

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE AGRONOMIA



**“DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE SOLUBILIZACIÓN
DE POTASIO POR *Bacillus mucilaginosus*”**

Presentado por:

TOMAS DANIEL SAMANIEGO VIVANCO

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE:
INGENIERO AGRÓNOMO

Lima - Perú
2018

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE AGRONOMIA**

**“DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE SOLUBILIZACIÓN DE
POTASIO POR *Bacillus mucilaginosus*”**

Presentado por:

TOMAS DANIEL SAMANIEGO VIVANCO

**TESIS PARA OPTAR EL TITULO DE:
INGENIERO AGRONOMO**

Sustentada y Aprobada ante el siguiente jurado:

Dr. Oscar Loli Figueroa
PRESIDENTE

Dr. Sady Javier García Bendezú
ASESOR

Dr. Constantino Calderón Mendoza
MIEMBRO

Biol. Juan Juscamaita Morales
MIEMBRO

Lima - Perú

2018

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I.	INTRODUCCIÓN 1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA 3
2.1.	Formas de potasio en el suelo..... 3
2.2.	El potasio en la nutrición vegetal 4
2.3.	Solubilización microbiana de fuentes insolubles de potasio 6
2.3.1.	Cuantificación de solubilización de potasio 6
2.3.2.	Mecanismos para la solubilización de potasio..... 6
2.4.	Inhibición del mecanismo de solubilización..... 8
2.5.	Factores que influyen en la actividad bacteriana..... 9
2.5.1.	Efecto de la temperatura y el pH..... 9
2.5.2.	Efecto de la estructura del suelo 10
2.5.3.	Efecto de la disponibilidad de nutrientes 10
2.6.	Microorganismos solubilizadores..... 10
2.6.1.	Microorganismos solubilizadores de potasio (MSK)..... 11
2.7.	Efectos de la aplicación de MSK en diferentes cultivos..... 12
III.	MATERIALES Y MÉTODOS 16
3.1.	Ubicación..... 16
3.2.	Cepa microbiana..... 16
3.3.	Medios de cultivo 16
3.4.	Evaluación de la capacidad solubilizadora de potasio de <i>Bacillus mucilaginosus</i> en laboratorio 17
3.4.1.	Materiales 17
3.4.2.	Diluciones seriadas y conteo en medio solido 18
3.5.	Análisis estadístico 19
3.5.1.	Diseño experimental 19

	3.5.2. Tratamiento estadístico	20
3.6.	Evaluación de la capacidad de disolución de potasio en medio líquido	20
3.7.	Ensayo biológico de disponibilidad de potasio	20
	3.7.1. Ubicación	20
	3.7.2. Materiales	21
	3.7.3. Sustrato experimental	21
	3.7.4. Cepa microbiana	22
	3.7.5. Feldespato potásico.....	22
	3.7.6. Fuente orgánica.....	23
	3.7.7. Descripción de los tratamientos	23
	3.7.8. Metodología y procedimiento	24
	3.7.9. Parámetros en evaluación	25
	3.7.10. Análisis estadístico	26
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	28
4.1.	Resultados de la comparación de medios de cultivo de <i>B. mucilaginosus</i>	28
4.2.	Prueba de solubilización in vitro en medio líquido	30
	4.2.1. Potasio soluble	30
	4.2.2. pH	32
	4.2.3. Acidez titulable.....	34
4.3.	Ensayo biológico de disponibilidad de nutrientes.	37
	4.3.1. Peso seco y número de vainas.....	37
	4.3.2. Extracción de potasio.....	40
	4.3.3. Extracción de nitrógeno y fósforo.....	40
V.	CONCLUSIONES	45
VI.	RECOMENDACIONES	46
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	47
VIII.	ANEXOS	55

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág
Cuadro 1: Composición de los medios nutritivos.....	17
Cuadro 2: Distribución de grados de libertad por fuente de variación.	19
Cuadro 3: Características físicas y químicas del sustrato empleado en las macetas.....	22
Cuadro 4: Composición del feldespato potásico e emplearse en el experimento.	22
Cuadro 5: Análisis fisicoquímico del abono líquido Tecnofer-L®	23
Cuadro 6: Tratamientos a ensayar en la prueba biológica	24
Cuadro 7: Distribución de grados de libertad por fuente de variación.	27
Cuadro 8: Recuento de población de <i>Bacillus mucilaginosus</i> en dos medios de cultivo	28
Cuadro 9: Diferencias en la composición química de ambos medios	29
Cuadro 11: Efecto de la inoculación de una cepa de <i>B. mucilaginosus</i> en combinación con un hidrolizado y de la aplicación de feldespato potásico sobre la materia seca y el número de vainas en plantas de frijol.	38
Cuadro 10: Efecto de la inoculación de una cepa de <i>B. mucilaginosus</i> en combinación con un hidrolizado y de la aplicación de feldespato potásico sobre la extracción de potasio, nitrógeno y fósforo por el follaje y vainas de frijol.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1: Interrelaciones entre las diversas formas de potasio en el suelo y el efecto de los microorganismos y los exudados de la raíz (Zörb et al., 2014).....	4
Figura 2: Efecto del uso de dos medios de cultivo sobre la población de <i>B. mucilaginosus</i>	28
Figura 3: Variación de la concentración de K soluble en medio líquido de Aleksandrov modificado con y sin inoculación de <i>Bacillus mucilaginosus</i>	30
Figura 4: Variación de la concentración de K soluble en medio nutritivo como resultado de la actividad de <i>B. mucilaginosus</i>	31
Figura 5: Variación del pH en el medio de Aleksandrov modificado con y sin inoculación de <i>B. mucilaginosus</i>	32
Figura 6: Relación entre la concentración de K soluble y el pH en medio inoculado.	33
Figura 7: Variación de la acidez titulable en el medio de Aleksandrov modificado con y sin inoculación de <i>B. mucilaginosus</i>	34
Figura 8: Variación de la acidez titulable en medio nutritivo como resultado de la actividad de <i>B. mucilaginosus</i>	35
Figura 9: Relación entre la concentración de K soluble y acidez titulable en medio inoculado.	36
Figura 12: Efecto de los tratamientos propuestos y de la aplicación de potasio sobre la materia seca en plantas de frijol.	39
Figura 13: Efecto de los tratamientos propuestos y de la aplicación de potasio sobre el número de vainas llenas en plantas de frijol.....	39
Figura 10: Efecto de los tratamientos propuestos y de la aplicación de potasio sobre la extracción de potasio por plantas de frijol.....	42
Figura 11: Efecto de los tratamientos propuestos y de la aplicación de potasio sobre la extracción de potasio por vainas de frijol.....	42

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág
ANEXO 1: ANVA de logaritmo de la población bacteriana	55
ANEXO 2: ANVA de extracción de K/maceta en la biomasa aérea en frijol	55
ANEXO 3: ANVA de extracción de N/maceta en la biomasa aérea en frijol	55
ANEXO 4: ANVA de extracción de P/maceta en la biomasa aérea en frijol.....	55
ANEXO 5: ANVA de extracción de K/maceta en la biomasa de vainas en frijol	55
ANEXO 6: ANVA de extracción de N/maceta en la biomasa de vainas en frijol.....	56
ANEXO 7: ANVA de extracción de P/maceta en la biomasa de vainas en frijol	56
ANEXO 8: ANVA de materia seca de la biomasa aérea en frijol.....	56
ANEXO 9: ANVA de materia seca de la biomasa de vainas en frijol	56
ANEXO 10: ANVA de materia seca de la biomasa total en frijol.....	56
ANEXO 11: ANVA de numero de vainas llenas en frijol.....	57
ANEXO 12: ANVA de numero de vainas vanas en frijol.....	57

RESUMEN

Los microorganismos solubilizadores de potasio (MSK) permiten convertir formas insolubles o compuestos minerales de potasio a formas disponibles para las plantas, siendo *Bacillus mucilaginosus* uno de los microorganismos que ha sido reportado como solubilizador de potasio. Para cuantificar la cantidad de potasio solubilizado por ésta bacteria y determinar el mecanismo que le permite hacerlo, se inoculó 1mL de una cepa enriquecida de *B. mucilaginosus* en botellas conteniendo 50 mL de medio líquido modificado con feldespato potásico como fuente de potasio insoluble. El periodo de incubación fue de 10 días, a una temperatura ambiente de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$. La cantidad de potasio soluble en cada frasco fue medida por espectrofotometría de absorción atómica. Además se midió la acidez titulable y el pH de los filtrados. Con el objetivo de determinar el efecto de la inoculación de éste microorganismo sobre la extracción de K y la producción de biomasa se realizó un ensayo biológico en el cultivo de frijol. Los parámetros evaluados fueron: biomasa fresca y seca, extracción de K, peso de vainas y número de vainas llenas. Los resultados encontrados fueron analizados a través del diseño completo al azar con arreglo factorial de dos niveles de K (0 y 500 mg/kg) y cuatro tratamientos en función a la combinación del inoculo y una fuente de materia orgánica (hidrolizado de gallinaza). Los resultados obtenidos en la prueba de solubilización demostraron que la cepa de *B. mucilaginosus* trabajada produce la liberación de 23.85mg/L en el lapso que duro la prueba, de la mano con un descenso del pH y aumento de la acidez titulable. Sin embargo, esta capacidad no se vio reflejada en el ensayo biológico, ya que los tratamientos inoculados con la cepa no presentaron más materia seca ni una mayor extracción de K por parte de las plantas. En cambio el hidrolizado de gallinaza demostró los mayor valores en los parámetros evaluados, sin embargo su aplicación junto a la cepa de *B. mucilaginosus* no tuvo el efecto potenciador de la actividad solubilizadora que se esperaba.

Palabras clave: *B. mucilaginosus*, feldespato potásico, Hidrolizado, y Potasio.

ABSTRACT

Potassium solubilizing microorganisms (KSM) allow converting insoluble forms of potassium in available forms for plants. The bacteria *Bacillus mucilaginosus* is a microorganism that has been reporting as a potassium solubilizer. To quantify the amount of potassium solubilized by this bacterium and determine the mechanism that allows it to do so, 1mL of an enriched strain of *B. mucilaginosus* was inoculated in bottles containing 50 mL of liquid medium modified with potassium feldspar as a source of insoluble potassium. The incubation period was 10 days, at an ambient temperature of 28 ± 2 ° C. The amount of soluble potassium in each bottle was measured by atomic absorption spectrophotometry. In addition, the titratable acidity and the pH of the filtrates were measured. To determine the effect of the inoculation of this microorganism on the uptake of K and the production of biomass, a biological test was performed on the bean crop. The parameters evaluated were: fresh and dry biomass, K extraction, pod weight and number of filled pods. The results were analyzed through the complete randomized design with a factorial disposition of two levels of K (0 and 500 mg / kg) and four treatments based on the combination of the inoculum and a source of organic matter (hydrolyzate chicken manure). The results obtained in the solubilization test demonstrated that the strain of *B. mucilaginosus* releases 23.85mg / L in the ten days of the test, with a decrease in pH and increase in titratable acidity. However, this capacity was not reflected in the biological test, since the treatments inoculated with the strain did not present more dry matter or greater extraction of K by plants. In contrast, the hydrolyzate chicken manure showed the highest values in the parameters evaluated; however, its application together with the strain of *B. mucilaginosus* did not have the enhancing effect of the solubilization activity that was expected.

Key words: *B. mucilaginosus*, potassium feldspar and potassium solubilizer.

I. INTRODUCCIÓN

El potasio (K) es uno de los elementos más importantes en la nutrición de las plantas ya que juega un rol importante en su crecimiento, metabolismo y desarrollo. Las plantas carentes de un adecuado aporte de potasio presentan pobre desarrollo de raíces, crecimiento lento, mala calidad de semillas y bajo rendimiento (White y Karley, 2010), además de una mayor susceptibilidad a enfermedades y plagas. La mayoría de los suelos contienen cantidades considerables de potasio; sin embargo, solo una fracción muy limitada es disponible para la planta, por lo que este nutriente es mayormente suministrado a través de fertilizantes.

Uno de los desafíos de la agricultura en el futuro es hacer un uso más eficiente de los recursos para hacer frente al aumento de la demanda de alimento. Grandes áreas en el mundo reportan baja disponibilidad de potasio debido a una disminución en las reservas en el suelo, resultante de una producción agrícola intensiva y una fertilización desbalanceada (Zörb et al., 2014). Desde el 2011, el mercado mundial de fertilizantes potásicos ha alcanzado a 38.8 millones de toneladas al año, al tiempo que su precio ha ido aumentando cada año, alcanzando 215 USD por tonelada (InvestmentMine, 2016), haciendo que la estrategia de incrementar el uso de fertilizantes potásicos no sea sostenible.

El Perú importa más de 100,000 toneladas de fertilizantes potásicos, de las cuales, el cloruro de potasio representa 52,858 toneladas, seguido por el sulfato de potasio y el sulpomag, con 36,589 y 13,793 toneladas respectivamente (INEI, 2015). El uso excesivo de cloruro de potasio puede producir problemas, ya que presenta un elevado índice de salinidad y aporta cloruros a la solución suelo, lo que a la larga puede afectar la calidad del suelo. Esto hace necesario desarrollar nuevos métodos de fertilización que nos permitan realizar una agricultura sostenible para los cultivos y el medio ambiente.

Una alternativa para incrementar la sostenibilidad de la agricultura sustituyendo parcial o totalmente a los fertilizantes potásicos, con ventajas ambientales y económicas, es la

inoculación de microorganismos solubilizadores de potasio (MSK). Estos microorganismos permiten convertir formas insolubles o compuestos minerales de potasio a formas disponibles para las plantas (Meenaa et al., 2014). Entre esos, se incluyen una lista de géneros de bacterias y hongos cuya capacidad solubilizadora de potasio ha sido ampliamente evaluada en otras latitudes. La mayoría de estos estudios han sido realizados en condiciones de laboratorio, siendo necesario profundizar en el comportamiento de estos microorganismos en el suelo bajo condiciones de campo y de cómo interaccionan junto a los cultivos.

Proponemos la hipótesis de que la inoculación de una cepa aislada de *Bacillus mucilaginosus*, especie que ha mostrado capacidad solubilizadora de potasio bajo condiciones de laboratorio (Sugumaram y Janarthanam, 2007; Basak y Biswas, 2008; Han et al., 2006; Han y Lee, 2005; Abou-el-Seoud y Abdel-Megeed, 2011) incrementa la solubilidad del potasio de una fuente de baja solubilidad (feldespato potásico) así como también incrementa la producción de biomasa (crecimiento) y la extracción de potasio por plantas cultivadas en un suelo con bajo contenido de potasio disponible. Es por ello que se plantea el presente trabajo de investigación a nivel de laboratorio y a través de un bioensayo en macetas con el frijol como cultivo indicador.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo general

- Determinar el potencial de *Bacillus mucilaginosus* para la solubilización de potasio mineral y su disposición para la planta.

1.2. Objetivos específicos

- Evaluar la capacidad solubilizadora de potasio de *Bacillus mucilaginosus* en forma cualitativa, por crecimiento de colonias en dos medios de cultivo agarizados (Pikovskaya y Aleksandrov modificado).
- Determinar la capacidad solubilizadora *in vitro* de *B. mucilaginosus* empleando el medio líquido más adecuado de los dos anteriores.
- Determinar el efecto de la inoculación de *B. mucilaginosus*, la aplicación de feldespato potásico y una fuente orgánica líquida sobre el crecimiento y la extracción de potasio de plantas de frijol bajo condiciones de invernadero.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

El potasio (K) es uno de los macronutrientes esenciales para las plantas junto con el nitrógeno (N) y el fósforo (P). Los suelos minerales contienen 0.04 – 3 % de K. La cantidad de potasio en la capa arable de los suelos agrícolas (0.2 m) varía de 10 – 20 g/kg estando en su mayoría (90 a 98 %) formando parte de la estructura de los minerales del suelo, lo que hace que sea difícilmente disponible para las plantas (Meena et al., 2014).

2.1. Formas de potasio en el suelo

El K en el suelo se puede agrupar en cuatro fracciones dependiendo de su disponibilidad para las plantas: en solución suelo, intercambiable, no intercambiable y estructural.

El K en la solución suelo está directamente disponible para las plantas en forma de K^+ y representa aproximadamente solo el 0.1 – 0.2 % de K del suelo (5 % de la demanda total de la planta) y es el más propenso a lixiviarse (Mclean y Watson, 1985).

El K intercambiable se encuentra unido electrostáticamente a la superficie a las arcillas y a la materia orgánica del suelo, representa entre el 1 – 2 % del total de K y junto con el K en solución representan las principales reservas de donde las plantas pueden obtener K en forma rápida. El K no intercambiable es el que se encuentra fuertemente fijado en la zona hexagonal de las arcillas micáceas, representando alrededor del 1 – 10 % del total de K y puede considerarse una fuente de K a largo plazo.

La forma restante y la que representa la mayor cantidad de potasio en el suelo (90 – 98 %) es el K estructural que es el K que compone los minerales primarios como la muscovita, ortoclasa, la biotita y los feldespatos (Zörb et al., 2014). Algunos de estos minerales pueden liberar directamente K a la solución suelo como los feldespatos potásicos o pueden sufrir desgaste en su estructura y degenerar en secundarios que representan fuentes potenciales de K para las plantas (Singh y Goulding, 1997).

Las fracciones predominantes de potasio en el suelo se presentan en la Figura 1.

