen en infusión suelo debido a que carecen de algunas sustancias (vitaminas y carbohidratos). Pero al parecer la diferencia de estos resultados se debe al agregado de glucosa que se le hizo a la infusión y a la presencia de compuestos vegetales que no se cernieron en su totalidad, reponiendo esas deficiencias.

Si bien el medio LB es el medio más utilizado y apto para el crecimiento de *Bacillus ssp* (*Bacillus Subtilis*, *Pumilus*, *Thuringensis* y *tropicus*), también puede ser utilizado para *Lysinibacillus* y *klebsellas*, tal como demostró este trabajo; donde la presencia de elementos como la levadura y triptona que fueron muy bien procesados y absorbidos por las bacterias en más tiempo debido a sus resistencias, permitieron la prolongación de fase exponencial y producción de metabolitos.

El medio MMS a pesar de contener variedad de sustancias que les proporcionarían diversos nutrientes a las cepas, están no se multiplicaron, no presentaron un aumento de cepas o absorbancia, a diferencia del que obtuvo Castañeda y Sánchez (47) en donde al medir la absorbancia en el medio MMS se observó un crecimiento de las bacterias y al *Bacillus subtilis* presento una fase estacionaria más larga que las otras bacterias. Al parecer lo que llevo a esta

diferencia es el tiempo de fermentación, el tipo de bacterias y el consorcio, pues utilizo cuatro especies de *Bacillus* (*b. lichenofirmes*, *b. subtilis*, *b. pumilis* y *b. Cereus*) de forma individual y la medición la hizo después de 48 horas de fermentación.

4.8 FERMENTACIÓN DE LOS FERTILIZANTES A NIVEL DE MATRAZ

La fermentación en los matraces duro unas 10 horas, ya que entre la hora 8 y 9 los microorganismos llegaron a su máxima absorbancia, deteniendo ahí la evaluación (Figura 19).

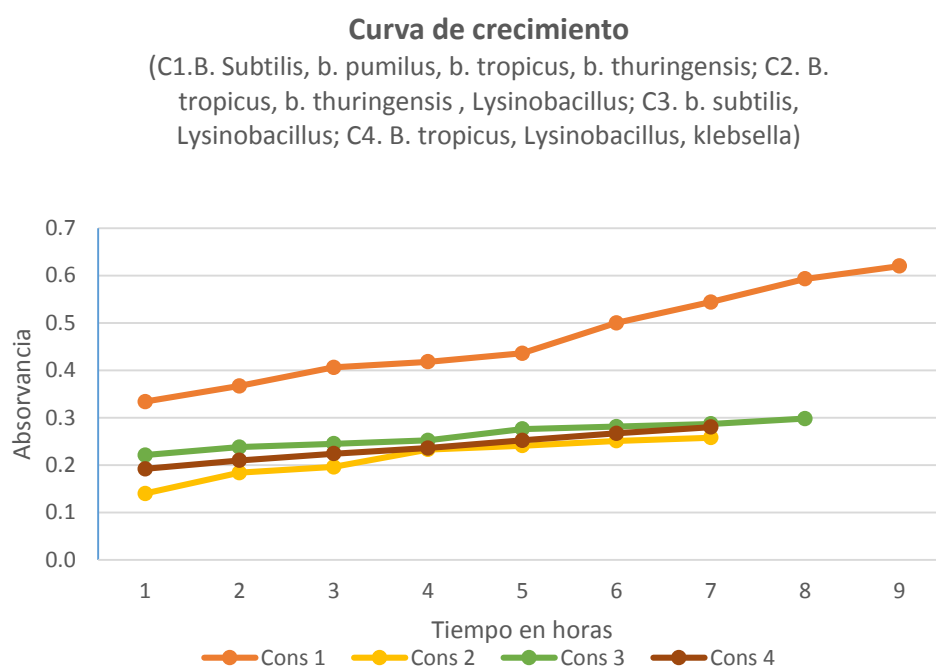


Figura 19: Curva de crecimiento bacteriano (Absorbancia vs Tiempo) para consorcio 1, 2, 3 y 4

(Fuente: Elaboración propia)

Respecto a la concentración, estos fueron determinados en laboratorio a través de los valores de absorbancia medidos al final del tiempo de máximo crecimiento de cada consorcio, tal como muestra la tabla 10.

Tabla 10: Concentración de biofertilizante mostrados la Absorbancia y concentración de cada consorcio

CONS. 1		CONS. 2		CONS. 3		CONS. 4	
Abs	UFC/ml	Abs	UFC/ml	Abs	UFC/ ml	Abs	UFC/ml
0.334	3.34E+08	0.140	1.40E+08	0.221	2.21E+08	0.192	1.92E+08
0.367	3.67E+08	0.184	1.84E+08	0.238	2.38E+08	0.210	2.10E+08
0.406	4.06E+08	0.196	1.96E+08	0.245	2.45E+08	0.224	2.24E+08
0.418	4.18E+08	0.233	2.33E+08	0.252	2.52E+08	0.236	2.36E+08
0.436	4.36E+08	0.241	2.41E+08	0.276	2.76E+08	0.252	2.52E+08
0.500	5.00E+08	0.251	2.51E+08	0.281	2.81E+08	0.267	2.67E+08
0.544	5.44E+08	0.258	2.58E+08	0.287	2.87E+08	0.280	2.80E+08
0.593	5.93E+08			0.298	2.98E+08		
0.620	6.20E+08						

4.9 EFECTO FERTILIZANTE

Los resultados del ensayo realizado en macetas, en cuanto a la longitud de tallo, longitud de raíz, color y numero de hojas en su desarrollo vegetativo inicial de la planta de la quinua se observa en los siguientes cuadros.

Tabla 11: Longitud de la planta por tres meses (cm)

TRATAMIENTO	1 ^{er} Mes	2 ^{do} Mes	3 ^{er} Mes	Análisis de varianza (Tukey)
Control	6	8	12	Ho : acepta
Fertilizante Químico	10	12	14.24	Ho : acepta
Consortio 1	6	10	12.32	Ho : acepta
Consortio 2	8	13.6	15	Ho : acepta
Consortio 3	10	12.15	14.45	Ho : acepta
Consortio 4	5	8	10.30	Ho : acepta

Los resultados obtenidos en la variable de longitud de tallo muestran que el consorcio 2 con valor 14 cm y el fertilizante químico con 14.25 son los de mayor longitud, coincidiendo con el

trabajo de O'Connor (93) donde los sustratos con *Bacillus* presentaron tallos más largos que los otros consorcios y que el mismo control. Sin embargo, el análisis de varianza de acuerdo al procedimiento alternativo de Tukey muestra que, entre los tratamientos, no hay diferencia significativa; aceptando la hipótesis nula H_0 , como se observa la tabla 11. (Anexo 19).

También se observó que los tratamientos que contenían *Lysinobacillos* eran los que presentaban un mejor crecimiento de tallo, siendo estas bacterias las más adecuadas para un incremento positivo y fortaleza del tallo, el cual es importante porque dependiendo de la capacidad de absorber los nutrientes en los primeros días va asegurar la resistencia y capacidad de aguantar un gran peso en el futuro.

Tabla 12: Numero de hojas en los tres primeros meses

TRATAMIENTO	1 ^{er} Mes	2 ^{do} Mes	3 ^{er} Mes	Análisis de varianza (tukey)
Control	2	15	28	H_0 : acepta
Fertilizante Químico	2	22	30	H_0 : acepta
Consorcio 1	2	16	21	H_0 : acepta
Consorcio 2	2	21	31	H_0 : acepta
Consorcio 3	2	20	31	H_0 : acepta
Consorcio 4	2	12	25	H_0 : acepta

Tabla 13: Color de hojas

TRATAMIENTOS	COLOR
Control	Verde claro
Fertilizante Químico Npk	Verde oscuro
Consorcio 1	Verde agrisado + morado
Consorcio 2	Verde oscuro + morado

Consorcio 3

Verde oscuro + morado

Consorcio 4

Verde agrisado

Los resultados obtenidos en la variable de número de hojas se ve que el tratamiento con el consorcio 1 presenta un bajo valor a comparación de los demás tratamientos; en el caso de consorcio 2 y consorcio 3 estos presentaron valores similares al del tratamiento con fertilizante químico; por lo que un fertilizante hecho a partir de bacterias de *B. Subtilis* y *lysino bacillus* serían un buen remplazante de los químicos, mejorando sus funciones primordiales (fotosíntesis, respiración y transpiración) de las plantas, asegurándose su desarrollo y permanencia de la quinua. Sin embargo, el análisis de varianza de acuerdo al procedimiento alternativo de Tukey muestra que, entre los tratamientos, no hay diferencia significativa; aceptando la hipótesis nula H_0 , tal como indica en la tabla 12 y Anexo 19.

