



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



Caracterización de especies de *Bacillus* aisladas de rizoplano y rizósfera de *Asparagus officinalis* L. y su potencial como promotoras de crecimiento en plantas

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA MICROBIOLOGÍA – PARASITOLOGÍA**

PRESENTADO POR:

Br. Michael Jhonn Casos Dávila

Br. Nilton Jhonn Casos Dávila

LAMBAYEQUE, PERÚ

2017

Caracterización de especies de *Bacillus* aisladas de rizoplano y rizósfera de *Asparagus officinalis* L. y su potencial como promotoras de crecimiento en plantas

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA MICROBIOLOGÍA – PARASITOLOGÍA**

APROBADO POR:

MSc. Clara A. Cueva Castillo

PRESIDENTE

Dr. Antero C. Vásquez García

SECRETARIO

Lic. Julio C. Silva Estela

VOCAL

Dra. Carmen R. Carreño Farfán

PATROCINADORA

LAMBAYEQUE, PERÚ

2017

AGRADECIMIENTO

A Dios, por habernos dado la dicha de vivir y habernos permitido llegar hasta este punto en nuestras vidas, junto a las personas que queremos. Por darnos salud y fuerzas para combatir las adversidades que se nos han presentado.

A mis padres, *Nilthon Casos Gil* y *Eloisa Dávila Delgado*, por su constante apoyo, guía, paciencia y cariño mostrado. Por sus palabras de aliento en los momentos difíciles y la sabiduría que me transmiten. Gracias a ellos estoy donde estoy. Los amo.

A mis hermanos, *Indira* y *Nilton*, por el apoyo brindado, la confianza existente entre nosotros y por los gratos momentos que hemos pasado.

A mi patrocinadora, *Dra. Carmen Carreño Farfán*, por su paciencia, guía, apoyo y toda su dedicación en la realización de esta tesis, que se vuelve una meta más cumplida.

A mis amigos, unos me ayudaron desde la realización hasta la sustentación de mi tesis, y otros que siempre me alentaron a seguir adelante. Gracias *Mayra*, *Heydi*, *Jorge Kevin*, *Liyí* y más. Gracias por todos los gratos momentos a su lado.

Michael J. Casos Dávila

AGRADECIMIENTO

A Dios, por permitirme vivir en un ambiente lleno de amor, aprendizaje y lindas experiencias, en compañía de mis seres queridos.

A mis padres, *Nilthon y Eloisa*, por inculcar en mí el valor de responsabilidad, que ha sido lo que ha permitido mis logros académicos. Por su cariño, dedicación y apoyo constantes durante todo mi vida. Gracias por darme los consejos y los valores que hoy son parte de mí.

A mi hermana, *Indira*, quien supo realizar su labor de hermana mayor, con buenos ejemplos y su apoyo en mis estudios, y ha compartido conmigo muchos gratos momentos, demostrándonos cariño.

A mi hermano, *Michael*, por haber estado presente en todas mis experiencias importantes, incluyendo esta tesis. Siendo mi gemelo, ha tenido ideas y actitudes diferentes a las mías con las que también he aprendido, lo cual agradezco.

A mi patrocinadora, *Dra. Carmen Carreño Farfán*, por su asesoramiento y paciencia, por las facilidades brindadas para la ejecución de este trabajo, y por sus lecciones de vida.

A mis amigos, en especial, *Heydi C., Mayra C., Kevin D. y F. Chafloque*, porque de alguna manera han participado en mi vida, durante la ejecución de esta tesis, con su cariño y apoyo.

Nilton J. Casas Davila

DEDICATORIA

Esta tesis refleja todo nuestro esfuerzo realizado durante su ejecución, logrando así una meta más, y debido a que en cada meta cumplida siempre existen personas que te apoyan e impulsan a seguir adelante a pesar de los obstáculos en el camino, nuestra dedicatoria va dirigida a todas las personas que de alguna forma hicieron posible el logro de esta meta y en especial:

A nuestro papá, Nilthon, quien siempre nos dio los ánimos necesarios en los momentos difíciles y nos enseñó a ver la vida positivamente, para poder conseguir nuestras metas.

A nuestra mamá, Eloisa, quien con tanto cariño y amor nos apoyó en el transcurso de la ejecución de la tesis y nos ha inculcado esas fuerzas de seguir luchando por lo que queremos.

A nuestra hermana, Indira, cuya influencia ha sido muy importante durante nuestras vidas, por todas las risas compartidas y su apoyo incondicional.

Michael y Nilton Casos Dávila

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MARCO TEÓRICO	4
	2.1 Antecedentes de la investigación	4
	2.2 Base teórica	8
	2.2.1 <i>Asparagus officinalis</i> L.	11
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	13
	3.1 Materiales	13
	3.1.1 Material biológico	13
	3.1.2 Población y muestra	13
	3.2 Métodos	13
	3.2.1 Variables de la fase descriptiva	13
	3.2.2 Variables de la fase experimental	14
	3.2.3 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis	14
	3.2.4 Lugar de muestreo	14
	3.2.5 Obtención de muestras	
	3.2.6 Aislamiento e identificación fenotípica de bacterias del género <i>Bacillus</i>	17
	3.2.7 Mantenimiento de cultivos de <i>Bacillus</i> spp.	22
	3.2.8 Cuantificación de nitrógeno fijados, fosfato solubilizado e indoles producidos	22
	3.2.9 Selección de <i>Bacillus</i> spp.	25
	3.2.10 Efecto de <i>Bacillus</i> spp. en plantas de espárrago	25
	3.2.11 Análisis estadístico de los datos	31
IV.	RESULTADOS	32
	4.1 <i>Bacillus</i> spp. aisladas e identificadas	32
	4.2 Nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos por <i>Bacillus</i> spp.	36
	4.3 Cultivos de <i>Bacillus</i> spp. seleccionados	36
	4.4 Efecto de <i>Bacillus</i> spp. en la altura y número de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L.	36

V.	DISCUSIÓN	74
VI.	CONCLUSIONES	78
VII.	RECOMENDACIONES	79
VIII.	RESUMEN	80
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
X.	ANEXOS	91

Índice de tablas

Tabla 1.	Lote de procedencia de muestras de raíces con suelo rizósferico de <i>Asparagus officinalis</i> L. en el Fundo Josymar, Virú, La Libertad	16
Tabla 2.	Análisis físico-químico de suelo rizosférico de <i>Asparagus officinalis</i> L. en Virú, La Libertad, 2016	20
Tabla 3.	Características y frecuencia de morfotipos de <i>Bacillus</i> spp. aislados de rizoplano y rizósfera de <i>Asparagus officinalis</i> L.	34
Tabla 4.	Características diferenciales de especies de <i>Bacillus</i> identificadas en rizoplano y rizósfera de <i>Asparagus officinalis</i> L. “espárrago”, 2016	35
Tabla 5.	Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por <i>Bacillus circulans</i> , <i>B. pasteurii</i> y <i>B. sphaericus</i> aislados de <i>Asparagus officinalis</i> L.	39
Tabla 6.	Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por <i>Bacillus pumilus</i> , <i>B. cereus</i> y <i>B. megaterium</i> aislados de <i>Asparagus officinalis</i> L.	41
Tabla 7.	Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. stearothermophilus</i> y <i>B. alvei</i> aislados de <i>Asparagus officinalis</i> L.	42
Tabla 8.	Fósforo cuantificado (ppm) en la solubilización por <i>Bacillus circulans</i> , <i>B. subtilis</i> y <i>B. sphaericus</i> aislados de <i>Asparagus officinalis</i> L.	47
Tabla 9.	Fósforo cuantificado (ppm) en la solubilización por <i>Bacillus pumilus</i> , <i>B. megaterium</i> y <i>B. alvei</i> aislados de <i>Asparagus officinalis</i> L.	49
Tabla 10.	Fósforo cuantificado (ppm) en la solubilización por <i>Bacillus stearothermophilus</i> , <i>B. pasteurii</i> y <i>B. cereus</i> aislados de <i>Asparagus officinalis</i> L.	50
Tabla 11.	Indoles producidos (ppm) por <i>Bacillus pasteurii</i> , <i>B. sphaericus</i> y <i>B. cereus</i> aislados de <i>Asparagus officinalis</i> L.	54
Tabla 12.	Indoles producidos (ppm) por <i>Bacillus megaterium</i> , <i>B. subtilis</i> y <i>B. alvei</i> aislados de <i>Asparagus officinalis</i> L.	57

Tabla 13.	Indoles producidos (ppm) por <i>Bacillus stearothermophilus</i> , <i>B. pumilus</i> y <i>B. circulans</i> aislados de <i>Asparagus officinalis</i> L.	59
Tabla 14.	Valores (ppm) de amonio, fósforo soluble e indoles correspondientes a cultivos de <i>Bacillus</i> spp. seleccionados	60
Tabla 15.	Índices de efectividad (%) de <i>Bacillus</i> spp. en la altura de <i>Asparagus officinalis</i> L. a los 15, 30, 45 y 60 días	62
Tabla 16.	Índices de efectividad (%) de <i>Bacillus</i> spp. en el número de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L. a los 15, 30, 45 y 60 días	63
Tabla 17.	Prueba de Tukey de la altura de plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. a los 30, 45 y 60 días después de la inoculación de <i>Bacillus</i> spp.	67

Índice de figuras

Figura 1.	Diseño completamente aleatorio para determinar el efecto de <i>Bacillus</i> spp. en <i>Asparagus officinalis</i> L.	15
Figura 2.	Ubicación de la provincia de Virú, región La Libertad, abril, 2016 (https://www.google.com.pe/maps/place/Provincia+de+Vir%C3%BA/A/@-8.5471469,-78.7881687,9z/data=!4m5!3m4!1s0x91ac59407c7b0391:0x6c172095672753ce!8m2!3d-8.5528417!4d-78.6254767)	20
Figura 3.	Extracción de raíces de suelo rizosférico de <i>Asparagus officinalis</i> L.	18
Figura 4.	Muestras de raíces con suelo rizosférico de <i>Asparagus officinalis</i> L.	18
Figura 5.	Raíces con suelo rizosférico de <i>Asparagus officinalis</i> L. deshidratadas	19
Figura 6.	Suspensión de raíces y suelo rizosférico de <i>Asparagus officinalis</i> L. en solución salina esterilizada	20
Figura 7.	Siembra en agar nutritivo mediante la técnica de agotamiento y estría	20
Figura 8.	Colonias de <i>Bacillus</i> spp. desarrolladas en agar nutritivo	21
Figura 9.	Caldo National Botanical Reserch Institute's phosphate cultivado con <i>Bacillus</i> spp.	24
Figura 10.	Caldo tripticasa soya suplementado con triptófano cultivado con <i>Bacillus</i> spp.	24
Figura 11.	Coronas de <i>Asparagus officinalis</i> L.	26
Figura 12.	Suelo agrícola, arena de río y humus	26
Figura 13.	Suelo experimental contenido en macetas de arcilla	27
Figura 14.	Inmersión de corna de <i>Asparagus officinalis</i> L. en solución de fungicida	27
Figura 15.	Inóculo de <i>Bacillus</i> spp. en solución salina esterilizada	29
Figura 16.	Aplicación del inóculo bacteriano en corona de <i>Asparagus officinalis</i> L.	29
Figura 17.	Medición de altura de tallo de <i>Asparagus officinalis</i> L.	30

Figura 18	Frecuencia de especies de <i>Bacillus</i> identificadas en rizoplaneo y rizósfera de <i>Asparagus officinalis</i> L. “espárrago”, 2016	35
Figura 19	Porcentaje de <i>Bacillus</i> spp. fijadores de nitrógeno <i>in vitro</i>	37
Figura 20	Coloración observada en la cuantificación de amonio	37
Figura 21	Porcentaje de <i>Bacillus</i> spp. que solubilizaron fosfato <i>in vitro</i>	44
Figura 22	Coloración observada en la cuantificación de fósforo soluble	45
Figura 23	Porcentaje de <i>Bacillus</i> spp. que produjeron indoles <i>in vitro</i>	51
Figura 24	Coloración observada en la cuantificación de indoles	52
Figura 25	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 15 días después de la siembra e inoculación de coronas, a) Testigo absoluto, b) <i>B. circulans</i> 70.1	59
Figura 26	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 15 días después de la siembra e inoculación de coronas, a) Testigo absoluto, b) <i>B. pasteurii</i> 72.4.	60
Figura 27	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 15 días después de la siembra e inoculación de coronas, a) Testigo absoluto, b) <i>B. pasteurii</i> 94.1	60
Figura 28	Altura (cm) de <i>Asparagus officinalis</i> L., 15 días después de la inoculación de <i>Bacillus</i> spp.	61
Figura 29	Número de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L., 15 días después de la inoculación de <i>Bacillus</i> spp.	62
Figura 30	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 30 días después de la siembra e inoculación de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>B. circulans</i> 70.1.	64
Figura 31	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 30 días después de la siembra e inoculación de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>B. pasteurii</i> 72.4	64
Figura 32	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 30 días después de la siembra e inoculación de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) <i>B. pasteurii</i> 94.1	65
Figura 33	Altura (cm) de <i>Asparagus officinalis</i> L., 30 días después de la inoculación de <i>Bacillus</i> spp.	65
Figura 34	Número de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L., 30 días después de la inoculación de <i>Bacillus</i> spp.	67

Figura 35	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 45 días después de la siembra e inoculación de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) <i>B. circulans</i> 70.1	67
Figura 36	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 45 días después de la siembra e inoculación de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) <i>B. pasteurii</i> 72.4	68
Figura 37	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 45 días después de la siembra e inoculación de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) <i>B. pasteurii</i> 94.1	68
Figura 38	Altura (cm) de <i>Asparagus officinalis</i> L., 45 días después de la inoculación de <i>Bacillus</i> spp.	69
Figura 39	Número de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L., 45 días después de la inoculación de <i>Bacillus</i> spp.	71
Figura 40	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 60 días después de la siembra e inoculación de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) <i>B. circulans</i> 70.1	71
Figura 41	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 60 días después de la siembra e inoculación de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) <i>B. circulans</i> 72.4	72
Figura 42	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. 60 días después de la siembra e inoculación de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) <i>B. pasteurii</i> 94.1	72
Figura 43	Altura (cm) de <i>Asparagus officinalis</i> L., 60 días después de la inoculación de <i>Bacillus</i> spp.	73
Figura 44	Número de tallos de <i>Asparagus officinalis</i> L., 60 días después de la inoculación de <i>Bacillus</i> spp.	73

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de *Asparagus officinalis* L. “espárrago” es económicamente muy importante (Borrego, 2014) y es el producto abanderado de las exportaciones hortofrutícolas peruanas (Canto *et al.*, 2008). Los valles de la costa de La Libertad, Ica, Ancash y Lima cuentan con las condiciones climáticas ideales para la producción de espárrago, lo cual permite un abastecimiento sostenido todo el año, con uno de los mejores rendimientos a nivel mundial ($12,2 \text{ tha}^{-1}$); sin embargo, existen limitantes que pueden disminuir la productividad competitiva de este cultivo. Entre las más importantes están la fertilidad de los suelos, escasez del recurso hídrico, limitada asistencia técnica y elevados costos de inversión y producción (Agrobanco, 2007).

Los fertilizantes químicos correctamente utilizados incrementan la productividad y rentabilidad de los cultivos agrícolas como el espárrago; no obstante, cada año aumenta la cantidad de fertilizantes por aplicar, debido a la menor eficacia de adsorción en el suelo y absorción por la planta (Nicolalde & Quintana, 2010) y bajo un manejo inadecuado, los fertilizantes químicos contaminan el ambiente (Perleche & Rentería, 2013).

Con el objetivo de mitigar el impacto ambiental causado por el uso excesivo de los insumos químicos en la agricultura, se investiga la diversidad de microorganismos rizosféricos como las rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR), que incluyen especies del

género *Bacillus*. Estas bacterias estimulan los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes, fijan nitrógeno atmosférico, solubilizan fosfato (Romero & Zapata, 2014), producen reguladores de crecimiento y sideróforos, así como también reducen el ataque de fitopatógenos e insectos (Altuna & Pelaez, 2013; Bhattacharyya & Jha, 2012).

Se han reportado investigaciones sobre *Bacillus* spp., en las que se ha demostrado incremento en la germinación (Luna *et al.*, 2013) y emergencia (Adesemoye *et al.*, 2009), desarrollo vegetativo (Luna *et al.*, 2013) y rendimiento (Salaheddin *et al.*, 2010) de los cultivos agrícolas; no obstante, también se han obtenido resultados diferentes a los esperados (Astorga *et al.*, 2014). En el rizoplasma y rizósfera de los cultivos como el espárrago se encuentran especies de *Bacillus* con características de promotoras de crecimiento en plantas; sin embargo, no se ha realizado investigación para aislarlas, caracterizarlas y determinar su efecto en los cultivos agrícolas.

Tecnológicamente las especies de *Bacillus* son fáciles de aislar y cultivar en sustratos de bajo costo. Asimismo, forman esporas que permanecen viables bajo condiciones desfavorables (Calvo & Zúñiga, 2010), por lo que se consideran apropiadas para constituir biofertilizantes que pueden ser aplicados a las semillas o el suelo, con éxito en la sobrevivencia y establecimiento de las bacterias. Los resultados de la presente investigación permitirán identificar especies de *Bacillus* propias de la región, con potencial para la biofertilización, generando valor agregado a la biodiversidad regional, a la vez que se disminuye el riesgo para la salud de los seres vivos y el efecto negativo de los insumos químicos en el ambiente.

El problema planteado fue: ¿cuáles son las características de las especies de *Bacillus* aisladas del rizoplasma y rizósfera de espárrago y cuál es su potencial como promotoras de crecimiento en plantas?. El objetivo general fue: aislar e identificar especies de *Bacillus* en el rizoplasma y rizósfera de espárrago y determinar su potencial como promotoras de crecimiento en plantas. Los objetivos específicos fueron: aislar e identificar fenotípicamente especies de *Bacillus* en el rizoplasma y

rizósfera de plantas de espárrago; cuantificar el nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos *in vitro* por las bacterias; seleccionar los seis cultivos de bacterias con los mayores valores en el nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos y determinar el efecto de las bacterias seleccionadas en la altura y número de tallos de plantas de espárrago. La hipótesis planteada fue: Las especies de *Bacillus* aisladas del rizoplaneo y rizósfera de espárrago fijan nitrógeno, solubilizan fosfatos, producen indoles e incrementan la altura y número de tallos de las plantas de espárrago.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

El género *Bacillus*, comprende especies filogenética y fenotípicamente heterogéneas. El crecimiento aerobio, la reacción positiva en la tinción de Gram, la forma bacilar y la formación de endosporas, se consideran características fundamentales para la clasificación; no obstante, la heterogeneidad en la fisiología, ecología y genética dificulta la generalización. Con base a las estrategias moleculares de la secuencia del ARNr 16S, este grupo se ha subdividido en cuatro. El primero, *Bacillus* senso estricto, agrupa 27 especies, entre las que se encuentra *B. subtilis*. El segundo grupo, senso lato, incluye bacilos formadores de esporas redondeadas, como *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis* y las taxas esporógenas como *Coryphanon*, *Exiguobacterium*, *Kurtia* y *Planococcus*. El tercer grupo considera a *B. polymyxa* y *B. macerans*, reclasificados en el género *Paenibacillus*. El cuarto grupo está formado por los géneros *Aneurobacillus* y *Brevibacillus* (Tejera *et al.*, 2011; Altuna & Pelaez, 2013).

Las especies de *Bacillus* son ubicuas y pueden ser aisladas de raíces y rizósfera de diversos cultivos agrícolas como *Physalis peruviana* L. “uchuva” (Venner & Martin, 2009), *Solanum tuberosum* L. “papa” (Calvo & Zúñiga, 2010), *Glycine max* L. “soya” (Wahyudi *et al.*, 2011), *Oryza sativa* L. “arroz” (Badía *et al.*, 2011), *Lycopersicon esculentum* Mill “tomate” (Ríos & Zúñiga, 2012), *Jatropha curcas* L. “piñon blanco” (Aguilar & Coral, 2013), *Gossypium* sp. “algodón” (Salaheddin *et al.*, 2010), *Zea mays* L. “maíz” (Altuna & Pelaez, 2013),

Eucaliptus nitens “eucalipto” (Angulo *et al.*, 2014) e inclusive malezas (Perleche & Rentería, 2013).

Las bacterias del género *Bacillus* favorecen el crecimiento de las plantas a través de mecanismos directos e indirectos. Los directos son: fijación de nitrógeno (Orozco & Martínez, 2009; Cuervo, 2010; Ríos & Zúñiga, 2012; Aguilar & Coral, 2013; Altuna & Pelaez, 2013; Perleche & Rentería, 2013), producción de ácido indolacético (Stechmann, 2011; Wahyudi *et al.*, 2011; Ríos & Zúñiga, 2012; Aguilar & Coral, 2013; Angulo *et al.*, 2014), citoquininas (Ortiz *et al.*, 2009) y giberelinas (Gutiérrez *et al.*, 2001) y solubilización de fosfato (Aguilar & Coral, 2013; Altuna & Pelaez, 2013; Perleche & Rentería, 2013).

Los mecanismos indirectos o de biocontrol incluyen la competencia por un nicho ecológico o por nutrientes, interacción directa con el patógeno (parasitismo y lisis enzimática), antibiosis, producción de sideróforos e inducción de resistencia sistemática en las plantas (Hernández *et al.*, 2006; Bhattacharyya & Jha, 2012). Las especies de *Bacillus* son de crecimiento rápido por lo que colonizan rápidamente un ambiente (Martim *et al.*, 2003; Perleche & Rentería, 2013), producen antibióticos (Schallmey *et al.*, 2004; Layton *et al.*, 2011), sideróforos (Wahyudi *et al.*, 2011), enzimas quitinolíticas (Reinoso *et al.*, 2007; Perleche & Rentería, 2013), compuestos antifúngicos difusibles y volátiles (Reinoso *et al.*, 2007). La antibiosis, competencia y actividad enzimática lítica son características de *Bacillus* spp. (Perleche & Rentería, 2013).

La inoculación de *Bacillus* se relaciona con incremento en la germinación en tomate (Ríos & Zúñiga, 2012), emergencia en maíz (Altuna & Pelaez, 2013), elongación de coleóptilos en maíz (Idris *et al.*, 2007), altura de plantas en tomate (Aysha *et al.*, 2012), longitud de raíz y tallo en soya (Wahyudi *et al.*, 2011), prolificidad de raíces laterales en *Arabidopsis* (Ortiz *et al.*, 2009), peso de biomasa aérea y radicular en cebada (Canbolat *et al.*, 2006), papa (Ekin *et al.*, 2009), tomate (Aysha *et al.*, 2012), maíz (Paredes, 2014), contenido de nitrógeno, fósforo y potasio en raíces y tallos de *Cucumis melo* “melón” (Egamberdiyeva, 2007), fósforo, hierro y zinc en hojas de fresa (Esitken *et al.*, 2010).

Las bacterias del género *Bacillus* pueden constituir biofertilizantes; sin embargo, en un inicio deben ser aisladas y caracterizadas. El potencial como PGPR

se investigó en *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de maíz. Se colectaron muestras de suelo rizosférico, se diluyeron en NaCl 0,85% plv, se sometieron a tratamiento térmico a 80°C y se sembraron en agar nutritivo. Se obtuvieron 226 cultivos puros de bacilos esporulados, entre los que se identificaron *Bacillus circulans* (54%), *B. lentus* (34%), *B. mycoides* (3%), *B. brevis* (2%), *B. pasteurii* (1%) y *B. subtilis* (1%). Con las bacterias se cuantificó 1,0–12,5ppm de ácido indolacético; 7,8–26,4ppm de nitrógeno fijado como amonio; 0,4–2,1ppm de fósforo solubilizado, así como también se detectó actividad proteolítica, quitinolítica y antagonica a *Fusarium verticillioides*, demostrándose su potencial como promotoras de crecimiento en plantas (Altuna & Pelaez, 2013).

En los ambientes desfavorables las bacterias maximizan su potencial como promotoras de crecimiento en plantas. En este contexto, se investigaron las especies de *Bacillus* aisladas de la rizósfera de malezas asociadas a maíz. Las bacterias se aislaron en agar nutritivo a 30°C por 48 horas, seleccionándose las colonias constituidos por bacilos Gram positivos esporulados. Se obtuvieron 285 cultivos puros de bacilos, identificándose *B. circulans* (20%), *B. firmus* (19%), *B. cereus* (18%), *B. sphaericus* (6%), *B. subtilis* (4%), *B. licheniformis* (2%), *B. lentus* (1%) y *B. brevis* (1%). Con las bacterias se cuantificó 0,4–34,47ppm de ácido indolacético; 18,0-24,65ppm de nitrógeno fijado como amonio, 0,18–3,43ppm de fósforo solubilizado y también se detectó actividad proteolítica, quitinolítica y antagonica a *Fusarium verticillioides*, características por las que estas bacterias son consideradas con potencial para su utilización como biofertilizantes (Perleche & Rentería, 2013).

En el marco de la implementación de una producción orgánica se evaluaron microorganismos promotores de crecimiento en tomate. Los microorganismos identificados como *Bacillus pumilus* (7), *B. altitudinis* (1), *B. subtilis* (1), *Bacillus* sp. (6) y *Rhodospiridium paludigenum* (1) se cultivaron en caldo tripticasa de soya para la cuantificación de ácido indolacético, agar Pikovskaya y agar quitina, para la detección de solubilización de fosfatos y enzimas quitinasas, respectivamente. El microorganismo que alcanzó mayor valor en el AIA se inoculó en semillas de tomate para determinar el efecto como promotor de crecimiento. Los microorganismos solubiliaron fosfato y se cuantificó 2,49–5,47ppm de AIA,

alcanzándose el mayor valor con *B. subtilis*. El diagrama del plano factorial obtenido demostró que las plantas de tomate inoculadas presentaron los mayores valores en longitud y peso de raíces y tallos (Rodríguez, 2013).

Las bacterias del género *Bacillus* son una alternativa para el control de tizones foliares y pudrición de frutos causados por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). Se investigó la actividad antagónica de *Bacillus subtilis* en pruebas de confrontación directa y mediante el uso de filtrados de cultivos bacterianos. En las pruebas de confrontación directa, *B. subtilis* inhibió en 62–80% el crecimiento del fitopatógeno, con halos de inhibición de 0,20–0,88 cm. Los filtrados de los cultivos esterilizados a 120°C por 15 minutos inhibieron hasta en 70% la germinación de conidios. Las cepas CBCC2, CBRF24, CBCK47 y CBMN22 inhibieron al hongo tanto en confrontación directa como en los filtrados, demostrándose el potencial de estas bacterias para el control de *C. gloeosporioides* (Ruiz *et al.*, 2014).

Los microorganismos aislados de la rizósfera de *Cicer arietinum* L. “garbanzo” se investigaron en su actividad antagónica *in vitro* contra los hongos causantes de la rabia del garbanzo: *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*. Los microorganismos se confrontaron en cultivos duales y se seleccionaron los cuatro con la mayor inhibición del crecimiento de los patógenos. Éstos identificados como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma lignorum* y *T. harzianum* fueron combinados con *Glomus intraradices* y su efectividad para controlar la enfermedad se comparó con un tratamiento químico (PCNB) y un testigo absoluto. Los tratamientos se aplicaron a la semilla, y se evaluó la severidad de la enfermedad cada 15 días y la colonización de raíces por los antagonistas a los 45 días. La colonización de *B. subtilis* + *G. intraradices* fue de $1,3 \times 10^8$ ufc/g de raíz fresca–75%, con 57% de reducción de la severidad de la enfermedad, concluyéndose que la aplicación en conjunto de *B. subtilis* y *G. intraradices* es una alternativa para el control de hongos patógenos en el garbanzo (Paredes *et al.*, 2009).

2.2 Base teórica

En la “Agricultura moderna”, las técnicas agrícolas introducidas, el afán de lucro de los grandes productores y la necesidad de subsistencia de los campesinos, ha producido una grave deforestación en el planeta, aumento de la erosión y pérdida de la capacidad productiva de los suelos (Dávila, 2004). La agricultura orgánica propone para el crecimiento y desarrollo de los cultivos la utilización de opciones tecnológicas como las bacterias promotoras de crecimiento en plantas para producir alimentos sanos, proteger la calidad del ambiente y la salud humana e intensificar las interacciones biológicas y los procesos naturales beneficiosos (Dávila, 2004).

En la rizósfera de las plantas se consideran tres componentes: el suelo rizosférico, el rizoplano y la raíz misma. El suelo rizosférico es la zona del suelo influenciada por las raíces a través de la liberación de exudados por efecto de la actividad microbiana. El rizoplano es la superficie de la raíz, incluidas las partículas fuertemente adheridas a la raíz. La raíz misma también forma parte de la rizósfera, porque determinados microorganismos son capaces de colonizar los tejidos internos (Nihorimbere *et al.*, 2011).

El término rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas, conocido por sus siglas en inglés PGPR (Plant growth promoting rhizobacteria) fue propuesto por Kloepper & Schroth en 1978, para describir a las bacterias que habitan la rizósfera de las plantas y que pueden tener un efecto sobre los cultivos. En 1996, se propusieron los términos PGPB (Plant growth promoting bacteria o bacterias promotoras de crecimiento en plantas) y biocontrol – PGPB (Biocontrol – plant growth promoting bacteria o bacterias promotoras del crecimiento de plantas con actividad de biocontrol). El término PGPB es aplicable a las bacterias que influyen directamente sobre el metabolismo de las plantas, promoviendo el aumento de la toma de agua y nutrientes, el desarrollo del sistema radical y la estimulación de la actividad de otros microorganismos rizosféricos beneficiosos. Las biocontrol–PGPB describe a las bacterias que adicionalmente tienen la capacidad de suprimir fitopatógenos mediante producción de metabolitos inhibitorios o por la inducción de

resistencia natural en la planta. Estos términos permiten incluir a otras bacterias benéficas que no son rizobacterias, entre las que destacan los rizobios (Hernández *et al.*, 2006).

Las PGPR benefician a los cultivos agrícolas a través de mecanismos directos e indirectos. La promoción directa ocurre cuando las PGPR sintetizan metabolitos y facilitan a las plantas la toma de nutrientes mientras que la promoción indirecta es consecuencia de la disminución o prevención del efecto deletéreo de fitopatógenos por las PGPR. Los mecanismos directos incluyen la síntesis de reguladores del crecimiento (auxinas, giberelinas, citoquininas), solubilización de fosfatos minerales, fijación de nitrógeno atmosférico, producción de sideróforos y estimulación del sistema de absorción de iones como los nitratos. Entre los mecanismos indirectos o de biocontrol se encuentran la competencia por un nicho ecológico o por nutrientes, la interacción directa con los patógenos (parasitismo y lisis enzimática), antibiosis o amensalismo, producción de sideróforos e inducción de resistencia sistémica a la planta (Delgado *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2006; Bhattacharyya & Jha, 2012).

Bacterias como *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter* y *Azotobacter* promueven el crecimiento de plantas, mayoritariamente a través de mecanismos directos, así como *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Streptomyces* lo hacen a través de mecanismos indirectos; no obstante, todas las PGPR presentan un mayor o menor grado de efectividad en ambos mecanismos (Guillén *et al.*, 2006; Franco, 2008; Karnwal, 2009; Martínez *et al.*, 2010; Salaheddin *et al.*, 2010). El efecto de las PGPR también se atribuye a la denominada “hipótesis aditiva”, según la cual más de un mecanismo están involucrados en la asociación planta-rizobacteria, los mismos que operan simultáneamente o en asociación. La suma de los diferentes mecanismos refleja los cambios observados en el crecimiento de las plantas, cuando son cultivadas bajo condiciones ambientales propicias (Bashan *et al.*, 1996).

El efecto positivo de las PGPR está relacionado con el crecimiento en longitud de las raíces laterales, así como el número y longitud de los pelos radiculares, cambios que se asocian con la síntesis de auxinas, citoquininas y giberelinas. En

un modelo hipotético, el AIA sintetizado por una bacteria que está adherida a la superficie de la semilla, o bien a la raíz en desarrollo, es tomado por la planta y junto con el AIA endógeno (de la planta) puede estimular la división y alargamiento de las células o bien promover la síntesis de ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico (ACC), con la activación de la enzima ACC sintasa. Por tanto, aumenta el ACC, que es un precursor inmediato del etileno, que a su vez inhibe la elongación de las raíces; no obstante, el ACC es hidrolizado por las bacterias (amino ciclopropano carboxilasa desaminasa: ACC desaminasa), transformándose en alfa-cetobutirato y amonio. Las bacterias inducen a la planta a sintetizar más ACC de lo que necesita para que éstas tengan una fuente de nitrógeno disponible. Una consecuencia directa de la disminución del ACC en la planta (endógeno y bacteriano) es la reducción de etileno, con incremento significativo en la formación de los pelos radiculares (Loredo *et al.*, 2004).

La solubilización de fosfatos precipitados consiste en la liberación de fosfato inorgánico soluble a partir de fosfatos insolubles y las PGPR responsables del proceso se denominan solubilizadoras del fósforo. El principal mecanismo, es la producción de ácidos orgánicos, aunque también se consideran los ácidos inorgánicos como el sulfhídrico, nitrito y carbónico, la excreción de protones acompañada de la asimilación del ión amonio y la acción de mecanismos reductores de los cationes. Por su parte, en el proceso de mineralización del fósforo, las PGPR pueden movilizar el fósforo de la materia orgánica no soluble del suelo y convertirlo en fósforo inorgánico soluble, mediante la excreción de enzimas hidrolíticas como fosfatasas, fitasas y fosfonatasas (Carreño, 2009).

