



# REUNIÓN NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA

## REDBIO - Bolivia

### Intercambio de experiencias en Biotecnología Aplicada



# MEMORIA

Cochabamba 28 y 29 de julio de 2022

Evento realizado con el apoyo de



**ACADEPEC**  
Academia de Postgrado y Educación Continua



**AVICENA**  
IMPORT-EXPORT  
EQUIPOS E INSUMOS MÉDICOS Y DE LABORATORIO



**BIO SCIENCE**  
LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN



## PRESENTACIÓN

Desde la Primera Reunión Nacional de Biotecnología, llevada a cabo en 1992, el desarrollo de esta disciplina en el país ha mostrado importantes avances, los mismos que se ha podido apreciar nítidamente en esta VII Reunión Nacional de Biotecnología.

El aglutinar diferentes áreas en una misma Reunión, como es el caso de microbiología industrial, microbiología agrícola, biología molecular y cultivo de tejidos vegetales ha evidenciado la contribución significativa de cada una de ellas al desarrollo del país, siendo la casi totalidad de las investigaciones, realizadas en las Universidades del Sistema Universitario Boliviano, así como por los principales centros de investigación nacionales como es el caso de la Fundación PROINPA y el Centro Pairumani y colegas de la región, aglutinados en REDBIO-Bolivia.

La valiosa participación de destacados investigadores amigos, que trabajan o son provenientes de Colombia, Dinamarca, Bélgica, México, Uruguay y Perú ha realizado muy significativamente esta VII Reunión Nacional

Asimismo, la sinergia entre colegas que, agrupados en REDBIO desde sus inicios ha permitido, una vez más, generar este tipo de reuniones que en esta oportunidad ha contribuido a intercambiar opiniones entre más de setenta participantes.

El Colegio de ingenieros Agrónomos y Profesionales en Ciencias Agropecuarias de Bolivia, filial Cochabamba ha jugado un rol catalizador para lograr este evento, en clara sinergia con las universidades y los componentes de REDBIO.

Es importante también valorar el rol de entidades como AVICENA y Bioscience, quienes, además de apoyar a la investigación en estas áreas, ha contribuido e impulsado esta experiencia, misma que ha tenido una particular calidad profesional con el valioso apoyo de ACADEPEC.

Como testimonio de estas preciosas 48 horas dedicadas a la Biotecnología en Bolivia queda esta Memoria institucional.

## AGRADECIMIENTOS

El comité Organizador de la VII Reunión Nacional de Biotecnología desea expresar un agradecimiento especial por su valioso apoyo a las siguientes personas:

Maria Mercedes Roca	BioScience Think Tank (empresa consultora)	México
Spiros Agathos	Universidad de Louvaine	Bélgica
Sabina Vidal Macchi	Universidad de la República.	Uruguay
Raúl Blas Sevillano	Universidad Nacional Agraria La Molina	Perú
Lourdes Tapia y Figueroa	Universidad Nacional Agraria La Molina	Perú
Elizabeth Hodson de Jaramillo	Profesora emérita de la Universidad Javeriana	Colombia
José Antonio Castillo Morales	Universidad Yachay Tech, Ecuador	Ecuador
Carla Ximena Colque-Little	Empresa estratégica de semillas (SEDEM) Universidad de Copenhagen	Dinamarca
Gustavo Curutchet	Universidad Nacional de San Martín	Argentina
Alba Marina Cotes Prado	Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA	Colombia
Doris Elizabeth Zúñiga Dávila	Universidad Nacional Agraria La Molina	Perú

Este evento no habría podido ser efectivo sin el valioso apoyo de las siguientes instituciones:

Universidad Mayor de San Simón

Universidad Mayor de San Andrés

Universidad Autónoma Gabriel René Moreno

Escuela Militar de Ingeniería

Universidad Amazónica de Pando

Universidad Técnica de Oruro

Colegio de Ingenieros Agrónomos Filial Cochabamba

Así mismo, deseamos remarcar el valioso auspicio de las siguientes empresas

AVICENA Import – Export

BIOSCIENCE SRL

Academia de Postgrado y Educación Continua (ACADEPEC)

## **COMITÉ ORGANIZADOR**

José Gino Aguirre Villarroel	Presidente del Colegio de Ingenieros Agrónomos Filial Cochabamba, Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias - UMSS
Martha Teresa Ávila Alba	Coordinadora Nacional REDBIO Bolivia
Jorge Ángel Nicolás Quezada Portugal	Instituto de Biología Molecular y Biotecnología. Facultad de Ciencias Puras y Naturales - UMSA
Ingrid Morales Benavent	Universidad Autónoma Gabriel René Moreno
Erick Vladimir Ferrufino Guardia	Centro de Biotecnología – Facultad de Ciencias y Tecnología – UMSS
Felipe Noel Ortuño Castro	Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias – UMSS
Piterd Luis Galindo Flores	Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias – UMSS

## **COMITÉ REVISOR**

José Gino Aguirre Villarroel

Martha Teresa Ávila Alba

Jorge Ángel Nicolás Quezada Portugal

Ingrid Morales Benavent

Erick Vladimir Ferrufino Guardia

Felipe Noel Ortuño Castro

Piterd Luis Galindo Flores

**El contenido de cada uno de estos artículos es enteramente  
responsabilidad de cada uno de sus autores**

## CONFERENCIAS MAGISTRALES

En la VII Reunión Nacional de Biotecnología se presentaron las siguientes conferencias magistrales, al final de la lista está un enlace donde podrás acceder a los videos de las conferencias:

Alba Marina Cotes Prado	La salud vegetal mediada por los microorganismos benéficos
Carla Ximena Colque-Little	<i>In vitro</i> pathogenic/endophytic evaluation of four Aschomycetes related to the quinoa crop
Curutchet Gustavo Andres	Procesos biocatalizados por microorganismos nativos para potencial biorremediación en rios urbanos: un enfoque transdisciplinario
Doris Elizabeth Zúñiga Dávila	Importancia de los microorganismos en la agricultura y producción de inoculantes
Elizabeth Hodson de Jaramillo	Bioeconomía circular y ODS
Erick Vladimir Ferrufino Guardia	Estrategias de biorremediación y fitorremediación
Felipe Noel Ortuño Castro	Mecanismos microbiológicos para mitigar efectos de la actividad agrícola ante el cambio climático
Gabriela Bottani Claros	Ganado Criollo Boliviano: Diversidad genetica y estructura de la población
Ilich Alberto Figueroa Candia	Biotecnología en la protección vegetal y gestión de residuos orgánicos con insectos benéficos
Jheanete Pérez Guzmán	Cultivo de tejidos vegetales in vitro
Jorge Ángel Nicolás Quezada Portugal	Generación de vectores para la caracterización funcional de genes mediante alteración de su expresión génica
Jose Antonio del Castillo	Diversidad y dinámica evolutiva de las proteínas de la cubierta de esporas en especies del orden Bacillales
José Gino Aguirre Villarroel	La estrategia universitaria para impulsar el cultivo del banano y el plátano en las zonas bajas de Bolivia
Lucia Elena Alvarado Arnez	Biotecnología como una necesidad y epidemiología genética como un ejemplo

Marín Condori Mamani	Mejoramiento genético y biotecnología como una herramienta básica para la seguridad alimentaria del país: Estudio de zonificación para el uso de maíz genéticamente modificado en Bolivia
María de Lourdes Tapia y Figueroa	Micropropagación de <i>Stevia rebaudiana</i> en Sistema de Bioreactores de Inmersión Temporal
María Mercedes Roca	Retos y avances en la Biotecnología y la Biología sintética
María Mercedes Roca	Biotecnología agrícola en Bolivia: avances y retos regulatorios
Martha Teresa Ávila Alba	Fundamentos y aplicaciones de los marcadores epigenéticos
Raúl Blas Sevillano	Retos de conservación in situ y uso de las razas de maíz en el Perú
Sabina Vidal Macchi	Fundamentos y aplicaciones de CRISPR-Cas9 en plantas
Sergio Daniel Moreira Ascarrunz	Análisis crítico y propuesta sobre cambios y adiciones al Reglamento Boliviano sobre Bioseguridad (DS24676) para tener un Comité Nacional de Seguridad de la Biotecnología en funcionamiento: una mirada al futuro
Spiros Agathos	Microbial engineering for sustainability

Por solicitud expresa se algunos autores el video de su participación no fue incluido en la carpeta. Ingresa en el siguiente enlace y accede a los videos de las conferencias:

<https://drive.google.com/drive/folders/1RpIB54L-0hBxF2m-8JrjSX9nSYBNIYY?usp=sharing>

## Exposiciones Orales

Micropropagación de Stevia ( <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) a partir de segmentos nodales en medio de cultivo líquido R. Viraca, J. Aguirre, G. Gerónimo, M. Flores .....	1
Micropropagación y aclimatación de <i>Schoenoplectus californicus</i> “totora” destinados a estudios de repoblamiento en el lago Titicaca, C. Ormachea. <sup>1*</sup> , A. Román., J. Quezada.....	6
Propagación <i>in vitro</i> de cacao ( <i>Theobroma cacao</i> L.) nativo via embriogénesis somática, J. Quezada., A. Román. & C. Ormachea.....	10
Optimización de medios de cultivo <i>in vitro</i> para la micropropagación de tuna forrajera ( <i>Opuntia ficus indica</i> L. Mill.), J. Quelca., L. Lazarte, G. Gerónimo & G. Aguirre.....	15
Cultivo <i>in vitro</i> de lavanda ( <i>Lavandula dentata</i> L.) en la etapa de introducción a partir de yemas axilares y apicales, M. Arano.....	20
Germinación <i>in vitro</i> de <i>Epidendrum secundum</i> con diferentes agentes gelificantes y concentraciones de agua de coco, B. Mamani., M. Nova., A. Muriel. & A. Maquera .....	27
Caracterización biológica del fruto <i>Allagoptera leucocalyx</i> (motacuchí), A. Camacho., N. Montellano.....	33
Germinación <i>in vitro</i> de <i>Zigopetalum maculatum</i> con diferentes protocolos de desinfección y adición de agua de coco en el medio de cultivo, B. Mamani. M. Nova, J. Espinal, .....	37
Optimización de medios de cultivo para la micropropagación <i>in vitro</i> de cinco nuevas variedades de plátano ( <i>Musa x paradisiaca</i> L.) proveniente del Centro de Tránsito del INIBAP, G. Gerónimo, J. Aguirre, M. Flores, K. Melgarejo. 43	
Experiencias de micropropagación de plátano ( <i>Musa paradisiaca</i> L.) y banano ( <i>Musa balbisiana</i> L.), G. Gerónimo, G. Ancasí, G. Pérez, J. Pardo, M. Mamani.....	50
Evaluación molecular de genes de resistencia a la antracnosis en seis ecotipos y una variedad de vaina, N. Aguilar, C. Rivera, T. Ávila.....	56
Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Fusarium</i> sp. para la inoculación y selección de tolerancia en 84 familias de maíz de la variedad Pairumani Choclero 2. L. Céspedes, J. Vera, A. Choque .....	60
Efecto de estrés salino (NaCl) e hídrico (PEG 6000) en la germinación de tres variedades de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. L. Quispe, J. Quezada, .....	64
Análisis de comunidades microbianas rizosféricas asociadas a cultivos de cobertura secados con glifosato, J. Escobar, I. García,.....	68
Consortios microbianos nativos para la biodegradación de residuos orgánicos, F. Ortuño, Paúl d'Abzac, N. Ortuño. ....	73
Biomíneralización de estruvita por <i>Chryseobacterium</i> sp. 2CANA <sup>T</sup> para la recuperación de magnesio de la bischofita y fósforo del suero lácteo, V. Gonzales, C. Crespo, M. Álvarez.....	80
Actividad antagónica de filtrados fúngicos frente a <i>Colletotrichum</i> sp., agente causal de la Antracnosis del Mango ( <i>Mangifera indica</i> L.), M. Llanos, C. Crespo, M. Álvarez .....	85
Obtención de Nanopartículas de Óxido de Hierro Procedente de Viruta con Tecnología Bottom – Up, J. Torres.....	91
Desarrollo de un Protocolo para la Evaluación de Microorganismos Fijadores de Nitrógeno y Solubilizadores de Fósforo y Potasio, G. Plata, J. Aguilar.....	102
Las micorrizas (MA) ( <i>Glomus fasciculatum</i> ) y el fósforo en papas nativas, D. Felipez, N. Ortuño.....	108

Uso de <i>Bacillus</i> sp. y técnicas de labranza para la multiplicación de esporas de micorriza arbusculares (MA), O. Flores, I. Figueroa, N. Ortuño. ....	114
Cultivo de <i>Arthrospira máxima</i> (Spirulina) en fotobioreactor condiciones ambientales bajo invernadero Valle Central Cochabamba – Bolivia, J. Quiroz.....	119
Evaluación del rendimiento de biodiesel obtenido a partir de microalgas nativas de la Bahía de Cohana empleando aguas residuales como medio de cultivo a nivel experimental, M. Aguilar. ....	124
Control biotecnológico del mildiu de la quinua, R. Méndez, G. Plata, A. Gandarillas, B. López, N. Hinojosa.....	135
<i>Trichoderma spp.</i> como inductor de resistencias sistémicas a nemátodos en cultivo de papa, O. Cabrera, F. Rojas, N. Ortuño.....	141
Fitorremediación de Suelos Contaminados por Cadmio y Plomo Mediante Plantas Florales Plantadas en Terreno Agrícola en Ensayos Con Medios Salinos, E. Ferrufino, C. Estívariz, M. Guaman.....	146
Caracterización de la diversidad estructural de las comunidades microbianas rizosfericas asociadas a los cultivos de cobertura avena y centeno inoculados con dos PGPR, N. Aguilar, J. Escobar, T. Ávila, I. García.....	152
Propiedades sensoriales, fisicoquímicas y antioxidantes del pitón ( <i>Talisia esculenta</i> Radlk.), J. Limpias, N. Montellano.....	156
Estudios preliminares de propiedades sensoriales y antioxidantes del pacay ( <i>inga edulis</i> ) en bosques semideciduos chiquitanos, P. Flores, N. Montellano. ....	158
ARSEMÁFORO: Diseño de un biosensor para la detección de arsénico en agua de consumo, J. Aliaga, A. Tambo, O. Zeballos. ....	160
Evaluación de medios de cultivo y sustratos para la producción de inóculo de hongos comestibles, F. Rojas, M. Claros, N. Ortuño. ....	168
Distribución Genotípica del VPH de Alto Riesgo en Mujeres con Lesiones Preneoplásicas y Cancerosas en Cochabamba, A. Torrico, P. Surriabre, P. Rodríguez, T. Vargas, V. Fontaine. ....	175

Universidad Mayor de San Simón  
Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias

Cochabamba - Bolivia

## Micropropagación de Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) a partir de segmentos nodales en medio de cultivo líquido

Rocío del Carmen Viraca, José Aguirre, Gladys Gerónimo, Marcelo Flores  
rocio.viraca.r@gamil.com

### Resumen

La Stevia (*S. rebaudiana* Bertoni), contienen esteviósido y rebaudiósido, tiene polinización cruzada que ocasiona una variación del contenido de glucósidos. Objetivo: desarrollar protocolo de micropropagación para las etapas de establecimiento y multiplicación a partir de segmentos nodales y determinar costos de producción. Se evaluó: tiempo de desinfección de los explantes (5, 10 y 15 minutos en hipoclorito de sodio al 1.2%), concentración de macronutrientes de las sales de Murashigue y Skoog (30%, 50% y 70%), tipo de citoquinina (Kinetina y Benzylaminopurina) a tres concentraciones (6  $\mu$ M, 8  $\mu$ M y 10  $\mu$ M); variables de respuesta: número de explantes con brote y sin brote; número de segmentos nodales por explante. Variable de respuesta: número de segmentos nodales, por número de repique. Resultado: Exposición en hipoclorito de sodio por cinco minutos y concentración de macronutrientes al 30% y 6  $\mu$ M de Kinetina; con un costo de bolivianos 2.28 por vitroplanta.

**Palabras clave: Protocolo; Vitroplanta; Macronutrientes; Citoquinina**

### INTRODUCCIÓN

La Stevia (*S. rebaudiana* Bertoni), es una planta originaria del Paraguay, sus hojas poseen un sabor dulce debido a la presencia de glucósidos como el esteviósido y el rebaudiósido; éste último, 180 a 400 veces más dulce que el azúcar (Bourlakis y Weightman 2006). China, Paraguay y Brasil se constituyen como los principales países productores de este cultivo, debido a sus múltiples usos, entre los cuales su uso en salud es el más importante al no aportar calorías al organismo y puede ser tomado como alternativa para pacientes diabéticos o con hipoglucemia (Tigrero y Landazuri 2009). Dentro de los países con una reciente incursión en este cultivo se encuentra Bolivia, debido a que según la Cámara Boliviana de la Stevia – CASTEBOL, hasta el año 2016 se contaba con una superficie de 300 hectáreas cultivadas.

Desafortunadamente la propagación de *S. rebaudiana* por semilla, es una limitante para este cultivo, debido a su alta variabilidad

genética, acompañada de una baja tasa de germinación.