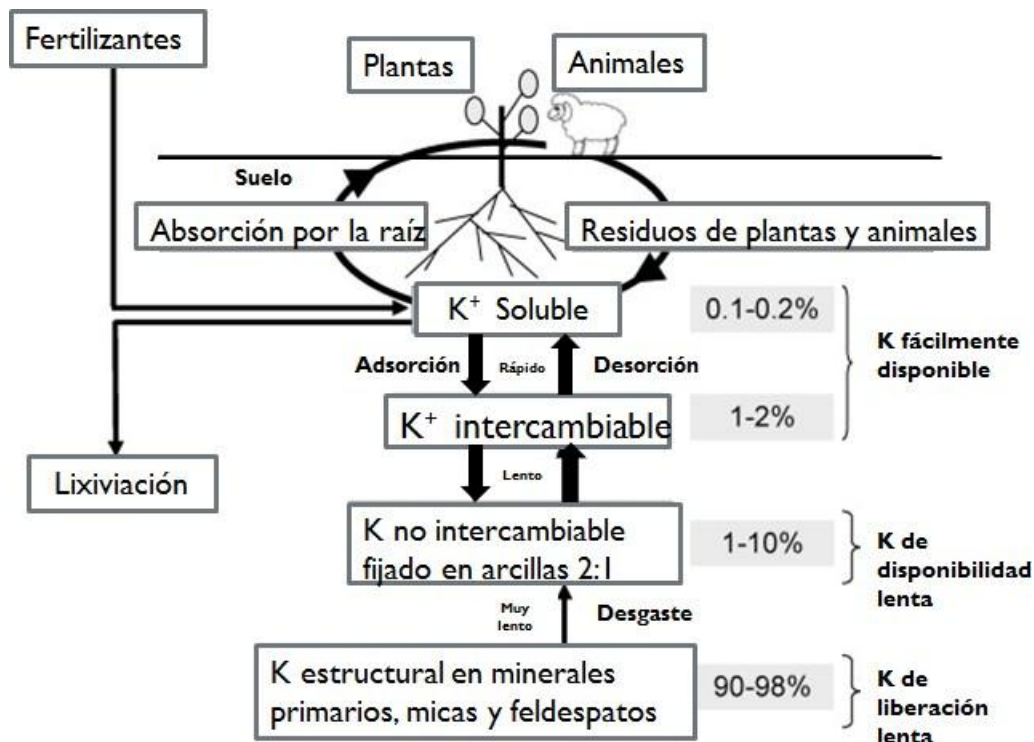


Figura 1: Interrelaciones entre las diversas formas de potasio en el suelo (Serrano et al., 2014)

El contenido de potasio en el suelo puede expresarse como K elemental o como óxido de potasio (K_2O). La solución suelo puede contener entre 5 y 15 ppm de K_2O lo que representa de 5 a 15 mg/L de K_2O . Cabe recalcar que aunque se exprese el contenido de potasio en K_2O , en la solución del suelo se encuentra únicamente en forma iónica (Urbano, 2003).

El potasio presente en la solución del suelo es rápidamente consumido por las plantas y los microorganismos y perdido por lixiviación, es por esto que la fertilidad potásica depende de la facultad del suelo para fijar y liberar el elemento y de los niveles de potasio en la solución del suelo. De tal manera que una adecuada nutrición vegetal de este mineral se basa en la existencia suficiente de K intercambiable y el mantenimiento de estos niveles (Brady y Weil, 1999).

2.2. El potasio en la nutrición vegetal

El potasio absorbido por la planta es el que se halla en forma iónica (K^+) en las soluciones de suelo o fijado sobre el complejo adsorbente. Su absorción por las raíces se produce mediante mecanismos de difusión, facilitado por su baja carga y pequeño radio iónico. La planta puede absorber cantidades importantes de potasio, más del 1 % de su peso seco

(Urbano, 2003). El potasio es el catión que prevalece en las plantas y hay pruebas que sugieren su implicación en el mantenimiento del balance iónico de las células (Bidwell, 1993).

La planta puede absorber cantidades superiores a las requeridas, sin que esto represente una mejora significativa del rendimiento en relación al obtenido con cantidades menores de potasio, mecanismo que es denominado “consumo de lujo”. Por otro lado, en situaciones de deficiencia de K^+ la planta puede sustituirlo absorbiendo Na^+ , interviniendo en aspectos fisicoquímicos como turgencia, hidratación, presión osmótica y no en aspectos biológicos (Urbano, 2003).

El potasio cumple funciones importantes en el desarrollo vegetativo, es así que coadyuva en la producción proteica, el tallo y los pastos crecen con mayor dureza, por lo que se reduce la necesidad de tutores; proporciona granos y semillas de mejor tamaño y contenido; participa en condición de esencial en la formación y desplazamiento de almidones y azúcares; interviene en el desarrollo de raíces y tubérculos; y está involucrado en la formación de antocianina, pigmento de color rojo azulado de las hojas y frutos (Zörb et al., 2014).

La función de algunas enzimas implicadas en la síntesis proteica es ineficiente en ausencia de potasio. Este elemento se enlaza de manera iónica a la piruvato quinasa, primordial en la respiración y el metabolismo de los carbohidratos (Bidwell, 1993). El potasio está relacionado con el funcionamiento de más de 60 enzimas involucradas con el crecimiento de las plantas, con la producción y con el transporte de metabolitos fotosintéticos hacia semillas, tubérculos, raíces y frutos. También está involucrado con la economía del agua y con el suministro de resistencia a distintas plagas, enfermedades, congelación y sequía (Sánchez et al., 2006)

Las carencias de potasio se pueden manifestar como una clorosis típicamente moteada en las hojas maduras que posteriormente, dada la movilidad de este elemento en las plantas, se distribuye a las hojas jóvenes. Otra característica es la presencia de áreas necróticas en los bordes y puntas de las hojas, enroscándose de una manera característica pudiendo producirse ennegrecimiento general u hojas quemadas. También puede apreciarse por la evolución en roseta o achaparramiento. Como consecuencia se registra la reducción del crecimiento caulinar, el debilitamiento del tallo y la baja resistencia a patógenos. Este

debilitamiento es muy evidente en los cereales que son fácilmente acamadas (se tienden ante la intemperie) y afectadas por enfermedades (Bidwell, 1993).

2.3. Solubilización microbiana de fuentes insolubles de potasio

2.3.1. Cuantificación de solubilización de potasio

Los estudios sobre la dinámica de la solubilización realizada por los microorganismos, se realizan en primera instancia en base al K liberado en el medio del cultivo teniendo como única fuente de K una fuente mineral, un compuesto insoluble. La tasa de solubilización de potasio a menudo se estima restando la concentración final de K de un medio inoculado menos la concentración de K de un medio no inoculado. Esta estimación tiene la limitación de no tener en cuenta la K utilizado por las células durante el crecimiento de las bacterias.

La eficiencia de solubilización de potasio por diferentes microorganismos varía según la naturaleza de los minerales potásicos utilizados, específicamente de su estructura y composición química. Según Sheng et al. (2002), la liberación del potasio de los minerales sigue el siguiente orden:

Illita > Feldespato > Muscovita.

2.3.2. Mecanismos para la solubilización de potasio

La literatura reporta que diversos microorganismos (procariotas y eucariotas) presentan capacidad para la solubilización de formas minerales poco solubles de potasio. Entre los mecanismos más frecuentemente reportados para explicar esta solubilización, pueden mencionarse los siguientes:

2.4.2.1. Oxidoreducción

En contraste con los eucariotas que utilizan oxígeno para la respiración, algunos taxones bacterianos destacan en el uso de aceptores de electrones alternativos para sus necesidades energéticas y metabólicas.

La mayoría de estos aceptores de electrones son solubles, incluyendo nitrato y sulfato. Por el contrario, otros aceptores, tales como el hierro contenido en minerales tales como goethita o hematita, son insolubles y es por esto que existe la necesidad de un contacto directo con la superficie mineral (Newman, 2001). En la goethita y hematita, el mecanismo por el cual los electrones son transferidos todavía no es claro. Se sugirió que esta transferencia puede ocurrir por excreciones y moléculas asociadas a la membrana

como quinonas, cisteínas o heteropolímeros de melanina extracelular (Croal et al., 2004; Hernández et al., 2004). En teoría, la reducción u oxidación de un compuesto atrapado en una estructura compleja debería dar como resultado la inestabilidad del cristal mineral y, por lo tanto, su disolución. Sin embargo, hasta la fecha, no hay evidencia clara que este proceso induce por sí solo el desgaste hecho por las bacterias en minerales complejos, tales como silicatos.

2.4.2.2. Producción de ácidos orgánicos

En pruebas de laboratorio para determinar el impacto de las bacterias y de metabolitos microbianos en la solubilización mineral, se encontró que el impacto en la disolución mineral de los ácidos orgánicos depende del tipo de ligando, de la concentración del ligando, del pH y de la composición del mineral (Ullman et al., 1996). Sheng y He (2006) reportaron que la solubilización de illita y feldespato por microorganismos está relacionada directamente con la producción de ácidos orgánicos como el ácido oxálico y tartárico, ácido glucónico, ácido 2-cetoglucónico, ácido cítrico, ácido málico y ácido succínico. El ácido tartárico parece ser el agente más frecuente en la solubilización de potasio (Zarjani et al., 2013; Prajapati et al., 2012; Prajapati et al., 2013). Otros ácidos orgánicos, tales como ácido acético, láctico, propiónico, glicólico, malónico, fumárico, etc, también se han reportado como solubilizantes de potasio (Wu et al., 2005).

Experimentos indican que la bacteria puede producir ácidos orgánicos al menos por tres diferentes mecanismos:

- La fermentación: varios tipos de bacterias fermentativas producen ácidos orgánicos como último subproducto metabólico. Los ejemplos clásicos de subproductos de la fermentación incluyen ácido acético, ácido láctico, y ácido butírico (Gottschalk, 1986). La fermentación es generalmente limitada en los acuíferos y sedimentos en las zonas donde los receptores de electrones alternativos (O_2 , Mn^{+4} , Fe^{+3} , NO_3^- , SO_4^{2-}) no son disponibles. Tales zonas no son infrecuentes en el subsuelo donde el flujo de receptores de electrones se inhibe debido a limitaciones hidrológicas (McMahon y Chapelle, 1991; McMahon et al., 1992; Murphy et al., 1992).
- El catabolismo: la degradación de macromoléculas tales como proteínas y polisacáridos complejos (por ejemplo, celulosa y lignina-celulosa) en ambientes oxigenados también puede inducir la producción de ácidos orgánicos. Se cree que los

aminoácidos y un gran número de subproductos orgánicos aromáticos que se encuentran en las aguas naturales se producen por este mecanismo (Thurman, 1985).

- Excreción de ácidos orgánicos: los experimentos con bacterias aeróbicas también indican que los ácidos orgánicos pueden ser excretados cuando el crecimiento está limitado por la ausencia de un elemento nutriente esencial (Tempest y Neijssel, 1992).

Estos ácidos orgánicos producidos pueden ser detectados por cromatografía líquida de alta resolución y métodos enzimáticos (Archana et al., 2012, 2013; Zhang et al., 2013). Sin embargo, la acidificación no parece ser el único mecanismo de solubilización, ya que la reducción del pH en algunos casos no se correlacionó con la capacidad de solubilizar potasio (Zarjani et al., 2013; Rosa-Magri et al., 2012).

2.4.2.3. Producción de sideróforos

En una investigación sobre solubilización de la roca fosfórica proveniente de tres minas de Marruecos por parte de actinomicetos. Hamdali et al. (2007), no encontraron liberación de ácidos orgánicos ni descenso de pH. Esto demuestra un mecanismo de solubilización diferente; en este caso se revela la excreción de sustancias quelantes (tales como sideróforos) que forman complejos estables con los adsorbentes más comunes del fósforo: aluminio, hierro y calcio (Watteau y Berthelin, 1994; Welch et al., 2002). Este mecanismo ha sido observado en otros microorganismos como *Aspergillus niger*, *Enterobacter* sp., y *Erwinia* sp. (Abd-Alla y Omar, 2001; Zhao et al., 2002).

2.4. Inhibición del mecanismo de solubilización

Las paredes celulares y polímeros extracelulares producidos por las bacterias pueden afectar a la solubilidad mineral (Ullman et al., 1995). Estos compuestos u otros subproductos metabólicos pueden, bajo ciertas condiciones, inhibir la disolución de minerales. Muchos compuestos orgánicos son capaces de adherirse de forma irreversible sobre las superficies minerales y reaccionar con la superficie del mineral para producir fases secundarias estables del mineral (precipitar), es decir esta adsorción y precipitación pueden tener el efecto de limitar el intercambio entre la superficie del mineral y el fluido circundante, reduciendo así la tasa de solubilización.

Patel et al. (2011), realizaron un ensayo con dos strains de *Pseudomonas aeruginosa* para determinar el grado de represión de la capacidad de solubilización de roca fosfatada (RP) en presencia de ácidos orgánicos (malato y succinato). Ambos aislamientos probaron

tener una gran capacidad de solubilización si se tiene a la glucosa como fuente de carbono ya que se relaciona con la producción de ácido glucónico, en cambio cuando se reemplaza la glucosa por malato, succinato o una mezcla de ambos la capacidad de solubilización se reduce en gran medida. Los resultados indican que la habilidad de solubilizar fosfatos se pierde por la inhibición de la enzima GDH encargada de la producción de ácido glucónico por parte de los ácidos orgánicos.

2.5. Factores que influyen en la actividad bacteriana

Un factor limitante es cualquier factor que en bajas o altas concentraciones puede limitar o prevenir el crecimiento de una población, aun cuando otros factores que influyan en su crecimiento estén cerca o en el rango óptimo para su estímulo. Las especies pequeñas como las bacterias tienen un alto potencial biótico, una cepa bacteriana puede reproducirse cada 20 minutos, con lo que en teoría podría cubrirse la superficie de la tierra con una capa de 0.3 metros en solo 36 horas, este desde luego no es un escenario real ya que las poblaciones de bacterias rápidamente ven limitado su crecimiento poblacional debido a limitaciones de recursos y competencia con otras especies. Los efectos de algunos de estos factores sobre la actividad microbiana se presentan a continuación:

2.5.1. Efecto de la temperatura y el pH

La temperatura del suelo influye en gran medida las tasas de procesos biológicos, químicos y físicos en el suelo. Esto se describe tradicionalmente por la relación Q_{10} , es decir, el factor por el cual la actividad microbiana aumenta cuando la temperatura aumenta en 10 °C. Dentro de un rango limitado de temperaturas, las tasas de procesos biológicos y químicos usualmente aumentan de dos a tres veces por cada 10 °C de aumento de temperatura.

Muy pocos suelos mantienen una temperatura uniforme en sus capas superiores. Las variaciones pueden ser estacionales o diurnas. Debido al alto calor específico del agua, las capas húmedas están menos sujetas a grandes fluctuaciones diurnas de temperatura que los suelos secos (Pettersson, 2004).

Uno de los factores más influyentes que afectan a la comunidad microbiana en el suelo es el pH. Este influye fuertemente en la solubilidad y la ionización de los constituyentes de la solución suelo, la disponibilidad de carbono, la disponibilidad de nutrientes y la solubilidad de metales pesados. También existe fuerte evidencia que el pH es

determinante en la estructura y diversidad de la comunidad microbiana (Fierer y Jackson, 2006).

2.5.2. Efecto de la estructura del suelo

El tipo y cantidad de arcilla presente en el suelo pueden afectar tanto la actividad como la supervivencia de una bacteria. Una textura fina se traduce en mayor cantidad espacio debido a la gran cantidad de microporos que esta contiene, además de ayudar en la formación de agregados en el suelo haciéndolos más estables.

Un suelo con alto contenido de arcilla posiblemente tenga una mayor cantidad de microhábitats que serán aprovechados por las bacterias. Estos microhábitats pueden proteger a las bacterias de los protozoos predadores ya que son su fuente principal de alimento.

2.5.3. Efecto de la disponibilidad de nutrientes

El déficit de carbono se ha determinado como el factor limitante más común en el suelo, aunque se ha reportado otros nutrientes limitantes como el nitrógeno y el fosforo. Demoling et al. (2007), estudiaron que nutrientes limitan la tasa de crecimiento bacteriano en 28 suelos suecos, para lo cual utilizaron la técnica de incorporación de timidina o leucina después de incorporar distintas concentraciones de carbono orgánico (glucosa), nitrógeno y fosforo. Los resultados indicaron que a bajas concentraciones de glucosa en el suelo el único factor limitante es el carbono, mientras que a mayor concentración de glucosa el carbono permanece siempre como el principal limitante teniendo al nitrógeno o fosforo como un factor limitante secundario.

2.6. Microorganismos solubilizadores

La zona estrecha de suelo que rodea directamente el sistema de raíces se denomina rizósfera, mientras que el término 'rizobacterias' se aplica a un grupo de bacterias que colonizan el medio ambiente cercano a la raíz proporcionando soporte mecánico, facilitando el acceso al agua y ayudando en la absorción de nutrientes (Walker et al., 2003).

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), se caracterizan por los siguientes caracteres intrínsecos: (i) Deben colonizar la superficie de las raíces y el espacio adyacente a estas; (ii) Tener la capacidad de sobrevivir, multiplicarse y competir con otros microorganismos en el suelo, al menos durante el tiempo necesario para

expresar su efecto en la promoción/protección en las plantas; y (iii) Deben promover el crecimiento de las plantas (Kloepper, 1994).

Somers et al. (2004), clasifican a las PGPRs según sus actividades funcionales como: (i) Biofertilizantes (aumentando la disponibilidad de nutrientes a la planta); (ii) Fitoestimuladores (promoción de crecimiento de la planta, generalmente a través de fitohormonas); (iii) Rizoremediadores (degradar contaminantes orgánicos) y (iv) Biopesticidas para el control de las enfermedades, principalmente por la producción de antibióticos y metabolitos antifúngicos (Antoun y Prévost, 2005).

Las asociaciones de las PGPRs con las plantas varían en el grado de proximidad de la bacteria con la raíz de las plantas y de acuerdo a la intimidad de la asociación (Gray y Smith, 2005). Según esto las PGPRs se pueden clasificar en:

- Extracelulares (ePGPR): existentes en la rizósfera, en el rizoplano, o en los espacios entre las células de la raíz. Algunos ejemplos de ePGPR son, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcous*, *Pseudomonas* y *Serratia*, etc. (Bhattacharyya y Jha, 2012).
- Intracelulares (iPGPR): existentes en células de la raíz, generalmente en estructuras nodulares especializadas (Figueiredo et al., 2011). Del mismo modo, algunos ejemplos de la iPGPR son *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Rhizobium* perteneciendo estos a varias familias.

2.6.1. Microorganismos solubilizadores de potasio (MSK)

Muchos microorganismos como hongos, bacterias, micorrizas, y actinomicetos han sido reportados colonizando incluso la superficie de las rocas de las montañas (Groudev, 1987; Gundala et al., 2013). Según Aleksandrov et al. (1967), diversos aislamientos bacterianos encontrados en tierras agrícolas no solo demostraron la capacidad de liberar K sino que también ayuda en la descomposición de la materia orgánica y residuos de cosechas. Lo que sugiere que juegan un papel importante en el ciclo de nutrientes en el sistema suelo-planta.