En caso de los colores de la hoja se observó que la planta control presentaba un color verde claro a diferencia de los demás consorcios y del fertilizante químico, los cuales tenían un color verde oscuro. Ya que el color es una indicación de falta de nutrientes, los resultados indican la buena capacidad de nutrir el suelo y entregar a la planta los nutrientes requeridos que tiene estos consorcios, siendo, el consorcio 2 y 3 los que presentaron mejores resultados.

Tabla 14: Longitud de la raíz segundo y tercer mes (cm)

Tratamiento	Mes 2	Mes 3
Control	3	5
Fertilizante Químico	2.45	4
Consorcio 1	3	5
Consorcio 2	5	6.15
Consorcio 3	5.15	6.10
Consorcio 4	2.30	4.2

Los resultados obtenidos en las variables de longitud de raíz nos presentaron que el consorcio 2 y 3 aumentaron mucho su longitud en comparación al mes anterior, mientras que, en el tratamiento con fertilizante químico, control y con consorcio 4 sus valores no fueron tan significativos. León. M et al (99) en su trabajo con *Bacillus* obtuvo valores muy significativos en relación al tratamiento con fertilizante químico. Por lo que se concluiría que el género *Bacillus* con *Lysinobacillus* son una buena combinación y son las más utilizadas para absorber nutrientes como nitrógeno y fósforo del suelo. Sin embargo, el análisis de varianza de acuerdo al procedimiento alternativo de Tukey muestra que, entre los tratamientos, no hay diferencia significativa; aceptando la hipótesis nula H_0 , como se observa la tabla 11 y anexo 19.

Otra observación fue que las combinaciones entre estas bacterias son fundamentales para la planta ya que mientras mejor es la raíz mejor va ser la absorción del nitrógeno y del fósforo el cual se obtiene del suelo.

CONCLUSIONES

Conclusión 1

Esta tesis demostró que al someter a shock térmico el medio rizosfericas, hubo menos contaminación por hongos y paracitos, haciendo que solo sobrevivan aquellas bacterias resistentes a altas temperaturas.

También demostró que al hacer muchas diluciones la cantidad de cepas vistas en la placa eran menores permitiendo una mejor identificación y aislamiento.

Conclusión 2

Se observó en su mayoría bacteria Gram + en forma de bacilos, cuyos aspectos macroscópicos eran irregulares y blanquecinos en su mayoría, los cuales fueron cultivados en AN e incubadas por 24 horas. Así mismo se realizó las pruebas PGPR e identificación molecular donde se obtuvo microorganismos de la especie *Bacillus*, *Lysinobacillus* y *Klebsella*, siendo en su mayoría del genero *Bacillus*, los cuales, presentaron una alta capacidad de solubilizar fosfato.

Conclusión 3

Se logró estudiar la coexistencia de las diversas bacterias frente a otras mediante pruebas de antagonismo, mostrándonos que hay bacterias como el *B. Tropicus* y *Lysinobacillus* capaces de coexistir con la mayoría de las bacterias de estudio y entre ellas, por lo que, la mayoría de los consorcios tienen a una de estas o ambas. Por todo lo anterior, se respalda el uso de esta técnica para formar consorcios bacteriales.

Además, se reveló la importancia de la Tinción Gram para la verificación de lo observado en las placas y discos.

Conclusión 4

Se logró elegir el mejor medio para cada consorcio (Infusión suelo- consorcio 1 y 2; LB – Consorcio 3, 4), a pesar que algunos medios presentaron un aspecto opaco que no permitía medir la absorbancia, pero que, al hacer diluciones seriadas, se disminuyó la concentración de las cepas y pudo ser leído por el espectrofotómetro. Otra cosa que también se logro fue, conocer

qué bacterias aprovechan mejor los compuestos o características de los medios, siendo los *Lysinobacillus* las bacterias con mejor capacidad para procesar y aprovechar el medio.

Conclusión 5

En este trabajo se logró evaluar el efecto fertilizante en el desarrollo de la quinua, mostrando que las semillas inoculadas con bacterias *Bacillus* y *Lysinobacillus* tienen resultados similares al del fertilizante químico y son muy efectivas para el crecimiento de tallo, desarrollo de la raíz y producción de hojas en su primera etapa de desarrollo.



RECOMENDACIONES

- Armar consorcios que tengan *Lysinobacillus*, *Microrrizas* y *Lactobacillus*, a la vez evaluar la coexistencia entre ellas.
- Evaluar la fermentación de la *klebesella oxitoca* en medio LB e infusión suelo
- Evaluar el efecto fertilizante del *Lysinobacillus* y *Klebsella* en el crecimiento de otros cereales
- Desarrollar medios factibles y económicos para la fermentación de *Bacillus*.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. León Carrasco JC. Agraria.pe, Agencia agraria de Noticias. [Online].; 2020 [cited 2021 Noviembre 10. Available from: <https://agraria.pe/noticias/produccion-nacional-de-granos-andinos-crecio-45en-el-2019-21452>.
2. Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego. Nota técnica de Granos Andinos. Única ed. Reátegui JMA, editor. Lima: MINAGRI; 2018.
3. Pérez V. Declaración de Cotahuasi como reserva paisajista. Reserva Paisajista: Caños del Cotahuasi. 2013 Junio; 2.
4. Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego. Análisis de mercado, Tarwi. Única ed. MINAGRI, Sierra y Selva exportadora, editor. Lima: Unidad de inteligencia comercial; 2021
5. Carrillo E. Revisión del genero *Lupinus* en el Perú. Tesis doctoral. Arequipa: Universidad de San Agustín , Departamento de Ciencias; 1956.
6. Tapia M. El Tarwi, Lupino andino: tarwi, tauri o chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) Peruano FI, editor. Lima; 2015.
7. Jacobsen SE, Mujica A. El tarwi *Lupinus mutabilis* sweet) y sus parientes silvestres. In M. Moraes R., B. Øllgaard, L. P. Kvist, F. Borchsenius & H. Balslev, editor. Botánica Económica de los Andes Centrales. La Paz: Universidad Mayor de San Andrés; 2006. p. 458-482.
8. Rodríguez A. Evaluación "in vitro" de la actividad antibacteriana de los alcaloides del agua de desamargado del chocho (*Lupinus mutabilis* sweer). Tesis de grado. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Departamento de Ciencias; 2009. Report No.: biblio-996381.
9. Ortega ED, Rodriguez A, David A, Zamora A. Características de semillas de Lupino (*Lupinus Mutabilis* Sweet) sembrado en los andes de Colombia. Acta Agronómica. 2010 Enero; LIX(1).
10. Gutiérrez A, Infantes M, Pacual G, Zamora J. Evaluación de los factores en el desamargado de tarwi (*Lupinis Mutabilis* Sweet). Agroindustrial Science. 2016 Junio; II(6).
11. Chirinos M. Andean Lupini (*Lupinus Mutabilis* Sweet) a plant with nutraceutica and medical potential. Revista Bio Ciencias. 2015 Julio; III(3).