En su mayoría las investigaciones expresan que la reproducción asexual, a través del cultivo de tejidos con sus variadas técnicas, resulta ser una alternativa viable para la obtención de un material uniforme, en gran cantidad y en poco tiempo. Con esa finalidad, la presente investigación pretende efectuar la multiplicación de *S. rebaudiana* B., en condiciones *in vitro*, mediante el cultivo de segmentos nodales, probando concentración de macronutrientes y tipos de citoquininas a diferentes dosis y en un medio de cultivo líquido para su posterior producción masiva. Por tanto, el trabajo de investigación tiene los siguientes objetivos:

- Evaluar tiempos de desinfección de los explantes en Hipoclorito de Sodio en la fase de establecimiento.
- Determinar el nivel óptimo de concentración de macronutrientes del medio basal M&S para la fase de establecimiento y multiplicación.

- Comparar el efecto entre dos tipos de citoquininas: N6 Benzylaminopurina (BAP) y Quinetina (KIN), en la fase de establecimiento y multiplicación.
- Evaluar el nivel de N6 Benzylaminopurina (BAP) y Quinetina (Kin), que promuevan una mejor proliferación de nudos durante la fase de multiplicación.
- Determinar los costos de producción de las vitroplantas de *S. rebaudiana*.

fue adquirido a través de una compra que se hizo a la empresa Tierra Dulce S.R.L.

En la etapa de establecimiento se evaluó el tiempo de desinfección al cual los explantes estuvieron sumergidos 5, 10 y 15 minutos en hipoclorito de sodio al 1.2% de concentración, posteriormente se sembraron los explantes en medios de cultivo enriquecidos con una concentración de macronutrientes de las sales de Murashigue y Skoog

(MS) al 30%, 50% y 70% y el tipo de citoquinina (Kinetina y Benzylaminopurina) a tres concentraciones (6  $\mu\text{M}$ , 8  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ ), distribuidos en forma de tratamientos, obteniéndose así un total de 18 tratamientos estructurados con 10 repeticiones por tratamiento como se indica en el Cuadro 1.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias de la Universidad Mayor de San Simón. Ubicada en el departamento de Cochabamba, Provincia Cercado, zona la Tamborada Km 5.5 de la avenida Petrolera. El material vegetal utilizado

**Cuadro 1. Estructura de los tratamientos evaluados en la etapa de Establecimiento de *S. rebaudiana*.**

Macronutrientes (M1)	30%					
Tipo de citoquinina	BAP			Kin		
Concentración de citoquinina	6 $\mu\text{M}$	8 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	6 $\mu\text{M}$	8 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$
Tratamiento	30 BAP 6	30 BAP 8	30 BAP 10	30 Kin 6	30 Kin 8	30 Kin 10
Macronutrientes (M1)	50%					
Tipo de citoquinina	BAP			Kin		
Concentración de citoquinina	6 $\mu\text{M}$	8 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	6 $\mu\text{M}$	8 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$
Tratamiento	50 BAP 6	50 BAP 8	50 BAP 10	50 Kin 6	50 Kin 8	50 Kin 10
Macronutrientes (M1)	70%					
Tipo de citoquinina	BAP			Kin		
Concentración de citoquinina	6 $\mu\text{M}$	8 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	6 $\mu\text{M}$	8 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$
Tratamiento	70 BAP 6	70 BAP 8	70 BAP 10	70 Kin 6	70 Kin 8	70 Kin 10

Para su evaluación se utilizó un diseño experimental completamente aleatorio (DCA). Las variables de respuesta en esta etapa fueron: la cantidad de unidades experimentales que tuvieron brote y el número de segmentos nodales alcanzados en un lapso de tiempo. Previa a la etapa de Multiplicación se llevó a cabo una selección de los

tratamientos que obtuvieron cuatro o más segmentos nodales por unidad experimental.

En la etapa de multiplicación la variable de respuesta utilizada fue: la cantidad de segmentos nodales obtenidos por tratamiento y número de repique. Como actividad complementaria se desarrollaron las etapas de Enraizamiento y Aclimatación de las vitro plantas.

Los costos de producción se definieron mediante los siguientes elementos: materia prima, mano de obra y gastos indirectos. Para este análisis se elaboró una lista de los equipos que se utilizaron para las etapas de establecimiento y multiplicación; se hizo una averiguación en cuanto a precios actuales de los equipos y su tipo de depreciación. En este caso también se hizo un prorrateo de un porcentaje de dedicación del equipo.

El costo unitario se obtuvo a partir de la suma de materia prima, mano de obra y gastos indirectos, los cuales se tomaron en cuenta en base a los tratamientos que mejores resultados habían reportado. Y de acuerdo a la cantidad de plántulas *in vitro* requeridas se hizo un cálculo matemático para poder obtener un resultado aproximado en cuanto al costo/plántula *in vitro*.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa de establecimiento: el siguiente análisis de varianza (Cuadro 2), se evaluó con los datos obtenidos hasta el día 14, a partir del día de siembra de los explantes, el cual nos indica que el número de explantes con brote y sin brote, tuvieron una respuesta diferente con respecto a los tiempos de desinfección ( $Pr=0,0069$ ).

<b>Cuadro 2. Análisis de varianza para el número de explantes con brote y sin brote de <i>S. rebaudiana</i>.</b>			
Fuentes de variación	Grados de libertad	$\chi^2$	$Pr > \chi^2$
<b>Tiempo de desinfección</b>	2	9,96	0,0069
<b>Concentración de macronutrientes</b>	2	50,25	<,0001
<b>Tipo de citoquinina</b>	1	1,47	0,2250
<b>Nivel de citoquinina</b>	2	2,28	0,3203

Donde los explantes sumergidos por el lapso de 5 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 1,2% (i.a.) obtuvieron mayor número de explantes con brote, tomando en cuenta

que los explantes sometidos a 15 minutos tuvieron una pérdida de más de la mitad de los explantes por necrosis, oxidación y hongos. De la misma manera en una evaluación realizada por Rivilla *et al.* (2016), se observó que, si bien la inmersión de los explantes de *S. rebaudiana* en hipoclorito de sodio al 2% durante 10 minutos disminuyó los porcentajes de contaminación microbiana con valores cercanos al 13%, cuando se consideró la supervivencia de los explantes se observó que esta también disminuyó hasta valores de 10%.

En cuanto al efecto de concentración de macronutrientes, el análisis de varianza del cuadro 2, también demuestra que el número de explantes con brote y sin brote, fueron diferentes para cada uno de los niveles de concentración de macronutrientes ( $Pr<,0001$ ). Donde se obtuvo 21 explantes con brotes, a una concentración de 30% de macronutrientes seguidos de 14 y 10 explantes con brotes, a una concentración de 50% y 70% de macronutrientes, respectivamente.

Un resultado similar al obtenido, se muestra en el análisis de la investigación hecha por Uribe *et al.* (2008) sobre *Berberidopsis corallina*, haciendo la dilución de los medios de cultivo, lo cual le permitió disminuir la pérdida de explantes por necrosis de los tejidos, ya que el medio M&S tiene un alto contenido de nitrógeno, con respecto a los macronutrientes, en consecuencia, la supervivencia de los explantes también podrían estar afectadas por la concentración salina de los medios de cultivo.

Previo a la fase de multiplicación se procedió a seleccionar los tratamientos que obtuvieron un mayor número de segmentos nodales por unidad experimental, tomando en cuenta como “bueno” a partir de cuatro segmentos nodales. Para el caso se hizo un análisis de varianza, el cual mostró una influencia en la concentración de macronutrientes ( $Pr<,0001$ ) y nivel de citoquinina ( $Pr=0.0052$ ), respecto a la obtención de número de segmentos nodales obtenidos.

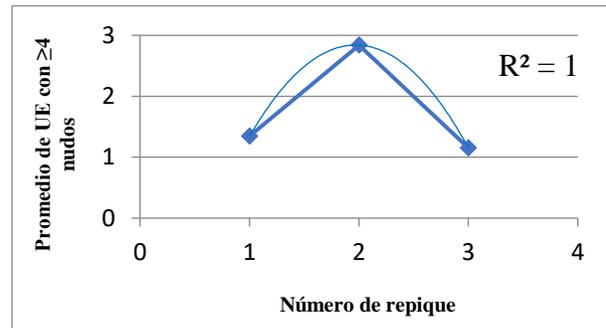
En cuanto al efecto de la concentración de macronutrientes las unidades experimentales (UE) que obtuvieron un número de segmentos nodales iguales o mayores a cuatro, fueron los tratamientos que tuvieron el 30% de concentración de macronutrientes, pudiendo deberse esta respuesta al estado nutricional de la planta madre donadora.

Para el efecto de niveles de concentración de citoquinina, se obtuvo que los tratamientos con un nivel de concentración de 6  $\mu\text{M}$  de ambas citoquininas (BAP y Kin), lograron obtener 17 unidades experimentales con cuatro o más segmentos nodales, frente a los tratamientos de 8  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  de citoquinina, los cuales llegaron a obtener entre 11 y 8 unidades experimentales, respectivamente. Delvalle (2001), indica que, en cuanto al efecto del tipo y concentración de las citoquininas, sus mejores resultados para obtener mayor tamaño de brote por explante se logró con 6  $\mu\text{M}$  de Kin, aunque estadísticamente no obtuvo una diferencia significativa con 4  $\mu\text{M}$  de Kin.

Los tratamientos seleccionados con cuatro o más segmentos nodales fueron: T3 (10  $\mu\text{M}$  BAP y 30% M1), T4 (6  $\mu\text{M}$  Kin y 30% M1), T7 (6  $\mu\text{M}$  BAP y 50% M1), T2 (8  $\mu\text{M}$  BAP y 30% M1; respectivamente.

**Etapas de Multiplicación:** el análisis de varianza indica que el número de segmentos nodales obtenidos fue diferente en cada uno de los repiques ( $P < .0001$ ). La Figura 1, indica que el segundo repique fue el que alcanzó mayor número de segmentos nodales, tomando en cuenta los cuatro tratamientos elegidos en la fase de selección, pero a la vez se puede observar que en el tercer repique el número de segmentos nodales por tratamiento va disminuyendo, lo que indica que un cuarto o quinto repique solo representaría pérdidas para el laboratorio ya que la cantidad de segmentos nodales va disminuyendo, pudiendo deberse al desgaste de tejido vegetal. Al respecto Sánchez *et al.*, citados por Gambarte (2015), menciona que la disminución en la producción hormonal endógena de las plantas *in vitro*, está

fuertemente relacionada con el número de ciclos que se realiza en dichos explantes.



**Figura 1.** Promedio de unidades experimentales (UE) con cuatro o más segmentos nodales de *S. rebaudiana*, por número de repique.

**Costo de producción:** los costos de producción de una plántula *in vitro* de *S. rebaudiana* se realizaron en base a los tratamientos que obtuvieron mayor número de unidades experimentales con cuatro o más segmentos nodales, en este caso fueron: T4 (6  $\mu\text{M}$  Kin y 30% M1) y T2 (8  $\mu\text{M}$  BAP y 30% M1).

Estos costos varían en cuanto al volumen producido los cuales como indica Medina (2006), entre el 88 y 90% corresponden a costos del personal técnico, siendo el más importante y el que determina en gran manera el costo total de la producción. En este caso cada plántula llega a costar entre Bs. 2,30 a Bs. 3, 90 dependiendo de la cantidad que se vaya a producir.

## CONCLUSIONES

En la etapa de establecimiento, los explantes sometidos a una solución de hipoclorito de sodio al 1.2 % durante 5 minutos lograron obtener mayor número de explantes viables. En la etapa de multiplicación: el T4 que contenía 30% de macronutrientes y 1.29 mg/L de Kinetina (6  $\mu\text{M}$  KIN), seguida del T2 con 30% de macronutrientes y 1.80 mg/L de BAP (8  $\mu\text{M}$  BAP) obtuvieron unidades experimentales con cuatro o más segmentos nodales, en los tres sub cultivos.

El cálculo del costo de producción de una plántula *in vitro* de *S. rebaudia* con datos del T4 y T2 son de Bs. 3,91 cuando se producen 3000 plántulas y de Bs. 2,28, cuando se producen 6000 plántulas; en caso de una producción mayor el costo por plántula *in vitro* se va reduciendo.

## REFERENCIAS CITADAS

- Bourlakis, M.; Weightman, P. 2006. Food Supply Chain Management. 1era Ed. USA, Blackwell Publishing. 413 p.
- Delvalle, W. 2001. Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B. a partir de segmentos nodales (en línea). Honduras, Zamorano Carrera de ciencia y producción agropecuaria. 60 p. Consultado 13 ene. 2016. Disponible en: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1437/1/CPA-2001-T028.pdf/>.
- Gambarte, R. 2015. Efecto de tres concentraciones de 2 ip en tres variedades de Ajo (*Allium sativum* L.) durante la fase de multiplicación para la obtención de microbulbillos *in vitro*. Tesis. Cochabamba, Bolivia. Universidad Mayor de San Simón, Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y Forestales. 95p.
- Landazuri, P.; Tigrero, J. 2009. *Stevia rebaudiana* Bertoni, una planta medicinal. Boletín técnico edición especial. Ecuador. Escuela Politécnica del Ejército Departamento de Ciencias de la Vida carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias. 34 p.
- Medina, R. 2006. Propagación *in vitro* de *Violeta africana* (*Saintpaulia ionantha*). Tesis. Cochabamba, Bolivia, Universidad Mayor de San Simón, Facultad de ciencias agrícolas y pecuarias "Martín Cardenas". 64 p.
- Rivilla, D. M., Urrea, A., Jiménez, E., Atehortua, L. (2016). Estrategia para la propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Biotecnología Vegetal*, 16(3).
- Uribe, M. E., Delaveau, C., Garcés, M., & Escobar, R. 2008. Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento *in vitro* de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales. *Bosque* (Valdivia), 29(1), 58-64.

Universidad Mayor de San Andrés  
Unidad de Biotecnología Vegetal  
Instituto de Biología Molecular y Biotecnología

La Paz – Bolivia

## Micropropagación y aclimatación de *Schoenoplectus californicus* “tatora” destinados a estudios de repoblamiento en el lago Titicaca

Ormachea Orellana C.<sup>1\*</sup>, Román Peña A. P.<sup>1</sup>, Quezada Portugal J. A. N.<sup>1</sup>  
Email: ormacheacarmen@gmail.com

### Resumen

La *Schoenoplectus californicus* tiene importancia ambiental, económica y cultural; sin embargo, actualmente los totorales son vulnerables. El objetivo fue desarrollar y evaluar un protocolo de micropropagación como alternativa para el repoblamiento. Se colectaron semillas evaluando su viabilidad con tetrazolio (0.5%). La desinfección fue realizada con alcohol (70%), NaClO (2%) y Benomyl (0,2%). El establecimiento fue en medio de cultivo Murashige & Skoog (50%) con leche de coco (50 ml/l) y Preservative plant mixture PPM (0,5 ml/l). En la multiplicación y enraizamiento se empleó bencilaminopurina BAP (1mg/l). Para la aclimatación se utilizó solución nutritiva FAO (50%). Los resultados muestran que la viabilidad de semillas varía desde 2% hasta 59%. Se obtuvo un porcentaje de germinación máximo de 32%. El tratamiento de multiplicación y enraizamiento (1mg/l BAP) generó mayor número de brotes como de raíces. En la aclimatación la solución nutritiva FAO al 50% permitió mayor crecimiento y sobrevivencia de plantines.

**Palabras clave:** *Schoenoplectus californicus*, Bencilaminopurina, ácido naftalenacético, micropropagación

### INTRODUCCIÓN

La tatora (*Schoenoplectus californicus*) es una planta acuática superior cuya agrupación forma totorales a orillas del Lago Titicaca, sin embargo, las poblaciones de tatora se han visto notablemente reducidas en los últimos 25 años por causas ambientales, problemas de reproducción propias de la especie y por motivos antrópicos como la contaminación y sobreexplotación del recurso natural (ADESU, 2001).

La tatora tiene innumerables beneficios, entre ellos sirve de materia prima para la construcción de balsas, viviendas y elaboración de artesanías, así mismo, constituye una fuente de alimentación y medicina para los pobladores; por otra parte, es fuente de forraje para el ganado, y cortada y enterrada forma abono. En el medio ambiente juega un rol importante debido a que

sirve de alojamiento de muchas especies de animales, insectos y otras plantas, por ejemplo, los peces usan los tallos para el desove, y cuando nacen las crías (ovas), estas se protegen entre las totoras para no ser comidas. En el caso de aves, los tallos sirven para que hagan sus nidos, puedan reproducirse y protegerse. Así mismo, sirve para proteger el suelo de las orillas de la erosión que causan las olas (ADESU, 2001; Levie & Orlove, 1988; Collot *et al.* 1983). Otro papel fundamental de la tatora es purificar aguas contaminadas, ya que absorben la materia orgánica compuesta por fósforo y nitrógeno, principales elementos de las aguas servidas.

Debido a estos antecedentes, se hace necesaria la implementación de iniciativas que promuevan la recuperación de las poblaciones de esta especie en el Lago Titicaca y el desarrollo de programas de repoblamiento a objeto de recuperar un recurso importante que

sustenta de materia prima a comunidades humanas asentadas en torno a sus poblaciones. En este sentido, nace la idea de aplicar la técnica de cultivo de tejidos vegetales ya que representa una herramienta biotecnológica eficaz para la propagación masiva de la especie, que con la técnica adecuada se pueden obtener miles de plantines aclimatados a condiciones de invernadero de una manera sostenida, los cuales podrán ser utilizados en estudios para implementar nuevas superficies de totorales en sectores afectados, de esta manera coadyuvar a la conservación de las poblaciones naturales.