2.6.1.1. Bacterias

Se han reportado diversos grupos de bacterias que tienen algún efecto en la conversión de formas insolubles de K a formas más disponibles para la planta. La primera evidencia

de solubilización de minerales de potasio por parte de microorganismos fue demostrado por Muentz en mil ochocientos noventa. Actualmente una amplia gama de microorganismos rizosféricos han sido reportados como solubilizantes de potasio los cuales incluyen: *B. mucilaginosus* y *Arthrobacter* spp. (Zarjani et al., 2013), *B. edaphicus* (Sheng 2005), *B. circulans* (Lian et al., 2002), *Burkholderia*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *B. mucilaginosus* (Zhang y Kong 2014), *Bacillus edaphicus* (Sheng y He 2006), *Enterobacter homaechi* (Prajapati et al., 2013.), *Paenibacillus mucilaginosus* (Liu et al., 2012; Hu et al., 2006), *P. frequentans*, *Cladosporium* (Argelis et al., 1993), *Aminobacter*, *Sphingomonas*, *Burkholderia* (Uroz et al., 2007), y *Paenibacillus glucanolyticus* (Sangeeth et al., 2012). Algunas de estas bacterias tienen amplias aplicaciones en la minería, la metalurgia, fertilizantes microbiana, y comida (Meena et al., 2014; Zhang y Kong 2014).

2.6.1.2. Hongos

También se ha reportado que las micorrizas arbusculares pueden aumentar la solubilidad de potasio mediante la liberación de protones (H^+) y ácidos orgánicos como el citrato, oxalato y malato. Prajapati et al. (2012) reportaron aislamientos de *Aspergillus terreus* y *Aspergillus niger*, obtenidos en suelos ricos en K con una gran capacidad de solubilizar fuentes insolubles de potasio. Siendo *A. terreus* el que demostró una mayor capacidad de solubilización, así como una mayor capacidad de producción de ácidos orgánicos.

Por otra parte, tanto como *Rhizobium* y *Pseudomonas*, simbiontes que fijan el nitrógeno atmosférico han mostrado tener algunas la capacidad e solubilizar fuentes insolubles de potasio y fosforo.

2.7. Efectos de la aplicación de MSK en diferentes cultivos.

Existen un gran número de ensayos que prueban la capacidad solubilizadora de diversas bacterias y su contribución en el crecimiento vegetal, entre los cuales se encuentran los siguientes:

Basak y Biswas (2009) realizaron un ensayo para determinar la influencia de *Bacillus mucilaginosus* en la solubilización de una mica potásica en alfisoles y teniendo como indicador a un pasto Sudán (*Sorghum vulgare* Pers), encontrando una mayor cantidad de biomasa en las plantas, mayor liberación de K por parte de la mica y una mayor captación de K por la planta en los tratamientos en los cuales se aplicó la cepa de *B. mucilaginosus* junto con la mica.

Sugumaram y Janarthanam (2007) probaron la capacidad de solubilización de microclina, ortoclasa y muscovita por parte de cinco aislamientos bacterianos con capacidad para solubilizar K de formas no disponibles, usando al maní como cultivo indicador. Determinando que la cepa MCRCp1 correspondiente a *B. mucilaginosus* presenta los mejores resultados en combinación con la muscovita al aumentar la cantidad de K y P disponible en el suelo y aumentar la cantidad de materia seca en 125 % y el contenido de aceite en 35.4 %.

Singh et al. (2010), evaluaron el efecto de *B. mucilaginosus*, *Azotobacter chroococcum* y *Rhizobium* spp., en la solubilización de K a partir de residuos de micas y su absorción por el maíz y el trigo. La absorción de K fue significativamente más alta en los tratamientos inoculados, esto se tradujo en una mayor acumulación de biomasa, mayor contenido de clorofila y un mayor contenido de proteínas en el tejido vegetal. Entre las rizobacterias, *B. mucilaginosus* demostró un mejor comportamiento que *A. chroococcum* y *Rhizobium* spp.

Bacillus edaphicus es otra especie bacteriana con capacidad para solubilizar potasio en combinación con fuentes insolubles de potasio. Esta bacteria fue probada en algodón (*Gossypium hirsutum* L.) y canola (*Brassica napus* L.) en un estudio realizado en macetas, demostrando que la inoculación de *B. edaphicus* a una concentración de 3.15×10^3 UFC/g aumenta la concentración de K en un 30 % en algodón y 26 % en canola, además se pudo observar un mayor crecimiento de brotes y raíces, al igual que un mayor contenido de N y P en las plantas (Sheng, 2005). En otro trabajo realizado en trigo, Sheng y He (2005) probaron una cepa de *Bacillus edaphicus*, además de cuatro mutantes de la misma, para determinar su capacidad de solubilización utilizando como fuente de potasio dos minerales (feldespato y illita). Los resultados reflejaron que la illita se comporta como una mejor fuente de K para las cinco cepas, del mismo modo se pudo determinar que el ácido oxálico es el principal agente involucrado en la solubilización de K. En el trigo se reporta un aumento en el crecimiento de raíces y brotes, además de aumentar la cantidad de N, P y K en las plantas.

Zhang y Kong (2014), aislaron 27 cepas con capacidad de solubilizar potasio y las identificaron mediante el método de comparación de ADN ribosomal 16S, las especies que se pudieron determinar fueron *Klebsiella variicola*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter aerogenes*, *Pantoea agglomerans*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Microbacterium foliorum*, *Myroides odoratimimus*, y *Burkholderia cepacia*.

Se probaron las cuatro mejores cepas (tres aislamientos de *Klebsiella variicola* y un aislamiento de *Enterobacter cloacae*) en un experimento en macetas utilizando plantines de tabaco como planta indicadora, además de usar feldespatos como fuente única de potasio. Los resultados obtenidos reflejan que los tratamientos inoculados con las cuatro cepas tuvieron una mejor captación de N, K y P, y un aumento en la materia seca de las plantas, la combinación de los inóculos con el feldespatos aumenta en mayor medida la absorción de N y K por parte del tabaco.

La coinoculación de bacterias solubilizadoras de potasio (*Bacillus mucilaginosus* y *B. subtilis*) y de fósforo (*B. megaterium* var. *phosphaticum*), junto con fuentes pocos solubles de fósforo y potasio, fueron analizadas en un cultivo de maíz (*Zea mays*) para determinar si existe una mejora en la disponibilidad de P y K, un mayor crecimiento en las plantas bajo condiciones limitantes de dichos nutrientes. Los resultados reportaron que la co-inoculación aumenta el crecimiento de la parte aérea y radicular del maíz en suelos donde el P y el K son un factor limitante (Abou-el-Seoud y Abdel-Megeed, 2011).

Los mismos tratamientos fueron probados en pimiento (*Capsicum annuum* L.) y pepino (*Cucumis sativus* L.) por Han et al., (2006). Los resultados reflejan que rocas fosfóricas y potásicas por sí solas no mejoran la disponibilidad de dichos elementos lo que las hace inadecuadas para su aplicación directa. *B. megaterium* var. *phosphaticum* demostró tener una mayor capacidad de solubilizar P que *B. mucilaginosus* disolviendo K, sin embargo la aplicación de ambas bacterias permite una disponibilidad de P y K significativamente mayor que los testigos sin inóculo. El contenido de N, P y K en los brotes y en las raíces, al igual que el crecimiento fueron mayores cuando se inocularon las bacterias, aunque el efecto fue más pronunciado con la inoculación de *B. megaterium* var. *phosphaticum*. Los mismos resultados fueron obtenidos en berenjena (*Solanum melongena*) por Han y Lee (2005). Estas investigaciones nos sugieren un posible uso de estas bacterias como biofertilizantes.

Badar et al. (2006) probaron la inoculación de microorganismos solubilizadores de K en tres tipos de suelos diferentes (arcilloso, arenoso, calcáreo), como planta indicadora el sorgo (*Sorghum* spp.). Los resultados reflejan un aumento en la materia seca de 48 %, 65 % y 58 %, el fósforo en planta aumento un 71 %, 110 % y 116 %, y el potasio aumento un 41 %, 93 % y 79 % en cada suelo respectivamente. Mikhailouskaya y Tcherhysh (2005) reportan un aumento en la producción de trigo de hasta 1.04 t/ha, además de un aumento en la producción de materia seca. Este estudio fue realizado en suelos

erosionados y los resultados son comparables con resultados vistos en suelos manejados modernamente y con un grado de erosión moderado.

Prajapati et al. (2013) trabajaron con la bacteria *Enterobacter hormaechei* y el hongo *Aspergillus terreus* ambos con capacidad solubilizadora de potasio, junto con la aplicación de feldespato potásico en el cultivo de oca (*Abelmoschus esculentus*). Encontrando un mayor crecimiento de brotes y raíces en los tratamientos inoculados con *E. hormaechei*, el potasio contenido en la planta aumentó en los tratamientos inoculados con alguno de estos microorganismos. Además se demostró un mejor efecto al inocular las semillas y el suelo en los tratamientos.

Clark et al. (1999) reportan que la presencia de micorrizas arbusculares en pasto varilla (*Panicum virgatum*) aumentó la captación de potasio en comparación al de magnesio y calcio. Hongos ectomicorríticos particularmente aislados como UFSC-PT22 y UFSC-Pt186 han aumentado la eficiencia de minerales alcalinos como fuente de P y K en el crecimiento de plantines de *Eucalyptus dunnii*, además también se reporta que después de 90 días, la altura de la planta, longitud de raíz, el peso seco, el contenido de potasio y fósforo, y la colonización de micorrizas se incrementaron en comparación con el control (Alves et al., 2010).

La inoculación de dos especies de HMA: *Glomus intraradices* y *G. mosseae* al suelo mostró incrementar la absorción de potasio en maíz (Wu et al., 2005). Sin embargo, la información de absorción de macronutrientes por parte de micorrizas ha sido relativamente inconsistente ya que en algunos casos aumenta, disminuye o no se reportan ningún efecto (Clark y Zeto 1996). En el caso del potasio se ha visto que depende de las condiciones del suelo, la naturaleza de la planta, la tasa de crecimiento y otras condiciones (Clark y Zeto 2010).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación

En el presente trabajo, la fase de evaluación de la capacidad solubilizadora de potasio de *Bacillus mucilaginosus* se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Suelo de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). La prueba biológica se realizó en el Laboratorio e Invernadero de Fertilidad del Suelo, el cual se encuentra a 12°4'58" Latitud Sur, 76°57' Longitud Oeste y una altitud de 244 m.s.n.m.

3.2. Cepa microbiana

Una cepa de *Bacillus mucilaginosus* fue empleada como microorganismo experimental. Esta cepa fue proporcionada por la empresa FEEDCOR S.A. La presentación del producto es un sustrato granulado inerte, que de acuerdo a especificaciones, contiene 1×10^{10} unidades formadoras de colonia (UFC)/g.

3.3. Medios de cultivo

En la prueba de solubilización se emplearon los medios de cultivo de Pikovskaya (PKV) y de Aleksandrov modificado (ADVm). Ambos medios fueron usados en medio líquido (Cuadro 1) y en sólido mediante la adición de 20 g/L de agar. Los medios sólidos fueron empleados para el recuento de la población de *Bacillus mucilaginosus*. Posteriormente se utilizó el medio más adecuado para evaluar la capacidad solubilizadora *in vitro* de la misma bacteria caracterizada como solubilizadora de potasio.

Para la preparación del medio primero se agregaron las diferentes sales que lo conforman y posteriormente se adicionó el feldespato potásico antes de esterilizarlo.

Cuadro 1: Composición de los medios nutritivos

Componente	Composición (g/L)	
	Pikovskaya (PKV)	Aleksandrov mod (ADVm)
Glucosa	10.0	5.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.1	0.5
Extracto de levadura	0.5	0.5
NaCl	0.2	---
CaCO ₃	---	0.1
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.002	---
FeCl ₃	---	0.005
MnSO ₄ .H ₂ O	0.002	---
NaH ₂ PO ₄	2.0	2.0
Feldespato potásico	3.0	3.0
pH	7.0	

Fuentes: Pradhan y Sukla (2005); Parmar y Sindhu (2013)

3.4. Evaluación de la capacidad solubilizadora de potasio de *Bacillus mucilaginosus* en laboratorio

3.4.1. Materiales

- Micropipeta
- Tubos de 50 mL para centrifugación
- Erlenmeyer de 250 mL
- Papel filtro
- Embudos
- Feldespato potásico
- Balanza de precisión
- Autoclave
- Incubadora
- Centrifuga de 5000 rpm
- Espectrofotómetro (marca Thermo Scientific® HeλIO5)

· Cámara de flujo laminar

3.4.2. Diluciones seriadas y conteo en medio solido

La determinación de la población de *B. mucilaginosus* en el inóculo sólido se realizó mediante la técnica de dilución sucesiva en placas. Para evitar la contaminación con hongos, los medios de Aleksandrov mod (ADVm) y Pikovskaya (PKV) fueron suplementados con 45 mg/L de fluconazol. Se tomaron tres muestras del inóculo donde se encuentra la cepa de *B. mucilaginosus*, para luego realizar las diluciones seriadas de cada muestra en agua estéril, posteriormente se cultivaron en medio sólido las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} ; a partir de las cuales se realizó el conteo de colonias de *B. mucilaginosus* que solubilizaron potasio, y en base a éste se determinó la población. Cada dilución fue repetida en tres placas de Petri.

La técnica de diluciones seriadas que se utilizó se describe a continuación:

1. Se preparó una dilución inicial de inóculo-agua de aproximadamente 1/10 (10^{-1}) añadiendo 10 g de inóculo a un frasco que contenía 90 ml de agua destilada estéril. Se determinó previamente el estado de humedad del inóculo. El agua destilada contenía 9 g/L de NaCl.
2. La solución fue agitada por 10 minutos sin dejar que las partículas de suelo sedimenten.
3. Con una pipeta estéril se transfirió 1 mL de la suspensión a un tubo de ensayo que contenía 9 ml de agua destilada estéril y se agitó durante 1 minuto. Esta segunda dilución fue 10^{-2} .
4. Se repitió este mismo procedimiento para las siguientes diluciones sucesivas: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} .
5. Para realizar la siembra, se añadió 1 mL de la dilución respectiva a cada placa correspondiente y asépticamente se colocaron aproximadamente 15 mL de cada medio de cultivo (ADV y PKV) de tal manera que se distribuyera de forma uniforme y forme una película de aproximadamente 2 a 3 mm. La temperatura ideal para el plaqueo es cuando el medio se encuentra entre 42 – 45 °C, lo cual coincide cuando el medio se encuentra líquido pero es manipulable sin causar quemaduras.
6. Luego que el medio solidificó, se invirtieron las placas para evitar que la humedad condensada de las tapas cayera sobre el medio y disperse las colonias.

7. Se colocaron las placas en la cámara de incubación a una temperatura de 28 °C (French y Hebert 1980).

El potasio mineral fue adicionado a ambos medios a razón de 3 g/L, empleando como fuente al feldespato potásico (10.1 % de K₂O), con lo cual se realizó una evaluación de la capacidad de solubilizar potasio de la cepa de *B. mucilaginosus*. Después de aproximadamente cinco días de incubación a 27 °C, se contabilizaron las colonias que desarrollaron halos o zonas claras alrededor (Kumar y Narula, 1999).

3.5. Análisis estadístico

3.5.1. Diseño experimental

Para la comparación de medios, se empleó un diseño de bloques completamente al azar (DBCA) con arreglo factorial de dos tratamientos aplicados: Medio Aleksandrov modificado y medio de Pikovskaya, con tres bloques y tres repeticiones. El modelo aditivo lineal es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Resultados obtenidos en el k-ésima placa que recibió el i-ésimo tratamiento en el j-ésimo bloque

μ = Efecto de la media general

τ_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

β_j = Efecto del j-ésimo bloque

ε_{ijk} = Efecto debido a la k-ésima placa que recibió el i-ésimo tratamiento en el j-ésimo bloque (error experimental).

Cuadro 2: Distribución de grados de libertad por fuente de variación.

Fuente de variación	Grados de libertad (G.L):	
Tratamientos(A)	A- 1	1
Bloque (B)	B- 1	2
Error experimental	(AxB)(R-1)	12
Total	(AxBxR) - 1	17

3.5.2. Tratamiento estadístico

Los datos obtenidos de la evaluación de variables en los diferentes tratamientos fueron sometidos al análisis de varianza (ANVA). Los promedios fueron comparados mediante la Prueba de comparación de medias de diferencias mínimas significativas (DLS) con un nivel de significación de 0.05. El análisis estadístico fue realizado empleando el paquete *Agricolae* del ambiente para cómputo estadístico R, versión 3.1.1 (R Core Team, 2016).

3.6. Evaluación de la capacidad de disolución de potasio en medio líquido

Una vez que se determinaron las poblaciones de *B. mucilaginosus* en los medios se procedió a enriquecer la cepa en medio líquido, para lo cual se utilizó el medio de cultivo más adecuado de acuerdo a los resultados del conteo en medio sólido. Una vez que se alcanzó una concentración de 2.3×10^7 /mL validada previamente mediante el método de curvas de absorbancia, se inoculó 1mL en botellas conteniendo 50 mL de medio líquido modificado con el feldespato potásico en las mismas cantidades que el ensayo en medio sólido. El periodo de incubación fue de 10 días a temperatura ambiente y a una temperatura ambiente de 28 ± 2 °C.

La cantidad de potasio soluble en cada frasco fue medida por espectrofotometría de absorción atómica. Para ello una alícuota de caldo microbiano fue centrifugada a 1500 rpm durante cinco minutos. Además se midió la acidez titulable por el método de Cerezine et al., (1988) y el pH de los filtrados.

Se determinaron las concentraciones de potasio, el pH y la acidez titulable los días 1, 3, 5, 7 y 10. El muestreo se realizó por descarte tomando una alícuota de 3 repeticiones por tratamiento y dos blancos por cada evaluación.

