 **UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN SIMÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y PECUARIAS**

**“Dr. MARTÍN CÁRDENAS”**



**Aislamiento y selección de bacterias endófitas solubilizadoras de fósforo de *Schinus molle*, *Erythrina falcata* y *Prosopis alba***

**Responsable:** Nimia Elena Chavez Torrez

 **Tutor:** M. Sc.Felipe Noel Ortuño Castro

**COCHABAMBA – BOLIVIA**

**2022**

**Aislamiento y selección de bacterias endófitas solubilizadoras de fósforo de *Schinus molle*, *Erythina falcata* y *Prosopis alba***

Nimia Elena Chavez Torrez

Aymin24g@gmail.com

**Resumen**

**Aislamiento y selección de bacterias endófitas solubilizadoras de fósforo de *Schinus molle*, *Erythrina falcata* y *Prosopis alba*.** El fósforo (P) es un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, este se encuentra en baja disponibilidad en el suelo. Por ello se busca alternativas como el uso de microoganismos. En este trabajo se realizó el aislamiento y selección de bacterias endófitas tipo *Bacillus* solubilizadoras de fósforo a partir de segmentos de raíces de tres especies forestales nativas (*Schinus molle*, *Erythrina falcata*, *Prosopis alba*). En invernadero se evaluaron quince cepas aisladas, un testigo comercial y un testigo absoluto en combinación con roca fosfórica (RF) en plantines de *Jacaranda mimosifolia*, bajo un diseño completamente aleatorio (DCA). Se encontró 8 cepas con la capacidad de solubilizar fósforo (FB1, FB4, FB5, FB6, FB7, FB10, FB12, FB13). La interacción de roca fosfórica con las cepas bacterianas tuvo un efecto significativo en las variables de respuesta. Por otra parte la cepa FB12 se mostró sobresaliente, superando al testigo comercial. Por tanto, es recomendable el uso de bacterias solubilizadoras de fósforo (BSF) para elevar la disponibilidad de P de la roca fosfórica.

***Palabras claves:*** Bacterias; Roca fosfórica (RF); Microorganismos; Bacillus spp.

**Abstract**

**Isolation and Selection of Phosphorus-Solubilizing Endophytic Bacteria from *Schinus molle, Erythrina falcata* and *Prosopis alba.***Phosphorus (P) is an essential element for the growth and development of plants, it is found in low availability in the soil. For this reason, alternatives are sought, such as the use of microorganisms. In this work, the isolation and selection of phosphorus solubilizing *Bacillus*-type endophytic bacteria was carried out from root segments of three native forest species (*Schinus molle*, *Erythrina falcata*, *Prosopis alba*). In the greenhouse, isolated quinces, a commercial control and an absolute control were evaluated in combination with phosphate rock (PR) in *Jacaranda mimosifolia* seedlings, under a completely randomized design (DCA). Eight strains with the ability to solubilize phosphorus were found (FB1, FB4, FB5, FB6, FB7, FB10, FB12, FB13). The interaction of phosphate rock with the bacterial strains had a significant effect on the response variables. On the other hand, the FB12 strain was outstanding, surpassing the commercial control. Therefore, the use of phosphorus-solubilizing bacteria (PSB) is recommended to increase the availability of P from PR.

***Keywords:*** Bacteria; Rock Phosphate (RF); Microorganisms; *Bacillus sp.*

1. **INTRODUCCIÓN**

La agricultura bajo el modelo de producción convencional resulta cada día menos sostenible, afectando la parte ambiental, económica y social de las zonas y regiones donde se practica. El uso indiscriminado de plaguicidas y fertilizantes químicos, sumado a la labranza inadecuada y la expansión de la frontera agrícola, ha generado desgaste en los ecosistemas (Barquero et al. 2007).

La erosión de los suelos es un proceso de degradación muy extendido en la zona andina y valles de Bolivia. Según el Programa Nacional de Lucha contra la Desertificación (PRONALDES) (1996), 85.6 % de la superficie de esta región está afectada en algún grado.

