

Estudio de la microflora de la rizósfera de *Caesalpinia spinosa* en la provincia de Huanuco

KATTY OGATA, DORIS ZÚÑIGA

Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología Marino Tabusso. Dpto. de Biología, Universidad Nacional Agraria

La Molina. 2005. Av La Molina s/n. Lima 12 - Perú.

Email: kappyta@gmail.com, dzuniga@lamolina.edu.pe

RESUMEN

Se recolectaron muestras de suelo, raíz y rizósfera de plantas de *Caesalpinia spinosa* (“tara”) ubicadas en los lotes A y B del *Fundo Canchacaya* – provincia de Ambo - departamento de Huanuco. También se tomaron muestras de estas plantas provenientes de almacigos para analizar las poblaciones microbianas de la raíz y rizósfera. Se evaluaron las poblaciones bacterianas y fúngicas, encontrándose una mayor población microbiana en la raíz y en las zonas más cercanas a ella. Los rizobios, actinomicetos, azotobacter y pseudomonas fueron aislados en los medios de cultivo LMA, caseína – almidón, caldo para fijadores de nitrógeno y medio F respectivamente; todas las cepas fueron purificadas y caracterizadas fenotípica y bioquímicamente. De los 14 nódulos encontrados se aislaron 4 cepas de rizobios; 2 pertenecientes al género de *Rhizobium spp* y 2 al género de *Bradyrhizobium spp.*, resultando estas cepas NOD+ cuando se inocularon en “frijol” y “pallar” y NOD- en “alfalfa”, “soya” y “tara”. Estas cepas aisladas no demostraron tolerancia a altos niveles de NaCl (>1%) ni a temperaturas de 8, 37 y 40°C, no obstante la mayoría mostró una buena capacidad de crecer a diferentes niveles de pH (4 a 8.8). Además se obtuvieron 3 cepas de *Azotobacter spp.*, 8 de actinomicetos y 13 de *Pseudomonas spp.* Por todas las poblaciones microbianas encontradas en este estudio, los suelos de Ambo (Huanuco) pueden ser considerados de ligero a medianamente fértiles y por lo tanto, podrían sostener parcialmente el crecimiento del cultivo de tara.

Palabras claves: *Caesalpinia spinosa*, pseudomonas, rizobios, azotobacter, actinomicetos

ABSTRACT

Soil samples were collected from ground, root and rhizosphere of *Caesalpinia spinosa* (“tara”) plants grown at the Canchacaya farm, in Huanuco, Peru. Samples of tara seedlings were taken as well to analyze microbial populations in their rhizosphere and root zone. We evaluated bacterial and fungal populations, finding a higher microbial population in the root and surrounding areas. Isolates of rhizobia, actinomycetes, *Azotobacter* and *Pseudomonas* were maintained in culture medium LMA (yeast manitol agar), casein - starch, broth for nitrogen fixers, and culture medium

F respectively. All strains were purified and characterized phenotypically and biochemically before selection. Isolates from the fourteen-found nodules included 4 rhizobial strains: 2 from genus *Rhizobium* spp., and 2 from genus *Bradyrhizobium* spp., which turned to be NOD+ when these strains were inoculated in “beans” and “broad beans”, and NOD- when inoculated in “alfalfa”, “soy beans” and “tara”. These isolates showed no tolerance to high levels of NaCl or temperature variations, but most of them showed a good growing capacity at different pH levels (4 to 8.8). In addition, we obtained 3 *Azotobacter* spp strains, 8 actinomycetes, and 13 *Pseudomonas* spp. that might correspond to: *P. aeruginosa* (2), *P. fluorescens* (6) and *P. putida* (5). Based on the found microbial populations, soils in the Ambo province, (Huanuco, Peru) are considered moderately fertile, and could partially sustain tara cultivation.

Keywords: *Caesalpinia spinosa*, *Pseudomonas*, rhizobia, *Azotobacter*, actinomycetes

INTRODUCCIÓN

El componente microbiano del suelo es importante para la salud de los ecosistemas. Los procesos agrícolas, así como el manejo de los recursos vegetales inciden sobre este componente afectando tanto su biodiversidad como la densidad de las poblaciones microbianas implicadas; los resultados a mediano y largo plazo pueden ser la pérdida de fertilidad de los suelos y su progresiva pauperización. La sostenibilidad de un agroecosistema yace también en su menor dependencia de fertilizantes y pesticidas químicos. El empleo de cepas de microorganismos con un alto potencial de acción sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas y el estudio de la diversidad biológica de sus patógenos son factores clave en su control y, por tanto, en el manejo integral de los cultivos (Olalde, 1998).

El suelo es un ecosistema de enorme riqueza microbiana. Las bacterias, incluidos los actinomicetos, son los organismos más numerosos en el suelo alcanzando poblaciones que van entre 10^6 y 10^7 bacterias g^{-1} de suelo; mientras que los hongos dado su mayor tamaño aunque menor abundancia tienen la biomasa más significativa (Alexander, 1980; Tate, 1995), representando un 10 a 20% de la microflora total, esto es aproximadamente 10^5 a 10^6 organismos / gramo de suelo.

Los estudios sobre los microorganismos del suelo son numerosos, sin embargo hasta la fecha no se ha determinado completamente la biodiversidad necesaria, en lo que se refiere a microorganismos, para que un suelo agrícola funcione de manera óptima (Stewart, 1991). En la actualidad se han identificado los significados funcionales de grupos particulares de microorganismos que afectan la productividad de las plantas en el contexto agrícola; actividades como la fijación de nitrógeno, degradación de celulosa, solubilización de fosfatos, interacción con otros microorganismos y control biológico. Todas ellas ocurren en el suelo y forman parte de la llamada agricultura sostenible, que permite el mantenimiento y mejoramiento de una buena producción de los cultivos agrícolas evitando el uso de químicos y pesticidas que puedan ocasionar deterioro en el medio ambiente. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar la microflora nativa de suelos y rizósfera del cultivo de tara como indicadores de la fertilidad del suelo y su posterior uso como promotores de crecimiento de esta planta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de muestreo

Las muestras de suelo fueron recolectadas de los diferentes lotes (A y B) de plantas de *Caesalpinia spinosa* (tara) crecidas en el Fundo Canchacaya, ubicado entre los 2080 – 2700 msnm (provincia de Ambo – Huanuco) (fig 1). Estos suelos, a pesar de encontrarse en lugares muy distantes, se caracterizan por tener condiciones de suelo, clima y altura muy similares (Tablas 1 y 2).