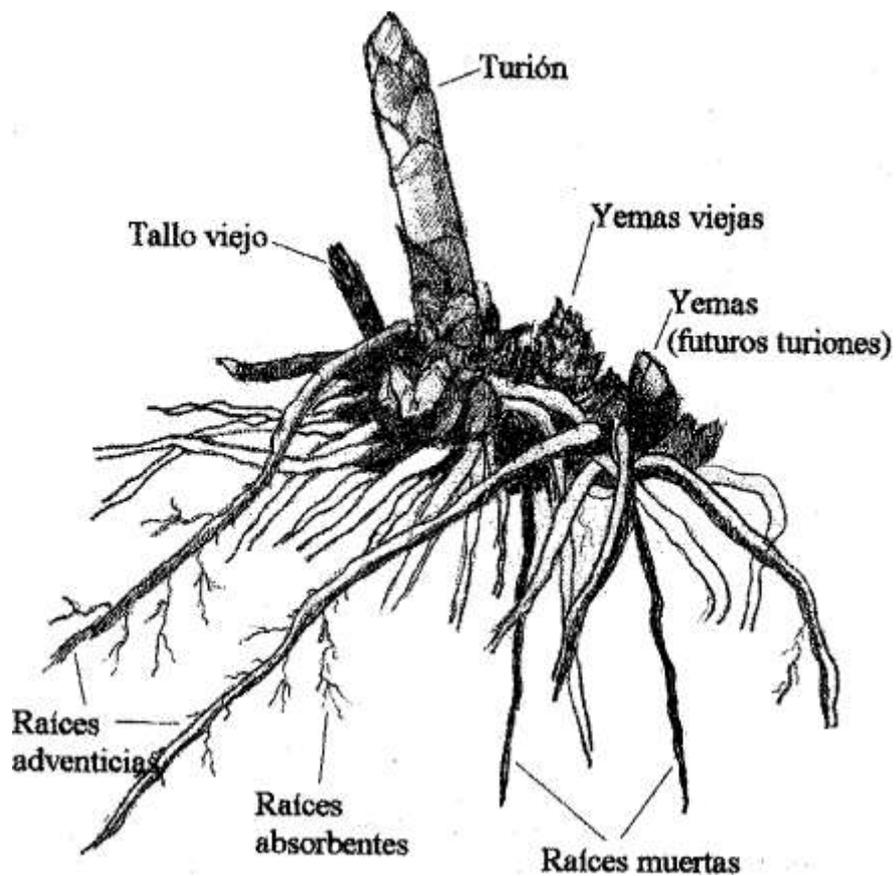
En la fijación de nitrógeno las bacterias reducen el nitrógeno molecular en amoníaco, gracias al complejo enzimático nitrogenasa, constituido por dos metaloproteínas: la molibdeno-ferroproteína (I) y la ferroproteína (II), requiriéndose las proteínas ferredoxina y flavodoxina como donadoras de electrones y reductores naturales de la nitrogenasa. En el proceso, los electrones son llevados por la ferredoxina hacia la ferroproteína, que a su vez activa el molibdeno-ferroproteína y se produce la reducción del nitrógeno, siendo luego fijado a compuestos aminados. Los géneros de bacterias fijadoras de nitrógeno diazótrofes de vida libre son:

Azospirillum, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Dexia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Clostridium* (Lara et al., 2007).

2.2.1 *Asparagus officinalis* L.

Clasificación taxonómica (Llatas & Llatas, 2013):

- Reino : Plantae
- División : Magnoliophyta (= Angiospermae)
- Clase : Liliopsida (= Monocotyledoneae)
- Orden : Liliiflorales
- Familia : Liliaceae
- Género : *Asparagus*
- Especie : *Asparagus officinalis* L.



El espárrago es originario de la región del este del Mediterráneo en el territorio ocupado actualmente por Italia y Grecia y de la región de Asia Menor, donde ha sido cultivado hace más de 2000 años. Los griegos y romanos usaban los espárragos como alimento y medicina; no obstante, su cosecha empezó a ser comercializada a fines del siglo XIX (Canto *et al.*, 2008). El género *Asparagus* L. se encuentra en la familia Liliaceae, que agrupa plantas productoras de numerosos alcaloides y compuestos sulfurados. Las especies más frecuentes son *A. acutifolius* y *A. aphyllus* con cladiolos de carácter rígido y punzante, a diferencia de *A. officinalis* y *A. albus* con cladiolos flexibles y no punzantes (Vallejo *et al.*, 2009).

El espárrago es una planta herbácea perenne, formada por tallos aéreos ramificados y una parte subterránea denominada comúnmente “garra” constituida por un tallo subterráneo, corona o rizoma, a partir del cual se producen yemas que originarán los turiones o espárragos y las raíces principales o de almacenamiento (Borrego, 2014). Éstas son cilíndricas, gruesas y carnosas y acumulan reservas para la producción de turiones. Los turiones son la parte comestible y comercializable y cuando se dejan vegetar son los futuros tallos ramificados. Las plantas son dioicas. Las masculinas son más productivas en turiones, más precoces y longevas que las femeninas, por lo que se prefieren, ya que al fructificar no hay posibilidad que las semillas originen nuevas plantas que incrementen la densidad de plantación (Kirschenbilder *et al.*, 2015).

El espárrago es uno de los alimentos más bajos en calorías con más de 90% de agua, rico en proteínas, fibra y vitaminas C, E y A con una poderosa acción antioxidante (Canto *et al.*, 2008). El producto comestible es de textura carnosa y firme. Las variedades de color verde claro o blanco Connovers Colosal y Mammouth White, se comercializan principalmente procesados y en su mayoría se cultivan en La Libertad. Las variedades de color verde oscuro Martha y Mary Washington, Palmetto, Argentenil, UC 72 y UC 157, se comercializan mayoritariamente frescos y se cultivan en Lima e Ica en dos campañas: enero a mayo - junio y la principal de setiembre a diciembre (Agrobanco, 2007).

La producción nacional de espárrago está centralizada en la costa, siendo La Libertad la región con mayores rendimiento y producción. Desde enero a abril existe una alta productividad, pero con una baja calidad del cultivo, incrementándose el porcentaje de descarte. Por el contrario, de mayo a setiembre la calidad es mayor pero con menor productividad. Los mejores meses para cosechar son octubre a diciembre. Casi la totalidad del volumen de producción, a diferencia de China, está destinada al mercado externo porque el consumo local es menor a 1 kg per cápita anual, evidenciándose que este producto no es habitualmente consumido por el poblador peruano (Agrobanco, 2007).

Perú fue el primer exportador de espárragos en el mundo durante el 2007. En los últimos 7 años las ventas al exterior en sus tres presentaciones: frescos, congelados y preparados crecieron a una tasa promedio anual de 23,2; 13,1 y 12,7%, respectivamente. El crecimiento de las exportaciones de espárragos frescos ha sido constante y excepcional al pasar de 54 millones de dólares exportados en el año 2000 a 232 millones en el 2007. Perú exporta espárragos bajo tres formas: fresco, en conserva y congelado. En el 2006, al espárrago fresco le correspondió el mayor aporte en el total de las exportaciones esparragueras (58,8%), seguido del espárrago en conserva con 32,7% y del espárrago congelado con 8,5% (Canto *et al.*, 2008).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Material biológico

El material biológico estuvo constituido por raíces con suelo rizosférico adherido de espárrago, cultivos puros de *Bacillus* spp. y coronas de espárrago cultivar UC-157 F2.

3.1.2 Población y muestra

En la investigación descriptiva la población estuvo constituida por las plantas de espárrago del fundo Josymar (50ha) en Virú, Trujillo y se investigó una muestra no probabilística de 96 plantas colectadas durante abril de 2016. El número de muestras fue calculado (Vásquez *et al.*, 2012), tomando en cuenta una prevalencia de 90% (Anexo 1), determinada en un estudio piloto por los investigadores. En la investigación explicativa la población fueron los cultivos de *Bacillus* aislados e identificados en el rizoplano y rizósfera de espárrago durante abril de 2016 y la muestra no probabilística y por conveniencia estuvo constituida por seis cultivos de *Bacillus* spp. seleccionados.

3.2 Métodos

3.2.1 Variables de la fase descriptiva

Variables cuantitativas: Potencial como promotoras de crecimiento en plantas (nitrógeno fijado, fosfato solubilizado, indoles producidos).

3.2.2 Variables de la fase explicativa

Variable independiente: Cultivos (6) de *Bacillus* spp.

Variable dependiente: Desarrollo vegetativo de plantas de espárrago (altura y número de tallos).

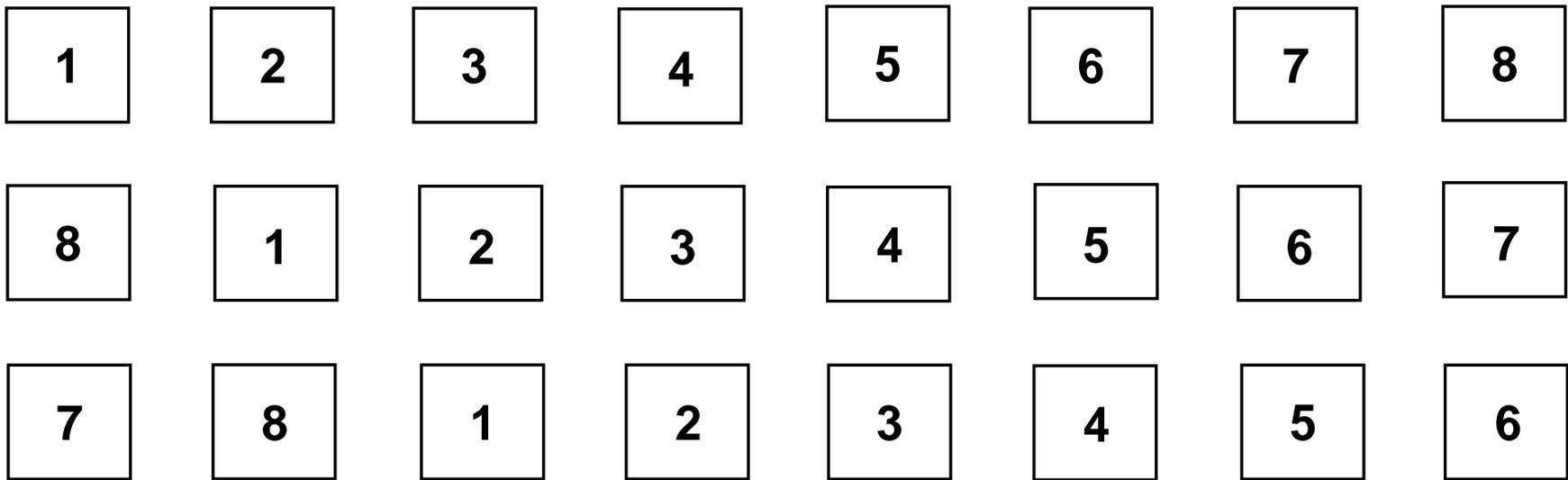
3.2.3 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

La investigación se realizó en dos fases. La primera fase descriptiva correspondió al aislamiento e identificación de *Bacillus* spp., cuantificación del nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos. En la segunda fase explicativa se determinó el efecto de seis cultivos de *Bacillus* spp. en la altura y número de tallos de plantas de espárrago, durante 60 días, en invernadero.

La hipótesis en la primera fase se contrastó con el diseño no experimental de “Solo Después” (Vásquez *et al.*, 2012) y en la segunda fase con el diseño experimental completamente aleatorio, DCA (Hernández *et al.*, 2010). Los tratamientos fueron ocho, correspondientes a T1: Testigo absoluto (agua destilada), T2: Testigo químico (urea 46% N), T3 – T8: *Bacillus* spp.. En cada tratamiento se consideraron tres repeticiones, totalizando 24 unidades experimentales (Figura 1).

3.2.4 Lugar de muestreo

Las 96 muestras de raíces con suelo rizosférico de espárrago se colectaron en el fundo Josymar, ubicado en el lote 10,6 del sector IV, Proyecto Especial Chavimochic, en la provincia de Virú, región La Libertad (Figura 2, tabla 1, anexo 2). Virú tiene una superficie de 3214,54 km² y limita por el norte con la provincia de Trujillo, por el este con las provincias de Julcán y Santiago de Chuco, por el sur con la provincia de Santa de la región Ancash y por el oeste con el Océano Pacífico (Municipalidad Distrital de Guadalupito, 2016). El fundo Josymar tiene 50 ha, distribuidas en 24 lotes de aproximadamente 1,5 ha cada uno. Al momento del muestreo 19 lotes estaban sembrados con espárragos cultivar UC-157 F2 (cuatro plantas por metro lineal), con 1,8-2,5 años transcurridos después del transplante de coronas y una población promedio de 30 000 plantas ha⁻¹.



T1: Testigo absoluto

T2: Testigo químico

T3 – T8: *Bacillus* spp.

Figura 1. Diseño completamente aleatorio para determinar el efecto de *Bacillus* spp. en *Asparagus officinalis* L.

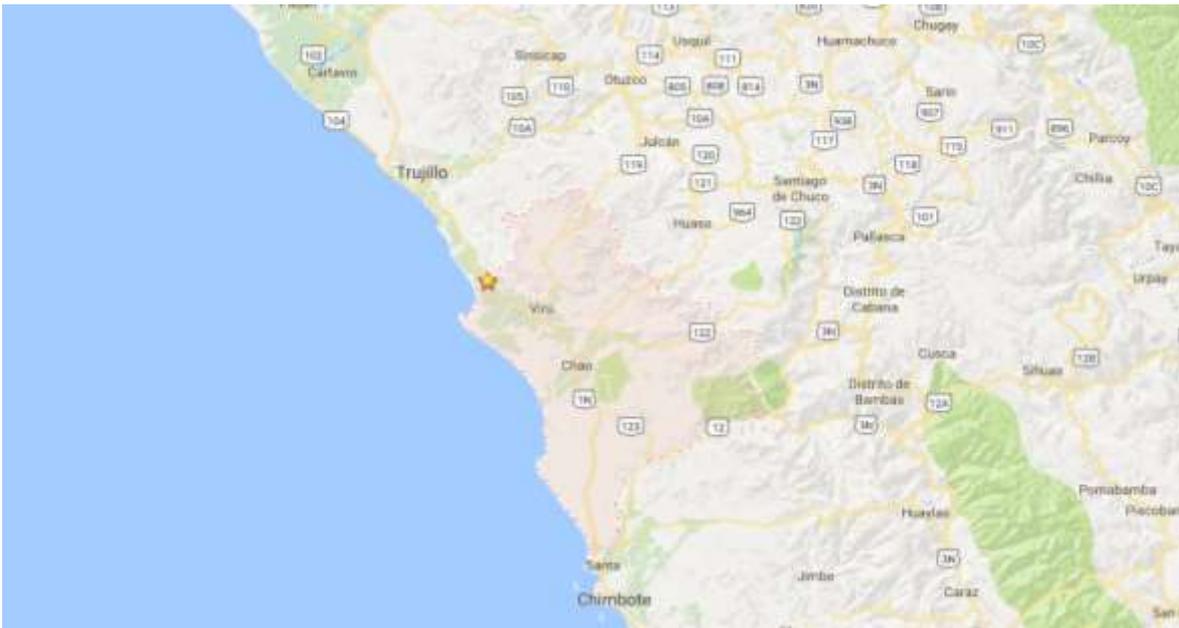


Figura 2. Ubicación de la provincia de Virú, región La Libertad, abril, 2016 (<https://www.google.com.pe/maps/place/Provincia+de+Vir%C3%BA/@-8.5471469,-78.7881687,9z/data=!4m5!3m4!1s0x91ac59407c7b0391:0x6c172095672753ce!8m2!3d-8.5528417!4d-78.6254767>).

Tabla 1. Lote de procedencia de muestras de raíces con suelo rizósferico de *Asparagus officinalis* L. en el Fundo Josymar, Virú, La Libertad

Lote	Nº de surcos	Nº de muestras
A1-B1-C1	54	15 (1-15)
A2-B2-C3	61	15 (16-30)
A3-B3-C3	62	15 (31-45)
A4-B4-C4	63	15 (46-60)
C5	56	5 (61-65)
A6-B6-C6	64	15 (66-88)
C7	49	5 (81-85)
C8	55	6 (86-91)
C9	51	5 (92-96)
Total: 19 lotes	515	96

3.2.5 Obtención de muestras

En el campo de cultivo de espárrago, cada cinco surcos se seleccionó la planta más vigorosa y se extrajeron aproximadamente 50g de raíces con suelo adherido (Figura 3), se depositaron en bolsas de polietileno debidamente identificadas (Figura 4) e inmediatamente se transportaron en una caja térmica ($10 \pm 1^\circ\text{C}$) hacia el Laboratorio de Microbiología y Parasitología, sección Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo en Lambayeque.

En simultáneo al muestreo de raíces con suelo rizosférico de espárrago para el aislamiento de *Bacillus* spp., se colectó una muestra representativa de 1 kg de suelo para realizar el análisis físico-químico en el Instituto Nacional de Innovación y Extensión Agraria, Estación Experimental Vista Florida de Chiclayo. Según los resultados (Tabla 2), el suelo es ligeramente alcalino (pH 6,5) y ligeramente salino (CE $3,06 \text{ dSm}^{-1}$), con textura arenosa, niveles bajos de materia orgánica (0,23%), nitrógeno (0,103 ppm), fósforo disponible (6,0 ppm) y potasio (203,0 ppm).

3.2.6 Aislamiento e identificación fenotípica de bacterias del género *Bacillus*

Para el aislamiento de *Bacillus* spp. (Ríos & Zúñiga, 2012), cada muestra de raíces con suelo rizosférico fue deshidratada (Figura 5) bajo sombra durante 72 horas y después fue triturada y tamizada. Del material obtenido se tomaron 10g para realizar una dilución en 90 mL de solución salina esterilizada: NaCl 0,87 % p/v (Figura 6). Las diluciones se llevaron a tratamiento térmico, a 80°C , durante 10 minutos y luego se enfriaron rápidamente en agua de caño. A continuación, se tomó una alícuota, se sembró mediante la técnica de agotamiento y estría sobre la superficie de agar nutritivo en placas de Petri (Figura 7, anexo 3) y se incubó en aerobiosis a 30°C , durante 48 horas. Con las bacterias de las colonias desarrolladas (Figura 8) se realizó tinción de Gram y los bacilos Gram positivos esporulados, catalasa positivos, se cultivaron en agar Tripticasa Soya (TSA), constituyendo los cultivos puros que se guardaron en refrigeración (8°C).



Figura 3. Extracción de raíces con suelo rizosférico de *Asparagus officinalis* L.



Figura 4. Muestras de raíces con suelo rizosférico de *Asparagus officinalis* L.

Tabla 2. Análisis físico-químico de suelo rizosférico de *Asparagus officinalis* L. en Virú, La Libertad, 2016

Clase textual	pH	CE (dSm⁻¹)	MO (%)	N (%)	P (ppm)	K (ppm)
Arenosa	6,5	3,06	0,23	0,103	6,0	203,0



Figura 5. Raíces con suelo rizosférico de *Asparagus officinalis* L. deshidratadas.



Figura 6. Suspensión de raíces y suelo rizosférico de *Asparagus officinalis* L. en solución salina esterilizada.



Figura 7. Siembra en agar nutritivo mediante la técnica de agotamiento y estría.

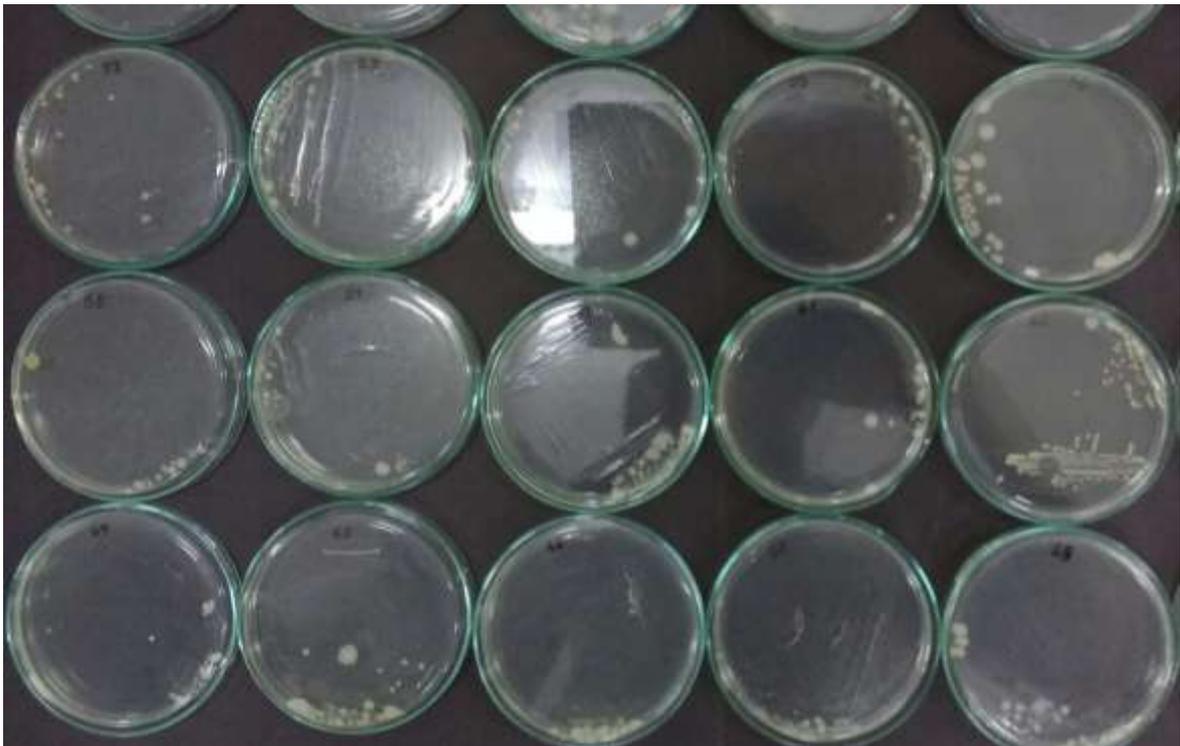


Figura 8. Colonias de *Bacillus* spp. desarrolladas en agar nutritivo.

El género *Bacillus* se identificó fenotípicamente (Guillén *et al.*, 2006; Cuervo, 2010), investigando la posición de las esporas y realizando las pruebas de catalasa, utilización del citrato como fuente de carbono y energía, crecimiento anaerobio en glucosa; producción de acidez a partir de arabinosa, manitol y xilosa; hidrólisis del almidón y lecitina y producción de acetoína o 2,3 butanodiol en la prueba de Voges–Proskauer.

3.2.7 Mantenimiento de cultivos de *Bacillus* spp.

Los cultivos puros de *Bacillus* spp. identificados se sembraron en agar tripticosa soya (TSA) y se mantuvieron en refrigeración (8 °C), realizándose subcultivos cada 30 días.

3.2.8 Cuantificación de nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos

Con las bacterias del género *Bacillus* aisladas e identificadas se cuantificó el amonio, producto de la fijación de nitrógeno, el fósforo soluble, producto de la solubilización de fosfatos, y los indoles producidos. Para la obtención del inóculo, cada bacteria se cultivó en 5 mL de caldo nutritivo a 30 °C, durante 24 horas (Córdova, 2016). Posteriormente, el caldo se centrifugó a 3500 rpm, durante 5 minutos, el sobrenadante se eliminó, el sedimento se lavó en solución salina esterilizada (NaCl 0,87 % p/v) y su concentración se estandarizó a 9×10^8 cel mL⁻¹ por turbidimetría (tubo 3 del nefelómetro de Mc Farland) y con el espectrofotómetro de luz visible a 540nm: absorbancia = 0,20, equivalente a 10^8 células mL⁻¹ (Rodríguez, 2013).

a. Cuantificación de nitrógeno fijado *in vitro*

La cuantificación del nitrógeno fijado *in vitro* por las bacterias investigadas se realizó con el método colorimétrico de Berthelot o fenol hipoclorito (Lara *et al.*, 2007; Cadena & Martínez, 2011). El inóculo (5%:0,15 mL) de cada cultivo bacteriano fue depositado por triplicado en tubos de 15x150 mL conteniendo 3 mL de caldo extracto de suelo 10% (Anexo 4) y se incubaron a 30°C, por 72 horas, con agitación constante (150 rpm).

A continuación, se agregaron 9 mL de KCl 2M, se agitaron a 150 rpm durante 1 hora y se dejaron en reposo 1 hora adicional, para después tomar 10 mL de sobrenadante y centrifugarlos (3000 rpm) durante 5 minutos. Los sobrenadantes se vertieron en tubos de dilución y se añadieron 0,4 mL de solución alcohólica de fenol al 10%; 0,4 mL de nitroprusiato de sodio al 0,5% y 1 mL de solución oxidante. Los tubos se agitaron manualmente por 2 minutos y se dejaron en reposo durante 1 hora. La reacción se consideró positiva a la fijación de nitrógeno por la aparición de una coloración azul, leyéndose la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible a 632,9 nm. Las concentraciones de amonio se calcularon con la ecuación de la curva de calibración, obtenida previamente con diluciones sucesivas de una solución de 100 ppm de cloruro de amonio (Anexo 4).

b. Cuantificación de fosfato solubilizado *in vitro*

La cuantificación de fosfato solubilizado *in vitro* por las bacterias investigadas se realizó con el método colorimétrico del molibdato (Alvarado & Valderrama, 2014). El inóculo (5%:0.25mL) de cada cultivo bacteriano se sembró por triplicado en 5 mL de caldo National Botanical Research Institute's phosphate, NBRIP (Figura 9, anexo 5) y se incubaron a 30 °C, con agitación (150 rpm), por 96 horas. Después, los caldos fueron centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos y en el sobrenadante se cuantificó el fósforo soluble (Rodier & Rodi, 2005), considerándose una coloración azul, positiva a la solubilización de fosfato. La absorbancia se leyó en espectrofotómetro de luz visible a 690 nm y las concentraciones de fósforo soluble se calcularon con la ecuación de la curva de calibración, obtenida con diluciones sucesivas de una solución de 10 ppm de fósforo (Anexo 5).

c. Cuantificación de indoles producidos *in vitro*

La cuantificación de indoles producidos *in vitro* se realizó según la reacción colorimétrica de Salkowski (Mantilla, 2007; García & Muñoz, 2010). El inóculo (5%:0,25mL) de cada cultivo bacteriano fue sembrado por triplicado en 5mL de caldo tripticasa soya suplementado con triptófano (Figura 10, anexo 6). Después de la incubación a 30°C, por 72 horas, en agitación constante (150 rpm), los cultivos se centrifugaron a 3000 rpm, durante 5 minutos.

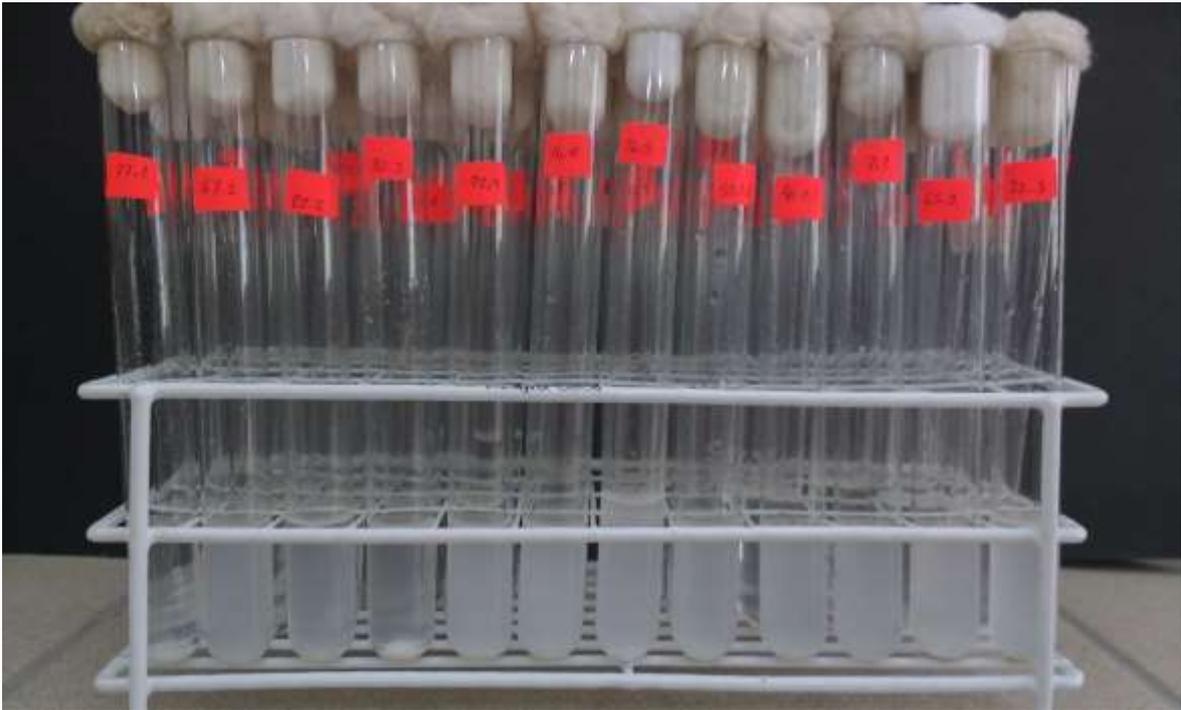


Figura 9. Caldo National Botanical Research Institute's phosphate cultivado con *Bacillus* spp.

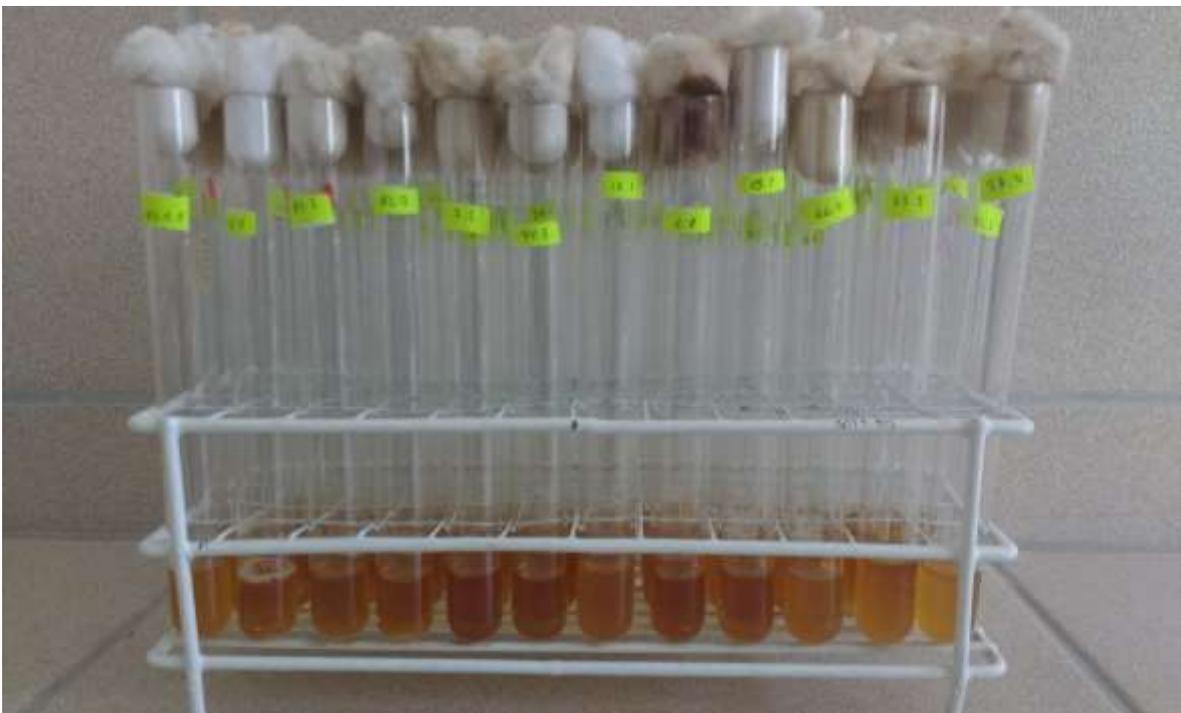


Figura 10. Caldo tripticasa soya suplementado con triptófano cultivado con *Bacillus* spp.

A continuación, 0,4 mL de cada sobrenadante se depositaron en tubos, se agregaron 1,6 mL de reactivo de Salkowski modificado, se mezclaron y se dejaron en reposo durante 30 minutos, en oscuridad. La reacción se consideró positiva a la producción de indoles por la aparición de una coloración grosella, leyéndose la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible a 530 nm. Las concentraciones de indoles se calcularon con la ecuación de la curva de calibración, obtenida previamente con diluciones sucesivas de una solución 100 ppm de ácido indolacético (Anexo 6).

3.2.9 Selección de *Bacillus* spp.

Los cultivos de *Bacillus* spp. seleccionados para la fase experimental de la investigación fueron seis, correspondientes a los valores máximos en la concentración de amonio (dos cultivos), fósforo soluble (dos cultivos) e indoles producidos (dos cultivos).