En las especies forestales, como en cualquier otro cultivo, la fertilización juega un rol fundamental en el desarrollo, crecimiento y producción. Al respecto, se han realizado diversos estudios con la finalidad de conocer la influencia de la fertilización en el crecimiento y desarrollo de las especies forestales, algunos de estos estudios se han enfocado a mejorar las características de las plantas que les permitan tener un mejor desarrollo en campo al momento del trasplante (Lázaro-Dzul et al. 2012).

El fósforo es uno de los nutrientes más limitantes en el crecimiento de las plantas, debido a que una gran porción de fosfatos inorgánicos, aplicados al suelo como fertilizantes, son inmovilizados después de su aplicación, lo cual impide el aprovechamiento de este elemento (Rengel y Marschner, 2005).

Dentro de las funciones que le han sido atribuidas se encuentran la captación, almacenamiento y transferencia de energía, además de formar parte de macromoléculas tales como ácidos nucleicos y fosfolípidos presentes en la membrana citoplasmática. La deficiencia de P es superada normalmente con la aplicación de fertilizantes fosfóricos de síntesis química, alternativa que pese a su eficiencia implica varios problemas: a) altos costos energéticos y económicos, b) muy baja eficiencia (5-30%), c) acumulación crónica de fosfatos en el ambiente, y d) escasez global de roca fosfórica, insumo esencial para la producción de fertilizantes fosfóricos (Patiño y Sanclemente, 2014). Es por ello que en la actualidad se ha venido proponiendo el uso de bacterias solubilizadoras de fósforo (BSF), las cuales actúan a través de la producción de enzimas y ácidos orgánicos que permiten solubilizar el fósforo y a la vez actúan como promotores de crecimiento (Bobadilla y Rincon, 2008).

Las bacterias del género *Bacillus* se encuentran ampliamente distribuidas en diversos hábitats, sus especies están muchas veces asociadas a plantas. En este caso, se han demostrado las potencialidades de las especies del género *Bacillus* para la producción de antibióticos, enzimas, la solubilización de fosfatos y la fijación biológica del Nitrógeno (Chen et al. 2006). Debido a la gran importancia de las bacterias de género *Bacillus* asociadas a plantas y las especies forestales nativas, se ha propuesto el presente estudio, que permitirá aislar bacterias endófitas del género *Bacillus* de tres especies forestales nativas, molle (*Schinus molle*), ceibo (*Erythrina falcata****)*** y algarrobo (*Prosopis alba*), y su posterior evaluación como solubilizadoras de fósforo y promotor de crecimiento en plantines de Jacaranda (*Jacaranda mimosifolia*).

1. **MATERIALES Y MÉTODOS**

El ensayo se llevó a cabo en el departamento de Cochabamba - Bolivia, en predios de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias UMSS., geográficamente localizado a 17° 24’ de latitud sur y 66° 10’ de longitud oeste, con temperatura promedio anual de 18 ºC, humedad relativa media de 56%, precipitación promedio anual de 450mm y una altitud de 2560 msnm.

El estudio se desarrolló en dos fases: Fase I en laboratorio y Fase II en invernadero, donde se evaluaron las bacterias seleccionadas tipo *Bacillus* (15), aisladas de especies forestales nativas (Molle, Ceibo, Algarrobo) en combinación con y sin una fuente fosforada (roca fosfórica), el testigo absoluto y un testigo comercial (cepas comerciales), se evaluó en plantines de *Jacaranda mimosifolia.*

***Fase I: Aislamiento y selección in vitro de Bacillus endófito***

**Muestreo**

 Se colectaron muestras de tres especies forestales nativas ceibo *(Erythrina falcata)*, molle *(Schinus molle)* y algarrobo *(Prosopis alba)*, 10 gr de raíces secundarias jóvenes por especie.

**Aislamiento de bacterias endófitas**

 Las raíces obtenidas fueron sometidas a un proceso de desinfección superficial, estas fueron cortadas es segmentos de 3 cm aproximadamente, los cuales fueron enjuagados con solución salina al 0.85% y posteriormente sumergidas en alcohol al 70% durante 1 min y 15 min en hipoclorito de Na al 1.3%. Metodología propuesta por Claros y Ortuño (2016). Posteriormente, se depositaron en bolsas plásticas estériles y empleado un mortero estéril se procedió a macerarlas, se recogió las raíces y se las sembró en medio solido TSA (Triptona Soya Agar) en placas individuales por especie forestal, incubadas a 25 ºC por 24 horas.