12. Camarena F, Huaranga A, Mostacero E, Jimenéz J. Revalorización de un cultivo subutilizado, chocho o tarwi, *Lupinus Mutabilis Sweet*. In CONCYTEC, editor. Lima: CONCYTEC; 2012.
13. Aquino V, Camarena F, Julca A, Jiménez J. Caracterización multivariada de fincas productoras de tarwi (*Lupinus Mutabilis Sweet*) del Valle del Mantaro. *Scientia Agropecuaria*. 2018 Diciembre; IX(2).
14. Tapia M, Fries AM. Tarwi. In C IR, editor. Guía de campo de los cultivos andinos. Lima: FAO y ANPE; 2007. p. 96-102.
15. Meneses R, Waijenberg H, Piérola L. Las leguminosas en la agricultura boliviana: Revisión de información. Ilustrada ed. Proyecto Rhizobiología Bolivia 1, editor.: Universidad de Texas; 2008.
16. Huanca M. Comportamiento de dos ecotipos de tarwi (*Lupinus Mutabilis Sweet*) bajo riego deficitario controlado y temperaturas bajas extremas en la estación experimental-Choqunaira- Viacha. Tesis de grado. La Paz: Universidad Mayor de San Andrés, Departamento de agronomía; 2018. Report No.: 123456789.
17. Spedding TA, Hamel C, Mehuys G, Madramotoo CA. Soil Microbial Dynamics in Maize-Growing Soil under different tillage and residue management systems. *Soil Biology & Biochemistry*. 2004 Octubre; XXXVI(3).
18. García D. La rizosfera de los cultivos: La clave oculta para el rendimiento sostenible de la agricultura. *Intagri*. 2017; Serie Suelos(32).
19. Rivera M, Wright E. Interacciones entre fitopatógenos y microorganismos benéficos en la rizosfera. *Asociación Argentina de Microbiología*. 2013 Octubre; I(1): p. 33-40.
20. Glick B. The Enhancement of Plant Growth by Free-Living Bacteria. *ResearchGate- Canadian Journal of Microbiology*. Reescrito 2012 Setiembre; 12.
21. Paco V, Guzman GD. effect of organic amendments on the microbial populations of the rhizosphere of quinoa cultivation (*Chenopodium quinoa Willd*) in the South Altiplano of Bolivia. *SciELO*. 2019; VII(1).
22. Cabrales E, Toro M, López D. Efecto de micorrizas nativas y fosforo en los rendimientos del maíz en Guárico, Venezuela. *Dialnet*. 2016 Diciembre; XXI(2).

23. Yzarra W, López F. Información complementaria. In Agricultura Md, Ambiente Md, editors. Manual de Observaciones fenológicas. Lima: Propia del Estado; 2011. p. 81-84.
24. Suca GR. Potencial del tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) como futura fuente proteica y avance de su desarrollo agroindustrial. Revista de Investigación UNMSM. 2015 Octubre; XVIII(2).
25. Cabrera JL, Muñoz H, Vélez JA. Evaluación de algunas propiedades químicas del suelo en un arreglo agroforestal *Morella pubescens* H.B.K y *Lupinus mutabilis* L. Pasto, Nariño. Agroforesteria Neotropical. 2014 Diciembre;(4).
26. Hudson BD. Soil organic matter and available water capacity. Journal of Soil and Water Conservation. 1994 Marzo-Abril; XLIX(2).
27. Spedding T, Hamel C, Mehuys G, Madramootoo C. Soil Microbial Dynamics in Maize-Growing Soil under Different Tillage and Residue Management Systems. Soil Biology & Biochemistry. 2004 Octubre; XXXVI(3).
28. Osorio N. A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake. Revista Facultad Nacional de Agronomía. 2007 Mayo; LX(1).
29. Moreno A, García V, Reyes J, Vásquez J, Cano P. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. Revista Colombiana de Biotecnología. 2018; XX(1).
30. Llanos M. Bacterias solubilizadores de fosfato del género *Bacillus* en suelos de la provincia de Collao (Puno) y su efecto en la germinación y crecimiento de quinua (*Chenopodium quinoa* Wild) en condiciones de invernadero. Tesis de grado. Puno: Universidad Nacional del Altiplano, Departamento de Ingenierías; 2017.
31. Huasasquiche L. Aislamiento y caracterización de la microflora asociada al cultivo de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). Tesis de grado. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina, Departamento de ingenierías; 2018.
32. Drew G. The roots of microbiology and the influence of Ferdinand Cohn on microbiology of the 19th century. FEMS Microbiology Reviews. 2000 Julio; XXIV(3).
33. Holt J, Krieg N, Sneath P, Staley J, William S. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. novena ed. LWW, editors. London: Springer; 2021.

34. Ash C, Farrow JA, Wallbanks S, Collins MD. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *sfam Society for applied microbiology*. 1991 Octubre; XIII(4).
35. Farrow J, Wallbanks S, Collins M. Phylogenetic Interrelationships of Round-Spore-Forming Bacilli Containing Cell Walls Based on Lysine and the Non-Spore-Forming Genera *Caryophanon*, *Exiguobacterium*, *Kurthia*, and *Planococcus*. *International Journal of Systematic and evolutionary microbiology*. 1994 Enero; XLIV(1).
36. Ash C, Priet F, Collins M. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1993 Setiembre; LXIV(1).
37. Shida O, Takagi H, Karowaki K, komagata K. Proposal for two new Genera, *Brevibacillus* gen.nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *Internacional Journal of Systematic Bacteriology*. 1996 Octubre; XLVI(4).
38. Wang L, Lee F, Tai C, Kasai H. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA–DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2007 Agosto; LVII(8).
39. Velázquez E, Rojas M, Lorite J, Zurdo J, Heydrich M, Bedmar E. Genetic diversity of endophytic bacteria which could be find in the apoplastic sap of the medullary parenchym of the stem of healthy sugarcane plants. *Journal of Basic Microbiology*. 2008 Marzo; XLVIII(2).
40. Reva O, Smirnov V, Pettersson B, Priest F. *Bacillus endophyticus* sp. nov., isolated from the inner tissues of cotton plants (*Gossypium* sp.). *International Journal of Sistematic and evolutionary microbiology*. 2002 Enero; LII(1).
41. Benedizi A, Peres D, Beschoren da Costa P, Bodanese M, Pereira L. Genetic and phenotypic diversity of plant-growth-promoting bacilli isolated from wheat fields in southern Brazil. *Research in microbiology*. 2008 Mayo; CLIX(4).
42. Hernandez A, Caballero A, Pazos M, Ramírez R, Hydrich M. Identificación de algunos géneros microbianos asociados al cultivo de maíz (*Zea mays* L.) en diferentes suelos de Cuba. *Revista colombiana de Biotecnología*. 2003 Julio; V(1).

43. Veléz P, Meneses L, Zuñiga D. Estudio de las poblaciones microbianas de la rizosfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas alto andinas. *Ecología Aplicada*. 2008 Enero / Diciembre; VII(1-2).
44. Tejera B, Heydhich M, Rojas M. Aislamiento de *Bacillus* solubilizadores de fosfato asociados al cultivo de arroz. *Agronomía Mesoamericana*. 2013 Julio/ Diciembre; XXIV(2).
45. Cuervo J. Aislamiento y caracterización de *bacillus* spp. como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfato en dos muestras de biofertilizante comerciales. Tesis de Grado. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana, departamento de Ciencias; 2010.
46. Corrales L, Sánchez L, Arévalo Z, Moreno V. *Bacillus*: género bacteriano que demuestra ser importante solubilizador de fosfato. *ResearchGate*. 2014 Diciembre; XII(22).
47. Castañeda E, Sánchez L. Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus* sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *ResearchGate*. 2016 Diciembre; XIV(26).
48. Romero JL, Canales E, Meneses P, Herbozo S. Aislamiento e identificación de *Bacillus Thuringiensis* en cultivos de plátano, para la producción de bioinsecticidas. *ResearchGate*. 2017 Marzo; VI(1).
49. Mehta P, Chauhan A, Mahajan R, Mahajan P, shirkot C. Strain of *Bacillus circulans* isolated from apple rhizosphere showing plant growth promoting potential. *Current Science*. 2010 Febrero; XCVIII(4).
50. Ramírez I. Aislamiento y caracterización fenotípica y molecular de cepas nativas de *Bacillus thuringensis* aisladas de ecoregiones de la costa del Perú con actividad larvicida para *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L). Tesis de grado. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Departamento de Biología; 2019.
51. Rosete M, Quintero V, Morales Y, Rodríguez O, Rivera A. La personalidad multifacética del género *Klebsella*: El bueno, el malo y el feo. *Zenodo*. 2019 Octubre; I(3).
52. Lutfu M, Evans H, Seidler R. Characteristics of nitrogen-fixing *Klebsiella oxytoca* isolated from wheat roots. *Plant and Soil*. 1981 (2010) Febrero; LXVI(1-2).