3.2.10 Efecto de *Bacillus* spp. en plantas de espárrago

Los seis cultivos de *Bacillus* spp. seleccionados se inocularon en coronas de espárrago (Figura 11), determinándose el efecto en el desarrollo vegetativo de las plantas, durante 60 días, en condiciones de invernadero. El suelo experimental estuvo constituido por 96 kg de una mezcla de suelo agrícola, arena de río y humus en la proporción de 2:1:1 (Figura 12), que fue distribuido en macetas de arcilla de 4,5 kg de capacidad, a razón de 4 kg por maceta (Figura 13).

El cultivo de espárrago y la inoculación de *Bacillus* spp. se realizó entre el 20 de octubre al 19 de diciembre de 2016, registrándose las temperaturas máxima (27°C), mínima (13°C) y media (15°C), valores obtenidos por la Estación Meteorológica de la Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, ubicado en el fundo "El Cienago" de Lambayeque (Anexo 7). En el ensayo se sembraron coronas de espárrago cultivar UC-157 F2, luego de ser tratadas por inmersión durante 5 minutos (Figura 14), en una solución del fungicida Benomyl polvo mojable - WP (Benlate), en la dosis de 2 gL⁻¹ de agua declorada previamente durante 24 horas.



Figura 11. Coronas de *Asparagus officinalis* L.



Figura 12. Suelo agrícola, arena de río y humus.



Figura 13. Suelo experimental contenido en macetas de arcilla.



Figura 14. Inmersión de corona de *Asparagus officinalis* L. en solución fungicida.

El cultivar UC-157 F2 fue obtenido en Estados Unidos en 1980 (Delgado, 2007). Es un híbrido de segunda generación, descendiente de UC-157 F1, por lo que tiene unas características similares, pero de menor uniformidad, vigor y producción. Es un cultivar precoz que se adapta a la recolección de turiones (brotes) verdes y blancos. Conforme desarrolla la planta forma tallos secundarios hacia arriba y raíces carnosas hacia abajo. El crecimiento inicial diario de la plántula a partir de la germinación es de 10 a 12 mm. Los nuevos brotes (tallos) que aparecen tienden a desarrollar más, acorde con la amplitud del sistema radicular y gracias a la acumulación de mayores reservas en las raíces carnosas (Regalado, 1992).

El inóculo fue obtenido con *Bacillus* spp. cultivadas en caldo nutritivo, a 30 °C, durante 24 horas y después de la centrifugación se obtuvieron 500 mL de cada cultivo bacteriano en solución salina esterilizada, NaCl 0,87% p/v (Figura 15), cuya concentración se estandarizó a 9×10^8 cel mL⁻¹ por turbidimetría (tubo 3 del nefelómetro de McFarland). Transcurridos 30 minutos del tratamiento con fungicida, las coronas de espárrago se asperjaron con el inóculo bacteriano (100 mL por corona), con ayuda de un pulverizador plástico de 500 mL de capacidad (Figura 16) y después de 30 minutos de reposo a temperatura ambiental (25 °C), se sembraron en el suelo experimental, a razón de una corona por maceta.

Los riegos se realizaron cada 3 días con agua potable declorada, tomando en cuenta los requerimientos hídricos de las plantas. Después de 15 días de la siembra, en el testigo químico se aplicaron 250 mL de una solución de fertilizante nitrogenado (Urea 46%) en la dosis 5 gL⁻¹ de agua, cada 30 días. Transcurridos 15 días de la siembra y a los 30, 45 y 60 días se midió la altura de las plantas (Figura 17) y se contaron los tallos. La altura se expresó en cm, considerado desde la base del tallo más alto hasta la yema terminal (Puicón, 2014). Con los valores de altura y número de tallos se calculó el índice de efectividad de la inoculación (IEI) en porcentaje (Carreño, 2009):

$$\text{IEI (\%)} = \frac{\text{Tratamiento con inoculación} - \text{Control sin inoculación}}{\text{Control sin inoculación}} \times 100$$

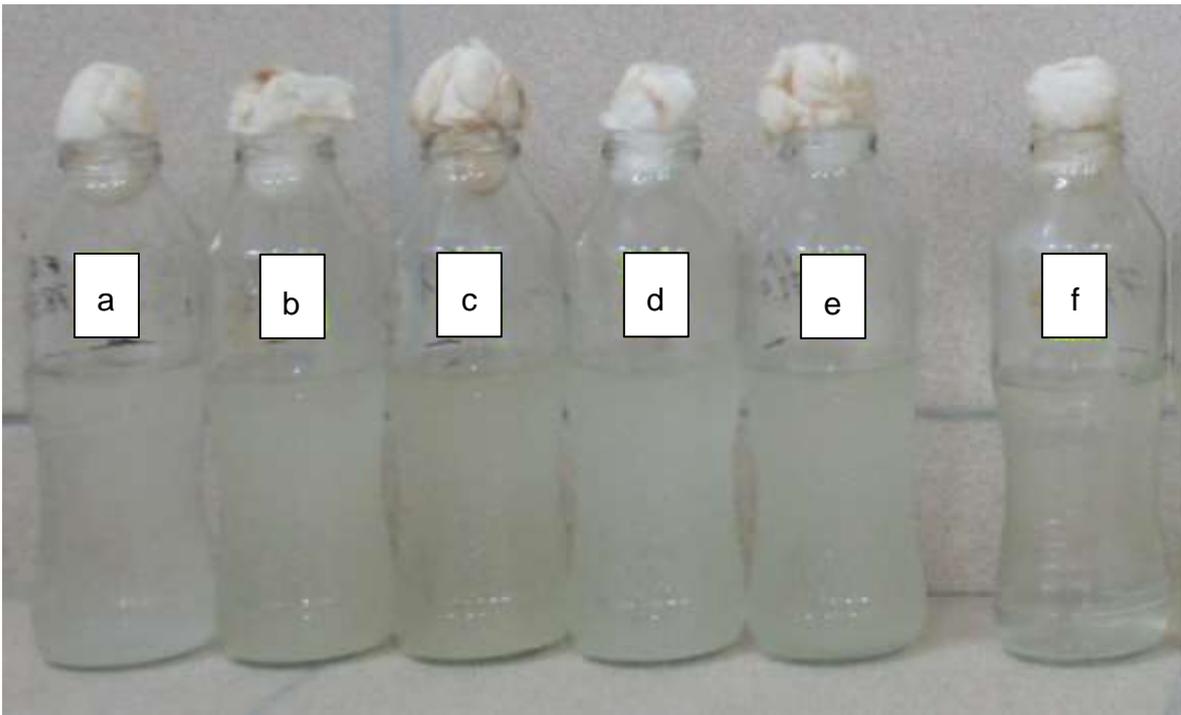


Figura 15. Inóculo de *Bacillus* spp. en solución salina esterilizada, a) *B. circulans* 70.1, b) *B. pasteurii* 72.4, c) *B. circulans* 77.5, d) *B. subtilis* 45.6, e) *B. pasteurii* 94.1, f) *B. sphaericus* 81.1.



Figura 16. Aplicación del inóculo bacteriano en corona de *Asparagus officinalis* L.



Figura 17. Medición de altura de tallo de *Asparagus officinalis* L.

3.2.11 Análisis estadístico de los datos

Para el diseño experimental completamente aleatorio, el modelo aditivo lineal fue:

$$Y_{ij} = u + t_i + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = observación del i -ésimo tratamiento, j -ésima repetición

u = media general de la variable respuesta

t_i = efecto i -ésimo tratamiento, siendo $i = 1,2,3,4,5,6,7,8$

E_{ij} = error experimental en el i -ésimo tratamiento, j -ésima repetición

$H_0 = u_1 = u_2 = u_3 = u_4 = u_5 = u_6 = u_7 = u_8$

H_a = Al menos una media diferente

Con los valores de altura y número de tallos de las plantas se realizaron las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza y según los resultados se llevaron a cabo análisis paramétricos y no paramétricos (Hernández *et al.*, 2010). En el presente trabajo se utilizó el software estadístico SPSS versión 21 así como los programas de Microsoft Office Word, Excel versión 2013 y Minitab 15.

IV. RESULTADOS

4.1 *Bacillus* spp. aisladas e identificadas

El 100 % (96) de las muestras de rizoplano y rizósfera de espárrago resultó positivo al aislamiento de *Bacillus* spp., obteniéndose 309 cultivos puros, que fueron agrupados según la forma, borde, aspecto y elevación de las colonias, resultando 14 morfotipos de bacilos, con una frecuencia que osciló entre 0,65 y 44,04% (Tabla 3). Las bacterias del género *Bacillus* se observaron como bacilos Gram positivos, con esporas deformantes y no deformantes, positivos en la prueba de catalasa, negativos a la utilización de citrato como fuente de carbono y energía y positivos o negativos en el crecimiento anaerobio a glucosa; producción de acidez en arabinosa, manitol y xilosa; hidrólisis del almidón y lecitina y producción de acetoina o 2,3 butanodiol (Tabla 4).

En las bacterias del género *Bacillus* se identificaron nueve especies (Figura 18): *B. subtilis* (20,71%), *B. sphaericus* (20,71%), *B. pasteurii* (15,86%), *B. stearothermophilus* (11,0%), *B. alvei* (11,0%), *B. megaterium* (8,09%), *B. cereus* (8,09%), *B. circulans* (2,92%) y *B. pumilus* (1,62%).

Tabla 3. Características y frecuencia de morfotipos de *Bacillus* spp. aislados de rizoplano y rizósfera de *Asparagus officinalis* L.

Morfotipo	Colonia				Frecuencia	
	Forma	Borde	Aspecto	Elevación	N°	%
1	Circular	Ondulado	Brillante	Plana	133	44,04
2	Circular	Ondulado	Pulverulento	Plana	69	22,33
3	Circular	Espiculado	Brillante	Plana	26	8,41
4	Circular	Entero	Brillante	Convexa	21	6,79
5	Circular	Filamentoso	Brillante	Plana	16	5,18
6	Circular	Ondulado	Brillante	Convexa	12	3,88
7	Circular	Ondulado	Transparente	Plana	12	3,88
8	Circular	Rizoide	Brillante	Plana	4	1,30
9	Circular	Entero	Transparente	Plana	4	1,30
10	Circular	Ondulado	Pulverulento	Convexa	3	0,97
11	Circular	Rizoide	Pulverulento	Plana	3	0,97
12	Circular	Ondulado	Rugoso	Plana	2	0,65
13	Circular	Filamentoso	Pulverulento	Plana	2	0,65
14	Irregular	Filamentoso	Brillante	Plana	2	0,65
Total					309	100,00

Tabla 4. Características diferenciales de especies de *Bacillus* identificadas en rizoplano y rizósfera de *Asparagus officinalis* L. “espárrago”, 2016

<i>Bacillus</i> spp.	Catalasa	Citrato	Glucosa	Arabinosa	Manitol	Xilosa	Almidón	Lecitina	VP
<i>B. subtilis</i>	+	-	+	V	V	V	V	-	V
<i>B. sphaericus</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	V
<i>B. pasteurii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. stearothermophilus</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	-
<i>B. alvei</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	+
<i>B. megaterium</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>B. cereus</i>	+	-	+	-	-	-	V	+	V
<i>B. circulans</i>	+	-	+	-	-	-	V	-	+
<i>B. pumilus</i>	+	-	+	-	+	V	-	-	-

*V: variable

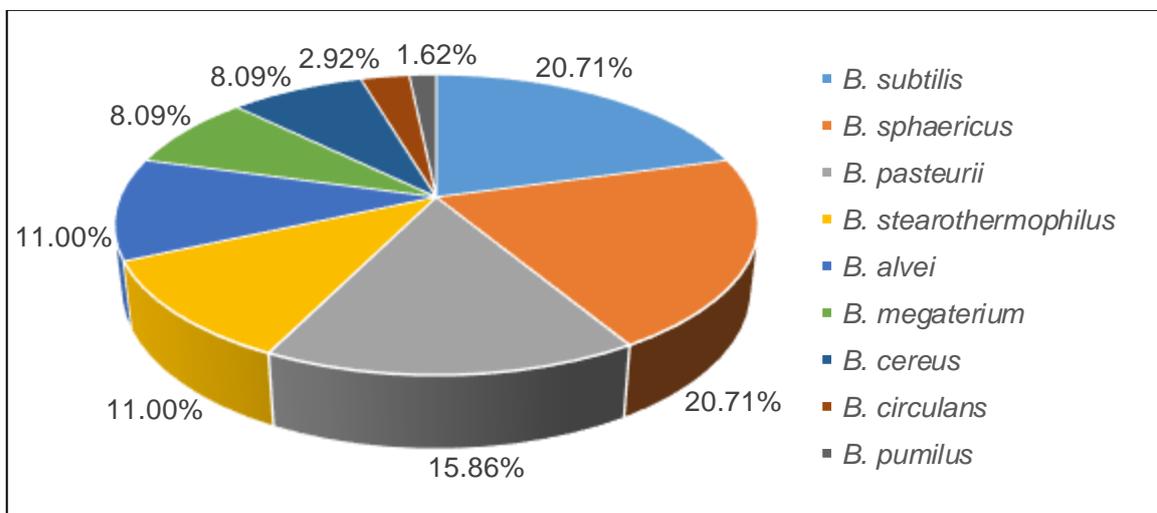


Figura 18. Frecuencia de especies de *Bacillus* identificadas en rizoplaneo y rizósfera de *Asparagus officinalis* L. “espárrago”, 2016.

4.2 Nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos por *Bacillus* spp.

El 99,03% (306) de cultivos de *Bacillus* spp. fijaron nitrógeno *in vitro* (Figura 19) y como producto de la fijación se detectó amonio, evidenciado por una coloración azul (Figura 20). La concentración de amonio osciló desde 0,079 hasta 26,384ppm (Tablas 5, 6, 7).

El 83,50% (258) de cultivos de *Bacillus* spp. solubilizaron fosfato *in vitro* (Figura 21) y como producto de la solubilización se detectó fósforo soluble, evidenciado por una coloración azul (Figura 22). La concentración de fósforo soluble fue de 0,022 a 8,316ppm (Tablas 8, 9, 10).

El 96,12% (297) de cultivos de *Bacillus* spp. produjeron indoles (Figura 23), evidenciados por una coloración grosella (Figura 24). La concentración de indoles producidos fue de 0,022 a 23,578ppm (Tablas 11, 12, 13).

4.3 Cultivos de *Bacillus* spp. seleccionados

Los cultivos de *Bacillus* spp. seleccionados correspondieron a *B. circulans* 70.1 y *B. pasteurii* 72.4 con 26,384 y 20,741ppm de amonio; *B. circulans* 77.5 y *B. subtilis* 45.6 con 8,316 y 8,302ppm de fósforo soluble; *B. pasteurii* 94.1 y *B. sphaericus* 81.1 con 23,578 y 20,467ppm de indoles (Tabla 14).

4.4 Efecto de *Bacillus* spp. en la altura y número de tallos de *Asparagus officinalis* L.

La altura y el número de tallos de las plantas de espárrago se incrementaron después de la inoculación de *Bacillus* spp. A los 15 días la altura fue de 9,5 a 27,3cm con *Bacillus* spp. y 8,3cm en el testigo absoluto (Figuras 25 a 28), registrándose índices de efectividad de 14,46% con *B. pasteurii* 94.1 y 228,92% con *B. pasteurii* 72.4 (Tabla 15). Asimismo, el número de tallos fue de 1,3 a 2,7 tallos con *Bacillus* spp. y 1,3 tallos en el testigo absoluto (Figura 29), registrándose índices de efectividad de 53,85% con *B. circulans* 77.5 y 107,69% con *B. circulans* 70.1 (Tabla 16).

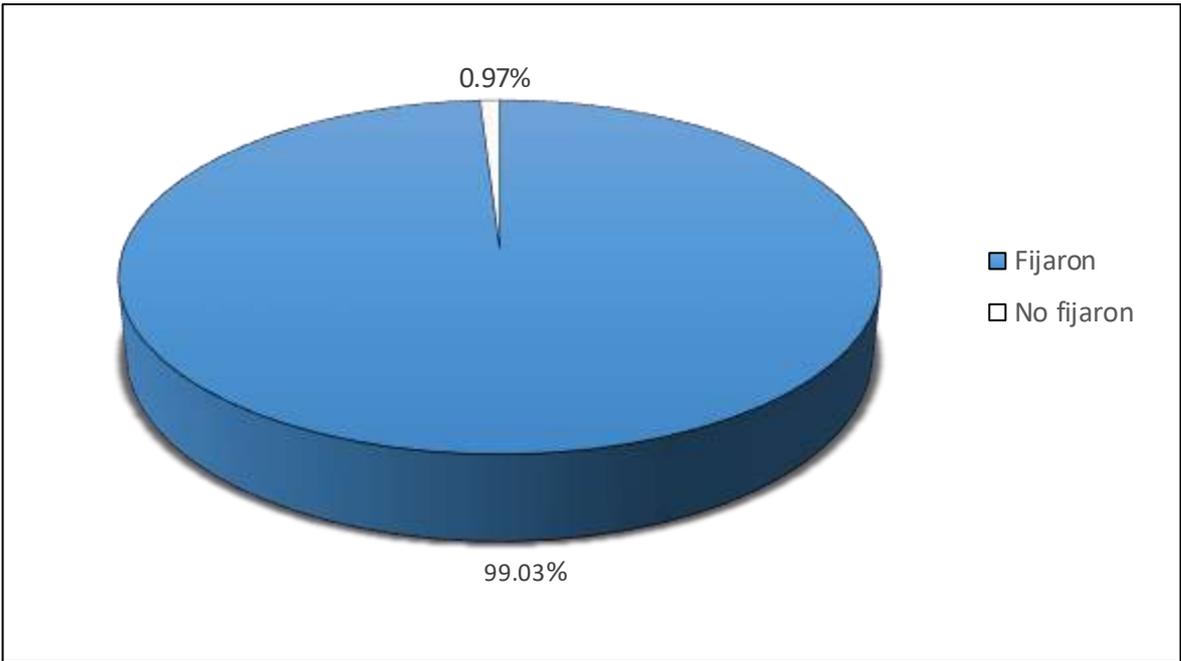


Figura 19. Porcentaje de *Bacillus* spp. fijadores de nitrógeno *in vitro*.

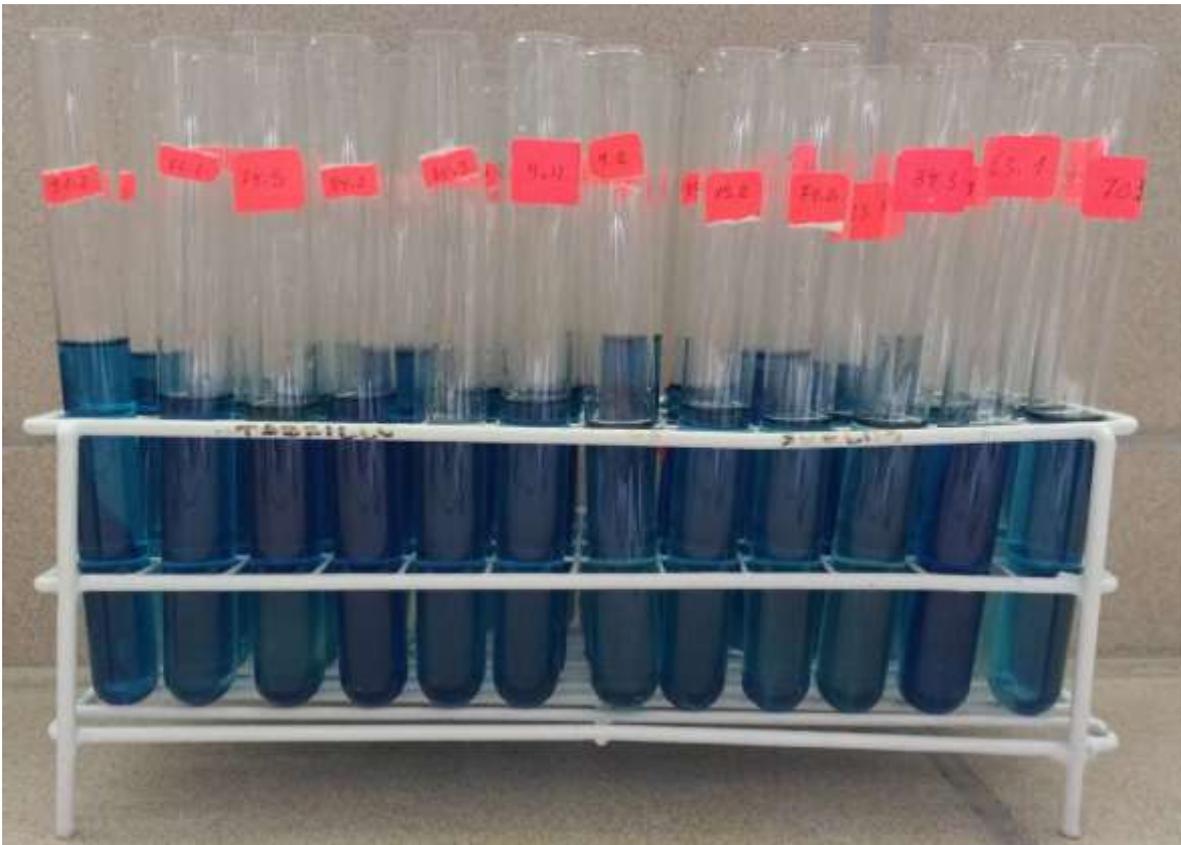


Figura 20. Coloración observada en la cuantificación de amonio.

Tabla 5. Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por *Bacillus circulans*, *B. pasteurii* y *B. sphaericus* aislados de *Asparagus officinalis* L.

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)	<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)	<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)
<i>B. circulans</i> 70.1	26,384	<i>B. pasteurii</i> 67.1	11,991	<i>B. pasteurii</i> 31.1	9,932
<i>B. pasteurii</i> 72.4	20,741	<i>B. sphaericus</i> 1.1	11.733	<i>B. circulans</i> 47.2	9,858
<i>B. sphaericus</i> 2.1	20,042	<i>B. pasteurii</i> 48.2	11.531	<i>B. pasteurii</i> 94.1	9,858
<i>B. sphaericus</i> 67.3	17,340	<i>B. pasteurii</i> 16.4	11.494	<i>B. sphaericus</i> 82.1	9,730
<i>B. pasteurii</i> 85.7	15,998	<i>B. pasteurii</i> 1.2	11.403	<i>B. sphaericus</i> 28.2	9,675
<i>B. sphaericus</i> 4.1	15,465	<i>B. sphaericus</i> 36.3	11.292	<i>B. pasteurii</i> 25.6	9,546
<i>B. pasteurii</i> 33.1	15,079	<i>B. pasteurii</i> 14.1	11.017	<i>B. sphaericus</i> 51.2	9,546
<i>B. sphaericus</i> 38.2	14,656	<i>B. sphaericus</i> 74.5	11.017	<i>B. pasteurii</i> 75.2	9,546
<i>B. sphaericus</i> 49.2	14,638	<i>B. sphaericus</i> 69.1	10.943	<i>B. sphaericus</i> 17.4	9,491
<i>B. sphaericus</i> 84.3	14,325	<i>B. pasteurii</i> 71.2	10.943	<i>B. sphaericus</i> 12.4	9,344
<i>B. pasteurii</i> 56.2	14,031	<i>B. sphaericus</i> 80.4	10.686	<i>B. sphaericus</i> 76.6	9,160
<i>B. circulans</i> 52.2	13,700	<i>B. sphaericus</i> 19.1	10.575	<i>B. pasteurii</i> 26.6	9,050
<i>B. sphaericus</i> 18.1	13,645	<i>B. sphaericus</i> 37.2	10.336	<i>B. pasteurii</i> 49.1	9,013
<i>B. pasteurii</i> 7.3	12,965	<i>B. pasteurii</i> 40.1	10.244	<i>B. sphaericus</i> 75.5	8,884
<i>B. sphaericus</i> 68.2	12,965	<i>B. sphaericus</i> 29.4	10.189	<i>B. sphaericus</i> 80.6	8,884
<i>B. pasteurii</i> 57.1	12,947	<i>B. sphaericus</i> 57.6	10.189	<i>B. sphaericus</i> 39.6	8,847
<i>B. sphaericus</i> 25.2	12,781	<i>B. sphaericus</i> 29.3	10,153	<i>B. pasteurii</i> 46.4	8,811
<i>B. sphaericus</i> 66.2	12,579	<i>B. sphaericus</i> 15.3	10,061	<i>B. sphaericus</i> 61.2	8,719
<i>B. sphaericus</i> 82.2	12,579	<i>B. circulans</i> 6.1	10,042	<i>B. sphaericus</i> 79.2	8,682
<i>B. sphaericus</i> 61.3	12,487	<i>B. pasteurii</i> 32.3	10,006	<i>B. sphaericus</i> 58.5	8,480
<i>B. sphaericus</i> 37.1	12,432	<i>B. sphaericus</i> 64.1	10,006	<i>B. pasteurii</i> 80.5	8,296
<i>B. pasteurii</i> 65.5	12,267	<i>B. sphaericus</i> 9.1	9,932	<i>B. sphaericus</i> 72.3	8,075

Continuación ...

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)	<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)	<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)
<i>B. pasteurii</i> 51.1	8,057	<i>B. sphaericus</i> 40.2	5,686	<i>B. sphaericus</i> 42.3	3,903
<i>B. sphaericus</i> 85.8	7,800	<i>B. pumilus</i> 63.4	5,686	<i>B. sphaericus</i> 91.2	3,884
<i>B. pasteurii</i> 15.1	7,634	<i>B. sphaericus</i> 56.3	5,612	<i>B. pasteurii</i> 61.1	3,590
<i>B. pasteurii</i> 6.2	7,487	<i>B. circulans</i> 77.5	5,575	<i>B. pasteurii</i> 7.2	3,425
<i>B. sphaericus</i> 62.3	7,248	<i>B. sphaericus</i> 93.8	5,575	<i>B. sphaericus</i> 81.1	3,296
<i>B. sphaericus</i> 41.2	7,083	<i>B. sphaericus</i> 4.4	5,336	<i>B. pasteurii</i> 74.2	3,149
<i>B. sphaericus</i> 70.3	6,899	<i>B. sphaericus</i> 55.1	5,281	<i>B. sphaericus</i> 68.1	3,020
<i>B. sphaericus</i> 26.2	6,789	<i>B. pasteurii</i> 16.3	5,189	<i>B. pasteurii</i> 80.2	2,616
<i>B. pasteurii</i> 89.2	6,789	<i>B. pasteurii</i> 92.3	5,116	<i>B. circulans</i> 74.1	2,248
<i>B. pasteurii</i> 93.7	6,752	<i>B. pasteurii</i> 36.2	5,024	<i>B. sphaericus</i> 66.5	1,917
<i>B. pasteurii</i> 50.2	6,697	<i>B. pasteurii</i> 67.5	5,024	<i>B. pasteurii</i> 78.3	1,917
<i>B. sphaericus</i> 73.5	6,697	<i>B. pasteurii</i> 79.1	4,822	<i>B. pasteurii</i> 38.1	1,862
<i>B. sphaericus</i> 83.6	6,494	<i>B. pasteurii</i> 42.2	4,767	<i>B. sphaericus</i> 9.2	1,807
<i>B. pasteurii</i> 55.3	6,035	<i>B. sphaericus</i> 83.3	4,619	<i>B. pasteurii</i> 93.1	1,531
<i>B. pasteurii</i> 59.3	5,998	<i>B. sphaericus</i> 74.4	4,601	<i>B. pasteurii</i> 54.1	1,274
<i>B. circulans</i> 78.2	5,943	<i>B. sphaericus</i> 82.7	4,417	<i>B. circulans</i> 34.3	0,943
<i>B. sphaericus</i> 66.3	5,833	<i>B. circulans</i> 55.5	4,381	<i>B. pasteurii</i> 22.2	0,244
<i>B. sphaericus</i> 50.1	5,796	<i>B. pasteurii</i> 29.2	3,976	<i>B. pasteurii</i> 76.1	0,226

Tabla 6. Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por *Bacillus pumilus*, *B. cereus* y *B. megaterium* aislados de *Asparagus officinalis* L.

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)	<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)	<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)
<i>B. pumilus</i> 52.3	18,921	<i>B. megaterium</i> 8.2	10,355	<i>B. cereus</i> 81.3	6,568
<i>B. cereus</i> 78.5	18,406	<i>B. cereus</i> 7.5	10,318	<i>B. megaterium</i> 34.1	6,513
<i>B. megaterium</i> 52.1	17,671	<i>B. pumilus</i> 39.1	10,263	<i>B. cereus</i> 70.2	6,458
<i>B. cereus</i> 87.4	17,046	<i>B. cereus</i> 86.2	9,858	<i>B. cereus</i> 45.3	6,366
<i>B. cereus</i> 35.1	16,733	<i>B. cereus</i> 35.3	9,601	<i>B. megaterium</i> 26.3	5,925
<i>B. megaterium</i> 10.3	15,686	<i>B. cereus</i> 53.2	9,270	<i>B. pumilus</i> 63.4	5,686
<i>B. cereus</i> 6.3	14,877	<i>B. megaterium</i> 65.1	9,252	<i>B. megaterium</i> 52.4	5,612
<i>B. cereus</i> 49.4	14,619	<i>B. cereus</i> 44.2	8,829	<i>B. megaterium</i> 51.3	4,270
<i>B. cereus</i> 86.5	14,160	<i>B. cereus</i> 51.4	8,664	<i>B. megaterium</i> 96.2	4,252
<i>B. megaterium</i> 18.2	13,333	<i>B. cereus</i> 83.9	8,572	<i>B. pumilus</i> 15.4	4,233
<i>B. cereus</i> 53.1	12,836	<i>B. megaterium</i> 10.1	8,204	<i>B. megaterium</i> 91.5	3,406
<i>B. megaterium</i> 46.1	12,597	<i>B. megaterium</i> 32.2	8,149	<i>B. megaterium</i> 34.6	3,369
<i>B. pumilus</i> 7.4	12,395	<i>B. cereus</i> 10.2	8,002	<i>B. megaterium</i> 93.2	2,487
<i>B. megaterium</i> 49.3	12,340	<i>B. megaterium</i> 68.6	7,928	<i>B. cereus</i> 95.3	2,358
<i>B. megaterium</i> 39.3	11,881	<i>B. cereus</i> 48.3	7,910	<i>B. megaterium</i> 7.1	1,770
<i>B. cereus</i> 54.2	11,329	<i>B. megaterium</i> 75.4	7,892	<i>B. cereus</i> 78.6	1,292
<i>B. megaterium</i> 76.3	11,311	<i>B. cereus</i> 86.3	7,744	<i>B. megaterium</i> 3.2	0,189
<i>B. cereus</i> 57.2	10,667	<i>B. cereus</i> 53.3	7,432		
<i>B. megaterium</i> 47.1	10,410	<i>B. megaterium</i> 3.1	7,193		

Tabla 7. Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por *Bacillus subtilis*, *B. stearothermophilus* y *B. alvei* aislados de *Asparagus officinalis* L.

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)	<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)
<i>B. subtilis</i> 85.2	17,450	<i>B. alvei</i> 84.2	11,954
<i>B. subtilis</i> 16.1	16,127	<i>B. stearothermophilus</i> 78.1	11,586
<i>B. subtilis</i> 25.3	15,980	<i>B. subtilis</i> 28.4	11,384
<i>B. subtilis</i> 76.4	15,447	<i>B. alvei</i> 23.1	11,256
<i>B. subtilis</i> 50.4	14,711	<i>B. alvei</i> 41.1	11,256
<i>B. stearothermophilus</i> 63.1	14,711	<i>B. subtilis</i> 64.2	11,200
<i>B. alvei</i> 29.1	14,656	<i>B. subtilis</i> 72.1	10,925
<i>B. alvei</i> 22.3	14,546	<i>B. subtilis</i> 59.1	10,741
<i>B. subtilis</i> 80.7	14,509	<i>B. stearothermophilus</i> 61.5	10,686
<i>B. subtilis</i> 20.2	14,436	<i>B. alvei</i> 94.4	10,631
<i>B. alvei</i> 62.2	14,344	<i>B. subtilis</i> 43.3	10,594
<i>B. subtilis</i> 13.2	14,013	<i>B. alvei</i> 34.2	10,539
<i>B. alvei</i> 46.2	13,847	<i>B. alvei</i> 42.1	10,373
<i>B. subtilis</i> 63.3	13,259	<i>B. stearothermophilus</i> 65.3	10,318
<i>B. subtilis</i> 24.2	12,708	<i>B. subtilis</i> 73.1	10,097
<i>B. stearothermophilus</i> 96.1	12,377	<i>B. circulans</i> 6.1	10,042
<i>B. stearothermophilus</i> 27.1	12,267	<i>B. alvei</i> 91.4	9,895
<i>B. subtilis</i> 37.3	12,230	<i>B. stearothermophilus</i> 43.1	9,748
<i>B. subtilis</i> 55.2	12,064	<i>B. stearothermophilus</i> 93.3	9,748

Continuación ...