Transcurrido este tiempo se observó el desarrollo de la diversidad de colonias las cuales fueron purificadas en placas individuales.

**Selección de *Bacillus***

Las colonias aisladas de raíces, fueron expuestas a un shock térmico, donde se tomaron muestras de las bacterias purificadas y multiplicadas en medio líquido, estas fueron sometidas a 80 ºC por 15 min. Posteriormente se realizó la siembra en medio solido TSA, incubado por 24 horas. Las cepas que lograron desarrollar después del shock térmico fueron preseleccionadas y se les realizo pruebas bioquímicas adicionales,las cuales ayudaron a la selección de cepas bacterianas tipo *Bacillus*.

**Determinación de la solubilización de fosfatos**

La determinación cualitativa de la solubilización de fosfatos se llevó a cabo por siembra directa de los *Bacillus* seleccionados en el medio de cultivo sólido NBRIP (Nautiyal, 1999). Las placas se incubaron a 30 °C. Siendo los positivos los que muestran un halo transparente.

**Multiplicación en medio de cultivo líquido (inoculo)**

Se realizó la multiplicación de bacterias en el medio líquido Melaza-Soya (MS) siguiendo lo descrito por Ferrufino (2019). Se realizó a partir de una placa petri con los cultivos bacterianos, se sembró en matraces que contenían medio MS en condiciones de asepsia, posteriormente se dejó en agitación durante siete días a temperatura ambiente, promedio 20 ºC, transcurrido este tiempo se sembro en TSA, para hacer el conteo de la población bacteriana.

***Fase II: bioensayos en invernadero***

La evaluación de las cepas tipo*Bacillus* seleccionadasse realizó en plantines de *Jacaranda mimosifolia.* Se utilizó un sustrato compuesto por arcilla, arena y materia orgánica en proporción (1-1-1) con pH 7.8 y dispuesto en macetas de 6 kg.

**Inoculación de plantines**

Previo a la inoculación, se estandarizo la población bacteriana a 1x109 UFC*.* La inoculación se realizó después de haber observado un prendimiento del 100%. Para la incorporación de roca fosfórica (RF) se realizó un surco de 5 cm de profundidad alrededor de la planta donde se aplicaron 6 gramos de RF y se añadió 1 ml de la solución bacteriana, se procedió a realizar una remoción en el área y se tapó con sustrato el área de aplicación.

**Análisis de datos**

Los tratamientos fueron evaluados bajo un diseño completamente aleatorio (DCA), donde se evaluaron 15 cepas bacterianas tipo *Bacillus*, un testigo absoluto (T0), un testigo solo con roca fosfórica sin microorganismos (T1) y un testigo de cepas comerciales en combinación con y sin roca fosfórica (T33,T34) con 3 repeticiones. Cada tratamiento estuvo constituido por una maceta que contiene una sola planta.Los datos fueron analizados con el PROC GLM del SAS versión 8.2.

1. **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Fase I: Selección *in vitro***

En la primera fase se logró aislar un total de 35 cepas bacterianas a partir de segmentos de raíces de ceibo (*Erythrina falcata*), molle (*Schinus molle*) y algarrobo (*Prosopis alba*) (cuadro 1). Las cuales fueron sometidas al shock térmico, que permitió seleccionar 25 cepas como posibles *Bacillus* (cuadro 1).

**Cuadro 1**. Colonias termoresistentes

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Especie forestal | Total de aislados | Aislados termorresistentes |
| Ceibo | 14 | B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B10. |
| Molle | 9 | B11, B12, B13, B14, B15, B16. |
| Algarrobo | 12 | B17, B18, B19, B20, B21, B22, B23, B24, B25. |

Stanier (1996), señala que la producción de esporas es una característica típica de todas las bacterias de los géneros *Bacillus* y *Clostridium.*

La resistencia de las esporas de *Bacillus* sp. al calentamiento a temperaturas que eliminan la célula vegetativa y las esporas poco resistentes al calor suele ser usado como método de aislamiento (Ratón et al., 2005).