3.7. Ensayo biológico de disponibilidad de potasio

3.7.1. Ubicación

Se realizó una prueba biológica en el Laboratorio e Invernadero de Fertilidad del Suelo de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), empleando como planta indicadora frijol Castilla (*Vigna unguiculata* L.). Se evaluó la respuesta del frijol a la inoculación de la cepa de *B. mucilaginosus* con capacidad para disolver potasio insoluble, a la aplicación de feldespato potásico y un hidrolizado líquido de gallinaza llamado Tecnofer-L.

El promedio de temperaturas máximas y mínimas anuales fue de 24 y 16 °C respectivamente. La precipitación acumulada anual fue 23 mm aproximadamente.

3.7.2. Materiales

- 40 macetas de plástico con capacidad de 4 kg.
- Semillas de frijol, maíz, trigo y haba.
- Agua destilada.
- Suspensión microbiana.
- Papel filtro.
- Tamiz de malla de cobre de 4 mm.
- Tijera de podar.
- Regla graduada o cinta métrica.
- Recipientes graduados de plástico.
- Balanzas mecánica y electrónica.
- Etiquetas adhesivas.
- Bolsas de papel reciclado.

3.7.3. Sustrato experimental

El sustrato empleado para el ensayo fue colectado en el distrito de Cieneguilla. El sustrato fue seleccionado por presentar un contenido bajo de potasio disponible y alta permeabilidad; esto fue importante para que el contenido de potasio en el sustrato no influya en los tratamientos propuestos.

El sustrato presenta una clase textural arena, reacción alcalina, es muy ligeramente salino, y con un contenido bajo de materia orgánica. El contenido de potasio disponible es bajo. La capacidad de intercambio catiónico del suelo es baja, con contenido medio de calcio, medio de magnesio y bajo sodio cambiables. El potasio cambiante es escaso. Las propiedades físicas y químicas del suelo, determinadas mediante el análisis de caracterización, se muestra en el siguiente cuadro.

La arena de río fue comprada al proveedor del laboratorio de fertilidad de suelos, posteriormente se realizó un lavado y secado para luego llevarla al laboratorio. La arena fue almacenada en lugar fresco hasta su instalación en las macetas. Antes de almacenar la arena se tomó una porción de cada saco para preparar una muestra compuesta de un kilo de peso para el análisis químico respectivo.

Cuadro 3: Características físicas y químicas del sustrato empleado en las macetas

Característica	Unidad	Valor	Clasificación
Arena	%	95.00	--
Limo	%	5.00	--
Arcilla	%	0	--
Clase textural	--	--	Arena
pH (H ₂ O)	--	7.78	Ligeramente alcalino
CE _(1:1)	dS/m	0.26	Muy ligeramente salino
CaCO ₃	%	0.50	Bajo
Materia orgánica	%	0.07	Bajo
Fósforo disponible	ppm	4.10	Bajo
Potasio disponible	ppm	58.00	Bajo
CIC	meq/100g	6.40	Bajo
Ca ²⁺	meq/100g	5.30	Medio
Mg ²⁺	meq/100g	0.68	Medio
K ⁺	meq/100g	0.15	Bajo
Na ⁺	meq/100g	0.10	Bajo
Al ³⁺ + H ⁺	meq/100g	0.00	--
PSB	%	97.00	Elevado

Fuente: LASPAF-UNALM, 2015

3.7.4. Cepa microbiana

La cepa de *B. mucilaginosus* fue concentrada en medio líquido durante 11 días llegando a tener una concentración de 2×10^7 UFC/mL validada previamente por el método de curvas de absorbancia.

3.7.5. Feldespato potásico

El feldespato potásico que se utilizó fue el feldespato SIP M-325® proveniente de la empresa COMACSA. La composición del producto se describe en el siguiente cuadro.

Cuadro 4: Composición del feldespato potásico e emplearse en el experimento.

Características	Composición (%)
SiO ₂	68.07
Fe ₂ O ₃	0.10
Al ₂ O ₃	16.82
SO ₃	0.00
Na ₂ O	3.08
K ₂ O	10.10

3.7.6. Fuente orgánica

La fuente orgánica que se empleó fue el hidrolizado líquido de gallinaza Tecnofer-L® provisto por la empresa Tecnonatura S.A. Se trata de un líquido viscoso y denso, de color pardo muy oscuro y olor sutil a azúcar fermentada, de reacción ácida y altamente salino. La cantidad de nutrientes que presenta es elevada. La composición fisicoquímica del producto se reporta en el siguiente cuadro.

Cuadro 5: Análisis fisicoquímico del abono líquido Tecnofer-L®

Características	Valor
pH	4.20
Conductividad eléctrica (dS/m)	26.90
Densidad a 20 °C (g/cm ³)	1.15
Sólidos totales (g/L)	233.50
M.O. en solución (g/L)	137.70
N (g/L)	7.50
P ₂ O ₅ (g/L)	4.90
K ₂ O (g/L)	11.10
CaO (g/L)	14.60
MgO (g/L)	2.20
Na (g/L)	1.30

3.7.7. Descripción de los tratamientos

3.7.7.1. Cepas microbianas

Los cuatro tratamientos empleados para el ensayo fueron: la cepa de *B. mucilaginosus*, el hidrolizado, la combinación de ambos y un tratamiento sin inoculación ni hidrolizado. Todos los tratamientos fueron aplicados con una fertilización base de los principales nutrientes menos de potasio.

3.7.7.2. Aplicación de potasio inorgánico

Dos niveles de K inorgánico (0 y 500 mg/kg de suelo) fueron aplicados en forma de feldespato potásico (10.1 % K₂O). Los tratamientos aplicados se resumen en el siguiente cuadro.

Cuadro 6: Tratamientos a ensayar en la prueba biológica

Tratamiento	Definición	K mineral (mg/kg)
Fb	Fertilización base: N-P-0-Ca-Mg	0
Bm	FB + <i>Bacillus mucilaginosus</i>	0
Tec	FB + Tecnofer-L	0
BmTec	FB + <i>B. mucilaginosus</i> + Tecnofer-L	0
Fb+Feldsp	FB	500
Bm+Feldsp	FB + <i>B. mucilaginosus</i>	500
Tec+Feldsp	FB + Tecnofer-L	500
BmTec+Feldsp	FB + <i>B. mucilaginosus</i> + Tecnofer-L	500

El K mineral fue mezclado uniformemente con el suelo de la maceta a dosis de 0 y 500 mg/kg de suelo seco, empleando feldespato potásico como fuente de K₂O.

La inoculación con *B. mucilaginosus* se realizó durante la siembra. Con una pipeta de 10 mL se procedió a colocar 10 mL de la suspensión de esporas alrededor de las semillas que previamente habían sido sembradas, esto se realizó en cada una de las macetas.

3.7.8. Metodología y procedimiento

3.7.8.1. Colecta, preparación y muestreo del sustrato

La arena de río fue comprada al proveedor del laboratorio de Fertilidad de Suelos, posteriormente se realizó un lavado y secado para luego llevarla al laboratorio. La arena fue almacenada en lugar fresco hasta su instalación en las macetas. Antes de almacenarla se tomó una porción de cada saco para preparar una muestra compuesta de un kilo de peso para el análisis químico respectivo.

3.7.8.2. Preparación de las macetas

Las macetas de plástico fueron lavadas y secadas al aire por dos a tres horas, luego fueron esterilizadas con alcohol para después ser etiquetadas y llenadas con cuatro kilos del sustrato experimental.

3.7.8.3. Siembra y desahije

Una vez humedecido el sustrato se sembraron cinco semillas de frijol en cada maceta. Cinco días después de la germinación se procedió al desahije, dejando dos plántulas por maceta.

3.7.8.4. Fertilización y riego

La dosis de fertilización fue de 200 ppm de N, 200 ppm de P_2O_5 y 40 ppm de MgO empleando nitrato de amonio, fosfato monoamónico y sulfato de magnesio, respectivamente. Cada uno de estos fertilizantes fue disuelto en 500 mL de agua destilada. Luego, en cinco envases separados, se distribuyen 100 mL de cada producto disuelto, estos envases con 300 mL fueron almacenados para luego ser usados. La aplicación del fertilizante se inició 10 días después de la germinación y tuvo una duración de cinco semanas. Cada semana se aplicó los 300 mL de solución en una mezcla de dos litros con agua destilada, a cada maceta se aplicaron 25 mL de la mezcla alrededor de la planta. Las macetas fueron regadas convenientemente y cultivadas por cinco meses.

3.7.8.5. Cosecha

Luego del periodo de crecimiento, se midió la altura de planta fue medida, las plantas fueron cosechadas, el follaje fue cortado, pesado en fresco, posteriormente lavado con agua corriente y luego con agua desionizada y secado a estufa a 70 °C hasta lograr un peso constante para determinar el peso seco. El follaje fue sometido a análisis químico para determinación del contenido de potasio.

3.7.9. Parámetros en evaluación

Peso fresco por planta: las plantas fueron cortadas al nivel del suelo, y luego pesadas en una balanza de precisión para obtener la materia fresca o biomasa por planta.

Peso seco por planta: Se pesaran porciones de la materia fresca anterior fueron pesadas y secadas a estufa a 70 °C por 24 horas hasta peso constante. Posteriormente fueron nuevamente pesadas obteniéndose el peso seco por planta y el porcentaje de materia seca.

Peso fresco de las vainas: las vainas fueron colectadas, y luego pesadas en una balanza de precisión para obtener la materia fresca o biomasa de las vainas por plantas.

Peso seco de las vainas: Se pesaran porciones de la materia fresca de las vainas anterior fueron pesadas y secadas a estufa a 70 °C por 24 horas hasta peso constante.

Posteriormente fueron nuevamente pesadas obteniéndose el peso seco de las vainas por planta y el porcentaje de materia seca de las mismas.

Contenido de potasio, nitrógeno y fósforo en la materia seca: la materia seca de plantas de frijol fueron homogenizada mediante una molienda.

Para el análisis químico de los tejidos vegetales se emplearon las metodologías seguidas por el LASPAF-UNALM. Las muestras de follaje de frijol y las vainas luego de su colecta, fueron lavadas con agua corriente y desionizada, para eliminar los residuos que podrían encontrarse adheridos a la superficie de las hojas.

Las hojas fueron luego secadas a estufa a aproximadamente 70 °C hasta peso constante, molidas y empaquetadas para su posterior análisis. Las vainas del frijol fueron cortadas en láminas delgadas, las que fueron secadas al aire por dos a tres días, y posteriormente a estufa a 70 °C hasta peso constante, para luego ser molidas y analizadas.

Las muestras fueron atacadas mediante digestión nitro-perclórica; en la solución obtenida se determinaron los contenidos de fósforo mediante colorimetría con el método amino-naftol-sulfónico. El nitrógeno fue determinado por el método de micro-Kjeldahl modificado. El potasio fue determinado por espectrofotometría de absorción atómica en el extracto anterior.

Adicionalmente se tomaron los datos del número de vainas llenas y vainas vanas por maceta.

3.7.10. Análisis estadístico

3.7.10.1. Diseño experimental

En el presente experimento, se empleó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial de cuatro tratamientos aplicados: una fertilización base sin K, inoculación de *B. mucilaginosus*, aplicación de Tecnofer-L e inoculación de *B. mucilaginosus* más aplicación de Tecnofer-L, por dos dosis de aplicación de K mineral (0 y 500 mg/kg de suelo), con cinco repeticiones por tratamiento. El modelo aditivo lineal es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Resultados obtenidos en el k-ésima maceta que recibió el i-ésimo tratamiento y la j-ésima dosis de potasio mineral.

μ = efecto de la media general

τ_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

β_j = Efecto de la aplicación de la j-ésima dosis de potasio mineral

$(\tau.\beta)_{ij}$ = Efecto de la interacción del i-ésimo tratamiento por la j-ésima dosis de potasio mineral.

ε_{ijk} = Efecto debido a la k-ésima maceta que recibió el i-ésimo tratamiento y la j-ésima dosis de potasio mineral (error experimental).

Cuadro 7: Distribución de grados de libertad por fuente de variación.

Fuente de variación	Grados de libertad (G.L):	
Biofertilización (A)	A- 1	3
Potasio mineral (B)	B- 1	1
Interacción biofertilización (A) x potasio mineral (B)	(A - 1)(B - 1)	3
Error experimental	(AxB+1)(R-1)	36
Total	((AxB+1)R) - 1	44

3.7.10.2. Tratamiento estadístico

Los datos obtenidos de la evaluación de variables en los diferentes tratamientos fueron sometidos al análisis de varianza (ANVA). Los promedios fueron comparados mediante la Prueba de comparación de medias de Tukey con un nivel de significación de 0.05. El análisis estadístico fue realizado empleando el paquete *Agricolae* del ambiente para cómputo estadístico R, versión 3.1.1 (R Core Team 2016).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Resultados de la comparación de medios de cultivo de *B. mucilaginosus*

El análisis de varianza demostró que los medios de cultivo produjeron efectos significativamente diferentes, también se observó que no hubo diferencias significativas entre los 3 muestreos realizados a la cepa de *B. mucilaginosus*. Cabe señalar que por la naturaleza del método mediante el cual se obtuvieron las poblaciones microbianas en el inóculo experimental y para realizar un análisis estadístico más preciso, se trabajó con el logaritmo en base diez de las poblaciones microbianas.

La población microbiana presentó diferencias estadísticas (p valor < 0.005) entre los dos medios ensayados (Aleksandrov mod. y Pikovskaya). Las medias de los tratamientos y sus diferencias estadísticas según la prueba de diferencias mínimas significativas (LSD) se presentan en el cuadro 8.

Cuadro 8: Recuento de población de *Bacillus mucilaginosus* en dos medios de cultivo

Tratamientos	Población (Log n)
Aleksandrov mod.	7.46 a
Pikovskaya	7.29 b

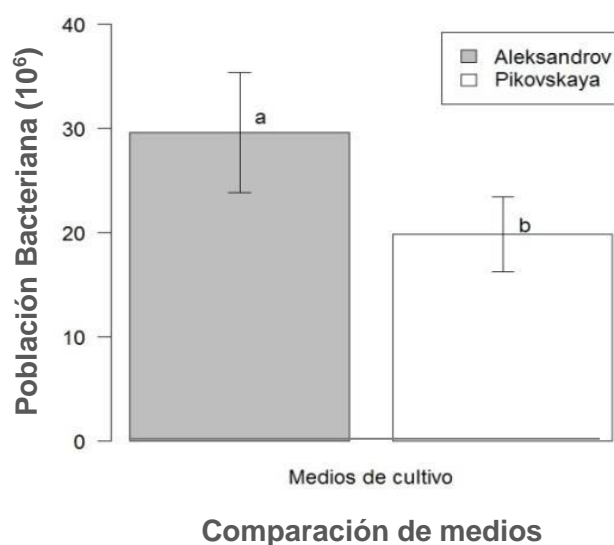


Figura 2: Efecto del uso de dos medios de cultivo sobre la población de *B. mucilaginosus*

La población bacteriana del medio Aleksandrov modificado fue aproximadamente 50 % mayor que la del medio Pikovskaya como se puede ver en la Figura 2.

Estos resultados permiten inferir que el medio optimizado de Aleksandrov se muestra como el medio ideal para el cultivo de *B. mucilaginosus*. Entonces es necesario determinar qué diferencias nutricionales entre ambos medios son las que producen estos resultados.

Cuadro 9: Diferencias en la composición química de ambos medios

Componente	Composición (g/L)	
	Pikovskaya (PKV)	Aleksandrov mod. (ADVm)
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.1	0.5
CaCO ₃	---	0.1
FeCl ₃	---	0.005
Glucosa	10	5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.002	---
NaCl	0.2	---
MnSO ₄ .H ₂ O	0.002	---

Como se puede observar en el cuadro 9, el medio de PKV tiene el doble de dosis de glucosa que el medio ADVm, y siendo esta la fuente principal de carbono en el medio, se esperaría una mayor población en el medio PVK. Sin embargo, los resultados reflejan una mayor población en el medio ADVm, pudiendo ser este un indicador de un efecto inhibitorio del crecimiento en altas concentraciones de glucosa.

Los otros elementos al no encontrarse en grandes cantidades no pudieron ser un factor diferencial entre ambos medios.

Pese a que literatura respalda al medio Aleksandrov como un buen medio para *B. mucilaginosus* (Parmar y Sindhu, 2013; Diep y Hieu, 2013; Hu et al., 2006), el medio Aleksandrov utilizado en este ensayo es una modificación del medio original ya que cuenta con 0.5 g/L de (NH₄)₂SO₄ y 0.5 g/L de extracto de levadura, que son compuestos ausentes en el medio original. Al realizar ensayos previos con el medio original no se produjo una cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) que permitiera realizar una prueba adecuada, esto también confirma la importancia de la adición de nitrógeno para el desarrollo de la bacteria.

4.2. Prueba de solubilización in vitro en medio líquido

Los ensayos de solubilización exhibieron el comportamiento de la bacteria en medio líquido, mostrando un cambio en el pH, acidez titulable y potasio disponible en el medio inoculado.

4.2.1. Potasio soluble

La variación temporal de la concentración de K soluble en un medio inoculado y un testigo sin inocular, puede apreciarse en la figura 3.