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)	<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)
<i>B. stearothermophilus</i> 24.3	9,693	<i>B. subtilis</i> 34.5	8,406
<i>B. subtilis</i> 95.1	9,472	<i>B. alvei</i> 34.4	8,241
<i>B. alvei</i> 83.4	9,399	<i>B. alvei</i> 60.2	8,112
<i>B. subtilis</i> 30.2	9,344	<i>B. subtilis</i> 17.2	8,020
<i>B. stearothermophilus</i> 65.2	9,233	<i>B. alvei</i> 41.3	7,947
<i>B. stearothermophilus</i> 21.1	9,215	<i>B. subtilis</i> 82.5	7,800
<i>B. stearothermophilus</i> 56.1	9,215	<i>B. stearothermophilus</i> 11.2	7,689
<i>B. subtilis</i> 48.4	9,105	<i>B. subtilis</i> 26.4	7,524
<i>B. subtilis</i> 72.5	9,086	<i>B. stearothermophilus</i> 16.2	7,469
<i>B. subtilis</i> 90.3	9,086	<i>B. subtilis</i> 12.2	7,450
<i>B. stearothermophilus</i> 39.2	9,068	<i>B. subtilis</i> 83.7	7,340
<i>B. subtilis</i> 76.5	9,050	<i>B. stearothermophilus</i> 89.1	7,285
<i>B. subtilis</i> 91.3	8,921	<i>B. subtilis</i> 92.1	7,248
<i>B. subtilis</i> 71.1	8,847	<i>B. subtilis</i> 28.3	7,156
<i>B. subtilis</i> 47.3	8,700	<i>B. subtilis</i> 4.2	7,138
<i>B. alvei</i> 20.3	8,664	<i>B. stearothermophilus</i> 76.2	7,046
<i>B. alvei</i> 36.1	8,664	<i>B. subtilis</i> 30.3	6,972
<i>B. alvei</i> 13.1	8,535	<i>B. alvei</i> 30.1	6,954
<i>B. alvei</i> 58.3	8,480	<i>B. subtilis</i> 79.4	6,715
<i>B. alvei</i> 5.1	8,443	<i>B. stearothermophilus</i> 82.4	6,715

Continuación ...

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)	<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)
<i>B. subtilis</i> 11.1	6,642	<i>B. subtilis</i> 23.3	5,483
<i>B. subtilis</i> 68.5	6,642	<i>B. alvei</i> 31.3	5,483
<i>B. subtilis</i> 11.3	6,623	<i>B. alvei</i> 91.1	5,465
<i>B. stearothermophilus</i> 75.3	6,550	<i>B. subtilis</i> 66.4	5,428
<i>B. alvei</i> 12.1	6,531	<i>B. stearothermophilus</i> 57.4	5,392
<i>B. alvei</i> 39.4	6,494	<i>B. sphaericus</i> 4.4	5,336
<i>B. stearothermophilus</i> 60.3	6,476	<i>B. stearothermophilus</i> 86.4	5,281
<i>B. subtilis</i> 87.3	6,476	<i>B. subtilis</i> 35.2	5,244
<i>B. alvei</i> 21.2	6,164	<i>B. subtilis</i> 94.2	5,189
<i>B. stearothermophilus</i> 54.3	6,145	<i>B. stearothermophilus</i> 9.3	4,895
<i>B. alvei</i> 28.5	6,090	<i>B. subtilis</i> 82.6	4,785
<i>B. subtilis</i> 57.5	6,053	<i>B. stearothermophilus</i> 83.8	4,601
<i>B. alvei</i> 45.5	5,943	<i>B. subtilis</i> 96.5	4,583
<i>B. subtilis</i> 45.6	5,925	<i>B. stearothermophilus</i> 45.1	4,472
<i>B. alvei</i> 75.1	5,888	<i>B. subtilis</i> 78.4	4,472
<i>B. subtilis</i> 77.3	5,869	<i>B. subtilis</i> 80.1	4,381
<i>B. subtilis</i> 50.3	5,796	<i>B. subtilis</i> 44.1	4,362
<i>B. subtilis</i> 84.5	5,722	<i>B. stearothermophilus</i> 15.2	4,307
<i>B. alvei</i> 19.2	5,520	<i>B. alvei</i> 60.5	4,270
<i>B. stearothermophilus</i> 4.3	5,483	<i>B. subtilis</i> 46.3	3,700

Continuación ...

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)	<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)
<i>B. stearothermophilus</i> 31.2	3,645	<i>B. stearothermophilus</i> 2.2	1,090
<i>B. stearothermophilus</i> 11.4	3,535	<i>B. stearothermophilus</i> 57.3	0,998
<i>B. subtilis</i> 60.4	3,241	<i>B. subtilis</i> 67.4	0,741
<i>B. subtilis</i> 58.2	2,818	<i>B. subtilis</i> 62.1	0,520
<i>B. alvei</i> 67.2	2,101	<i>B. alvei</i> 93.6	0,447
<i>B. subtilis</i> 84.6	1,752	<i>B. stearothermophilus</i> 88.2	0,355
<i>B. alvei</i> 55.4	1,586	<i>B. subtilis</i> 58.1	0,079

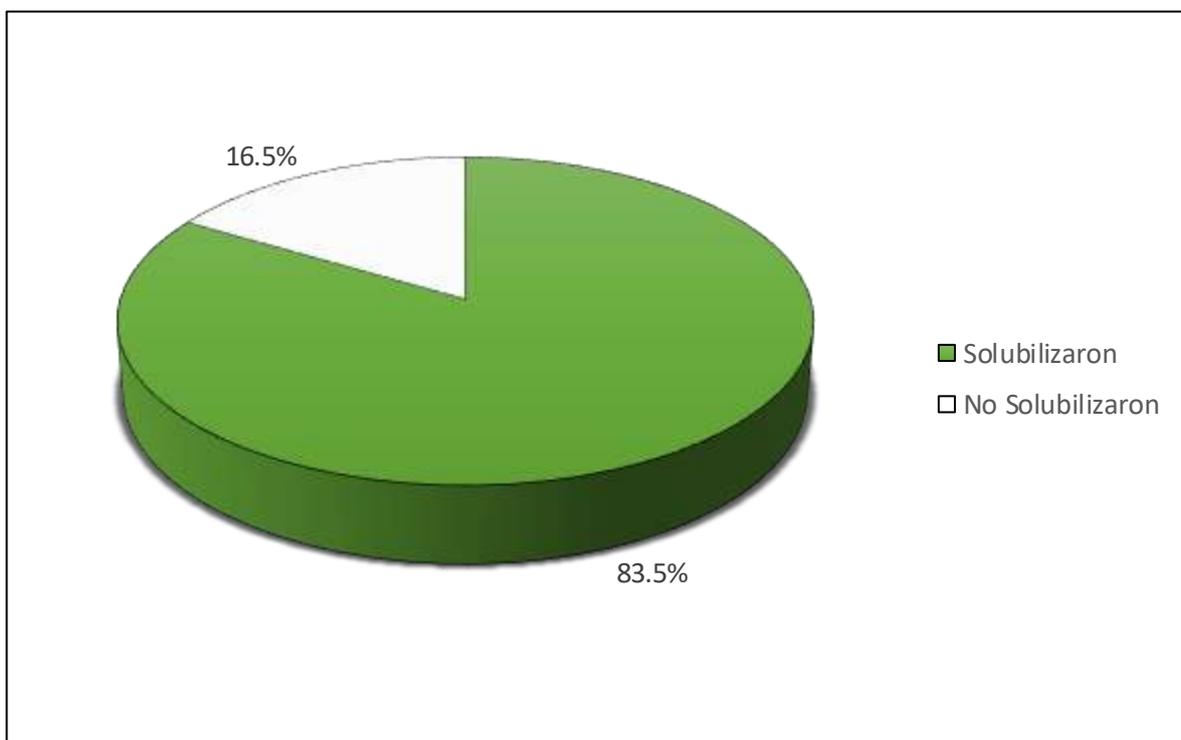


Figura 21. Porcentaje de *Bacillus* spp. que solubilizaron fosfato *in vitro*.



Figura 22. Coloración observada en la cuantificación de fósforo soluble.

Tabla 8. Fósforo cuantificado (ppm) en la solubilización por *Bacillus circulans*, *B. subtilis* y *B. sphaericus* aislados de *Asparagus officinalis* L.

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	P soluble (ppm)	<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	P soluble (ppm)	<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	P soluble (ppm)
<i>B. circulans</i> 77.5	8,316	<i>B. sphaericus</i> 42.3	4,082	<i>B. sphaericus</i> 70.3	3,186
<i>B. subtilis</i> 45.6	8,302	<i>B. sphaericus</i> 68.1	4,068	<i>B. sphaericus</i> 26.2	3,085
<i>B. sphaericus</i> 56.3	7,970	<i>B. subtilis</i> 72.2	3,981	<i>B. subtilis</i> 64.2	3,085
<i>B. circulans</i> 55.5	7,854	<i>B. sphaericus</i> 82.7	3,923	<i>B. sphaericus</i> 66.3	2,883
<i>B. sphaericus</i> 66.5	7,796	<i>B. sphaericus</i> 83.3	3,837	<i>B. sphaericus</i> 72.3	2,883
<i>B. subtilis</i> 26.4	6,048	<i>B. sphaericus</i> 68.2	3,808	<i>B. pasteurii</i> 76.1	2,883
<i>B. subtilis</i> 30.3	5,499	<i>B. sphaericus</i> 4.4	3,779	<i>B. sphaericus</i> 39.6	2,854
<i>B. subtilis</i> 76.4	5,484	<i>B. subtilis</i> 28.3	3,764	<i>B. subtilis</i> 48.4	2,796
<i>B. pasteurii</i> 85.7	5,441	<i>B. sphaericus</i> 67.3	3,678	<i>B. sphaericus</i> 4.1	2,767
<i>B. sphaericus</i> 1.1	4,863	<i>B. subtilis</i> 4.2	3,663	<i>B. sphaericus</i> 62.3	2,695
<i>B. subtilis</i> 90.3	4,733	<i>B. sphaericus</i> 58.5	3,663	<i>B. subtilis</i> 50.4	2,551
<i>B. subtilis</i> 17.2	4,516	<i>B. sphaericus</i> 40.2	3,634	<i>B. sphaericus</i> 80.4	2,551
<i>B. subtilis</i> 72.5	4,516	<i>B. sphaericus</i> 22.1	3,605	<i>B. sphaericus</i> 82.2	2,536
<i>B. subtilis</i> 62.1	4,501	<i>B. subtilis</i> 20.2	3,591	<i>B. subtilis</i> 82.5	2,507
<i>B. subtilis</i> 43.3	4,487	<i>B. subtilis</i> 44.1	3,447	<i>B. sphaericus</i> 38.2	2,464
<i>B. sphaericus</i> 17.4	4,386	<i>B. subtilis</i> 60.4	3,447	<i>B. circulans</i> 34.3	2,406
<i>B. subtilis</i> 25.3	4,270	<i>B. sphaericus</i> 81.1	3,345	<i>B. sphaericus</i> 9.2	2,363
<i>B. sphaericus</i> 64.1	4,097	<i>B. subtilis</i> 67.4	3,259	<i>B. sphaericus</i> 18.1	2,348
<i>B. subtilis</i> 96.5	4,097	<i>B. sphaericus</i> 29.4	3,215	<i>B. sphaericus</i> 41.2	2,334

Continuación ...

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	P soluble (ppm)	<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	P soluble (ppm)	<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	P soluble (ppm)
<i>B. subtilis</i> 35.2	2,276	<i>B. subtilis</i> 58.1	1,698	<i>B. subtilis</i> 94.2	0,773
<i>B. subtilis</i> 84.6	2,262	<i>B. subtilis</i> 87.3	1,582	<i>B. subtilis</i> 76.5	0,759
<i>B. sphaericus</i> 61.3	2,103	<i>B. subtilis</i> 28.4	1,539	<i>B. circulans</i> 52.2	0,730
<i>B. subtilis</i> 80.1	2,074	<i>B. sphaericus</i> 57.6	1,481	<i>B. sphaericus</i> 2.1	0,701
<i>B. circulans</i> 70.1	2,001	<i>B. subtilis</i> 50.3	1,467	<i>B. subtilis</i> 46.3	0,701
<i>B. subtilis</i> 73.1	2,001	<i>B. sphaericus</i> 73.5	1,467	<i>B. sphaericus</i> 12.4	0,585
<i>B. sphaericus</i> 29.3	1,958	<i>B. subtilis</i> 79.4	1,423	<i>B. subtilis</i> 11.1	0,571
<i>B. sphaericus</i> 1.3	1,944	<i>B. subtilis</i> 95.1	1,395	<i>B. sphaericus</i> 80.6	0,571
<i>B. sphaericus</i> 37.2	1,944	<i>B. sphaericus</i> 82.1	1,337	<i>B. subtilis</i> 82.6	0,499
<i>B. circulans</i> 47.2	1,944	<i>B. circulans</i> 6.1	1,322	<i>B. sphaericus</i> 85.8	0,455
<i>B. subtilis</i> 30.2	1,929	<i>B. subtilis</i> 58.2	1,293	<i>B. subtilis</i> 57.5	0,441
<i>B. sphaericus</i> 37.1	1,929	<i>B. subtilis</i> 80.7	1,134	<i>B. subtilis</i> 47.3	0,426
<i>B. sphaericus</i> 91.2	1,915	<i>B. subtilis</i> 34.5	1,077	<i>B. sphaericus</i> 61.2	0,426
<i>B. circulans</i> 74.1	1,871	<i>B. pasteurii</i> 59.3	1,048	<i>B. subtilis</i> 68.5	0,181
<i>B. sphaericus</i> 19.1	1,857	<i>B. pasteurii</i> 67.5	1,004	<i>B. subtilis</i> 71.1	0,166
<i>B. sphaericus</i> 83.6	1,814	<i>B. subtilis</i> 85.2	0,990	<i>B. subtilis</i> 13.2	0,152
<i>B. sphaericus</i> 93.8	1,785	<i>B. sphaericus</i> 76.6	0,918	<i>B. sphaericus</i> 36.3	0,079
<i>B. subtilis</i> 11.3	1,770	<i>B. subtilis</i> 72.1	0,903	<i>B. subtilis</i> 23.3	0,065
<i>B. sphaericus</i> 55.1	1,756	<i>B. subtilis</i> 78.4	0,831		
<i>B. sphaericus</i> 84.3	1,712	<i>B. sphaericus</i> 51.2	0,788		

Tabla 9. Fósforo cuantificado (ppm) en la solubilización por *Bacillus pumilus*, *B. megaterium* y *B. alvei* aislados de *Asparagus officinalis* L.

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	P soluble (ppm)	<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	P soluble (ppm)	<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	P soluble (ppm)
<i>B. pumilus</i> 63.4	7,218	<i>B. alvei</i> 39.4	2,912	<i>B. alvei</i> 42.1	1,842
<i>B. megaterium</i> 51.3	6,496	<i>B. cereus</i> 86.2	2,868	<i>B. alvei</i> 60.2	1,611
<i>B. alvei</i> 30.1	5,614	<i>B. alvei</i> 60.5	2,796	<i>B. megaterium</i> 18.2	1,582
<i>B. megaterium</i> 3.1	4,516	<i>B. alvei</i> 23.1	2,782	<i>B. alvei</i> 46.2	1,510
<i>B. alvei</i> 36.1	4,473	<i>B. megaterium</i> 65.1	2,637	<i>B. alvei</i> 62.2	1,423
<i>B. megaterium</i> 46.1	4,458	<i>B. alvei</i> 13.1	2,594	<i>B. alvei</i> 58.3	1,380
<i>B. megaterium</i> 76.3	4,227	<i>B. alvei</i> 34.4	2,579	<i>B. megaterium</i> 10.3	1,366
<i>B. alvei</i> 75.1	4,126	<i>B. megaterium</i> 52.1	2,565	<i>B. megaterium</i> 52.4	1,351
<i>B. alvei</i> 5.1	4,082	<i>B. megaterium</i> 3.2	2,493	<i>B. megaterium</i> 49.3	1,207
<i>B. alvei</i> 31.3	4,082	<i>B. alvei</i> 12.1	2,449	<i>B. pumilus</i> 39.1	1,134
<i>B. alvei</i> 28.5	3,822	<i>B. alvei</i> 83.4	2,348	<i>B. megaterium</i> 39.3	1,062
<i>B. alvei</i> 41.1	3,822	<i>B. alvei</i> 67.2	2,334	<i>B. alvei</i> 41.3	0,932
<i>B. megaterium</i> 96.2	3,461	<i>B. alvei</i> 55.4	2,189	<i>B. alvei</i> 45.5	0,932
<i>B. alvei</i> 84.2	3,447	<i>B. pumilus</i> 52.3	2,132	<i>B. megaterium</i> 47.1	0,860
<i>B. alvei</i> 20.3	3,345	<i>B. alvei</i> 21.2	2,103	<i>B. alvei</i> 29.1	0,744
<i>B. alvei</i> 22.3	3,244	<i>B. alvei</i> 91.1	1,973	<i>B. megaterium</i> 34.1	0,311
<i>B. alvei</i> 91.4	3,230	<i>B. alvei</i> 94.4	1,973	<i>B. megaterium</i> 26.3	0,282
<i>B. megaterium</i> 7.1	3,201	<i>B. megaterium</i> 34.6	1,900	<i>B. pumilus</i> 15.4	0,036
<i>B. megaterium</i> 68.6	2,970	<i>B. megaterium</i> 32.2	1,842		

Tabla 10. Fósforo cuantificado (ppm) en la solubilización por *Bacillus stearothermophilus*, *B. pasteurii* y *B. cereus* aislados de *Asparagus officinalis* L.

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	P soluble (ppm)	<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	P soluble (ppm)
<i>B. stearothermophilus</i> 63.1	6,510	<i>B. stearothermophilus</i> 83.8	2,970
<i>B. stearothermophilus</i> 65.3	6,221	<i>B. pasteurii</i> 15.1	2,926
<i>B. pasteurii</i> 85.7	5,441	<i>B. pasteurii</i> 23.2	2,897
<i>B. pasteurii</i> 36.2	4,646	<i>B. cereus</i> 53.2	2,897
<i>B. pasteurii</i> 92.3	4,227	<i>B. stearothermophilus</i> 27.1	2,883
<i>B. stearothermophilus</i> 93.3	4,198	<i>B. pasteurii</i> 76.1	2,883
<i>B. pasteurii</i> 71.2	3,996	<i>B. cereus</i> 86.2	2,868
<i>B. pasteurii</i> 31.1	3,938	<i>B. stearothermophilus</i> 11.4	2,840
<i>B. stearothermophilus</i> 56.1	3,938	<i>B. cereus</i> 95.3	2,767
<i>B. stearothermophilus</i> 45.1	3,837	<i>B. cereus</i> 51.4	2,695
<i>B. pasteurii</i> 55.3	3,779	<i>B. pasteurii</i> 7.3	2,681
<i>B. stearothermophilus</i> 60.3	3,736	<i>B. pasteurii</i> 25.6	2,652
<i>B. cereus</i> 53.1	3,504	<i>B. cereus</i> 86.3	2,493
<i>B. cereus</i> 83.9	3,158	<i>B. pasteurii</i> 7.2	2,478
<i>B. stearothermophilus</i> 16.2	3,114	<i>B. pasteurii</i> 61.1	2,464
<i>B. stearothermophilus</i> 75.3	3,056	<i>B. cereus</i> 53.3	2,319
<i>B. stearothermophilus</i> 43.1	3,042	<i>B. stearothermophilus</i> 4.3	2,305
<i>B. stearothermophilus</i> 86.4	3,042	<i>B. pasteurii</i> 48.2	2,305
<i>B. pasteurii</i> 78.3	2,970	<i>B. pasteurii</i> 80.2	2,290

Continuación ...

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	P soluble (ppm)	<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	P soluble (ppm)
<i>B. pasteurii</i> 32.3	2,262	<i>B. pasteurii</i> 93.7	1,597
<i>B. cereus</i> 10.2	2,247	<i>B. megaterium</i> 18.2	1,582
<i>B. pasteurii</i> 89.2	2,218	<i>B. cereus</i> 87.4	1,582
<i>B. pasteurii</i> 54.1	2,189	<i>B. cereus</i> 81.3	1,380
<i>B. pasteurii</i> 79.1	2,189	<i>B. pasteurii</i> 29.2	1,293
<i>B. pasteurii</i> 51.1	2,103	<i>B. pasteurii</i> 40.1	1,264
<i>B. stearothermophilus</i> 21.1	2,074	<i>B. pasteurii</i> 65.5	1,192
<i>B. pasteurii</i> 42.2	2,074	<i>B. stearothermophilus</i> 54.3	1,178
<i>B. pasteurii</i> 67.1	2,074	<i>B. stearothermophilus</i> 88.2	1,134
<i>B. stearothermophilus</i> 39.2	2,001	<i>B. cereus</i> 78.6	1,091
<i>B. pasteurii</i> 46.4	2,001	<i>B. pasteurii</i> 59.3	1,048
<i>B. pasteurii</i> 93.1	1,900	<i>B. pasteurii</i> 67.5	1,004
<i>B. cereus</i> 57.2	1,886	<i>B. pasteurii</i> 1.2	0,932
<i>B. pasteurii</i> 16.4	1,842	<i>B. cereus</i> 44.2	0,932
<i>B. pasteurii</i> 16.3	1,799	<i>B. cereus</i> 7.5	0,918
<i>B. pasteurii</i> 38.1	1,799	<i>B. stearothermophilus</i> 96.1	0,918
<i>B. cereus</i> 70.2	1,785	<i>B. cereus</i> 48.3	0,903
<i>B. stearothermophilus</i> 89.1	1,640	<i>B. cereus</i> 54.2	0,903
<i>B. cereus</i> 78.5	1,626	<i>B. pasteurii</i> 57.1	0,889
<i>B. pasteurii</i> 33.1	1,597	<i>B. pasteurii</i> 56.2	0,874

Continuación ...

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	P soluble (ppm)	<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	P soluble (ppm)
<i>B. pasteurii</i> 80.5	0,874	<i>B. sphaericus</i> 85.8	0,455
<i>B. stearothermophilus</i> 15.2	0,744	<i>B. stearothermophilus</i> 9.3	0,426
<i>B. stearothermophilus</i> 78.1	0,730	<i>B. stearothermophilus</i> 11.2	0,354
<i>B. stearothermophilus</i> 57.4	0,715	<i>B. pasteurii</i> 72.4	0,354
<i>B. stearothermophilus</i> 57.3	0,672	<i>B. pasteurii</i> 26.6	0,325
<i>B. stearothermophilus</i> 65.2	0,600	<i>B. stearothermophilus</i> 31.2	0,065
<i>B. pasteurii</i> 22.2	0,484	<i>B. cereus</i> 45.3	0,022
<i>B. pasteurii</i> 74.2	0,470		

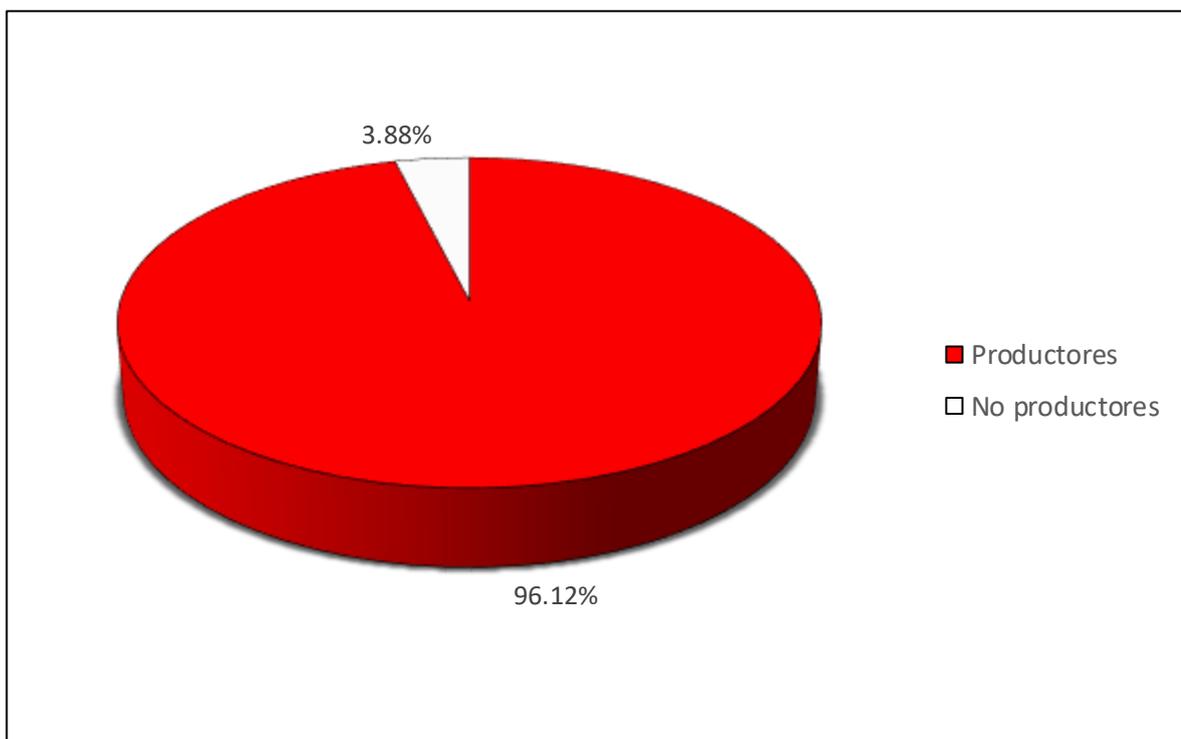


Figura 23. Porcentaje de *Bacillus* spp. que produjeron indoles *in vitro*.

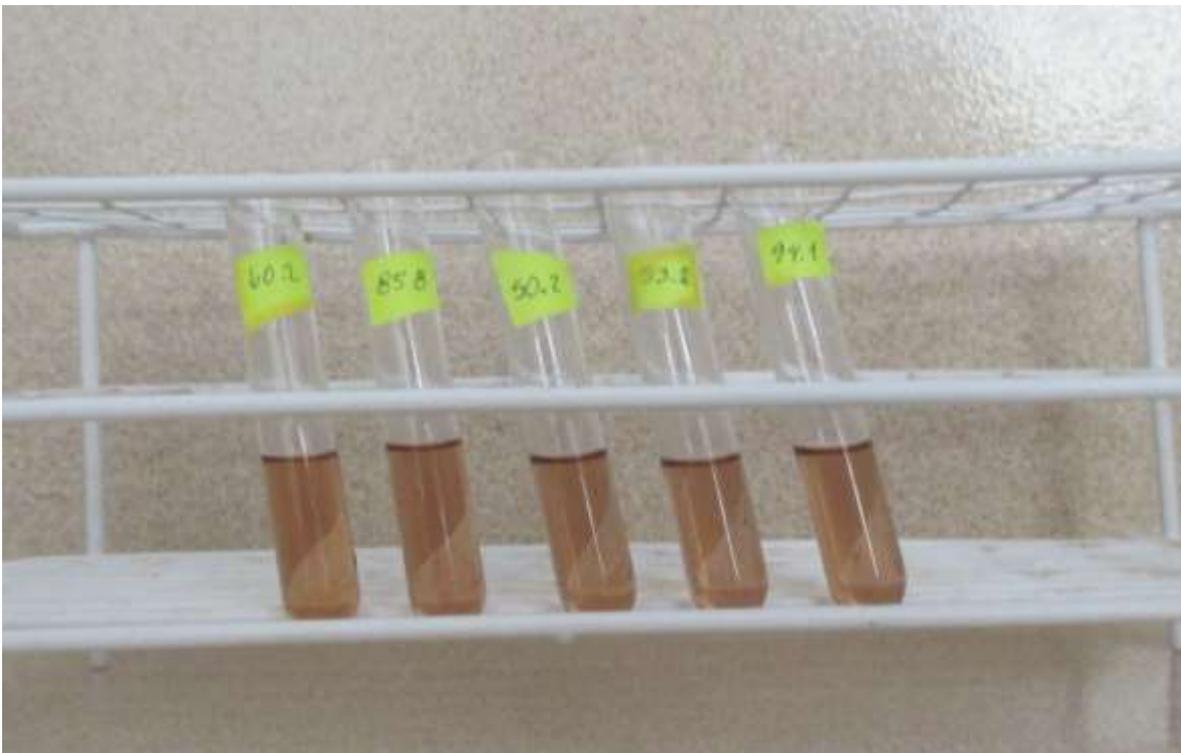


Figura 24. Coloración observada en la cuantificación de indoles.

Tabla 11. Indoles producidos (ppm) por *Bacillus pasteurii*, *B. sphaericus* y *B. cereus* aislados de *Asparagus officinalis* L.

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)	<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)	<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)
<i>B. pasteurii</i> 94.1	23,578	<i>B. sphaericus</i> 37.1	8,022	<i>B. pasteurii</i> 32.3	6,022
<i>B. sphaericus</i> 81.1	20,467	<i>B. sphaericus</i> 79.2	8,022	<i>B. sphaericus</i> 91.2	6,022
<i>B. sphaericus</i> 12.4	12,244	<i>B. sphaericus</i> 4.4	7,800	<i>B. sphaericus</i> 56.3	5,800
<i>B. pasteurii</i> 85.7	11,800	<i>B. sphaericus</i> 49.2	7,800	<i>B. pasteurii</i> 71.2	5,800
<i>B. cereus</i> 45.3	11,578	<i>B. pasteurii</i> 50.2	7,800	<i>B. pasteurii</i> 80.5	5,800
<i>B. pasteurii</i> 6.2	11,356	<i>B. sphaericus</i> 66.2	7,800	<i>B. pasteurii</i> 7.2	5,578
<i>B. sphaericus</i> 18.1	11,356	<i>B. pasteurii</i> 59.3	7,356	<i>B. pasteurii</i> 36.2	5,578
<i>B. sphaericus</i> 68.2	10,467	<i>B. pasteurii</i> 15.1	7,133	<i>B. sphaericus</i> 61.2	5,578
<i>B. sphaericus</i> 80.6	10,244	<i>B. sphaericus</i> 17.4	6,911	<i>B. pasteurii</i> 42.2	5,356
<i>B. cereus</i> 53.2	9,00	<i>B. pasteurii</i> 25.6	6,911	<i>B. pasteurii</i> 72.4	5,356
<i>B. pasteurii</i> 29.2	9,78	<i>B. sphaericus</i> 69.1	6,911	<i>B. sphaericus</i> 73.5	5,356
<i>B. pasteurii</i> 67.1	9,56	<i>B. sphaericus</i> 82.7	6,689	<i>B. sphaericus</i> 85.8	5,356
<i>B. pasteurii</i> 33.1	9,133	<i>B. cereus</i> 6.3	6,467	<i>B. cereus</i> 10.2	5,133
<i>B. cereus</i> 86.5	8,911	<i>B. sphaericus</i> 50.1	6,467	<i>B. sphaericus</i> 25.2	5,133
<i>B. sphaericus</i> 66.3	8,689	<i>B. cereus</i> 53.1	6,467	<i>B. pasteurii</i> 38.1	5,133
<i>B. sphaericus</i> 83.6	8,689	<i>B. sphaericus</i> 84.3	6,467	<i>B. sphaericus</i> 64.1	5,133
<i>B. sphaericus</i> 15.3	8,467	<i>B. sphaericus</i> 9.1	6,244	<i>B. sphaericus</i> 74.4	5,133
<i>B. sphaericus</i> 29.4	8,244	<i>B. pasteurii</i> 16.4	6,244	<i>B. sphaericus</i> 1.3	4,911
<i>B. pasteurii</i> 14.1	8,022	<i>B. sphaericus</i> 4.1	6,022	<i>B. cereus</i> 78.6	4,911

Continuación ...

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)	<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)	<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)
<i>B. sphaericus</i> 42.3	4,689	<i>B. sphaericus</i> 83.3	3,356	<i>B. cereus</i> 95.3	2,022
<i>B. pasteurii</i> 16.3	4,467	<i>B. sphaericus</i> 80.4	3,133	<i>B. sphaericus</i> 29.3	2,022
<i>B. pasteurii</i> 57.1	4,467	<i>B. sphaericus</i> 39.6	2,911	<i>B. sphaericus</i> 26.2	1,800
<i>B. sphaericus</i> 61.3	4,467	<i>B. cereus</i> 51.4	2,911	<i>B. sphaericus</i> 41.2	1,800
<i>B. pasteurii</i> 79.1	4,467	<i>B. pasteurii</i> 55.3	2,911	<i>B. pasteurii</i> 56.2	1,800
<i>B. pasteurii</i> 51.1	4,244	<i>B. pasteurii</i> 92.3	2,911	<i>B. cereus</i> 86.3	1,800
<i>B. pasteurii</i> 67.5	4,244	<i>B. subtilis</i> 16.1	2,689	<i>B. sphaericus</i> 93.8	1,800
<i>B. sphaericus</i> 68.1	4,244	<i>B. cereus</i> 35.3	2,689	<i>B. sphaericus</i> 19.1	1,578
<i>B. pasteurii</i> 49.1	4,022	<i>B. cereus</i> 48.3	2,689	<i>B. sphaericus</i> 36.3	1,356
<i>B. sphaericus</i> 55.1	4,022	<i>B. pasteurii</i> 72.4	2,689	<i>B. pasteurii</i> 80.2	1,356
<i>B. sphaericus</i> 62.3	4,022	<i>B. sphaericus</i> 82.2	2,689	<i>B. pasteurii</i> 93.7	1,356
<i>B. pasteurii</i> 31.1	3,800	<i>B. megaterium</i> 93.2	2,467	<i>B. pasteurii</i> 22.2	1,133
<i>B. sphaericus</i> 40.2	3,800	<i>B. sphaericus</i> 9.2	2,244	<i>B. sphaericus</i> 38.2	1,133
<i>B. cereus</i> 44.2	3,800	<i>B. sphaericus</i> 22.1	2,244	<i>B. sphaericus</i> 57.6	1,133
<i>B. sphaericus</i> 72.3	3,800	<i>B. sphaericus</i> 37.2	2,244	<i>B. pasteurii</i> 75.2	1,133
<i>B. pasteurii</i> 54.1	3,578	<i>B. pasteurii</i> 48.2	2,244	<i>B. megaterium</i> 8.2	0,689
<i>B. sphaericus</i> 58.5	3,578	<i>B. cereus</i> 57.2	2,244	<i>B. megaterium</i> 34.6	0,689
<i>B. pasteurii</i> 1.2	3,356	<i>B. pasteurii</i> 76.1	2,244	<i>B. pasteurii</i> 40.1	0,689
<i>B. sphaericus</i> 2.1	3,356	<i>B. pasteurii</i> 93.1	2,244	<i>B. cereus</i> 54.2	0,689
<i>B. pasteurii</i> 26.6	3,356	<i>B. pasteurii</i> 65.5	2,022	<i>B. cereus</i> 70.2	0,689

Continuación ...