53. Patten C, Glick B. The Role of Bacterial Indoleacetic Acid in the Development of the Host Plant Root System. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002 Agosto; LXVIII(8).
54. Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y. Plant growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2003 Junio; XXII(2).
55. Cattelan A J, Hartel P G, Furhmann J. Screening for plant growth rhizobacteria to Promote early soybean growth. *Soil Science Society of America Journal*. 1999 Noviembre; LXIII(6).
56. Pal K K, Tilak K V, Saxena A K, Dey R, Singh C S. Suppression of maize root disease caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium germinearum* by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*. 2001; CLVI(3).
57. Mamaní E, Morales V, Ortuño N. Aplicación de biofertilizante foliares en el cultivar Huaycha (*Solanum*. *Revista Latinoamericana de la Papa*. 2016 Diciembre; XX(2).
58. Barreiro L, Gamboa J, Pueyo JP, Temporín F, Vasquez P. Producción de Biogas y biofertilizante a partir de estiércol bovino. Única ed. Piedrafita D, Goñi A, editors. San Rafael: Grupo BIOEMIA.
59. Tovar L. Intagri.com. [Online].; 2013 [cited 2021 Mayo 12. Available from: <https://www.intagri.com/articulos/agricultura-organica/Preparados-de-plantas-y-minerales-para-el-manejo-de-plagas-y-enfermedades>.
60. Gómez TL. Preparados de Plantas y Minerales para el Manejo de Plagas y Enfermedades en la Agricultura Ecológica. *Artículos Técnicos*. 2017; Serie Agricultura Orgánica(13).
61. Rivera W. Control biológico como experiencia de sostenibilidad local en la agricultura centroamericana. *Revista Tecnológica en Marcha*. 2016 Octubre; Edición Especial Biocontrol (29).
62. Roa B, Pérez S, Reyes JP, Caro D. Producción de un inoculante a base de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Dialnet*. 2011 Diciembre; XVI(2).

63. Bach C, Yang J, Larsson H, Stocks S, Gernaey K, Albaek M, et al. Evaluation of mixing and mass transfer in a stirred pilot scale bioreactor utilizing CFD. Chemical Engineering Science. 2017 Noviembre; CLXXI(2).
64. Camelo M, Moreno A, Romero F, Bonilla R. Development of a liquid fermentation system and encystment for a nitrogen-fixing bacterium strain having biofertilizer potential. Rev Argent Microbiol. 2017 Julio- Setiembre; XLIX(3).
65. Stanbury P, Whitaker A, Hall S. Principles of Fermentation Technology. Segunda ed. Gran Bretaña: Butterworth Heinemann; Reprinted 2003.
66. Jacques P, Hbid C, Destain J, Razafingralambo H. Optimization of Biosurfactant Lipopeptide Production from Bacillus subtilis S499 by Plackett-Burman Design. Applied Biochemistry and Biotechnology. 1999 Marzo; LXXVII(1).
67. Waites M, Morgan N, Rockey J, Highton G. Industrial Microbiology: An Introduction. Primera ed. Osney Mead OOO, editor. London: Blakwell Science; 2001.
68. Morales I, Miranda G, Méndez V, Morales C. Producción in situ de biofertilizante para el cultivo de quinua. Fundación PIEB. 2011 Julio; I(1).
69. León L, Luis R. Determinación del potencial promotor del crecimiento vegetal de Azotobacter spp. aislados de la rizósfera de malezas en cultivos de maíz (Zea mays L.). Scientia Agropecuaria. 2015 Octubre; VI(4).
70. Aquilanti L, Favilli F, Clementi F. Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of Azotobacter from soil samples. Soil Biology and Biochemistry. 2004 Setiembre; XXXVI(9).
71. Vásquez A. Producción de Xilasas por aspergillus sp. en fermentación sumergida y fermentación en medio sólido. Tesis de maestría. Ciudad de México: Universidad Iberoamericana, Departamento de química; 2013.
72. Bravo I, Marquinez L, Potosi S. Fraccionamiento del fosforo y correlación con la materia orgánica en dos suelos del departamento del cauca. Suelos Ecuatorianos. 2007; XXXVII(2).
73. Fernández O, Cejas A, Márquez ME. Influencia del medio de cultivo, el tipo de inóculo y las condiciones de agitación- aireación en la reproducción de dos cepas de Bacillus thuringiensis (Berl.). en fermentadores de diferentes volúmenes. Fito sanidad. 2009 Setiembre; XIII(3).

74. Vargas-Hoyo H, Glichrist E. Producción de enzimas hidrolíticas y actividad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre dos cepas de *Fusarium* aisladas de cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*). *Revista Mexicana de Micología*. 2015; 42.
75. Ministros Pdcd. Observatorio Ceplan. [Online].; 2022 [cited 2023 Marzo 11. Available from: https://observatorio.ceplan.gob.pe/ficha/o11_2022.
76. Perú BcdRd. BCRP. [Online].; 2022 [cited 2023 Marzo 11. Available from: <https://www.bcrp.gob.pe/docs/Publicaciones/Reporte-Inflacion/2022/junio/ri-junio-2022-recuadro-7.pdf>.
77. Mora S, Cuaical E, García JRV, Puetate LM, Aguila E, Ruiz M. Biofertilización con bacterias solubilizadoras de fósforo y hongos micorrízicos arbusculares en el cultivo de la papa. *Cultivos tropicales*. 2021 Enero; XLII(2).
78. Bonifacio A. Mejoramiento de la quinua (*Chenopodium quinoa* Wild.) y cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) en un contexto de cambio climático en los Andes altos. *Ciencias e Investigación Agraria*. 2019 Junio; XLVI(2).
79. Zurita A, Jacobsen S, Razzaghi F, Alvarez R, Ruiz K, Morales A, et al. Respuestas a la sequía y adaptación de la Quinoa. Unica ed. Bazile D, Bertero D, Nieto C, editors. Santiago de Chile: FAO, CIRAD; 2014.
80. Ccoyllar KZA, Lozano A, Cornejo J. Vulnerability of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) to environmental stress events in the high Andean regions of Peru. *Ciencia Agropecuaria*. 2001 Octubre. Diciembre; XII(4).
81. Gómez L, Aguilar E. Guía de cultivo de la quinua. Segunda ed. Molina UNAL, editor. Lima: FAO, Universidad Agraria Nacional Agraria La Molina; 2016.
82. Jacobsen S, Monteros C, Corcuera L, Bravo L, Chistiansen J, Mijica A. Frost resistance mechanisms in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *European Journal of Agronomy*. 2007 Mayo; XXVI(4).
83. Celaya H, Castellano A. Mineralización de nitrógeno en el suelo de zona árida y semiáridas. *Terra Latinoamericana*. 2011 Marzo; XXIX(3).
84. Miranda R, Carlesso R, Huanca M, Mamani P, Borda A. Rendimiento y acumulación de nitrógeno en la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) producida con estiércol y riego suplementario. *Venezuela*. 2012 Mayo; XX(1).