Las muestras se tomaron a 15 y 30 cm de profundidad en una cantidad aproximada de 1 kilo de suelo por muestra. El muestreo se realizó con una pala de mano, la que fue desinfectada con alcohol, siendo colocadas en bolsas de plástico rotuladas y transportadas al laboratorio para su posterior procesamiento. También se tomaron muestras de plantas de *Caesalpinia spinosa* (tara) provenientes de almácigos para analizar las poblaciones microbianas de su raíz y rizósfera.

Determinación de las poblaciones bacterianas, hongos y micorrizas

Se hicieron los recuentos de bacterias mesófilas viables (APHA AWWA WEF, 1998), hongos totales (Krieg, 1984) y actinomicetos (APHA AWWA WEF, 1998), expresadas en ufc/gramo de suelo. La enumeración de *Azotobacter sp* (Burgess, 1960) y *Pseudomonas sp* (APHA AWWA WEF, 1998) se expresó en NMP/g de suelo.

Para la enumeración de *Pseudomonas sp*, se observó como positivo la aparición de un pigmento fluorescente al exponer el caldo de cultivo a luz UV (figura 5a). Para el caso de *Azotobacter*, se consideraron tubos positivos aquellos que presentaron velo en la superficie del medio (Zapater, 1975).

Para la detección de micorrizas en las raíces de plantas de tara, éstas se separaron de la parte aérea y se lavaron, siendo luego colocadas en tubos de ensayo; aplicándoles después hidróxido de potasio (KOH) al 10%, dejándolas así por 7 días a temperatura ambiente. Como las raíces de tara presentaban una pigmentación muy fuerte, estas fueron calentadas por 10 minutos a una temperatura de 60 – 70°C y luego se las volvió a remojar en KOH hasta que las raíces se aclararon. Luego de una decantación, las raíces fueron enjuagadas con agua destilada, en seguida, se aplicó ácido clorhídrico (HCl) al 10% y se agitó vigorosamente, para una buena neutralización del KOH, hasta que las raíces tomaron un color blanquecino - transparente. Finalmente el HCl fue decantado y las raíces fueron enjuagadas con agua, aplicándose el colorante tripan blue al 0.1% en lactofenol por dos días. Luego, el colorante fue decantado y las raíces se enjuagaron con lactofenol para extraer el exceso de colorante y preservarlas. Para evaluar la infección por micorrizas, las raíces se montaron con agua en láminas portaobjetos, observándose después al microscopio (Sieverding, 1983).

Aislamiento de rizobios a partir de nódulos

En la zona de muestreo (rizósfera de árboles de tara) ubicada en el Fundo Canchacaya se encontraron nódulos, los que fueron sometidos al siguiente tratamiento para el aislamiento de rizobios. Se seleccionaron los nódulos más grandes, siendo colocados en sobres de papel de filtro para su posterior hidratación en agua destilada estéril por 30 minutos. Cumplido

este tiempo, los nódulos fueron desinfectados en alcohol de 70° y se siguió el protocolo según el manual del CIAT (1987). Con ayuda de pinzas estériles se abrieron los sobres que contenían los nódulos y se colocaron en placas Petri estériles agregándole una gota de agua destilada estéril por nódulo. Luego, con ayuda de una bagueta se procedió a la maceración del nódulo (utilizando una bagueta diferente para cada nódulo), a partir del macerado se sembró en placas Petri con Levadura Manitol Agar (LMA) con el colorante rojo congo por estrías paralelas. Estas se incubaron a 28°C por un período de 2 a 4 días. Una vez observado el crecimiento se procedió a elegir los posibles rizobios teniendo en cuenta la morfología de cada una de las colonias. Después de esto se llevaron a cabo varios reaislamientos de las colonias obtenidas hasta observar un crecimiento puro y homogéneo. Se evaluaron sus características y se realizó una tinción Gram para observar su morfología.

Las cepas aisladas tanto de nódulo, como del suelo donde se encontraban las plantaciones de "tara" fueron sembradas en los medios Agar Lactosa Levadura (LLA), Peptona Glucosa (PG) (CIAT, 1987) y Luria Bertani (LB), para verificar la pureza de las cepas aisladas. La siembra de las bacterias en LLA se utiliza para diferenciar las cepas de rizobios con las de *Agrobacterium*, una bacteria que pertenece a la misma familia pero que no forma nódulos, sino tumoraciones en la planta.

Con cada cepa de rizobio pura y crecidas a una densidad de $10^6 - 10^8$ cel/ml (Prevost et al., 1987; Meissner y Gross, 1980) se inocularon semillas de *Phaseolus vulgaris* "frijol", *Phaseolus lunatus* "pallar", *Medicago sativa* "alfalfa", *Glycine max* "soja" y *C. espinosa* "tara", previamente desinfectadas, germinadas y colocadas en tubos de ensayo con un soporte inerte y solución nutritiva (CIAT, 1987) para observar la formación de nódulos. Se llevaron a un cuarto de plantas a una temperatura de 20° C y un fotoperíodo de 12 horas de luz blanca (dos fluorescentes de 40 watts cada uno) y 12 horas de oscuridad.

Caracterización de los rizobios aislados

Para la determinación de acidez o alcalinidad se sembraron las cepas de rizobios en el medio LMA con azul de bromotimol al 0.5% y se incubaron por 3 a 5 días. Los rizobios de crecimiento más lento producen alcalinidad cuando hay un viraje del medio del verde al azul, mientras que los rizobios de crecimiento rápido producen acidez, cambiando la coloración de verde a amarilla (fig 7). Para las pruebas de pH, Las cepas se sembraron en medio LMA ajustado a pH 4, 5, 7, 8 y 8.8, siendo luego incubadas a 28°C por un período de 7 días, las evaluaciones se realizaron cada 24 horas (Luyo, 1992; Matos, 1994).

En cuanto a las pruebas de temperatura, Las cepas fueron sembradas en medio LMA pH 7 y luego se incubaron a diferentes temperaturas, 8°, 28°, 37° y 40°C, evaluándolas cada 24 horas por un período de 7 a 15 días. (Luyo, 1992; Matos, 1994). Para las pruebas de tolerancia a la salinidad, las cepas se sembraron en el medio LMA con diferentes concentraciones de NaCl, 0.2% (34 mM), 0.5% (85 mM), 0.7% (119 mM), 1% (170 mM), 2% (240 mM), 3% (510 mM) y 4% (680 mM); incubándose luego a 28°C y evaluándose cada 24 horas por una semana.

Aislamiento de *Azotobacter* sp.

Se sembró una asada de los tubos positivos para *Azotobacter* sp. en placas con medio sin fuente de nitrógeno y se dejó incubando a 28°C por un periodo de 24 a 48 horas. Luego se procedió a elegir los posibles cepas de *Azotobacter* sp. teniendo en cuenta la morfología y aspecto de las colonias. Las colonias aisladas se sembraron en un medio para el crecimiento de *Azotobacter chroococcum* modificado con CaCO₃.