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)	<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)	<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)
<i>B. pasteurii</i> 23.2	0,467	<i>B. sphaericus</i> 28.2	0,244	<i>B. pasteurii</i> 78.3	0,244
<i>B. pasteurii</i> 7.3	0,244	<i>B. cereus</i> 49.4	0,244	<i>B. sphaericus</i> 75.5	0,022

Tabla 12. Indoles producidos (ppm) por *Bacillus megaterium*, *B. subtilis* y *B. alvei* aislados de *Asparagus officinalis* L.

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)	<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)	<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)
<i>B. megaterium</i> 68.6	10,467	<i>B. alvei</i> 12.1	6,467	<i>B. megaterium</i> 3.1	5,133
<i>B. subtilis</i> 60.4	10,244	<i>B. subtilis</i> 46.3	6,467	<i>B. megaterium</i> 52.4	5,133
<i>B. subtilis</i> 72.2	10,244	<i>B. subtilis</i> 64.2	6,467	<i>B. subtilis</i> 30.2	4,911
<i>B. subtilis</i> 63.3	8,689	<i>B. subtilis</i> 87.3	6,467	<i>B. subtilis</i> 35.2	4,911
<i>B. subtilis</i> 11.3	8,467	<i>B. alvei</i> 34.4	6,244	<i>B. subtilis</i> 45.6	4,911
<i>B. alvei</i> 42.1	8,467	<i>B. subtilis</i> 77.3	6,244	<i>B. subtilis</i> 58.2	4,911
<i>B. alvei</i> 67.2	8,467	<i>B. alvei</i> 91.1	6,244	<i>B. alvei</i> 84.2	4,911
<i>B. alvei</i> 83.4	8,244	<i>B. subtilis</i> 94.2	6,244	<i>B. subtilis</i> 17.2	4,689
<i>B. subtilis</i> 28.4	8,022	<i>B. subtilis</i> 11.1	6,022	<i>B. subtilis</i> 82.6	4,689
<i>B. alvei</i> 22.3	7,800	<i>B. subtilis</i> 68.5	6,022	<i>B. alvei</i> 23.1	4,467
<i>B. alvei</i> 20.3	7,356	<i>B. alvei</i> 94.4	6,022	<i>B. megaterium</i> 34.1	4,467
<i>B. alvei</i> 31.3	7,133	<i>B. subtilis</i> 28.3	5,578	<i>B. alvei</i> 60.5	4,467
<i>B. subtilis</i> 37.3	7,133	<i>B. subtilis</i> 50.4	5,578	<i>B. subtilis</i> 66.4	4,467
<i>B. alvei</i> 45.5	7,133	<i>B. subtilis</i> 92.1	5,578	<i>B. alvei</i> 91.4	4,467
<i>B. subtilis</i> 72.5	7,133	<i>B. alvei</i> 19.2	5,356	<i>B. alvei</i> 91.4	4,467
<i>B. subtilis</i> 80.7	7,133	<i>B. alvei</i> 29.1	5,356	<i>B. megaterium</i> 47.1	4,244
<i>B. subtilis</i> 84.5	7,133	<i>B. subtilis</i> 55.2	5,356	<i>B. megaterium</i> 39.3	4,022
<i>B. subtilis</i> 76.5	6,911	<i>B. alvei</i> 62.2	5,356	<i>B. alvei</i> 41.3	4,022
<i>B. megaterium</i> 46.1	6,689	<i>B. megaterium</i> 3.1	5,133	<i>B. subtilis</i> 73.1	4,022

Continuación ...

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)	<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)	<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)
<i>B. alvei</i> 93.6	4,022	<i>B. subtilis</i> 91.3	3,578	<i>B. megaterium</i> 26.3	1,578
<i>B. subtilis</i> 13.2	3,800	<i>B. megaterium</i> 3.2	3,356	<i>B. alvei</i> 28.5	1,356
<i>B. alvei</i> 34.2	3,800	<i>B. subtilis</i> 47.3	3,356	<i>B. subtilis</i> 85.2	1,356
<i>B. alvei</i> 34.2	3,800	<i>B. megaterium</i> 76.3	3,356	<i>B. subtilis</i> 48.4	1,133
<i>B. subtilis</i> 71.1	3,800	<i>B. megaterium</i> 18.2	3,133	<i>B. megaterium</i> 52.1	1,133
<i>B. subtilis</i> 96.5	3,800	<i>B. alvei</i> 46.2	3,133	<i>B. subtilis</i> 59.1	1,133
<i>B. subtilis</i> 30.3	3,578	<i>B. megaterium</i> 10.3	2,911	<i>B. subtilis</i> 78.4	1,133
<i>B. alvei</i> 36.1	3,578	<i>B. subtilis</i> 24.2	2,911	<i>B. subtilis</i> 95.1	0,911
<i>B. alvei</i> 41.1	3,578	<i>B. megaterium</i> 32.2	2,911	<i>B. megaterium</i> 8.2	0,689
<i>B. megaterium</i> 49.3	3,578	<i>B. subtilis</i> 90.3	2,911	<i>B. subtilis</i> 12.2	0,689
<i>B. subtilis</i> 50.3	3,578	<i>B. megaterium</i> 10.1	2,689	<i>B. megaterium</i> 34.6	0,689
<i>B. megaterium</i> 51.3	3,578	<i>B. subtilis</i> 16.1	2,689	<i>B. alvei</i> 55.4	0,467
<i>B. alvei</i> 60.2	3,578	<i>B. alvei</i> 13.1	1,800	<i>B. subtilis</i> 23.3	0,244
<i>B. alvei</i> 75.1	3,578	<i>B. alvei</i> 39.4	1,800	<i>B. subtilis</i> 57.5	0,244
<i>B. subtilis</i> 79.4	3,578	<i>B. subtilis</i> 62.1	1,800	<i>B. megaterium</i> 65.1	0,244

Tabla 13. Indoles producidos (ppm) por *Bacillus stearothermophilus*, *B. pumilus* y *B. circulans* aislados de *Asparagus officinalis* L.

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)	<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Indoles (ppm)
<i>B. stearothermophilus</i> 11.4	12,689	<i>B. stearothermophilus</i> 63.1	3,578
<i>B. stearothermophilus</i> 83.8	10,244	<i>B. stearothermophilus</i> 24.3	3,356
<i>B. stearothermophilus</i> 56.1	7,133	<i>B. stearothermophilus</i> 45.1	3,356
<i>B. stearothermophilus</i> 60.3	7,133	<i>B. circulans</i> 52.2	3,133
<i>B. stearothermophilus</i> 21.1	6,467	<i>B. stearothermophilus</i> 65.3	3,133
<i>B. stearothermophilus</i> 4.3	6,022	<i>B. stearothermophilus</i> 27.1	2,911
<i>B. stearothermophilus</i> 93.3	6,022	<i>B. circulans</i> 77.5	2,911
<i>B. stearothermophilus</i> 57.3	5,800	<i>B. stearothermophilus</i> 9.3	2,689
<i>B. stearothermophilus</i> 61.5	5,578	<i>B. pumilus</i> 63.4	2,244
<i>B. circulans</i> 78.2	5,356	<i>B. pumilus</i> 15.4	2,022
<i>B. stearothermophilus</i> 16.2	5,133	<i>B. stearothermophilus</i> 31.2	2,022
<i>B. stearothermophilus</i> 71.3	5,133	<i>B. stearothermophilus</i> 82.4	2,022
<i>B. stearothermophilus</i> 43.1	4,911	<i>B. stearothermophilus</i> 86.4	2,022
<i>B. circulans</i> 6.1	4,689	<i>B. pumilus</i> 7.4	1,578
<i>B. stearothermophilus</i> 2.2	4,467	<i>B. stearothermophilus</i> 57.4	1,356
<i>B. stearothermophilus</i> 15.2	4,244	<i>B. circulans</i> 34.3	0,911
<i>B. stearothermophilus</i> 88.2	4,244	<i>B. stearothermophilus</i> 11.2	0,244
<i>B. circulans</i> 55.5	4,022	<i>B. stearothermophilus</i> 39.2	0,244
<i>B. stearothermophilus</i> 76.2	3,800	<i>B. stearothermophilus</i> 75.3	0,022
<i>B. stearothermophilus</i> 96.1	3,800		

Tabla 14. Valores (ppm) de amonio, fósforo soluble e indoles correspondientes a cultivos de *Bacillus* spp. seleccionados

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Amonio (ppm)	Fósforo soluble (ppm)	Indoles (ppm)
<i>B. circulans</i> 70.1	26,384	2,001	0,000
<i>B. pasteurii</i> 72.4	20,741	0,354	2,689
<i>B. circulans</i> 77.5	5,575	8,316	2,911
<i>B. subtilis</i> 45.6	5,925	8,302	4,911
<i>B. pasteurii</i> 94.1	9,858	0,000	23,578
<i>B. sphaericus</i> 81.1	3,296	3,345	20,467

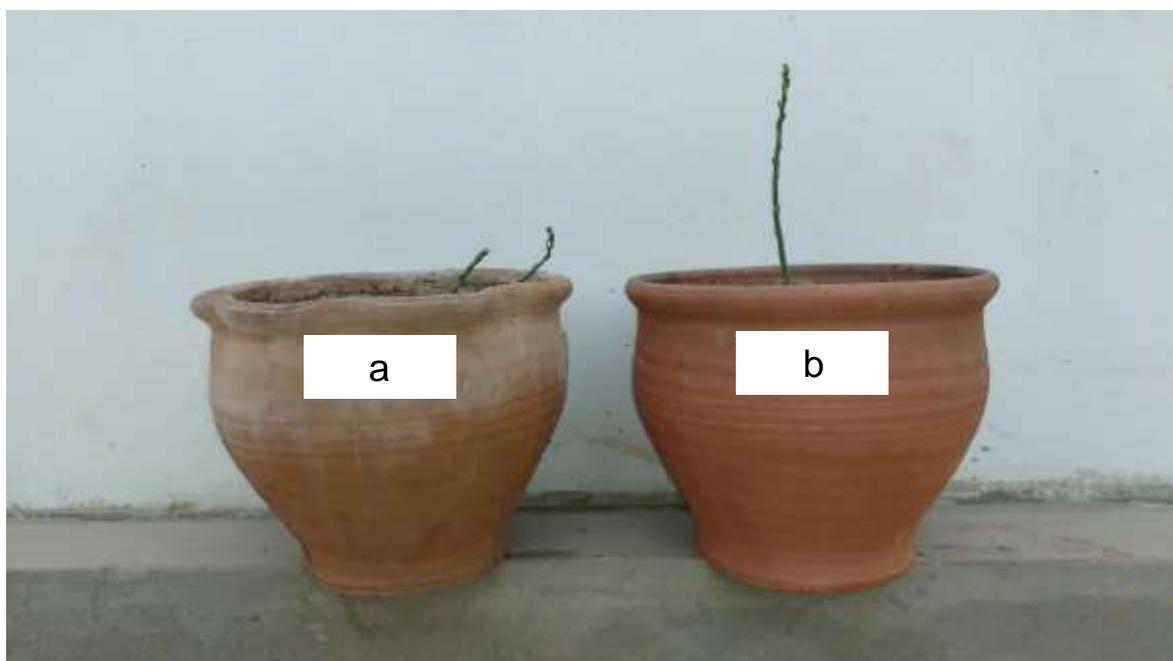


Figura 25. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 15 días después de la siembra e inoculación de coronas, a) Testigo absoluto, b) *B. circulans* 70.1.

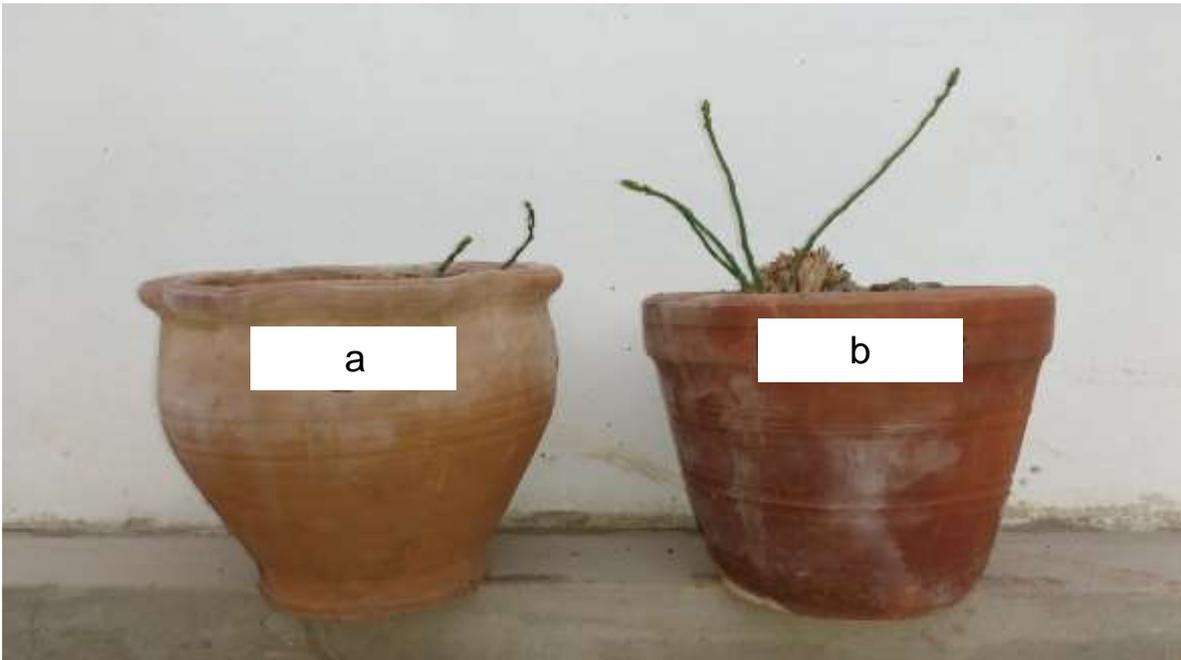


Figura 26. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 15 días después de la siembra e inoculación de coronas, a) Testigo absoluto, b) *B. pasteurii* 72.4.

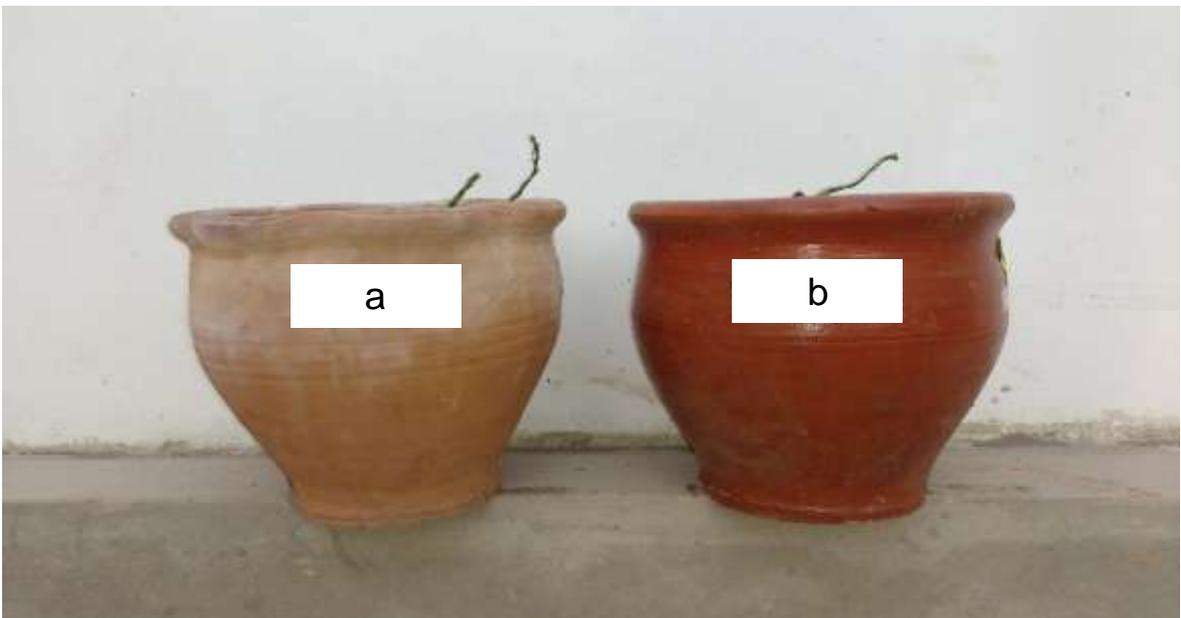


Figura 27. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 15 días después de la siembra e inoculación de coronas, a) Testigo absoluto, b) *B. pasteurii* 94.1.

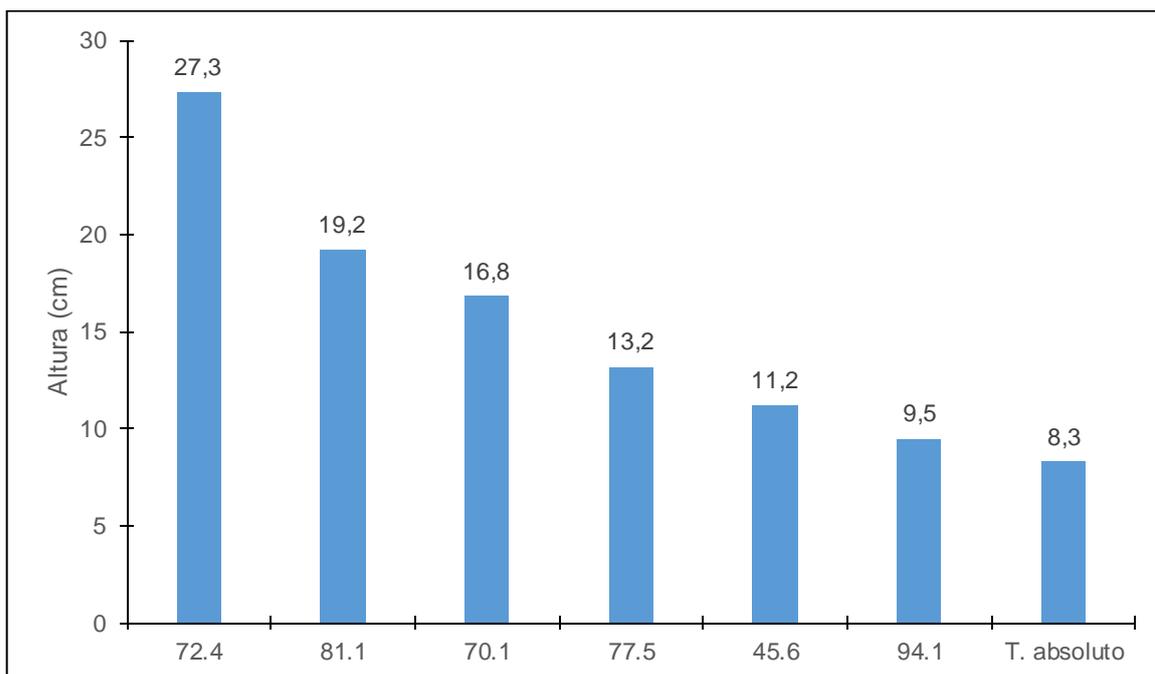


Figura 28. Altura (cm) de *Asparagus officinalis* L., 15 días después de la inoculación de *Bacillus* spp.

Tabla 15. Índices de efectividad (%) de *Bacillus* spp. en la altura de *Asparagus officinalis* L. a los 15, 30, 45 y 60 días

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	IE (%)			
	15 días	30 días	45 días	60 días
<i>B. circulans</i> 70.1	102,41	6,83	18,69	25,93
<i>B. pasteurii</i> 72.4	228,92	42,32	31,45	3,96
<i>B. circulans</i> 77.5	59,04	6,48	4,45	1,10
<i>B. subtilis</i> 45.6	34,94	8,19	1,48	0,66
<i>B. pasteurii</i> 94.1	14,46	15,36	12,17	11,43
<i>B. sphaericus</i> 81.1	131,33	9,22	0,89	0,44
T. químico	-	15,02	14,24	6,59

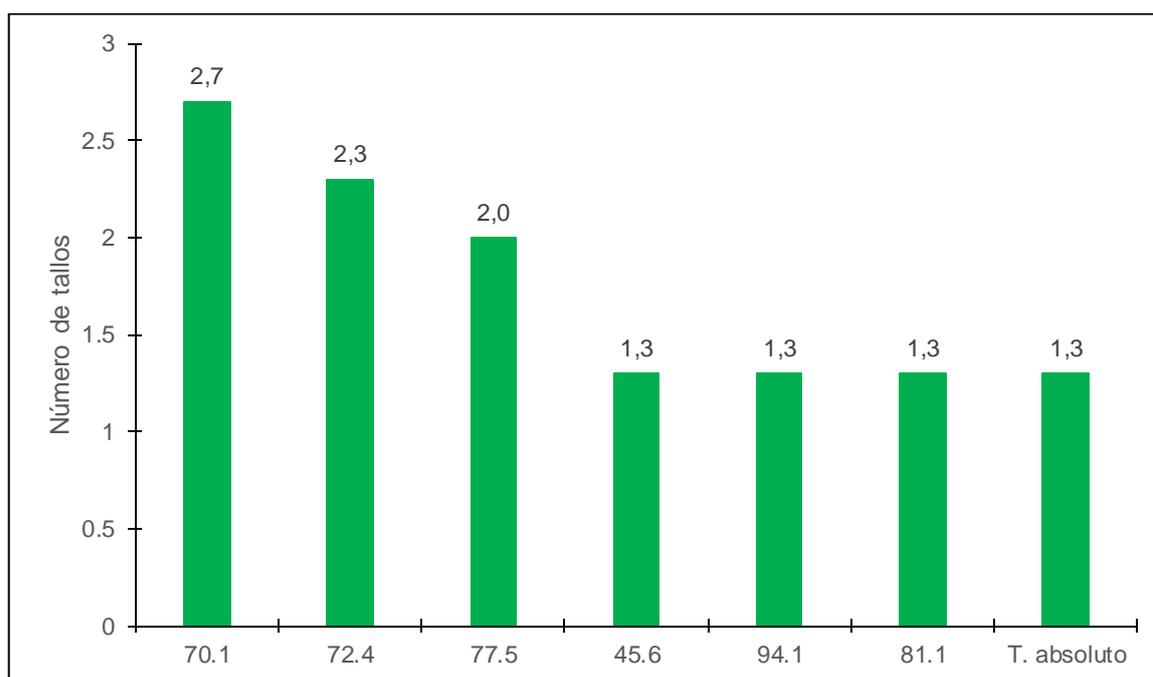


Figura 29. Número de tallos de *Asparagus officinalis* L., 15 días después de la inoculación de *Bacillus* spp.

Tabla 16. Índices de efectividad (%) de *Bacillus* spp. en el número de tallos de *Asparagus officinalis* L. a los 15, 30, 45 y 60 días

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	IE (%)			
	15 días	30 días	45 días	60 días
<i>B. circulans</i> 70.1	107,69	35,00	50,00	85,00
<i>B. pasteurii</i> 72.4	76,92	15,00	50,00	50,00
<i>B. circulans</i> 77.5	53,85	35,00	35,00	50,00
<i>B. subtilis</i> 45.6	0	85,00	85,00	85,00
<i>B. pasteurii</i> 94.1	0	50,00	50,00	50,00
<i>B. sphaericus</i> 81.1	0	0	0	0
T. químico	-	0	35,00	50,00

Considerando los testigos absoluto y químico a los 30, 45 y 60 días, los valores de altura y número de tallos de las plantas de espárrago presentaron distribución normal ($p>0,05$) y homogeneidad de varianza ($p>0,05$), por lo que se realizó el análisis de varianza de un solo factor y la prueba múltiple de Tukey (Anexos 8 a 13).

La altura de las plantas de espárrago a los 30 días fue de 31,2 a 41,7cm con *Bacillus* spp.; 29,3cm en el testigo absoluto y 33,7cm en el testigo químico (Figuras 30 a 33), registrándose índices de efectividad de 6,48% con *B. circulans* 77.5 y 42,32% con *B. pasteurii* 72.4 (Tabla 15). El análisis de varianza de los valores de altura demostró significancia (Anexo 8) y según la prueba múltiple de Tukey el mayor valor se alcanzó con *B. pasteurii* 72.4, diferenciándose significativamente de los demás tratamientos (Tabla 17).

El número de tallos de las plantas de espárrago a los 30 días fue de 2,3 a 3,7 tallos con *Bacillus* spp.; 2 tallos en el testigo absoluto y 2 tallos en el testigo químico (Figura 34), registrándose índices de efectividad de 15% con *B. pasteurii* 72.4 y 85% con *B. subtilis* 45.6 (Tabla 16). El análisis de varianza de los valores de número de tallos no demostró significancia (Anexo 11); no obstante, numéricamente el mayor valor se alcanzó con *B. subtilis* 45.6.

La altura de las plantas de espárrago a los 45 días fue de 34,0 a 44,3cm con *Bacillus* spp.; 33,7cm en el testigo absoluto y 38,5cm en el testigo químico (Figuras 35 a 38), registrándose índices de efectividad de 0,89% con *B. sphaericus* 81.1 y 31,45% con *B. pasteurii* 72.4 (Tabla 15). El análisis de varianza de los valores de altura demostró significancia (Anexo 9) y según la prueba múltiple de Tukey los mayores valores se alcanzaron con *B. circulans* 70.1 y *B. pasteurii* 72.4 (Tabla 17).

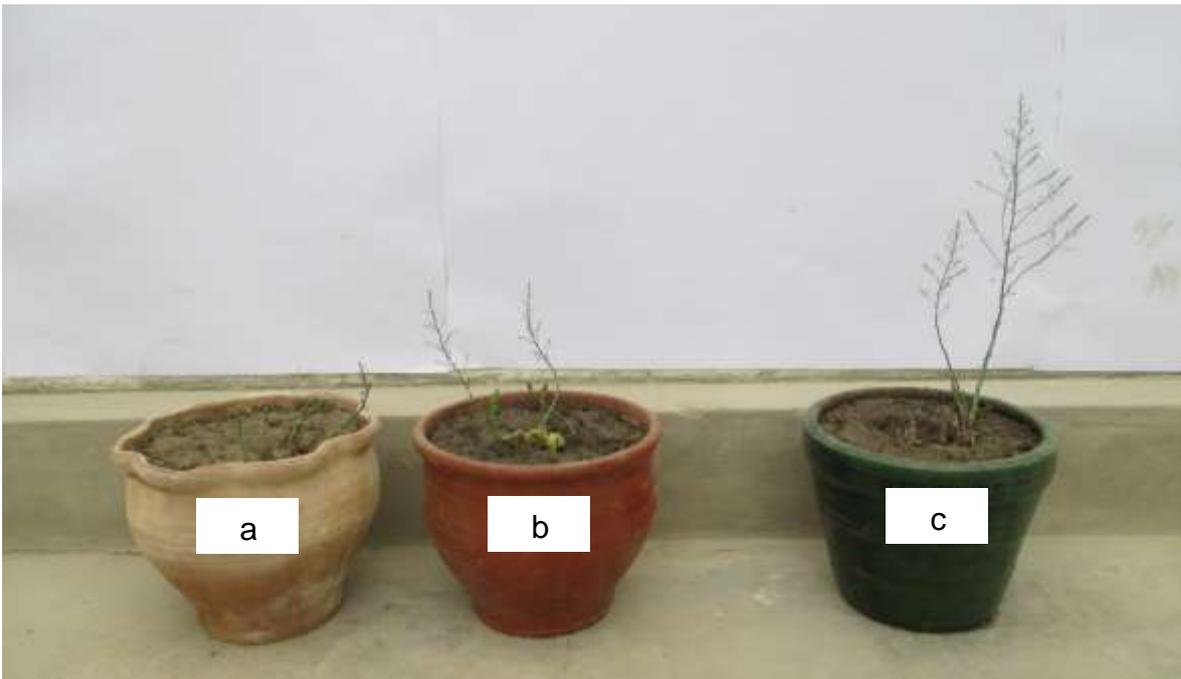


Figura 30. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 30 días después de la siembra e inoculación de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *B. circulans* 70.1.

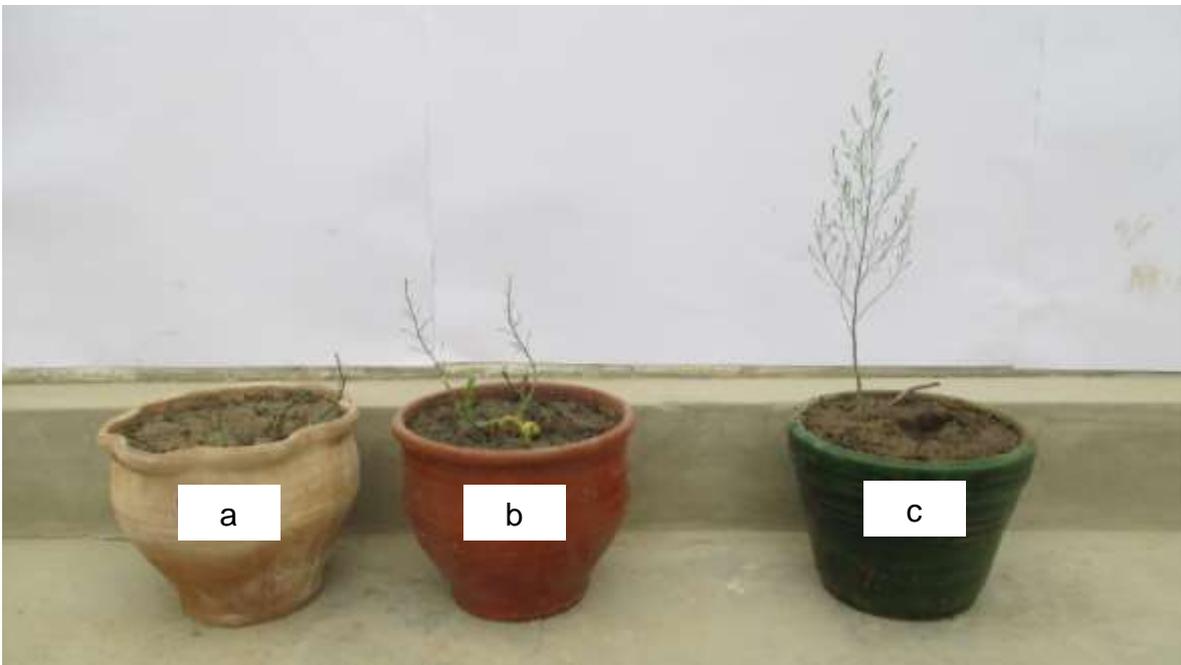


Figura 31. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 30 días después de la siembra e inoculación de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *B. pasteurii* 72.4.

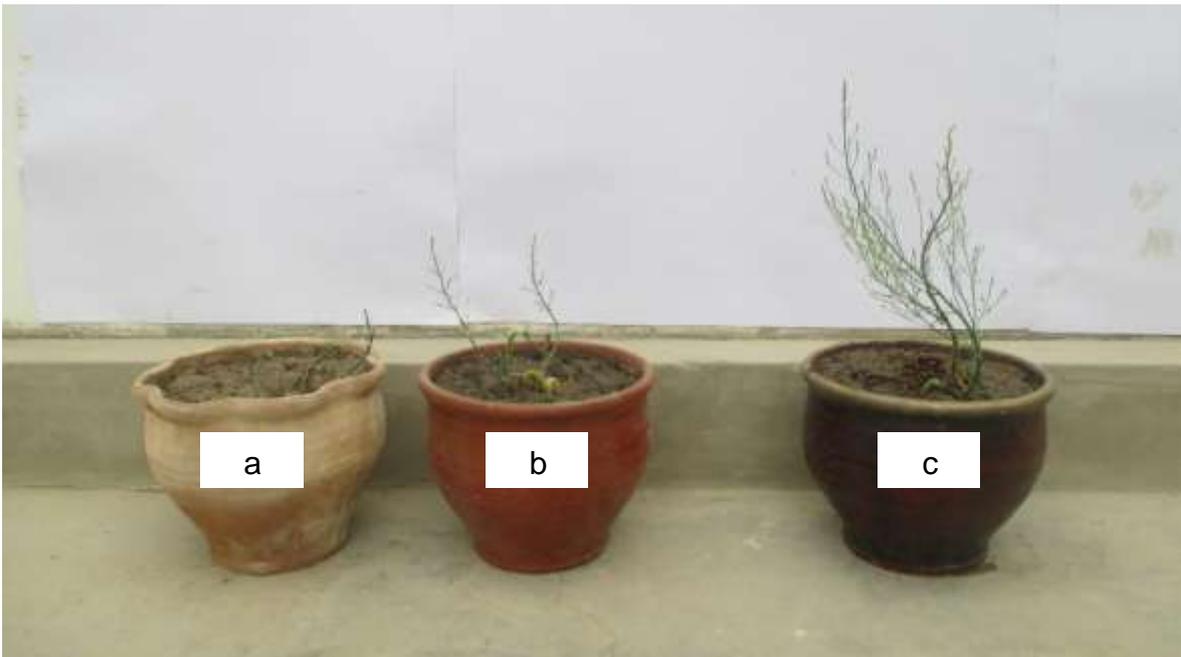


Figura 32. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 30 días después de la siembra e inoculación de coronas, a) Testigo absoluto, b) Testigo químico, c) *B. pasteurii* 94.1.

