



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Aislamiento de bacterias solubilizadoras de
fosfato, del suelo cultivado con papa
(*Solanum tuberosum* L.)**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGA**

PRESENTA:

Katia Alejandra Aguilar Rivera

Director: Dr. Gustavo Yáñez Ocampo

Codirector: Dr. Pedro Del Águila Juárez

Toluca, Edo. Mex. Septiembre, 2020

RESUMEN

El fósforo es el segundo nutriente necesario para el desarrollo de las plantas, y de los microorganismos que habitan la rizósfera. En un modelo agrícola convencional, la mayoría de los cultivos requieren cerca de 10 a 30 kg de fósforo por hectárea que se suministran en forma de fertilizantes sintéticos, los cuales debido a sus formas no disponibles tienden a acumularse y modificar las condiciones fisicoquímicas del suelo por la inmovilización química del elemento fierro, aluminio y calcio principalmente, si bien se incrementa el rendimiento de las cosechas, no se consideran los impactos negativos que se producen, como la eutrofización de cuerpos de agua, disminución de las principales reservas de nutrientes, inmovilización de nutrientes en el suelo con los consecuentes desbalances en cultivos, aumento de los costos de producción, entre otros. Atendiendo a esta problemática surge un concepto de agricultura sustentable a través de la generación de biofertilizantes, a partir del estudio, entendimiento y aplicación de microorganismos que actúan como promotores del crecimiento vegetal o que presentan rasgos que favorecen la disponibilidad de micro y macro elementos. El presente trabajo se orientó en el aislamiento de bacterias solubilizadoras de fósforo a partir de suelo cultivado con papa (*Solanum tuberosum* L.) en el Estado de México. Se llevó a cabo la caracterización fisicoquímica del suelo de las zonas muestreadas, se aislaron y contabilizaron la Bacterias Heterótrofas totales, y se seleccionaron bacterias efectivas para la solubilización de fosfato mediante la siembra en medio Pikovskaya sólido, obteniendo un total de 5 cepas de las que se determinó el diámetro de halo de solubilización, siendo la cepa A3 la que presento un mayor diámetro con 19mm aproximadamente. Al confirmar la capacidad solubilizadora de las cepas aisladas se puede esperar sean de uso potencial para la formulación de un bioinoculante efectivo para el cultivo de la papa.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	5
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1 Suelo	7
2.2 Rizósfera.....	8
2.3 El cultivo de papa.....	9
2.3.1 Requerimientos del cultivo de papa.....	10
2.3.2 Fertilización.....	11
2.4 Importancia del fósforo.....	12
2.5 Fósforo en el suelo	13
2.6 Organismos solubilizadores de fósforo	15
2.6.1 Aislamiento de microorganismos solubilizadores.....	17
2.7 Mecanismos de solubilización del fósforo.....	18
2.7.1 Solubilización de fósforo mediante ácidos orgánicos	19
2.8 Uso de microorganismos en la agricultura: biofertilización	21
3.JUSTIFICACIÓN	23
4. OBJETIVOS	24
5. HIPÓTESIS	24
6. MATERIALES Y MÉTODOS	25
6.1 Trabajo de campo.....	25
6.2 Trabajo experimental.....	27
6.2.2 Análisis microbiológico	28
6.2.3 Ensayo de actividad solubilizadora de fosfato	31
6.2.4 Medición de halos de solubilización	32
6.2.5 Caracterización microscópica de las cepas	33
6.2.6 Análisis de datos.....	33
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
7.1 Características fisicoquímicas del suelo de los sitios Raíces y Loma alta.	34
7.2 Densidad poblacional de Bacterias heterótrofas totales.....	36
7.3 Actividad solubilizadora de fosfato	38
7.4 Caracterización microscópica de las colonias aisladas	43
8. CONCLUSIONES	45

9. REFERENCIAS	46
10. ANEXOS	53

Índice de figuras y tablas

Figura 1. Etapas fenológicas del cultivo de papa.....	11
Figura 2. Relaciones entre el ciclo del fósforo y los compartimentos orgánicos y minerales.....	15
Figura 3. Representación esquemática de la movilización del fosforo del suelo por microorganismos.....	17
Figura 4. Halos de solubilización, siembra en medio PKV.....	19
Figura 5. Representación geográfica del sitio de muestreo.....	26
Figura 6. Esquema del muestreo en campo.....	27
Figura 7. Toma de muestra de la rizósfera del suelo.....	28
Figura 8. Siembra por estría de una cepa seleccionada.....	31
Figura 9. Caja Petri con inóculos de la cepa A5.....	33
Figura 10. Procesamiento de las imágenes en el programa image J.....	34
Figura 11. Formas químicas de Fósforo en función del pH.....	37
Figura 12. Densidad poblacional de Bacterias heterótrofas totales.....	38
Figura 13. Fotografía de la cepa A2.....	40
Figura 14. Diámetros de halos de solubilización.....	42
Figura 15. Tinción Gram.....	45
Tabla 1. Formas de fósforo orgánico e inorgánico presentes en el suelo.....	13
Tabla 2. Ácidos orgánicos más comunes producidos por microorganismos.....	22
Tabla 3. Composición de medio PY sólido.....	30
Tabla 4. Composición del medio Pikovskaya.....	32
Tabla 5. Caracterización fisicoquímica de los sitios muestreados.....	35
Tabla 6. Promedio de halos de solubilización.....	41
Tabla 7. Antecedentes del aislamiento de microorganismos solubilizadores.....	43
Tabla 8. Caracterización microscópica.....	44

1. INTRODUCCIÓN

Gracias a la diversidad de climas, en México se cultiva una gran variedad de especies vegetales de interés alimenticio. Dentro de las más importantes se encuentra el cultivo de papa, un alimento básico e indispensable en la dieta debido a su valor nutritivo. A nivel mundial se siembran más de 18 millones de hectáreas ocupando así el cuarto lugar de importancia para la alimentación humana (Sagarpa, 2010).

En un cultivo la absorción de nutrientes varía según la fase de desarrollo, durante el crecimiento de la planta la demanda de macronutrientes es alta, estos deben encontrarse disponibles y en cantidades suficientes para ser absorbidos y que su crecimiento no se vea limitado (Hannane, 2008).

Además del Potasio y Nitrógeno, el Fósforo es uno de los elementos de suma importancia en el crecimiento vegetal, se encuentra constituyendo fosfolípidos de la membrana celular, así como del material genético. Este elemento presenta baja disponibilidad en los suelos ácidos debido a su restringida movilidad de tal forma que la planta lo absorbe de su entorno en mínimas cantidades (Ramírez et al; 2014).

Debido a esto, los agricultores recurren al uso de fertilizantes químicos que suplen las necesidades nutricionales de la planta y promueven su crecimiento, sin embargo, estos agroquímicos se acumulan en forma de sales y no permiten el intercambio catiónico deteriorando la calidad del suelo y disminuyendo la producción agrícola (Pandya et al., 2007).

Con el fin de contrarrestar esta problemática, se han propuesto alternativas biotecnológicas que reemplacen los productos químicos, una de ellas son los bioinoculantes, estos se basan en el metabolismo de microorganismos como las bacterias solubilizadoras de fosfato, que actúan como mediadoras al liberar el ion fosfato soluble para la planta, a través de la acidificación del medio o la producción de fosfatasas, y de esta forma facilitar su absorción y mejorar el rendimiento y contenido de fósforo en los cultivos (Corrales, 2014).

Se han aislado de distintos hábitats organismos solubilizadores de fosfato pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium* y *Erwinia* los cuales se han empleado para la formulación de estos bioinoculantes, que permiten la producción sostenible (Fernandez *et al.*, 2005).

Por lo mencionado anteriormente, en el presente trabajo se buscó aislar microorganismos nativos a partir de muestras de suelo de cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) de la localidad Raíces perteneciente al municipio de Zinacantepec, Edo, México, con la finalidad de medir sus densidades poblacionales, aislar y demostrar su actividad solubilizadora.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Suelo

La definición de suelo va a depender del área de interés en que se involucre, según la Sociedad Americana de la Ciencia del Suelo (SSSA, por sus siglas en inglés), este se define como la capa superficial de material mineral y orgánico no consolidado que sirve de medio natural para el crecimiento de organismos, y se encuentra sujeto a factores que definen sus propiedades físicas, químicas, biológicas.

Desde el punto de vista agrícola, el suelo es la capa de material fértil que recubre la corteza terrestre, aprovechada por las raíces de las plantas para obtener sostén, nutrimentos y agua, es un complejo sistema en el que interactúan tres fases bien definidas: la fase sólida, que comprende la porción orgánica e inorgánica (minerales) la fase líquida y la fase gaseosa (Nogales, 2005).

Juega un papel fundamental en los procesos ecosistémicos, debido a las funciones y servicios que brinda tales como la regulación y la distribución del flujo de agua o como amortiguador de los efectos de diversos contaminantes (Semarnat, 2013).

En el suelo, específicamente en la rizósfera, comunidades de organismos interactúan entre sí generando una actividad biológica junto con la flora, fauna, nutrientes y minerales, lo que permite el desarrollo vegetal ya que proporciona elementos como el potasio, calcio, magnesio, nitrógeno, y fósforo (Corrales, 2014). Según Cortázar *et al.*, (2012), la biomasa microbiana refleja la salud de un suelo y su respuesta al cambio ambiental, incluso mejor que parámetros fisicoquímicos; debido a esto el uso de suelo puede afectar directa o indirectamente la estructura de la microbiota edáfica (Van Bruggen *et al.*, 2006; Pedraza *et al.*, 2010).

Como cualquier otro sistema, el suelo puede sufrir perturbaciones que alteren su estructura, ya sea de origen natural o provocado por el hombre como la

contaminación y el uso de agentes químicos. Tratándose de una fuente natural no renovable a corto plazo su conservación es vital para el desarrollo sostenible de actividades como la agricultura y el resguardo de otros recursos (Hidalgo, 2013).

2.2 Rizósfera

Las raíces vegetales crecen continuamente durante el ciclo de los cultivos, no obstante, su proliferación depende de la disponibilidad de agua y minerales en el microentorno que las rodea, conocido como rizósfera (Taiz y Zeiger, 2006; Gonzáles 2017). En comparación con la mayor parte del suelo, en la rizósfera, la biomasa microbiana y la actividad enzimática se presentan en un orden de magnitud mayor aproximadamente entre 10 y 1000 veces superior al suelo no rizosférico, esto se da como resultado de la exudación de compuestos por la raíz, los cuales se ha estimado contienen entre 10% y 40 % del carbono asimilado, así como otra serie de elementos los cuales favorecen el incremento de las densidades poblacionales (Calvo *et al.*, 2008) y a su vez la transformación de productos orgánicos en la zona (Wu, 2014). Los microorganismos presentes en la rizósfera participan en el ciclaje de elementos como carbono, nitrógeno, azufre y fósforo (Shivlata y Satyanarayana, 2017), tanto en los sistemas naturales, como en los agrícolas y forestales (Berg y Smalla, 2009).

Se ha demostrado, que en los sistemas agrícolas se observa una disminución en la diversidad biológica de la zona rizosférica debido al uso de insumos sintéticos como fertilizantes fosforados (Reyes y Valery, 2007). Ejemplo de ello es el cultivo de papa, el cual consume altas cantidades de fertilizantes compuestos por unidad de superficie, con dosis que van de los 1000 a 2000 kg ha⁻¹ siendo las más predominantes las fuentes altas en P (Calvo *et al.*, 2008).

2.3 El cultivo de papa

La papa (*Solanum tuberosum*) es el cuarto alimento de mayor consumo a nivel mundial, después del maíz, trigo y arroz, con gran importancia en la dieta humana por su alto valor nutritivo, de acuerdo con Camire *et al.*, (2009), 100 g de papa cocinada contiene 2.50 g de proteínas, 0.13 g de grasas totales, 21.15 g de carbohidratos, 2.2 g de fibra, así como vitaminas A, B y C.