Aislamiento y caracterización de actinomicetos

Después de los 15 días de incubación a 28°C, se eligieron las colonias características para actinomicetos, realizándose reaislamientos de las colonias obtenidas en placas petri con agar almidón – caseína y fluconazol al 0.25%, hasta obtener colonias aisladas. Para la caracterización morfológica de los actinomicetos, se observó su aspecto, pigmentación, tamaño y olor característico (geosminas), también se utilizó el microscopio óptico con una lente de inmersión y aceite de cedro, para observar el crecimiento filamentosos, característico de este tipo de bacterias (fig 6).

Aislamiento y caracterización de cepas de *Pseudomonas* sp

Se hizo una selección de los tubos positivos para fluorescencia en luz ultravioleta, siendo sembrados cada uno de estos, en Medio F (Merck, 1994) para distinguir las *Pseudomonas* sp. de otros microorganismos. Las cepas desarrolladas en el medio luego fueron observadas a la luz UV a las 24, 48 y 52 horas de incubación, seleccionándose sólo aquellas que presentaban fluorescencia (fig 5b), luego estas mismas cepas fueron sembradas en Medio P, para determinar la especie de *Pseudomonas* aislada, mediante esta prueba se pudo diferenciar la *P. fluorescens* de la *P. aeruginosa* (fig 5c). Posteriormente se realizaron varias pruebas bioquímicas para caracterizar y seleccionar cepas de *P. fluorescens* del resto de especies de *Pseudomonas*; se incluyeron el crecimiento a diferentes temperaturas (4 y 42°C), degradación de azúcares (trehalosa, inositol y glucosa) y la prueba de la gelatinasa (Atlas, 1990).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características físico químicas del suelo y poblaciones microbianas

Es muy difícil de conceptualizar la calidad del suelo ya que ésta se define en función al uso y manejo de su medio edáfico que favorece determinadas condiciones (suelos agrícolas, forestales, industriales, entre otros); no obstante, debe de tomarse en cuenta también el equilibrio medioambiental y las funciones básicas del suelo en cuanto a productividad y degradación (Doran et al. 1994; Blum, 1998). Desde el punto de vista sostenible y de salud para el agroecosistema, debe definir la capacidad del medio para mantener su productividad biológica, su calidad ambiental, promoviendo además la salud de animales, plantas y hasta del propio ser humano (Doran et al. 1994). Así, los parámetros microbiológicos aportan información relativa a la actividad metabólica que hay en el suelo, pues son los que mantienen una mayor sensibilidad frente a procesos no deseables tales como la contaminación o el mal manejo de este. Es por ello que los efectos de prácticas agrícolas, así como los producidos por fertilizantes y sistemas de cultivo, pueden ser evaluados a partir de las determinaciones de la

biomasa microbiana, su actividad metabólica y el conteo de las poblaciones microbianas más importantes de la microflora del suelo (Acuña et al., 2006).

Los suelos muestreados (tabla 1) de la zona de Ambo, presentan algunas características fisicoquímicas semejantes; siendo suelos franco arenoso con pHs que varían entre ácido (Cachuna Arichaca) a neutro (Canchacaya alta, Canchacaya Baja y Campanikishka). El pH es un factor importante de considerar ya que es determinante en la existencia de ciertos microorganismos (Reyes & Valery, 2007). En cuanto a las cantidades de fósforo y potasio, estas son relativamente altas; teniendo pequeñas variaciones entre los diferentes suelos. Las concentraciones altas de fósforo encontradas, se deben principalmente a la presencia de altos niveles de materia orgánica. Este fósforo al no estar disponible no puede ser utilizado por las bacterias que se encuentran en el suelo, sino que existe como parte de la materia orgánica sin descomponer (tabla 2); esto puede explicar la población relativamente baja a comparación de otros ecosistemas (fig 2).

Los niveles de potasio hallados; así como la conductividad eléctrica obtenida señala que los suelos tienden a presentarse ligeramente, moderadamente y fuertemente salinos (Cachuna Arichaka, Campanikishka y Canchacaya baja, Canchacaya alta, respectivamente), lo que explicaría también las bajas poblaciones microbianas encontradas. Por el contrario, otros autores (Pahuara & Zúñiga 2002 y Calvo, et al. 2008) encontraron en suelos altoandinos, poblaciones bacterianas en mayor número; siendo además un factor importante, el clima de la región, que en este caso en la época de muestreo (febrero) presentaba un periodo seco. El estrés salino es uno de los factores fundamentales por los cuales los microorganismos presentan una limitante para crecer normalmente y así poder alcanzar poblaciones altas, aunque existen bacterias en las que estas condiciones ejercen cambios morfológicos y bioquímicos que les permite adaptarse y resistir estos factores adversos, como la inducción a cambios de los lipopolisacáridos, perfil de proteínas (Zúñiga, 1997) a nivel de su síntesis también, que alteran los procesos de infección y nodulación en simbioses adaptados a estos ambientes (Zahran et. al., 1994). Muchas de las bacterias del suelo no presentan esta capacidad de adaptación.

En cuanto a las rizosferas, se muestrearon las raíces de árboles de tara de 3 años de edad que ya habían producido desde el primer año de vida y también de una especie silvestre ubicados en el lote A y B pertenecientes a Cachuna Arichaca y Campanikishka. En esta última se encontraron nódulos en las raíces circundantes a la planta; no observándose alrededor de ésta ninguna otra leguminosa. Otros nódulos se encontraron en raíces circundantes a otro árbol de tara silvestre del mismo lote, este hallazgo difiere con el reporte de TECNIDES (1994), en el que se señala que en todas las exploraciones realizadas en raíces de plantas madres de tara, así como en raíces de plántulas que se encontraban debajo de ellas, no se visualizó la presencia de nódulos formados por rizobios. Dado que, durante este trabajo no se han logrado autenticar estas cepas de rizobios en plántulas de tara, no se podría confirmar que los nódulos encontrados pertenezcan a esta planta.