**Pruebas bioquímicas**

Se realizó un total de 3 pruebas bioquímicas a las 25 cepas bacterianas seleccionadas como posibles *Bacillus*, encontrándose 22 cepas bacterianas Gram positivas, 22 cepas catalasa positiva y 19 oxidasa negativa. Zapata et al (2012) encontró resultados similares en las pruebas bioquimas realizadas a 6 aislamientos de Bacillus sp., de los cultivos de Cómbita y Granada, los cuales resultaron como bacilos Gram positivo y catalasa positiva.

Después de haber realizado las pruebas bioquímicas, se seleccionadas 15 cepas de posibles Bacillus, siendo elegidas aquellas que dieron positivo a las pruebas bioquímicas,para ser evaluadas en plantines de jacaranda **Multiplicación en medio liquido**

El cuadro2**.** Muestra la cuantificación de UFC (Unidades Formadoras de colonias) de los *Bacillus* seleccionados, transcurridos 7 días a partir de la inoculación de en medio líquido. Donde se observa poblaciones significativas teniendo en cuenta que este es un factor muy importante en la formulación de productos comerciales. Por lo general se consideran efectivos económica y técnicamente los productos con una población superior a 108 UFC/g (Viñals y Villar, 1999).

**Evaluación de la Capacidad de Solubilización de Fosfatos**

Se obtuvieron los resultados a partir de la observación del crecimiento de las 15 bacterias seleccionadas en medio NBRIP, donde se forma un halo trasparente alrededor de la colonia cuando estas presentan capacidad de solubilización de fosfatos. Se identificaron 8 cepas con dichas características: FB1, FB4, FB5, FB6, FB7, FB10, bacterias de ceibo y FB12 y FB13 provenientes de molle, como se detalla en el cuadro 3. Otero (2011), sostiene que la formación del halo transparente que se observa alrededor de las colonias ocurre en la medida que sucede la solubilización.

**Cuadro 2.** Población de inoculo en UFC

|  |  |
| --- | --- |
| Cepas Bacterianas | Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL |
| FB1 | 1,273\*1011 |
| FB2 | 1,079\*1011 |
| FB3 | 1,240\*109 |
| FB4 | 1,135\*1011 |
| FB5 | 1,391\*109 |
| FB6 | 9,23\*1010 |
| FB7 | 8,22\*1010 |
| FB8 | 1,317\*1011 |
| FB9 | 1,211\*1011 |
| FB10 | 1,332\*1011 |
| FB11 | 1,332\*1011 |
| FB12 | 1,127\*1011 |
| FB13 | 1,230\*1011 |
| FB14 | 1,335\*109 |
| FB15 | 1,339\*109 |
| *Biobac (B.subtilis* + *B. pumilus)* | 1,329\*109 |

**Cuadro 3.** Cepas positivas a la solubilización de fosfatos

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Especie forestal | Bacterias seleccionadas(tratamientos) | Formación de halo transparente |
| Ceibo | FB1, FB2, FB3, FB4, FB5, FB6, FB7, FB8 | **FB1, FB4, FB5, FB6, FB7** |
| Molle | FB9, FB10, FB11, FB12, FB13, | **FB10, FB12, FB13** |
| Algarrobo | FB14, FB15 |  |

**Fase II: bioensayos en invernadero**

**Altura de planta**

Se encontró diferencias significativas (Pr≤0.05) para el efecto fijo de las bacterias, roca fosfórica y la interacción de bacterias con la fuente de fósforo.