En México la producción de papa cobra importancia debido a que se trata de un cultivo de alto valor agregado, generando una fuente directa o indirecta de empleos para diversas familias del campo (Sagarpa, 2018). En el país las zonas con mejores condiciones edafoclimáticas para la producción de papa se localizan sobre el Sistema Volcánico Transversal, destacando el Estado de México, Puebla y Veracruz (SIAP, 2019), debido a estas condiciones se puede disponer de tubérculos frescos todo el año, tanto para consumo humano como para siembra. En 2016, el Estado de México, contribuyó con un total de 175,325 toneladas de papa, ubicándolo en el cuarto lugar nacional de producción, se han realizado estudios para estimar el potencial de producción, con base en cambios de tecnologías referentes al uso de nuevas variedades, manejo en el campo y fertilización lo cual se estima, incrementaría el rendimiento en un 50 o hasta 70% (Morales, 2011).

Uno de los factores que afecta la producción del tubérculo por ser un cultivo con altos requerimientos es el consumo de productos agroquímicos, como los fungicidas, plaguicidas y fertilizantes (Méndez, 2018), lo cual tiene que ver con las malas prácticas por parte de los productores, que por observar una evidente respuesta en el desarrollo vegetativo del cultivo, aplican dosis mayores de dichos insumos al considerar preferible un exceso de elementos a una deficiencia, generando así un aumento en costos de producción que en muchas ocasiones no es recuperado en la cosecha (Ramírez, 2014).

2.3.1 Requerimientos del cultivo de papa

La papa pertenece a la familia de floríferas de las solanáceas, del género *Solanum* su morfología está constituida por: flor, tallo, hojas, raíces, tubérculo y brote. Esta especie puede ser cultivada en diversos tipos de suelo, por ejemplo, suelos arenosos o con composición arcillosa, con profundidad mayor a 30 centímetros. El pH óptimo para un buen crecimiento, desarrollo y producción de papa fluctúa entre 5.0 y 7.0, es moderadamente tolerante a la salinidad y su requerimiento mínimo de materia orgánica es del 2%, así mismo se requiere que las temperaturas no sean mayores a 25 °C ya que se puede ver afectado el desarrollo del cultivo (FAO, 2008).

El cultivo de papas requiere una gran preparación del suelo, se debe rastrillar el suelo hasta eliminar todas las raíces de la maleza, por lo general arar tres veces , para que el suelo adquiera la condición adecuada: suave, bien drenado y bien ventilado. La papa no se siembra en forma de semilla, si no con “tubérculos semilla” que son pequeños tubérculos o fragmentos de éstos, los cuales se introducen a una profundidad de 5 a 10 centímetros en el suelo, deben estar libres de enfermedades y pesar de 30 a 40 gr. El crecimiento del follaje de la papa tarda alrededor de cuatro semanas, durante esta etapa es necesario combatir la maleza lo que le da ventaja competitiva al cultivo. Se deben formar camellones durante todo el ciclo con la finalidad de que la planta se mantenga vertical e impedir que las plagas lleguen a los tubérculos (FAO, 2008). En la figura1 se pueden observar las etapas del desarrollo del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*).

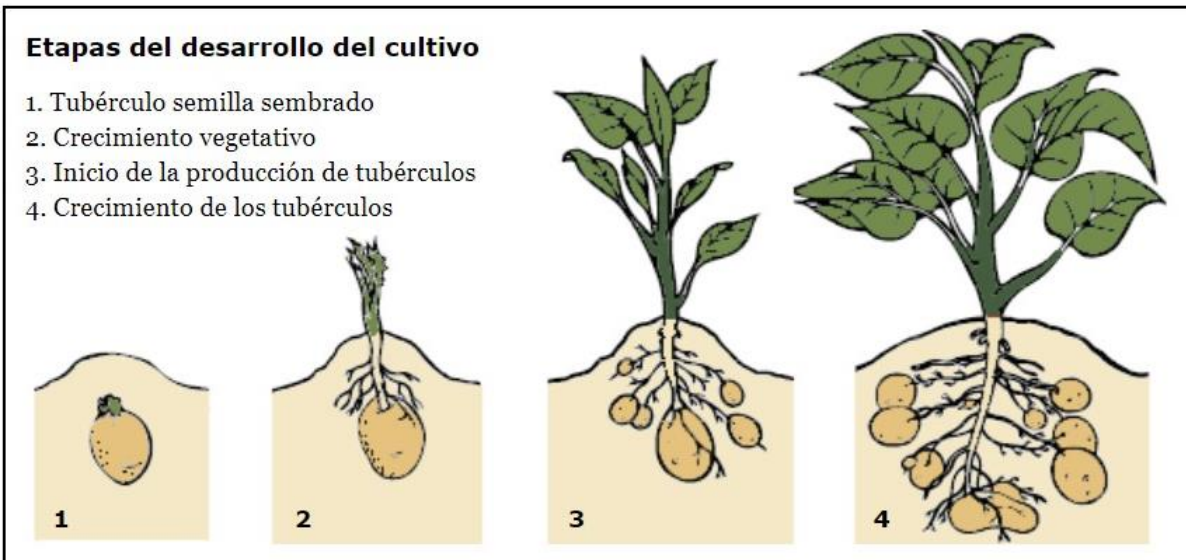


Figura 1. Etapas fenológicas del cultivo de papa (FAO 2008 Año Internacional de la papa).

2.3.2 Fertilización

La fertilización es una práctica fundamental en México pues permite mantener o incrementar el rendimiento y calidad de los tubérculos. La finalidad de llevar a cabo algún tipo de fertilización es suministrar nutrimentos al cultivo, que no son aportados de manera natural por el suelo. El cultivo de papa demanda grandes cantidades de nutrientes a lo largo de su ciclo, generalmente los macronutrientes NPK son aplicados al cultivo cuando las reservas del suelo son limitadas (Ibarra, 2013).

Las condiciones geológicas, topográficas y climáticas del Estado de México propician una gran variedad de suelos representados por 13 grupos edáficos de los establecidos en el mapa mundial de suelos de la FAO-UNESCO. Los suelos Andosol representan el 20.7% del territorio estatal, los andosoles se han formado a partir de ceniza volcánica, se caracterizan por su capacidad de retención de humedad y textura suelta lo que los hace susceptibles a la degradación, siendo la degradación química la que demanda mayor atención ya que es la responsable de la disminución de fertilidad en los suelos.

Se entiende como disminución de fertilidad al decremento neto de nutrimentos y materia orgánica disponible, esto da como resultado de un balance negativo entre las entradas de nutrientes (vía fertilización, conservación de residuos de cosecha) y las salidas (lixiviación y productos de la cosecha) lo que repercute en la productividad del suelo (SEMARNAT, 2013). Otra característica de estos suelos es su capacidad de reaccionar a grandes cantidades de fósforo, teniendo como consecuencia la baja disponibilidad de fósforo proveniente de fertilizantes fosfatados solubles para las plantas, manteniéndose en el suelo únicamente el 10% del fósforo aplicado (Hernández, 2013).

2.4 Importancia del fósforo

Después del nitrógeno, el fósforo (P) es un elemento esencial para el crecimiento y funcionamiento de la planta, se encuentra constituyendo los fosfolípidos de las membranas celulares y del material genético, así mismo está involucrado en procesos como la fotosíntesis, metabolismo celular, glucólisis, síntesis de ácidos grasos y respiración (Ramírez *et al.*, 2014).

Las cantidades de macronutrientes N, P, K requerida por las plantas durante su ciclo de vida es más alta que la de micronutrientes por lo que la absorción es mayor que las reservas contenidas en el suelo donde el fósforo total en raras ocasiones sobrepasa el 0.5%. En suelos agrícolas que contienen disueltos iones Al^{3+} , Fe^{+3} y Mn^{2+} , el anión fosfato suele estar absorbido a las fases sólidas con estos cationes actuando de puentes metálicos (Domenech y Peral, 2003) formando eventualmente fosfatos insolubles siendo los más comunes la variscita ($AlPO_4 \cdot 2H_2O$) y la strengita ($FePO_4 \cdot 2H_2O$), la baja solubilidad de los minerales formados los hace no disponibles para las plantas resultando en una escases frecuente de Fósforo inorgánico (P_i) para la nutrición de las mismas a pesar de que el suelo pueda contener altos niveles de P total (Bashan *et al.*, 2013).

2.5 Fósforo en el suelo

El fósforo es un elemento crítico para la producción agropecuaria, la insuficiencia de sus fuentes naturales, su escasez edáfica y elevada retención, así como su falta de reposición natural y baja movilidad en comparación con otros nutrientes hacen que su disponibilidad sea limitada. La disponibilidad del fósforo es esencial para el crecimiento vegetal ya que constituye más de 0.2% del peso seco de la planta (Banerjee *et al.*, 2010). La distribución de las fuentes de fósforo en los suelos depende de factores como el tipo de suelo, pH, vegetación, actividad microbiana y aplicación de productos sintéticos (Morales *et al.*, 2013), en la siguiente tabla (Tabla1) se resumen las fuentes principales de fósforo presentes en el suelo categorizados como orgánico e inorgánico.

Tabla 1. Formas de fósforo orgánico e inorgánico presentes en el suelo (Beltrán Pineda, 2014).

Fósforo orgánico	Fósforo inorgánico
Materia orgánica (originada por la degradación microbiana de restos animales y vegetales)	Minerales de Ca, Fe, Al originados por mecanismos de precipitación
Fosfatos de Inositol	Sales en solución, sales cristalinas, o sales absorbidas por coloides del suelo
Ésteres de fosfato (fosfolípidos en membranas biológicas)	Enlaces de gran estabilidad con hidróxidos de hierro, aluminio y manganeso
Biomasa de las células microbianas (ARN)	Ortofosfatos $H_2PO_4^{-1}$, HPO_4^{-2}

Los cultivos adquieren el fósforo a partir de la solución del suelo en forma inorgánica en estado soluble como fosfatos mono y dibásicos, siendo necesario un pH de 6,5 para que el ion ortofosfato en el suelo sea aprovechable por las plantas, ya que a ese valor la precipitación de los fosfatos de aluminio y calcio disminuye (Beltrán, 2014).

El ciclo del fósforo en el suelo (Figura 2) involucra procesos en los que a diferencia del ciclo del nitrógeno no hay cambios en la valencia, estos incluyen la toma del elemento por la planta y su retorno a través de residuos vegetales y animales, reacciones de fijación a superficies de arcillas y óxidos y el más importante el recambio biológico dado por procesos de mineralización-inmovilización y solubilización dependientes de la actividad microbiana (Rincón y Aristizábal, 2012).

La mineralización es el mecanismo mediante el cual diversos organismos transforman las fuentes orgánicas de fósforo en Fósforo Inorgánico (Pi) , mediado por la acción enzimática de fitasas, que actúan sobre el ácido fítico o fitatos, para liberar inositol y hasta seis moléculas de fosfatos asimilables, mientras que las fosfatasas degradan compuestos como el DNA, proteínas carbohidratos, etc. mediante una reacción de desfosforilación donde se libera fosfato quedando disponible para ser aprovechado. Por otro lado, la transformación del Pi se da por otro mecanismo conocido como solubilización, relacionado con la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular los cuales liberan protones que solubilizan el fósforo y tienen la capacidad de quelar los iones Ca^{2+} , Fe^{3+} y Al^{3+} (Fankem *et al.*, 2006; Patiño, 2014).

Se ha demostrado que algunos microorganismos son capaces de secretar ácidos orgánicos, lo cual incrementa la solubilidad del P. En este sentido se estudia la capacidad de diversos géneros microbianos que puedan aumentar la disponibilidad del fósforo para la formulación de insumos a partir de uno o varios microorganismos (Sarmiento, 2014), que puedan prometer soluciones a los problemas de deficiencia de componentes en el suelo y a su vez logre un beneficio tanto ambiental como económico para los sistemas agrícolas.