En el presente estudio, las poblaciones de bacterias mesófilas, en todas las muestras, estuvieron en el orden de 10^6 ufc/g suelo. En los lotes A y B (Cachuna Arichaca y Campanikishka) se observó un incremento de la mayoría de las poblaciones microbianas en las muestras tomadas a 15 cm de profundidad en comparación a las obtenidas a 30 cm que presentaron

una población relativamente más baja (fig 1), sin embargo, las poblaciones bacterianas mesófilas fueron ligeramente mayores a 30 cm de profundidad, Esto no concuerda con lo mencionado por Murali et. al. (2005) quienes registraron una mayor población de bacterias a 25 cm de profundidad con respecto a 50 cm de suelo muestreado en árboles de palmera. Los actinomicetos se encontraron en orden de 10^3 ufc/g de suelo seco a 15 cm, no observándose presencia a 30 cm de profundidad. Por otro lado, en raíces y rizósfera de las zonas de Canchacaya se encontró una población de actinomicetos de 10^4 ufc/g, superando notablemente a las poblaciones encontradas en suelos solos. La población de *Azotobacter*, se mostró ausente en el lote A ubicada en la zona de Cachuna (fig 2), encontrándose poblaciones regularmente bajas (en el orden de 10^2) en las demás muestras analizadas, en comparación a lo señalado por Cisneros et al. (2000), Jaime et al. (2000) y Pahuara & Zúñiga (2002) quienes encontraron valores alrededor de 10^3 NMP/g de suelo, lo cual puede estar influenciado por el pH del suelo, ya que este género crece generalmente en medios alcalinos, mientras que la zona de estudio mostró pHs ligeramente ácidos.

Además de los géneros descritos anteriormente, las pseudomonas también se encontraron en número relativamente bajo que osciló entre 10 y 10^2 , lográndose aislar estos microorganismos en todas las muestras analizadas (fig 1).

Curiosamente la población de hongos estuvo alrededor de 10^4 ufc/g siendo las muestras de raíces las que albergaron las mayores poblaciones en comparación a las demás muestras. Los hongos fueron encontrados en número moderado identificándose géneros comunes del ambiente (fig 4), coincidiendo algunas especies con lo reportado por Jiménez (1990). Entre los géneros que presentaron mayor número en todos los aislamientos se encontraron, *Acremonium* spp, *Aspergillus* spp y *Penicillium* spp, reportándose con capacidad solubilizadora de fosfato (Agnihotri, 1970; Gómez, 2004). Por otro lado, en las raíces obtenidas de los almácigos no se encontró asociación con hongos micorríticos, (aunque existe información no publicada en Cajamarca que sí se ha podido encontrar esta asociación).

De los resultados obtenidos anteriormente; podemos decir que todas las muestras analizadas, presentaron en general, una mayor población microbiana en las zonas cercanas a las raíces de los árboles o plántulas de tara; esto debido a que estas zonas, además de estar más cerca de la superficie externa y permitir un mayor intercambio de O_2 en el suelo, importante para el crecimiento de los microorganismos estudiados, presentan una alta concentración de exudados radiculares, que no sólo le permite a la planta poder asimilar los nutrientes del suelo, sino que sirven también como fuente de sustratos para los microorganismos que habitan en él; promoviendo a su vez la quimiotaxis de estos últimos hacia la rizósfera e inclusive hacia la misma raíz (Dakora & Philips, 2002), mediante compuestos químicos como flavonoides (Caetano et. al., 1988), ácidos aromáticos (Parke et. al., 1985), aminoácidos y ácidos dicarboxílicos (Barbour & Stacey, 1991); lográndose generar un conjunto de asociaciones entre las diferentes comunidades microbianas que habitan el suelo y la planta. Los suelos de esta zona, mantienen una moderada densidad poblacional con una diversidad de géneros microbianos. No obstante el número de microorganismos se encuentra dentro del límite inferior de los estándares indicados para suelos no tropicales (Parkinson, 1987).

Caracterización simbiótica y bioquímica de rizobios

De cinco nódulos encontrados en raíces circundantes a la rizósfera de tara y de siete nódulos obtenidos de la autenticación de muestras de suelo en pallar, se aislaron once posibles cepas de rizobios: dos pertenecientes a la zona de Cachuna Arichaca y dos a Campanisquishka; asimismo de las zonas de Canchacaya alta y baja se aislaron siete posibles cepas de rizobios. Cuatro de las cepas resultaron ser bacilos Gram negativos con características morfológicas típicas de rizobios.

Luego, dichas cepas fueron autenticadas en frijol, pallar, soya y alfalfa para evaluar su capacidad de nodulación. Las cuatro formaron nódulos (Nod+) en plántulas de *P. vulgaris* var. Canario camanejo y sólo dos de ellas (rP2N3 y br P3N4) nodularon *P. lunatus* var. Baby. La plantas de *M. sativa* y *G. max* y *C. spinosa* no nodularon (Nod-) con ninguna de las cepas probadas (tabla 3).

Las cepas de rizobios son diferenciadas por su tiempo de crecimiento y viraje de color en el medio LMA con azul de bromotimol, en donde el género *Rhizobium* incluye cepas de crecimiento rápido y que a su vez producen metabolitos ácidos (viraje a amarillo), mientras que las cepas de *Bradyrhizobium* posee crecimiento lento (5 a 7 días) y producen metabolitos alcalinos (viraje azul) (fig 7). Las colonias fueron, además, evaluadas fenotípicamente en tamaño, textura, apariencia y presencia de goma. De las bacterias evaluadas; el 50% fueron ubicadas en el género *Rhizobium* spp y 50% al género *Bradyrhizobium* spp (tabla 3).

Se evaluó también el efecto del pH, temperatura y porcentaje de cloruro de sodio en el crecimiento de las cepas de rizobios. Se observó un buen crecimiento de la mayoría de las cepas en todos los niveles de pH, a excepción de la cepa rTN3(3) que no creció a pH alcalino; mientras que la cepa brTN3(1) no creció a pH 4 (tabla 4). Estos resultados fueron diferentes a los encontrados por Pahuara y Zúñiga (2002) quienes observaron un crecimiento limitado de cepas de rizobios a pH bajos (4 y 5). Hay que tener en cuenta que la acidez es un factor limitante en la supervivencia de los rizobios, por lo que encontrar cepas que se desarrollen bien en estas condiciones resulta de gran importancia cuando se trata de inoculantes.

En la prueba de tolerancia al NaCl, se observó que sólo una cepa pudo crecer a una concentración del 1% (170 mM), dos cepas crecieron sólo a 0.2% y las restantes no crecieron en ninguno de los niveles de NaCl. Estos resultados difieren con lo encontrado por Luyo (1992); también Mayo & Hernández (2002) encontraron que cepas de *Bradyrhizobium* y *Rhizobium* crecieron a concentraciones de 3 y 2% NaCl respectivamente. La importancia de esta prueba es encontrar cepas tolerantes a la salinidad capaces de poder generar interacciones simbióticas efectivas en condiciones de estrés salino, es interesante considerar la tolerancia del microsimbionte en vida libre, para evaluar la inhibición de la nodulación y fijación de nitrógeno en leguminosas bajo estas condiciones (Zahran & Sprent, 1986; Rai, 1987, Craig et. al., 1991). En cuanto al efecto de la temperatura, todas las cepas crecieron bien a 28°C, sólo una cepa creció a 37°C y ninguna creció a 8°C (tabla 4), estos datos se contraponen con lo encontrado por Pahuara y Zúñiga (2002) quienes encontraron cepas de *Rhizobium* que crecieron a 8°, 28° y 37°C pero no a 40°C.