Los resultados de los tratamientos con bacterias y sin roca fosfórica (Figura 1) mostraron que las cepas de *Bacillus* aislados FB12 y FB1 obtuvieron mejores resultados en comparación con las demás cepas con una altura 28.7 y 27.8 cm, respectivamente, sin embargo no se halló diferencias significativas respecto al testigo comercial con una altura promedio de 29.8 cm. El tratamiento que registró menores alturas fue el T0 (Testigo absoluto). Por otra parte, en los tratamientos donde se aplicó roca fosfórica (Figura 2), las alturas más bajas se registraron en el T0 (testigo absoluto), T4 (FB2), T18 (FB9), con alturas similares a 20 cm. Mientras que T24 (FB12) se mostró sobresaliente ante las demás cepas con una altura promedio de 48.3 cm. Estos resultados podrían indicar la relación de la capacidad solubilizadora de fósforo de *Bacillus* con la promoción de crecimiento vegetal. Sánchez et al*.* (2012) encontró que la altura de planta enmtomate mostró incrementos en el tamaño de la planta hasta dos veces en los tratamientos con *Enterobacter* sp. TVL-2 y *Bacillus* sp. BEOO2 en el segundo mes de muestreo, respecto al testigo absoluto y una diferencia del 30% con el testigo químico.

La aplicación de roca fosfórica tuvo un efecto significativo donde se halló alturas de planta promedio de 28 cm, en comparación a aquellos tratamientos donde no se aplicó la fuente de fósforo, estas reportaron alturas promedio de 23 cm (figura 3).

**Figura1.** Efecto de la inoculación de *Bacillus* spp. en la altura de planta

**Figura2.** Efecto de la inoculación de *Bacillus* spp. y la aplicación de roca fosfórica sobre la altura de planta

**Figura 3.** Efecto de la aplicación de roca fosfórica sobre la altura de planta.

**Peso fresco del follaje**

El análisis de varianza, mostró diferencias significativas (Pr≤0.05) para los efectos fijos bacterias, roca fosfórica y la interacción de estos.

La aplicación de BSF sin roca fosfórica (RF) (Figura 4), generó variación en el peso fresco de follaje en relación al testigo absoluto (T0) que junto con T9 (FB4) y T27 (FB13) registraron los pesos más bajos de 5 gr. Por otra parte la cepa FB12 y el testigo comercial mostraron ser los más eficientes en la promoción de desarrollo de follaje, en relación a las demás cepas evaluadas.

**Figura. 4** Efecto de la inoculación de aislados bacterianos sobre el peso fresco de follaje

En los tratamientos donde se aplicó roca fosfórica (Figura 5) se aprecia que el testigo absoluto T0 y T4 (FB2), obtuvieron los pesos más bajos (5.3 y 5.7 gr). Las cepas FB12, FB10 y FB6 mostraron los mejores pesos de follaje con 15, 14.7 y 12 gr, respectivamente, superando al testigo comercial (T32) en un 30% y 50%, respecto al testigo absoluto. Estas a su vez dieron positivo a la prueba de solubilización de fosfatos, lo cual indica que esta propiedad podría haberles dado ventaja en la asimilación de dicho nutriente, dado que el tratamiento donde se aplicó solo roca fosfórica T1 (5.33 gr) presentó resultados similares al Testigo absoluto (5 gr), lo cual estaría relacionado con la lenta liberación de P de la RF. La dificultad de la RF para ser usada como fertilizante fosfatado radica en su baja solubilidad y, por consiguiente, en la lenta liberación de P disponible para la planta (Menon y Chien, 1995).

**Figura 5.** Efecto de la inoculación de aislados bacterianos y la aplicación de roca fosfórica sobre el peso fresco de follaje.

La figura (6) muestra el efecto de la aplicación de RF en el desarrollo de biomasa donde se observa una diferencia significativa cuando se aplica este fertilizante.

Este efecto positivo de la aplicación de roca fosfórica (RF) y BSF se puede explicar considerando que mientras la RF aporta principalmente fósforo, las BSF pueden tener efectos adicionales en la solubilización de este nutriente, como ser, en la fijación de N, el biocontrol de patógenos y la producción de sustancias fitoreguladoras (Archand y Schneider, 2006). Estos resultados guardan relación con el estudio de Main y Franco (2011), donde probaron el efecto de la fertilización fosfórica en combinación de *Bacillus* *subtilis* y micorrizas arbusculares, donde la inoculación de *Bacillus* permitió obtener mejores resultados en las variables agronómicas con menores niveles de fertilización fosfórica.