Por las razones anteriormente expuestas, así como para reducir la presión extractiva que tienen las poblaciones naturales y apoyar de esta manera la conservación de las poblaciones de totora y del Lago Titicaca en general, la presente investigación pretendió promover la producción masiva de plantines de esta especie (*S. californicus*) mediante el desarrollo de un protocolo de micropropagación como base para estudios de repoblamiento y fitorremediación de la especie en el Lago Titicaca.

## MÉTODOS

Se realizó la colecta de semillas procedente de 7 diferentes zonas (Cota Cota, Puerto Pérez, Huatajata, Tiquina, Achocalla, Suriqui y Pariti) del departamento de La Paz, con las cuales inicialmente se realizaron pruebas de viabilidad con tetrazolio al 0.5%.

Para la etapa de desinfección de semillas se empleó dos tratamientos (T1: alcohol al 70%, NaClO al 2% y T2: alcohol al 70%, NaClO al 2%, Benomyl al 0,2%).

Para el establecimiento y germinación se realizó dos tratamientos T1: medio de cultivo Murashige & Skoog (1962) al 50% y T2: medio de cultivo Murashige & Skoog (1962) al 50%, con presencia de leche de coco (50 ml/l) y PPM Plant Preservation Mixture (0,5 ml/l).

Para la etapa de multiplicación y enraizamiento, se emplearon tres tratamientos con los reguladores de crecimiento bencilaminopurina BAP y ácido naftalenacético ANA (1mg/l BAP; 2,5 mg/l ANA y 2.5mg/l ANA+1mg/l BAP).

Para la etapa de aclimatación, se realizaron dos pruebas, inicialmente se emplearon tres tratamientos (sustrato y riego con agua, sustrato y riego con solución nutritiva FAO y cultivo en hidroponía con solución nutritiva FAO) y posteriormente se evaluaron dos tratamientos correspondientes al riego con solución nutritiva FAO al 50% y 100%.

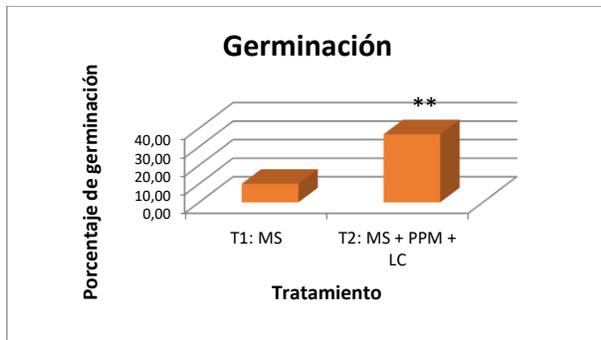
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la etapa de viabilidad de semillas y establecimiento *in vitro*, los porcentajes de viabilidad obtenidos fueron variables según la procedencia de las semillas (Tabla 1), desde 2% (Huatajata) a 59% (Isla Suriqui). Las zonas con menor intervención presentan mayor porcentaje de viabilidad, los frutos provienen de totorales más densos y más alejados de la orilla y de zonas urbanizadas.

**Tabla 1. Porcentajes de viabilidad de semillas de Totora**

Zona	Código	Porcentaje de Viabilidad
Cota Cota	C.C. b	19
Cota Cota	C.C. a	4
Puerto Pérez	P.P.	10
Huatajata	H	20
Tiquina	T	20
Achocalla	A	17
Suriqui	S1	59
Suriqui	S2	26
Pariti	P1	44
Pariti	P2	22
Huatajata	H1	2

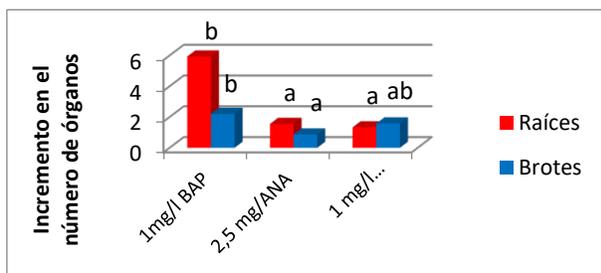
En la etapa de desinfección, los dos tratamientos mostraron diferencias significativas en los porcentajes promedios de contaminación, a favor del tratamiento 1 (sin benomyl), a pesar de esto, fue utilizado el tratamiento 2 ya que se observó que la principal fuente de contaminación fue fúngica en relación a la bacteriana, de esta manera se seleccionó el tratamiento 2 con benomyl.



**Figura 1.** Porcentajes promedios de germinación en función al tratamiento, de la prueba de germinación *in vitro*, con información estadística de ANOVA\*\*= diferencias altamente significativas.

En la etapa de establecimiento y germinación de semillas, se observó mayor porcentaje de germinación en el tratamiento 2 (MS+LC+PPM), obteniéndose un máximo de 32% (Fig. 1). La presencia de leche de coco generó mayor respuesta germinativa y debido a la adición de PPM fue menor el porcentaje de contaminación por ser este un germicida de amplio espectro, el cual también evita la contaminación procedente de vitropatógenos endógenos de la semilla.

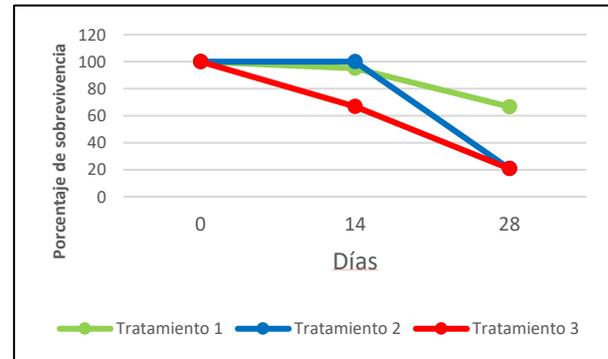
Para la etapa de multiplicación y enraizamiento, los resultados mostraron diferencias significativas entre los tratamientos. El tratamiento 1 que corresponde a la menor concentración de BAP produce tanto mayor número de brotes como de raíces, por lo que este tratamiento es bueno tanto para la multiplicación como para el enraizamiento *in vitro* de la especie (Fig. 2).



**Figura 2.** Comparación del incremento del número de raíces y brotes entre los tratamientos de prueba de enraizamiento *in vitro*

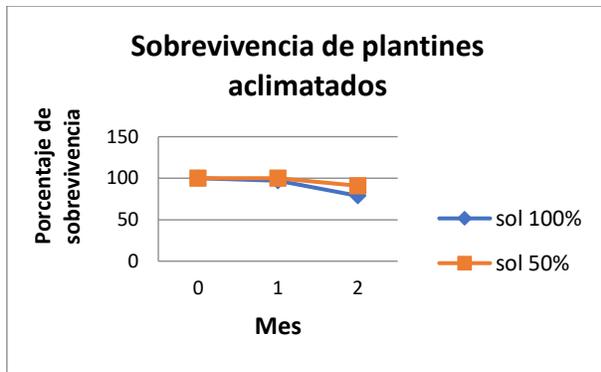
*in vitro*, con información estadística de la prueba de Duncan con  $\alpha= 0.05$ . Letras similares estadísticamente no son diferentes.

Para la etapa de aclimatación, en la primera prueba se observaron resultados de sobrevivencia del 67% de los plantines en el tratamiento 1, como se observa en la Figura 3 la sobrevivencia en el tiempo fue declinando drásticamente.



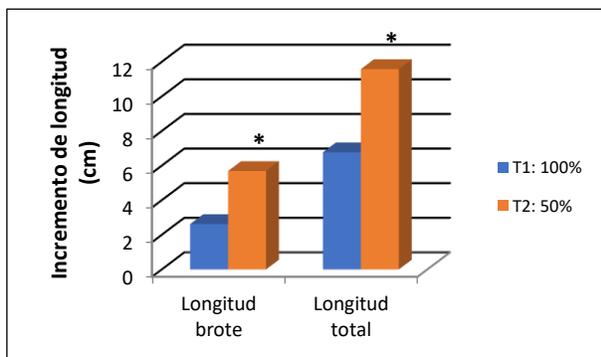
**Figura 3.** Porcentajes de sobrevivencia de vitroplantas aclimatadas durante los periodos de evaluación hasta los 28 días. Tratamiento 1: Sustrato y riego con agua, Tratamiento 2: Sustrato y riego nutritivo y Tratamiento 3: Cultivo en hidroponía

En el caso de la segunda prueba de aclimatación, el desarrollo de las vitroplantas en ambos tratamientos fue similar, se vio reducida en el segundo mes debido al desecamiento de ápices de los brotes. La sobrevivencia de las plántulas fue mayor a una concentración del 50% de solución nutritiva FAO (Fig. 4). El obtener una mejor respuesta en el crecimiento de los plantines, en el tratamiento con menor concentración de nutrientes puede deberse a que una alta concentración de sales en la solución (solución al 100%) podría generar la acumulación de estos nutrientes en los tejidos y reducir la adecuada absorción de agua, por lo que se produce una mayor desecación en las vitroplantas en relación a la solución nutritiva al 50%.



**Figura 4.** Porcentaje de sobrevivencia de plantines en condiciones de invernadero.

De esta forma, los resultados obtenidos demuestran la presencia de diferencias significativa para el incremento en la longitud total de las vitroplantas, al cabo de 60 días (Fig. 5).



**Figura 5.** Desarrollo de vitroplantas aclimatadas a condiciones de invernadero.

## CONCLUSIONES

- El porcentaje de viabilidad de las semillas es variable según la zona de colecta, obteniendo un porcentaje mayor a 50% en la Isla Suriqui, seguido de la isla Pariti (44%)
- Se determinó el tratamiento de desinfección 2 (Alcohol al 70% durante 1 minuto, benomyl al 0,2% durante 10 minutos, hipoclorito de sodio al 2% durante 15 minutos), para establecer semillas de totora en condiciones *in vitro*, lo que permite una reducción de

la contaminación fúngica por la aplicación del antifúngico benomyl.

- Se obtuvo un porcentaje mayor de germinación en semillas introducidas a condiciones *in vitro* en medio MS/2 suplementado con 50 ml/l de Leche de Coco y en presencia de 0,5 ml/l de PPM para reducir el porcentaje de contaminación.
- El tratamiento con 1 mg/l de BAP permite simultáneamente multiplicación de los brotes y rizogénesis, lo que genera vitroplantas aptas para su aclimatación.
- Una concentración del 50% de la solución nutritiva FAO (Marulanda & Izquierdo, 2003) permitió un mayor crecimiento de los plantines aclimatados, además de una mayor sobrevivencia.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADESU – PELT (Proyecto Binacional Lago Titicaca) 21.03 - “Técnicas de Reimplante de Totorá”- Programa de Capacitación Sobre El Manejo de la Totorá. 2001.

Collot, D. 1983. Mapa de vegetación de la Bahía de Puno. Rev. Ecología en Bolivia. 1: 47-54.

Leviel D. & B. Orlove. 1988. importancia socio-económica. En: El lago Titicaca síntesis del conocimiento limnológico actual. ORSTOM HISBOL. La Paz-Bolivia.

Marulanda C. & J. Izquierdo, FAO 2003 La Huerta hidropónica Popular. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación - Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo.

Murashige T. & F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473–497.

Universidad Mayor de San Andrés  
Unidad de Biotecnología Vegetal y Biotecnología  
Instituto de Biología Molecular y Biotecnología

La Paz, Bolivia

## Propagación *in vitro* de cacao (*Theobroma cacao* L.) nativo via embriogénesis somática

Quezada Portugal<sup>1\*</sup> J. A. N., Román Peña A. P. <sup>1</sup> & Ormachea Orellana C.<sup>1</sup>  
\*Email: jorgequezada@yahoo.com

### Resumen

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una especie originaria de América, con alta importancia económica. En Bolivia, el cacao nativo se encuentra distribuido en varias poblaciones cultivadas y naturales, siendo la región del Norte de La Paz, el lugar de mayor producción. La presente investigación, pretendió desarrollar un protocolo de inducción a embriogénesis somática de cacao nativo a partir de callos utilizando como material inicial explantes florales. Los explantes florales utilizados fueron estaminodios y pétalos de plantas provenientes de diferentes poblaciones, constituyendo diferentes genotipos que fueron sembrados en diferentes medios de cultivo tanto para la inducción de callos como la de embriones somáticos. Se identificó como el explante de mejor respuesta a los estaminodios. La respuesta callogénica como embriogénica fue variable, mostrando respuesta estadística entre las interacciones de los medios de cultivo con los genotipos, evidenciando mayor respuesta en el medio Li (1998), así como genotipos que solo reaccionaron en otros medios, genotipos que reaccionaron independientemente al medio de cultivo y genotipos que no mostraron respuesta.

**Palabras claves:** *Theobroma cacao*, callogénesis, embriogénesis somática, estaminodios, sacarosa

### INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.), es una de las especies más importantes de los bosques húmedos tropicales ya que presenta una significativa importancia comercial a nivel mundial (Schnell *et al.*, 2005). Su valor radica en las semillas que son utilizadas ampliamente en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética. Esta industria genera divisas por unos 73.000 millones de dólares (Ploetz, 2007) y de ella dependen unos 60.000 empleos en todo el mundo (Lanaud *et al.*, 2009).

En Bolivia el cacao se encuentra en poblaciones cultivadas y naturales en los Departamentos de La Paz, Beni, Pando, Santa Cruz y Cochabamba, siendo la región del Alto Beni ubicada en el Norte del Departamento de La Paz el lugar de mayor producción nacional.

En las tierras bajas y yungas del norte paceño, este cultivo ha venido subsistiendo hasta el presente gracias al manejo tradicional por parte de agricultores; conservando de esta manera un importante acervo genético con amplio potencial para su adaptación.

El manejo de esta diversidad genética, puede reducir significativamente la vulnerabilidad de los cultivos a los efectos del cambio climático, ya que provee a los mismos una mayor diversidad de alternativas de respuestas adaptativas ante modificaciones del ambiente (sequías, nuevas enfermedades, etc.), evidenciando la necesidad de realizar proyectos de investigación que apoyen al estudio y conservación del cacao nativo en nuestro país. Es así que, en la presente investigación se identificaron poblaciones de cacao nativo en el Norte Paceño Tropical para contar con material vegetal con alta diversidad

genética y utilizarlo para identificar su respuesta en el establecimiento *in vitro*, inducción a la formación de callos y embriones somáticos.

## MÉTODOS

Dentro del área de estudio (Norte del Departamento de La Paz) se seleccionaron botones florales de árboles de cacao nativo que mostraron mayor rendimiento, tomándose los respectivos datos de pasaporte y elaborándose con ellos una base de datos.

Después de realizar pruebas preliminares de desinfección, se determinó el protocolo de desinfección de botones florales de la siguiente manera: grupos de 6 a 10 botones florales se colocaron en sobres de gasa y fueron sumergidos inicialmente en alcohol al

70 % por 1 minuto. Posteriormente en Hipoclorito de Sodio al 1% (con 2 gotas de detergente), por 20 minutos (el porcentaje de hipoclorito puede elevarse a 2% dependiendo del estado de las flores y el tiempo que transcurrió desde la colecta). Finalmente en la cabina de flujo laminar se realizó 3 enjuagues en agua destilada estéril.

Para el establecimiento *in vitro* de material vegetal se seleccionaron dos tipos de tejidos florales: estaminodios y pétalos, los cuales fueron sembrados en diferentes medios de cultivo como se observa en la Tabla 1. Así mismo, en esta y las posteriores etapas se evaluó la variable genotipo en función a su origen. Los cultivos fueron mantenidos en oscuridad durante 4 semanas, realizando evaluaciones periódicas de sobrevivencia y contaminación.

	<b>Li PCG</b>	<b>DL-IC</b>	<b>NT-1</b>
<b>Sales</b>	DKW	DKW	DKW
<b>Vitaminas</b>	Glicina 2 mg/l Glutamina 250 mg/l Niacina 1 mg/l Tiamina 1mg/l Mio-inositol 1mg/l	Glicina 2 mg/l Glutamina 250 mg/l Niacina 1 mg/l Tiamina 1mg/l Mio-inositol 1mg/l	L-Lisina 0,460 mg/l L-Leucina 0,330 mg/l L-Arginina 0,440 mg/l L-triptófano 0,510 mg/l Glicina 0,190 mg/l
<b>Fuente de carbono</b>	Glucosa 20 g/l	Sacarosa 80 g/l	Glucosa 30 g/l
<b>Reguladores de Crecimiento</b>	Thidiazuron 5 ug/l 2 mg/l de 2,4-D	Thidiazuron 5 ug/l 4 mg/l de 2,4-D	Kinetina 0,25 mg/l 1 mg/l de 2,4-D

En relación al desarrollo de callos *in vitro*, los tejidos fueron transferidos a diferentes medios de cultivo correspondiendo a los tratamientos que se observan en la Tabla 2.