Aislamiento de cepas de *Azotobacter* sp. y actinomicetos

Las muestras de suelo positivas para *Azotobacter* sp formaron un velo característico en el medio líquido utilizado, luego de sembradas en un medio sólido sin fuente de nitrógeno, se observaron colonias características, seleccionándose las que presentaban un aspecto particular mucoso y brillante. La presencia de quistes fue evidenciado a nivel microscópico, característico del genero de *Azotobacter* sp. (Beijerinck, 1901; Winogradski, 1938). Estas bacterias fueron sembradas en un medio de cultivo para *A. chroococcum* modificado con CaCO_3 . Este reactivo permite detectar colonias de *Azotobacter*, debido a que ellas no producen ácido en este medio a diferencia de otras bacterias que sí lo hacen. El CaCO_3 tiene una buena capacidad tampón alcalina la que es necesaria para el desarrollo de *A. chroococcum*.

Al igual que los demás microorganismos, los actinomicetos son indicadores de la fertilidad del suelo; que a su vez han demostrado tener la capacidad para producir antibióticos (Davelos et. al., 2004) y antimicóticos (Jung & Byung, 2002), cuya inoculación podría combatir las plagas de algunos cultivos. En el presente trabajo se aislaron 8 cepas distintas de actinomicetos que difirieron en color y morfología (fig 6), seleccionándose luego, una de las más frecuentes para ensayos posteriores de germinación en diferentes especies vegetales.

Aislamiento y caracterización de cepas de *Pseudomonas* sp.

De todas las muestras de suelo y raíces tomadas, se aislaron 70 posibles cepas de *Pseudomonas* sp. a las que se les sembró en medio F para descartarlas de las enterobacterias (Merck, 1994), de todas las cepas sembradas, sólo 13 crecieron en este medio entre las 20 y 24 horas de incubación y presentaron fluorescencia verde o azul al ser observadas en luz ultravioleta (tabla 5 y fig 5).

Luego se realizó una caracterización fenotípica y bioquímica para diferenciar entre especies de pseudomonas: *P. fluorescens*, *P. putida* o *P. aeruginosa*; es importante entonces diferenciar las bacterias que sean potencialmente benéficos para las plantas y que no sean dañinos para el hombre (Pedersen et. al., 1970; Von Graevenitz & Weinstein, 1971). Por ello, se sembraron las cepas en el medio P para ver producción de pioverdina y piorrubina, que distingue a la *P. aeruginosa* de las otras dos cepas, las cepas también fueron sembradas en distintas fuentes de carbohidratos, incubadas en dos niveles de temperatura (4 y 42°C), y en el medio Kellman (método utilizado en el laboratorio de bacteriología del CIP para distinguir *P. fluorescens* de *P. putida* por la pigmentación). Las *P. fluorescens* no generan piorrubina ni pioverdina, por lo que pueden crecer en el medio P formando colonias blancas, no azules ni verdes como correspondería a una cepa pioverdina positiva, además también tienen la capacidad de crecer a 4°C, degradar glucosa, trehalosa e inositol (Atlas, 1990) y en el medio de Kellman forman colonias blancas; lo que las distingue de las *P. putida* que viran el medio a marrón. Por las características de pigmentación y crecimiento se determinaron 2 cepas de *P. aeruginosa*, 6 de *P. fluorescens*, 4 de *P. putida* y 1 que no se logró identificar. Estas pruebas bioquímicas sirven para poder hacer una distinción preliminar de las bacterias aislados y se recomienda realizar una caracterización molecular posterior.

CONCLUSIONES

1. Las poblaciones microbianas fueron mayores en la rizósfera de plantas de “tara” respecto a las del suelo. Las bacterias mesófilas estuvieron en el orden de 10^6 ufc/g, mientras que las poblaciones de hongos y actinomicetos oscilaron entre de 10^2 y 10^4 ufc/g suelo. Las poblaciones de *Azotobacter* se encontraron alrededor de 10 y 10^2 . Las poblaciones de pseudomonas oscilaron entre <10 a 10^2 NMP/g de suelo. No se detectaron raíces micorrizadas en ninguna de las muestras evaluadas.
2. Se aislaron y caracterizaron bioquímicamente 4 cepas de rizobios, 2 *Rhizobium* spp. y 2 *Bradyrhizobium* spp., 13 cepas de pseudomonas, que según sus características se aproximan a *P. aeruginosa* (2), *P. putida* (4) y *P. fluorescens* (6); además se obtuvieron 3 cepas de *Azotobacter* y 8 cepas de actinomicetos.
3. La cepa de *Rhizobium* rP2N3 destacó por crecer tanto en pH ácido como alcalino, siendo además la única que creció a niveles de NaCl de hasta el 1% en comparación de las demás cepas que mostraron sensibilidad a esta sal. Todas las cepas probadas mostraron sensibilidad a los diferentes niveles de temperatura probados (8, 37 y 40°C).
4. Todas las cepas de rizobios aisladas formaron nódulos en plántulas de frijol. Sólo las cepas rP2N3 y brP3N4 nodularon en pallar. Ninguna de las cepas de rizobios nodularon plántulas de tara, soya y alfalfa a nivel de laboratorio.
5. Por todas las poblaciones microbianas encontradas en este estudio, los suelos de Ambo (Huanuco) pueden ser considerados de ligero a medianamente fértiles y por lo tanto, podrían sostener parcialmente el crecimiento del cultivo de tara.

AGRADECIMIENTOS

Concytec-procyt, FDA Biol-111 / UNALM. Dra. Consuelo Arellano por la revisión del abstract.

BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, O., W. Peña, E. Serrano, L. Pocasangre, F. Rosales, E. Delgado, J. Trejos & A. Segura. 2006. La importancia de los microorganismos en la calidad y salud de suelos. Artículo publicado en el marco de la VIII Reunión Internacional de Asociación para la Cooperación en la Investigación Sobre Banana en el Caribe y en América Tropical. 15 - 20 Octubre. 222 – 233. Joinville – Santa Catarina – Brasil.
- Agnihortri, V. P. 1970. Solubilization of insoluble phosphatase by some soil fungi isolated from nursery seedbeds. *Can. J. Microbiol.* 16: 877 – 880.
- Alexander, M. 1980. Transformaciones microbianas del fósforo. AGT editor. Introducción a la microbiología del suelo. 355 – 371. México.
- Alstrom, S. & R. Burns. 1989. Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. *Biol. Fert. Soils* 7: 232 – 238.
- APHA. AWWA, WEF. 1998. Standard Methods of Examination of Water and Wastewater. 20 th Ed. Washington DC.