**Figura 6.** Efecto de la aplicación de roca fosfórica sobre el peso fresco de follaje.

**Peso seco de follaje**

El análisis de varianza muestra diferencias significativas para los efectos fijos bacterias y la interacción de estas con roca fosfórica, sin embargo la aplicación de roca fosfórica sola no mostro diferencian en el peso seco de follaje.

En el caso de peso seco de follaje se encontró resultados relacionados con aquellos obtenidos en evaluaciones en peso fresco, sin la aplicación de roca fosfórica T25 (FB12) y el testigo comercial mostraron mayores pesos (figura 7). De igual manera se observa que los tratamientos que mostraron pesos más bajos fueron T27 (FB13) y T9 (FB4) los cuales registraron valores inferiores al testigo absoluto, lo cual podría deberse a las reacciones de los microorganismos y a las condiciones adversas de temperatura y fertilidad. Bhattacharyya y Jha (2012), indican que algunas condiciones abióticas pueden afectar la eficiencia de estos microorganismos, por ejemplo la influencia de las temperaturas o los tipos de suelos y condiciones bióticas como las respuestas sinérgicas antagónicas.

**Figura 7.** Efecto de la inoculación de aislados bacterianos sobre el peso seco de follaje

En el caso de los tratamientos que si tenían roca fosfórica y cepas bacterianas destacaron significativamente T14 (FB7), T20 (FB10) y T24 (FB12), los cuales superaron al testigo absoluto y al testigo comercial (Figura 8).

**Figura 8.** Efecto de la inoculación de aislados bacterianos y la aplicación de roca fosfórica sobre el peso seco de follaje

En cuanto a la aplicación de roca fosfórica no se encontró diferencias significativas. Lo cual podría deberse a que las raíces absorben cantidades muy pequeñas de fósforo (Corrales et al, 2017), siendo necesarias las asociaciones simbióticas entre raíces y microorganismos los cuales participan en la solubilización del P por la acción metabólica. (Goldstein y Krishnaraj, 2007),

**Longitud de raíz**

El análisis de varianza, mostro diferencias significativas (Pr≤0.05) para el efecto fijo de las bacterias, roca fosfórica y su interacción.

Los resultados obtenidos de los tratamientos con bacterias y sin roca fosfórica (Figura 9), mostraron que las cepas de *Bacillus* FB12, FB14, FB8 y FB1 obtuvieron mejores resultados, con alturas 49.7, 44.7, 44.7 y 44 cm, respectivamente, superando al testigo comercial, donde se encontró una altura promedio de 43 cm. El tratamiento que registró menor longitud de raíz fue el T0 (Testigo absoluto).

**Figura 9.** Efecto de la inoculación de aislados bacterianos sobre la longitud de raíz

En los tratamientos donde se aplicó roca fosfórica para ver la interacción con las cepas aisladas (Figura 10), se encontró longitudes desde 29 cm en T0, hasta 56 cm en T24 (FB12) y T18 (FB9). Estos resultados podrían indicar la capacidad de las BSF con relación a la promoción de crecimiento vegetal.

**Figura 10.** Efecto de la inoculación de aislados bacterianos y la aplicación de roca fosfórica sobre la longitud de raíz.

Respecto a la aplicación de roca fosfórica, este fue significativo, se halló longitudes de raíz promedio de 46.93 cm en comparación con aquellos tratamientos donde no se aplicó RF, estos reportaron alturas promedio de 37 cm (figura 11).

**Figura 11.** Efecto de la aplicación de roca fosfórica sobre la longitud de raíz.

**Peso fresco de raíz**

Con la aplicación de roca fosfórica (RF) el peso de raíz fue de 13 gr y sin la aplicación de esta fuente de fósforo fue de 8.5 gr (Figura 14), esto muestra que la aplicación de roca RF incremento el desarrollo radicular de la planta.