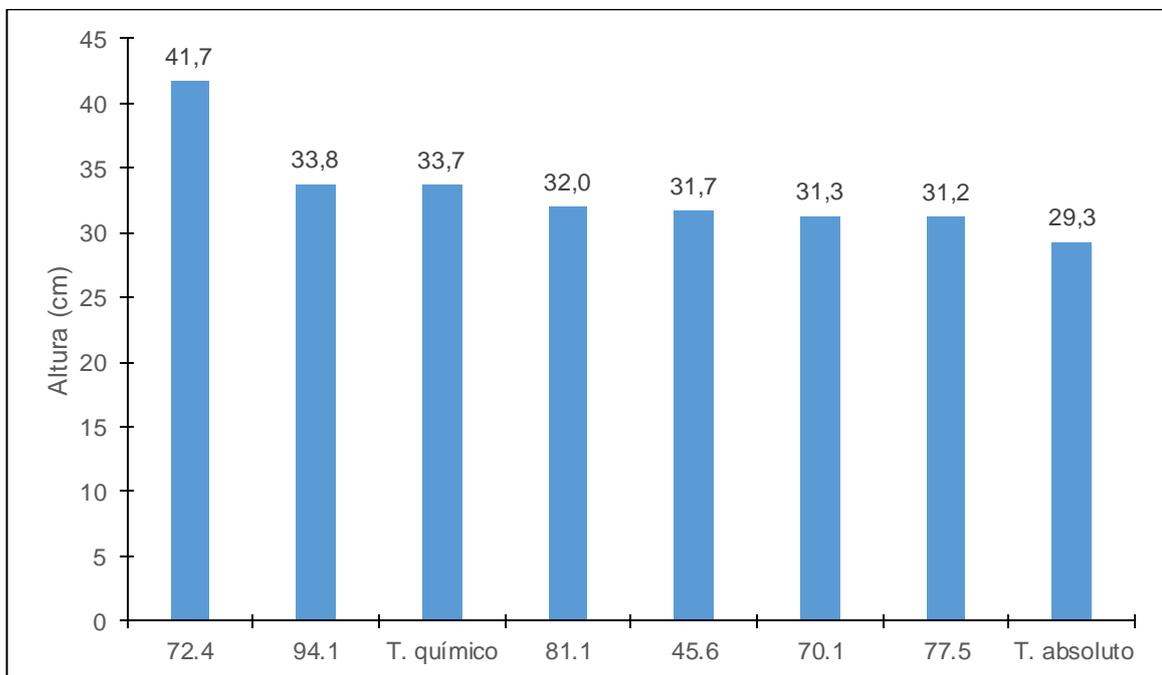


Figura 33. Altura (cm) de *Asparagus officinalis* L., 30 días después de la inoculación de *Bacillus* spp.

Tabla 17. Prueba de Tukey de la altura de plantas de *Asparagus officinalis* L. a los 30, 45 y 60 días después de la inoculación de *Bacillus* spp.

<i>Bacillus</i> spp. código UNPRG	Altura (cm)					
	30 días	Sign	45 días	Sign	60 días	Sign
<i>B. pasteurii</i> 72.4	41,667	a	44,333	a	47,333	bc
<i>B. pasteurii</i> 94.1	33,833	b	37,833	bc	50,667	b
T. químico	33,667	b	38,500	bc	48,500	bc
<i>B. subtilis</i> 45.6	31,667	bc	34,167	c	45,833	c
<i>B. circulans</i> 70.1	31,333	bc	40,000	ab	57,333	a
<i>B. circulans</i> 77.5	31,167	bc	35,167	bc	46,000	c
T. absoluto	29,333	c	33,667	c	45,500	c
<i>B. sphaericus</i> 81.1	25,167	d	34,000	c	45,667	c

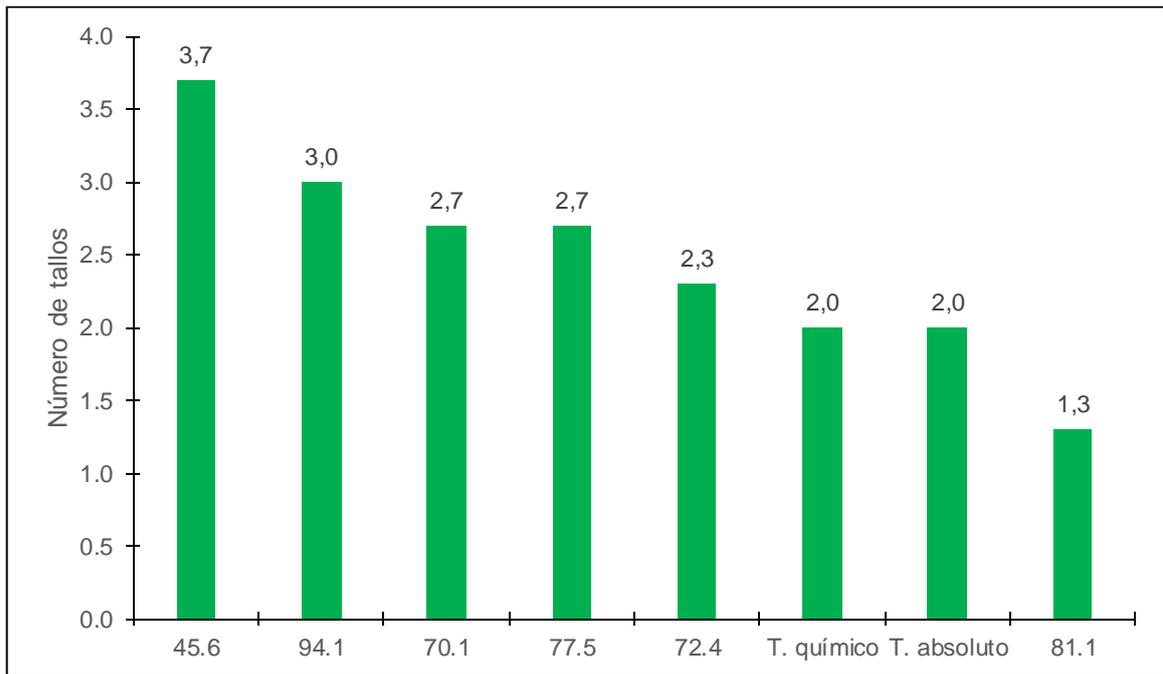


Figura 34. Número de tallos de *Asparagus officinalis* L., 30 días después de la inoculación de *Bacillus* spp.

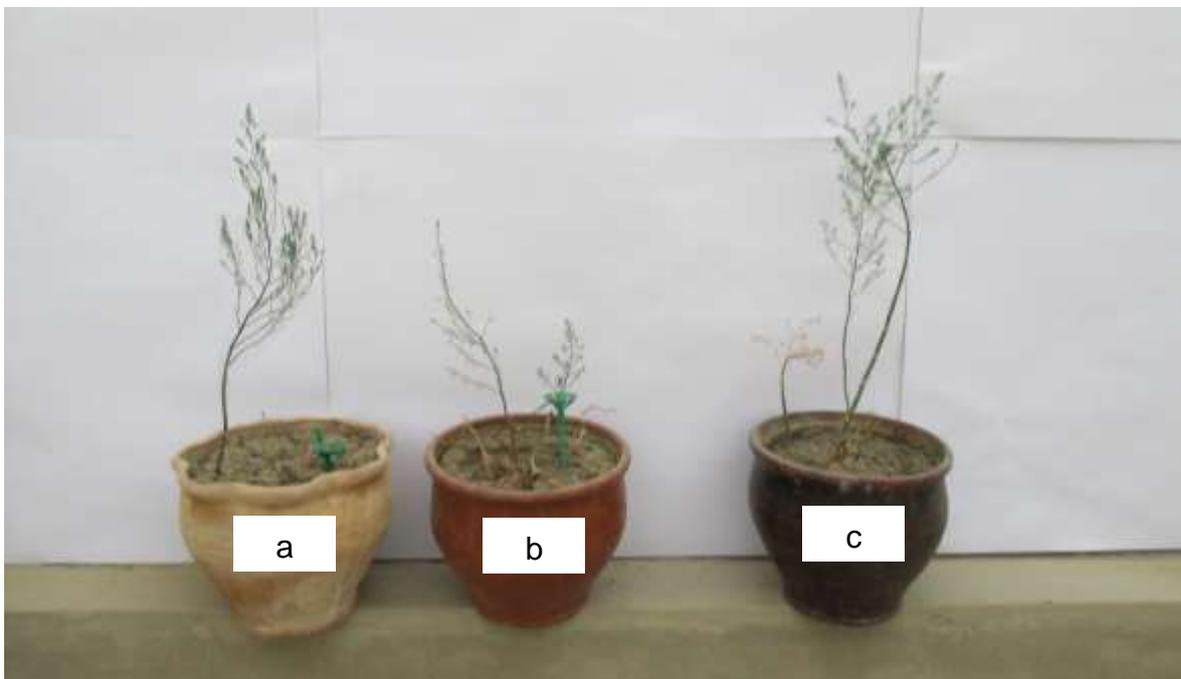


Figura 35. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 45 días después de la siembra e inoculación de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) *B. circulans* 70.1.

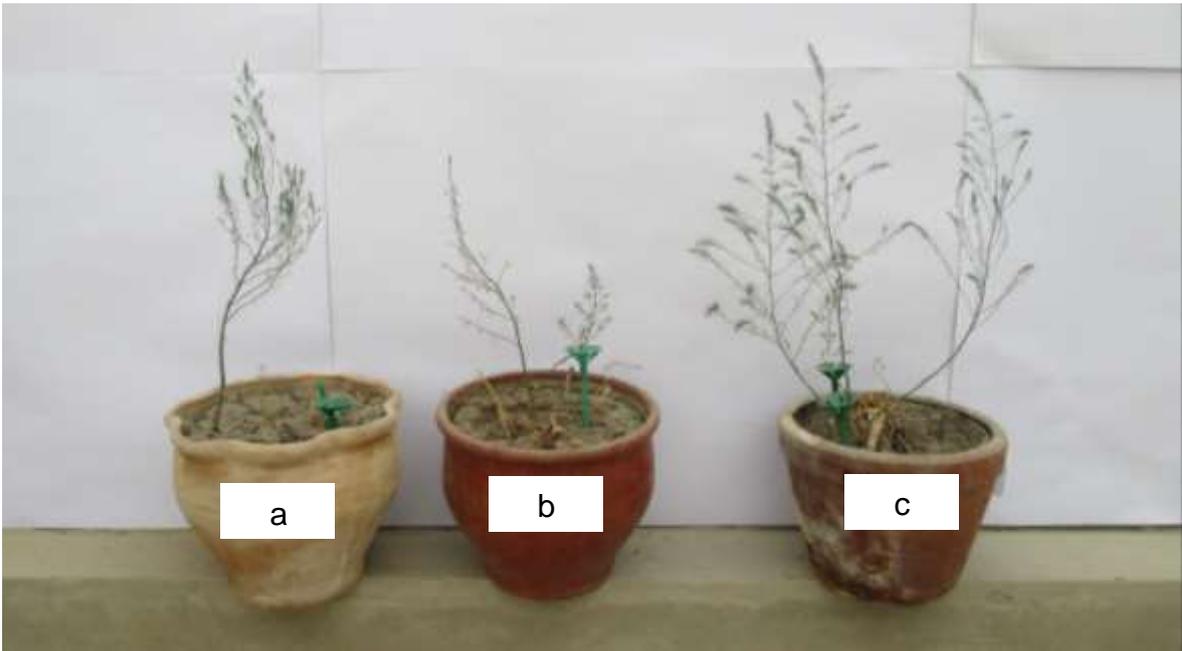


Figura 36. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 45 días después de la siembra e inoculación de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) *B. pasteurii* 72.4.

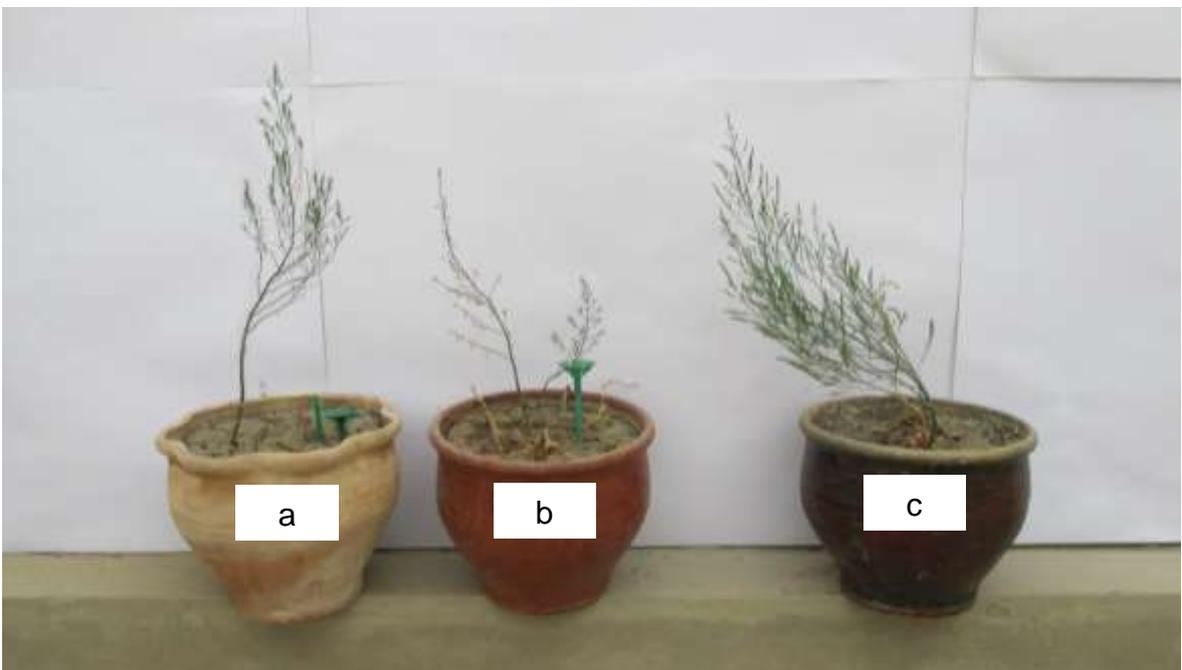


Figura 37. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 45 días después de la siembra e inoculación de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) *B. pasteurii* 94.1.

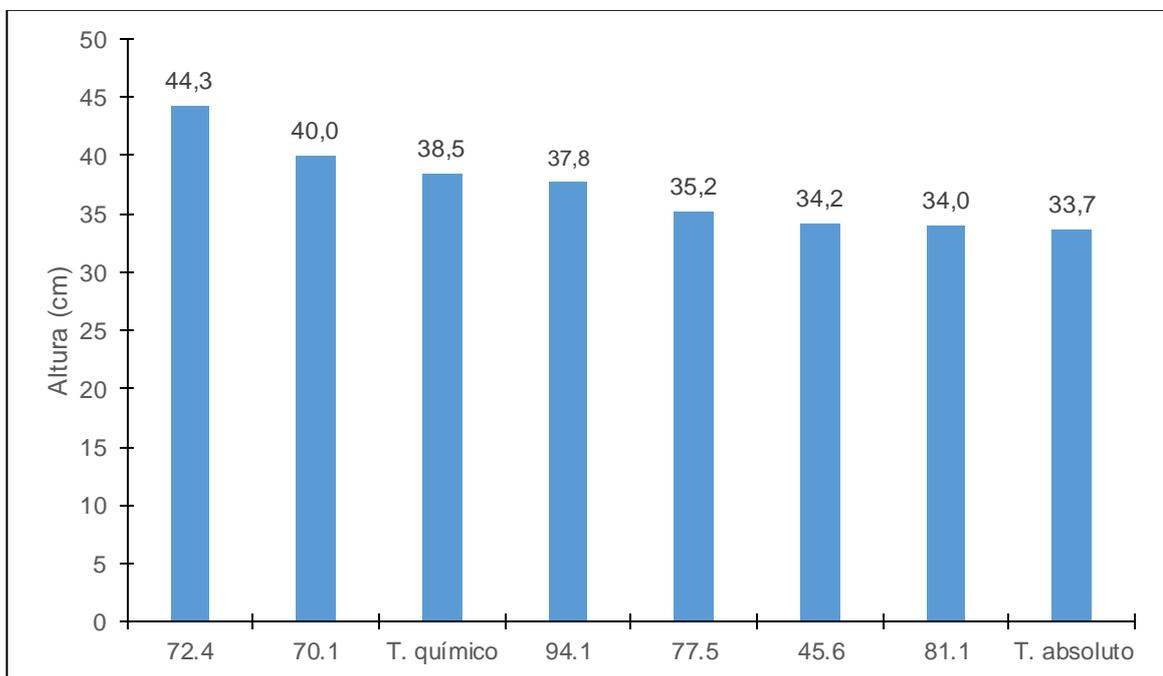


Figura 38. Altura (cm) de *Asparagus officinalis* L., 45 días después de la inoculación de *Bacillus* spp.

El número de tallos de las plantas de espárrago a los 45 días fue de 2,0 a 3,7 tallos con *Bacillus* spp.; 2 tallos en el testigo absoluto y 2,3 tallos en el testigo químico (Figura 39), registrándose índices de efectividad de 35% con *B. circulans* 77.5 y 85% con *B. subtilis* 45.6 (Tabla 16). El análisis de varianza de los valores de número de tallos no demostró significancia (Anexo 12); no obstante, numéricamente el mayor valor se alcanzó con *B. subtilis* 45.6.

La altura de las plantas de espárrago a los 60 días fue de 45,7 a 57,3cm con *Bacillus* spp., 45,5cm en el testigo absoluto y 48,5cm en el testigo químico (Figuras 40 a 43), registrándose índices de efectividad de 0,44% con *B. sphaericus* 81.1 y 25,93% con *B. circulans* 70.1, (Tabla 15). El análisis de varianza de los valores de altura demostró significancia (Anexo 10) y según la prueba múltiple de Tukey el mayor valor se alcanzó con *B. circulans* 70.1, diferenciándose significativamente de los demás tratamientos (Tabla 17).

El número de tallos de las plantas de espárrago a los 60 días fue de 2,0 a 3,7 tallos con *Bacillus* spp.; 2 tallos en el testigo absoluto y 3 tallos en el testigo químico (Figura 44), registrándose índices de efectividad de 50% con *B. pasteurii* 72.4, *B. circulans* 77.5 y *B. pasteurii* 94.1 y 85% con *B. circulans* 70.1 y *B. subtilis* 45.6 (Tabla 16). El análisis de varianza de los valores de número de tallos no demostró significancia (Anexo 13); sin embargo, numéricamente el mayor valor se alcanzó con *B. circulans* 70.1 y *B. subtilis* 45.6.

Los índices de efectividad de por lo menos dos cultivos de *Bacillus* spp. superaron en la altura al testigo químico: *B. pasteurii* 72.4 y 94.1 a los 30 días, *B. circulans* 70.1 y *B. pasteurii* 72.4 a los 45 días y *B. circulans* 70.1 y *B. pasteurii* 94.1 a los 60 días. Asimismo, en el número de tallos, también los cultivos de *Bacillus* spp., a excepción de *B. sphaericus* 81.1 igualaron o superaron al testigo químico a los 30, 45 y 60 días (Tablas 15, 16).

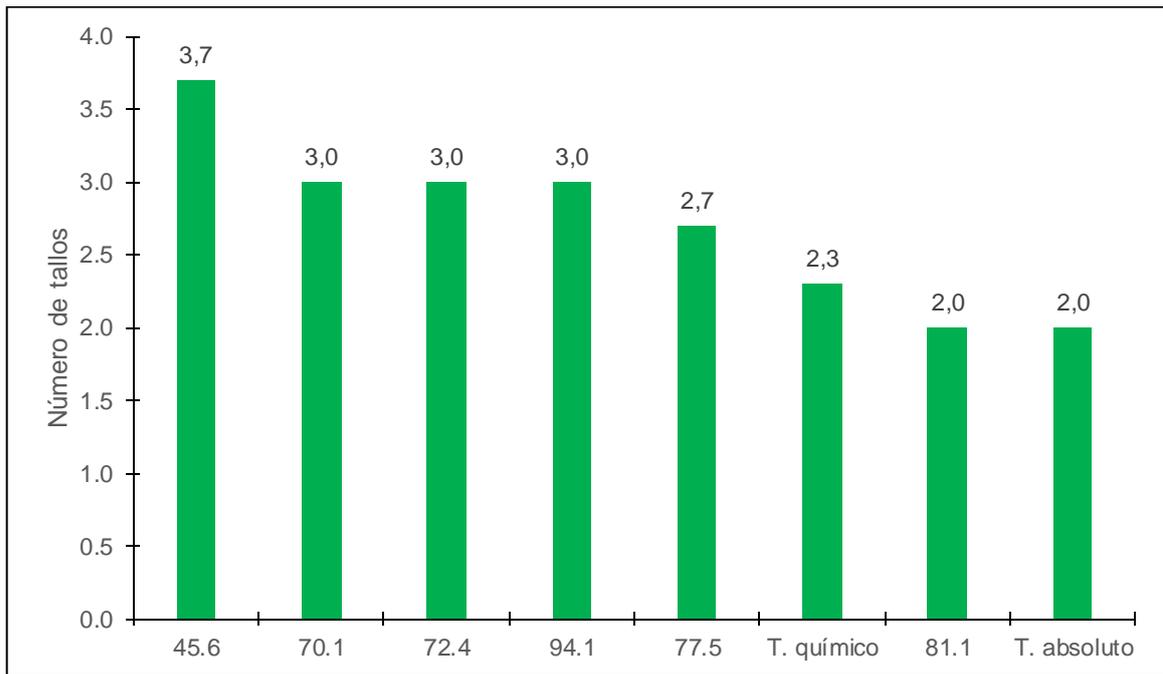


Figura 39. Número de tallos de *Asparagus officinalis* L., 45 días después de la inoculación de *Bacillus* spp.

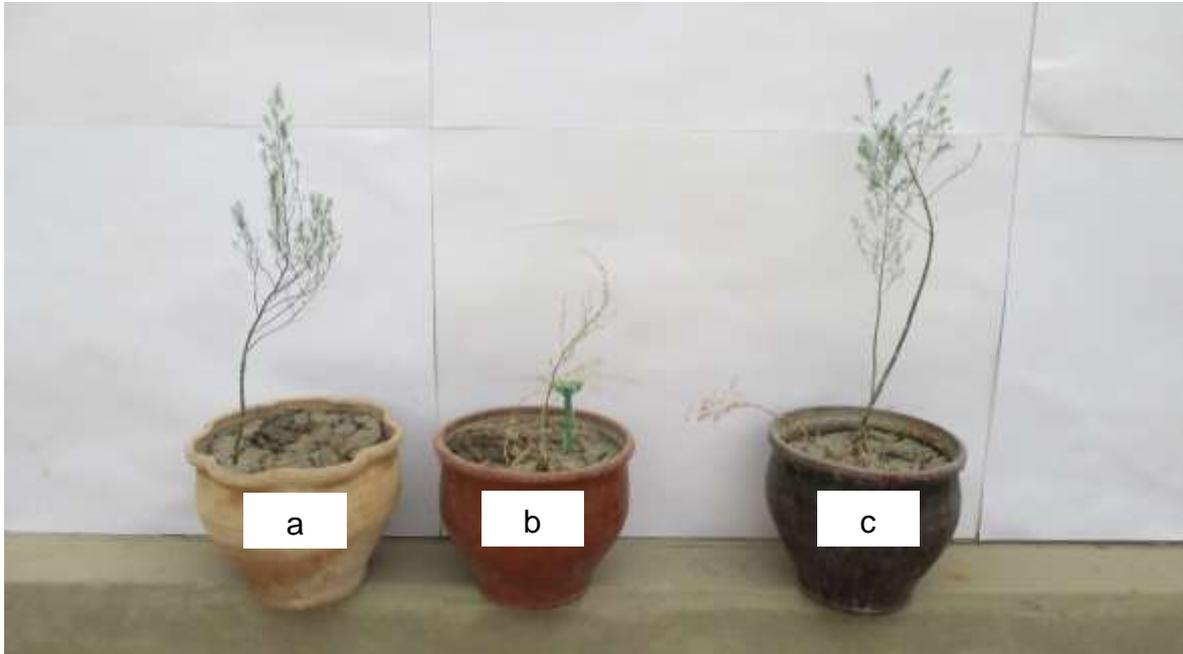


Figura 40. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 60 días después de la siembra e inoculación de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) *B. circulans* 70.1.

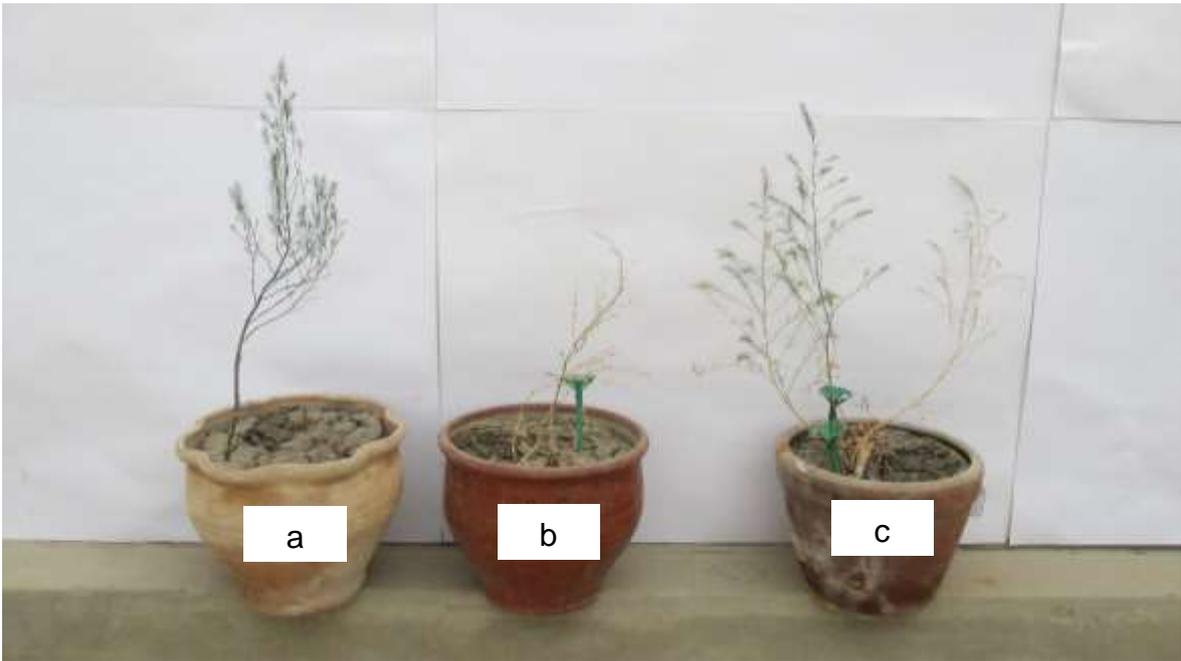


Figura 41. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 60 días después de la siembra e inoculación de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) *B. pasteurii* 72.4.

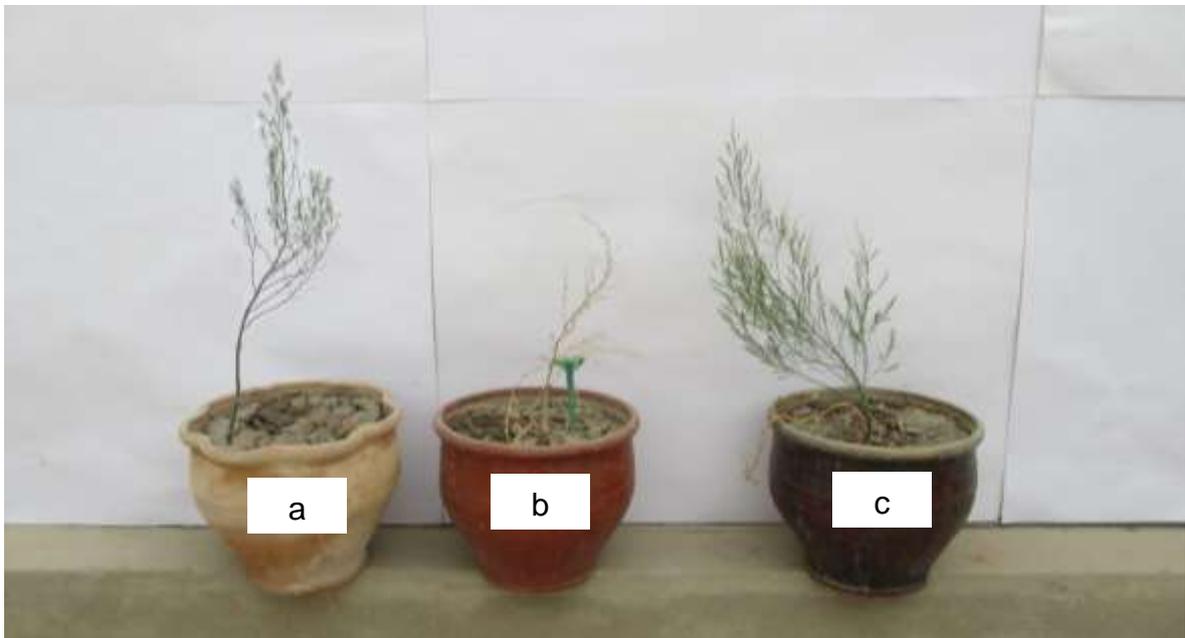


Figura 42. Plantas de *Asparagus officinalis* L. 60 días después de la siembra e inoculación de coronas, a) Testigo químico, b) Testigo absoluto, c) *B. pasteurii* 94.1.

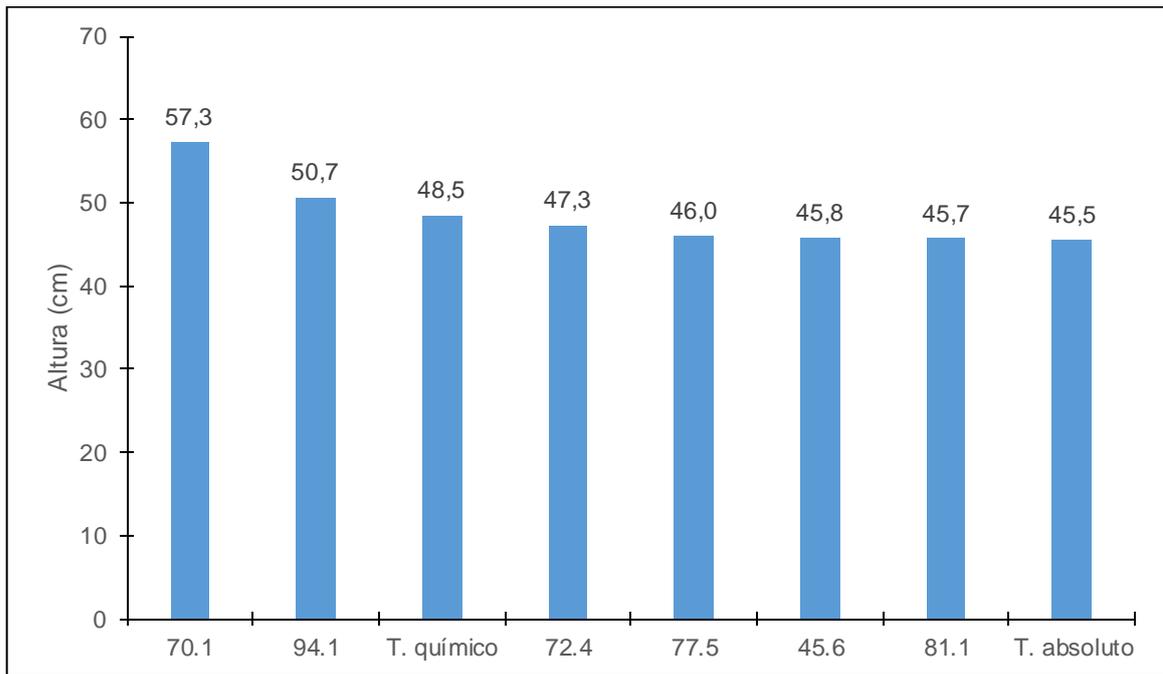


Figura 43. Altura (cm) de *Asparagus officinalis* L., 60 días después de la inoculación de *Bacillus* spp.