- Atlas, R. 1990. Microbiología: fundamentos y aplicaciones. Edit. Continente. México.
- Barbour, W. M., D. R. Hattermann & G. Stacey. 1991. Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2635 – 2639.
- Beijerinck, N. W. 1901. Ueber oligonitrphile mickroben zentralhl. Bakteriol parasitenk infektiensk. *Hyg. Abt.* II. 7: 561 - 582.
- Blum, W. E. H. 1998. Problems of soil coservation. *Council of Europe, Strasbourg. Nature and Environmental.* Series 39: 62
- Burges, A. 1960. Introducción a la microbiología de suelos. Editorial Acribia. Zaragoza
- España Caetano, A. G., C. Estes D. K. & D. W Bauer. 1988. Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requieres functional nodulation genes. *J. Bacteriol.* 170: 3164 – 3169.
- Calvo, P., L. Reymundo & D. Zúñiga. 2008. Estudio de las Poblaciones Microbianas de la rizosfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Ecología Aplicada* 7: 141-148.
- Carrillo, G., J. Juárez, D. Ruiz & R. Müller. 2000. Aumento del rendimiento de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) cuando la raíz se desarrolla colonizada por microorganismos. *Biotec. Apl.* 17 (1, 2): 171 – 176.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1987. Simbiosis leguminosa – rizobio. Manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico. Colombia.
- Cisneros, J., J. Macaro, H. Ricci, C. Chueca, A. Ganin & F. Medina. 2000. Rizobacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico en grama rhodes (*Chioris gayana*) en el este de Tucumán Argentina. XX Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. 63 – 65. Arequipa.
- Craig, G. F., C. A. Atkins, & D. T. Bell. 1991. Effect of salinity on growth of four strains of *Rhizobium* and their efectivity and effectiveness on two species of acacia. *Plant Soil* 133 (2): 253 – 262.
- Dakora, F., D. Phillips. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low – nutrient environments. *Research Plant and Soil* 245 (1): 35 – 47.
- Davelos, A., L. Kinkel & D. A. Samac. 2004. Spatial Variation in Fequency and Intensity of Antibiotic Interactions among *Streptomycetes* from Prairie Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2): 1051 – 1058.
- Doran, J. W.; D. C. Coleman, D. F. Bezdicsek & B. A. Stewart. 1994. Defining soil quality for a sustainable environment. SSA Sp. Pub. 35. Madison.
- Enebak, S. A., G. Wei & J. W. Klopfer. 1998. Effects of Plant Growth – Promoting Rhizobacteria on Loblolly and Slash Pine Seedlings. *Forest Science* 44 (1): 139 - 144.
- Essaid, A. B., A. Belarb, C. Hachet, J. Nowak & J. C. Audran. 2000. Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth – promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiology Letters* 186 (1): 91 – 95.
- Gómez, Y. 2004. Actividad de las fosfatasas ácidas y alcalinas (extracelulares e intracelulares) en hongos de la rizósfera de *Arachis hypogaea* (Papiloneaceae). *Revista de biología tropical* 52(1): 287 – 295.
- Jaime, M., G. Martín, E. Valdora, C. Chueca., P. Mascaro, J. Cisneros & L. Martinez. 2000. Presencia de microorganismos fijadores de nitrógeno atmosférico en plantaciones de

- Leucaena leucocephala* (Lamarck) De Wit, en un sistema de producción silvopastoril. XX Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. 59 – 61. Arequipa
- Jimenez, R. N.** 1990. Estudio de microorganismos en suelos de Lambayeque, Perú. Boletín de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Biológicas de la UNPRG.
- Jung, Y. L. & K. H. Byung.** 2002. Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can. J. Microbiol* 48 (5): 407 – 417.
- Krieg, N. R. & J. Dobereiner.** 1984. Genus *Azospirillum*. En: Bergery's manual of systematic bacteriology. 94 – 103. Baltimore.
- León, S.** 1998. Identificación de cepas de *Rhizobium* mediante la técnica de antibióticos. Tesis de Biología. UNALM. Lima-Perú.
- Loper, J. & M. Scroth.** 1986. Influence of bacterial source of indole – 3 – acetic acid on root elongation of sugar beet. *Physiol. Biochem.* 76: 386 – 389.
- Luyo, C.** 1992. Aislamiento, purificación, autenticación y selección de cepas eficientes de *Rhizobium leguminosarum* en dos variedades de *Phaseolus vulgaris* (bayo y canario PF – 210) in vitro. Tesis de Biología. UNMSM.
- Matos, G.** 1994. Aislamiento de *Rhizobium* de diferentes variedades de *Phaseolus lunatus* y estudio de su eficiencia en la productividad de la leguminosa. Tesis de Biología. UNALM. Lima-Perú.
- Mayo, H., J & Q., J. Hernández.** 2002. Inefectividad y efectividad de cepas nativas de rizobios aisladas de la provincia de Ica en *Phaseolus lunatus* “pallar” var. Criollo Iqueño y var. Sieva. Tesis de Biología. Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica.
- Meissner, C. A. & D. H. Gross.** 1980. Some guidelines for the evaluation of the need for and response inoculation of tropical legumes. North Caroline Agricultural Research Service. Raleigh. USA.
- Merck.** 1994. Manual de Medios de cultivo. E. Merck. Darmstadt – Alemania. 364 p.
- Mishra, A. & M. A. Choudhuri.** 1998. Monitoring of Phytotoxicity of lead and mercury from germination and early seedling growth indices in two rices cultivars. *Water, Air, and Soil Pollution* 114 (3, 4): 339 – 346.
- Murali, G., G. Alka & R. V. Nair.** 2005. Variations in hosting beneficial plant associated microorganisms by root (wilt) diseased and field tolerant coconut palms of West Coast Tall variety. *Current Science* 89 (11): 1922 – 1926.
- Olalde, P. V. y L. L. Aguilera.** 1998. Microorganismos y Biodiversidad. *Terra* 16 (3): 289 – 292.
- Pahuara, D. & D. Zúñiga.** 2002. Efecto del fósforo sobre la población microbiana en suelos con pasturas en la zona altoandina de Junín. *Ecol. Apli.* 1(1): 57 – 64.
- Parke, D., Rivelli M. & Ornston.** 1985. Chemotaxis to aromatic and hydroaromatic acids; Comparison of *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium trifolii*. *J. Bacteriol.* 163: 417 – 422.
- Parkinson, D.** 1987. Ecology of soil microorganisms. Adlard & son Ltd. Bartholomew Press. Oxford.
- Pendersen, M. M., E. Marso & M. J. Pickett.** 1970. Nonfermentative bacilli associated with man. III Pathogenicity and antibiotic susceptibility. *Amer. J. Clin. Pathol.* 54: 178 – 192.