	<b>Li SCG</b>	<b>DL-SCG</b>	<b>NT-2</b>
<b>Sales</b>	WPM	WPM	Macronutrientes MS Micronutrientes DKW
<b>Vitaminas</b>	Niacina 1 mg/l Tiamina 10 mg/l Mio-inositol 100 mg/l Piridoxina 1 mg/l	Glicina 2 mg/l Niacina 0,5 mg/l Tiamina 1mg/l Mio-inositol 100 mg/l Piridoxina 0,5 mg/l	<b>Vitaminas DKW:</b> Glicina 2 mg/l Glutamina 250 mg/l Niacina 1 mg/l Tiamina 1mg/l Mio-inositol 1 mg/l <b>Aminoácidos NT-1:</b> L-Lisina 0,460 mg/l L-Leucina 0,330 mg/l L-Arginina 0,440 mg/l L-triptófano 0,510 mg/l Glicina 0,190 mg/l
<b>Fuente de carbono</b>	Glucosa 20 g/l	Sacarosa 80 g/l	Glucosa 30 g/l
<b>Reguladores de Crecimiento</b>	2 mg/l de 2,4-D 0,3 mg/l Kinetina	2 mg/l de 2,4-D 2,5 mg/l Kinetina	Adenina 0,025 mg/l
<b>Leche de coco</b>	50 ml/l	50 ml/l	

Una vez que se obtuvieron callos con los transferidos a medios de cultivo para diferentes tratamientos planteados, se desarrollo de embriones aplicando los seleccionaron aquellos de mayor tamaño, de tratamientos que se muestran en la Tabla 3. apariencia friable y globular para ser

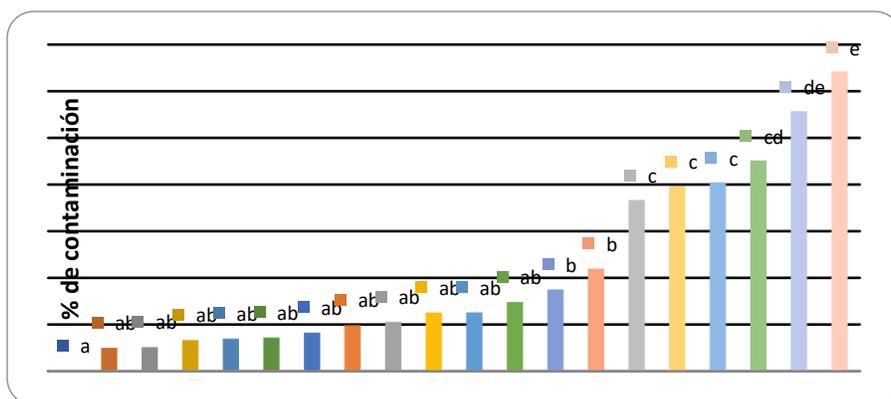
**Tabla 3. Composición de los medios de cultivo para inducción a embriogénesis somática**

Sales	Li ED DKW	DL-ED DKW	NT-2 Macronutrientes MS Micronutrientes DKW
<b>Vitaminas</b>	Niacina 1 mg/l Tiamina 2 mg/l Mio-inositol 100 mg/l Glicina 2 mg/l	L-Lisina 0,0460 mg/l L-Leucina 0,0330 mg/l L-Arginina 0,0440 mg/l L-triptófano 0,0510 mg/l Glicina 0,0190 mg/l KNO3 0,3 g/l	Vitaminas DKW: Glicina 2 mg/l Glutamina 250 mg/l Niacina 1 mg/l Tiamina 1mg/l Mio-inositol 1mg/l Aminoácidos NT-1: L-Lisina 0,0460 mg/l L-Leucina 0,0330 mg/l L-Arginina 0,0440 mg/l L-triptófano 0,0510 mg/l Glicina 0,0190 mg/l
<b>Fuente de carbono</b>	Glucosa 1 g/l Sacarosa 30 g/l	Sacarosa 80 g/l	Glucosa 30 g/l
<b>Reguladores de Crecimiento</b>			Adenina 0,025 mg/l

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra que se observó una alta variación de contaminación (0%-64%), lográndose en el caso de las muestras vegetales procedentes de la comunidad de Trapicheponte (Guanay) un alto éxito de

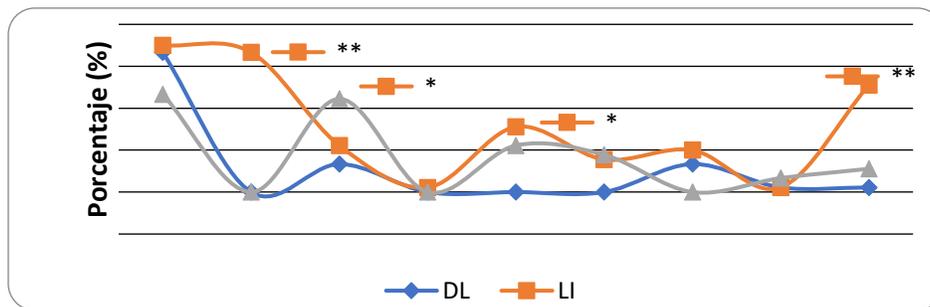
desinfección. Por otra parte, el análisis realizado también señala un porcentaje mayor de contaminación en el material vegetal cuyo origen fue la comunidad de Macahua (Ixiamas) (64%).



**Figura 1.** Porcentaje de contaminación en función de la procedencia de las muestras. Duncan ( $\alpha=0,05$ ). Letras iguales implican resultados que estadísticamente no son diferentes.

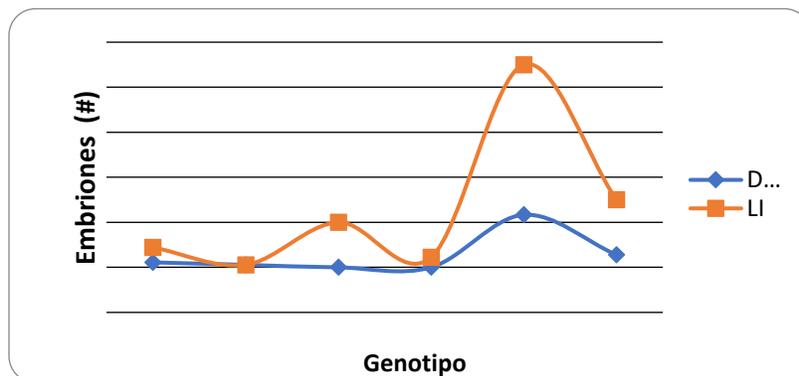
Para el establecimiento e inducción a de cultivo y los genotipos evaluados en funcion callogénesis *in vitro*, se identificó respuesta a su origen (Figura 2). En este sentido, se estadística de la interacción entre los medios pudo evidenciar que el medio Li fue en el que

se desarrollaron en general los mayores porcentajes de formación de callo para varios genotipos estudiados. Sin embargo, también se evidenció que algunos genotipos no mostraron esta tendencia general, generando mayor formación de callo en el medio NT. Asimismo, es importante destacar la presencia de genotipos que llegaron a obtener la mayor formación de callos, independientemente al medio de cultivo. También se observó que algunos genotipos no llegaron a formar callos en ninguno de los tratamientos. Por otro lado, los estaminodios indujeron la mayor formación de callos ya que los pétalos presentaron mayor contaminación y callos con malas características de friabilidad y tamaño.



**Figura 2.** Porcentaje de calogénesis en función a la interacción (genotipo \* tratamiento) de una de las poblaciones estudiadas (municipio). Diferencias estadísticas se representan en el gráfico de acuerdo al Análisis de efectos simples. \* = Diferencias significativas ( $P < 0,05$ ); \*\* = Diferencias altamente significativas ( $P < 0,01$ ).

Nuevamente se observó interacción estadísticamente diferenciada entre los medios de cultivo y los pocos genotipos que lograron desarrollar embriones somáticos (Figura 3), lo que demuestra que hay una respuesta diferencial entre los genotipos. Al respecto, Alemanno *et al.* (1996) indican que la capacidad de generar embriones somáticos es dependiente de la variabilidad genotípica.



**Figura 3.** Efecto de la interacción de 2 tratamientos con 6 genotipos sobre el número de embriones somáticos generados (Efectos simples). \*\* = Diferencias altamente significativas ( $P < 0,01$ ).

Así mismo, se observó que el medio de cultivo descrito por Li *et al.* (1998) presentó mayor respuesta a la formación de embriones somáticos que el medio DL (Díaz-López *et al.*

2009) para los genotipos analizados. En este sentido, Li *et al.*, 1998, mencionan que el medio DKW posee un significativo aumento en la concentración de calcio, sulfuro y magnesio, en comparación con el medio MS (1962); estos

elementos son esenciales para la diferenciación celular, rápido crecimiento de callos y la embriogénesis somática. Por otra parte, en el estudio concluyen que el uso de glucosa como recursos de carbono es esencial para la iniciación de callos embriogénicos y producción de embriones somáticos en cacao.

## CONCLUSIONES

- Se identificaron 27 poblaciones de cacao nativo en 5 municipios del Norte de La Paz
- Se desarrolló el protocolo de colecta de material vegetal (botones flores) el cual hace énfasis en el manipuleo y traslado del mismo, para evitar ruptura de los botones y contaminación de los tejidos previos al establecimiento *in vitro*.
- El tiempo de inicio de formación de callos es altamente variable entre los genotipos y puede iniciarse en los medios de inducción a callos como también en los medios para el desarrollo y crecimiento de los mismos
- Los tratamientos fueron aplicados en bloque, es decir se mantuvieron los medios de cultivo para cada etapa según la descripción de cada autor, sin embargo se recomienda realizar variaciones
- Debido a la frecuente interacción entre las variables genotipo y tratamiento (medio de cultivo y/o fuente de carbono), se demuestra una respuesta diferencial en la formación de callos, por lo que se recomienda utilizar tanto el medio Li, como el medio DL, suplementados con Sacarosa a concentraciones de 20 y 40 g/l, para de esta forma determinar el protocolo óptimo para cada genotipo
- Se optimizó un protocolo de introducción e inducción a callogénesis *in vitro* a partir de estaminodios de *T. cacao* nativo.
- Se generó un protocolo de embriogénesis somática indirecta *in vitro* a partir de los callos generados

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alemanno, L., M. Berthouly y N. Michaux-Ferrière. 1996. "Histology of somatic embryogenesis from floral tissues cocoa". En: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 46.3, págs. 187-194. issn: 0167-6857, 1573-5044.
- Díaz-López, A. A., Salazar, R. V., & Chirinos, M. 2009. Efecto del Tamaño del Botón Floral Sobre la Inducción de Embriones Somáticos En: Cacao Effect Of The Flower Bud Length On Cocoa Somatic Embryogenesis. *Agronomía Trop*, 59(4), 481-489.
- Lanaud, C., Risterucci, A. M., Pieretti, I., Falque, M., Bouet, A. y Lagoda, P. 1999. Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. In: *Mol. Ecol.*, 8: 2141-2152.
- Li, Z., Traore, A., Maximova, S., & Guiltinan, M. J. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 34(4), 293-299
- Ploetz, R. 2007. Cacao diseases: important threats to chocolate production worldwide. In: *Phytopathology*. 97: 1634-1647.
- Schnell, R.; Olano, C.; Brown, J.; Meerow, A. y Cervantes, C. 2005. Retrospective determination of the parental population of superior cacao *Theobroma cacao* L., seedlings and association of microsatellite alleles with productivity. In: *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 130(2): 181-190.

Universidad Mayor de San Simón  
Facultad de Ciencias Agrícolas  
Laboratorio de Biotecnología  
Departamento de Fitotecnia

Cochabamba - Bolivia

## Optimización de medios de cultivo in vitro para la micropropagación de tuna forrajera (*Opuntia ficus indica* L. Mill.)

Jhoselyn Quelca Helguero, Lorena Lazarte, Gladys Gerónimo, Gino Aguirre  
E mail: g.aguirre@umss.edu.bo

### Resumen

El presente trabajo se efectuó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas Pecuarias y Forestales de la Universidad Mayor de San Simón, evaluando ocho medios de conservación para tuna con aptitud forrajera. Los objetivos fueron determinar la concentración adecuada de sorbitol para la conservación a mediano plazo del explante de tuna y evaluar el efecto de myo-inositol en los explantes de tuna forrajera (*Opuntia ficus-indica* L. Mill) para la conservación. La concentración de sorbitol a 30 g/L fue la adecuada, observándose explantes viables después de 21 meses.

**Palabras clave:** Tuna Forrajera; Conservación; *In-Vitro*

### INTRODUCCIÓN

El interés creciente en Bolivia por las tunas, en particular *Opuntia ficus-indica* L. Mill, está basado en el amplio grado de adaptación al clima y al suelo, debido a que presentan una excelente rusticidad a las condiciones que prevalecen en las zonas semiáridas y áridas; en ese sentido se han generado iniciativas para incentivar el cultivo de tuna debido a la rusticidad y adaptabilidad hacia estas zonas.

Para suplir las necesidades de agua y forraje que requiere el ganado en las zonas aridas y semiaridas, muy frecuentemente afectadas por periodos de sequia y escasez de forraje, se plantea el cultivo in-vitro de tuna por las ventajas de una producción masiva de plantas homogéneas con alta calidad sanitaria, en superficies reducidas, a bajos costos y en tiempos reducidos, con la finalidad de incrementar la población de plantas.

Los recursos genéticos vegetales para la agricultura y la alimentación son la base para

la seguridad agroalimentaria mundial, por lo que se han iniciado programas de conservación y se han establecido bancos de genes con el objetivo de coleccionar y mantener la diversidad genética, para satisfacer las necesidades continuas de diferentes usuarios (Kameswara 2004).

Las técnicas de cultivo in vitro, además de una multiplicación acelerada, también permiten conservar material valioso bajo condiciones controladas durante periodos relativamente

extensos y en superficies reducidas, con el fin de contar con material ya caracterizado y que permita dar continuidad a una nueva multiplicación del material inicial (Aguirre et al. 2018).

### Los objetivos

- Determinar la concentración adecuada de sorbitol para la conservación a mediano plazo de explantes de tuna
- Evaluar el efecto de myo-inositol en los explantes de tuna forrajera (*Opuntia*

ficus-indica L. Mill) para la conservación a mediano plazo

## MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación: El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas Pecuarias y Forestales (FCAPyF) ubicado en la zona “La Tamborada” (Av. Petrolera Km 4,5) de la ciudad de Cochabamba, geográficamente se localiza a 17° 24 de latitud sur y 66° 10 de longitud oeste, altitud de 2558 msnm.

### Material biológico

Se tomaron explantes de tuna forrajera (*Opuntia ficus-indica* L. Mill) que estaban en el segundo repique del laboratorio de biotecnología.

### Metodología

Se procedió a seleccionar de la fase de multiplicación plantas in-vitro, que presentaron uniformidad en tamaño y vigor. En cámara de flujo laminar se seccionaron fragmentos de 2 cm de longitud aproximadamente para ser establecidos en los medios de conservación.

La implantación se realizó en diferentes medios de cultivo. Fueron utilizados tubos de ensayo, que contenían 10 ml de medio de conservación, para cada tratamiento se utilizó 10 tubos de ensayo.

Los diferentes componentes como reguladores de crecimiento y las concentraciones utilizadas en todos los tratamientos para la micropropagación y la conservación de explantes, se muestran en el Cuadro 1. Se adiciona myo-inositol y sorbitol para el desarrollo mínimo del explante para su conservación, lo que constituye los tratamientos. El medio se esteriliza a 121°C por 20 minutos.

**Cuadro 1. Componentes del medio de conservación y tratamientos para los medios de conservación.**

Componentes	Cantidad	Tratamiento	Myo-inositol(g)	Sorbitol(g)
Ms	4,43 g	1	0,1	15
AG <sub>3</sub>	18 mg	2	0,1	20
Ácido Nicotínico	5 mg	3	0,1	25
Piridoxina	5 mg	4	0,1	30
Tiamina	0,1 g	5	0	15
Azúcar	20 g	6	0	20
Agar	6,5 g	7	0	25
		8	0	30

El cuadro 1, muestra los tratamientos que se realizaron con las cantidades de los componentes de un medio de conservación para un litro de medio de conservación.

### Diseño experimental

Se utilizó el diseño experimental completamente aleatorio (DCA).

La unidad experimental fué un tubo de ensayo donde se estableció un explante de 2

cm de longitud, cada tratamiento con diez repeticiones, el cultivo se mantuvo en el cuarto de incubación con temperatura de 25°C y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad con una intensidad lumínica de 2500 lux. Se registró el crecimiento en longitud de los explantes 630 días después de la siembra.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El nivel de significancia de la prueba de 0,01, que se puede observar en la tabla, indica que la diferencia de medios es altamente significativa, el crecimiento de longitud de un explante es diferente con al menos uno de los ocho medios de conservación.

De acuerdo al cuadro 3 que muestra el análisis de varianza de longitud de explantes, indica que el modelo es apropiado. Los medios de conservación tuvieron resultados significativos en los explantes, en cuanto al contenido de myo-inositol y a los niveles de sorbitol en el medio de conservación, los datos se tomaron a los 630 días (21 meses).