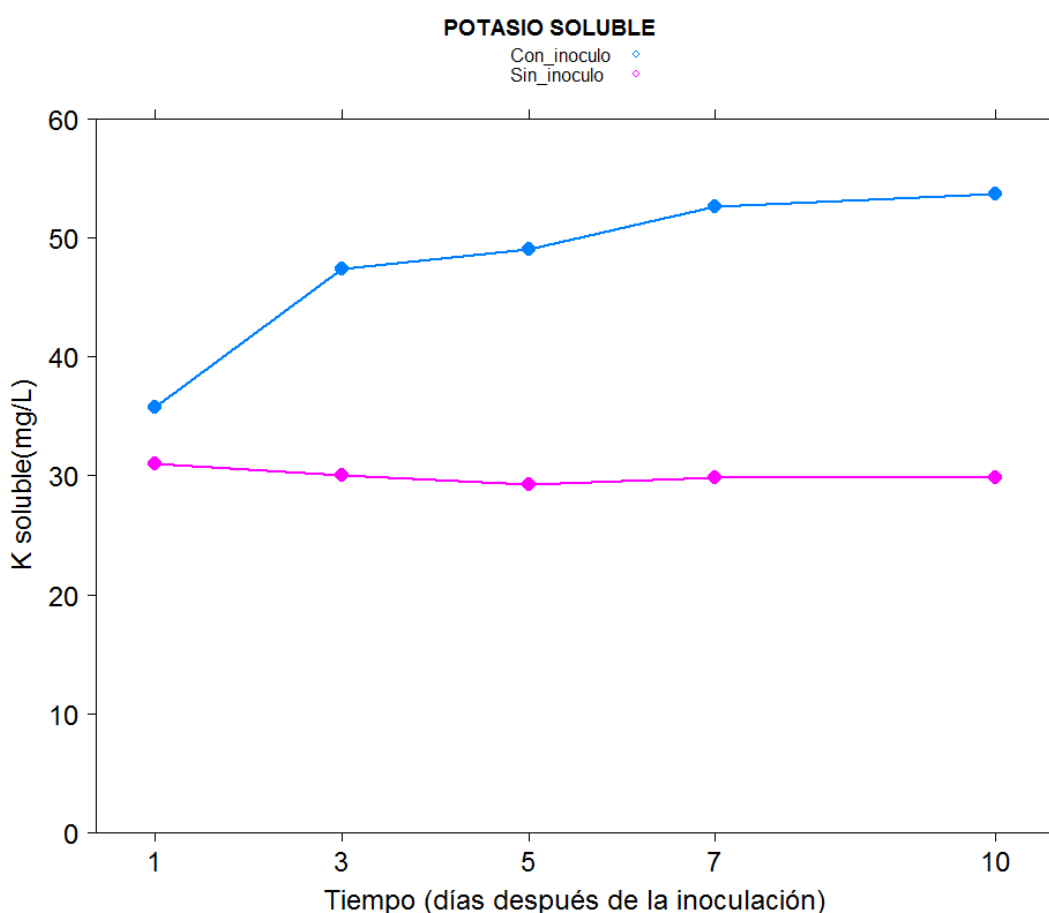


Figura 3: Variación de la concentración de K soluble en medio líquido de Aleksandrov modificado con y sin inoculación de *Bacillus mucilaginosus*.

La concentración de K soluble en el medio no inoculado se mantuvo constante durante el tiempo de incubación (diez días), con un valor medio de 30 mg/L de K. Esta cantidad proviene del feldespato potásico, el cual a pesar de haber sido sometido a lavados previos al ensayo pudo haber liberado cantidades moderadas de K debido a la alta presión alcanzada durante los procesos de esterilización en autoclave.

En la figura 4 se observa la variación de K soluble debida solo a la inoculación de la bacteria al restar el K soluble de los testigos sin inocular.

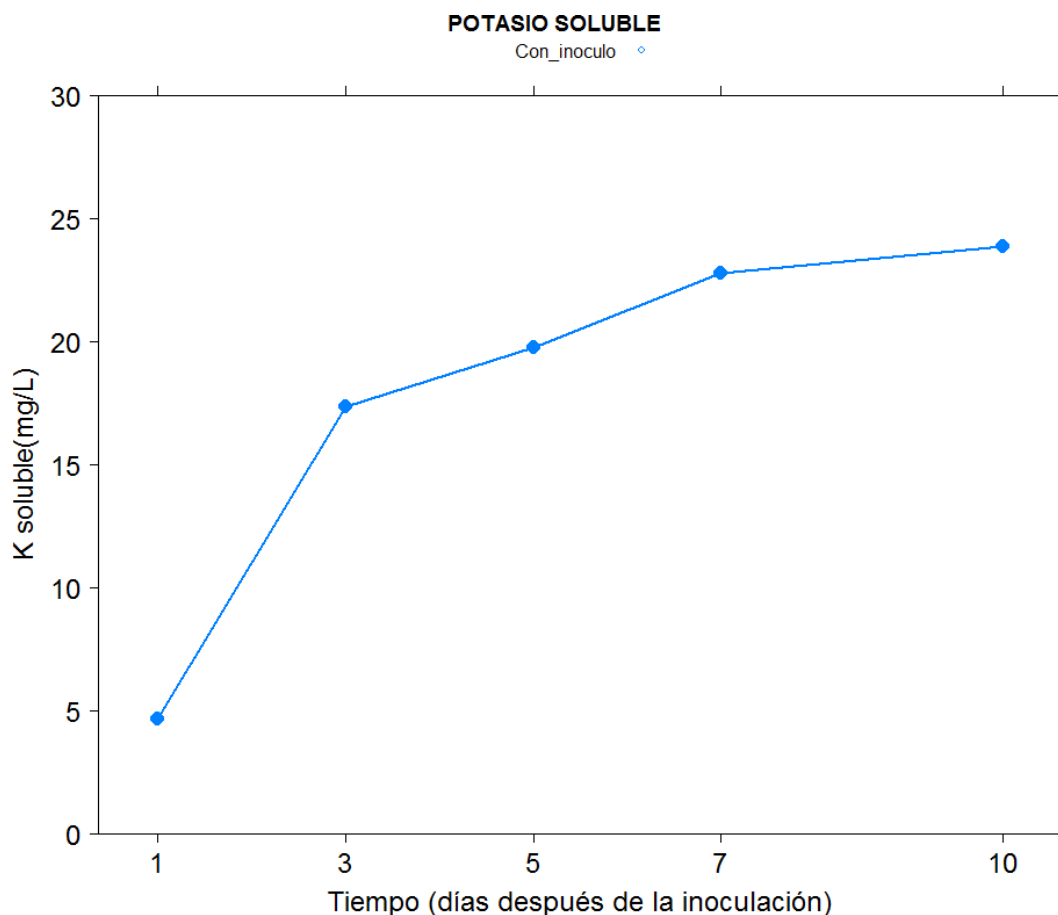


Figura 4: Variación de la concentración de K soluble en medio nutritivo como resultado de la actividad de *B. mucilaginosus*.

La mayor concentración de K soluble (23.85 mg K/L) se alcanzó a los diez días después de la inoculación. Es importante señalar que aunque este valor fue alcanzado el último día de evaluación, no se espera una mayor solubilización ya que la curva de concentración se va estabilizando en los días siete y diez. También se registró un cambio en el K disponible más pronunciado en los primeros tres días, lo que indica que la bacteria es más activa en solubilizar el potasio en ese lapso de tiempo.

La literatura reporta un amplio rango de K liberado por microorganismos solubilizadores de potasio, por lo que nuestros resultados se encuentran dentro de lo reportado en ensayos similares. Sugumaran y Janarthanam (2007) reportan 4.29 mg/L de K liberado en cuatro días de ensayo usando una cepa de *B. mucilaginosus*, Parmar y Sindhu (2013), reportan rangos entre 15 - 48 mg/L en ensayos de diez días para varias cepas sin caracterizar; Prajapati et al., (2013) reportan 26 mg /L para *Aspergillus terreus* y 23 mg/L para *A. niger* en siete días de ensayo y Sheng y He (2006) reportan valores entre 5 – 70 mg/L para cuatro mutaciones de *B. edaphicus* en 7 días de ensayo.

4.2.2. pH

La variación del pH en el medio nutritivo con y sin inoculación de *B mucilaginosus* durante diez días de incubación, puede apreciarse en la Figura 5.

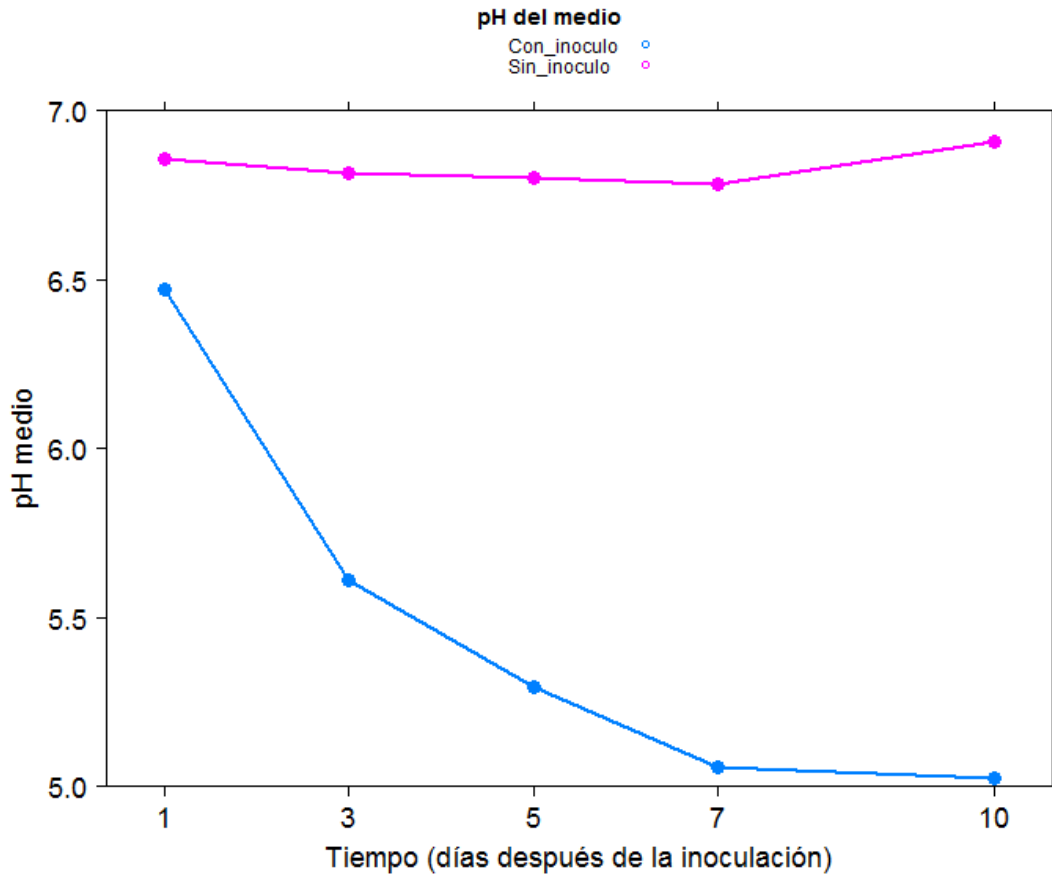


Figura 5: Variación del pH en el medio de Aleksandrov modificado con y sin inoculación de *B. mucilaginosus*.

El medio de cultivo mostró un valor inicial de pH (antes de la esterilización) de 7.02; después de la esterilización el pH disminuyó a 6.80. El pH en el medio no inoculado se mantuvo constante en 6.83 a lo largo de los días que duro el ensayo. En el medio inoculado se observó una disminución gradual del pH, alcanzando un valor mínimo de 5.02 a los diez días después de la inoculación. Es importante mencionar que aunque el pH más bajo se registró el último día de muestreo, no se espera una mayor disminución ya que los valores de pH se tornan asintóticos a partir de los siete días después de la inoculación. La disminución del pH fue más pronunciada en los primeros tres días, lo que indica que la bacteria es más activa en solubilizar el potasio en ese periodo de tiempo.

En la siguiente figura se muestra la relación entre el aumento del K soluble y el descenso del pH durante la duración del experimento.

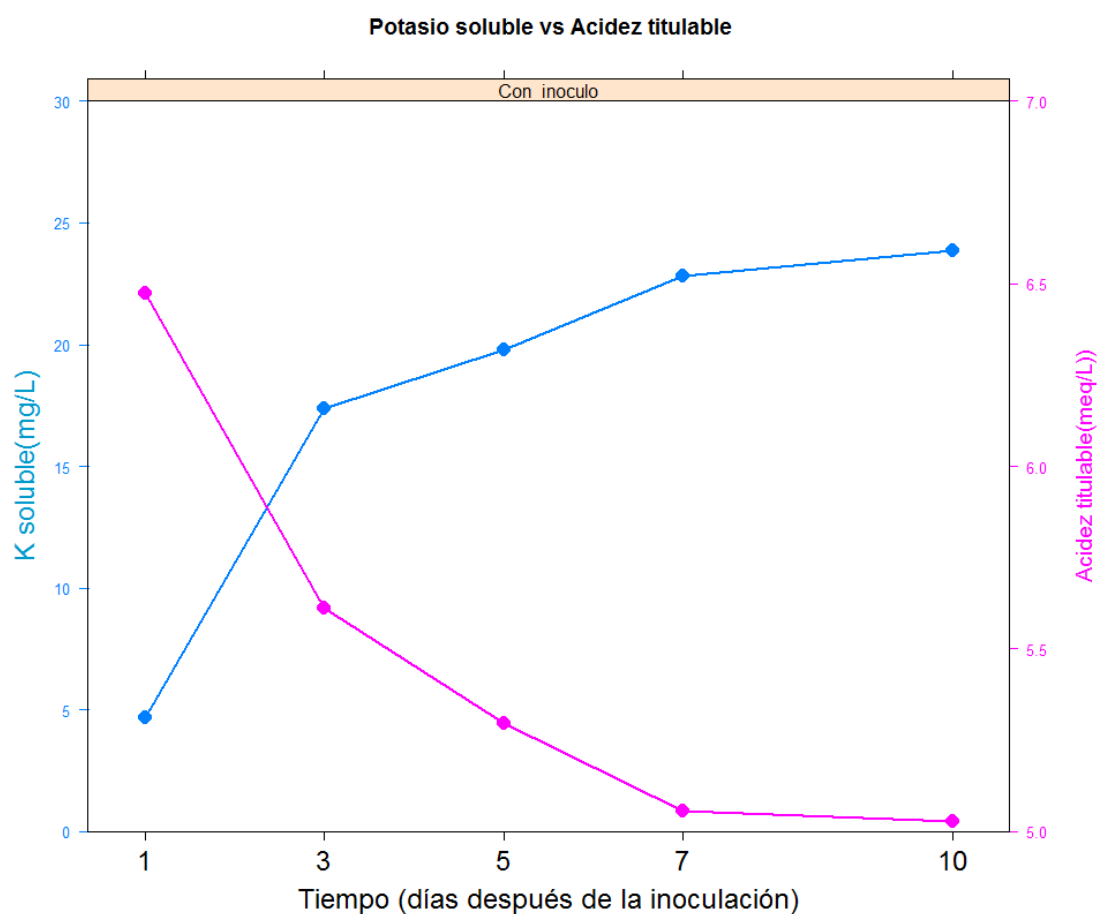


Figura 6: Relación entre la concentración de K soluble y el pH en medio inoculado.

Como se puede observar en la Figura 6, el pH tiene una relación inversa al K soluble, en los tres primeros días donde la bacteria solubiliza el K más activamente, observamos un descenso en el pH de 6.5 a 5.6, que es el descenso más drástico que se pudo registrar en el ensayo.

Estos resultados reflejan que el mecanismo que utiliza el *B. mucilaginosus* para solubilizar K implica un cambio en el pH. Estos resultados van de acuerdo a lo presentado por Sheng y He (2005), que reportan descensos en el pH hasta 4.84 – 5.45 en 4 mutaciones de *B. edaphicus*. Prajapati et al. (2013) reportan valores finales de pH de 2.3 y 3.0 para *A. terreus* y *A. niger*, respectivamente. Hu et al. (2006) reportaron un pH final de 5.0 para *B. mucilaginosus* en cuatro días de ensayo.

4.2.3. Acidez titulable

La variación temporal de la acidez titulable en un medio inoculado y un testigo sin inocular, puede apreciarse en la siguiente figura.

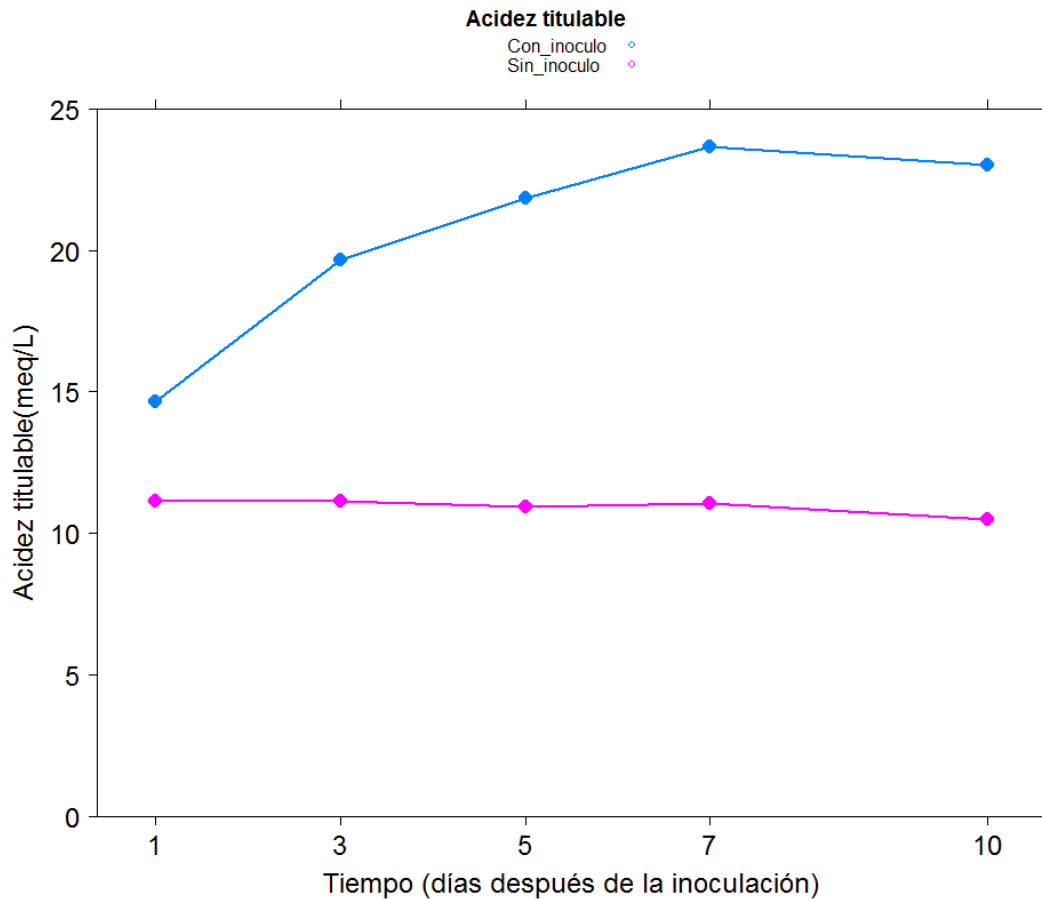


Figura 7: Variación de la acidez titulable en el medio de Aleksandrov modificado con y sin inoculación de *B. mucilaginosus*.