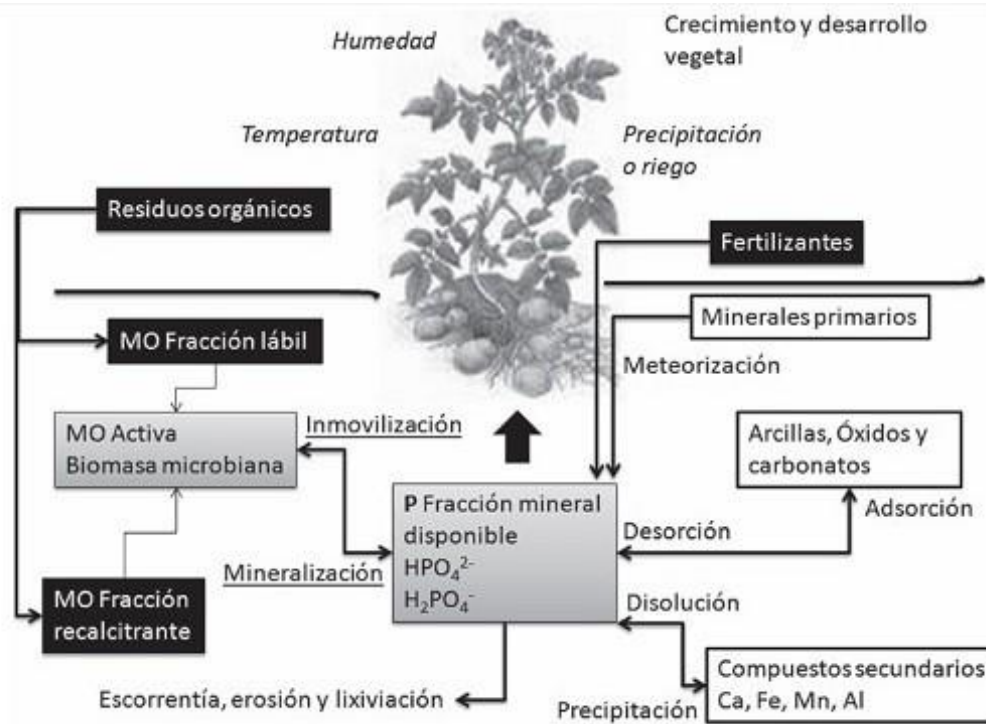


Figura 2. Relaciones entre el ciclo del fósforo y los compartimentos orgánicos y minerales. Los cuadros negros representan las entradas al sistema, los grises las fracciones disponibles, sin color las fracciones minerales y sin recuadro procesos y factores que influyen en la disponibilidad del fósforo. Tomado de Rincón y Aristizábal (2012).

2.6 Organismos solubilizadores de fósforo

Debido a la restringida disponibilidad del fósforo en los suelos, se vuelve necesario el estudio de los microorganismos fosfato-solubilizadores (Jana *et al.*, 2001). Dichos organismos como lo son hongos, bacterias y algunos actinomicetos se consideran promotores del crecimiento, por su alta eficiencia a la hora de proveer los nutrientes necesarios a la planta en sus formas asimilables resultado de una serie de procesos químicos (Pineda, 2014). A diferencia de hongos y actinomicetos, las bacterias han demostrado ser más efectivas en cuanto a procesos de solubilización, siendo también las más predominantes en los suelos, constituyendo del 1% al 50% del total de las poblaciones rizosféricas (Guang-Can *et al.*, 2008), se pueden encontrar formando simbiosis con algunas plantas o en el suelo de vida libre, son capaces de

adaptarse, persistir y colonizar la rizósfera (Beltrán, 2014). Desempeñan un papel importante en la movilización del fósforo, interviniendo en procesos de solubilización y mineralización del elemento (Figura 3), procesos que están influenciados por las propiedades físicas y químicas del suelo como lo son la textura, composición mineral, humedad, pH, etc. (Jones y Oburguer, 2011).

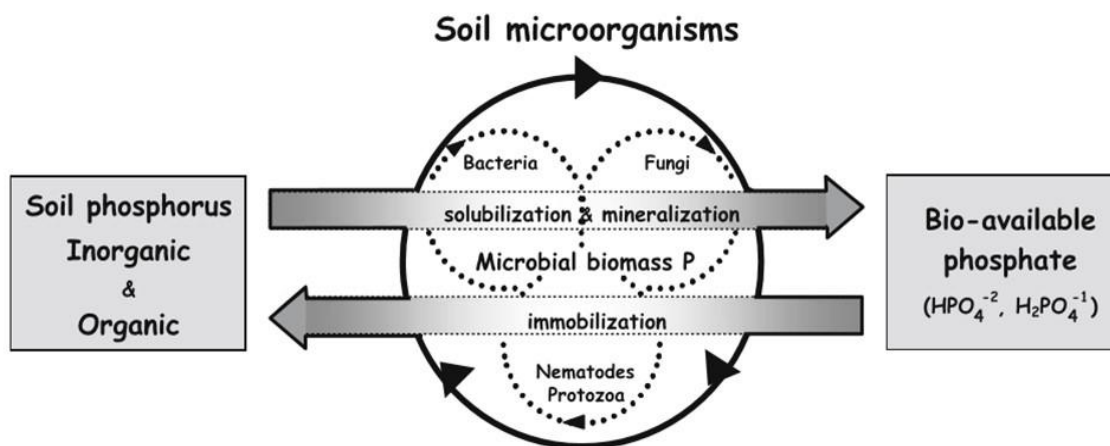


Figura 3. Representación esquemática de la movilización del fósforo del suelo por microorganismos (Zaidi *et al.*, 2010).

Algunos géneros bacterianos reportados como fosfato solubilizadores son *Pseudomonas*, *Bacillus* (Krishnananda y Dipika, 2017), *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Chryseobacterium*, *Phyllobacterium*, (Wani *et al.*, 2005), *Azotobacter* (Kumar *et al.*, 2001), *Xanthomonas* (De Freitas *et al.*, 1997), *Enterobacter*, *Pantoea* y *Klebsiella* (Chung *et al.*, 2005). Estos han sido aislados de suelos rizosféricos de plantas de interés agrícola como trigo, avena, arroz, arazá, cebolla y papa por mencionar algunos (Chaiharn y Lumyong, 2009; Jorquera *et al.*, 2008; Vera *et al.*, 2002; Moratto *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2006; Beltrán, 2009).

En cuanto a hongos del suelo no micorrícicos con capacidad solubilizadora se han aislado de suelos agrícolas géneros como *Penicillium spp.*, *Mucor spp.*, *Aspergillus spp.*, *Trichoderma spp.* (Pérez *et al.*, 2012).

Diversos estudios han demostrado que la inoculación con microorganismos solubilizadores de fósforo puede incrementar el rendimiento o el crecimiento de las plantas, tanto en condiciones de invernadero como en condiciones de campo, por otra parte, se ha señalado incrementos en la biodisponibilidad de P cuando existen aumentos paralelos en la actividad microbiana del suelo (Patiño, 2010; Khan *et al.*, 2010).

2.6.1 Aislamiento de microorganismos solubilizadores

Distintas técnicas son utilizadas para el aislamiento de organismos, lo que permite evaluar la diversidad y capacidad microbiana de los mismos. Una de las técnicas habituales de aislamiento es la siembra en placa por estrías, al sembrar una colonia que ha sido aislada varias veces mediante este método se puede obtener un cultivo axénico. Ya que, en un ambiente natural como el suelo, se pueden encontrar distintos organismos formando colonias, si se desea obtener cepas con características específicas se debe emplear un medio selectivo (formulaciones especiales y específicas según las peculiaridades fisiológicas: nutrición y respiración de las bacterias) (Madigan *et al.*, 2003). Según Paredes (2010), los medios más destacados empleados para seleccionar cepas solubilizadoras de fosfato son el agar PVK desarrollado por Pikovskaya en 1948, el agar Sperber y el National Botanical Research Institutes Phosphate growth medium o NBRIP desarrollado por Nautiyal en 1999; la característica distintiva de todos ellos es que permiten identificar a las cepas solubilizadoras a partir de la formación de un halo traslúcido que se desarrolla alrededor de los aislados o colonias, como efecto de la producción de ácidos orgánicos, se observa un ejemplo en la figura 4.

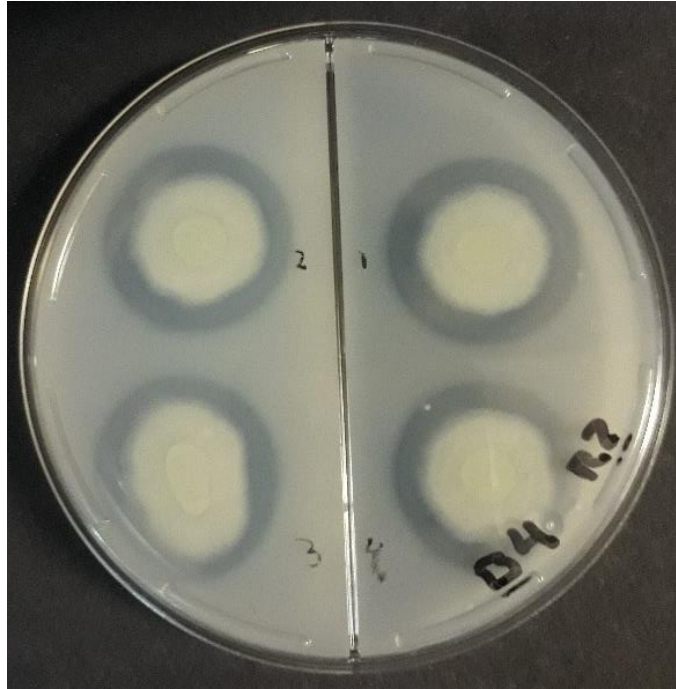


Figura 4. Halos de solubilización (zonas claras) formado entorno al inóculo, siembra en medio PKV.

2.7 Mecanismos de solubilización del fósforo

Se reconocen dos principales mecanismos responsables de la solubilización de Fósforo; 1) la **producción y excreción de fosfatasa ácidas** para la mineralización del P orgánico, 2) **producción y liberación de ácidos orgánicos** por parte de los microorganismos, que por su acción quelante favorecen la formación de complejos insolubles con metales, con la consecuente liberación del fosfato (Fernández *et al.*, 2005). Debido a los objetivos de la presente tesis únicamente se abordará el último mencionado.

2.7.1 Solubilización de fósforo mediante ácidos orgánicos

Al igual que las plantas, los microorganismos pueden modificar su entorno químico inmediato, esto a través de la absorción y liberación de iones y moléculas orgánicas e inorgánicas. Algunos autores señalan que la terminología adecuada para referirse a los ácidos orgánicos sería “aniones de ácidos orgánicos” (Jones, 2011) debido a sus bajos valores de constantes de disociación de ácidos (pKa). Estos compuestos de bajo peso molecular están presentes en el citosol de las células, y en el suelo en forma de aniones disociados.

Como consecuencia de su liberación ocurre una disminución del pH en el medio extracelular, la cual no es causada por los aniones en sí, ya que estos se encuentran en su forma disociada cuando se liberan al suelo; más bien se debe a la secreción de protones que compensan la pérdida de cargas negativas netas dando como resultado la acidificación del medio (Beltrán Pineda, 2014). Jones (2011) señala que el efecto solubilizante de los aniones orgánicos puede deberse a sus cargas negativas o a sus propiedades de complejación de metales. Al tratarse de aniones son capaces de movilizar fósforo inorgánico de las superficies de óxido metálico mediante el intercambio de ligandos o mediante la disolución mejorada por ligandos de óxidos de Fe, Al y fosfatos de calcio, donde el debilitamiento de los enlaces minerales provocados por la adsorción y quelación previa del anión orgánico libera el fósforo ocluido. En el caso particular de los ortofosfatos de calcio los protones presentes en los ácidos convierten el $\text{Ca}_3 (\text{PO}_4)_2$ a fosfatos di y mono básico más soluble y asimilable para las plantas, la reacción se ejemplifica a continuación:



Los ácidos orgánicos liberados por microorganismos solubilizadores provienen del metabolismo de compuestos de alto peso molecular (carbohidratos, péptidos y lípidos), producidos en el periplasma de muchas bacterias Gram negativas mediante la ruta de oxidación directa de la glucosa a ácido glucónico, dicho mecanismo fue propuesto por Goldstein en 1996 y se reconoce como uno de los principales mecanismos para la solubilización de fósforo inorgánico.