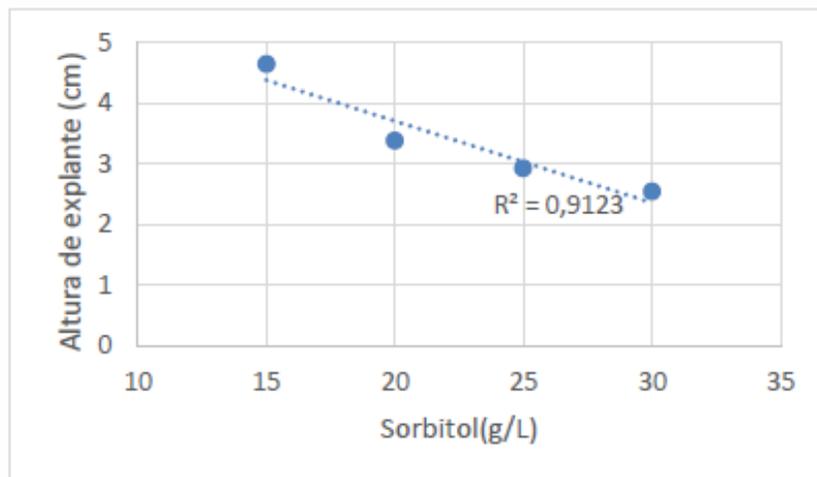
**Cuadro 2. Análisis de varianza para la longitud de explantes**

Fuente De Variación	Grados De Libertad	Suma De Cuadrados	Cuadrados Medios	Estadístico F	Pr>F
Modelo	4	57,05	14,26	11,30	<0,0001
Myo-inositol	1	6,96	6,96	5,56	0,021
Sorbitol	3	50,088	16,696	13,33	<0,0001
Error	75	30	1,3		
Total	79	49			

Pr=0.01

Según (Sánchez-Chiang y Jiménez 2010), el desarrollo de los explantes en el medio de conservación en banano se pudo observar que fue más notorio los primeros 30 días. Los meristemos de cultivares comerciales se

mantuvieron almacenados entre 28 y 30 meses en medios de cultivo con la mitad de la concentración de las sales minerales, a 22 °C con un fotoperiodo de 16 horas luz y transferencia cada dos meses.



**Figura 1. Crecimiento de altura de explante por concentración de sorbitol**

El crecimiento en longitud de los explantes disminuye linealmente a medida que se aumenta el nivel de concentración de sorbitol.

El medio óptimo para conservar es de 30g/L de Sorbitol, al constatarse que los explantes de este tratamiento presentaron un desarrollo mínimo, manteniendo las características del cultivo. Según Rayas *et al.* (2012) encontró que el medio “MS”, suplementado con 20 g.L-1 de glucosa y 20 mg.L-1 de sorbitol, resultó la mejor variante para la conservación *in vitro* de boniato (*Ipomoea batatas* L. Lam).

En nuestra experiencia, se pudo observar que los explantes de tuna en conservación presentaron diferencias por tratamiento, los cuales son el crecimiento en longitud en explantes con una sobrevivencia al 100% de todos los explantes evaluados. Según Díaz *et al.* (2015) se debe tener en cuenta el efecto potenciador del sorbitol sobre la necrosis del tejido foliar, especialmente cuando se usa individualmente y el medio compuesto por sales (MS) + manitol 15 g/L + sorbitol 20 g/L + carbón activado 2 g/L + tiamina 1mg/L + mioinositol 0,1g/L + agar 8 g/L, que permiten de manera efectiva la conservación de plantas *in vitro* a partir de segmentos uninodales de *Dioscorea alata* suplementados con 4 mg/L de BAP y 0.5 mg/L de ANA y *Dioscorea rotundata* suplementado con 0.3 mg/L de BAP y 0.1 mg/L de ANA, durante 8 meses con altos porcentajes de supervivencia, bajos porcentajes de senescencia foliar, evidenciando un desarrollo restringido en plantas *in vitro*.

## CONCLUSIONES

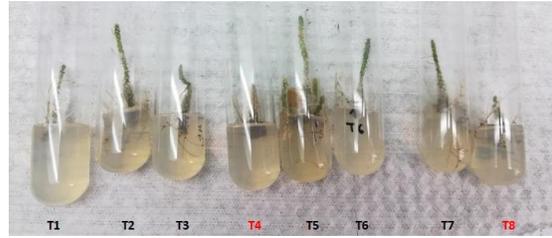
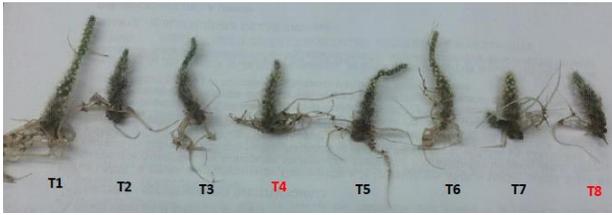
Para la conservación *in vitro* de tuna forrajera (*Opuntia ficus indica* Mill.), la dosis de 30 g/l de sorbitol resultó ser la más apropiada al presentar un crecimiento mínimo, adecuado para la conservación *in vitro*.

## REFERENCIAS CITADAS

- Aguirre, G.; Baudoin, J. P.; Leigue L. 2010. Aplicación del Cultivo de Tejidos en la Multiplicación y Conservación de los Recursos Fitogenéticos. Cochabamba, Bolivia. Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias – UMSS. 274 p.
- Díaz, LC; Carmona, OE; Beltrán, JD. 2015. Optimización de la conservación *in vitro* de germoplasma de *Dioscorea spp* por crecimiento mínimo. Colombia.
- Kameswara, RN. 2004. Plant genetic resources advancing conservation and use through biotechnology. African Journal of Biotechnology. 3(2):136-145. Referencia encontrada en Rayas, A; Cabrera, M; Santos, A; Basail, M; López, J; Medero, V; Beovides, Y. Efecto del manitol y el nitrato de plata en la conservación *in vitro* de la malanga (*Xanthosoma spp.*) Revista Colombiana de Biotecnología, vol. XV, núm. 1, enero-junio, 2013, pp. 167-171 Universidad Nacional de Colombia Bogotá, Colombia.
- Rayas A; Medero, V; López, J; Santos, A; Basail, M; Cabrera, M; Arce, D. 2012. Efecto del sorbitol en la conservación *in vitro* de boniato (*Ipomoea batatas* (L.) LAM), CV. ‘CAUITILO’. Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Santo Domingo, Villa Clara.
- Sánchez-Chiang, N y Jiménez VM. 2010. Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. Agronomía mesoamericana. Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos (CIPROC); Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica.

## ANEXOS

DIA 630



Universidad Autónoma Gabriel René Moreno  
Laboratorio de Biotecnología UAGRM  
BIOFAN  
El Vallecito

Santa Cruz – Bolivia

## **Cultivo *in vitro* de lavanda (*Lavandula dentata* L.) en la etapa de introducción a partir de yemas axilares y apicales**

Melanny Araceli Arano Tapia

### **Resumen**

El proyecto de investigación tuvo como objetivo establecer un protocolo de cultivo *in vitro* de lavanda (*Lavandula dentata*) en la etapa de introducción a partir de yemas axilares y apicales, en el laboratorio de Biotecnología (BIOFAN) de la FCA/UAGRM, de enero a julio del 2020, para su posterior producción con fines medicinales y cosméticos. La investigación que se ha desarrollado es de tipo prospectivo, longitudinal y experimental, realizado con una muestra de 50 yemas apicales y axilares. El instrumento empleado fue el formulario de registros de datos que se basa en el número de 5 tratamientos y 10 repeticiones por cada tratamiento. El cual explica como los explantes apicales y axilares se van desarrollando en el transcurso de la investigación. Los resultados fueron procesados con el programa estadístico SPSS, para la prueba de asociación de variables se utilizó el análisis de ANOVA Intersujetos y la comparación por pareja o prueba Post HOT. Los resultados del crecimiento de la lavanda por semana, se utilizó el análisis estadístico de regresión.

**Palabras claves:** Protocolo, *Lavandula dentata* introducción

### **INTRODUCCIÓN**

El presente trabajo de investigación busca establecer un protocolo de cultivo *in vitro* de lavanda (*Lavandula dentata*) en la etapa de introducción a partir de yemas apicales y axilares, en el laboratorio de Biotecnología (BIOFAN) de la FCA/UAGRM, siguiendo una serie de procedimientos desde describir a detalle si hay crecimiento de bacterias u hongos en el medio de cultivo, utilizando reguladores de crecimiento como el ácido 1-Naftalenacético (ANA) y 6-N-Bencilaminopurina (BAP) que logren generar una elongación celular en los explantes apicales y axilares.

El interés de este trabajo proviene de la gran importancia que tiene la lavanda (*Lavandula dentata*) a nivel mundial debido a que sus aceites esenciales son utilizados en medicina, industrias cosméticas y perfumería. Los principales compuestos del aceite esencial de

*Lavandula dentata*, son los monoterpenos oxigenados (68,6%), seguidos de los monoterpenos hidrocarburos (2,7%), sesquiterpenos oxigenados (2,6%) e hidrocarburos sesquiterpenos (2,6%). La presencia de monoterpenos oxigenados 1,8-cineol y alcanfor dan el aceite esencial propiedades medicinales y terapéuticas con acciones antiespasmódico, antifungico, bactericida, antiinflamatorio y analgésicos, aún actuando como repelente e insecticida (Masetto, Deschamps, Mógor & Bizzo, 2011).

Desde hace mucho tiempo se viene realizando el cultivo de la *Lavandula dentata* de manera convencional mediante semillas y esquejes (Magazine, 2019), pero con la llegada de la biotecnología vegetal, comenzaron a desarrollarse las técnicas de cultivo *in vitro* en las últimas décadas (Municio, 1999), siendo objeto de estudio en diferentes países que a su vez, dieron origen a importantes investigaciones como ser: Hernández Amador, 2017; Koefender, et al., 2021; Echeverrigaray,

Basso, & Andrade, 2005; Pereira Machado, Lopes da Silva, & Biasi, 2011.

Actualmente en Bolivia no hay estudios específicos del cultivo in vitro de *Lavandula dentata*; pero en caso de existir, estos estudios aún no han sido publicados.

Este trabajo de investigación es para obtener plantas sanas, en gran cantidad y así tener material vegetal de buena calidad llegando a beneficiarse los microempresarios y la población en general que le dan uso potencial a la lavanda.

## MÉTODOS

Desinfección de las yemas apicales y axilares, sobrevivencia y contaminación, crecimiento de explantes, número de hojas y análisis estadístico del crecimiento. La desinfección de las yemas apicales y axilares está basada en (Hernández Amador, 2017) con modificaciones.

El crecimiento longitudinal del explante apical está basado en (Pereira Machado, Lopes da Silva, & Biasi, 2011).

El crecimiento longitudinal del explante axilar está basado en (Hernández Amador, 2017)

Los equipos utilizados son: estufa de esterilización, medidor de pH, agitadores magnéticos, autoclave, cabina de flujo laminar clase I.

Materiales: probeta de 200 ml, 5 vasos precipitados de 200 ml, varilla, 50 tubos de ensayo, 5 jeringas, papel aluminio, 3 gradilla, 1 mechero, 1 placa petri, material quirúrgico, mechero, tijera, algodón, frasco volumétrico de 200 ml.

## RESULTADOS Y LA DISCUSIÓN

Distribución de la etapa de iniciación a partir de yemas axilar y apical de la especie *Lavandula dentata* de plantas vivas, oxidación y contaminación por hongos y bacterias.

Tabla 1. Distribución de la etapa de iniciación

Sobrevivencia y Contaminación		Cantidad (n)	Porcentajes (%)
Hongos	Con desarrollo	0	0
	Sin desarrollo	50	100
Bacterias	Con desarrollo	1	2
	Sin desarrollo	49	98
Oxidación	Si	0	0
	No	50	100
Vivas	Si	49	98
	No	1	2

Fuente: Elaboración propia, 2020

**Interpretación:** Según la presente tabla, el porcentaje de sobrevivencia fue del 98% para la especie *Lavandula dentata*. El porcentaje de contaminación por hongos fue del 0%, contaminación por bacterias fue del 2%, y el porcentaje de oxidación 0%. Los resultados demuestran que el uso de desinfectantes para la obtención de un mayor número de yemas apicales y axilares libres de microorganismos es altamente satisfactorio. En comparación con el autor (Hernández Amador, 2017) que utilizó etanol 70%, hipoclorito sódico más tween 20, fue del 25% +/- 3,07.

**Gráfico 1. Barras de distribución de la etapa de iniciación a partir de yemas axilar y apical de la especie *Lavandula dentata* L., porcentajes de: plantas vivas, oxidación y contaminación por hongos y bacterias.**

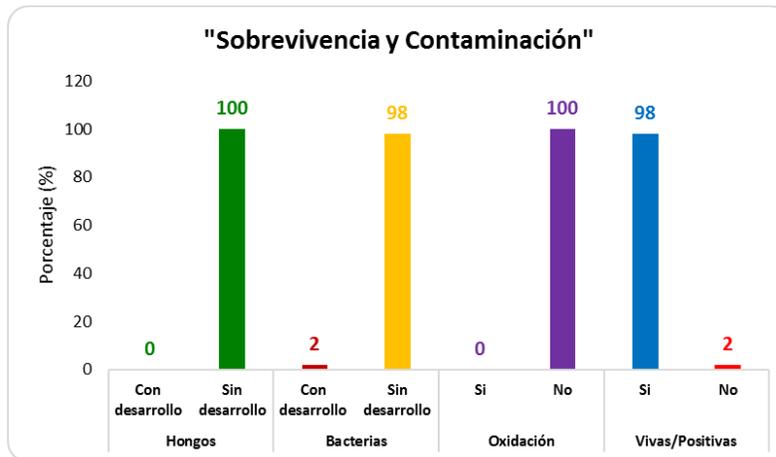
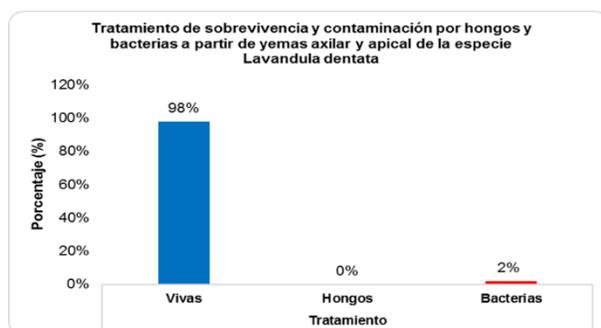


Tabla 2. Distribución por tratamiento de sobrevivencia y contaminación por hongos y bacterias a partir de yemas axilares y apicales de la especie *Lavandula dentata*

Tratamiento	N° total de explantes introducidos	Vivas	Hongos	Bacterias
T1 (ANA 0 mg/ml + BAP 0 mg/ml)	10	10	0	0
T2 (ANA 0,025mg/ml + BAP 0,12 mg/ml)	10	9	0	1
T3 (ANA 0,05 mg/ml + BAP 0,12 mg/ml)	10	10	0	0
T4 (ANA 0,025 mg/ml + BAP 0,25 mg/ml)	10	10	0	0
T5 (ANA 0,05 mg/ml + BAP 0,25mg/ml)	10	10	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>50</b>	<b>49</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>PORCENTAJE</b>	<b>100%</b>	<b>98%</b>	<b>0%</b>	<b>2%</b>

**Gráfico 1. Barras de distribución por tratamiento de sobrevivencia y contaminación por hongos y bacterias a partir de yemas axilares y apicales de la especie *Lavandula dentata*.**



contaminación por bacterias, el resto de los demás tratamientos presentan el 98% de sobrevivencia, con explantes apicales y axilares libres de microorganismos contaminantes.

En comparación con el autor (Hernández Amador, 2017), el 25% +/- 3,07 fue tratamiento con MS+ BA 0,5 mg/l+ ANA 0,5 mg/l que presentó contaminación por hongos.

**Interpretación:** Según la presente tabla, el tratamiento 2 (T2) presentó 2% de

**Tabla 3. Pruebas de ANOVA inter-sujetos "Crecimiento longitudinal de explantes Apicales**

Pruebas de ANOVA inter-sujetos "Explante Apical"							
Origen		Suma de cuadrados SC	grados de libertad gl	Media cuadrática MC	F-Fisher F	P-Valor Sig.	Significativo P < 0,01
Repeticiones	Explante Apical	16,525	9	1,836	35,538	0,000	Significativo
Tramamiento	Explante Apical	2,600	4	0,650	12,581	0,000	Significativo
R * Tramamiento	Explante Apical	19,000	36	0,528	10,215	0,000	Significativo
Error	Explante Apical	7,750	150	0,052			
Total	Explante Apical	137,000	200				

**Interpretación:** Según el análisis de varianza (ANOVA), existen alta diferencia significativa del crecimiento entre repeticiones, tratamiento y repeticiones por tratamiento de yemas apicales con un p valor 0,000 que significa que es  $P < 0,05$  de la prueba de ANOVA

El mayor crecimiento longitudinal se dio en T1 (0 mg/ml de ANA y 0 mg/ml BAP) con 0,825 cm, y el segundo lugar T4 (ANA 0,025 mg/ml

y BAP 0,25 mg/ml) con 0,800 cm (anexo 17,18). En comparación con la (Pereira Machado, Lopes da Silva, & Biasi, 2011), la mayor altura de los brotes fue de 2,7 cm obtenida en un medio que contenía BAP 0,5  $\mu$ M + IBA 2,5  $\mu$ M + GA3 0,3  $\mu$ M, donde la evaluación fue de 30 días.