La figura 7 permite observar un comportamiento diferente en acidez titulable cuando el medio es inoculado. La acidez titulable en el medio no inoculado se mantiene en 10.96 meq/L durante los días que duro el ensayo, este valor refleja el propio contenido de ácidos provenientes de la misma composición del medio de cultivo.

La cantidad de acidez titulable del testigo fue tomada como un valor base para a partir de él calcular la cantidad de acidez titulable que genera la bacteria.

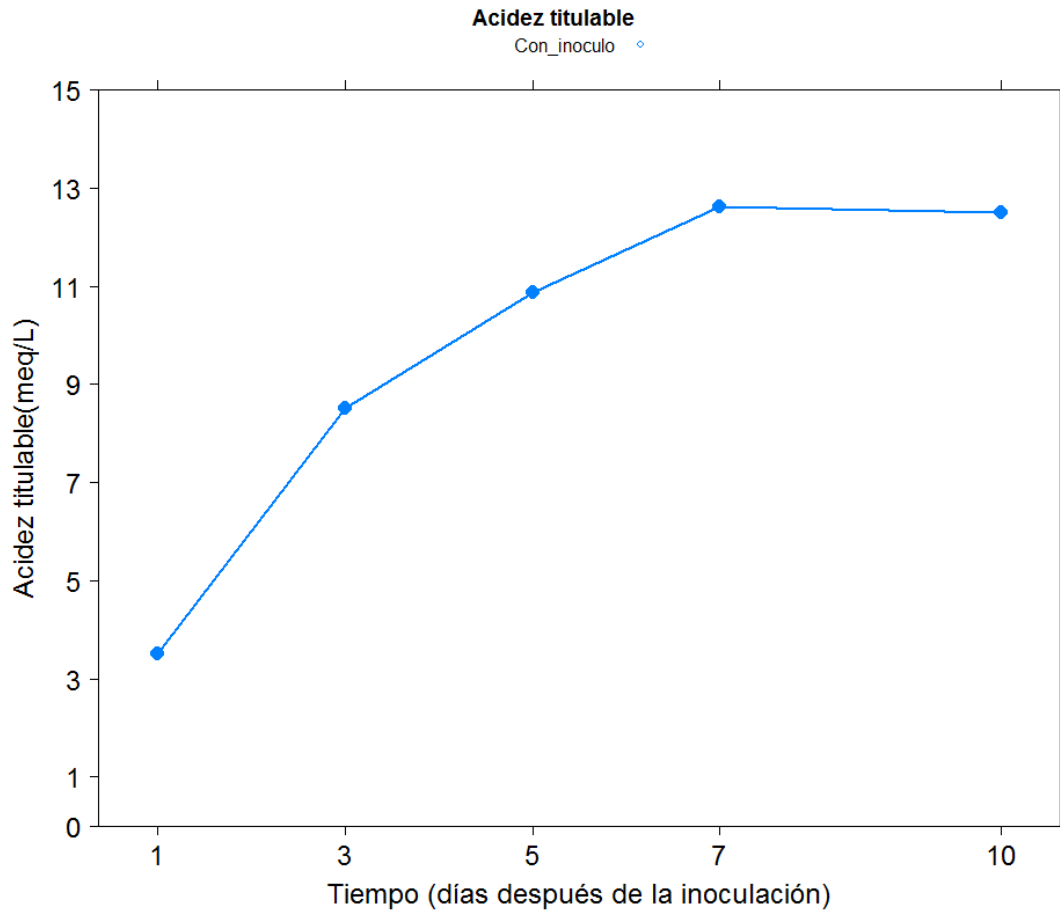


Figura 8: Variación de la acidez titulable en medio nutritivo como resultado de la actividad de *B. mucilaginosus*.

La figura 8 nos permite observar la variación en la acidez titulable debido solo a la inoculación de la bacteria. En el medio inoculado se observa que la mayor cantidad de acidez titulable producida por la bacteria fue de 12.61 meq/L. Se puede observar que el pico de solubilización ocurrió el séptimo día de ensayo en que se realizó el muestreo, el último día de ensayo se registró un ligero descenso que demuestra una reducción de la actividad de la bacteria. También se registró un cambio en la acidez titulable más pronunciado en los primeros tres días.

Es importante relacionar el K soluble con la acidez titulable ya que nos permitirá determinar si la liberación de ácidos por la bacteria es su principal mecanismo para solubilizar K, la gráfica comparativa se presenta a continuación.

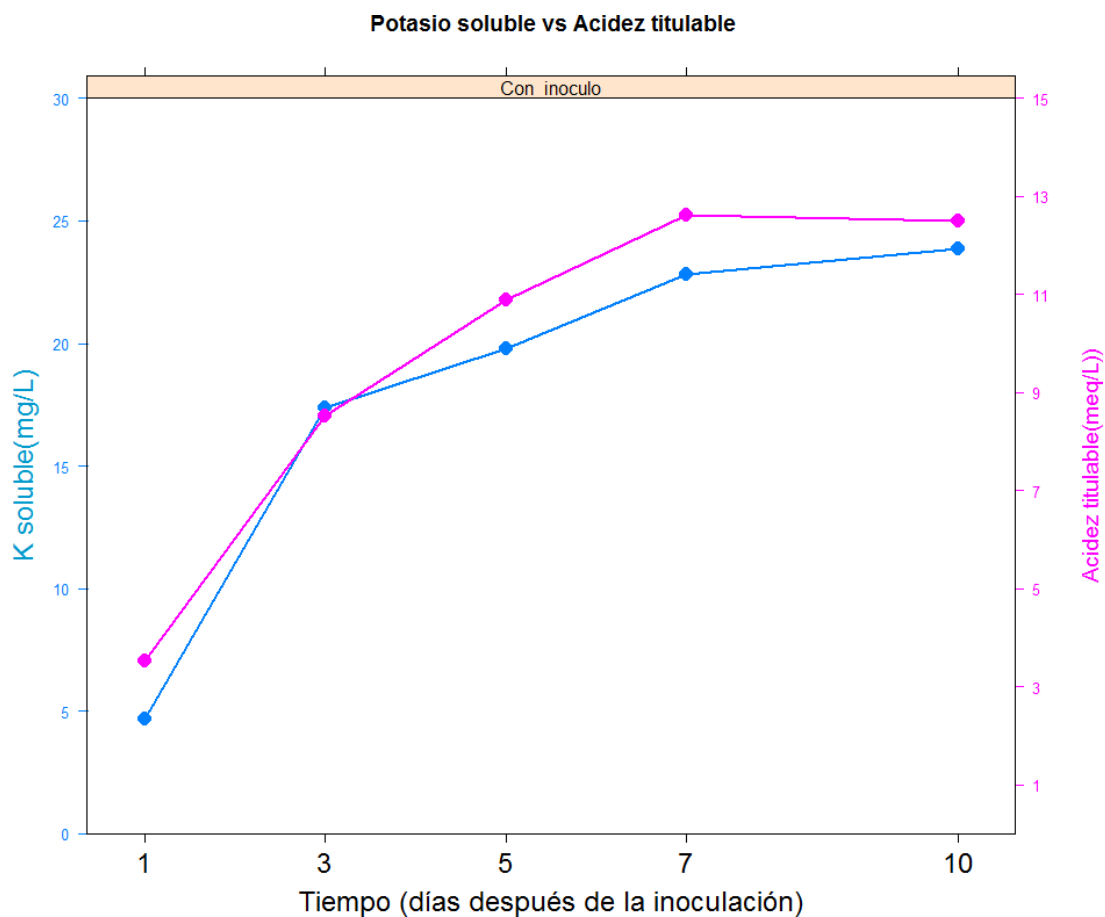


Figura 9: Relación entre la concentración de K soluble y acidez titulable en medio inoculado.

Relacionando la acidez titulable y el K solubilizado en el medio inoculado con la bacteria, se observa una relación directamente proporcional y muy evidente entre la cantidad de K solubilizado y la AT; es decir, que a mayor cantidad de acidez titulable se observa mayor concentración de K solubilizado. Se puede apreciar que la línea de variación del K soluble en todo el periodo de evaluación tiene el mismo comportamiento que la línea de variación de la acidez titulable. Por lo tanto la variable que mayor incidencia tiene sobre la solubilización, o que explicaría de mejor forma la solubilización del feldespato potásico es la acidez titulable.

Esto nos permite determinar que el principal mecanismo de solubilización que tiene *B. mucilaginosus* es la producción de ácidos orgánicos. Zeng et al. (2012), reportan que *B. mucilaginosus* produce principalmente ácido oxálico junto con polisacáridos capsulares, los mismos que también son reportados por Sheng y He (2005) para *B. edaphicus*. Sin embargo no se descarta la acción de otros ácidos.

4.3. Ensayo biológico de disponibilidad de nutrientes.

En este ensayo el análisis de varianza demostró que los tratamientos aplicados produjeron efectos significativamente diferentes, del mismo modo, se observaron diferencias significativas para la interacción Fertilización-Dosis potásica sobre las variables de potasio, nitrógeno y fósforo en el follaje, así como en el fósforo en vainas. Las fuentes de K utilizadas presentaron diferencias significativas sobre el fosforo en el follaje.

4.3.1. Peso seco y número de vainas

El análisis de varianza demostró que los tratamientos aplicados produjeron efectos significativamente diferentes, también se observaron diferencias significativas para la interacción Fertilización-Dosis potásica sobre el peso seco total. Las fuentes de K utilizadas presentaron diferencias significativas sobre el peso seco total y las vainas vanas.

Los valores obtenidos de peso seco del follaje y las vainas no presentaron diferencias significativas resaltantes. En cambio en el peso seco total, los mayores valores fueron los del tratamiento BmTec con un valor de 26.69 mg/maceta. Mientras que en la fertilización base se presentaron los menores valores con 25.57 mg/maceta. También se presentaron diferencias significativas en cuanto a la fertilización potásica, produciéndose en promedio más peso seco total (25.57 mg/maceta) en los tratamientos aplicados con el feldespato en comparación a los no aplicados (24.23 mg/maceta).

En cuanto al número de vainas llenas el tratamiento Tec presentó en promedio el mayor número con 16.30, mientras que, en promedio, el tratamiento Bm presentó los valores más bajos con 12.10. En relación a las vainas vanas el tratamiento Tec presentó en promedio la mayor cantidad de vainas vanas (4.3), mientras que el tratamiento BmTec fue el que presentó la menor cantidad de vainas vanas (2.2). También se presentaron diferencias significativas en la aplicación de feldespato potásico produciéndose un mayor número promedio de vainas (3.55) en los tratamientos no aplicados con el feldespato en comparación a los aplicados (2.8).

Las medias de los tratamientos y sus diferencias estadísticas según la prueba de Tukey se presentan en el Cuadro

Cuadro 10: Efecto de la inoculación de una cepa de *B. mucilaginosus* en combinación con un hidrolizado y de la aplicación de feldespato potásico sobre la materia seca y el número de vainas en plantas de frijol.

Tratamiento	PESO SECO (g/maceta)			NUMERO DE VAINAS	
	Follaje	Vainas	Total	Llenas	Vanas
Fertilización					
Fertilización base: N-P-0-Ca-Mg (FB)	11.52 b	10.89 ab	22.42 c	14.60 b	3.10 ab
FB + <i>Bacillus mucilaginosus</i> (Bm)	14.30 a	10.02 b	24.33 bc	12.10 c	3.10 ab
FB + Tecnofer-L (Tec)	14.02 a	12.16 a	26.25 ab	16.30 a	4.30 a
FB + <i>B. mucilaginosus</i> + Tecnofer-L (BmTec)	15.38 a	11.30 ab	26.69 a	14.67 b	2.20 b
Dosis de potasio					
0 mg/kg	13.30a	10.85 a	24.23 b	14.70 a	3.50 a
500 mg/kg	14.27a	11.33 a	25.57 a	14.10 a	2.80 b
Fertilización	***	**	***	***	***
DP	n.s.	n.s.	*	n.s.	*
Fertilización × DP	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.

Los valores dentro de una columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P > 0.05$), según la prueba de comparación de medias HSD de Tukey.

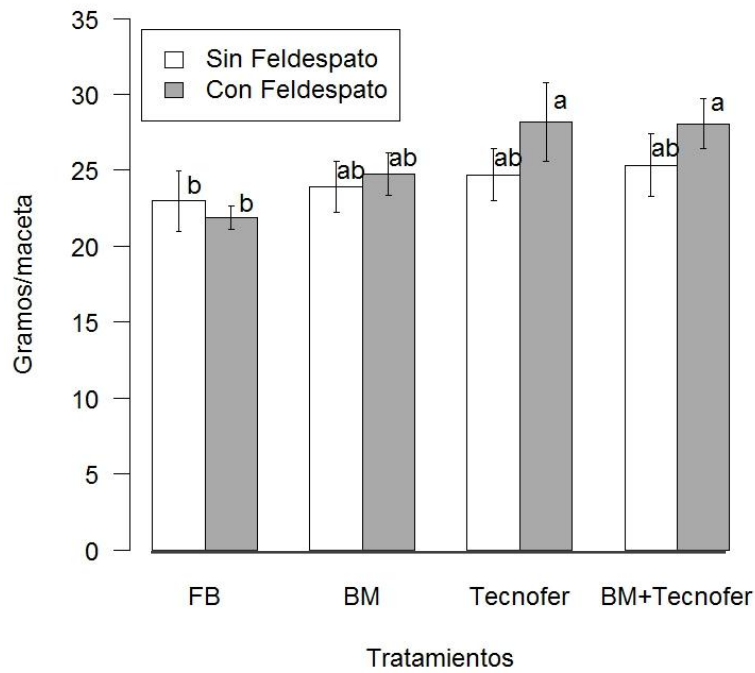


Figura 10: Efecto de los tratamientos propuestos y de la aplicación de potasio sobre la materia seca en plantas de frijol.

Vainas llenas

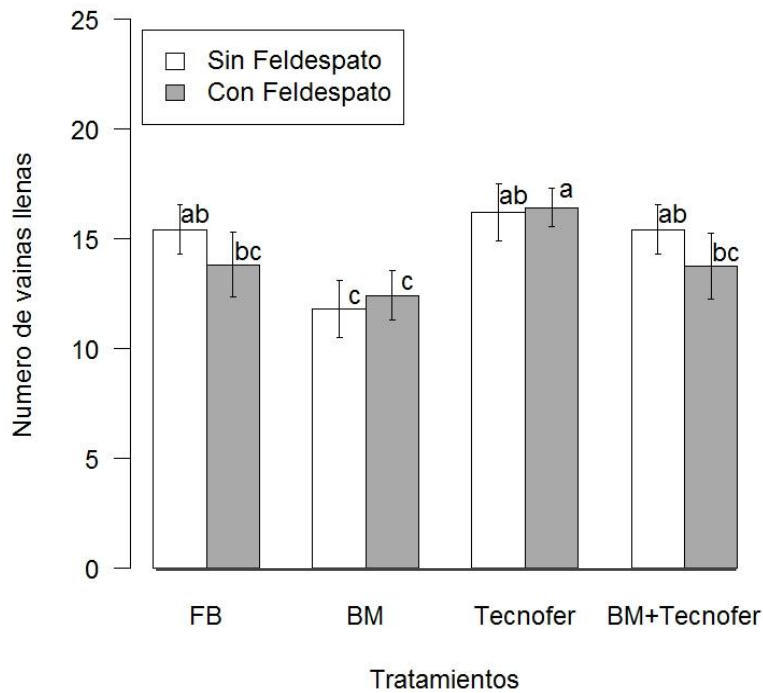


Figura 11: Efecto de los tratamientos propuestos y de la aplicación de potasio sobre el número de vainas llenas en plantas de frijol.

4.3.2. Extracción de potasio

Los mayores niveles de extracción de potasio (Figura 10) en el follaje del frijol fueron originados por la aplicación de Tec y BmTec con valores de 335.39 y 317.39 mg/maceta, respectivamente. Mientras que la fertilización base y Bm, presentaron niveles significativamente menores de extracción con 214.14 y 232.48 mg/maceta respectivamente. Mientras que en las vainas se presentaron resultados similares en los niveles de extracción de K (Figura 11), presentando mayores niveles los tratamientos BmTec y Tec ,con valores de 423.36 y 424.30 mg/maceta respectivamente. Mientras que los tratamientos Fb y Bm, presentaron niveles significativamente menores de extracción con 357.24 y 330.61 mg/maceta respectivamente.

4.3.3. Extracción de nitrógeno y fósforo

En lo referente a la extracción de nitrógeno en el follaje se observa un mayor nivel en el tratamiento Bm con 501.48 mg/maceta y el tratamiento que presento los valor más bajo fue el del a fertilización base. Mientras que en el fósforo el tratamiento con mayor extracción fue el de la fertilización base con 51.61 mg/maceta y el tratamiento con el valor más bajo fue el BmTec con 41.15 mg maceta⁻¹, también se presentaron diferencias significativas en la fertilización con potasio, produciéndose una mayor extracción en los tratamientos aplicados con el feldespató.

En lo que respecta a la extracción en las vainas, el tratamiento con mayor extracción de nitrógeno fue el Tec con 965.23 mg/maceta y el tratamiento que presentó los valor más bajo fue el BmTec. Mientras que en el fósforo no se observaron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos.

Las medias de los tratamientos y sus diferencias estadísticas según la prueba de Tukey se presentan en el Cuadro 11.

Cuadro 11: Efecto de la inoculación de una cepa de *B. mucilaginosus* en combinación con un hidrolizado y de la aplicación de feldespato potásico sobre la extracción de potasio, nitrógeno y fósforo por el follaje y vainas de frijol.