85. MINAGRI. La quinua: Producción y comercio del Perú. Boletín. Lima: Ministerio de Agricultura y Riego; 2017.
86. MAXIMIXE. Alerta Económica. [Online].; 2019 [cited 2022 Junio 28. Available from: <https://alertaeconomica.com/produccion-de-quinua-crecera-99-en-2019>.
87. Soler J, Posada L F. Distribución diferencial de bacterias con potencial biocontrolador de *Spongospora* subterránea en plantas de papa (*Solanum tuberosum* cv. Diacol Capiro). Revista Facultad Nacional de Agronomía. 2012; LXV(1).
88. Patiño C, Sanchez M. Aislamiento e Identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos habitantes de la rizosfera de chontaduro. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 2012; X(2).
89. Lara C, Esquivel L, Negrete J. Bacterias nativas solubilizadores de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de Córdoba- Colombia. Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial. 2011; IX(2).
90. Liceta M. 2015. Aislamiento y caracterización de *Pseudomonas* y *Bacillus* provenientes de la rizosfera de diferentes variedades de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y su uso como potenciales promotores del crecimiento vegetal. Tesis doctoral. Lima: Universidad Agraria La Molina, departamento de Biología; 2015. Report No.: 20.500.12996/2690.
91. Carcaño M, Ferrera R, Pérez J, Molina J, Bashan Y. Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y. Terra Latinoamericana. 2006; XXIV(4).
92. Orberá T, Gonzales Z, Pérez I. Aislamiento de cepas del genero *Bacillus* sp con potencialidades para la bioprotección y la estimulación del crecimiento vegetal. Revista Cubana de Química. 2005; XVII(1).
93. O'Connor J. Descifrando el contenido microbiano de bioinsumos comerciales para el diseño de un consorcio con potencial biofertilizante. Tesis de Maestría. Managua: Universidad Nacional de Ingenierías, Departamento de biotecnología; 2019.
94. De la Vega P. Distribución, caracterización e importancia ecológica de *Micromonospora* en nódulos fijadores de nitrógeno de *Lupinus*. Tesis Ph. D. Salamanca: Universidad de Salamanca, Departamento de biotecnología; 2010.

95. Hernández A. (2002). Obtención de un biopreparado a partir de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz (*Zea Mays* L.) Tesis de doctorado. Universidad de La Habana, La Habana, Cuba. Tesis Doctoral. La Habana, Cuba: Universidad de La Habana, Departamento de biología; 2002.
96. Díaz Y. *Bacillus* spp y *Trichoderma* spp de la rizosfera de cafeto con potencial antagonista frente a *Fusarium oxysporum* del valle de Monzón- Huánuco- Perú. Tesis Profesional. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos , Departamento de Biología; 2019.
97. Romero J, Canales E, Meneses P, Herbozo S. Aislamiento e identificación de *Bacillus Thuringiensis* en cultivos de plátano, para la producción de bioinsecticidas. *Revista de Investigación Científica*. 2017; VI(1).
98. Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*. 2005; LVI(4).
99. León M, Mancilla j, Ortuño F. Evaluación de bacterias endófitas promotoras de crecimiento en el cultivo de quinua. *Journal of the Selva Andina Biosphere*. 2019; VII(2).
100. Ochoa, Y. Estudio de la función de las bacterias PGPR en el desarrollo de la trufa. Tesis de licenciatura. España: Universidad Zaragoza, Departamento de Ciencia y tecnología alimentaria; 2022.

ANEXOS

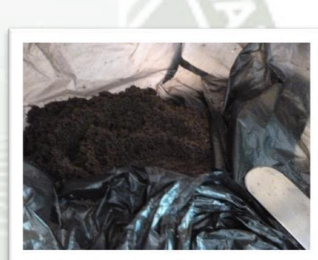
Anexo 1

IMAGEN DE RECOLECCION DE MUESTRAS



Anexo 2:

AISLAMIENTO Y SHOCK TÉRMICO



Tamizado de la muestra de suelo en el local de la universidad



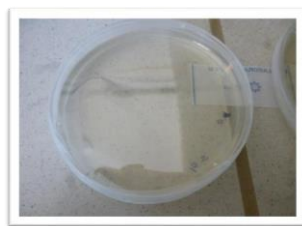
Muestra con NaCl 85%



*Suelo Agrícola con
Shock térmico a*

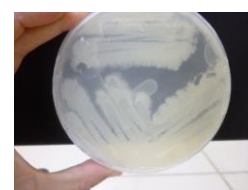
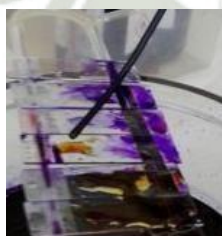


*Disolución seriada
hasta 10^{-7}*



Placa con AN donde se colocó la disolución 10^{-6}

Anexo 3: TINCION GRAM Y CULTIVO DE CEPAS



Anexo 4: MEDIO PARA MEDIR AIA

MEDIO MINIMO DE SALES DF Suplementado con Triptófano (1L)		
(NH ₄) SO ₄	2.00	g
KH ₂ PO ₄	4.00	g
Na ₂ HPO ₄	6.00	g
MgSO ₄ + 7H ₂ O	0.200	g
FeSO ₄ + 7H ₂ O	0.001	g
H ₃ BO ₃	10.00	ug
MnSO ₄	10.00	ug
ZnSO ₄	70.00	ug
CuSO ₄	50.00	ug
MoO ₃	10.00	ug
Triptófano	0.500	ug
Agua destilada	1000	ml

Reactivo de Salkowski (1 L)		
FeCl ₃	12,00	g
H ₂ SO ₄	7,9	M
Agua destilada	1L	

Anexo 5: MEDIO PARA EVALUAR EL NITROGENO

MEDIO Nfb (1L)		
Ácido Metálico	3.00	g
Glucosa	2.00	g
NaCl	0,100	g
KH ₂ PO ₄	0.500	g
MgSO ₄ + 7H ₂ O	0.200	g

CaCl ₂ 2H ₂ O	0.200 g
EDTA-Fe, Sol 1,64%	4 ml
Azul de bromotimol, sol 0,5% en KOH 0,2N	2 ml
Solución de micronutrientes	2 ml
Solución de vitaminas	1 ml
Agar	15.00 g
Agua destilada	1 L

Anexo 6: MEDIO PARA EVALUACION DE SIDEROFOROS

Agar O-CAS (1L)	
CAS	60,50 mg
HDTMA	72,90 mg
PIPES	30,24 mg
FeCl ₃ + 6H ₂ O Sol 1mM en 10mM HCl	10 ml
Agar	9, 00 g
Agua destilada	1 L
Ajustar a pH 6,8	

Anexo 7: MEDIOS FERMENTADORES

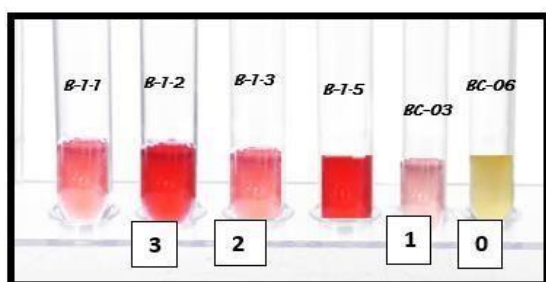
MMS 1L	
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.2 g
CaCl ₂ 7H ₂ O	0.1 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.1 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.01 g
K ₂ HPO ₄	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.1 g
Agua destilada	1000 ml
Ajustar a pH	6.0

Caldo LB (1 litro)	
Tryptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua destilada	1000 ml

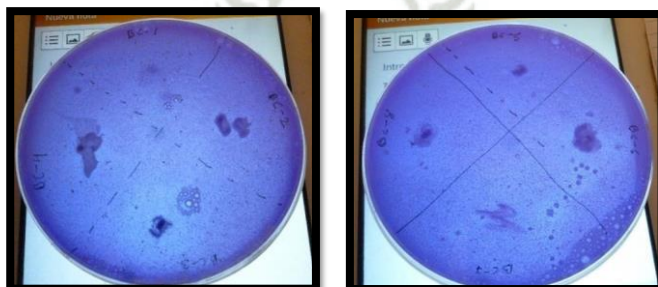
Anexo 9: CAMPOS PARA RECOLECCIÓN DE MUESTRA