**Tabla 4. Pruebas de ANOVA inter-sujetos "Crecimiento longitudinal de explantes Axilares"**

Pruebas de ANOVA inter-sujetos "Explante Axilar"							
Origen		Suma de cuadrados SC	grados de libertad gl	Media cuadrática MC	F-Fisher F	P-Valor Sig.	Significativo P < 0,01
Repeticiones	Explante Axilar	11,780	9	1,309	11,219	0,000	Significativo
Tramamiento	Explante Axilar	3,230	4	0,808	6,921	0,000	Significativo
R * Tramamiento	Explante Axilar	26,770	36	0,744	6,374	0,000	Significativo
Error	Explante Axilar	17,500	150	0,117			
Total	Explante Axilar	98,000	200				

**Interpretación:** Los resultados de análisis de varianza (ANOVA) determinan que existen diferencias estadísticas significativas del crecimiento entre repeticiones, tratamiento y repeticiones por tratamiento de yemas axilares con un p valor 0,000 que significa que es  $P < 0,05$  de la prueba de ANOVA (anexo 16). El mayor crecimiento longitudinal de

yemas axilares se dio en el T2 (ANA 0,025 mg/ml y BAP 0,12 mg/ml) con 0,550 cm y T3 (ANA 0,05 mg/ml BAP 0,12 mg/ml) con 0,525 cm, (anexo 17,18). En comparación con el (Hernández Amador, 2017) tratamiento MS + BA 1 mg/L + ANA 0,5 mg/L fue del 46% +/- 3,60 con 16 +/- días. Esto significa que el

tratamiento con ANA y BAP son más efectivos que ANA y BA.

<b>Tabla 5. <i>Lavandula dentata</i> Números de brotes NEAP por tratamiento</b>												
Tratamientos	Repeticiones										Sumas	Medias
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
T1 (ANA 0 mg/ml + BAP 0 mg/ml)	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0	32	3,2
T2 (ANA 0,025 mg/ml + BAP 0,12 mg/ml)	4	2	4	2	0	4	4	0	0	4	24	2,4
T3 (ANA 0,05 mg/ml + BAP 0,12 mg/ml)	2	4	2	2	2	4	2	4	0	0	22	2,2
T4 (ANA 0,025 mg/ml + BAP 0,25 mg/ml)	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0	32	3,2
T5 (ANA 0,05 mg/ml + BAP 0,25 mg/ml)	4	4	4	4	0	0	4	0	0	4	24	2,4

**Interpretación:** La presente tabla indica que el tratamiento 1 y el tratamiento 4, producen una media 3,2 cantidades de hojas siendo estos los tratamientos óptimos para desarrollar un mayor número de brotes apicales para la especie.

<b>Tabla 6. <i>Lavandula dentata</i> Números de brotes NEAX por tratamiento</b>												
Tratamientos	Repeticiones										Sumas	Medias
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
T1 (ANA 0 mg/ml + BAP 0 mg/ml)	0	3	2	0	0	0	2	0	4	4	15	1,5
T2 (ANA 0,025 mg/ml + BAP 0,12 mg/ml)	0	4	0	4	4	0	0	4	4	0	20	2,0
T3 (ANA 0,05 mg/ml + BAP 0,12 mg/ml)	2	1	2	2	2	1	2	0	4	4	20	2,0
T4 (ANA 0,025 mg/ml + BAP 0,25 mg/ml)	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	8	0,8
T5 (ANA 0,05 mg/ml + BAP 0,25 mg/ml)	1	0	0	1	4	4	1	4	4	1	20	2,0

**Interpretación:** En la presenta tabla se muestra que el tratamiento 2, 3 y 5 producen una media 2,0 (20) hojas siendo estos los tratamientos óptimos para desarrollar un mayor número de brotes axilares de *Lavandula dentata*.

**Tabla 5. Promedio de crecimiento de las 4 semanas**

Semanas	<i>Lavandula dentata</i> (cm)
1	0,372
2	0,802
3	0,976
4	0,722

Tabla 6. Prueba de ANOVA inter-sujetos

Pruebas de ANOVA inter-sujetos						
Origen	Suma de cuadrados SC	grados de libertad gl	Media cuadrática MC	F-Fisher F	P-Valor Sig.	Significativo P < 0,01
Semanas	9,668	3	3,223	9,071	0,000	Significativo
Error	69,628	196	0,355			
Total	182,400	200				

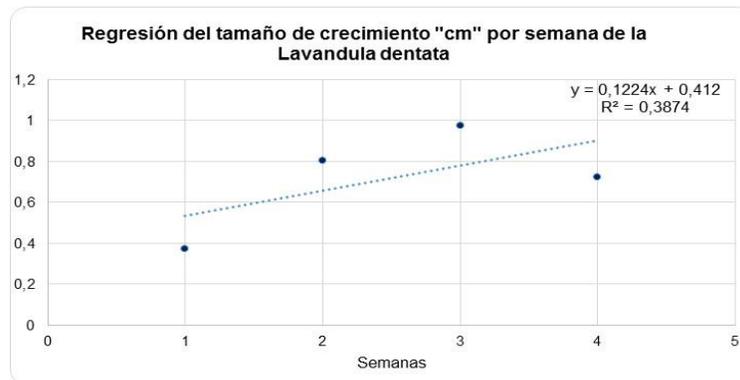
**Interpretación:** El promedio de crecimiento de las 4 semanas de la lavanda muestra que en la semana 3 hubo un crecimiento más alto de 0,976 cm. mientras que en la semana 4 hubo un descenso a 0,722 la diferencia es de 0,254 cm, a pesar de esta caída crecimiento según la prueba de varianza (ANOVA) tiene un p valor 0,000 que significa que es  $p < 0,05$  es altamente significativo. La caída del crecimiento en la semana 4 es debido a que los explantes presentaron necrosidad en la

parte basal por déficit de nutrientes en el medio de cultivo.

Tabla 7. Evaluación del tamaño de crecimiento, en cm por semana de la Lavandula dentata

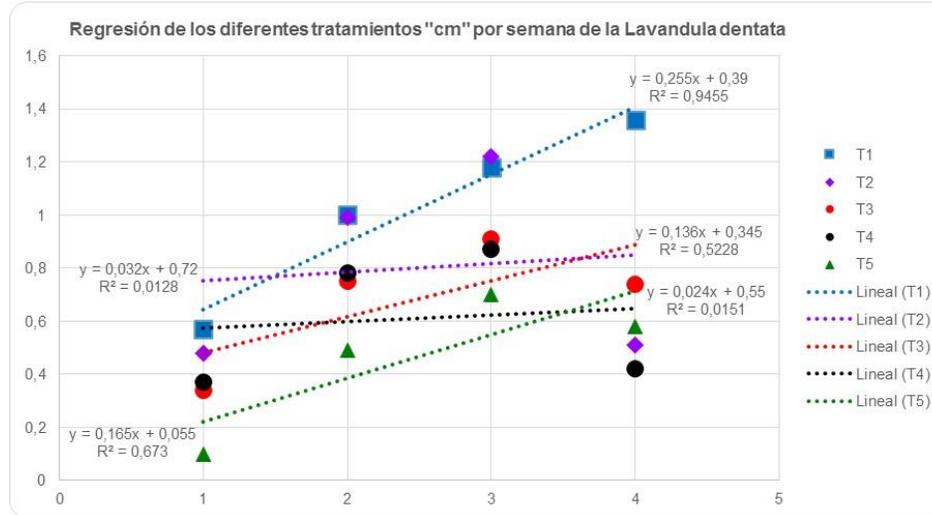
Semanas	<i>Lavandula dentata</i>
1	0,372
2	0,802
3	0,976
4	0,722

Gráfica 1. Regresión del tamaño de crecimiento cm por semana de la Lavandula dentata.



**Interpretación:** La relación entre el tiempo y crecimiento de la especie *Lavandula dentata* mediante el análisis de regresión, indica que

creció 0,122 cm por semana. El valor de  $R^2$  (0,3874) presentó una correlación positiva débil, con una línea de tendencia casi lineal.

**Gráfica 2 Regresión de los diferentes tratamientos "cm" por semana de la Lavandula dentata**

**Interpretación:** El coeficiente de regresión indica que las concentraciones de los diferentes tratamientos T1, T2, T3, T4, T5, presentan crecimiento 0,255; 0,032; 0,136; 0,024; 0,165 centímetros por semana respectivamente. Se puede observar que los coeficientes de correlación lineal (valor de R) del tratamiento 1 con  $R^2 = 0,9455$  son muy aproximados al valor de 1, lo que significa que la correlación entre variables es alta, a diferencia de la  $R^2 = 0,0128$  del tratamiento 2,  $R^2 = 0,0151$  del tratamiento 4, presentan una correlación positiva débil; mientras que  $R^2 = 0,5228$  del tratamiento 3,  $R^2 = 0,673$  del tratamiento 5, tienen una correlación positiva moderada.

## CONCLUSIONES

En la presente tesis se estableció un protocolo de cultivo *in vitro* de lavanda (*Lavandula dentata*), en la etapa de introducción a partir de yemas axilares y apicales, en el laboratorio de Biotecnología (BIOFAN) de la FCA/UAGRM, de enero a julio del 2020.

Los explantes apicales y axilares que fueron desinfectados en la etapa de introducción dio como respuesta el porcentaje de sobrevivencia del 98% siendo la contaminación por bacterias del 2% en el tratamiento 2 (T2), que garantizó

la obtención de explantes libres de contaminantes con hongos o bacterias.

El mayor crecimiento longitudinal de explantes apicales se presentó en el tratamiento 1 con 0,825 cm., generando una media de 3,2 hojas y en el caso de explantes axilares el tratamiento 2 produjo el mayor crecimiento con 0,550 cm., con una media de 2,0 hojas.

La especie *Lavandula dentata* llega a crecer de manera general 0,122 cm por semana y es el tratamiento 1 el que mejor favorece a su crecimiento en primer lugar con 0,255 cm por semana en ambos tipos de explantes.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Hernández Amador, E. (2017). Establecimiento *in vitro* de cultivos de *Lavandula dentata*. España. Obtenido de <https://riull.ull.es/xmlui/handle/915/5758>.

Pereira Machado, M., Lopes da Silva, A. L., & Biasi, L. A. (2011). Efecto de los reguladores del crecimiento vegetal en la regeneración *in vitro* de puntas de brotes de *Lavandula dentata* L. (28-31 ed., Vol. 2). Brasil: J. Biotec. Biodivers

Universidad Católica Boliviana “San Pablo”  
Unidad Académica Campesina Carmen Pampa (UAC-CP)  
Departamento de Investigación y Proyectos

La Paz - Bolivia

## **Germinación *in vitro* de *Epidendrum secundum* con diferentes agentes gelificantes y concentraciones de agua de coco**

Beatriz Mamani Sánchez, Máximo Nova Pinedo, Ana Eva Muriel Mamani y Andreina Noelia Maquera Pardo

### **Resumen**

En el presente estudio se realizó pruebas de germinación en *Epidendrum secundum* en medios alternativos con sales de cultivo hidropónico (macro y micronutrientes) suplementados con 10 y 20 % de leche de coco y tipos de gelificantes (gelrite, agar y carragenina). Las semillas fueron desinfectadas al 0,5% de NaClO por 15 min. Fueron cultivados en la cámara de crecimiento a 25°C fotoperiodo de 16/8 horas luz y oscuridad durante 105 días. Se evaluó el porcentaje de germinación, mortalidad y fases de desarrollo en la germinación.

*Epidendrum secundum* presento un 85.8 % de geminación en el medio gelrite en el medio de cultivo con sales de hidroponía y con la adición de 20% de leche de coco la germinación fue mayor (86,4) que con 10% (78,1) de este. No obstante, con la adición de carragenina, los protocormos germinados tienden a morir en un 1.8%.

**Palabras claves:** *Orchidacea, carragenina, gelrite, agar, agua de coco*

### **INTRODUCCIÓN**

Entre las orquídeas, *Epidendrum secundum* Jacp es de amplia distribución y nativa de América. Se caracteriza por ser de habito geófito como litófito. Inflorescencia en racimos terminales (Santa Cruz & MA Choce-Peña, 2020). Las semillas de las orquídeas son tan pequeñas que contienen poca o ninguna reserva para llevar a cabo la germinación, es decir, no presentan endospermo, por lo que en condiciones naturales se asocian con hongos que digieren la materia orgánica y transfieren los carbohidratos al embrión de la orquídea, permitiendo que se desarrolle la planta (Abdelnour & Muñoz, 1997).

En orquídeas se tienen dos vías de geminación en medios asimbiótico y simbióticos, ambas contribuyen en programas de reintroducción. En medios asimbióticos, es a través de cultivo de tejidos en medios específicos las cuales les proporcionan

nutrientes para promover la germinación. Es así, que Lewis Knudson, demostró que es posible la germinación en un medio que tiene sales y azúcar (knudson, 1991) citado en (Salazar-Mercado, 2012). Entretanto, la germinación simbiótica requiere de hongos micorrizicos principalmente con hongos basidiomicetos del grupo de Rhizoctonia (Rasmussen, 1995).

Los medios basales en orquídeas generalmente están constituidos por las sales de MS (Murashige y Skoog, 1962), Knudson C (1922), Vacin y Went (1949) entre otros, un agente gelificante y suplementos naturales como el agua de coco, pulpa de plátano y jugo de tomate. Por las características de habito de crecimiento de las orquídeas epifitas, terrestres y rupícolas sus requerimientos nutricionales son mínimos, y contrastando esto en medios de cultivo son necesarios que tengan los macroelementos (N, P, K), pudiendo contener además otros elementos

como Mg, Bo, Zn, Fe (García y Cuevas, 2000) citado en (Rodríguez, 2013). Se evidencia en otros trabajos en cultivo *in vitro*, emplean fertilizantes comerciales como alternativa de minimizar costos. Un fertilizante que es ampliamente usado en medios de hidroponía de la FAO, mismo que contiene macro y micronutrientes. De la misma forma el uso de agentes alternativos al phytigel, agar como la carragenina, ya que el agar según (Mejía & Vitorelli, 1988) el costo representa el 80 % del costo total en la preparación de medios de cultivo. En ese sentido el presente trabajo tiene como objetivo describir el proceso ontogénico de *Epidendrum secundum* en condiciones *in vitro* y determinar el porcentaje de germinación en el medio de cultivo con sales de hidroponía con diferentes agentes gelificantes y concentraciones de agua de coco.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología en las instalaciones de la Unidad Académica Campesina Carmen Pampa (UAC-CP) de Coroico, de la provincia Nor Yungas el Departamento de La Paz, Bolivia. Geográficamente se sitúa a 16° 20' 30" de latitud Sur y 67° 50' 00" de longitud Oeste a una altura de 1850 m.s.n.m. (Alarcón, 2008). Las capsulas de las *E. secundum* fueron colectada de la zona Puerta del Viento cercanías a la Cerro Uchumachi a 16° 20' 30" de latitud Sur y 67° 50' 00" de longitud Oeste.

En base a las sales comerciales que se emplean soluciones nutritivas en cultivo hidropónico se procedió a preparar dos soluciones A (macronutrientes) y B (micronutrientes), ver **tabla 1**.

Nombre	Fórmula	Solubilidad g/l
Nitrato de Calcio	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1220
Nitrato de Potasio	KNO <sub>3</sub>	130
Nitrato de Magnesio	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	279
Fosfato monopotásico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	230
Sulfato de	MgSO <sub>4</sub> 6H <sub>2</sub> O	710

Magnesio		
Sulfato de Potasio	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	111
Sulfato de Manganeso	MnSO <sub>4</sub>	980
Ácido Bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	60
Sulfato de Cobre	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	310
Sulfato de Zinc	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	960
Molibdato de Amonio	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> 4H <sub>2</sub> O	430

Fuente: FAO, La Empresa Hidropónica de Mediana Escala, La técnica de la solución Nutritiva Recirculante (NFT), (1996) citado en (Gilsanz, 2007).

Para el preparado de 1 litro de medio de cultivo se añadió 5 ml de la solución A y 2 ml de la solución B. se adicionó agua de coco (10 y 20% dependiendo del tratamiento empleado), 20 gr de azúcar de mesa, el pH fue ajustado a 5.6 y se adicionó el agente gelificante (gelrite, agar y carragenina). Seguidamente los medios fueron autoclavados a 15 PSI a 121 °C durante 15 minutos. La batería de tratamientos de los medios a emplear estaba en función a la siguiente combinación descrita en la siguiente tabla:

Tratamiento	Factor A Tipo de agente gelificante	Factor B Concentración de agua de coco (%)
T1	Carragenina	10
T2	8 g/L	20
T3	Agar.	10
T4	6 g/L	20
T5	Gelrite.	10
T6	2 g/L	20

Las semillas fueron desinfectadas con 0.5% de hipoclorito de sodio durante 15 min. Seguidamente, las semillas sembradas en los medios de cultivo fueron trasladadas a la cámara de crecimiento a 25°C fotoperiodo de 16/8 horas luz y oscuridad.

## Análisis estadístico

El diseño aplicado fue DCA. El factor de estudio corresponde, el tipo de agente gelificante (carragenina, agar y gelrite) y la

adición de agua de coco (10 y 20%) en los medios de cultivo (Calzada-Benza, 1970).