 Se observa que en la mayoría de los casos donde se aplicó roca fosfórica y bacterias superaron a aquellos donde solo se aplicó bacterias, a excepción del testigo comercial donde se observó el mismo comportamiento en ambos casos. García *et al* (2015) encontró que la inoculación de aislados bacterianos (*Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*) solubilizadores de fosforo, generó diferencias significativamente superiores a las no inoculadas, donde las inoculaciones con *B. amiloliquefaciens* produjeron plantas con mayor peso fresco y seco en raíz.

Con la aplicación solo de bacterias (BSF), la cepa FB12 mostró ser la mejor estadísticamente con 16 gr promedio, superando así a T0 (4 gr) y al testigo comercial T33 (Biobac) que registró 10gr. (Figura 12). De igual manera, se observó que los tratamientos con adición de RF presentaron como mejores a las cepas FB2 (15 gr), FB4 (17 gr), FB5 (14 gr), FB6(15 gr), FB7 (15 gr), FB10(17 gr), FB11(17 gr) , FB12(18 gr), FB13(15 gr) y FB15(13 gr) en relación al testigo comercial (10 gr) y superaron de gran manera al testigo absoluto (7 gr) que presento los pesos de raíz más bajos junto a FB9.

**Figura. 12** Efecto de la inoculación de aislados bacterianos sobre el peso fresco de raíz.

**Figura. 13** Efecto de la inoculación de aislados bacterianos y la aplicación de roca fosfórica sobre el peso fresco de raíz

**Figura. 14** Efecto de la aplicación de roca fosfórica sobre el peso fresco de raíz.

**Conclusiones**

En laboratorio:

Se aislaron 35 cepas de bacterias endófitas, a partir de raíces de tres especies forestales nativas (molle, ceibo, algarrobo), siendo 14 cepas de ceibo, 9 de molle y 12 de algarrobo. Del total de 35 cepas bacterianas endófitas de raíces, se seleccionaron 15 cepas como posibles *Bacillus sp.*, de las cuales FB1, FB4, FB5, FB6, FB7, F10, FB12 y FB13, mostraron capacidad de solubilizar fosfatos en las pruebas *in vitro*.

En invernadero:

En función a las variables de respuesta evaluadas, se encontró que en la mayoría de los casos, los mejores tratamientos fueron aquellos donde se aplicó bacterias (BSF) combinadas con roca fosfórica. La aplicación de cepas bacterianas y roca fosfórica tuvo efectos positivos en la altura de planta, donde FB12 y FB5 fueron las mejores. En el caso del peso del follaje, la cepa FB12 y el testigo comercial (Biobac), obtuvieron los pesos más altos, en materia fresca y en materia seca. En general la aplicación de roca fosfórica y cepas bacterianas incrementó el peso de follaje en relación al testigo absoluto. Sobre el desarrollo radicular, la longitud y peso se vieron influenciados por la aplicación de bacterias y roca fosfórica. Las cepas que promovieron mayor longitud fueron FB1, FB9 y FB12, en cuanto al peso de raíz FB2, FB4, FB5, FB6, FB7, FB10, FB11, FB12, FB13 y FB15 obtuvieron pesos más altos.

En función a los ensayos realizados en invernadero, en general la aplicación de cepas beneficio el desarrollo de las variables evaluadas bajo condiciones de estudio.

1. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arcand, M. y Schneider, K. (2006). *Plant and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock*: a review. Ann. Acad. Bras. Cienc. 78:791 - 807.

Barquero, L., Campos, S., Tobar, M., Guerrero, A., Sánchez, J., & Landinez, L. (2007). Informe de vigilancia tecnológica. Bioinsumos. Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología (COLCIENCIAS). Bogotá, Colombia

Bhattacharyya, P; Jha, D. (2012). *Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1327-1350

Bobadilla, C. y Rincón, S. (2008). *Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza.* [Tesis de grado;Pontifica Universidad Javeriana]. Colombia

Corrales, L., Caycedo, L., Gómez, M., Ramos, S., y Rodríguez, J. (2017). *Bacillus* spp: *una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos*. *NOVA*, *15*(27), 45 - 65.

Chen,Y., Rekha, P., Arun A., Shen, F., Lai, W. y Young, C. (2006). *Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities.* Applied Soil Ecology*.* 2006;(34):33-41.