Anexo 10. Prueba de AIA con diferentes niveles



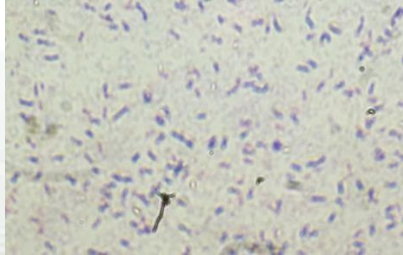
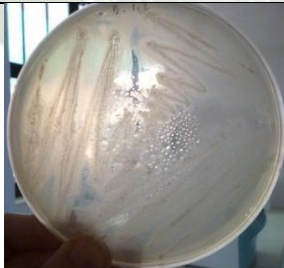
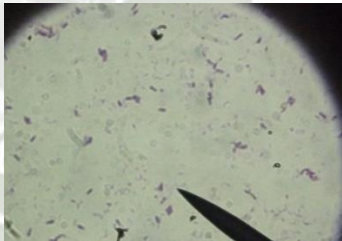
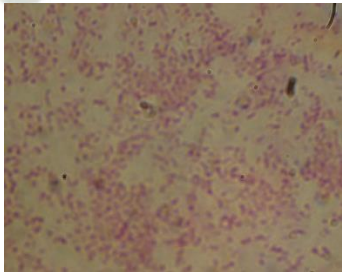
Anexo 11. OBSERVACIÓN DE SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATO DE LOS AISLADOS BACTERIANOS DEL SUELO DE TARWI

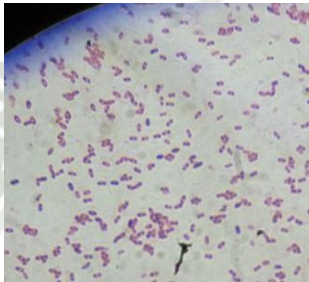
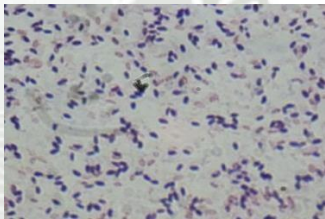
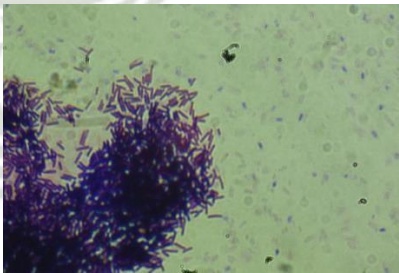
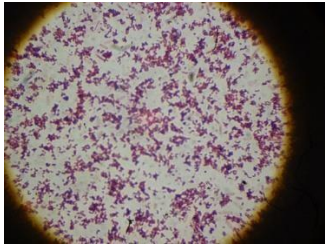


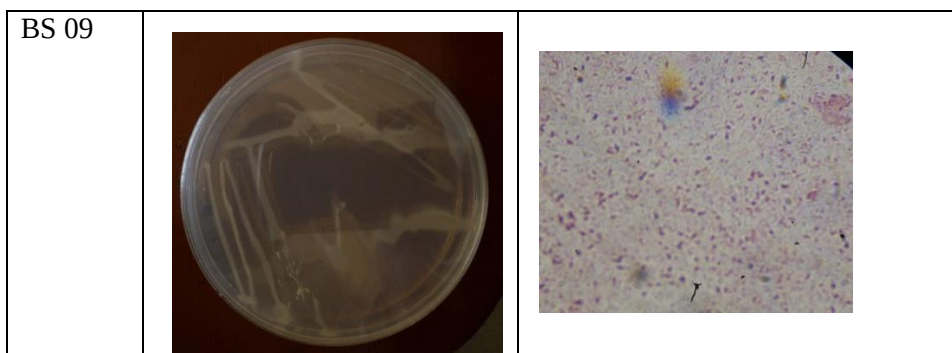
Anexo 12: OBSERVACIÓN DE PRESENCIA DE SIDEROFOROS EN PLACAS



Anexo 13: OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA Y TINCIÓN GRAM

CODIGO	VISTA MACROSCOPICA	MICROSCOPICA
BS 01		
BS 02		
BS 04		

BS- 05		
BS 06		
BS 07		
BS 08		
BC-06		



Anexo 14: SECUENCIAS CORREGIDAS Y ALINEADAS EN FORMATO FASTA

>1T_27F Secuencia 1 Cepa BS 04 (*Klebsella oxitoca*)

```
GCAGTCGAACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGA
CGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGG
AAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTT
CGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGG
GTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCA
GCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTAT
GAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGATA
AGGTTAATAACCTTGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTA
ACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA
ATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAA
TCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTCGAAACTGGCAGGCTGGAGTCT
TGTAAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCT
GGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCA
GGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
CTGTAAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGG
AGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAA
CAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGAA
TTCGATGCAACGCGATACCTACTCTTGACAT
```


>2T_27F **Secuencia 2, Cepa BS 01 (*Bacillus subtilis*)**

TGGGGCCTTGCCCTAATACTGGCAAGTTCGAGCCGACAGAATGGG
AGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG
GTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAAT
ACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTT
CGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGA
GGTAATGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTG
ATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGC
CGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGA
AGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCA
GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG-CCGCGGTAATACGTAGGT
GGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGG-CGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTT
TCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGGCTCAACCCGGGGAG

>3T_27F **Secuencia 3, Cepa BS 02 (*Bacillus pumilus*)**

CGCCCGGGTGAGTAACACGTAGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATA
ACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGG
TTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCC
GCGGCGCATTATCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACG
ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA
TACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCG
CAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA
AGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGA
GAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCT
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTC
CGGAATTATTGGGCGTAAAGGGGTTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGA
TGTGAAAGCCCCCGGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGG
AAACTTGAGTGACAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTC
TGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGGAGCGAACA
GGATTAGATACCCTTGGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAA
GTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCA

CTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAGGACTGAAACTCAAAGAAACGCG
AAGAACCTTTACCCAGGTCCTTGACATCCTCTGACAACCC

>4T_27F **Secuencia 4 Cepa BS 05 (Bacillus Thuringensis)**

TTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATAAGACTGG
GATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGGGTAACGGCTCACCAAG
GCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTG
AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCA
ATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTT
CGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAG
CTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC
CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTA
TTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
CACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCA
GAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATA
TGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACAC
TGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCT
TTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG
CCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGT
GGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTT
GACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAG
TGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTT
AAGTCCCGCAACGAGCGC

>5T_27F **Secuencia 5 Cepa BS 06 (klebsella oxitoca)**

GCAGTCGAACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGA
CGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGG
AAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTT
CGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGG
GTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCA
GCCCACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG

GGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTAT
GAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGATA
AGGTTAATAACCTTGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTA
ACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA
ATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAA
TCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTGGAGTCT
TGTAGAGGGGGGTAGAAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCT
GGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCA
GGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
CTGTAAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGG
AGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAA
CAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGAA
TTCGATGCAACGCGATACCTACTCTTGACAT

>6T_27F **Secuencia 6 Cepa BS 07 (*lysinobacillus macriodes*)**

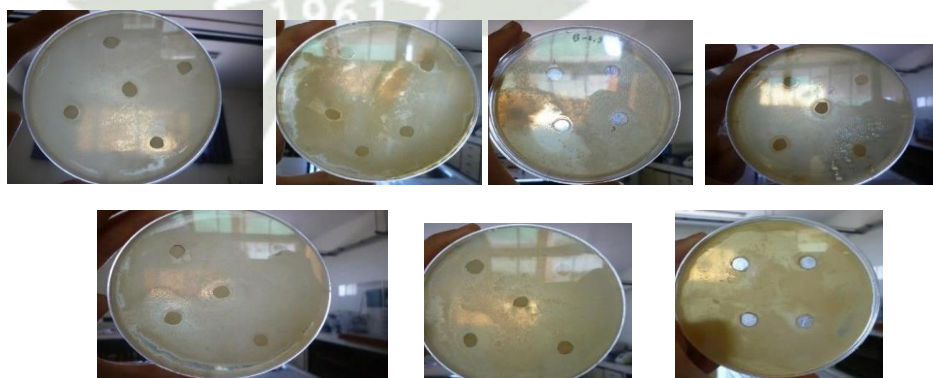
GCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGC
AACCTACCCTATAGTCTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCG
AATAATCTCTTTTGCTTCATGGTGAAAGACTGAAAGACGGTTTCGGCTGT
CCCTATAGGATGGGCCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC
TCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACA
CTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
ATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTTATGGAGCAACGCCGCGTGAGTG
AAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTAC
AGTAGTAAGTGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTA
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGG
AATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTTAAGTCTGATGT
GAAAGCCCACGGCTCAACCGTGAGGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTG
AGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCGAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
AGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTGA
CGCTGAGGCGCGttAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGAGTaaGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCC
CCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTC
GCAAGACTGAAACTC