- Prevost, D., L. M. Bordelau & H. Antun. 1987. Symbiotic effectiveness of indigenous arctic rhizobia on a temperature forage legume Saifon (*Onobrychis vicifolia*). *Plant and Soil* 104: 63 -69.
- Rai, R. 1987. Chemotaxis of salt - tolerant and sensitive *Rhizobium* strains to root exudates of lentil (*Lens culinaris* L.) genotypes and symbiotic N – fixation, praline content and grain yield in saline calcareous soil. *J. Agric. Sci.* 108: 25 – 37.
- Ramos, E. & D. Zúñiga. 2008. Efecto de diferentes inoculantes sobre la actividad microbiana en la rizósfera del cultivo de pallar (*Phaseolus lunatus* var. *sieva*) en condiciones de campo. *Ecol. Apl.* 7 (1, 2): 131-139.
- Ramos, E. & D. Zúñiga. 2008. Efecto de la humedad, temperatura y ph del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio. *Ecol. Apl.* 7 (1, 2): 123-130.
- Reyes, I. & A. Valery. 2007. Efecto de la fertilidad del suelo sobre la microbiota y la promoción del crecimiento (*Zea mays* L.) con *Azotobacter* spp. *Bioagro* 19 (3): 117-126.
- Sieverding, E. 1983. Manual de métodos para la investigación de la micorriza vesículo – arbuscular en el laboratorio. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) – Proyecto Micorriza.
- Stewart, W. D. P. 1991. The importante to sustainable agricultura of biodiversity among invertebrates and microorganisms. In: D. L. Hawksworth (ed). The biodiversity of microorganisms and invertebrates: Its role in sustainable agricultura. Redwood Press. 3 – 5. Melksham - UK.
- Tang, M. 1995. Efecto de la inoculación de con *Azotobacter chroococcum* en la germinación y en la altura de las plántulas en dos leguminosas y dos gramíneas. *Pastos y forrajes*. 18 (2): 45 – 150.
- Tate, R. L. 1995. *Soil microbiology*. John Wiley & Sons., New York – USA.
- TECNIDES - Asociación Tecnología y Desarrollo. 1994. Estudio sobre Cultivos in vitro de “tara” (*Caesalpinia spinosa*). Lima, Perú.
- Von, Graevenitz A. & J. Weinstein. 1971. Pathogenic significance of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. *Yale J. biol. Med.* 44 (3): 265 – 273.
- Winogradsky, S. 1938. Sur la morphologie et l’oecologie des *Azotobacter*. *Ann. Inst. Pasteur.* Paris 60: 351 – 400.
- Zahran, H. H. & J. E. Sprent. 1986. Effect of sodium chloride and polyethylene glycol on root – hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*. *Planta* 167 (3): 303 – 309.
- Zahran, H. H. Räsänen., M. Karsisto, y K. Linström. 1994. Alteration of lipopoly-saccharide and proteína profiles in SDS – PAGE of rhizobia by osmótica and heat stress. *World J. Microbiol. Biotech.* 10: 100 – 105
- Zapater, J. 1975. Evaluación en el maíz del coeficiente rizósfera – suelo (R/S) referidos a bacterias libres fijadoras de N₂. *Anales Científicos UNALM* 13: 45 – 57.
- Zúñiga, D. & Gutiérrez – Correa, M. 1982. Dinámica poblacional de diazótrofos libres fijadores de nitrógeno en la rizósfera de *Sicyos baderoa*. *Zonas Áridas* 2: 79 – 86.
- Zúñiga, D. 1997. Contribución relativa de los simbiosntes en la fijación de nitrógeno por *Phaseolus vulgaris* en condiciones de estrés salino. Tesis Doctoral. 302 pp. Universidad de Granada. España.

Tabla 1. Lugares de muestreo de plantaciones de "tara"

Lugar	Código	Altitud (msnm)	Temperatura a 15 cm de profundidad (°C)	Temperatura a 30 cm de profundidad (°C)	Tipo de plantación	Edad del cultivo
Cachuna Arichaca	A1	2100	18.9	22.2	Introducida	3 años
Cachuna Arichaca	A2	2100	15.6	17.8	Silvestre	-
Campanikishka	B1	2200	18.9	17.8	Introducida	3 años

Tabla 2. Características fisicoquímicas de los suelos de los campos muestreados en cuatro lugares de muestreo

	Cachuna Arichaca	Campanikishka	Canchacaya alta	Canchacaya baja
pH (promedios)	6.3	6.9	7.4	7.2
C.E (dS/m)	1.20	3.50	4.24	3.66
CaCO ₃ (%)	0.00	0.00	0.00	0.00
M.O (%)	6.4	9.2	6.4	4.5
P (ppm)	56.2	73.2	114.6	119.4
K (ppm)	747	1560	1372	1462
Arena (%)	58	64	56	58
Limo (%)	30	30	38	38
Arcilla (%)	12	6	6	4
Clase Textural	Franco arenoso	Franco arenoso	Franco arenoso	Franco arenoso
CIC (me/100g)	22.40	24.32	19.20	14.08
Ca ² (me/100g)	9.88	11.36	15.37	11.33
Mg ² (me/100g)	2.81	2.84	2.56	1.78
K (me/100g)	1.14	1.56	1.13	0.91
Na (me/100g)	0.42	0.09	0.15	0.07
Al ³⁺ +H (me/100g)	0.00	0.00	0.00	0.00

Tabla 3. Caracterización morfológica y simbiótica de cepas nativas de rizobios aisladas de Huanuco

Genero	Cepas	Zona de Muestreo	Tamaño (mm)	TC* (días)	Caracterización Morfológica				Caracterización simbiótica	
					LMA + ABT reacción	Textura	Apariencia	Presencia de Goma	Nod+	Nod-
Rhizobium	rP2N3	Canchacaya baja	5	2 – 3	ácida	cremosa	opaca	abundante	frijol, pallar	tara, alfalfa, soya
Bradyrhizobium	brP3N4	Canchacaya alta	1.5	5	alcalina	cremosa	opaca	lig. abundante	frijol, pallar	tara, alfalfa, soya
Rhizobium	rTN3(3)	Cachuna Arichaca	4	3	ácida	ligosa	brillante	abundante	frijol	tara, alfalfa, soya
Bradyrhizobium	brTN3(1)	Campanikishka	0.5	6	alcalina	cremosa	brillante	escasa	frijol	tara, alfalfa, soya

Tabla 4. Efecto del pH, %NaCl y Temperatura sobre el crecimiento (mm) de las cepas nativas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* spp aisladas de Huanuco