Las enzimas involucradas en esta ruta son la Quinoproteína Glucosa Deshidrogenasa y la Glucanato Deshidrogenasa (GDH) , las cuales se encuentran orientadas en la cara exterior de la membrana citoplasmática de tal forma que puedan oxidar sustratos en el espacio periplásmico, de esta forma los ácidos orgánicos se excretan al exterior de la célula, pudiendo así liberar fósforo soluble a partir de fósforos minerales debido a la presencia de protones y aniones de ácidos orgánicos que se unen al metal liberando el fosfato. Se ha determinado que limitaciones de Fósforo induce la glucosa deshidrogenasa, Muleta en el 2013, reportó que la actividad GDH aumenta hasta 5 veces con presencia limitada de P, y se correlaciona con una disminución del pH en el medio de cultivo.

El ácido glucónico se ha reportado con más frecuencia como el agente liberado implicado en la solubilización, producido por especies como *Pseudomonas sp*, *Erwinia herbicola* y *Burkholderia cepacia*, le sigue el 2-cetoglucónico sintetizado por *Rhizobium* y *Bacillus*. En la Tabla 2, se observan otros ejemplos de ácidos orgánicos que pueden sintetizar los organismos.

Tabla 2. Ácidos orgánicos más comunes producidos por microorganismos solubilizadores de Fosfato (Paredes *et al.*, 2009).

Cítrico	Oxálico
Láctico	Malónico
Acético	Málico
Succínico	Fumárico
Butírico	Indolacético
Glucónico	Fórmico

Se ha demostrado también que la capacidad solubilizadora de los microorganismos depende ampliamente de las fuentes de carbono y nitrógeno empleadas en el medio; por ejemplo, al usar sales de amonio se registran mayores tasas de solubilización, esto ha sido atribuido a la extrusión de protones que compensan la toma de amonio, provocando un pH extracelular más bajo por la acidificación del medio (Scervino *et al.*, 2010).

2.8 Uso de microorganismos en la agricultura: biofertilización

Se define como biofertilizante al producto tecnológico cuyo producto activo es un microorganismo vivo, cuya propiedad es mejorar la nutrición y crecimiento vegetal (Mayoral, 2008). Diversos autores desde hace algunos años se han dedicado al estudio de distintas especies microbianas y sus beneficios como fitoestimulantes, mejoradores o biofertilizantes, todos ellos empleados para la formulación de insumos biológicos que se han ido contemplando como una alternativa para la

fertilización tradicional y así la sustitución total o parcial de fertilizantes minerales (Carbajal y Mera, 2010). La aplicación de biofertilizantes ya ha tenido éxito comercial en algunos países como Cuba, Canadá y Australia, que han desarrollado inoculantes a base de microorganismos para el uso en cultivos de arroz, trigo, tomate (Patiño, 2010).

En nuestro país se han formulado productos biofertilizantes, a base de organismos seleccionados de diversos sistemas que pueden emplearse en cultivos variados, sin embargo, el avance en la producción y comercialización de los mismos ha sido menor al igual que en otros países de Latinoamérica principalmente por cuestiones de promoción y distribución, ya que el uso y manejo de estas nuevas tecnologías no se transmite a la mayoría de los productores (Grageda *et al.*, 2012).

Bajo este contexto y teniendo conocimiento de que específicamente para el estado de México los estudios al respecto son limitados, se pretende generar una herramienta que pueda ser empleada para generar mayor entendimiento en el desarrollo de investigaciones referentes a la microbiología de los suelos del cultivo de papa.

3.JUSTIFICACIÓN

En el Estado de México se producen más de cien mil toneladas al año de papa (*Solanum tuberosum*) en una superficie de cinco mil hectáreas (Sedagro, 2016). De acuerdo con Alvarado *et al.*, (2009) para producir 20 T ha⁻¹ de papa se requieren alrededor de 20 kg.ha⁻¹ de fósforo, ya que este elemento estimula el crecimiento de las raíces y favorece el desarrollo radicular y aéreo en las plántulas.

La producción comercial de este cultivo está altamente asociada al uso de fertilizantes fosforados, especialmente en suelos Andosol, ya que inmovilizan (fijan) el fósforo en la superficie. Debido a que es el segundo nutrimento más limitante en el suelo, se sabe que solo del 1 al 3 % se encuentra disponible en su forma mono o di básica para ser aprovechado por las plantas (Romero *et al.*, 2000; Pineda, 2014; Etesami y Beattie, 2017). Por esta razón, la problemática asociada al uso de fertilizantes convencionales conlleva a la contaminación del suelo (Alvarado *et al.*, 2008, Kumar, 2015).

Las bacterias asociadas a la rizósfera de plantas mejoran su crecimiento, nutrición y tolerancia al estrés abiótico. Cepas de bacterias del género *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. y *Rhizobium* sp. tienen la capacidad de solubilizar el fósforo no disponible para el crecimiento vegetal, involucrándose en procesos que van desde la captación y adquisición de fuentes de fósforo, hasta la síntesis de nuevos componentes celulares (Bianco, 2010).

Por ello es importante aislar y caracterizar bacterias edáficas a fin de aprovechar su actividad solubilizadora y puedan potencialmente ser aplicadas como inoculantes bacterianos que mejoren la productividad agrícola del cultivo de papa.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General:

Aislar bacterias solubilizadoras de fosfato del suelo donde se cultiva papa (*Solanum tuberosum* L.) para su uso potencial como biofertilizantes.

4.2 Objetivos Específicos:

- Comparar las características fisicoquímicas del suelo de dos sitios cultivados con papa, Raices y Loma Alta, pertenecientes al Nevado de Toluca.
- Cuantificar la densidad poblacional de bacterias heterótrofas totales de los sitios muestreados.
- Evaluar la capacidad solubilizadora de fósforo en medio sólido de cepas de bacterias aisladas del suelo cultivado con papa.

5. HIPÓTESIS

- Las bacterias presentes en la rizósfera de la papa, aisladas en un medio de cultivo selectivo enriquecido con fosfato tricálcico son capaces de solubilizarlo, por lo que al evaluar su actividad solubilizadora pueden ser consideradas para su potencial uso como biofertilizantes.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Trabajo de campo

6.1.1 Colecta de muestras del suelo

a) Descripción del sitio

El muestreo de suelos se llevó a cabo en la comunidad de Raíces perteneciente al Municipio de Zinacantepec Estado de México, México (Figura 5). Ubicada en las coordenadas GPS: Longitud (dec): -99.805278, Latitud (dec): 19.161389. La localidad se encuentra a una altura de 3531 metros sobre el nivel del mar (INEGI, 2010).



Figura 5. Representación geográfica del sitio de muestreo, poblado de raíces Edo. de México.

b) Muestreo del suelo para análisis fisicoquímicos y microbiológicos

El muestreo fue de tipo preferencial y se consideraron dos parcelas de 1 ha aproximadamente, destinadas al cultivo de papa (*Solanum tuberosum*), denominadas Raíces y Loma alta respectivamente. El diseño de muestreo se realizó en el área delimitada en forma diagonal, se marcaron 5 cuadrantes de 10 x 10 m, se tomaron 5 muestras de suelo rizosférico por cuadrante a una profundidad de 10 - 15 cm, en cajas Petri estériles para los análisis microbiológicos, y en bolsas de polietileno para los análisis fisicoquímicos; todas las muestras se etiquetaron y almacenaron para su traslado y posterior análisis (Figuras 6 y 7).

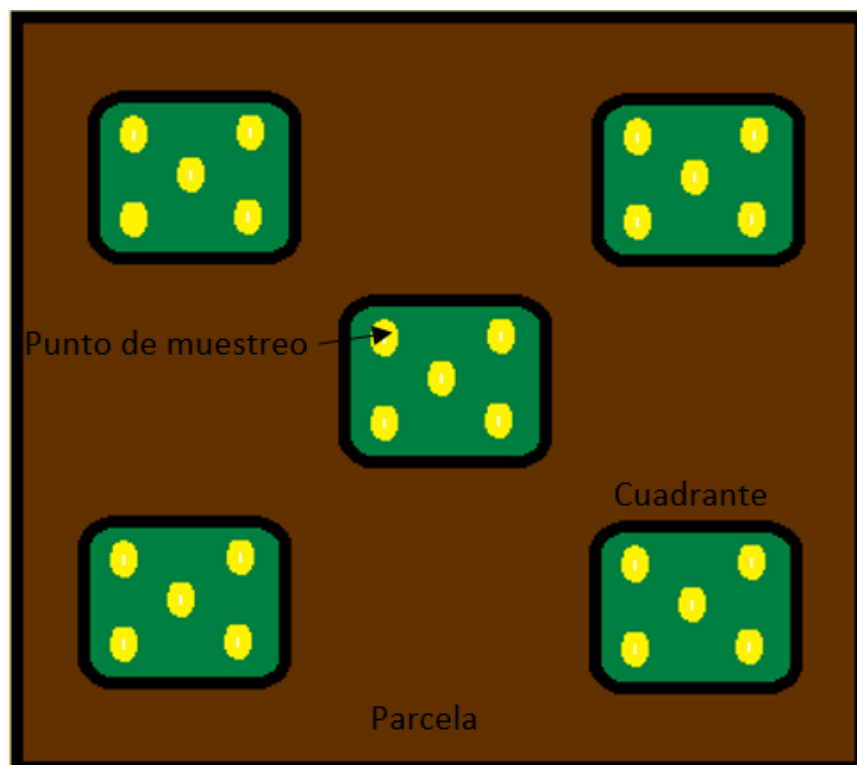


Figura 6. Esquema del muestreo en campo para ambas parcelas.



Figura 7. Toma de muestra de la rizósfera del suelo en caja Petri estéril para análisis microbiológicos.

c) Entrevista a productores

Se realizó una breve entrevista con preguntas dirigidas a los productores de papa propietarios de las parcelas donde se llevó a cabo el muestreo, con el fin de conocer experiencias sobre costumbres, uso y manejo relacionados con el cultivo, así como de la aplicación de fertilizantes y/o plaguicidas minerales (Anexo 1) .

6.2 Trabajo experimental

6.2.1 Análisis fisicoquímicos

a) Tratamiento de muestras previo al análisis

Las muestras colectadas de suelo se pusieron a secar sobre un plástico en una superficie plana a temperatura ambiente, una vez secas se molieron y tamizaron utilizando un tamiz de acero inoxidable con malla del número 10 , se homogenizaron y reservaron para su posterior uso.

b) Determinación de pH

La determinación del pH del suelo se llevó a cabo mediante un método potenciométrico, utilizando una mezcla de relación suelo agua 1:2. siguiendo el método AS-02 de la NOM- 021 SEMARNAT- 2000.

c) Determinación de conductividad eléctrica

Mediante un método simplificado que se basa en la obtención del extracto de una suspensión suelo-agua, se midió la conductividad eléctrica mediante el método AS-18 de dicha Norma.

d) Determinación de Materia orgánica

La determinación de materia orgánica se llevó a cabo según la NOM- 021- SEMARNAT, siguiendo el método de Walkley y Black, el cual se basa en la oxidación del carbono orgánico mediante una solución de dicromato de potasio y el calor generado al reaccionar con ácido sulfúrico concentrado. El resultado es reportado en porcentaje (%) de materia orgánica.

e) Determinación de textura

La textura del suelo fue determinada de acuerdo a la Norma 021- Semarnart por el método de Bouyoucos, donde se separan los agregados para dejar sólo las partículas, midiendo en un primer tiempo las de menor tamaño y en un segundo tiempo las partículas mayores. Se realizaron los cálculos y se interpretaron utilizando una tabla de texturas.

6.2.2 Análisis microbiológico

a) Muestras compuestas

Por cada punto de muestreo se tomaron 10 gramos de suelo para obtener una muestra compuesta por cuadrante (50 g en total). De cada muestra compuesta se

determinó la densidad poblacional de bacterias heterótrofas totales mediante la técnica de cuenta viable.

b) Cuenta viable para bacterias heterótrofas totales

La técnica de cuenta viable se basa en cuantificar las unidades formadoras de colonias presentes en un gramo o mililitro de una muestra, cada organismo que se desarrolla en el medio de cultivo después de la incubación puede formar agregados o colonias, por lo que se realizan las diluciones decimales necesarias de la muestra para su conteo de manera confiable.

Con la muestra de suelo se realizó una solución madre, agregando 10 g de suelo en 90 mL de solución salina estéril, (NaCl 0.85%) a partir de esta se obtuvieron diluciones seriadas: 10^{-1} hasta 10^{-5} .