### VARIABLES DE RESPUESTA

Las variables evaluadas fueron: a) porcentaje de individuos en 4 fases de desarrollo para la germinación en orquídeas (Otero & P, 2009) corresponden a: Fase 0: Son semillas que no son viables, Fase I: Son semillas con embrión viables. Fase II: Son semillas que empiezan a aumentar su tamaño en forma de redondo que está a punto de germinar. Fase III: Semillas germinadas con la aparición de brote apical y protocomos. Fase IV: plantula con brote apical y protocomos desarrollados.

b) porcentaje de germinación para este cálculo en base a la siguiente formula, donde se consideró como semillas germinadas desde la fase II, III y IV.

$$\%Germinacion = \frac{FII, FIII + FIV}{F0 + FI + FII + FIII + FIV} * 100\%$$

c) porcentaje de mortalidad. Las evaluaciones se realizaron con la ayuda de un estereoscopio cada 3 semanas durante 105 días.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### fases de desarrollo durante la germinación de *E. secundum*

A continuación, se detalla las fases por la cual se pasaron las semillas de *E. secundum* durante la germinación en condiciones *in vitro*:



Semillas sin embrión (No viable)



Semillas con embrión viable



Semillas con embrión abultado



Semilla con ruptura de testa e inicio del estado protocormal (germinado)



Plantines con hojas y raíces desarrollados *in vitro*

**Figura 1.** Esquema del proceso de germinación *E. secundum*

### Porcentaje de germinación

En la **tabla 1** se denota que, al cabo de 21, 42, 63, 84 días de evaluación no se presentaron diferencias significativas como efecto del agente gelificante en el medio de cultivo, sin

embargo, hay diferencias significativas al cabo de 105 días. Entre la comparación a la cartagenina y el gelrite fueron estadísticamente iguales de 82,4 y 85,8% germinación. Con relación a la aplicación de agua de coco se presentaron diferencias

significativas entre las concentraciones de agua de coco en los cinco tiempos de evaluación. La adición de 20% de leche de coco favorece en el porcentaje de germinación de un 86.4%. finalmente, no se presentaron diferencias entre factores demostrase que estos son independientes.

Los agentes gelificantes son empleados como medio de soporte, pero estos tienen algunos componentes orgánicos que pueden estimular el crecimiento de los brotes en cultivo *in vitro*, y es parte de los componentes del medio de cultivo que se utilizan para que éste permanezca en un estado semisólido y que proporciona sostén al explante McLachan (1985) citado por (Babbar & Jain, 1998).

De los resultados encontrados en la germinación de *E. secundum* la carragenina no favoreció en la germinación, esto probablemente se deba a que es un producto es empleado con fines de la industria alimentaria, es un gel opaco, con mucha celulosa y fibra, bajo grado de pureza (semi refinada) o un gel claro, transparente, alto grado de pureza (refinada) (Porto, 2003). Mientras que, entre el Gelrite y el agar, el primero no presenta impurezas. En un estudio realizado en una especie cactácea con Agar, Gelrite presentaron 98 y 97,7% de germinación (Lopez & Lopez, 2016). Con ello se constata que estos dos agentes gelificantes presentan altos porcentajes de germinación en condiciones *in vitro*.

**Tabla 3.** Efecto de diferentes tipos de agentes gelificantes y dos niveles de concentración de agua de coco en el porcentaje de germinación de *Epidendrum secundum* cada 21 días de evaluación.

Fuente de variación	Tiempo de evaluación				
	21 días	42 días	63 días	84 días	105 días
Agente gelificante (FA)					
Agar	38,1 <sup>a</sup>	55,3 <sup>a</sup>	67,3 <sup>a</sup>	75,0 <sup>a</sup>	82,4 <sup>ab</sup>
Gelrite	31,9 <sup>a</sup>	57,5 <sup>a</sup>	69,7 <sup>a</sup>	78,7 <sup>a</sup>	85,8 <sup>a</sup>
Carragenina	29,3 <sup>a</sup>	50,8 <sup>a</sup>	61,4 <sup>a</sup>	70,3 <sup>a</sup>	78,6 <sup>b</sup>
F cal.	2,83 NS	1,73 NS	2,65 NS	3,60 NS	4,33*
Pr > F	0,0645	0,1833	0,0763	0,0317	0,0162
Concentración de agua de coco (FB)					
AC2 (20%)	36,6 <sup>a</sup>	59,6 <sup>a</sup>	71,2 <sup>a</sup>	79,5 <sup>a</sup>	86,4 <sup>a</sup>
AC1 (10%)	29,6 <sup>b</sup>	49,4 <sup>b</sup>	61,1 <sup>b</sup>	69,8 <sup>b</sup>	78,1 <sup>b</sup>
F cal.	4,51*	8,02**	11,44**	14,40**	17,45**
Pr > F	0,0366	0,0058	0,0011	0,0003	<0,0001
FA*FB					
F cal.	1,53 NS	0,45 NS	0,31 NS	0,23 NS	0,27 NS
Pr > F	0,2222 (41,1%)	0,6385	0,7322	0,7948	0,7607
Coef. Var.	8,8%	(29,8%) 8,0%	21,5%	16,1%	11,4%

Dónde: <sup>a,b</sup> Prueba Duncan al 5%. \*\* Altamente significativo (<1%). \* Significativo (1%-5%). NS No significativo.

Comparando costos de cada agente gelificante para 1 litro de medio de cultivo de agar se invierte Bs. 9,6, Gelrite Bs. 7 y Carragenina es Bs 1.6. con esta relación de costos la carragenina es la más económica. Al respecto, (Mamani, 2009) mencionan que el agar o

phytagel puede representar hasta 70% del costo de las plantas.

El porcentaje de germinación en esta *E. secundum* es similar al trabajo realizado por (Sarbi & Guzman, 2007) con 10% de agua de

coco fue al 100% y con la adición de pulpa de plátano fue 86,37% ambos en el medio MS.

<https://www.redalyc.org/journal/621/62146619008/html/>

### Porcentaje de mortalidad

El análisis de varianza presentó diferencias significativas ( $F=3.80$ ;  $GL_{1,57}$ ;  $P<0.01$ ) entre los agentes gelificantes, mientras con la aplicación de agua de coco no se presentan diferencias ( $F=3.44$ ;  $GL_{1,57}$ ;  $P>0.01$ ). De la comparación de medias se evidencio que el medio con carragenina seguido de agar presentaron 1,8 y 0,8 protocormos muertos. No ocurriendo así en el medio que se adicione Gelrite.

Calzada-Benza. (1970). *Métodos estadísticos para la investigación*. Lima, Perú: Jurídica.

Gilsanz, J. (2007). *Hidroponia*. Montevideo: Unidad de comunicación y transferencia de tecnología. Obtenido de <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/520/1/11788121007155745.pdf>

Lopez, A., & Lopez, M. (2016). Efecto de diferentes agentes gelificantes en la germinación y desarrollo in vitro de plantulas de *Echinocactus platyacanthus link et otto* (cactacea). *POLIBOTANICA*, 153-166, . doi:10.18387/polibotanica.42.8

Mamani, M. (2009). *Evaluación de la carragenina, en la propagación in vitro de tres especies vegetales de importancia comercial papa, crisnatemo y piña*. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz.

## CONCLUSIONES

*Epidendrum secundum* presento un 85.8 % de geminación en el medio gelrite al cabo de 105 días de evaluación en el medio de cultivo con sales de hidroponía con la adición de 20% de leche de coco su porcentaje de germinación fue mayor que con 10% de este aditamento. No obstante, con la adición de carragenina, los protocormos germinados tienden a morir en un 1.8%.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelnour, A., & Muñoz, A. (1997). *Rescate, establecimiento, multiplicación y conservación in vitro de germoplasma de orquídeas en vías de extinción*. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica.

Otero, J., & P, B. (2009). Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epifitas. *Acta Agronomica*, 270-277.

Porto, S. (2003). *Agargel*. Obtenido de <http://www.agargel.com.br>

Alarcón, E. (2008). *Biodiversidad de insectos de las familias Syrphidae y Carabidae entre nichos ecológicos (Bosque. Borde del bosque y Área de cultivo) en tres comunidades del municipio de Coroico Nor Yungas*. Universidad Católica Boliviana Unidad Académica Campesina de Carmen Pampa, Coroico, Bolivia.

Rasmussen, H. (1995). *Terrestrial orchids: From seeds to mycotrophic plants*. University Press, 444.

Rodríguez, A. (2013). *Inducción de la germinación in vitro de Epidendrum radicans Pav. ex Lindl*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Babbar, S., & Jain, N. (1998). Isubgol as an alternative gelling agent in plant tissue culture media. *Plant Cell Reports*, 318-322. Obtenido de

Salazar-Mercado, S. (2012). Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo in vitro de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombroin (Orchidaceae). *ACTA AGRONÓMICA*, 69-78. Obtenido de

- <http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v61n1/v61n1a09.pdf>
- Santa Cruz, L., & MA Choce-Peña, N. V.-V.-R. (2020). Flora orquideológica del distrito Pulán,. *Arnaldoa*, 1-56. doi:10.22497/arnaldoa.271.27102.
- Sarbi, L., & Guzman, S. (2007). *Análisis de la variación de la tasa de germinación y crecimiento de las orquídeas Epidendrum secundum y Oncidium excavatum a través de medios de cultivo convencionales combinados con naturales*. Universidad del Azuay, Cuenca, Ecuador.

Universidad Católica Boliviana San Pablo.Cochabamba, Bolivia.  
Universidad Católica Boliviana San Pablo, Santa Cruz, Bolivia.

Cochabamba – Santa Cruz de la Sierra

## Caracterización biológica del fruto *Allagoptera leucocalyx* (motacuchí)

Camacho Ayelen J.<sup>1</sup>; Montellano Natalia<sup>2</sup>  
<sup>1</sup> ayelen.camacho@ucb.edu.bo

### Resumen

El motacuchí es un fruto tropical de una palmera baja que crece en todas las épocas del año y está ampliamente distribuida en la Chiquitania boliviana, este fruto no está caracterizado ni estudiado. El objetivo de este trabajo es caracterizar sus propiedades biológicas con el fin de promover su consumo y evaluar posibles aplicaciones. Las propiedades biológicas fueron determinados mediante métodos espectrofotométricos como: Folin-Ciocalteu, AlCl<sub>3</sub>, pH diferencial, DPPH•, ABTS•, turbidimetría y se hicieron antibiogramas. Los resultados mostraron que el fruto presenta compuestos bioactivos de interés como polifenoles, flavonoides y antocianinas con actividad antioxidante y antimicrobiana; siendo muy benéfico para la dieta y la salud. En conclusión, las propiedades determinadas en el fruto pueden posicionarlo como fuente potencial para el desarrollo de nuevos productos en áreas cosmética, alimenticia y farmacéutica.

**Palabras claves:** frutos, antioxidantes, polifenoles, flavonoides, antimicrobianos

### INTRODUCCIÓN

Bolivia es uno de los países tropicales con mayor biodiversidad en especies vegetales. En la región de la Chiquitania contamos con variedad de frutos tropicales no caracterizados debido a la escasa investigación que existe sobre los frutos tropicales. Este trabajo tiene como objetivo: caracterizar las propiedades biológicas como compuestos bioactivos y actividad antimicrobiana del fruto *Allagoptera leucocalyx* (motacuchí), un fruto nativo de la Chiquitania, con el fin de ampliar la información acerca de este, y crear una expectativa en su investigación para producirlo, comercializarlo e incluso agro industrializarlo.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Radical libre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo), radical libre 2,2-Azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), reactivo de Folin-Ciocalteu, ácido gálico, fueron obtenidos de Sigma Aldrich (Alemania); todos los demás productos químicos y reactivos

utilizados en este estudio eran de grado analítico. Todos los experimentos espectrofotométricos se realizaron en un espectrofotómetro ultravioleta-visible (UV-Vis) (Lamda-25, Perkin Elmer, Cambridge, Reino Unido).

Los frutos fueron donados por la Reserva Natural *Arubai* en el departamento de Santa Cruz, en conjunto con la Fundación para la Conservación del Bosque Chiquitano (FCBC).

Los compuestos bioactivos se extrajeron con etanol 70% (1:2 y 1:4) (p/p), 24h en agitación, se filtró y centrifugó (15min, 10<sup>5</sup> rpm), obteniéndose así el extracto etanólico de motacuchí (EEM), el extracto 1:2 se denominó como C1 y el extracto 1:4 como C2; finalmente fueron almacenados a 4°C hasta realizar las pruebas.

El contenido total de polifenoles fue determinado usando el método de Folin-Ciocalteu, se usó como estándar el ácido gálico y los resultados fueron expresados como mg de ácido gálico equivalente (GAE)

por 100 g de fruta. El contenido total de flavonoides fue determinado usando el método cloruro aluminio, se usó como estándar la quercetina y los resultados fueron expresados como mg de quercetina equivalente (QE) por 100 g de fruta; y por el método cualitativo de Shinoda. La cantidad de antocianinas totales se determinó según el método de pH diferencial y los resultados fueron expresados como mg de cianidin-3-glucoside por 100 g de fruta. La actividad antioxidante se determinó mediante los métodos de captación de los radicales libres: DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) y ABTS• (2,2'-azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) se usó trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) como estándar y la actividad antioxidante total fue expresada como  $\mu\text{mol}$  trolox/g de fruto. La actividad antimicrobiana se determinó por antibiograma y turbidimetría frente a 4 bacterias: *Shigella sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Escherichia coli* y *Salmonella sp.*

El contenido de bioactivos y actividad antioxidante para el extracto etanólico de motacuchí se presenta en la Tabla 1, donde para los polifenoles se encontró un valor medio, para los flavonoides un valor alto y para las antocianinas valores bajos. Asimismo, la prueba cualitativa indica la presencia de flavonoides del tipo flavonoles. En cuanto la actividad antioxidante se encontró que los valores DPPH• fueron menores en comparación a los valores ABTS, la diferencia sugiere que los compuestos antioxidante presentes en el extracto del motacuchi son altamente hidrofílicos o lipofílicos los cuales son más sensibles a la técnica ABTS• (Granados *et al.*, 2014).

En antibiograma la actividad antimicrobiana del fruto en C1 fue efectiva solo para *Shigella sp* (halo de inhibición  $\geq 7$  mm), mientras C2 fue efectiva frente a *Shigella sp.* (halo de inhibición  $\geq 12$  mm), *Escherichia coli* y *Pseudomonas sp* (halo de inhibición  $\geq 7-8$  mm).

## RESULTADOS

**Tabla 8: Compuestos bioactivos y actividad antioxidante determinados para el extracto etanólico de motacuchí**

Propiedades	EMM	
	C1	C2
Polifenoles (mg GAE/100 g)	171 $\pm$ 5	209 $\pm$ 12
Flavonoides (mg QE/100 g)	5,9 $\pm$ 0,1	7,9 $\pm$ 0,1
Antocianinas (mg C-3-G /100 g)	0,43 $\pm$ 0,03	0,72 $\pm$ 0,03
Act. Antioxidante		
ABTS• ( $\mu\text{mol}$ Trolox/g)	4,5 $\pm$ 0,1	9,3 $\pm$ 0,2
DPPH• ( $\mu\text{mol}$ Trolox/g)	3,9 $\pm$ 0,1	5,7 $\pm$ 0,2

En la Figura 1 se observa los resultados obtenidos para turbidimetría donde se observa que C1 fue efectiva contra *Escherichia coli* y *Shigella* mientras que C2 contra *Shigella*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas sp.* Diversos estudios reportaron que los flavonoides presentan actividad antimicrobiana por tanto podemos atribuir la actividad antimicrobiana a estos compuestos (Kumar & Pandey, 2013; Shahzadi & Shah, 2015; Wu *et al.*, 2008). En ambos métodos se observa mayor bioactividad para *Shigella sp.*, esto se puede asociar al pH

ácido del fruto (4,1) que actuó como factor bactericida contra *Shigella*, ya que a  $\text{pH} < 4,8$  se inhibe su crecimiento (Small *et al.*, 1994).

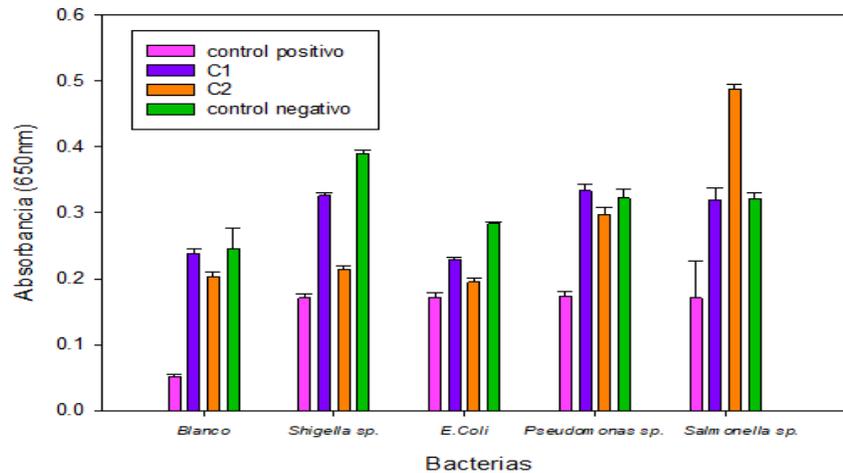
Los resultados determinados, muestran que C2 presenta mayor contenido polifenoles, flavonoides, antocianinas que C1. Este comportamiento es acorde lo reportado por en la literatura, donde se evidencia que a un mayor volumen de solvente hidroalcohólico existe una mejor transferencia de masa y por consiguiente una mejor extracción de

compuestos polares como polifenoles (Brighenti *et al.*, 2014; Hidalgo & Almajano, 2017).

bioactivos y las actividades antioxidante y antimicrobiana ya que para C2 se obtuvo mejores resultados en cuanto estas bioactividades

De manera que podemos predecir que existe una correlación positiva entre los compuestos

**Figura 1: Actividad antimicrobiana del extracto etanólico motacuchí por turbidimetría frente a Bacterias Gram negativas**



## CONCLUSIONES

En conclusión, la caracterización de compuestos bioactivos presenta altos contenidos de flavonoides, bajos contenidos de antocianinas y un moderado contenido de polifenoles y de actividad antioxidante. La actividad antimicrobiana del motacuchí muestra una alternativa prometedora especialmente para las infecciones por *Shigella sp.*

Las propiedades determinadas demuestran resultados prometedores para el consumo del fruto y el uso de sus compuestos bioactivos en diferentes industrias como la alimentaria, cosmética y farmacéutica, creando perspectivas de agroindustrialización.