>7T_27F **Secuencia 7 Cepa BS 08 (*Bacillus tropicus*)**

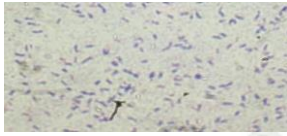
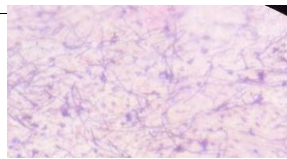
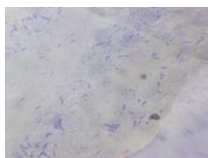
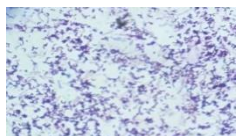
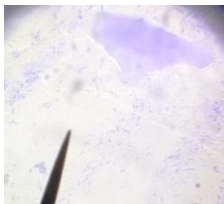
GAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACG
TGGGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAAT
ACCGGATAACATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGGCTTCGG
CTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAC
GGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA
TCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA
AGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTT
GAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTA
TTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC
ACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAA
GAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAG
GAACACCAGTGGCGCTTTCTGGTCTGTAACTGACACTGAGGCG
CGAAAGCGGCAAACAAATACCCTGGTAGTAGCGTCGAGTG
CTAAGTGAGACCCTTTAGTGCTGATAACGCAAAGACTCGGGAGTACCT
AATTGACGGGGGCCAAAGC

Anexo 15:

PRUEBA DE ANTAGONISMO



Anexo 16: TINCIONES DE GRAM REALIZADAS PARA EVIDENCIAR LOS COMPORTAMIENTOS OBSERVADOS EN LAS PRUEBAS DE ANTAGONISMO.

MEDIOS	VISION MICROSCOPICA
I cepa 1 masiva cepa 2 en disco	
II cepa 1 masiva- cepa 3 en disco	
III cepa 1 masiva- cepa 6 en disco	
IV cepa 6 masiva- cepa 3 en disco	
VI Cepa 5 masiva- Cepa 1 en disco	
VI <i>Cepa 2 masiva - Cepa 3 en disco</i>	

Anexo17: DATOS DE ABSORBANCIA MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA.

Consorcio 1 (*B. subtilis*, *B. Pumilus*, *B. Thuringensi*, *B. Tropicus*)

TIEMPO	SUSTRATOS		
	Inf. Suelo	LB	MMS
1	0.443	0.367	0.034
2	0.406	0.432	0.043
3	0.418	0.52	0.048
4	0.482	0.531	0.056
5	0.693	0.187	0.044
6	0.743	0.460	0.046
7	0.733	0.525	0.032
8	0.742	0.529	0.028
9	0.739	0.531	0.024
10	0.700	0.500	0.030
11	0.560	0.468	0.040
12	0.518	0.436	0.034
13	0.481	0.321	0.026

Consorcio 2 (*B. subtilis*, *B. thuringensis*, *Lysinobacillus macroide*)

TIEMPO	Inf. Suelo	LB	MMS
1	0.153	0.049	0.019
2	0.140	0.060	0.037
3	0.258	0.105	0.049
4	0.233	0.146	0.048
5	0.250	0.164	0.048
6	0.249	0.186	0.032
7	0.251	0.251	0.021
8	0.248	0.200	0.029
9	0.193	0.150	0.020
10	0.202	0.129	0.053
11	0.195	0.108	0.024
12	0.178	0.090	0.008
13	0.164	0.057	0.007

Consorcio 3 (*Lysinobacillus macroide*, *B. Subtilis*)

TIEMPO	Inf. Suelo	LB	MMS
1	0.236	0.270	0.014
2	0.24	0.271	0.016
3	0.245	0.273	0.016
4	0.251	0.276	0.025
5	0.234	0.279	0.048
6	0.230	0.288	0.023
7	0.234	0.280	0.023
8	0.230	0.286	0.016
9	0.234	0.291	0.013
10	0.239	0.290	0.015
11	0.230	0.291	0.017
12	0.224	0.289	0.034
13	0.219	0.268	0.039

Consorcio 4 (*B. tropicus*, *Lysinobacillus*, *Klebsella oxitoca*)

TIEMPO	Inf. Suelo	LB	MMS
1	0.108	0.285	0.012
2	0.144	0.280	0.019
3	0.168	0.284	0.051
4	0.192	0.285	0.059
5	0.24	0.299	0.071
6	0.276	0.285	0.090
7	0.252	0.270	0.080
8	0.252	0.263	0.076
9	0.24	0.267	0.042
10	0.168	0.258	0.027
11	0.084	0.235	0.023
12	0.12	0.224	0.010
13	0.168	0.242	0.005

Anexo 18: Imágenes de los tratamientos.

TRATAMIENTOS	1 MES	2 MES	3MES
Planta sin tratar			
Tratamiento químico TQ Planta con fertilizante químico			
Tratamiento 1 Planta con consorcio 1			

Tratamiento 2 Planta tratada con consorcio 2			
Tratamiento 3 Planta tratada con consorcio 3			

2 ^{do} mes	3 ^{er} mes
	

Anexo 19: Estadística ANOVA Y TUKEY

ESTADÍSTICA PARA LA VARIABLE LONGITUD DE TALLO

GRUPOS	MEDIA	ni
Control	8.6667	3
FQ	12.0.833	3
Cons 1	9.44	3
Cons 2	12.2	3
Cons 3	12.2	3
Cons 4	7.7667	3

TABLA ANOVA

FUENTE DE VARIANZA	SUMA DE CUADRADOS	GRADO DE LIBERTAD	VARIANZA O MEDIA	ESTADISTICO TEST
ENTRELOS GRUPOS	60.5214	5	12.1043	0.1384
DENTRO DE LOS GRUPOS	99.6216	12	8.3018	
TOTAL	160.143	17		

PRUEBA DE TUKEY

$$HSD = Q_{a,c,gl R} \sqrt{\frac{SCM_R}{n}} \quad Q_{a,c,gl R} = 4.7518$$

$$HSD = Q_{0.05,6,12} \sqrt{\frac{8.3018}{ni}} ni = [n_{max}; n_{min}] = n_{min}$$

Tabla de resultados

Si: $|X_i - X_j| > HSD$ Ho: rechaza

Hipotesis	$ X_i - X_j $	Verificar	Conclusiones
Ho : $\mu_1 = \mu_2$ Ho : $\mu_1 \neq \mu_2$	3.4166	$3.4166 < 4.6052$	Ho : acepta
Ho : $\mu_1 = \mu_3$ Ho : $\mu_1 \neq \mu_3$	0.7733	$0.7733 < 4.6053$	Ho : acepta
Ho : $\mu_1 = \mu_4$ Ho : $\mu_1 \neq \mu_4$	3.5333	$3.5333 < 4.6054$	Ho : acepta
Ho : $\mu_1 = \mu_5$ Ho : $\mu_1 \neq \mu_5$	3.5333	$3.5333 < 4.6055$	Ho : acepta
Ho : $\mu_1 = \mu_6$ Ho : $\mu_1 \neq \mu_6$	0.9	$0.9 < 4.6056$	Ho : acepta
Ho : $\mu_2 = \mu_3$ Ho : $\mu_2 \neq \mu_3$	2.6433	$2.6433 < 4.6057$	Ho : acepta
Ho : $\mu_2 = \mu_4$ Ho : $\mu_2 \neq \mu_4$	0.1167	$0.1167 < 4.6058$	Ho : acepta
Ho : $\mu_2 = \mu_5$ Ho : $\mu_2 \neq \mu_5$	0.1167	$0.1167 < 4.6059$	Ho : acepta
Ho : $\mu_2 = \mu_6$ Ho : $\mu_2 \neq \mu_6$	4.3166	$4.3166 < 4.6060$	Ho : acepta
Ho : $\mu_3 = \mu_4$ Ho : $\mu_3 \neq \mu_4$	2.76	$2.76 < 4.6061$	Ho : acepta
Ho : $\mu_3 = \mu_5$ Ho : $\mu_3 \neq \mu_5$	2.76	$2.76 < 4.6062$	Ho : acepta
Ho : $\mu_3 = \mu_6$ Ho : $\mu_3 \neq \mu_6$	1.6733	$1.6733 < 4.6063$	Ho : acepta
Ho : $\mu_4 = \mu_5$ Ho : $\mu_4 \neq \mu_5$	0.0	$0.0 < 4.6064$	Ho : acepta
Ho : $\mu_4 = \mu_6$ Ho : $\mu_4 \neq \mu_6$	4.4333	$4.4333 < 4.6065$	Ho : acepta
Ho : $\mu_5 = \mu_6$ Ho : $\mu_5 \neq \mu_6$	4.4333	$4.4333 < 4.6066$	Ho : acepta