Se consideraron las diluciones 10^{-1} , 10^{-3} y 10^{-5} de las que se tomaron 100 μ L para sembrar en cajas de Petri con medio PY (peptone-yeast) , se incubaron a 30°C por 24 h. El medio PY es un medio de cultivo no selectivo que permite el aislamiento y recuento de bacterias heterótrofas, la peptona y la levadura constituyen las fuentes de carbono y nitrógeno y aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano. La composición del medio se observa en la tabla 3:

Tabla 3. Composición de medio PY sólido.

Reactivo	g/L
Peptona de caseína	5.0
Extracto de levadura	3.0
Cloruro de calcio	0.1
Agar	15

c) Aislamiento de cepas bacterianas potencialmente solubilizadoras de fosfato

De las colonias de bacterias aisladas en medio PY se seleccionaron aquellas que registraron mayor abundancia para su aislamiento en medio Pikovskaya (PKY), la composición se observa en la tabla 4; se incubaron para determinar la presencia de zonas traslucidas alrededor de la colonia como evidencia de la solubilización del fosfato tricálcico (Figura 8). Una vez seleccionadas las cepas y aisladas como cepas puras, se hicieron cultivos en medio PY sólido y líquido de cinco cepas seleccionadas en cajas de Petri y viales de cristal independientes, para conservación del cepario en refrigeración a 4°C.



Figura 8. Siembra por estría de una cepa seleccionada, aislada en medio PKY, se observan zonas traslucidas alrededor de la misma.

Tabla 4. Composición del medio Pikovskaya (PKY), tomado de Corrales Ramírez, 2014.

Reactivo	g/L
Glucosa	10.0
Fosfato de tricálcico	5.0
Sulfato de amonio	5.0
Cloruro de potasio	0.2
Sulfato de magnesio	0.1
Extracto de levadura	0.5
Agar	15

6.2.3 Ensayo de actividad solubilizadora de fosfato

Previo a la realización del ensayo de actividad solubilizadora de fosfato, a partir del cepario preservado se llevó a cabo la activación del cepario haciendo una resiembra de cada una de las cepas en medio PY, incubando 24 h a 30 °C, para obtener biomasa viable. La biomasa cosechada fue sembrada en medio PY líquido e incubada a 30° C únicamente por 8 h para tomar la biomasa en una fase exponencial. A partir del pre inóculo se ajustó la densidad óptica de la biomasa en 0.2 U.A. a 600 nm. Partiendo de la misma cantidad de biomasa se tomaron 20 µl y se inocularon en cajas Petri con medio PKY, se sembraron mediante micro pipeta, 8 repeticiones de cada una de las cepas aisladas denominadas A1 hasta A5, se colocaron en la incubadora para el posterior registro de diámetros (mm) de los halos de solubilización (Figura 9).

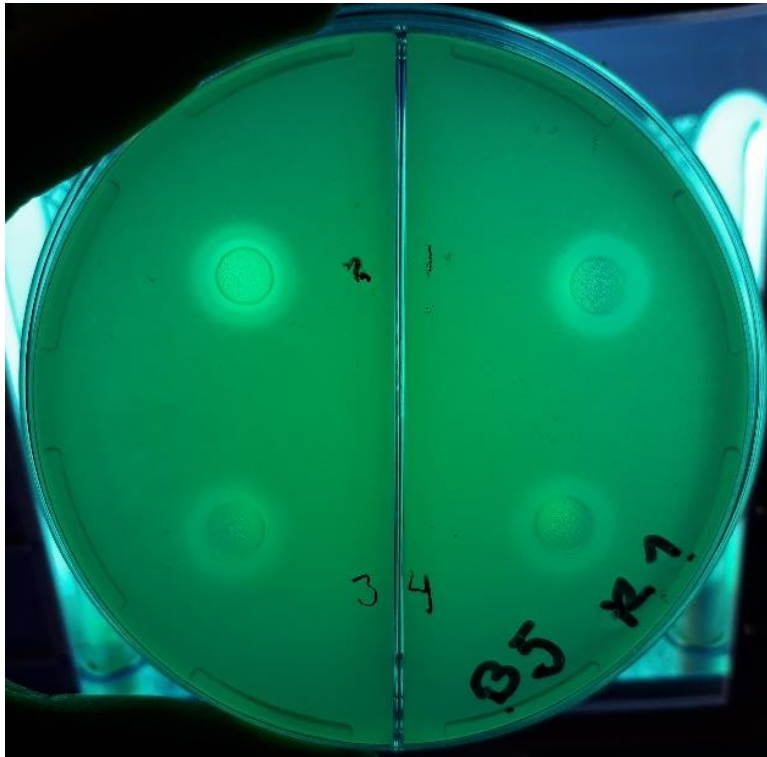


Figura 9. Caja Petri con inóculos de la cepa A5, se evidencia la formación del halo de solubilización.

6.2.4 Medición de halos de solubilización

La medición de halos de solubilización de las cepas A1, A2, A3, A4, A5 se llevó a cabo durante ocho días, registrando diámetros diariamente. Utilizando un microscopio estereoscópico donde se colocaron las cajas Petri y se observaron mediante una cámara de la marca Olympus EVOLT E-620 la cual se encontraba montada sobre el mismo.

Se capturaron fotografías de las 8 repeticiones por cepa y posteriormente se analizaron en un procesador de imágenes. El programa **image J 1.51j8**, permitió obtener el área total de la zona traslucida alrededor del inóculo (Figura 10), con

estos datos se calculó el radio utilizando la fórmula: $A = \pi \cdot r^2$, entonces $r = \sqrt{\frac{A}{\pi}}$

y el diámetro se obtiene con $D = 2r$.

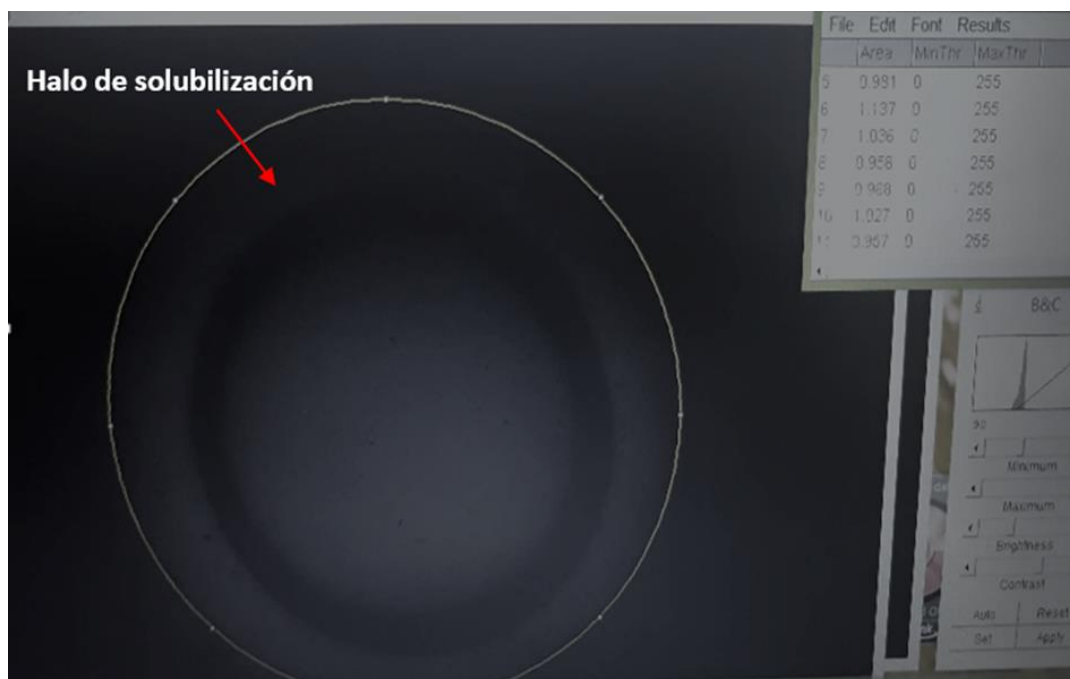


Figura 10. Procesamiento de las imágenes en el programa image J, cálculo del área total de solubilización, zona traslucida dentro del círculo.

6.2.5 Caracterización microscópica de las cepas

Se llevó a cabo la caracterización morfológica microscópica de las 5 cepas seleccionadas mediante la prueba de Tinción de Gram, según Bergey's (1953). Tomando la muestra de cada cepa de las cajas petri donde se aislaron, se colocaron sobre un portaobjetos extendiéndola, se fijó utilizando un alcohol y después lugol para teñir las células, después de lavarlas se pudieron observar al microscopio para su clasificación.

6.2.6 Análisis de datos

Se utilizó el software Statgraphics Centurion para la estadística descriptiva que consistió en comparar las tendencias de los promedios al día ocho de medición de los diámetros de halos de solubilización de las cinco cepas, así también se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para conocer si existen diferencias en el estudio de las variables involucradas y se terminó con una prueba LSD la cual identifica las diferencias entre tratamientos con un nivel de confianza del 99 % es decir una $p < 0.001$.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Características fisicoquímicas del suelo de los sitios Raíces y Loma alta.

Los suelos analizados presentaron un alto contenido de materia orgánica, entre 6 y 7 %, son de textura franco-arenosa, y el pH fue considerado moderadamente ácido, con un valor promedio de 5.4. Los valores obtenidos de los parámetros fisicoquímicos se pueden observar en la tabla 5.

Se ha reportado que la solubilización del fosfato por los ácidos orgánicos depende del pH y la mineralogía del suelo. El pH influye en gran medida sobre las formas solubles de fosfatos, a valores de pH entre 4.0 y 6.0, la mayoría del Pi está presente como ion H_2PO_4^- a pH entre 6.5 y 7.5, el Pi en la solución del suelo está presente principalmente como H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} mientras, a pH entre 8.0 y 10.0, el ion HPO_4^{2-} es dominante (Patiño *et al.*, 2014).

Tabla 5. Caracterización fisicoquímica de los sitios muestreados.

Promedios y porcentajes de los parámetros fisicoquímicos de los sitios raíces y loma alta.

Parámetro / Sitio	pH	CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA (mS/m)	MATERIA ORGÁNICA (%)	HUMEDAD (%)	TEXTURA
RAICES	5.32 ±0.1	0.26±0.1	7.32	3.65	Franco-arenoso
LOMA ALTA	5.65±0.2	0.19±0.1	6.32	3.10	Franco-arenoso

Los minerales secundarios como los fosfatos de calcio, aluminio y hierro, son solubles dependiendo del pH y el tamaño de las partículas. Los iones fosfato liberados mediante la disolución no son estables, si no que se transforman mediante procesos de adsorción y precipitación. Las precipitaciones se producen principalmente con Ca^{2+} a pH por arriba del neutro, y con Fe^{+3} y Al^{3+} en pH ácidos (Figura 11). Los suelos derivados de cenizas volcánicas tienen una gran capacidad para fijar el fósforo soluble aplicado, este proceso ocurre al instante (Fernandez,2001).

El contenido de materia orgánica, es otro factor determinante para la presencia y actividad microbiana, en el análisis se encontraron valores superiores al 6%, dado que los valores deseables de materia orgánica en el suelo son mayores al 5% se puede asegurar que los suelos muestreados cumplen con un alto contenido en materia orgánica, se debe tener presente que este valor no determina la abundancia de microorganismos que puedan ser aislados del suelo, ya que esto depende también de otros factores, y en ausencia de nutrientes las bacterias no pueden utilizar la materia orgánica como fuente de energía, ya que los hongos tienden a aprovecharla más (Vélez *et al.*, 2008) de igual manera se sabe que cuando se llevan a cabo aislamientos *in vitro* las características y habilidades de las mismas pueden perderse o no manifestarse como lo hacen en la dinámica del microentorno en donde habitan

Autores como Alfonso (2008), reportan que el número de microorganismos y géneros presentes pueden variar en el tiempo para un mismo sitio, en su estudio realizado en Bogotá, Colombia, se trabajó con un cultivo experimental, en el cual demostró la variabilidad que se producía en la dinámica poblacional de hongos y bacterias, entre dos muestras del mismo suelo separadas en el tiempo.