Tratamiento	Extracción por el follaje (mg/maceta)			Extracción por las vainas (mg/maceta)		
	N	P	K	N	P	K
Fertilización						
Fertilización base: N-P-0-Ca-Mg (FB)	441.51 b	51.61 a	214.14 b	850.50 ab	73.32 a	357.24 b
FB + <i>Bacillus mucilaginosus</i> (Bm)	501.48 a	44.89 ab	232.48 b	726.20 b	71.56 a	330.61 b
FB + Tecnofer-L (Tec)	456.85 ab	46.64 ab	335.39 a	965.23 a	77.35 a	423.36 a
FB + <i>B. mucilaginosus</i> + Tecnofer-L (BmTec)	481.73 ab	41.15 b	317.39 a	796.56 b	77.07 a	424.30 a
Dosis de potasio						
0 mg/kg	470.98 a	40.60 b	272.73 a	874.50 a	73.33 a	389.50 a
500 mg/kg	470.49 a	51.80 a	273.90 a	794.75 a	76.32 a	378.26 a
Fertilización	*	*	***	**	n.s.	***
DP	n.s.	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Fertilización × DP	***	*	**	n.s.	***	n.s.

Los valores dentro de una columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P > 0.05$), según la prueba de comparación de medias HSD de Tukey.

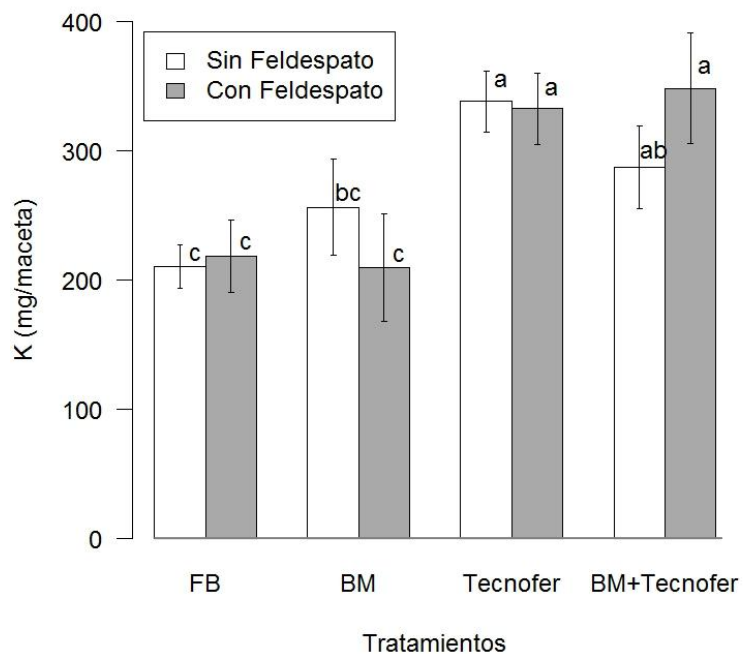


Figura 12: Efecto de los tratamientos propuestos y de la aplicación de potasio sobre la extracción de potasio por plantas de frijol.

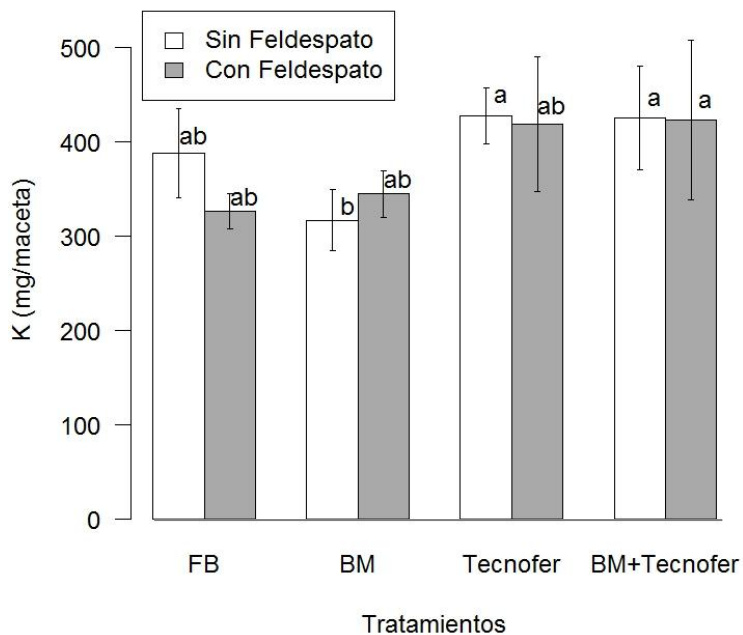


Figura 13: Efecto de los tratamientos propuestos y de la aplicación de potasio sobre la extracción de potasio por vainas de frijol.

La inoculación de *B. mucilaginosus* no produjo resultados significativos en la mayoría de las variables evaluadas, tanto en la materia seca total y el K extraído por el follaje y las vainas. En general, se observan mejores respuestas a la aplicación de Tecnofer que a la inoculación de la bacteria. Esto resulta contrastante con la prueba de solubilización in vitro ya que se demostró que la inoculación de la bacteria aumenta la concentración de K disponible en el medio de la mano con una disminución de pH y un aumento en la acidez titulable. Las razones por la cual se genera esta diferencia pueden ser por las condiciones ideales que se maneja a nivel de laboratorio, mientras que en condiciones a nivel de invernadero los azúcares no se encuentran en formas tan disponibles, el pH y la temperatura del suelo experimental son cambiantes, por lo que la inoculación al sustrato experimental no produjo una colonización exitosa por las condiciones adversas que se presentaron.

También es importante señalar que los tratamientos inoculados con la bacteria presentaron menor peso y producción de vainas que los otros tratamientos. La diferencia entre los niveles de extracción de potasio del follaje no parece explicar de manera determinante estas diferencias en la producción de vainas ya que el tratamiento con menor extracción (Bm) no presentó la peor producción de vainas. La extracción de nitrógeno por el follaje por su parte, sí explica estos resultados ya que los tratamientos inoculados con la bacteria fueron los que reportaron una mayor extracción de nitrógeno. Esto indica que la bacteria fomentó la extracción de nitrógeno de la planta que sumada a la fertilización nitrogenada base produjo mayor producción vegetal dejando de lado la producción de flores y vainas.

Hay varios factores que influyen en el desarrollo de la bacteria en un sustrato. En la elección del sustrato se puso mucho énfasis en el poco K disponible que este debía tener, y se descuidó otros aspectos importantes para el desarrollo de los microorganismos como una buena estructuración del suelo, el porcentaje de arcilla fue de (0 %) y la materia orgánica (0.07 %) lo que no permite generar espacios donde la bacteria pueda desarrollarse de manera adecuada. Esto se reafirma en otros ensayos que mostraron efectos significativos en la aplicación de la misma bacteria, ensayos como el de Han y Lee (2005) al utilizar un Inceptisol como sustrato con 1.8 % de materia orgánica, obtuvieron resultados significativos en el uso de la bacteria. Otro factor importante que pudo verse afectado es la humedad del suelo. Voroney (2006) resalta la importancia de mantener un potencial hídrico adecuado, ya que muchas

comunidades microbianas pueden ver disminuida su actividad. Esto es especialmente importante en las bacterias ya que son inmóviles en el suelo y dependen de procesos de difusión para su nutrición.

La concentración del inoculo utilizado fue de 2×10^7 UFC/mL, esta concentración se encuentra dentro del rango de $1.0 \times 10^7 - 1.5 \times 10^8$ UFC/mL utilizado por Basak y Biswas (2009) utilizando como planta indicadora pasto de sudan. Esto indica que la concentración utilizada en el ensayo debería haber sido suficiente para asegurar el establecimiento de las bacterias en la rizósfera y que la poca eficacia de este se debió a otros factores.

Originalmente la aplicación de Tecnofer respondía a la necesidad de una fuente rica en compuestos orgánicos y demás nutrientes para fomentar la actividad de la bacteria en la rizósfera; sin embargo, a pesar que en el ensayo los mejores resultados fueron obtenidos con la presencia del Tecnofer (Tec y BmTec) no hubo diferencias significativas entre ambos tratamientos lo que refleja que el éste tuvo un efecto positivo en la planta (principalmente asociado a su alto contenido nutricional) sin fomentar la actividad solubilizadora de la bacteria en el sustrato.

V. CONCLUSIONES

- El medio de Aleksandrov modificado se muestra como un medio adecuado para el desarrollo de colonias de *Bacillus mucilaginosus*.
- La cepa de *B. mucilaginosus* demostró capacidad solubilizadora en condiciones de laboratorio disminuyendo el pH y aumentando la acidez titulable del medio.
- La inoculación de *B. mucilaginosus* no incrementó la biomasa en frijol Castilla, ni la extracción de potasio por parte del mismo.
- El Tecnofer-L no fomenta la actividad solubilizadora de *B. mucilaginosus* en la rizósfera de la planta; sin embargo, su aplicación incrementa la biomasa en frijol castilla y la extracción de potasio por parte del mismo.
- A pesar de los resultados que se presentaron en laboratorio, en el bioensayo la eficiencia de solubilización de potasio fue muy baja.
- La capacidad solubilizadora de *B. mucilaginosus* y su aporte en la provisión de potasio depende de la existencia de factores fisicoquímicos adecuados dentro del suelo.

VI. RECOMENDACIONES

- Para futuros trabajos se recomienda trabajar con sustratos adecuados para el desarrollo de microorganismos.
- Se recomienda utilizar como fuente de carbono para los microorganismos compuestos más simples como azúcares para que su aprovechamiento sea más fácil por los microorganismos.
- Se recomienda trabajar con microorganismos nativos del suelo ya que estos están acostumbrados a las características ambientales.
- Se recomienda utilizar el medio de Aleksandrov modificado ya que demostró un buen desarrollo de colonias.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abd-Alla, M.H., Omar, S.A. (2001). Survival of rhizobia/bradyrhizobia and rock-phosphate-solubilizing fungus *Aspergillus niger* on various carriers from some agroindustrial wastes and their effects on nodulation and growth of faba bean and soybean. *Journal of Plant Nutrition* 24. pp: 261–272.
- Abou-el-Seouda, I.I., Abdel-Megeed, A. (2012). Impact of rock materials and biofertilizations on P and K availability for maize (*Zea mays*) under calcareous soil conditions. *Saudi Journal of Biological Sciences* 19. pp: 55–63.
- Aleksandrov, V.G., Blagodyr, R.N., Ilev, I.P. (1967). Liberation of phosphoric acid from apatite by silicate bacteria. *Microchemical Journal* 29. pp: 111–114.
- Alves, L., Oliveira, V.L., Filho, G.N.S. (2010). Utilization of rocks and ectomycorrhizal fungi to promote growth of eucalypt. *Brazilian Journal of Microbiology* 41. pp: 76–84.
- Antoun, H., Prévost, D. (2005). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. En: Siddiqui, Z.A. (Ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, Springer. pp: 1–38.
- Archana, D.S. Nandish, M.S. Savalagi, V.P. Alagawadi, A.R. (2012). Screening of potassium solubilizing bacteria (KSB) for plant growth promotional activity. *Bioinfolet* 9 (4). pp: 627–630.
- Archana, D.S. Nandish, M.S. Savalagi, V.P. Alagawadi, A.R. (2013). Characterization of potassium solubilizing bacteria (KSB) from rhizosphere soil. *Bioinfolet* 10. pp: 248–257.
- Argelis, D.T. Gonzala, D.A. Vizcaino, C. Gania, M.T. (1993). Biochemical mechanism of stone alteration carried out by filamentous fungi living in monuments. *Biogeochemistry* 19: 29-147.

- Badr, M.A., Shafei, A.M., Sharaf El-Deen, S.H. (2006). The dissolution of K and P- bearing minerals by silicate dissolving bacteria and their effect on sorghum growth. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 2(1). 5-11.
- Basak, B.B., Biswas, D.R.(2009). Influence of potassium solubilizing microorganism (*Bacillus mucilaginosus*) and waste mica on potassium uptake dynamics by Sudan grass (*Sorghum vulgare* Pers.) grown under two Alfisols. *Plant and Soil* 317.pp: 235–255.
- Bhattacharyya, P.N. Jha, D.K.(2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28.pp: 1327–1350.
- Bidwell, R.G.S. (1993). Fisiología Vegetal. AGT Editors, S.A. México DF.Mexico.
- Brady, N. Weil, R. (1999). The Nature and Properties of Soils. 12th Edition. Prentice Hall, Inc. New Jersey.USA.
- Cerezine, P; Nahas, E; Banzatto, D. (1988). Soluble phosphate accumulation by *Aspergillus niger* from fluoroapatite. *Applied Microbiology and Biotechnology* 29, pp:501-505.
- Croal, L.R. Gralnick, J.A. Malasarn, D.Newman, D.K.(2004).The genetics of geochemistry. *Annual Review of Genetics* 38.pp: 175–202.
- Clark, R.B., Zeto, S.K. (1996). Growth and root colonization of mycorrhizal maize grown on acid and alkaline soil. *Soil Biology and Biochemistry* 28.pp:1505-1511.
- Clark, R.B., Zobel, K.W., Zeto, S.K. (1999). Effects of mycorrhizal fungus isolate on mineral acquisition by *Panicum virgatum* in acidic soil. *Mycorrhiza* 9.pp:167-176.
- Clark, R.B., Zeto, S.K. (2010). Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *Journal of Plant Nutrition* 23.pp:867-902.
- Demoling, F. Figueroa, D. Baath, E.(2007). Comparison of factors limiting bacterial growth indifferent soils. *Soil Biology and Biochemistry* 39, Elsevier, pp. 2485 – 2495.
- Diep, C.N. Hieu, T.N. (2013). Phosphate and potassium solubilizing bacteria from weathered materials of denatured rock mountain, Ha Tien, Kiên Giang province Vietnam. *American Journal of Life Sciences. vol. 1(3).pp: 88-92.*

- Gottschalk, G. (1986). *Bacterial Metabolism*. Springer. New York, United States.
- Gray, E. J. Smith, D. L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry* 37,pp: 395-412.
- Groudev, S.N. (1987). Use of heterotrophic microorganisms in mineral biotechnology. *Biotechnologia Acta* 7. pp: 299–306.
- Gundala, P.B. Chinthala, P. Sreenivasulu, B. (2013). A new facultative alkaliphilic, potassium solubilizing, *Bacillus* Sp. SVUNM9 isolated from mica cores of Nellore District, Andhra Pradesh, India. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2 (1).pp: 1–7.
- Fierer, N., and Jackson, R.B. (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103.pp: 626–631.
- Figueiredo, M.V.B., Seldin, L., Araujo, F.F., Mariano, R.L.R. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications. En: Maheshwari, D.K. (Ed.), *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. pp. 21–42.
- French, E., Hebert, T. (1980). Métodos de investigación fitopatológica. San José, Costa Rica.
- Hamdali, H., Bouizgarne, B., Hafidi, M., Lebrihi, A., Virolle, M., Ouhdouch, Y. (2007). Screening for rock phosphate solubilizing actinomycetes from Moroccan phosphate mines. *Applied Soil Ecology* 38.pp: I2-I9.
- Han y Lee Han, H.S., Lee, K.D. 2005. Phosphate and potassium solubilizing bacteria effect on mineral uptake, soil availability and growth of eggplant. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 1(2): 176-180.
- Hernández, M.E., Kappler, A., Newman, D.K. (2004). Phenazines and other redox-active antibiotics promote microbial mineral reduction. *Applied and Environmental Microbiology* 70(2).pp: 921–928.

- Hu, X., Chen, J., Guo, J. (2006). Two phosphate and potassium solubilizing bacteria isolated from the Tianmu Mountain, Zhejiang, China. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 22.pp: 983–990.
- Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). (2015). Perú. Anuario de Estadísticas Ambientales 2015. Lima-Perú. Oficina de impresiones INEI. Pag 56. http://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1140/Libro.pdf (Revisado 07/10/16).
- InvestmentMine.(2016). Potash Prices and Potash Price Charts- InvestmentMine. Infomine.com.<http://www.infomine.com/investment/metalprices/potash/>.(Revisado 17/10/16).
- Kloepper, J.W. (2003). A review of mechanisms for plant growth promotion by PGPR In: Reddy, M.S., Anandaraj, M., Eapen, S.J.,Sarma, Y.R., Kloepper, J.W. (Eds.), Abstracts and Short Papers. 6th International PGPR Workshop, 5–10. *Indian Institute of Spices Research*. pp: 81–92.
- Kumar, V., Narula, N. (1999). Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococum* mutants. *Biology and Fertility of Soils* 28.pp:301-305.
- Lian, B. Fu, P.Q. Mo, D.M. Liu, C.Q. (2002).A comprehensive review of the mechanism of potassium release by silicate bacteria. *Acta Mineral Sinica* 22. pp: 179.
- Liu, D. Lian, B. Dong, H. (2012). Isolation of *Paenibacillus* spp. and assessment of its potential for enhancing mineral weathering. *Geomicrobiology Journal* 29(5).pp:41-421.
- Mclean E.O., Watson M.E. (1985). Soil measurement of plant-available potassium. In: Mundson RDE, editor. Potassium in agriculture. *The American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America*. pp:277–308.
- McMahon, P.B., Chapelle, F.H. (1991). Microbial production of organic acids in aquitard sediments and its role in aquifer geochemistry. *Nature (London)* 349.pp: 233-235.

- McMahon, P.B., Chapelle, F.H., Falls, W.F., Bradley, P.M. (1992). Role of microbial processes in linking sandstone diagenesis with organic-rich clays. *Journal of Sedimentary Petrology* 62.pp: 1-10.
- Meenaa, V.S., Mauryaa, B.R., Vermab, J.P. (2014). Does a rhizospheric microorganism enhance K⁺ availability in agricultural soils?. *Microbiological Research* 171.pp: 337-347.
- Mikhailouskaya, N., Tcherhysh, A. (2005). K-mobilizing bacteria and their effect on wheat yield. *Latvian Journal of Agronomy* 8. pp:154–7.
- Murphy, E.M., Schramke, J.A., Frederickson, J.K., Beldsoe, H.W., Francis, A.J., Sklarew, D.S., Linehan, J.C. (1992). The influence of microbial activity and sedimentary organic carbon on the isotope geochemistry of the Middendorf aquifer. *Water Resource Research* 28.pp: 723-740.
- Newman, D.K. (2001). How bacteria respire minerals. *Science* 292.pp: 1312–1313.
- Parmar, P., Sindhu, S. (2013). Potassium solubilization by rhizosphere bacteria: Influence of nutritional and environmental conditions. *Journal of Microbiology Research* 3(1).pp: 25-31.
- Patel D.K., Murawala P., Archana G., Naresh Kumar G. F. (2011). Repression of mineral phosphate solubilizing phenotype in the presence of weak organic acids in plant growth promoting fluorescent pseudomonads. *Bioresource Technology* 102(3).pp: 305-306.
- Petterson, M. (2004). Factors Affecting Rates of Change in Soil Bacterial Communities
Marie Pettersson, Högbovägen 1F, 227 31 Lund, Sweden.
- Pradhan, N., Sukla, L. (2005). Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *African Journal of Biotechnology* 5(10).pp:850-854.
- Prajapati, K., Sharma M.C., Modi H.A. (2012). Isolation of two potassium solubilizing fungi from ceramic industry soils. *Life Sciences Leaflets* 5.pp:71-75.