Claros, M. y Ortuño, N. (2016). Manual de laboratorio agrícola. Fundación PROINPA. Cochabamba, Bolivia. 76 p.

Ferrufino, N. (2019). *Aislamiento y selección de bacterias tipo Bacillus para la inducción de tolerancia a Globodera sp. en dos variedades de papa (Solanum tuberosum sp.)*[Tesis de Grado, Universidad Mayor de San Simon]

García, R., Lovaisa, N., & Ulla, E. (2015). *Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfatos del Noroeste Argentino y su efecto en la promoción de crecimiento en maíz (Zea mays L.).* *Revista agronómica del noroeste argentino*, *35*(1), 13-28.

Goldstein, A. and Krishnaraj, P. (2007) *Phosphate solubilizing microorganisms vs. phosphate mobilizing microorganisms: what separates a phenotype from a trait? In: First International meeting on microbial phosphate solubilization:* Springer, Dordrecht, p. 203-213..

Lázaro, M., Velázquez, J., Vargas, J., Gómez, A., Álvarez, M., & López, M. (2012). *Fertilización con nitrógeno, fósforo y potasio en un latizal de Pinus patula Schl*. et Cham. *Revista Chapingo serie* ciencias *forestales y del ambiente*, *18*(1), 33-42.

Llanos, M. (2017). *Bacterias solubilizadoras de fosfato del género bacillus en suelos de la provincia de el Collao (Puno) y su efecto en la germinación y crecimiento de quinua (Chenopodium quinoa Willd.) en condiciones de invernadero.*

Main, G., & Franco, j. (2016) *Efecto de la bacteria Bacillus subtilis y el hongo Micorrizico Arbuscular Glomus fasciculatum en la fertilización fosfórica de la papa (Solanum tuberosum ssp. andigena).* Revista Latinoamericana de la Papa, 16(2), 250-269.

Menon R., Chien S. (1995) *Phosphorus availability to maize from partially acidulated phosphate rocks compacted with triple superphosphate.*Plant Soil *127*: 123- 128.

Nautiyal, SC. (1999). *An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganism*. FEMS Microbiology Letters 170:265- 275.

Otero Vanessa. (2011*) Aislamiento, Selección e Identificación de Actinomicetos, Bacterias Fotosintéticas No Sulfuro-sas y Bacterias Ácido Lácticas con Potencial Biofertilizante, a Partir de Suelos Asociados al Cultivo de Plátano en la Costa Atlántica Colombiana*. [Tesis de grado].Colombia.

Patiño, C., & Sanclemente, O. (2014). *Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible.* Entramado, 10(2) ,288-297.

PRONALDES**. (**1996). *Mapa preliminar de erosión de suelos: región árida, semiárida y subhúmeda de Bolivia.*Programa Nacional de Lucha contra la Desertificación. CID. La Paz.

Ratón, T., Portuondo, I., Salas, D., Ramos, N., & Giro, Z. (2005). *Aislamiento de cepas del genero Bacillus sp. con potencialidades para la bioprotección y la estimulación del crecimiento vegetal.*Revista Cubana de Química, *17*(1), 189-195.

Rengel, Z. y Marschner, P. (2005). Nutrient availability in the rizosphere: exploiting genotypic differences. New Phytologyst 168:305-312.

Sánchez, D., Gómez, R., Garrido, M., & Bonilla, R. (2012). *Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero.* Revista mexicana de ciencias agrícolas, *3*(7), 1401-1415.

Torres, C. P., & de Prager, M. S. (2014). Efecto de la aplicación de roca fosfórica y la inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfatos sobre el crecimiento del ají (Capsicum annum). Acta Agronómica, 63(2), 1-13.

Viñals, M., & Villar, J. (1999). Avances en la formulación y aplicación de inoculantes bacterianos de uso agrícola. *Cultivos tropicales*, *20*(4), 9-17.

Zapata, J., Diaz, A., Caviedes, D. (2012) *Estrategias de control biológico de Fusarium oxysporum en el cultivo de uchuva,* 27-31