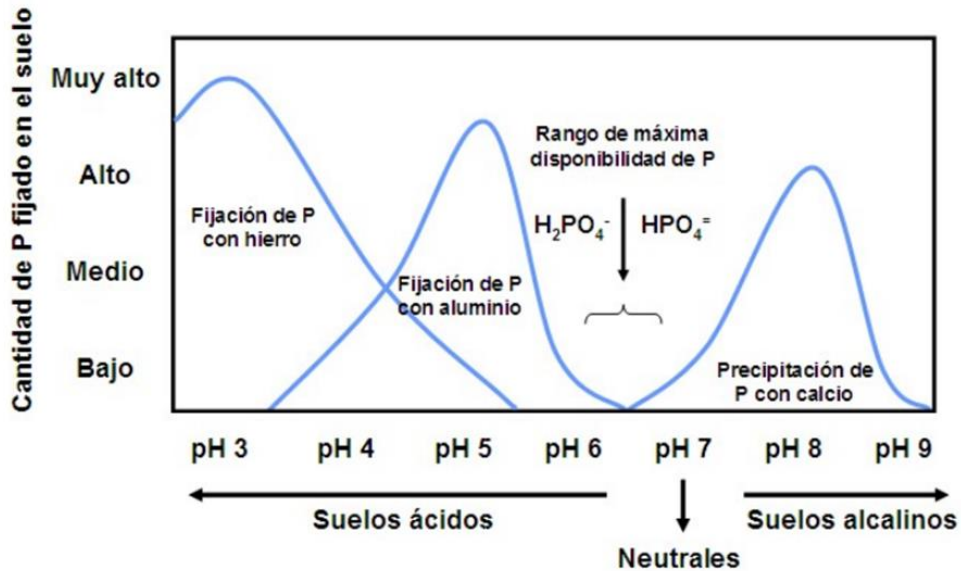


Figura 11. Formas químicas de Fósforo en función del pH.

Como ya se mencionó, la fracción biótica de la materia orgánica juega un papel importante en el funcionamiento del sistema terrestre, hablando de un hábitat específico, los microorganismos pueden encontrarse interactuando con las raíces, o adheridos a la superficie de las partículas del suelo, especialmente arcillas, por lo que este tipo de suelos soporta mayor cantidad de biomasa microbiana que los franco-arenosos, así lo reportan Lasta et al., (2006) quienes encontraron diferencias significativas en la evolución de la biomasa microbiana con relación a las características fisicoquímicas de suelos con distintas texturas.

Los sitios muestreados presentaron una textura franco-arenosa este factor puede estar determinando junto con los parámetros antes mencionados la dinámica de las poblaciones microbianas en la zona de estudio.

7.2 Densidad poblacional de Bacterias heterótrofas totales

La densidad poblacional de bacterias heterótrofas totales fue de 5.22 y 5.14 Log UFC /g suelo para el sitio raíces y loma alta respectivamente (Figura12). Este resultado puede deberse a que en ambos sitios de muestre los suelos comparten

características físicas y químicas, así mismo el manejo agrícola (tipo de labranza y fertilización química) que se les ha dado a lo largo del tiempo es similar.

Se sabe que la densidad poblacional de bacterias en la rizósfera depende de factores abióticos y bióticos como la temporada estacional, los metabolitos exudados por las raíces de las plantas, tipo de suelo, fertilización y labranza que se practica (Vélez *et al.*,2008, Beltrán Pineda 2014). En este sentido, es importante considerar el manejo cultural que se ha llevado en ambas zonas muestreadas, en la entrevista realizada a los productores mencionaron que únicamente hacen rotación de cultivo con avena una vez al año, y la adición de fertilizantes fosforados la llevan a cabo en distintos momentos a lo largo del ciclo vegetativo de la papa, desde hace aproximadamente 30 años.

Los efectos de esta práctica impactan en el contenido de materia orgánica, la estructura y erosión del suelo, el desarrollo de plagas y la disponibilidad de nutrientes debido a que las especies vegetales difieren en sus requerimientos nutricionales.

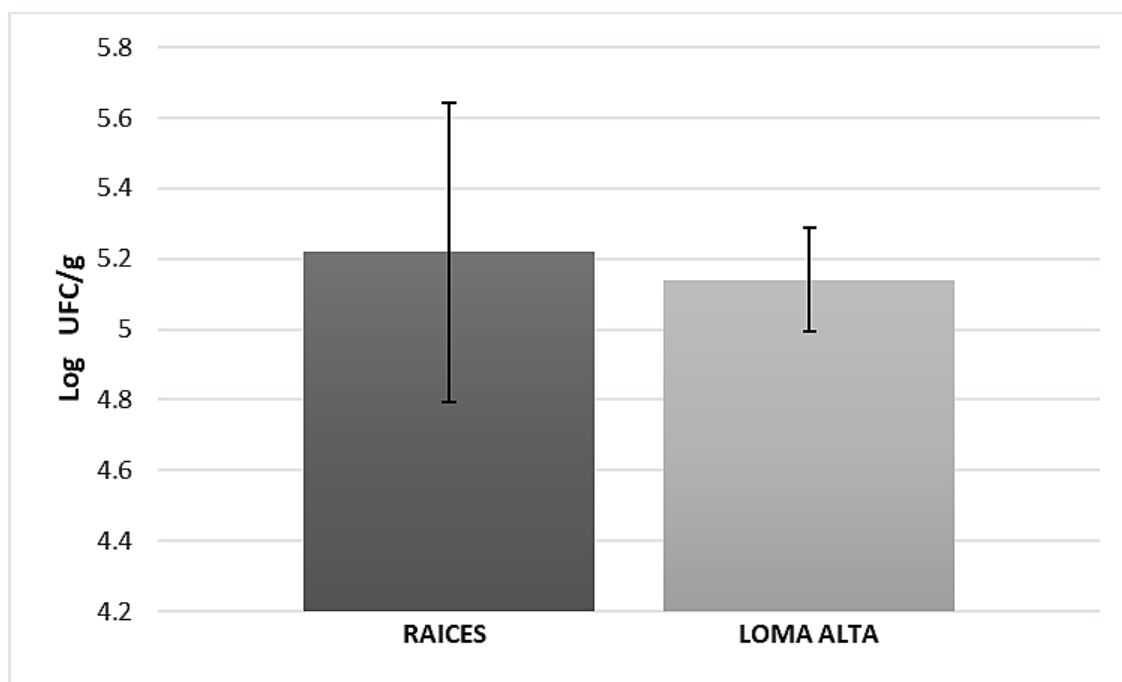


Figura 12. Densidad poblacional de Bacterias heterótrofas totales de la rizósfera del cultivo de papa *Solanum tuberosum* expresado en logaritmo UFC/g.

7.3 Actividad solubilizadora de fosfato

Del conteo de bacterias heterótrofas totales se seleccionó un total de 26 colonias de las que se obtuvieron cultivos puros para evaluar su actividad solubilizadora. En diferentes investigaciones se han reportado valores variados al efectuar recuentos de organismos solubilizadores, por ejemplo, Pandya *et al.*, (2017) aislaron un total de 16 colonias y únicamente 5 aislados fueron positivos para solubilización de fósforo.

Se determinó evaluar la actividad solubilizadora durante 8 días con base en lo reportado por diversos autores quienes realizaron mediciones a los 5, 7, y hasta 11 días del experimento (Corrales-Ramires, 2014 ; Fernandez *et al.*, 2005), resulta evidente el aumento en el tamaño de los halos de solubilización con respecto al tiempo, por lo que cada autor define el tiempo en el que evaluará las cepas según los requerimientos y resultados esperados.

También se debe mencionar que en un medio de cultivo ya sea líquido o sólido los nutrientes se van agotando y comienzan a acumularse desechos tóxicos que merman el crecimiento y la actividad bacteriana, estos factores se han tomado en cuenta al hacer dichas evaluaciones (Koneman *et al.*, 2008). La figura 13 corresponde a una imagen tomada a los 3 días después de la siembra para el registro diario y posterior análisis en el procesador de imágenes, se observa la zona de solubilización más clara alrededor del inóculo.

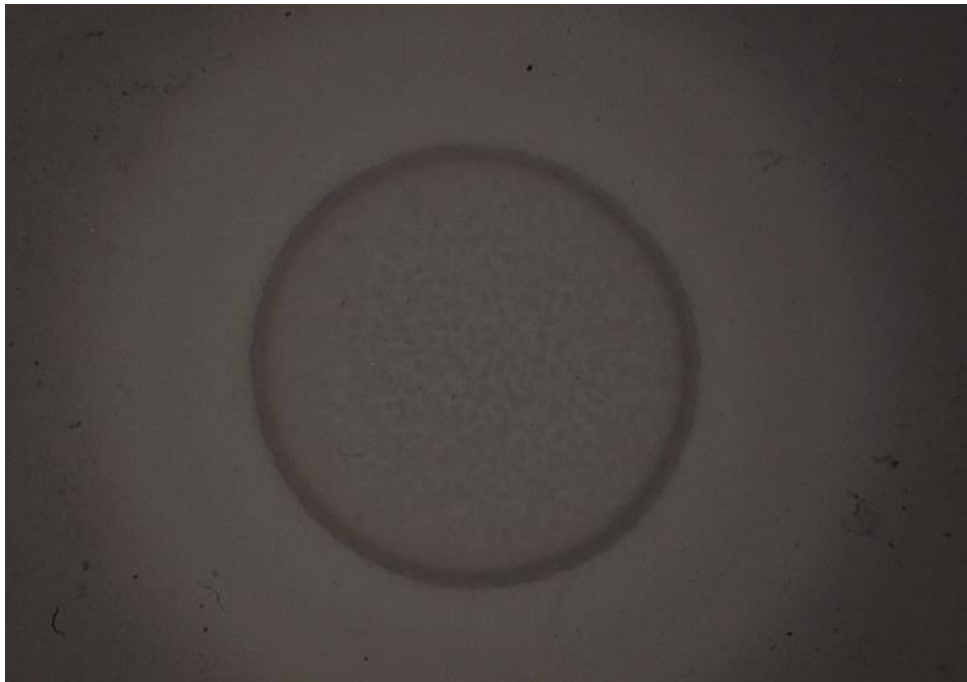


Figura 13. Fotografía de la cepa A2 tomada a los 3 días después del inóculo.

Fueron aisladas 5 cepas de microorganismos con capacidad de hacer disponible el fósforo a partir de fosfato tricálcico, de las cuales 3 corresponden al sitio Raíces y 2 a Loma alta. Los resultados del análisis estadístico indican que existen diferencias en los promedios de los diámetros de área de solubilización ($p < 0.001$), siendo la cepa A3 la que presentó el promedio de solubilización más alto, con un valor de 19.53 mm después de 8 días de incubación (Tabla 6).

Tabla 6. Promedio de halos de solubilización: letras iguales indica que no son significativamente diferentes.

Cepas	Promedio del halo (mm)
A1	11.57 B
A2	10.53 C
A3	19.53 A
A4	12.75 B
A5	12.08 B

En la figura 14, se muestran los promedios de los diámetros de halos de solubilización para el día 1 y día 8 de medición de las 5 cepas. Se observa que al día uno los diámetros de halos de solubilización están dentro del promedio de los 9 mm a excepción de la cepa 5 que registró un diámetro de 2 mm. Después de los 8 días las cepas 1, 2, 4 y 5 aumentaron el área de solubilización hasta los 12 mm de diámetro en promedio, mientras que la cepa A3 alcanzó los 19 mm de diámetro.