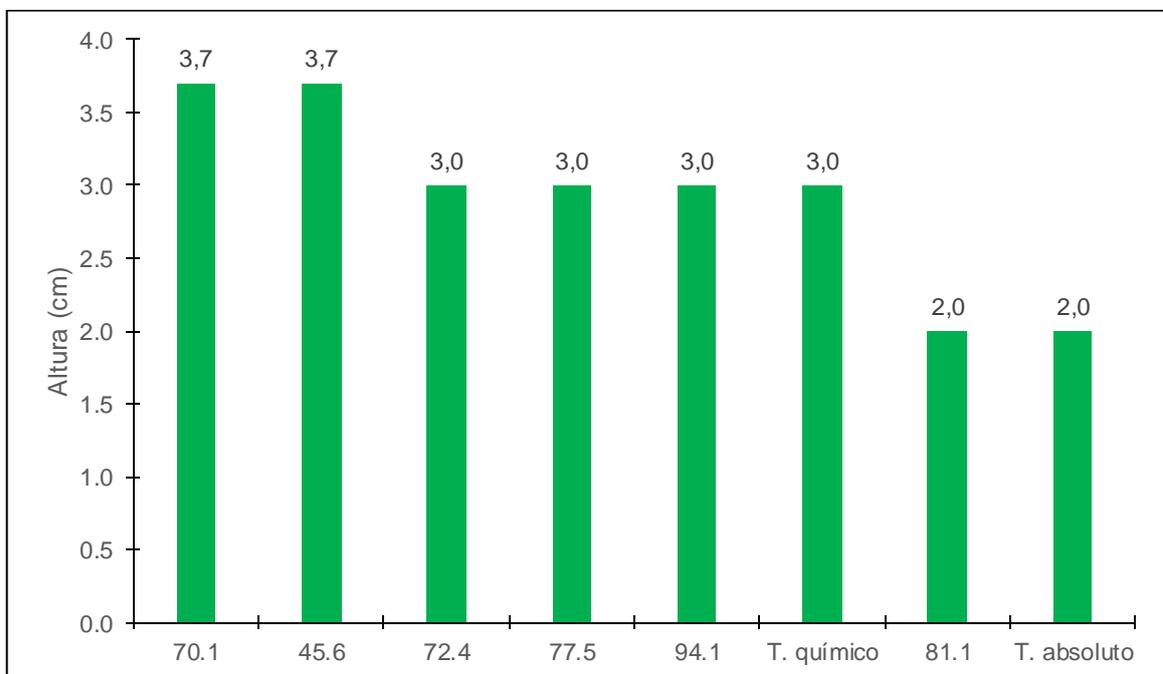


Figura 44. Número de tallos de *Asparagus officinalis* L., 60 días después de la inoculación de *Bacillus* spp.

V. DISCUSIÓN

En muestras de rizoplasma y rizósfera de espárrago se aislaron bacterias del género *Bacillus*, reportado previamente en raíces de arroz (Badía *et al.*, 2011) y eucalipto (Angulo *et al.*, 2014); suelo rizosférico de maíz (Aguado & Moreno, 2012), papa (Calvo & Zúñiga, 2010), algodón (Salaheddin *et al.*, 2010), soya (Wahyudi *et al.*, 2011), tomate (Aysha *et al.*, 2012), *Allium sativum* L. “ajo” (Astorga *et al.*, 2014) y *Theobroma cacao* “cacao” (Suárez & Rangel, 2013); así como también en suelo rizosférico, raíces y hojas de arroz (Tejera *et al.*, 2011).

Las especies de *Bacillus* son ubicuas y son aisladas del suelo rizosférico y tejidos de diferentes cultivos agrícolas y forestales (Angulo *et al.*, 2014), así como también de plantas endémicas del desierto (Castillo *et al.*, 2015), residuos lignocelulósicos de *Ricinus communis* “higuerilla” (Rodríguez, 2013) e incluso personas enfermas (Rodríguez *et al.*, 2012). El suelo rizosférico es la zona del suelo influenciada por las raíces a través de la liberación de exudados y el rizoplasma es la superficie de la raíz, incluidas las partículas del suelo fuertemente adheridas a la raíz. Ambos, el suelo rizosférico y el rizoplasma junto a la raíz misma conforman la rizósfera (Nihorimbere *et al.*, 2011).

Para el aislamiento de *Bacillus* spp., las muestras recibieron tratamiento térmico, coincidiendo con Astorga *et al.* (2014), Angulo *et al.* (2014) y Castillo *et al.* (2015). Los métodos para el aislamiento de bacterias esporuladas como *Bacillus* spp. están basados en la resistencia de las endosporas a elevadas

temperaturas: 80°C durante 10 minutos (Ríos & Zúñiga, 2012), 15 minutos (Castillo *et al.*, 2015) y 30 minutos (Calvo *et al.*, 2008).

El género *Bacillus* se identificó fenotípicamente, coincidiendo con Sosa *et al.* (2011), Aysha *et al.* (2012) y Astorga *et al.* (2014); no obstante, las técnicas convencionales de identificación fenotípica deben ser complementadas con técnicas moleculares (Rodríguez, 2013; Castillo *et al.*, 2015). En el rizoplasma y rizósfera de espárrago se identificaron nueve especies de *Bacillus*, reportadas previamente por Márquez (2007) en suelo de bosque de *Pinus radiata* y una pradera permanente (*B. stearothermophilus*, *B. alvei*); Altuna y Pelaez (2013) en maíz (*B. circulans*, *B. pasteurii*); Luna *et al.* (2013) en tomate (*B. subtilis*, *B. megaterium*); Perleche & Rentería (2013) en malezas (*B. sphaericus*); Angulo *et al.* (2014) en eucalipto (*B. cereus*, *B. megaterium*); Suárez & Rangel (2013) en cacao (*B. cereus*, *B. megaterium*) y Castillo *et al.* (2015) en plantas endémicas del desierto (*B. pumilus*, *B. subtilis*).

Los cultivos de *Bacillus* spp. fijaron nitrógeno *in vitro*, cuantificándose hasta 26,384ppm, valor similar al reportado por Altuna & Pelaez (2013) y Perleche & Rentería (2013) en aislados de maíz y malezas respectivamente. La fijación de nitrógeno *in vitro* por *Bacillus* spp. también fue demostrada con *B. polymyxa* (Egamberdiyeva, 2007), *B. firmus* (Cuervo, 2010), *B. circulans* y *B. lentus* (Altuna & Pelaez, 2013), *B. megaterium* y *B. subtilis* (Luna *et al.*, 2013) y *Bacillus* spp. (Badía *et al.*, 2011; Wahyudi *et al.*, 2011; Tejera *et al.*, 2011).

Los cultivos de *Bacillus* spp. solubilizaron fosfato tricálcico, *in vitro*, cuantificándose hasta 8,316ppm, valor superior al reportado por Altuna & Pelaez, 2013 (2,1ppm), y Perleche & Rentería, 2013 (3,43ppm) en aislados de maíz y malezas, respectivamente. La solubilización de fosfato *in vitro* por *Bacillus* spp. también fue demostrada con *B. amyloquefaciens* y *B. megaterium* (Angulo *et al.*, 2014), *B. subtilis* (Luna *et al.*, 2013; Rodríguez, 2013), *B. circulans* y *B. lentus* (Altuna & Pelaez, 2013).

Los cultivos de *Bacillus* spp. produjeron indoles, cuantificándose hasta 23,578ppm. Este valor es superior al rango 2,3–17,04ppm reportado por Altuna & Pelaez (2013), Rodríguez (2013) y Angulo *et al.* (2014), para aislados de maíz, residuos lignocelulósicos y eucalipto, respectivamente; pero es inferior a 86,82ppm

reportados por Wahyudi *et al.* (2011) para *Bacillus* spp. aisladas de soya. La producción de indoles por estas bacterias ha sido demostrada con *B. cereus*, *B. amyloquefaciens*, *B. firmus*, *B. weihenstephanensis*, *B. simplex* (Angulo *et al.*, 2014), *B. megaterium*, *B. subtilis* (Luna *et al.*, 2013), *B. circulans*, *B. lentus* y *B. brevis* (Altuna & Pelaez, 2013).

El potencial de *Bacillus* spp. como promotoras de crecimiento en plantas se atribuye a mecanismos indirectos o de control biológico (Ruiz *et al.*, 2014) y a mecanismos directos como la fijación de nitrógeno (Luna *et al.*, 2013), solubilización de fosfatos (Angulo *et al.*, 2014) y producción de indoles (Altuna & Pelaez, 2013). En este contexto, se seleccionaron los cultivos de *Bacillus* spp. que alcanzaron los mayores valores en la concentración de amonio, fósforo soluble e indoles, coincidiendo con Altuna & Pelaez (2013) y Perleche & Rentería (2013); no obstante, también se pueden seleccionar sólo por indoles producidos (Rodríguez, 2013), efecto en la germinación (Wahyudi *et al.*, 2011) y efecto en el desarrollo vegetativo (Angulo *et al.*, 2014).

Las bacterias del género *Bacillus* fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fosfatos y productoras de indoles afectaron positivamente el desarrollo vegetativo de las plantas de espárrago, observándose incremento en la altura y número de tallos. De manera similar, el efecto positivo de *Bacillus* spp. ha sido demostrado en papa (Ekin *et al.*, 2009), fresa (Esitken *et al.*, 2010), soya (Wahyudi *et al.*, 2011), tomate (Aysha *et al.*, 2012; Rodríguez, 2013) y maíz (Paredes, 2014; Ramírez, 2013; Torres, 2015).

El incremento en la altura de las plantas por *Bacillus* spp. fue reportado previamente en tomate y pimiento (Luna *et al.*, 2013), tomate (Aysha *et al.*, 2012; Rodríguez, 2013), soya (Wahyudi *et al.*, 2011) y maíz (Ramírez, 2013). También se ha reportado incremento en la germinación (Angulo *et al.*, 2014), longitud de raíces, materia seca, índice de vigor (Salaheddin *et al.*, 2010), diámetro de tallo, peso fresco y seco de vástagos y raíces (Luna *et al.*, 2013), número de hojas (Aysha *et al.*, 2012), número de raíces (Wahyudi *et al.*, 2011) y rendimiento (Esitken *et al.*, 2010; Paredes, 2014).

Dos cultivos de *Bacillus* spp. superaron en los índices de efectividad en la altura al testigo químico y todos lo igualaron o superaron en el número de tallos, coincidiendo con Paredes (2014). Este resultado sugiere que *B. circulans* 70.1 y *B. pasteurii* 72.4 y 94.1 deben ser investigados en condiciones de campo (Carreño, 2009) con la perspectiva de utilizarlos como biofertilizantes que puedan ser aplicados solos (Luna *et al.*, 2013) o junto a dosis disminuidas de fertilizante químico (Ekin *et al.*, 2009) en una agricultura no contaminante del ambiente.

VI. CONCLUSIONES

- 6.1 En el rizoplasma y rizósfera de espárrago se aislaron e identificaron fenotípicamente *Bacillus subtilis* (20,71%), *B. sphaericus* (20,71%), *B. pasteurii* (15,86%), *B. stearothermophilus* (11,0%), *B. alvei* (11,0%), *B. megaterium* (8,09%), *B. cereus* (8,09%), *B. circulans* (2,92%) y *B. pumilus* (1,62%).
- 6.2 Los cultivos de *Bacillus* spp. fijaron nitrógeno, solubilizaron fosfatos y produjeron indoles, cuantificándose variaciones desde 0,079 hasta 26,384ppm de amonio; 0,022 a 8,316ppm de fósforo soluble y 0,022 a 23,578ppm de indoles.
- 6.3 Los cultivos de *Bacillus* spp. seleccionados correspondieron a *B. circulans* 70.1 y *B. pasteurii* 72.4 con 26,384 y 20,741ppm de amonio; *B. circulans* 77.5 y *B. subtilis* 45.6 con 8,316 y 8,302ppm de fósforo soluble; *B. pasteurii* 94.1 y *B. sphaericus* 81.1 con 23,578 y 20,467ppm de indoles.
- 6.4 Las bacterias seleccionadas incrementaron la altura y el número de tallos de las plantas de espárrago, con índices de efectividad de 0,44 a 228,92% y 15,0 a 107,69%, respectivamente.

VII. RECOMENDACIONES

- 7.1 Identificar a nivel molecular *Bacillus circulans* 70.1 y *B. pasteurii* 72.4 y 94.1.
- 7.2 Determinar el efecto de *B. circulans* 70.1 y *B. pasteurii* 72.4 y 94.1 en el desarrollo vegetativo y rendimiento de espárrago en condiciones de campo, con o sin dosis de fertilizante químico.
- 7.3 Investigar sustratos orgánicos de bajo costo para el incremento masivo de *B. circulans* 70.1 y *B. pasteurii* 72.4 y 94.1.

VIII. RESUMEN

En el rizoplasma y la rizósfera de *Asparagus officinalis* L. “espárrago” se aislaron bacterias del género *Bacillus*, con el objetivo de determinar su potencial como promotoras de crecimiento en plantas. Las muestras se sometieron a tratamiento térmico, a 80°C por 10 minutos con enfriamiento rápido, se sembraron en agar nutritivo y las colonias de bacterias desarrolladas se aislaron e identificaron fenotípicamente. Se cuantificó el nitrógeno fijado como amonio, fósforo soluble producto de la solubilización de fosfato tricálcico e indoles producidos por las bacterias *in vitro*. Los seis cultivos de bacterias (9×10^8 cel mL⁻¹) que alcanzaron los mayores valores se inocularon por aspersión en coronas de espárrago cultivar UC-157 F2 y se determinó el efecto en la altura y número de tallos, durante 60 días en invernadero. Se aisló e identificó *Bacillus* spp., obteniéndose 309 cultivos puros, con los que se cuantificaron desde 0,079 hasta 26,384ppm de amonio; 0,022 a 8,316ppm de fosfato y 0,022 a 23,578ppm de indoles. Los cultivos de *Bacillus* spp. seleccionados incrementaron la altura y el número de tallos, con índices de efectividad de 0,44 a 228,92% y 15,0 a 107,69%, respectivamente. Se demostró la promoción de crecimiento de las plantas de espárrago por *Bacillus* spp.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adesemoye, A., Torbert, H. & Kloepper, J. (2009). Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbial Ecology*, 58, 921-929.
- Aguado, A. & Moreno, B. (2012). Biofertilizantes bacterianos desarrollados por INIFAP. En Aguado, A. (Ed.). *Introducción al uso y manejo de biofertilizantes en agricultura* (pp. 151-170). INIFAP/SAGARPA. Guanajuato, México.
- Aguilar, H. & Coral, J. (2013). *Caracterización de Bacillus spp. asociadas a la rizósfera de Jatropha curcas L., “piñón blanco”, en Lambayeque y su potencial como promotoras del crecimiento de plantas, 2012*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Agrobanco (2007). Cultivo del espárrago. Lima, Perú. Recuperado de http://www.agrobanco.com.pe/pdfs/publicacionagroinforma/2_cultivo_del_esparrago.pdf
- Altuna, H. & Pelaez, K. (2013). *Determinación del potencial como promotoras del crecimiento de plantas de las especies de Bacillus aisladas de la rizósfera de Zea mays L. “maíz” en Lambayeque, 2013*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Lambayeque, Perú.

- Alvarado, P. & Valderrama, M. (2014). *Caracterización de los géneros Burkholderia y Pseudomonas solubilizadoras de fosfato aisladas de Zea mays L. en el distrito de Requena en Lambayeque*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Angulo, V., Sanfuentes, E., Rodríguez, F. & Sossa, K. (2014). Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(4), 338–347.
- Astorga, K., Meneses, K., Zúñiga, C., Brenes, J. & Rivera, W. (2014). Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. *Tecnología en Marcha*, 27(2), 82-91.
- Aysha, O., Vinothkumar, P., Vasuki, S., Nirmala, P. & Reena, A. (2012). PGPR *Bacillus* isolated from tomato plant – A comparative study coconut water enrichment. *International Journal for Bioassays*, 1(11), 131–137.
- Badía, M., Hernández, B., Murrel, J., Mahillon, J. & Pérez, M. (2011). Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista Brasileira de Agroecología*, 6(1), 90-99.
- Bashan, Y., Holguin, G. & Ferrera, R. (1996). Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos I. *Azospirillum*. *Terra*, 14(2), 159-194.
- Bhattacharyya, P. & Jha, D. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 28, 1327-1350.
- Borrego, A. (2014). *Las enmiendas orgánicas del suelo en el control de las Fusariosis del espárrago y del tomate*. (Tesis de Doctorado). Universidad de Córdoba, España.
- Cadena, S. & Martínez, B. (2011). *Caracterización de cepas de Pseudomonas spp. y su efecto en la germinación y emergencia de Zea mays L. "maíz" en Lambayeque*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Lambayeque, Perú.

- Calvo, P., Reymundo, L. & Zúñiga, D. (2008). Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera de cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Ecología Aplicada*, 7(1,2), 141–148.
- Calvo, P. & Zúñiga, D. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada*, 9(1), 31-39.
- Canbolat, M., Bilen, S., Cakmakci, R., Sahin, F. & Aydin, A. (2006). Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. *Biology and Fertility of Soils*, (42), 350-357.
- Canto, B., Hurtado, E., Ma, W., Wang, C. & Wang, N. (2008). *Proyecto de importación de espárragos verdes frescos*. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid.
- Carreño, C. (2009). *Efecto de la inoculación de bacterias nativas solubilizadoras de fósforo en el desarrollo y rendimiento de tres cultivos agrícolas en Mochumí, Lambayeque, Perú*. (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Castillo, F., Hernández, F., Gallegos, G., Flores, A., Rodríguez, R. & Aguilar, C. (2015). Efectividad *in vitro* de *Bacillus* y polifenoles de plantas nativas de México sobre *Rhizoctonia solani*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(3), 549-562.
- Córdova, L. (2016). *Efecto de Azospirillum spp. nativas en el desarrollo vegetativo de Zea mays L. "maíz" en invernadero*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Cuervo, J. (2010). *Aislamiento y caracterización de Bacillus spp. como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales*. (Tesis de Grado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

- Dávila, J. (2004). *Elementos para una agricultura organica e introducción de cultivos alternativos para suelos con problemas de salinidad*. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Delgado, Y., Cupull, R., Pérez, C., Sánchez, A. & Vilchez, M. (2003). Efecto de *Azotobacter* spp. en la estimulación de la germinación y el desarrollo de posturas de *Coffea arabica* L. *Centro Agrícola*, 30(1), 26-31.
- Delgado, A. (2007). *Producción y comercialización de espárrago en el valle de Virú*. (Tesis de Maestría). Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, Perú.
- Egamberdiyeva, D. (2007). The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology*, 36, 184 -189.
- Ekin, Z., Oguz, F., Erman, M. & Ogun, E. (2009). The effect of *Bacillus* sp. OSU-142 inoculation at various levels of nitrogen fertilization on growth, tuber distribution and yield of potato (*Solanum tuberosum* L.). *African Journal of Biotechnology*, 8(18), 4418- 4424.
- Esitken, A., Yildiz, H., Ercisli, S., Donmez, M., Turan, M. & Gunes, A. (2010). Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) in yield, growth and nutrient contents of organically grow strawberry. *Scientia Horticulturae*, 124, 62-66.
- Franco, M. (2008). *Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas* (Tesis de Doctorado). Universidad de Granada, España.
- García, F. & Muñoz, H. (2010). *Caracterización de cepas nativas de Azospirillum spp. y su efecto como promotoras del desarrollo vegetativo de arroz (Oryza sativa)*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Lambayeque, Perú.

- Guillén, R., Hernández, F., Gallegos, G., Rodríguez, R., Aguilar, C., Padrón, E. & Reyes, M. (2006). *Bacillus* spp., como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(2), 105-114.
- Gutiérrez, F., Ramos, B., Probanza, A., Mehouchi, J., Tadeo, F. & Talon, M. (2001). The plant – growth - promoting rizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia plantarum*, 111, 206-211.
- Hernández, A., Heydrich, M., Velázquez, M. & Hernández, A. (2006). Perspectivas del empleo de rizobacterias como agentes de control biológico en cultivos de importancia económica. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(1), 42-49.
- Hernández, R., Fernández, C. & Baptista, P. (2010). *Metodología de la Investigación* (5ta ed.). México: Mc Graw, Hill Interamericana Editores S.A.
- Idris, E., Iglesias, D., Talon, M. & Borriss, R. (2007). Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular Plant-Microbe Interactions* (MPMI), 20(6), 619-626.
- Karnwal, A. (2009). Production of indole acetic acid by fluorescent *Pseudomonas* in the presence of L-tryptophan and rice root exudates. *Journal of plant Pathology*, 91(1), 61-63.
- Kirschenbilder, E., Castagnino, A., Díaz, K., Rosini M. & Falavigna A. (2015). Cadena espárrago: producción de diferentes genotipos en su quinto año y comportamiento en poscosecha. *Agronomía Mesoamericana*, 26(1), 99-109.
- Lara, C., Villalba, M. & Oviedo, L. (2007). Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, IX(2), 6-14.

- Layton, C., Maldonado, E., Monroy, L., Corrales, L. & Sánchez, L. (2011). *Bacillus* spp., perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *Nova - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 9(15), 177-187.
- Llatas, S. & Llatas, D. (2013). *EL Herbario Lambayeque (PRG). Las colecciones botánicas de 1966 al 2010*. Lambayeque, Perú: GRAFICART SRL.
- Loredo, C., López, L. & Espinosa, D. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana*, 22 (2), 225-239.
- Luna, L., Martínez, R., Hernández, M., Arvizu, S. & Pacheco, J. (2013). Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(1), 63-69.
- Mantilla, M. (2007). *Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (Chrysanthemum morifolium var. Yoko ono) en periodo de enraizamiento*. (Tesis de Grado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Márquez, F. (2007). *Aislamiento y taxonomía de bacterias del género Bacillus recolectadas en suelos de un bosque de Pinus radiata y una pradera permanente en distintas épocas de muestreo*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Austral de Chile, Vladivostok, Chile.
- Martim, R., Nagpala, A. & Luis, J. (2003). *Bacillus subtilis* and its efficacy as a biocontrol agent of *Rhizoctonia* - induced diseases of potato in organically-amended soil. *Research Journal*, 40, 96–124.
- Martínez, O., Jorquera, M., Crowley, D., Gajardo, G. & Mora, M. (2010). Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rizobacteria. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10(3), 293-319.
- Municipalidad Distrital de Guadalupe (2016). Plan de desarrollo concertado. Distrito de Guadalupe. 2016-2021. Recuperado de http://www.mdg.gob.pe/Transparencia/Gestion/PDC_2016_2021.pdf

- Nicolalde, A. & Quintana, D. (2010). *Utilización de bacterias fijadoras de nitrógeno (Azotobacter) y solubilizadoras de fósforo en el cultivo de brócoli (Brassica oleraceae var. Legacy) en Otavalo*. Ecuador: Universidad Técnica del Norte.
- Nihorimbere, V., Ongena, M., Smargiassi, M. & Thonart P. (2011). Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnology Agronomy Society and Environment*, 15(2), 327-337.
- Orozco, C. & Martínez, P. (2009). Evaluación de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno simbióticos aislados de la rizósfera de *Pinus patula* en Colombia. *Bosque*, 30(2), 70-77.
- Ortiz, R., Valencia, E. & López, J. (2009). Participación de las citocininas en la estimulación del crecimiento vegetal por *Bacillus megaterium*. *Biológicas*, (11), 64–72.
- Paredes, J., Carrillo, J., García, R., Allende, R., Sañudo, J. & Valdez, J. (2009). Microorganismos antagonistas para el control del complejo de hongos causantes de la Rabia del Garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el estado de Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27(1), 27–35.
- Paredes, S. (2014). *Efecto de la aplicación de Bacillus y Streptomyces spp. nativas en el desarrollo vegetativo y rendimiento de Zea mays L. maíz, amarillo duro en Lambayeque*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Pedro Ruíz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Perleche, C. & Rentería, M. (2013). *Determinación del Potencial como promotoras del crecimiento de Bacillus aisladas de la rizósfera de malezas asociadas a Zea mays L. "maíz" en Lambayeque, 2013*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Puicón, H. (2014). *Efecto de Pseudomonas spp. nativas en el desarrollo vegetativo de Zea mays L. "maíz" en condiciones de invernadero, 2013*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Lambayeque, Perú.

- Ramírez, J. (2013). *Efecto de Bacillus y Streptomyces spp. aisladas de malezas en el desarrollo vegetativo de Zea mays L. "maíz", en condiciones de invernadero, en Lambayeque, 2013.* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Regalado, F. (1992). *Espárrago: Conducción de viveros.* Perú: Colegio de Ingenieros del Perú.
- Reinoso, Y., Vaillant, D., Casadesús, L., Pazos, V. & García, E. (2007). Caracterización e identificación de cepas de los géneros *Bacillus*, *Brevibacillus* y *Paenibacillus* aisladas del suelo con potencialidades para el control biológico de *Rhizoctonia solani* Kühn. Recuperado de http://www.actaf.co.cu/revistas/agrotecnia_05_2008/agrot2007-3/BIOPLAG/Bioplagn10.pdf
- Ríos, P. & Zúñiga, L. (2012). *Bacillus spp. aisladas de rizósfera de Lycopersicon esculentum Mill. "tomate" en Lambayeque y su potencial como promotoras del crecimiento de plantas.* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Rodier, J. & Rodi, L. (2005). *Análisis de Aguas.* España: Ediciones Omega.
- Rodríguez, N., Esquivias, M., Plans, E., Tesfamariam, A., Reyes, F. & Ramos, J. (2012). Brote de carbunco en una zona rural de Etiopía. *Revista Clínica Española*, 212(9), e73-e75.
- Rodríguez, C. (2013). *Evaluación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal en tomate (Solanum lycopersicum) variedad Santa Clara, aislados de residuos lignocelulósicos de higuera (Ricinus communis).* (Tesis de Especialidad). Universidad Católica de Manizales, Colombia.
- Romero, L. & Zapata, M. (2014). *Caracterización de especies de Bacillus spp. solubilizadoras de fosfatos aisladas de Zea mays L. en el distrito de Requena en Lambayeque, Junio - Agosto, 2014.* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Lambayeque, Perú.

- Ruiz, E., Mejía, M., Cristóbal, J., Valencia, A. & Reyes, A. (2014). Actividad antagónica de filtrados de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(7), 1325-1332.
- Salaheddin, K., Valluvaparidasan, V., Ladhakshmi, D. & Velazhahan, R. (2010). Management of bacterial blight of cotton using a mixture of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *Plant Protection Science*, 46(2), 41–50.
- Schallmeyer, M., Singh, A., & Ward, P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50, 1-17.
- Sosa, A., Álvarez, V., Torres, D., & Casadesús, L. (2011). Identificación y caracterización de seis aislados pertenecientes al género *Bacillus* promisorios para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*, 15(1), 39-43.
- Stechmann, L. (2011). *Crecimiento de Bacillus spp., Pseudomonas putida y Streptomyces spp., en sustrato con diferente contenido de materia orgánica y pH y su efecto en Solanum tuberosum L. "papa" en invernadero*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Suárez, L. & Rangel, A. (2013). Aislamiento de microorganismos para control biológico de *Moniliophthora roreri*. *Acta Agronómica*, 62(4), 370-378.
- Tejera, B., Rojas, M. & Heydrich, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 42(3), 131-138.
- Torres, I. (2015). *Efecto de Bacillus spp. en el desarrollo vegetativo de Zea mays L. "maíz", en condiciones de invernadero, 2014*. Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Vallejo, J., Peral, D. & Carrasco, M., (2009). Anotaciones al conocimiento etnobotánico y medicinal de los espárragos extremeños (Género *Asparagus* L.). *Medicina Naturista*, 3(1), 41–46.

Vásquez, A., Díaz, N., Vásquez, O. & Vásquez, W. (2012). *Metodología de la Investigación Científica*. Lambayeque, Perú: Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo.

Venner, C. & Martin, M. (2009). *Aislamiento y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en cultivos de uchuva (*Physalis peruviana* L.) con capacidad antagónica frente a *Fusarium* sp.* (Tesis de Grado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Wahyudi, A., Puji, R., Widyawati, A., Meryandini, A., & Asih, A. (2011). Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting Rhizobacteria. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 3(2), 34-40.

X. ANEXOS

ANEXO 1

Cálculo del número de muestras para el aislamiento de *Bacillus* (en Vásquez *et al.*, 2012)

$$n = \frac{Z^2 p \cdot q}{T^2}$$

$$n = \frac{(1,96)^2 (0,90 \cdot 0,10)}{(0,06)^2}$$

$$n = 96,04 \text{ muestras}$$

Donde:

n = Tamaño de la muestra.

Z = 1,96 ($\alpha=0,05$) valor estándar.

p = Prevalencia de *Bacillus* spp. promotoras de crecimiento en plantas (0,90).

q = 1-p, ausencia (0,10).

T = Error estimado (6%).

ANEXO 2

Posición de los puntos de muestreo de raíces y suelo rizosférico de *Asparagus officinalis* L., 2016

Punto	Posición		Punto	Posición	
	Latitud	Longitud		Latitud	Longitud
1	-8.346433	-78.877472	34	-8.349107	-78.874532
2	-8.345996	-78.876798	35	-8.350052	-78.875259
3	-8.346651	-78.877240	36	-8.349319	-78.874368
4	-8.346181	-78.876637	37	-8.350157	-78.875044
5	-8.346790	-78.877055	38	-8.349503	-78.874236
6	-8.346427	-78.876465	39	-8.350293	-78.874924
7	-8.347015	-78.877073	40	-8.349662	-78.874128
8	-8.356586	-78.876327	41	-8.350477	-78.874790
9	-8.347375	-78.876920	42	-8.349812	-78.874024
10	-8.346781	-78.876196	43	-8.350715	-78.874759
11	-8.347598	-78.876808	44	-8.349974	-78.873922
12	-8.347028	-78.876006	45	-8.350782	-78.874621
13	-8.347863	-78.876651	46	-8.350102	-78.873808
14	-8.347234	-78.875860	47	-8.3508750,	-78.8744680
15	-8.348082	-78.876501	48	-8.350902,	-78.874313
16	-8.347444	-78.875711	49	-8.351045,	-78.874217
17	-8.348263	-78.876316	50	-8.351187,	-78.874113
18	-8.347675	-78.875541	51	-8.351334,	-78.874015
19	-8.348454	-78.876142	52	-8.351484,	-78.873914
20	-8.347886	-78.875387	53	-8.351624,	-78.873807
21	-8.348654	-78.876029	54	-8.351772,	-78.873710
22	-8.346538	-78.873790	55	-8.351920,	-78.873606
23	-8.349104	-78.876154	56	-8.352062,	-78.873502
24	-8.346712	-78.873676	57	-8.352219,	-78.873420
25	-8.349280	-78.876055	58	-8.352367,	-78.873319
26	-8.346899	-78.873550	59	-8.352512,	-78.873228
27	-8.349457	-78.875940	60	-8.352650,	-78.873111
28	-8.347080	-78.873411	61	-8.352765,	-78.872985
29	-8.349617	-78.875837	62	-8.352919,	-78.872894
30	-8.347273	-78.873281	63	-8.353080,	-78.872806
31	-8.349819	-78.875720	64	-8.353213,	-78.872693
32	-8.347450	-78.873183	65	-8.353352,	-78.872586
33	-8.350009	-78.875605	66	-8.353515,	-78.872498

Punto	Posición		Punto	Posición	
	Latitud	Longitud		Latitud	Longitud
67	-8.353652,	-78.872399	82	-8.349744,	-78.872050
68	-8.353767,	-78.872263	83	-8.350029,	-78.871529
69	-8.353900,	-78.872154	84	-8.350129,	-78.871337
70	-8.354038,	-78.872043	85	-8.350169,	-78.871245
71	-8.354196,	-78.871959	86	-8.350466,	-78.871266
72	-8.854319,	-78.871838	87	-8.350512,	-78.871173
73	-8.354469,	-78.871744	88	-8.350591,	-78.871014
74	-8.354595,	-78.871625	89	-8.350768,	-78.870929
75	-8.354735,	-78.871519	90	-8.350981,	-78.870863
76	-8.354885,	-78.871406	91	-8.351209,	-78.870743
77	-8.349140,	-78.872584	92	-8.351415,	-78.870716
78	-8.349220,	-78.872390	93	-8.351458,	-78.870458
79	-8.349397,	-78.872177	94	-8.351629,	-78.870485
80	-8.349454,	-78.872060	95	-8.351771,	-78.870122
81	-8.349465,	-78.871974	96	-8.352022,	-78.870255

ANEXO 3

Medios de cultivo y soluciones para el aislamiento y mantenimiento de *Bacillus* spp.

a. Agar Nutritivo (en Escobar & Horna, 2011)

Componentes	gL ⁻¹
Peptona	5,0
Extracto de carne	3,0
Agar agar	15,0
Agua destilada csp	1000 mL

b. Agar Trypticase Soya (en Cadena & Martínez, 2011)

Componentes	gL ⁻¹
Triptona	15,0
Peptona	5,0
Extracto de levadura	3,0
Glucosa	5,0
Cloruro sódico	5,0
Agar	15,0
Agua destilada en cantidad suficiente	1000 mL

c. Caldo extracto de suelo al 10% (en García & Muñoz, 2010)

Componentes	gL ⁻¹
K ₂ HPO ₄	0,4
MgCl ₂	0,1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05
FeCl ₃	0,01
CaCl ₂	0,1
Triptona	1,0
Extracto de levadura	1,0
Extracto de suelo al 10%	250 mL
Agua destilada	750 mL

Ajustar a pH 7,3. Para obtener extracto de suelo al 10%, depositar en un matraz 250 g de suelo agrícola y 500 mL de agua destilada. Hervir 2 horas, completar a 500 mL con agua destilada y filtrar el sobrenadante. Tomar 25 mL del filtrado y completar a 500 mL con agua destilada.

d. Medio de cultivo National Botanical Research Institute, NBRIP (en Alvarado & Valderrama, 2014)

Componentes	gL ⁻¹
Glucosa	10,0
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25
KCl	0,2
MgCl ₂ .6H ₂ O	5,0
Agar agar	15,0
Agua destilada	1000 mL

Solución de antimicótico (en Alvarado & Valderrama, 2014)

Disolver una cápsula de 150 mg de Fluconazol en 10 mL de alcohol al 95%. Agregar 2 mL de solución de antimicótico por litro de medio de cultivo para tener 45 mg de Fluconazol por litro.

e. Caldo tripticasa soya suplementado con triptófano (en Escobar & Horna, 2011)

Componentes	gL ⁻¹
Peptona de caseína	17,0
Peptona de harina de soya	3,0
D(+) glucosa (dextrosa)	2,5
Cloruro de sodio	5,0

Continuación ...