Cepas	pH					NaCl (%)								Temperatura (°C)			
	4	5	7*	8	8.8	0.02*	0.2	0.5	0.7	1	2	3	4	8	28*	37	40
rP2N3	7.0	9.0	12.0	8.0	12.0	8.0	3.0	5.0	5.0	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	12.0	0.0	0.0
brP3N4	2.0	3.0	2.0	3.0	2.0	4.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	3.0	0.0
rTN3(3)	4.0	4.0	3.0	ND	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	0.0	0.0	
brTN3(1)	0.0	2.0	2.0	2.0	2.0	3.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	

Tabla 5. Caracterización fenotípica y bioquímica de cepas nativas de *Pseudomonas* spp aisladas del suelo, raíz y rizósfera de *Caesalpinia spinosa* en la zona de Huánuco

Cepa	Lugar de procedencia	Medio F fluorescencia	Medio P pigmentación	Crec. a 4°C	Crec. a 42°C	Degrad. Trehalosa	Degrad. Inositol	Degrad. Glucosa	Viraje en M. Kellman	Especie relacionada
ps68	Almacigo (raíz)	+	azul verdoso	+/-	+	+	+	+	azul	<i>P. aeruginosa</i>
ps58	Almacigo (rizósfera)	+	blanco	+	-	+	+	+	blanco	<i>P. fluorescens</i>
ps57	Almacigo (rizósfera)	+	blanco	+	-	-	+	+	blanco	<i>P. fluorescens</i>
ps52b	Almacigo (raíz)	+	blanco	+	-	+	+	+	marrón	<i>P. putida</i>
ps52a	Almacigo (raíz)	+	blanco	+	-	+	+	+	marrón	<i>P. putida</i>
ps47	Canchacya alta (raíz)	+	blanco	+	-	+	+	+	marrón	<i>P. putida</i>
ps69	Almacigo (raíz)	+	azul verdoso	-	+	+	+	+	azul	<i>P. aeruginosa</i>
ps41	Campanikishika	+	blanco	+	-	+	+	+	blanco	<i>P. fluorescens</i>
ps26	Cachuna Arichaca	+	blanco	+	-	+	+	+	blanco	<i>P. fluorescens</i>
ps9	Cachuna Arichaca	+	blanco	+	-	+	+	+	azul	no identificada
ps35	Campanikishika	+	blanco	+	-	+	+	+	blanco	<i>P. fluorescens</i>
ps8	Cachuna Arichaca	+	blanco	+	-	+	+	+	blanco	<i>P. fluorescens</i>
ps53	Almacigo (raíz)	+	blanco	+	-	+	+	+	marrón	<i>P. putida</i>



Figura 1. Mapa del departamento de Huanuco, provincia de Ambo. La zona de muestreo está señalada en rojo.

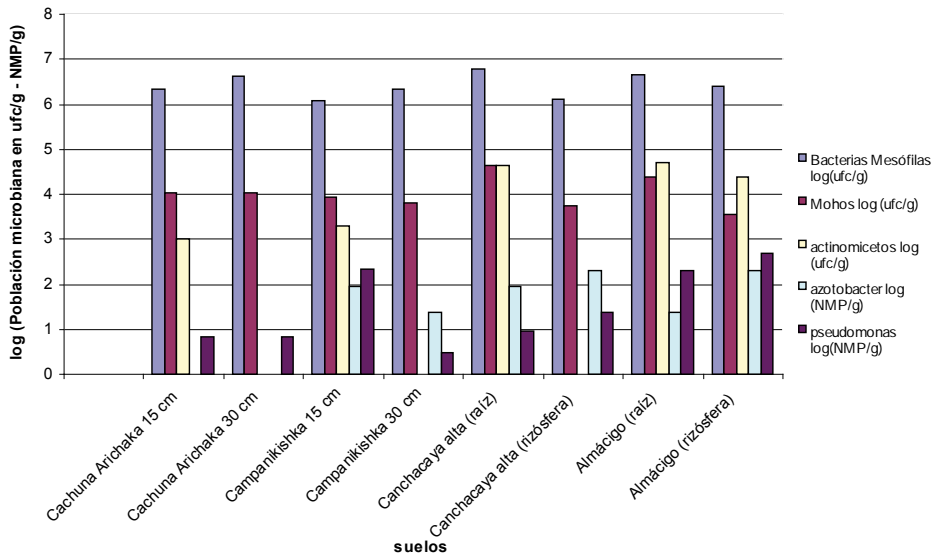


Figura 2. Poblaciones microbianas en las diferentes zonas muestreadas.



Figura 3. Recuento de aerobios mesófilos viables en medio plate count, (provincia de Ambo – Huánuco)



Figura 4. Diversidad de mohos en un suelo muestreado de la provincia de Ambo, Huánuco



Figura 6. Detección de *Pseudomonas* en suelos, por fluorescencia con luz UV en caldo asparagina (a), bioquímicas para la confirmación de *Pseudomonas fluorescens* (b) y *P. aeruginosa* (c) utilizando medio F y P respectivamente, (Provincia de Ambo, Huánuco)



Figura 6. Aislamiento de actinomicetos en medio almidón caseína provenientes de suelo de Ambo - Huánuco

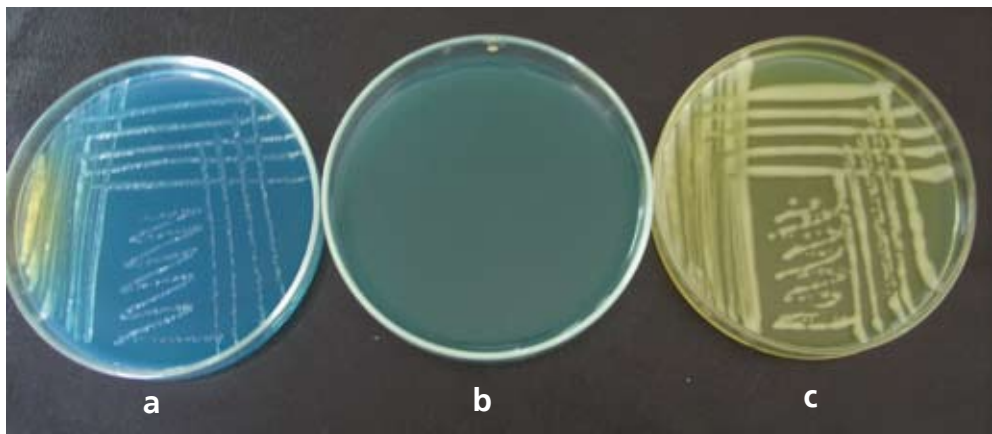


Figura 7. Bioquímica de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* spp. en medio LMA con azul de bromotímol, alcalinidad (a), medio control (b) y acidez (c)