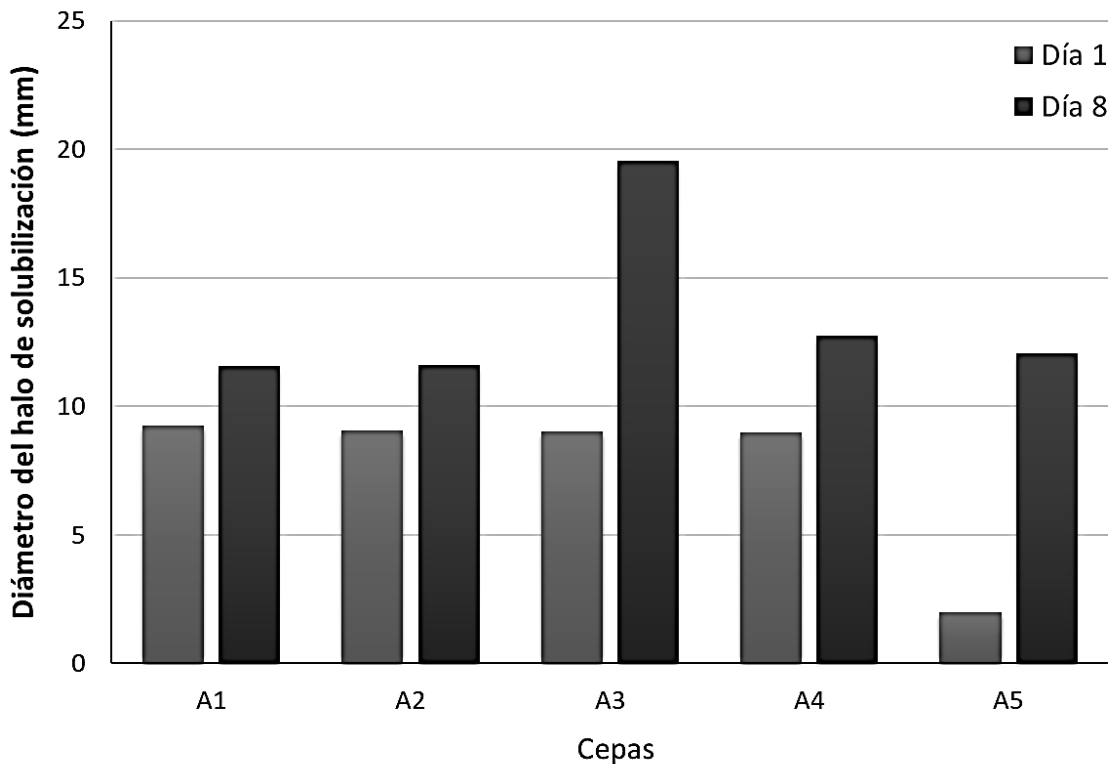


Figura 14. Diámetros de halos de solubilización, los valores mostrados son los promedios de las 8 réplicas por cepa medidas al día 1 y día 8 después de la inoculación.

La actividad solubilizadora de fosfato depende del género de los microorganismos aislados, así como de sus características genéticas y bioquímicas y los mecanismos que emplean para solubilizar fósforo, pues como ya se ha mencionado la producción de ácidos orgánicos no es el único mecanismo responsable de dicho proceso (Ingle y Padol, 2017).

Por ejemplo, se han encontrado diferencias en cuanto a la actividad solubilizadora por parte de cepas aisladas de la misma especie *Bacillus megaterium* (Chen *et al.*, 2006) ddónde una cepa fue capaz de producir ácidos orgánicos para la solubilización, mientras que la segunda no tuvo la capacidad de producir ningún tipo de ácido, esto significa que a pesar de compartir características genéticas o encontrarse en condiciones similares en un medio, son independientes en cuanto a su actividad solubilizadora.

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, las fuentes de carbono empleadas en el medio influyen en gran medida, Kucey (1983), afirma que un medio de cultivo con fuentes carbonadas puede excluir a aquellos organismos solubilizadores de fosfato que no utilicen eficientemente los carbohidratos, por lo que es importante recordar que en el medio selectivo que se utilizó, la glucosa es la principal fuente de carbono (Fernández *et al.*, 2005).

En la siguiente tabla (Tabla 7), se resumen algunos trabajos de autores que evaluaron la actividad solubilizadora de microorganismos aislados de distintos suelos o ambientes.

Tabla 7. Antecedentes del aislamiento de microorganismos solubilizadores de fosfato en distintos hábitats.

Autor y año	Cepa	Tipo de suelo/ambiente	Tiempo de incubación	mm halo de solubilización
Sanclemente <i>et al</i> (2017)	<i>Escherichia vulneris</i>	<i>Guadua angustifolia</i>	20 días	24mm
Corrales Ramírez (2014)	<i>Bacillus sp</i>	Raíces de plantas aromáticas	2 días	3mm
Álvarez Figueroa (2012)	<i>Clostridium sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i>	Suelos calcáreos	5 días	15.80mm 15.40mm
Hernández–Leal <i>et al</i> (2011)	<i>P. lilacinus</i>	<u><i>Globodera rostochiensis</i></u>	8 días	45mm

Fernández <i>et al</i> (2005)	<i>Bradyrhizobiu</i> <i>m sp</i>	Nódulos planta de soya	14 días	15mm
----------------------------------	-------------------------------------	---------------------------	---------	------

7.4 Caracterización microscópica de las colonias aisladas

Como se puede observar en la tabla 8, de las 5 cepas aisladas, 4 corresponden a bacterias Gram negativas y presentan morfología de tipo cocos y bacilos (Figura 15). Estas observaciones concuerdan con estudios realizados por otros autores que confirman la relación de esta propiedad con la facultad de solubilizar fósforo en distintos géneros como: *Pseudomonas* spp, *P.cepacea*, *P.gladioli*, *Xanthomonas* spp, *X. maltophilia*, *Enterobacter agglomerans*, todos estos bacilos Gram negativos (Paredes y Espinosa, 2010).

Tabla 8. Características microscópicas de las 5 cepas aisladas.

CEPA	MORFOLOGIA	TINCION GRAM
A1	Cocos	G+
A2	Bacilos	G-
A3	Bacilos	G-
A4	Cocos	G-
A5	Bacilos	G-

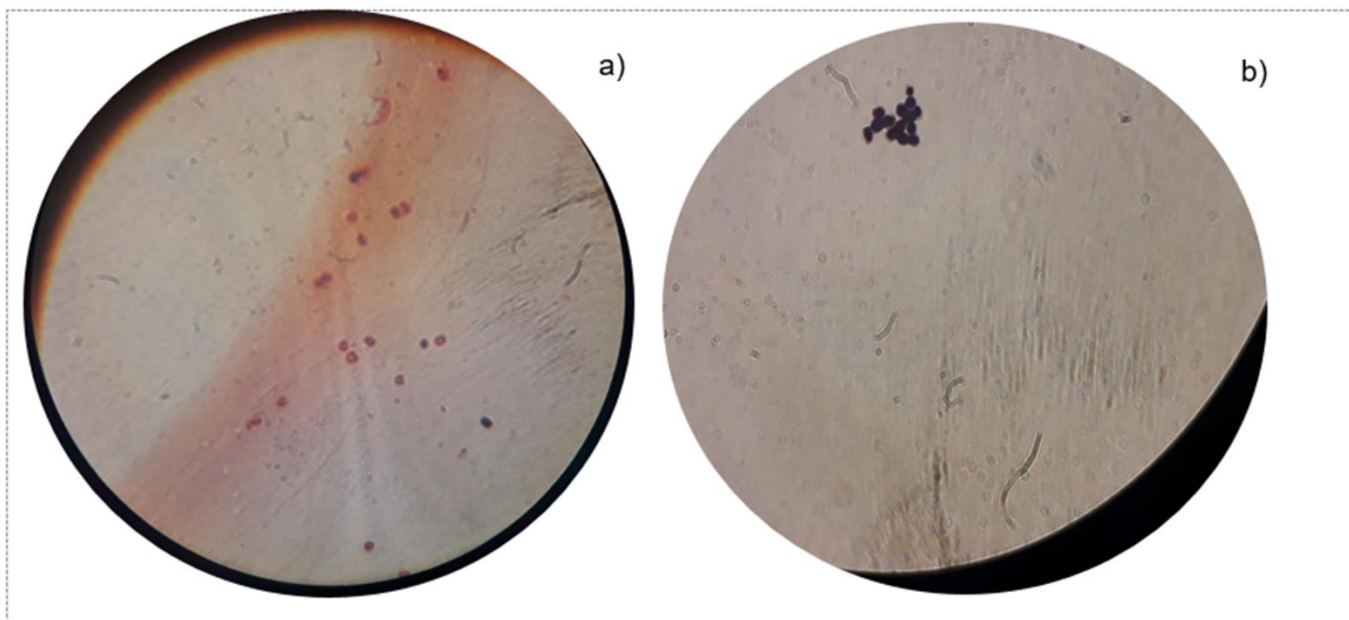


Figura 15. Tinción Gram: a) Cocos gram negativos, coloración roja, b) Bacilos gram positivos, coloración azul.

Se ha evidenciado, que en variados ecosistemas edáficos existe una relación entre las bacterias Gram negativas altamente eficaces y la vía de oxidación directa, el fenotipo solubilizador les da la habilidad de disolver fosfatos de calcio insolubles como resultado de oxidación periplásmica de la glucosa a ácido glucónico por la vía de la quinoproteína glucosa deshidrogenasa (GDH). (Muleta *et al*, 20013).

Las quinoproteínas regulan los procesos bioenergéticos en bacterias Gram negativas. La GDH interviene en una etapa en la ruta metabólica de la oxidación de aldosas que es el principal mecanismo para la utilización de azúcares por parte de microorganismos (Beltrán- Pineda, 2014).

Cumpliendo con los objetivos del trabajo, se lograron aislar cepas nativas las cuales son una primera aproximación y aporte de microorganismos nativos aislados del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en el suroeste del Estado de México, y pueden ser considerados en investigaciones futuras para la formulación de inóculos con potencial para ser probados en cultivos en campo o invernadero.

8. CONCLUSIONES

Los suelos analizados mostraron características fisicoquímicas típicas de ese tipo de ecosistema edáfico, que en conjunto con la actividad agrícola limitan el desarrollo de poblaciones rizosféricas heterótrofas y solubilizadoras de fosfato.

La densidad poblacional no mostró diferencias significativas entre los dos sitios de colecta.

Se comprobó la presencia de bacterias con capacidad solubilizadora en suelo cultivado con papa.

Se encontraron diferencias significativas en la capacidad solubilizadora de cinco cepas aisladas, siendo la cepa A3 la que registró un mayor diámetro de halo de solubilización.

Debido a los resultados en la evaluación de la capacidad solubilizadora de fosfato, las cepas aisladas pueden ser candidatas para su uso como biofertilizantes.

9. REFERENCIAS

Alfonso, M., Coca, A., Ramírez, W., Hoyos-Carvajal, L. (2011). Aproximación de la dinámica poblacional de los microorganismos en diferentes sustratos empleados en el cultivo de rosa (*Rosa* spp. var. Charlotte) en la Sabana de Bogotá. *Revista Colombiana De Ciencias Hortícolas*, 2(1), 98-108.

Alvarado, A., Iturriaga, I., Smyth, J. T., Ureña, J. M., & Portuguez, E. (2009). Efecto de la fertilización con fósforo sobre el rendimiento y la absorción de nutrimentos de la papa en un Andisol de Juan Viñas, Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 33(1).

Alvarez Figueroa, P. (2012). Selección y evaluación de microorganismos solubilizadores de fosfatos en suelos calcáreos del valle del Mantaro [Tesis de Maestría. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú].

Banerjee, S., Palit, R., Sengupta, C., Standing, D. (2010). Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. Isolated from tomato rhizosphere. *Australian Journal of crop science*, 4(6), 378-383.

Bashan, Y., Kamnev, A., de-Bashan, L. (2013). Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: A proposal for an alternative procedure. *Biology and Fertility of Soils*, 49. 465-469. 10.1007/s00374-012-0737-7.

Beltrán Pineda, M.E. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. Corpoica. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15(1), 101-113.

Berg, G., Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS microbiology ecology*, 68(1), 1-13.

Bobadilla Henao C, Rincón Vanegas S. (2008). Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza. [Tesis de grado. Pontificia Universidad Javaeriana, Colombia].

Calvo Vélez, P., Reymundo Meneses, L., Zúñiga Dávila, D. (2008). Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Ecología Aplicada*, 7(1,2), 141-148.

Carvajal Muñoz, J.S., Mera Benavides, A.C. (2010). Fertilización biológica: técnicas de vanguardia para el desarrollo agrícola sostenible. *Producción + Limpia*, 5 (2), 77-96.