Componentes	gL ⁻¹
Fosfato dipotásico	2,5
Triptófano	0,01
Agua destilada csp	1000 mL

Disolver por calentamiento y ajustar pH 7,3.

ANEXO 4

Procedimiento para elaborar la curva de calibración para cuantificar el ión amonio

a. Reactivos (en Lara *et al.*, 2007; Cadena & Martínez, 2011)

- **Cloruro de potasio 2M**

Cloruro de potasio	149,12g
Agua destilada	1000 mL

- **Solución alcohólica de fenol 10%**

Fenol concentrado	10 mL
Alcohol 97°	97 mL

- **Nitroprusiato de sodio 0,5%**

Nitroprusiato de sodio	0,5g
Agua destilada	100mL

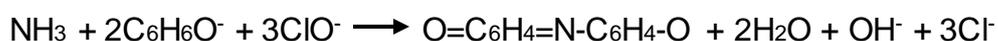
- **Solución oxidante**

Citrato de sodio	20,0g
Hidróxido de sodio	1,0g
Hipoclorito de sodio 5% (lejía comercial)	2mL
Agua destilada	100mL

b. Método colorimétrico de Berthelot para cuantificar el nitrógeno en amonio (en Lara *et al.*, 2007)

b.1 Fundamento del método colorimétrico de Berthelot (fenolhipoclorito)

Se basa en la formación de un color azul intenso de indofenol, que resulta de la reacción del ión amonio (NH₄) con los compuestos fenólicos, en presencia de un agente oxidante, como el hipoclorito de sodio u o-fenol y un catalizador, principalmente nitroprusiato de sodio o de potasio. El mecanismo de la reacción depende de la luz presente, la temperatura ambiente, catalizadores y pH alcalino. Cuando se utiliza fenol o sodio la reacción puede ser representada de la siguiente manera:



b.2 Preparación de diluciones a partir de una solución madre de NH₄Cl

Para obtener la curva patrón se prepara una solución madre de 100 ppm de NH₄Cl, para lo cual se pesa 0,1 g de NH₄Cl y se disuelve en 1L d agua bidestilada. Posteriormente, a partir de la solución madre se efectúan las siguientes diluciones:

N° de tubo	Solución patrón [mL]	H ₂ O bidestilada [mL]	NH ₄ Cl (Ug/mL = ppm) NH ₄ Cl [µg/mL = ppm]
1	0,0	10,0	0
2	0,2	9,8	2
3	0,4	9,6	4
4	0,6	9,4	6
5	0,8	9,2	8
6	1,0	9,0	10
7	1,5	8,5	15
8	2,0	8,0	20

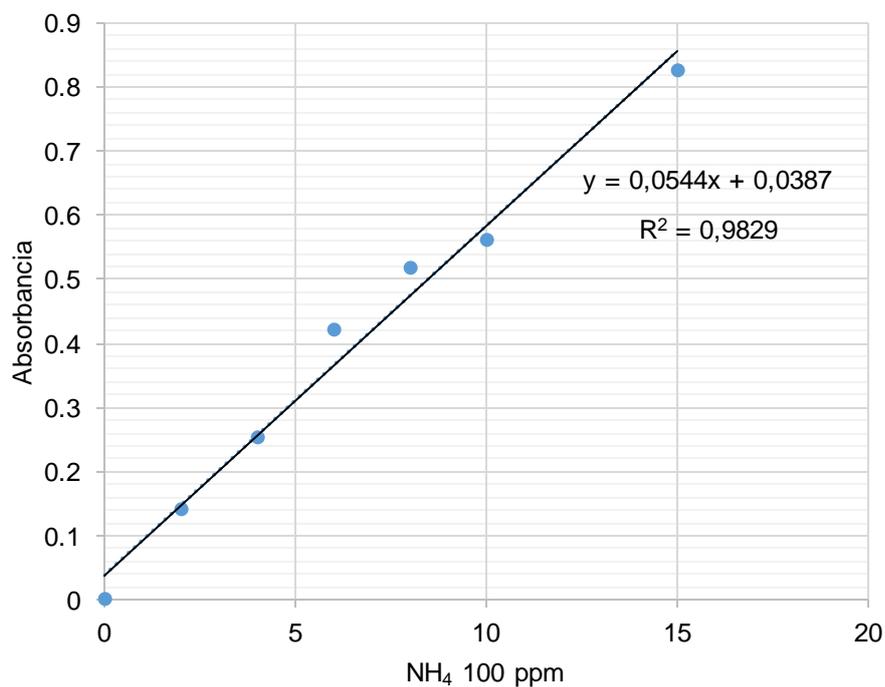
b.3 Procedimiento para la cuantificación de amonio por colorimetría

Obtenidas las diluciones, agregar a cada tubo 0,4 mL de solución alcohólica de fenol al 10%; 0,4 mL de nitrprusiato de sodio al 0,5% y 1 mL de solución oxidante, luego agitar para mezclar y dejar en reposo durante 1 hora. Observar una coloración que varía del verde azul al azul intenso según la concentración de amonio. Leer la absorbancia de cada dilución en el espectrofotómetro a 632,9 nm.

Una vez obtenida la absorbancia de todas las concentraciones de amonio, corregir los valores y mediante regresión lineal con el programa Microsoft Excel 2013, obtener la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (R²) que deberá ser mayor a 0,9 para demostrar una dispersión homogénea de los valores sobre la recta.

Nº de tubo	NH ₄ 100 (ppm)	Absorbancia	Absorbancia corregida
01	0	0,058	0,000
02	2	0,199	0,141
03	4	0,311	0,253
04	6	0,480	0,422
05	8	0,576	0,518
06	10	0,619	0,561
07	15	0,884	0,826

Obtenida la absorbancia de las siete concentraciones de amonio, introducir los datos en el programa Microsoft Office Excel 2013 y construir la curva patrón de calibración:



En la ecuación obtenida:

$$y = 0,0544x + 0,0387$$

Donde:

y: representa la absorbancia captada (variable dependiente).

x: cantidad de amonio en ppm (variable independiente).

Despejar "x" para obtener la cantidad de amonio (ppm) fijado por cada bacteria nativa.

$$x = \frac{y - 0,0387}{0,0544}$$

ANEXO 5

Cuantificación de fósforo solubilizado *in vitro*

a. Reactivos (en Rodier & Rodi, 2005)

- **Solución de ácido sulfúrico 5N**

Ácido sulfúrico (d = 1,84)	14 mL
Agua destilada hasta enrase	100 mL

- **Solución de molibdato amónico 4%** 20 mL

- **Solución de ácido ascórbico**

Ácido ascórbico	1,76 mL
Agua destilada hasta enrase	100 mL

- **Solución de emético (preparar al momento del uso)**

Tartrato doble de antimonio y potasio	0,0274 g
Agua destilada hasta enrase	100 mL

- **Reactivo para determinación de ortofosfatos**

Ácido sulfúrico 5N	40 mL
Solución de molibdato amónico	12 mL
Solución de ácido ascórbico	24 mL
Solución de emético	4 mL

- **Solución madre de 0,2 mgL⁻¹ de fósforo**

Fosfato monopotásico previamente desechado en agua a 100°C	877g
Agua destilada hasta enrase	100 mL

- **Solución hija de 2mgL⁻¹ de fósforo**

Diluir 1 mL de solución madre en 99 de agua destilada (1/100)

b. Método colorimétrico del Molibdato para cuantificar fósforo soluble (en Rodier & Rodi, 2005)

b.1 Fundamento

En medio ácido y en presencia de molibdato amónico, los ortofosfatos forman un complejo fosfomolibdico que, reducido por el ácido ascórbico, desarrolla una coloración azul susceptible de una determinación colorimétrica y cuya aparición se acelera utilizando el catalizador emético, tartrato doble de antimonio y potasio.

b.2 Limpieza de los recipientes de vidrio

Para la limpieza del material de vidrio no utilizar detergentes que contengan fosfato. Lavados con ácido clorhídrico diluido y enjuagados cuidadosamente con agua destilada.

b.3 Preparación de la curva de calibración

Colocar en una serie de matraces aforados de 25 mL:

Número de matraces	T	I	II	III
Solución salina de fósforo de 2 mgL ⁻¹ (mL)	0	1	2	5
Agua bidestilada (mL)	20	19	18	15
Reactivo indicador (mL)	4	4	4	4
Agua destilada hasta enrase (mL)	25	25	25	25
Correspondencia de fósforo en mgL ⁻¹	0	0,1	0,2	0,5

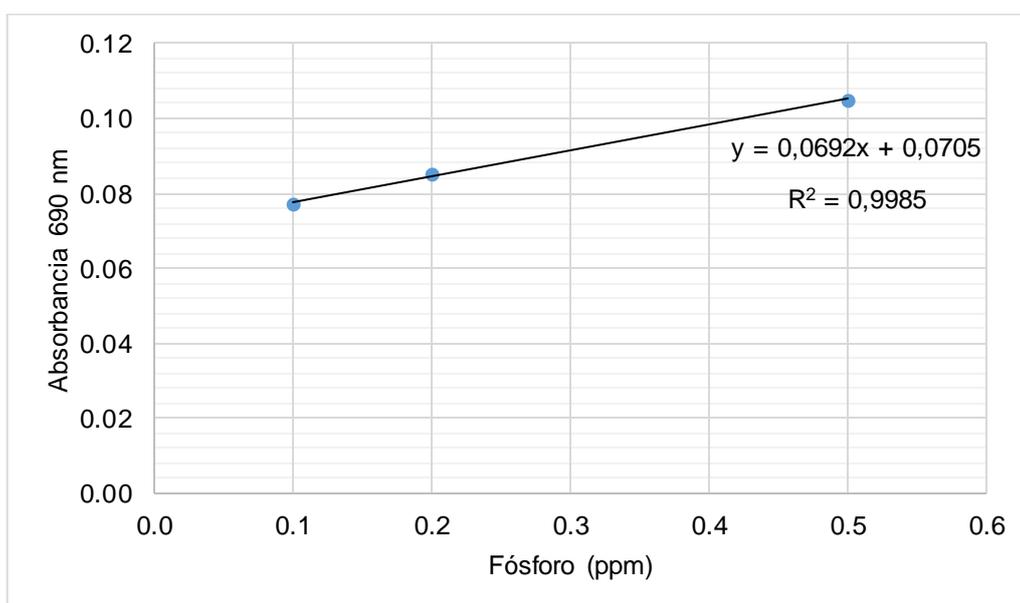
Esperar 20 minutos y efectuar las lecturas en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 690 nm en cubetas de 10 cm. Construir la curva de calibración. Los datos de absorbancia corregida se analizan mediante regresión lineal con el programa Microsoft Excel 2013 para obtener la ecuación de la recta y el coeficiente (R^2) que deberá ser mayor a 0,9 para demostrar una dispersión homogénea de los valores sobre la recta.

b.4 Procedimiento para cuantificar fosfatos en la muestra

Introducir 20 mL de la muestra a analizar en un matraz aforado de 25 mL. Añadir 4 mL de reactivo indicador, completar el volumen a 25 mL con agua destilada. Esperar 20 minutos y efectuar la lectura en el espectrofotómetro de luz visible con una longitud de onda de 690 nm. Tener en cuenta el valor leído para el testigo. Obtener los resultados en la curva de calibración. Para una muestra de 20 mL, la curva indica el contenido de fósforo expresado en miligramos por litro.

Nº de tubo	Fósforo soluble (ppm)	Absorbancia
1	0,1	0,077
2	0,2	0,085
3	0,5	0,105

Una vez obtenida la absorbancia de las tres concentraciones de fosfato dicálcico, introducir los datos en el programa Microsoft Office Excel 2013 y construir la curva patrón de calibración:



En la ecuación obtenida:

$$y = 0,0692x + 0,0705$$

Donde:

y: representa la absorbancia captada (variable dependiente).

x: cantidad de fósforo en ppm (variable independiente).

Despejar "x" para obtener la cantidad de fósforo (ppm) producido por cada bacteria nativa.

$$x = \frac{y - 0,0705}{0,0692}$$

ANEXO 6

Procedimiento para elaborar la curva de calibración para cuantificar indoles

a. Reactivos

- **Reactivo de Salkowski (en García & Muñoz, 2010)**

Componentes	g L^{-1}
H ₂ SO ₄ concentrado	150 mL
Agua destilada	250 mL
FeCl ₃ 0,5M en agua destilada	7,5 mL

Al momento de la preparación, verter el ácido sulfúrico concentrado en un balón con 250 mL de agua destilada y simultáneamente enfriar con chorro de agua constante. Finalmente agregar el cloruro férrico al 0,5 M.

Utilizar 4 mL del reactivo para 1 mL de la muestra investigada.

b. Método colorimétrico de Salkowski para cuantificar indoles (en Mantilla, 2007)

b.1 Fundamento de la reacción de Salkowski

Mediante la reacción de Salkowski se detectan grupos indol presentes en el medio y la concentración de indol es directamente proporcional a la intensidad de color rojo producido. A su vez, el cambio de color es el resultado de una reacción oxidativa con el ácido sulfúrico, donde por medio de una transaminación un grupo amino es sustituido por el cloro proveniente del FeCl₃, originando un compuesto visible de color rosado a rojo en el caso del indolacético. Otras coloraciones indican la presencia de productos intermedios de la síntesis del ácido indolacético, que pueden ser generados a partir del triptófano.

b.2 Preparación de diluciones a partir de una solución madre de AIA

Para obtener una curva patrón de ácido indolacético, preparar una solución madre de 100 ppm, para lo cual se pesan 10 mg de ácido indolacético y se disuelven con unas gotas de NaOH en un matraz aforado a 100 mL. A continuación enrasar con agua bidestilada y agitar hasta homogenizar. Posteriormente se realizan las siguientes diluciones:

N° de tubo	Solución patrón (100 µg mL ⁻¹)	H ₂ O bidestilada [µL]*	Concentración AIA (mg L ⁻¹)
1	0	1000	0
2	20	980	2
3	40	960	4
4	60	940	6
5	80	920	8
6	100	900	10
7	150	850	15
8	200	800	20
9	300	700	30
10	400	600	40
11	500	500	50
12	600	400	60

*1000 µL = 1 mL

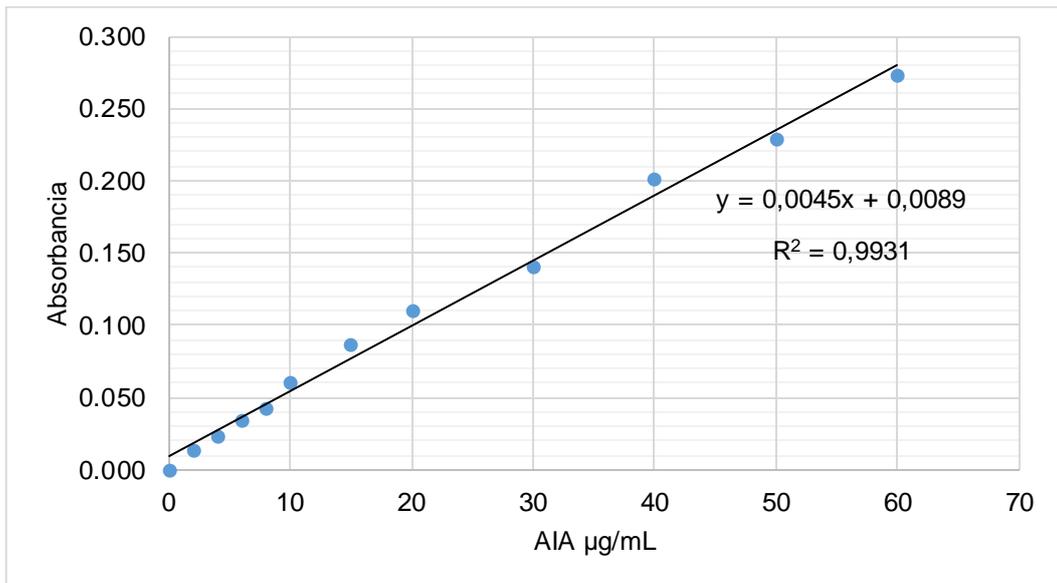
b.3 Procedimiento para la cuantificación de AIA por colorimetría

Obtenidas las concentraciones parciales de AIA extraer de cada tubo 0,4 mL de solución, verter en tubos de 13 x 75 mm y agregar 1,6 mL de reactivo de Salkowski (1:4). Dejar en reposo en oscuridad por 30 minutos. Observar la presencia de una coloración rojiza en los tubos. A continuación, leer la absorbancia de cada dilución en espectrofotómetro a 530 nm.

Una vez obtenida la absorbancia en todas las concentraciones de ácido indolacético, corregir los valores y mediante regresión lineal en el programa Microsoft Excel 2013, obtener la ecuación de la recta y el coeficiente (R^2) que deberá ser mayor a 0,9 para demostrar una dispersión homogénea de los valores sobre la recta.

Nº tubo	AIA ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia
1	0	0,000
2	2	0,013
3	4	0,023
4	6	0,034
5	8	0,043
6	10	0,060
7	15	0,087
8	20	0,110
9	30	0,141
10	40	0,202
11	50	0,229
12	60	0,273

Obtenida la absorbancia de las doce concentraciones de ácido indol acético, introducir los datos en el programa Microsoft Office Excel 2013 y construir la curva patrón de calibración:



En la ecuación obtenida:

$$y = 0,0045x + 0,0089$$

Donde:

y: representa la absorbancia captada (variable dependiente).

x: ácido indol acético en ppm (variable independiente).

Despejar "x" para obtener la cantidad de ácido indol acético (ppm) producido por cada bacteria nativa.

$$x = \frac{y - 0,0089}{0,0045}$$

ANEXO 7

Temperatura mínima, media y máxima durante el cultivo de *Asparagus officinalis* L.

Fecha	Temperatura máxima (°C)	Temperatura mínima (°C)	Temperatura media (°C)
20/10/16	25,0	17,0	21,0
21/10/16	24,0	17,0	20,5
22/10/16	25,0	17,0	21,0
23/10/16	24,0	17,0	20,5
24/10/16	24,0	17,0	20,5
25/10/16	25,0	17,0	21,0
26/10/16	24,0	16,0	20,0
27/10/16	25,0	17,0	21,0
28/10/16	24,0	16,0	20,0
29/10/16	24,0	16,0	20,0
30/10/16	24,0	16,0	20,0
31/10/16	24,0	16,0	20,0
01/11/16	24,0	16,0	20,0
02/11/16	24,0	15,0	19,5
03/11/16	23,0	16,0	19,5
04/11/16	24,0	17,0	20,5
05/11/16	24,0	17,0	20,5
06/11/16	24,0	16,0	20,5
07/11/16	25,0	16,0	20,5
08/11/16	27,0	17,0	22,0
09/11/16	26,0	17,0	21,5
10/11/16	26,0	17,0	21,5
11/11/16	26,0	17,0	21,5
12/11/16	26,0	17,0	21,5
13/11/16	25,0	18,0	21,5
14/11/16	25,0	18,0	21,5
15/11/16	25,0	17,0	21,0
16/11/16	24,0	17,0	20,5
17/11/16	24,0	17,0	20,5
18/11/16	22,0	16,0	19,0
19/11/16	25,0	14,0	19,5

Continuación ...

Fecha	Temperatura máxima (°C)	Temperatura mínima (°C)	Temperatura media (°C)
20/11/16	24,0	13,0	18,5
21/11/16	25,0	14,0	19,5
22/11/16	24,0	16,0	20,0
23/11/16	24,0	16,0	20,0
24/11/16	25,0	17,0	21,0
25/11/16	25,0	18,0	21,5
26/11/16	26,0	16,0	21,0
27/11/16	25,0	18,0	21,5
28/11/16	25,0	18,0	21,5
29/11/16	25,0	17,0	21,0
30/11/16	27,0	18,0	22,5
01/12/16	26,0	18,0	22,0
02/12/16	27,0	19,0	23,0
03/12/16	27,0	18,0	22,5
04/12/16	26,0	18,0	22,0
05/12/16	26,0	18,0	22,0
06/12/16	26,0	18,0	22,0
07/12/16	25,0	19,0	22,0
08/12/16	26,0	18,0	22,0
09/12/16	25,0	19,0	22,0
10/12/16	27,0	19,0	23,0
11/12/16	25,0	18,0	21,5
12/12/16	26,0	18,0	22,0
13/12/16	26,0	18,0	22,0
14/12/16	26,0	18,0	22,0
15/12/16	25,0	18,0	21,5
16/12/16	26,0	19,0	22,5
17/12/16	26,0	19,0	22,5
18/12/16	25,0	19,0	22,0
19/12/16	25,0	19,0	22,0

ANEXO 8

Prueba de normalidad, homogeneidad de varianzas y análisis de la altura de *Asparagus officinalis* L. a los 30 días

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		Tratamiento absoluto	Tratamiento químico	<i>B. circulans</i> 70.1	<i>B. pasteurii</i> 72.4
N		3	3	3	3
Parámetros normales ^{a,b}	Media	29,333	33,667	31,333	41,667
	Desviación típica	1,2583	1,8930	,7638	1,7559
Diferencias más extremas	Absoluta	,219	,337	,253	,204
	Positiva	,189	,241	,196	,204
	Negativa	-,219	-,337	-,253	-,185
Z de Kolmogorov-Smirnov		,380	,583	,438	,354
Sig. asintót. (bilateral)		,999	,886	,991	1,000

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		<i>B. circulans</i> 77.5	<i>B. subtilis</i> 45.6	<i>B. pasteurii</i> 94.1	<i>B. sphaericus</i> 81.1
N		3	3	3	3
Parámetros normales ^{a,b}	Media	122,67	31,667	33,833	25,167
	Desviación típica	157,906	,7638	1,6073	,7638
Diferencias más extremas	Absoluta	,384	,253	,328	,253
	Positiva	,384	,253	,234	,253
	Negativa	-,281	-,196	-,328	-,196
Z de Kolmogorov-Smirnov		,665	,438	,567	,438
Sig. asintót. (bilateral)		,769	,991	,904	,991

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error^{a,b}

Variable dependiente: Altura

F	gl1	gl2	Sig.
1,326	7	16	,301

Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.^{a,b}

a. tiempo = 30

b. Diseño: Intersección + especies

ANOVA

Variable dependiente: Altura

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamiento	462,656	7	66,094	40,158	,000
Error	26,333	16	1,646		
Total	25418,250	24			

Prueba de Tukey

Tratamiento	Altura promedio	Grupos
<i>B. pasteurii</i> 72.4	41,667	a
<i>B. pasteurii</i> 94.1	33,833	b
Testigo químico	33,667	b
<i>B. subtilis</i> 45.6	31,667	b c
<i>B. circulans</i> 70.1	31,333	b c
<i>B. circulans</i> 77.5	31,167	b c
Testigo absoluto	29,333	c
<i>B. sphaericus</i> 81.1	25,167	d

ANEXO 9

Prueba de normalidad, homogeneidad de varianzas y análisis de la altura de *Asparagus officinalis* L. a los 45 días

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		Tratamiento absoluto	Tratamiento químico	<i>B. circulans</i> 70.1	<i>B. pasteurii</i> 72.4
N		3	3	3	3
Parámetros normales ^{a,b}	Media	33,667	38,500	40,000	44,33
	Desviación típica	,7638	2,5000	2,7839	1,528
Diferencias más extremas	Absoluta	,253	,175	,238	,253
	Positiva	,253	,175	,238	,253
	Negativa	-,196	-,175	-,193	-,196
Z de Kolmogorov-Smirnov		,438	,303	,412	,438
Sig. asintót. (bilateral)		,991	1,000	,996	,991

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		<i>B. circulans</i> 77.5	<i>B. subtilis</i> 45.6	<i>B. pasteurii</i> 94.1	<i>B. sphaericus</i> 81.1
N		3	3	3	3
Parámetros normales ^{a,b}	Media	35,167	34,167	37,833	34,000
	Desviación típica	,7638	1,2583	2,0207	,5000
Diferencias más extremas	Absoluta	,253	,219	,232	,175
	Positiva	,253	,219	,232	,175
	Negativa	-,196	-,189	-,192	-,175
Z de Kolmogorov-Smirnov		,438	,380	,402	,303
Sig. asintót. (bilateral)		,991	,999	,997	1,000

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

c. La distribución no tiene varianza para esta variable. No es posible realizar la prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra.

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error^{a,b}

Variable dependiente: Altura

F	gl1	gl2	Sig.
1,412	7	16	,267

Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.^{a,b}

a. tiempo = 45

b. Diseño: Intersección + especies

ANOVA

Variable dependiente: Altura

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamiento	290,625	7	41,518	14,184	,000
Error	46,833	16	2,927		
Total	33564,500	24			

Prueba de Tukey

Tratamiento	Altura promedio	Grupos
<i>B. pasteurii</i> 72.4	44,333	a
<i>B. circulans</i> 70.1	40,000	a b
Testigo químico	38,500	b c
<i>B. pasteurii</i> 94.1	37,833	b c
<i>B. circulans</i> 77.5	35,167	b c
<i>B. subtilis</i> 45.6	34,167	c
<i>B. sphaericus</i> 81.1	34,000	c
Testigo absoluto	33,667	c

ANEXO 10

Prueba de normalidad, homogeneidad de varianzas y análisis de la altura de *Asparagus officinalis* L. a los 60 días

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		Tratamiento absoluto	Tratamiento químico	<i>B. circulans</i> 70.1	<i>B. pasteurii</i> 72.4
N		3	3	3	3
Parámetros normales ^{a,b}	Media	45,500	48,500	57,333	47,33
	Desviación típica	1,5000	1,3229	,7638	1,528
Diferencias más extremas	Absoluta	,175	,314	,253	,253
	Positiva	,175	,225	,196	,253
	Negativa	-,175	-,314	-,253	-,196
Z de Kolmogorov-Smirnov		,303	,544	,438	,438
Sig. asintót. (bilateral)		1,000	,929	,991	,991

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		<i>B. circulans</i> 77.5	<i>B. subtilis</i> 45.6	<i>B. pasteurii</i> 94.1	<i>B. sphaericus</i> 81.1
N		3	3	3	3
Parámetros normales ^{a,b}	Media	46,00	45,833	50,67	45,667
	Desviación típica	1,000	,7638	1,528	,7638
Diferencias más extremas	Absoluta	,175	,253	,253	,253
	Positiva	,175	,196	,196	,253
	Negativa	-,175	-,253	-,253	-,196
Z de Kolmogorov-Smirnov		,303	,438	,438	,438
Sig. asintót. (bilateral)		1,000	,991	,991	,991

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

c. La distribución no tiene varianza para esta variable. No es posible realizar la prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra.

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error^{a,b}

Variable dependiente: Altura

F	gl1	gl2	Sig.
,603	7	16	,745

Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.^{a,b}

a. tiempo = 60

b. Diseño: Intersección + especies

ANOVA

Variable dependiente: Altura

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamiento	342,906	7	48,987	34,326	,000
Error	22,833	16	1,427		
Total	56480,750	24			

Prueba de Tukey

Tratamiento	Altura promedio	Grupos
<i>B. circulans</i> 70.1	57,333	a
<i>B. pasteurii</i> 94.1	50,667	b
Testigo químico	48,500	b c
<i>B. pasteurii</i> 72.4	47,333	b c
<i>B. circulans</i> 77.5	46,000	c
<i>B. subtilis</i> 45.6	45,833	c
<i>B. sphaericus</i> 81.1	45,667	c
Testigo absoluto	45,500	c

ANEXO 11

Prueba de normalidad, homogeneidad de varianzas y análisis del número de tallos de *Asparagus officinalis* L. a los 30 días

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		Tratamiento absoluto	Tratamiento químico	<i>B. circulans</i> 70.1	<i>B. pasteurii</i> 72.4
N		3	3	3	3
Parámetros normales ^{a,b}	Media	2,00	2,00	2,67	2,33
	Desviación típica	1,000	,000	,577	,577
Diferencias más extremas	Absoluta	,175		,385	,385
	Positiva	,175		,282	,385
	Negativa	-,175		-,385	-,282
Z de Kolmogorov-Smirnov		,303		,667	,667
Sig. asintót. (bilateral)		1,000		,766	,766

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		<i>B. circulans</i> 77.5	<i>B. subtilis</i> 45.6	<i>B. pasteurii</i> 94.1	<i>B. sphaericus</i> 81.1
N		3	3	3	3
Parámetros normales ^{a,b}	Media	2,67	3,67	3,00	1,33
	Desviación típica	1,155	1,155	1,000	,577
Diferencias más extremas	Absoluta	,385	,385	,175	,385
	Positiva	,385	,385	,175	,385
	Negativa	-,282	-,282	-,175	-,282
Z de Kolmogorov-Smirnov		,667	,667	,303	,667
Sig. asintót. (bilateral)		,766	,766	1,000	,766

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error^{a,b}

Variable dependiente: Número de tallos

F	gl1	gl2	Sig.
1,892	7	16	,138

Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.a,b

a. tiempo = 30

b. Diseño: Intersección + especies

ANOVA

Variable dependiente: Número de tallos

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamiento	10,625	7	1,518	2,143	,098
Error	11,333	16	,708		
Total	167,000	24			

ANEXO 12

Prueba de normalidad, homogeneidad de varianzas y análisis del número de tallos de *Asparagus officinalis* L. a los 45 días

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		Tratamiento absoluto	Tratamiento químico	<i>B. circulans</i> 70.1	<i>B. pasteurii</i> 72.4
N		3	3	3	3
Parámetros normales ^{a,b}	Media	2,00	2,33	3,00	3,00
	Desviación típica	1,000	,577	,000	1,000
Diferencias más extremas	Absoluta	,175	,385		,175
	Positiva	,175	,385		,175
	Negativa	-,175	-,282		-,175
Z de Kolmogorov-Smirnov		,303	,667		,303
Sig. asintót. (bilateral)		1,000	,766		1,000

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		<i>B. circulans</i> 77.5	<i>B. subtilis</i> 45.6	<i>B. pasteurii</i> 94.1	<i>B. sphaericus</i> 81.1
N		3	3	3	3
Parámetros normales ^{a,b}	Media	2,67	3,67	3,00	2,00
	Desviación típica	1,155	1,155	1,000	,000
Diferencias más extremas	Absoluta	,385	,385	,175	
	Positiva	,385	,385	,175	
	Negativa	-,282	-,282	-,175	
Z de Kolmogorov-Smirnov		,667	,667	,303	
Sig. asintót. (bilateral)		,766	,766	1,000	

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

c. La distribución no tiene varianza para esta variable. No es posible realizar la prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra.

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error^{a,b}

Variable dependiente: Número de tallos

F	gl1	gl2	Sig.
2,270	7	16	,083

Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.a,b

a. tiempo = 45

b. Diseño: Intersección + especies

ANOVA

Variable dependiente: Número de tallos

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamiento	6,958	7	,994	1,325	,301
Error	12,000	16	,750		
Total	195,000	24			

ANEXO 13

Prueba de normalidad, homogeneidad de varianzas y análisis del número de tallos de *Asparagus officinalis* L. a los 60 días

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		Tratamiento absoluto	Tratamiento químico	<i>B. circulans</i> 70.1	<i>B. pasteurii</i> 72.4
N		3	3	3	3
Parámetros normales ^{a,b}	Media	2,00	3,00	3,67	3,00
	Desviación típica	1,000	1,000	,577	1,000
Diferencias más extremas	Absoluta	,175	,175	,385	,175
	Positiva	,175	,175	,282	,175
	Negativa	-,175	-,175	-,385	-,175
Z de Kolmogorov-Smirnov		,303	,303	,667	,303
Sig. asintót. (bilateral)		1,000	1,000	,766	1,000

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		<i>B. circulans</i> 77.5	<i>B. subtilis</i> 45.6	<i>B. pasteurii</i> 94.1	<i>B. sphaericus</i> 81.1
N		3	3	3	3
Parámetros normales ^{a,b}	Media	3,00	3,67	3,00	2,00
	Desviación típica	1,000	1,155	1,000	,000
Diferencias más extremas	Absoluta	,175	,385	,175	
	Positiva	,175	,385	,175	
	Negativa	-,175	-,282	-,175	
Z de Kolmogorov-Smirnov		,303	,667	,303	
Sig. asintót. (bilateral)		1,000	,766	1,000	

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

c. La distribución no tiene varianza para esta variable. No es posible realizar la prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra.

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error^{a,b}

Variable dependiente: Número de tallos

F	gl1	gl2	Sig.
,903	7	16	,528

Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.a,b

a. tiempo = 60

b. Diseño: Intersección + especies

ANOVA

Variable dependiente: Número de tallos

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamiento	8,500	7	1,214	1,457	,251
Error	13,333	16	,833		
Total	226,000	24			