ESTADÍSTICA PARA LA VARIABLE NÚMERO DE HOJAS

GRUPOS	MEDIA	ni
Control	15.0	3
FQ	18.0	3
Cons 1	13.0	3
Cons 2	18.0	3
Cons 3	17.6667	3
Cons 4	13.0	3

TABLA ANOVA

FUENTE DE VARIANZA	SUMA DE CUADRADOS	GRADO DE LIBERTAD	VARIANZA O MEDIA	ESTADISTICO TEST
ENTRELOS GRUPOS	88.4444	5	17.6889	0.1022
DENTRO DE LOS GRUPOS	2076.6667	12	173.0556	
TOTAL	2165.1111	17		

PRUEBA DE TUKEY

$$HSD = Q_{a,c,gl R} \sqrt{\frac{SCM_R}{n}} \quad Q_{a,c,gl R} = 4.7518$$

$$HSD = Q_{0.05,6,12} \sqrt{\frac{173.0556}{n_i}} \quad n_i = [n_{max}; n_{min}] = n_{min}$$

Tabla de resultados

Si: $|X_i - X_j| > HSD$ Ho: rechaza

Hipotesis	$ X_i - X_j $	Verificar	Conclusiones
Ho : $\mu_1 = \mu_2$ Ho : $\mu_1 \neq \mu_2$	3.0	$3.0 < 36.0906$	Ho : acepta
Ho : $\mu_1 = \mu_3$ Ho : $\mu_1 \neq \mu_3$	2.0	$2.0 < 36.0907$	Ho : acepta
Ho : $\mu_1 = \mu_4$ Ho : $\mu_1 \neq \mu_4$	3.0	$3.0 < 36.0908$	Ho : acepta
Ho : $\mu_1 = \mu_5$ Ho : $\mu_1 \neq \mu_5$	2.6667	$2.6667 < 36.0909$	Ho : acepta
Ho : $\mu_1 = \mu_6$ Ho : $\mu_1 \neq \mu_6$	2.0	$2.0 < 36.0910$	Ho : acepta
Ho : $\mu_2 = \mu_3$ Ho : $\mu_2 \neq \mu_3$	5.0	$5.0 < 36.0911$	Ho : acepta
Ho : $\mu_2 = \mu_4$ Ho : $\mu_2 \neq \mu_4$	0.0	$0.0 < 36.0912$	Ho : acepta
Ho : $\mu_2 = \mu_5$ Ho : $\mu_2 \neq \mu_5$	0.3333	$0.3333 < 36.0913$	Ho : acepta
Ho : $\mu_2 = \mu_6$ Ho : $\mu_2 \neq \mu_6$	5.0	$5.0 < 36.0914$	Ho : acepta
Ho : $\mu_3 = \mu_4$ Ho : $\mu_3 \neq \mu_4$	5.0	$350 < 36.0915$	Ho : acepta
Ho : $\mu_3 = \mu_5$ Ho : $\mu_3 \neq \mu_5$	4.6667	$4.6667 < 36.0916$	Ho : acepta
Ho : $\mu_3 = \mu_6$ Ho : $\mu_3 \neq \mu_6$	0.0	$0.0 < 36.0917$	Ho : acepta
Ho : $\mu_4 = \mu_5$ Ho : $\mu_4 \neq \mu_5$	0.3333	$0.3333 < 36.0918$	Ho : acepta
Ho : $\mu_4 = \mu_6$ Ho : $\mu_4 \neq \mu_6$	5.0	$5.0 < 36.0919$	Ho : acepta
Ho : $\mu_5 = \mu_6$ Ho : $\mu_5 \neq \mu_6$	4.6667	$4.6666 < 36.0920$	Ho : acepta

ESTADÍSTICA PARA LA VARIABLE LONGITUS DE RAIZ

GRUPOS	MEDIA	ni
--------	-------	----

Control	4.0	2
FQ	3.225	2
Cons 1	4.0	2
Cons 2	5.575	2
Cons 3	5.575	2
Cons 4	4.68	2

TABLA ANOVA

FUENTE DE VARIANZA	SUMA DE CUADRADOS	GRADO DE LIBERTAD	VARIANZA O MEDIA	ESTADISTICO TEST
ENTRELOS GRUPOS	8.9375	5	1.7875	1.6045
DENTRO DE LOS GRUPOS	6.6846	6	1.1141	
TOTAL	15.6221	11		

PRUEBA DE TUKEY

$$HSD = Q_{a,c,gl R} \sqrt{\frac{SCM_R}{n}} \quad Q_{a,c,gl R} = 4.7518$$

$$HSD = Q_{0.05,6,12} \sqrt{\frac{1.1141}{ni}} \quad ni = [n_{max}; n_{min}] = n_{min}$$

Tabla de resultados

Si: $|X_i - X_j| > HSD$ Ho: rechaza

Hipotesis	$ X_i - X_j $	Verificar	Conclusiones
-----------	---------------	-----------	--------------

Ho : $\mu_1 = \mu_2$ Ho : $\mu_1 \neq \mu_2$	0.775	0.775 < 4.2021	Ho : acepta
Ho : $\mu_1 = \mu_3$ Ho : $\mu_1 \neq \mu_3$	0.0	0.0 < 4.2022	Ho : acepta
Ho : $\mu_1 = \mu_4$ Ho : $\mu_1 \neq \mu_4$	1.575	1.575 < 4.2023	Ho : acepta
Ho : $\mu_1 = \mu_5$ Ho : $\mu_1 \neq \mu_5$	1.575	1.575 < 4.2024	Ho : acepta
Ho : $\mu_1 = \mu_6$ Ho : $\mu_1 \neq \mu_6$	0.680	0.680 < 4.2025	Ho : acepta
Ho : $\mu_2 = \mu_3$ Ho : $\mu_2 \neq \mu_3$	0.775	0.775 < 4.2026	Ho : acepta
Ho : $\mu_2 = \mu_4$ Ho : $\mu_2 \neq \mu_4$	2.4	2.4 < 4.2027	Ho : acepta
Ho : $\mu_2 = \mu_5$ Ho : $\mu_2 \neq \mu_5$	2.35	2.35 < 4.2028	Ho : acepta
Ho : $\mu_2 = \mu_6$ Ho : $\mu_2 \neq \mu_6$	1.455	1.455 < 4.2029	Ho : acepta
Ho : $\mu_3 = \mu_4$ Ho : $\mu_3 \neq \mu_4$	1.575	1.575 < 4.2030	Ho : acepta
Ho : $\mu_3 = \mu_5$ Ho : $\mu_3 \neq \mu_5$	1.575	1.575 < 4.2031	Ho : acepta
Ho : $\mu_3 = \mu_6$ Ho : $\mu_3 \neq \mu_6$	0.68	0.68 < 4.2032	Ho : acepta
Ho : $\mu_4 = \mu_5$ Ho : $\mu_4 \neq \mu_5$	0.0	0.0 < 4.2033	Ho : acepta
Ho : $\mu_4 = \mu_6$ Ho : $\mu_4 \neq \mu_6$	0.895	0.895 < 4.2034	Ho : acepta
Ho : $\mu_5 = \mu_6$ Ho : $\mu_5 \neq \mu_6$	0.895	0.895 < 4.2035	Ho : acepta