Cañón Cortázar, R., Avellaneda-Torres, L., Torres-Rojas, E. (2012). Microorganismos asociados al ciclo del nitrógeno en suelos bajo tres sistemas de uso: cultivo de papa, ganadería y páramo, en el Parque Los Nevados, Colombia. *Acta Agronómica*, 61 (4), 371-379.

Corrales Ramírez, L. C., Leal, S., Consuelo, L., Arévalo Galvez, Z. Y., Burbano, M., Estefanía, V. (2014). *Bacillus*: a genus of bacteria that exhibits important phosphate solubilizing abilities. *Nova*, 12(22), 165-178.

Chica, F. (2008). Evaluación de la adición de zeolitas al suelo como factor para mitigar la contaminación producto de la fertilización agrícola. *Producción + Limpia*. 3 (1), 7-24.

Chung, H., Park, M., Madhaiyan, M., Seshadri, S., Song, J., Cho, H., Sa, T. (2005). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil Bioland Biochemistry*, 37, 1970–1974.

De Freitas, J.R., Banerjee, MR., Germida, J.J. (1997). Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biology and Fertilizer Soils*, 24, 358–364.

Fankem, H., Nwaga, D., Deubel, A., Dieng, W., Merbach, W. (2006). Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon. *African Journal of Biotechnology*, 5 (24), 2450-2460.

Fernández, L. A., Zalba, P., Gómez, M.A., Sagardoy, M.A. (2005). Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Ciencia del suelo*, 23(1), 31-37.

Fernandez, Marcos, Maria. (2011). Contaminación por fósforo procedente de la fertilización orgánica de suelos agrícolas. *Servizo de Publicacións e Intercambio Científico, Universidade de Santiago de Compostela* 2, 25-31.

Figuroa, A. P. (2012). Selección y evaluación de microorganismos solubilizadores de fosfatos en suelos calcáreos del valle del Mantaro. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional Agraria la Molina, Lima, Perú].

Grageda Cabrera, O. A., Díaz Franco, A., Peña Cabriales, J., Vera Nuñez, J. A. (2012). Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3 (6), 1261-1274.

González Chávez, M. C. A., Carrillo González, R., Sánchez-López, A. S. (2017). Definiciones y problemática en la investigación científica en aspectos de fitoremediación de suelos. *Agroproductividad*, 10 (4), 3-7.

Guang Can, T., Shu tun, T., Miao Ying, C., Guang hui. (2008). Phosphate solubilizing and mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. *Pedosphere*, 18 (4), 515-523.

Hernández Leal, T. I., Carrión, G., Heredia, G., (2011). Solubilización in vitro de fosfatos por una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Agrociencia*, 45 (8), 881-892.

Ingle, K. P., Padole, D. A., (2017). Phosphate solubilizing microbes: An overview. *International Journal of Current. Microbiology and Applied. Sciences*, 6 (1), 844-852.

Jana, B. B., Chakraborty, P., Biswas, J.K., Ganguly, S. (2001) Biogeochemical cycling bacteria as indices of pond fertilization: importance of CNP ratios of input fertilizers. *Journal of Applied Microbiology*, (90), 733–740.

[Jones, D.L., Oburger, E. (2011). Solubilization of Phosphorus by Soil Microorganisms. (eds) Phosphorus in Action. Soil Biology, (169-198). Springer, Berlin, Heidelberg: Bünemann E., Oberson A., Frossard E].

Jorquera, M., Hernández, M., Rengel, Z., Marschner, P., Mora, M. (2008). Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. *Soil Biology Fertility Soils*, (44), 1025–1034.

Koneman, W., Gary, W., Janda, W., Allen, S., Winn, W. [6ta edición]. (2008). *Koneman Diagnóstico Microbiológico*. EE.UU. Editorial Panamericana.

Krishnananda, P.I., Dipika Ashokrao, P. (2017). Phosphate Solubilizing Microbes: An Overview. *International Journal of Current Microbiology Applied Science*, 6 (1), 844-852.

Kumar, V., Behl, R.K., Narula, N. (2001). Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under greenhouse conditions. *Microbiol Research*, (156), 87–93.

Lacasta, C., Benítez, M., Maire, N., Meco, R. (2006). Efecto de la textura del suelo sobre diferentes parámetros bioquímicos. In *VII Congreso SEAE: Agricultura y Alimentación Ecológica*. Toledo, España.

Lim, B.L., Yeung, P., Cheng, C., Hill, J.E. (2007). Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria. *The ISME Journal*, (1), 321-330.

Morales Hernández, J.L., Hernández Martínez, J., Rebollar Rebollar, S. (2013). Rendimiento de papa con fuentes de fertilización mineral en un Andosol del Estado de México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 4 (6), 881-893.

Moratto, C., Martínez, L., Valencia, H., Sánchez, J. (2005). Efecto del uso del suelo sobre hongos solubilizadores de fosfato y bacterias diazotróficas en el páramo de Guerrero. *Agronomía colombiana*, 23 (2), 299-309.

Muleta D, Assefa F, Börjesson E, Granhall U. 2013. Phosphatesolubilising rhizobacteria associated with *Coffea arabica* L. in natural coffee forests of southwestern Ethiopia. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* (12), 73–84.

Nogales, B. (2005). La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas*, 14 (2), 41-50.

Pandya, U., Prajapati, M., Sahay, N. S. (2017). Cultivable Microbial Diversity Study from Traditional Formulation and Characterization of Phosphate Solubilizers through Their Effect on Vegetative Growth Parameters of *Zea mays* L. *International Journal Current Microbiology Applied Science*, 6 (4), 501-510.

Paredes Mendoza, M., Espinosa Victoria, D. (2010). Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*, 28(1), 61-70.

Paredes Mendoza, M. (2010). Aislamiento y caracterización bioquímica de metabolitos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato [Tesis para acceder al título de Doctora en Ciencias. Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas de Montecillo, Texcoco, Mexico].

Patiño Torres, C.O., Sanclemente Reyes, O. E. (2014). Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. *Entramado, Universidad Libre Cali, Colombia*, 10 (2), 288-297.

Patiño Torres, C. O. (2010). Solubilización de fosfatos por poblaciones bacterianas aisladas de un suelo del Valle del Cauca. Estudio de Biodiversidad y Eficiencia. [Trabajo de tesis como requisito parcial para optar al título de Doctor en Ciencias Agropecuarias Línea de Investigación Manejo de Suelos y Aguas. Universidad Nacional de Colombia, Palmira].

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

Pedraza, R., Teixeira, K., Fernández Scavino, A., García de Salamone, I., Baca, B., Azcón, R., Baldani, V., Bonilla, R. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. *Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 11 (2), 155-164.

Pérez, A., De la Ossa, J., Montes, D. (2012). Hongos solubilizadores de fosfatos en fincas ganaderas del departamento de Sucre. *Revista Colombiana Ciencias Animal*, 4(1), 35-45.

Ramírez, D., Ninfa, Serrano R., José Antonio, Sandoval, T., Horacio (2006). Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37 (3), 56-71.

Rodríguez Chávez, J. (2008). Estudio de viabilidad para la instalación de una empresa productora de inoculantes bacterianos [Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, México.]

Romero Lima, M., Trinidad Santos, A., García Espinosa, R., Ferrera Cerrato, R. (2000). Producción de papa y biomasa microbiana en suelo con abonos orgánicos y minerales. *Agrociencia*, 34 (3), 261-269.

Rubio Covarrubias, O. A., Grünwald Niklaus, J., Cadena Hinojosa, M. A. (2005). Influencia del nitrógeno sobre la infección de tizón tardío en el cultivo de papa en Toluca, México. *Terra Latinoamericana*, 23(4), 487-493.

Sanclemente, O., Yacumal, V., Patiño, C. (2017). Solubilización de fosfatos por bacterias nativas aisladas en tres agroecosistemas del Valle del Cauca (Colombia). *Temas Agrarios*, 22 (2), 59-67.

Scervino, M., Prieto, M., Ivana, M., Recchi, M., Sarmiento, N., Godeas, A. (2010). Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization. *Biology and Fertility Soils*, (46) ,755–763.

Semarnat. Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales. Indicadores Clave y de Desempeño Ambiental. Edición 2012. Capítulo 3, México. 2013.

Shivlata, L.; Satyanarayana, Tulasi. (2017) Actinobacteria in Agricultural and Environmental Sustainability. Agro-Environmental Sustainability (173-179). Uttar Pradesh, India: Springer International Publishing AG.]

Torres, M., Lizarazo, L., (2006). Evaluación de grupos funcionales (C, N, P) y actividad de la fosfatasa ácida en dos suelos agrícolas del departamento de Boyacá, Colombia. *Agronomía Colombiana*, 24 (2), 317- 325.

Vera, D., Valencia, H., Pérez, H. (2002). Aislamiento de hongos solubilizadores de fosfatos de la rizósfera de arazá (*Eugenia stipitata, myrtaceae*). *Acta Biológica Colombiana*, 7(1), 33-40.

Wani, P.A., Zaidi, A., Khan, A.A., Khan, M.S. (2005). Effect of phorate on phosphate solubilization and indole acetic acid (IAA) releasing potentials of rhizospheric microorganisms. *Annals Plant Protection Science*, (13), 139–144.

Wu, X. M., Long, Y. H., Li, Y. R., Liu, R. X., & Li, M. (2014). Effects of napropamide on microbiological characteristics of tobacco rhizosphere soil and its dissipation. *Journal of soil science and plant nutrition*, 14(1), 151-159.

Almas, Z., Munees, A., Oves, M., Ees, A., Khan, M. (2010). Role of Phosphate-Solubilizing Bacteria. Legume Improvement (273-291) UP, India: Springer-Verlag/Wien].

10. ANEXOS

Entrevista a productores de papa de las parcelas muestreadas en la comunidad de Raíces.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

ENCUESTA APLICADA A PRODUCTORES DE PAPA EN LA ZONA DEL NEVADO DE TOLUCA

DATOS DEL ENCUESTADO:

-Antonio Carbajal

TIPO DE CULTIVO:

- De temporal, sitio 1 de muestreo.

VARIEDAD SEMBRADA:

-Citlalli, Lucero, Fiana

¿Por cuánto tiempo se ha sembrado papa en el terreno?

-12 años

¿Qué criterios consideró para la sembrar papa en esta área?

-Clima, características del cultivo

¿En su terreno únicamente se cultiva papa? (rotación de cultivo)

-Se alterna con avena para no "desgastar el suelo"

¿Hay un periodo de descanso entre cada cultivo?

-De Septiembre a Abril

¿Qué tratamiento le da al suelo cultivado?

-Se hace barbecho y se mete tractor para el arado.

¿Cuál es el rendimiento de su cultivo por ciclo de cosecha?

-18-25 ton/ha

Si usa fertilizantes:

Nombre	20-30-10 Nutriwrow
Dosis	2 kg/ 200L. de agua
Periodicidad	Se aplica cada que es necesario
Forma física	cristales
Método de aplicación	Con bomba

Si adiciona materia orgánica:

Origen	Excreta de caballo/borrego y vaca composta
Cantidad	No hay limite
Forma de aplicarlo	Directo en el suelo

UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

ENCUESTA APLICADA A PRODUCTORES DE PAPA EN LA ZONA DEL NEVADO DE TOLUCA

DATOS DEL ENCUESTADO:

-Crispín Álvarez

TIPO DE CULTIVO:

- De temporal, sitio 2 de muestreo.

VARIEDAD SEMBRADA:

-Clon roja

¿Por cuánto tiempo se ha sembrado papa en el terreno?

-30 años

¿Qué criterios consideró para la sembrar papa en esta área?

-El suelo, se da la papa aquí.

¿En su terreno únicamente se cultiva papa? (rotación de cultivo)

-un año papa, el siguiente avena

¿Hay un periodo de descanso entre cada cultivo?

-7 meses

¿Qué tratamiento le da al suelo cultivado?

-barbecho, se aplica lama

¿Cuál es el rendimiento de su cultivo por ciclo de cosecha?

-10 toneladas por media hectárea aproximadamente.

Si usa fertilizantes:

Nombre	18-46 papera
Dosis	20 bultos = 1 ton.
Periodicidad	Una vez, en la siembra.
Forma física	Polvo
Método de aplicación	Directo al suelo

Si adiciona materia orgánica:

Origen	composta
Cantidad	No hay limite
Forma de aplicarlo	Directa