- Prajapati, K., Sharma M.C., Modi H.A. (2013). Growth promoting effect of potassium solubilizing microorganisms on okra (*Abelmoschus esculentus*). *International Journal of Agricultural Science and Research* 3(1).pp: 118-128.
- R Core Team. (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Rosa-Magri, M.M. Avansini, S.H. Lopes-Assad, M.L.Tauk-Tornisielo, S.M. Ceccato-Antonini, S.R.(2012).Release of potassium from rock powder by the yeast *Torulaspota globosa*.*Brazilian Archives of Biology and Technology* 55 .pp:577–582.
- Sanchez, E., Soto, J.M., Ruiz, J.M. Romero, L. (2006). Biomasa, actividad enzimática y compuestos nitrogenados en plantas de frijol ejotero bajo diferentes dosis de potasio. *Agricultura Técnica en México* 32(1).pp: 27-37.
- Sangeeth, K.P. Bhai, R.S. Srinivasan, V. (2012). *Paenibacillus glucanolyticus*, a promising potassium solubilizing bacterium isolated from black pepper (*Piper nigrum* L.) rhizosphere. *Journal of Spices and Aromatic Crops* 21 (2). pp: 118–124.
- Serrano, J. Marques da Silva , S. Shahidian, S.2014. Spatial and temporal patterns of potassium on grazed permanent pastures—Management challenges. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. Vol. 188,pp: 29–39.
- Sheng, X.F. He, L.Y. Huang, W.Y. (2002). The conditions of releasing potassium by a silicate-dissolving bacterial strain NBT. *Agricultural Sciences in China* 1,pp: 662–666.
- Sheng, X.F. (2005). Growth promotion and increased potassium uptake of cotton and rape by a potassium releasing strain of *Bacillus edaphicus*. *Soil Biology and Biochemistry* 37.pp: 1918–1922.
- Sheng, X.F., He, L.Y. (2006). Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild-type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat. *Canadian Journal of Microbiology* 52(1).pp: 66-72.

- Singh, G., Biswas, D.R., Marwah, T.S. (2010). Mobilization of potassium from waste mica by plant growth promoting rhizobacteria and its assimilation by maize (*Zea mays*) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Plant Nutrition* 33.pp:1236–51.
- Singh, B., Goulding K.W.T. (1997). Changes with time in the potassium content and phyllosilicates in the soil of the Broadbalk continuous wheat experiment at Rothamsted. *European Journal of Soil Science* 48.pp:651–9.
- Somers, E., Vanderleyden, J., Srinivasan, M. (2004). Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Critical Reviews in Microbiology*. 30.pp:205–240.
- Sugumaram, P., Janarthnam, B. (2007). Solubilization of potassium containing minerals by bacteria and their effect on plant growth. *World Journal of Agricultural Sciences* 3(3).pp: 350-355.
- Tempest, D.W., Neijssel, O.M. (1992). Physiological and energetic aspects of bacterial metabolite overproduction. *FEMS Microbiology Letters* 100.pp: 169-176.
- Thurman, E.M. (1985). Organic Chemistry of Natural Waters. Martinus Nijhoff/D.W. Junk, Dordrecht.pp:497.
- Ullman, W.J., Kirchman D.L., Welch, S.A., Vandevivere, P. (1996). Laboratory evidence for microbially mediated silicate mineral dissolution in nature. *Chemical Geology* 132.pp: 11–17.
- Uroz, S. Calvaruso, C. Turpault, M.P. Pierrat, J.C. Mustin, C. Frey-Klett, P. (2007). Effect of the mycorrhizosphere on the genotypic and metabolic diversity of the bacterial communities involved in mineral weathering in a forest soil. *Applied and Environmental Microbiology* 73. pp:3019–3027.
- Urbano, T.P. (2003). Tratado de Fitotecnia General.Mundi- Prensa Libros. Bilbao,España.
- Voroney, R.P. (2006). The Soil Habitat in Soil Microbiology. Ecology and Biochemistry, 38,pp: 720-728.
- Walker, T.S., Bais, H.P., Grotewold, E., Vivanco, J.M., (2003). Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiology* 132.pp: 44–51.

- Watteau, F., Berthelin, J. (1994). Microbial dissolution of iron and aluminum from soil minerals: efficiency and specificity of hydroxamate siderophores compared to aliphatic acids. *European Journal of Soil Biology* 30.pp: 1–9.
- Welch, S.A., Taunton, A.E., Banfield J.F. (2002). Effect of microorganisms and microbial metabolites on apatite dissolution. *Geomicrobiology Journal* 19.pp:343–367.
- White, P.J., Karley, A.J. (2010). Cell biology of metals and nutrients. *Plant cell monographs* (17). Berlin: Springer. pp:199–224.
- Wu, S.C., Cao, Z.H., Li, Z.G., Cheung, K.C., Wong, M.H. (2005). Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma* 125.pp:155–166.
- Zarjani , J.K. Aliasgharzad, N. Oustan, S. Emadi, M. Ahmadi, A.(2013).Isolation and characterization of potassium solubilizing bacteria in some Iranian soils.*Archives of Agronomy and Soil Science* 77. pp:7569.
- Zeng, X., Zhou, H., Hu, Y., Tang, J., Liu, X., Liu, F., Hu, P. (2012). The silicon dissolution of kaolinite and illite by extracellular polysaccharide and organic acid from *Bacillus mucilaginosus* Lv₁₋₂. *Advanced Science Letters* 5.pp: 543-546.
- Zhang, C., Kong, F., (2014). Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from tobacco rhizospheric soil and their effect on tobacco plants. *Applied Soil Ecology* 82.pp:18-25.
- Zhang, A. Zhao, G. Gao, T. Wang, W. Li, J. Zhang, S. (2013). Solubilization of insoluble potassium and phosphate by *Paenibacillus kribensis* CX-7: a soil microorganism with biological control potential. *African Journal of Microbiology Research*, 7 (1). pp: 41–47.
- Zhao, X., Lin, Q., Li, B. (2002). The solubilization of four insoluble phosphates by some microorganisms. *Acta Microbiologica Sinica* 42(2): 236–241.
- Zörb, C., Senbayram, M., Peiter, E. (2014). Potassium in agriculture – Status and perspectives. *Journal of Plant Physiology* 171.pp: 656-666.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1: ANVA de logaritmo de la población bacteriana

Fuente de V:	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	Significación
Medio		1 0.136213	0.13621	18.0547	0.0008096 ***
Muestra		2 0.002786	0.00139	0.1846	0.8333919
Residuales		14 0.105622	0.00754		

ANEXO 2: ANVA de extracción de K/maceta en la biomasa aérea en frijol

Fuente de V:	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	Significación
Tratamientos	3	105813	35271	33.5	7.52e-10 ***
enmienda	1	185	185	0.176	0.67757
Tratamientos:enmienda	3	14812	4937	4.689	0.00818 **
Residuales	31	32639	1053		

ANEXO 3: ANVA de extracción de N/maceta en la biomasa aérea en frijol

Fuente de V:	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	Significación
Tratamientos	3	20936	6979	2.912	0.0499 *
enmienda	1	14	14	0.006	0.9395
Tratamientos:enmienda	3	82804	27601	11.519	3.08e-05 ***
Residuales	31	74283	2396		

ANEXO 4: ANVA de extracción de P/maceta en la biomasa aérea en frijol

Fuente de V:	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	Significación
Tratamientos	3	566.4	188.8	3.034	0.043874 *
enmienda	1	1232.2	1232.2	19.804	0.000103 ***
Tratamientos:enmienda	3	568	189.3	3.043	0.043470 *
Residuales	31	1317.8	42.5		

ANEXO 5: ANVA de extracción de K/maceta en la biomasa de vainas en frijol

Fuente de V:	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	Significación
Tratamientos	3	67394	22465	8.801	0.000212 ***
enmienda	1	1263	1263	0.495	0.486891
Tratamientos:enmienda	3	10427	3476	1.362	0.272141
Residuales	32	81684	2553		

ANEXO 6: ANVA de extracción de N/maceta en la biomasa de vainas en frijol

Fuente de V:	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	Significación
Tratamientos	3	305160	101720	6.259	0.00182 **
enmienda	1	63593	63593	3.913	0.05659 .
Tratamientos:enmienda	3	87375	29125	1.792	0.16853
Residuales	32	520093	16253		

ANEXO 7: ANVA de extracción de P/maceta en la biomasa de vainas en frijol

Fuente de V:	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	Significación
Tratamientos	3	243	81	1.084	0.369794
enmienda	1	89.3	89.3	1.194	0.282585
Tratamientos:enmienda	3	1690.3	563.4	7.54	0.000595 ***
Residuales	32	2391.1	74.7		

ANEXO 8: ANVA de materia seca de la biomasa aérea en frijol

Fuente de V:	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	Significación
Tratamientos	3	79.89	26.628	15.487	2.46e-06 ***
enmienda	1	6.68	6.682	3.886	0.0577 .
Tratamientos:enmienda	3	12.52	4.174	2.427	0.0842 .
Residuales	31	53.3	1.719		

ANEXO 9: ANVA de materia seca de la biomasa de vainas en frijol

Fuente de V:	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	Significación
Tratamientos	3	23.69	7.897	4.615	0.00857 **
enmienda	1	2.3	2.299	1.344	0.25496
Tratamientos:enmienda	3	9.15	3.05	1.782	0.17035
Residuales	32	54.76	1.711		

ANEXO 10: ANVA de materia seca de la biomasa total en frijol

Fuente de V:	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	Significación
Tratamientos	3	113.11	37.7	12.019	2.19e-05 ***
enmienda	1	19.54	19.54	6.23	0.0181 *
Tratamientos:enmienda	3	30.81	10.27	3.274	0.0341 *
Residuales	31	97.25	3.14		

ANEXO 11: ANVA de numero de vainas llenas en frijol

Fuente de V:	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	Significación
Tratamientos	3	90.04	30.012	19.403	2.86e-07 ***
enmienda	1	3.3	3.303	2.135	0.154
Tratamientos:enmienda	3	10.15	3.382	2.187	0.109
Residuales	31	47.95	1.547		

ANEXO 12: ANVA de numero de vainas vanas en frijol

Fuente de V:	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	Significación
Tratamientos	3	22.27	7.425	7.157	0.000826 ***
enmienda	1	5.62	5.625	5.422	0.026366 *
Tratamientos:enmienda	3	6.67	2.225	2.145	0.113998
Residuales	32	33.2	1.038		

FOTOS

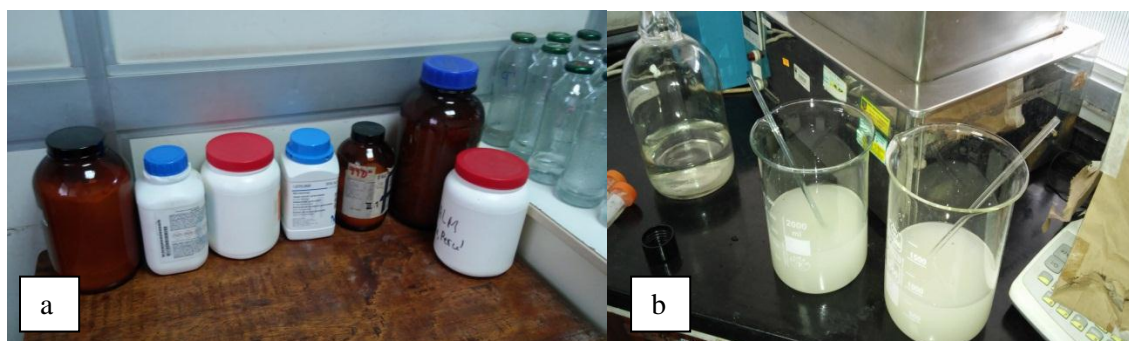


Foto 1: a) Insumos para los medios de cultivo; b) Preparación de los medio de cultivo

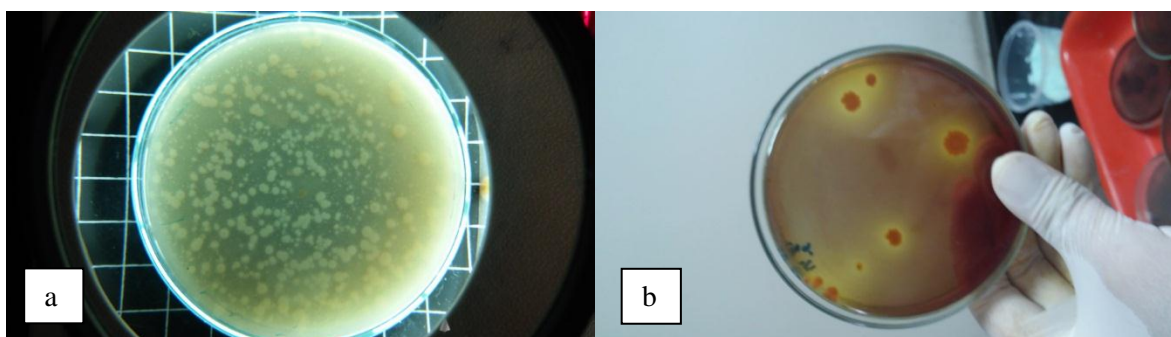


Foto 2: a) Conteo de colonias en medio solido; b) Visualización del halo de solubilización de las colonias solubilizadoras.



Foto 3: a) Botellas con medio líquido; b) Medios de cultivo a punto de ser esterilizados en el autoclave.

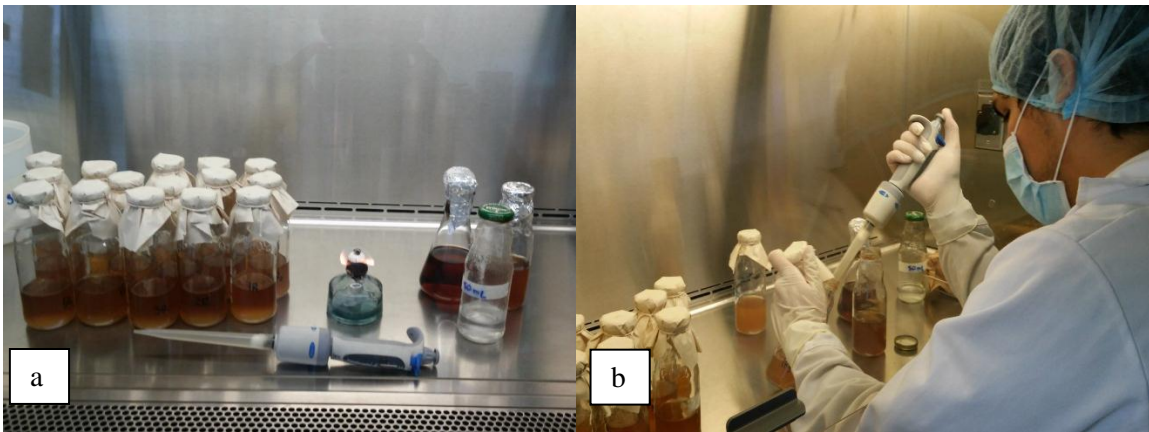


Foto 4: a) Medios listos para la inoculación; b) Proceso de inoculación

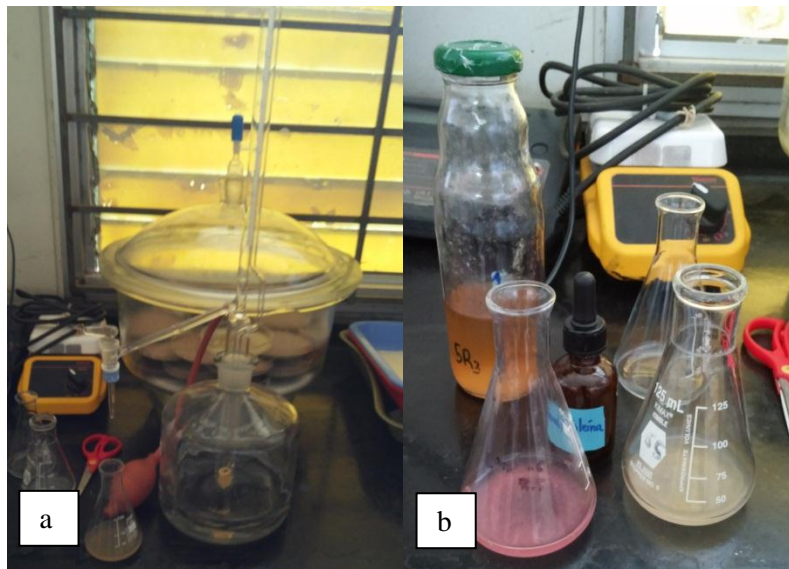


Foto 5: a) Titulación del medio de cultivo; b) Diferencia de color por el indicador



Foto 6: a) Aplicación del feldespato potásico; b) Aplicación del Tecnofer



Foto 7: Inicio de la emergencia de las plántulas de frijol



Foto 8: Emergencia de primeras plántulas de frijol



Foto 9: Inoculación de *B.muciliginosus* a las plantulas de frijol.



Foto 10: Plantas de frijol a 21 días de la siembra



Foto 11: Plantas de frijol a 5 semanas de la siembra



Foto 12: Inicio de la floración a 8 semanas de la siembra



Foto 13: a) Vainas en crecimiento en planta; b) Comparación de vaina llena y vaina vana



Foto 14: Comparativo final antes de la cosecha.