## AGRADECIMIENTOS

A OWSD-UNESCO y IDRC por el financiamiento para llevar a cabo este Proyecto de investigación bajo la dirección de la Dra. Natalia Montellano

## BIBLIOGRAFÍA

Brighenti, F. Salvador, M., Delbem, A., Delbem, A., Oliveira, M., Soares, C., Freitas, L., & Koga, C. (2014). Systematic screening of plant extracts from the Brazilian pantanal with antimicrobial activity against bacteria with cariogenic relevance. *Caries Research*, 48(5), 353-360. <https://doi.org/10.1159/000357225>

Granados, C., Yáñez, X., & Acevedo, D. (2014). Evaluación de la Actividad Antioxidante del Aceite Esencial Foliar de *Myrcianthes leucoxylla* de Norte de Santander (Colombia). *Información Tecnológica*, 25(3), 11–16. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642014000300003>

Hidalgo, G., & Almajano, M. (2017). Red fruits: Extraction of antioxidants, phenolic content, and radical scavenging determination: A review. *Antioxidants*, 6(1), 1–27. <https://doi.org/10.3390/antiox6010007>

- Kumar, S., & Pandey, A. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *The Scientific World Journal*, 1, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- Shahzadi, I., & Shah, M. (2015). Acylated flavonol glycosides from *Tagetes minuta* with antibacterial activity. *Frontiers in Pharmacology*, 6(195), 1–10. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2015.00195/BIBTEX>
- Small, P., Blankenhorn, D., Welty, D., Zinser, E., & Slonczewski, J. (1994). Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of *rpoS* and growth pH. *Journal of Bacteriology*, 176(6), 1729–1737. <https://doi.org/10.1128/jb.176.6.1729-1737.1994>
- Wu, D., Kong, Y., Han, C., Chen, J., Hu, L., Jiang, H., & Shen, X. (2008). D-Alanine:D-alanine ligase as a new target for the flavonoids quercetin and apigenin. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32(5), 421–426. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2008.06.010>

Universidad Católica Boliviana “San Pablo”  
 Unidad Académica Campesina Carmen Pampa (UAC-CP)  
 Departamento de Investigación y Proyectos

La Paz – Bolivia

## **Germinación *in vitro* de *Zigopetalum maculatum* con diferentes protocolos de desinfección y adición de agua de coco en el medio de cultivo**

Beatriz Mamani Sánchez, Máximo Nova Pinedo, Jhimmy Alexander Espinal Coaquira  
[bmamani@uac-cp.edu.bo](mailto:bmamani@uac-cp.edu.bo)

### **Resumen**

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la viabilidad y germinación asimbiótica de *Zigopetalum maculatum* mediante tres protocolos de desinfección, de semillas en sobres de papel y en la jeringa, y cápsulas en diferentes medios suplementados con 10% y 20% de agua de coco. Las semillas fueron sumergidas al 0.5% de NaClO\*5 min. y las cápsulas al 1% de NaClO\*5 min. Las semillas fueron sembradas en MS con 10 y 20% de agua de coco respectivamente. El diseño fue DCA con 15 repeticiones, se evaluó el % de viabilidad, germinación y fases de desarrollo del proceso de germinación (F1, F2, F3 y F4). El porcentaje de viabilidad fue de 68,7%. Las semillas alcanzaron desinfectadas a partir de semillas presentaron fases más avanzadas de F3 y F4 que las procedentes de frutos. En el medio MS con 10% agua de coco 0.5% de NaClO\*5 min. se logró una germinación de 98%.

**Palabras claves:** Desinfección, viabilidad, germinación, *in vitro* y *Zigopetalum maculatum*

### **INTRODUCCIÓN**

La región de Los Yungas contiene 60% de las especies de orquídeas, de las cuales el 80% son endémicas Vásquez e Ibisch (2004). Entre ellas, se destaca *Zigopetalum maculatum* de hábito terrestre posee alto potencial como ornamental Jiménez *et al* (2015). Las flores son muy fraganciosas, en cada escapo floral posee entre 6 a 8 flores y tiene una duración de la floración de octubre a noviembre en el Cerro de Uchumachi en el municipio de Coroico (Observaciones en campo). Las semillas de orquídeas terrestres tienen una testa tipo reticulada y fuerte, más que las orquídeas epífitas Augustine *et al.* (2001).

La propagación *in vitro* es una alternativa viable, estratégica y recomendada para la conservación de las orquídeas (Bertolini *et al* 2014), el uso de protocolos eficientes asegura la supervivencia de los embriones en el proceso de germinación de orquídeas y el desarrollo del protocormo (estructura que se

forma durante la germinación y el desarrollo de la plántula (Billard, *et al* 2014). El desarrollo de medios de cultivo permitió que la viabilidad de las semillas de la familia (*Orchidaceae*) sea alta y por tal razón a podido fomentar la recuperación de especies como: *Cyrtopodium punctatum* y *Bletia purpurea* (Dutra *et al* 2008). En ese sentido, el presente trabajo tiene como objetivo estandarizar el protocolo de desinfección y medios para su introducción en condiciones asépticas a partir de semillas de *Zigopetalum maculatum*.

### **MÉTODOS**

El trabajo experimental se dividió en dos fases, una corresponde a realizar el seguimiento de floración y fructificación, y la otra consiste en la prueba de viabilidad y germinación en condiciones *in vitro*. El seguimiento fenológico, se realizó en una colina denominada Puerta del Viento dentro del cerro Uchumachi en el municipio de Coroico, localizada en coordenadas Longitud -67.68630859 Oeste y

Latitud -16,26792842 Sur a una altitud de 1850 msnm. Se observó 15 plantas adultas, de las cuales, en octubre a diciembre del 2020 se encuentran en floración y de enero a abril están con frutos y a finales de mayo del 2021 empiezan a madurar los frutos.

La fase de laboratorio se realizó en ambientes de Biotecnología de la Unidad Académica Campesina de Carmen Pampa. El medio de cultivo empleado, fue el MS (1962) al cual se añadió 20 g/L de sacarosa, 2 g/L de gelrite, el pH fue ajustado a 5.6. Para el trabajo se emplearon dos medios al primero y segundo se añadió 10% y 20% de agua de coco respectivamente. Los medios fueron dispensados en tubos de ensayo y después fueron autoclavados a 121°C (vapor a presión) a 15 PSI por 15 minutos.

La desinfección de las semillas y capsulas se consideró 3 tratamientos desinfectantes, la primera consistía en desinfectar las semillas en hipoclorito de sodio al 0.5% durante 5 minutos en sobre de té, posteriormente se sometió a con cinco enjuagues con agua destilada estéril. La segunda desinfección consistió en colocar la semilla dentro de la jeringa en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% durante 5 minutos seguido de enjuagues sucesivos. La tercera desinfección, la capsula madura e intacta fue sumergida en hipoclorito de sodio al 1% durante 5 minutos y

después se realizó enjuagues, para concluir con el flameado con alcohol al 70% previo abrir las semillas. Las semillas previamente desinfectadas fueron colocadas en caja Petri con agua destilada para formar una solución de semillas y después con la ayuda de una jeringa se sembró a cada tubo de ensayo 1 ml de la solución con semillas. Los tubos sembrados permanecieron en la sala de crecimiento por 65 días a una temperatura de 23°C, fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad.

## DISEÑO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Resultado de las combinaciones de los factores de estudio (métodos de desinfección y suplementación de agua de coco en los medios de cultivo) cuyos tratamientos se encuentran descritos en la **tabla 1**. Cada tratamiento tenía 15 repeticiones y está representada por un tubo de ensayo. El diseño experimental corresponde a un diseño completamente al azar. El análisis de datos se realizó a través del programa estadístico INFOSTAT (2010), el ANVA (análisis de varianza) y la prueba Tukey fueron analizados a un nivel de significancia del 5%.

<b>Tabla 1.</b> Tratamientos resultantes de la combinación de factores de estudio	
<b>Tratamiento</b>	<b>Combinación de factores de estudio</b>
T1	Desinfección semillas 0.5%*5 min y 10% agua de coco
T2	Desinfección semillas 0.5%*5 min 20% de agua de coco
T3	Desinfección semillas 0.5%*5 min jeringa 10% agua de coco
T4	Desinfección semillas 0.5%* 5 min jeringa 20% de agua de coco
T5	Desinfección de la capsula 1%* 5min 10% agua de coco
T6	Desinfección de la capsula 1%* 5min 20% de agua de coco

Las variables de respuesta fueron: a) porcentaje de viabilidad, b) porcentaje de contaminación y c) fases del desarrollo de la germinación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Porcentaje de viabilidad de las semillas

Las semillas de *Zigopetalum maculatum* con la prueba de terrazolium fue 68.7%  $\pm$ 11.9 de viabilidad y con 1.75% de semillas vacías sin

embrión (**Figura 1**). Duarte *et al* (2017) menciona que la baja viabilidad de las semillas y gran volumen de aire que poseen las semillas de orquídea terrestre, podrían dificultar la humectación de la misma y por ende su germinación y el resultado en *Z. maculatum* podría ser explicado por él autor. Además, es importante considerar que el porcentaje de viabilidad es variable depende de la especie esto fue demostrado (Muñoz y Jiménez, 2008) en el género *Phragmipedium* reporto para *P. humboldtii* fue 34.3%, en *P. longifolium* 44.7% y *P. pearcei* 82.3% de viabilidad de las semillas.



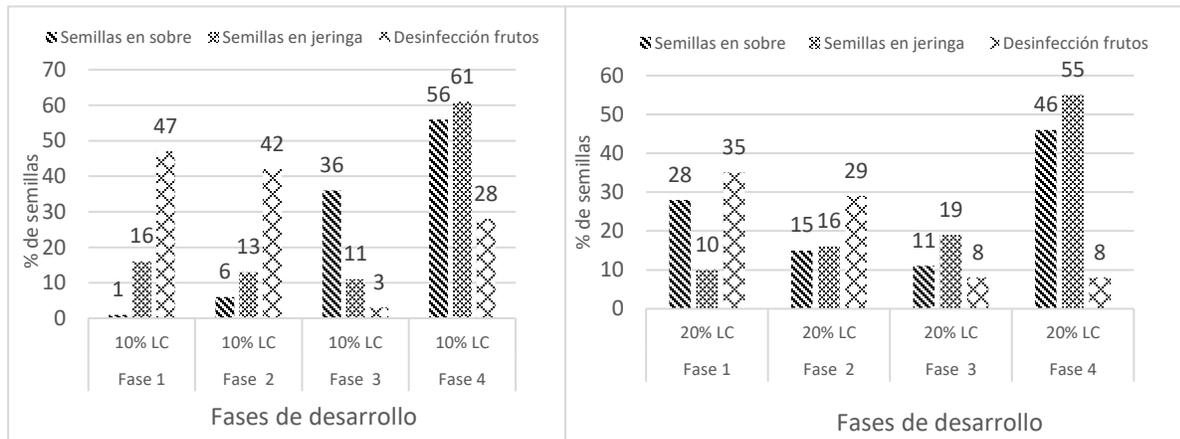
**Figura 1.** Semillas viables tenidas el embrión color rojo con Tetrazolium y semillas sin embrión

#### Porcentaje de contaminación

Los tratamientos T3 y T4 presentaron mayor porcentaje de contaminación. Ambos corresponden al empleo de la técnica de desinfección del método de la jeringa. A pesar que la solución desinfectante y tiempo es similar en el T1 y T2 (sobres de té), probablemente en el método de la jeringa requiere mayor tiempo de exposición, como señala Morales (2011) recomienda para la desinfección de semillas en *Cattheya nobilior* por el método de la jeringa deben sumergirlas 2% de hipoclorito de sodio (NaClO) durante 15 minutos. Además, la concentración del desinfectante varía en función al material vegetal, en orquídeas se usa desde 0.1, 0.5 a 2.5% de NaClO, al igual que el tiempo de desinfección varía desde 10 a 30 minutos.

En la **figura 2** se observa que las semillas desinfectadas en sobre y dentro la jeringa en los dos medios de cultivo al 10 y 20% de leche de coco respectivamente presentaron mayor porcentaje de individuos en fases más avanzadas de 3 y 4 en relación a las desinfectadas en frutos. También se observa que al 10% de leche de coco fue superior de todas las fases en relación al 20% de este aditamento.

El agua de coco es un inductor en la germinación, al igual que se emplea en promover la formación de brotes y también es empleado en orquídeas en reemplazo del endospermo líquido debido semillas carecen de endospermo. Al respecto, Patiño *et al* (2011) señala que el agua de coco actúa como agente promotor de la germinación de semillas con alto nivel de latencia, que coloca este recurso como una alternativa adicional, altamente eficaz y de bajo costo, para ser utilizado en estrategias de propagación vegetal de especies con semillas de latencia profunda. En los resultados encontrados en *Z. maculatum* se podría indicar que hasta un nivel de 10% es adecuado y no así duplicando esta concentración. En un estudio realizado por Santiago *et al* (2015) en *Epidendrum falcatum* evidencio un mayor porcentaje de germinación se obtuvo en el tratamiento con MS con 10% agua de coco, que el tratamiento control que solo contenía MS basal. Tal situación atribuye Del Pozo, *et al.* (2005) debido que el agua de coco contiene diversidad de hormonas con acción citoquinina, por ejemplo, del tipo isoprenoide, las cuales están implicadas en el proceso de división celular, y aromáticas, implicadas en procesos posgerminativos. En orquídeas terrestres de los géneros *Habenaria* y *Ophrys* evidencio el efecto positivo del agua de coco en el medio de cultivo, en término de formación y desarrollo de los protocormos (Stewart y Kane, 2006; Kitsaki *et al.*, 2004) lo cual se refleja en *Z. maculatum* debido a su hábito terrestre.

**Fases del desarrollo de la germinación**

**Figura 2.** Porcentaje de semillas en fases de proceso germinativo en dos medios de cultivo y distintos tratamientos desinfectantes

**Porcentaje de germinación**

El ANVA mostro diferencias significativas con respecto al tratamiento desinfectante y la interacción entre el tratamiento desinfectante ( $F=43.98$ ;  $GL_{2,84}$ ;  $P<0.01$ ) y ( $F=18.34$ ;  $GL_{2,84}$ ;  $P<0.01$ ). Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas para el factor de medios de cultivo ( $F=1.14$ ;  $GL_{1,84}$ ;  $P>0.05$ ). En la comparación de medias la desinfección en sobres de papel y en la jeringa fueron estadísticamente similares de 85.63% y 87.07% de semillas germinadas que las desinfectadas en el fruto que presento un 58,67%.

Resultado de la interacción de los factores de estudio en la Tabla 2 se observa que las semillas que fueron desinfectadas con 0.5% de  $NaClO_2$  5 minutos en sobres de papel y jeringa con 10% y 20% de leche de coco alcanzaron

un 98% y 90% de germinación (protocormos) respectivamente. Comparando los resultados con los tratamientos de la desinfección de semillas en sobres de té resultan más favorables por su bajo perdida de contaminación en relación al método de la jeringa, por lo que resulta más favorable por emplear el T1 para *Z. maculatum*. En orquídeas la germinación morfológicamente se la asigna fase protocormal, el cual puede diferenciarse en plántula o formar cuerpos parecidos a protocormos (PLBs) Arditti y Ernst (1993). El tiempo de germinación en *Z. maculatum* fue muy similar al reportado por Nagaraju y Mani (2005) en una especie del mismo género, *Z. intermedium* este último fue cultivado en el medio MS a la mitad de concentración con  $1.5 \text{ g l}^{-1}$  agua de coco con  $0.25 \text{ mg l}^{-1}$  PBZ y  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  of NAA permitió la formación de protocormos en 64 a 70 días.

**Tabla 2.** Efecto de la interacción de los tratamientos de desinfección y concentración de agua de coco en el porcentaje total de semillas germinadas

Tratamiento	F2	F3	F4	Total semillas geminadas
T1	6	36	56	<b>98</b>
T2	15	11	43	69
T3	13	11	61	85
T4	16	19	55	<b>90</b>
T5	42	3	28	73

T6	29	8	8	45
----	----	---	---	----

## CONCLUSIONES

El porcentaje de viabilidad de las semillas de *Z. maculatum* fue de 68.7%. Los tratamientos de desinfección aplicados en semillas en sobres de papel de té al 0.5% de NaClO y la capsula al 1% de NaClO durante 5 minutos de desinfección. De los tratamientos desinfectantes las semillas alcanzaron fases de desarrollo de germinación más avanzadas de F3 y F4 que las procedentes de frutos, los cuales tuvieron un comportamiento inverso. El mayor porcentaje de germinación fue 90% mediante la utilización del medio de cultivo MS con la adición 10% agua de coco con el tratamiento de desinfección en sobre de té con una solución de 0.5% de hipoclorito de sodio durante 5 minutos de inmersión

## BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Arditti, J; R. Ernst, "Micropropagation of Orchids," John Wiley and Sons, New York, 1993, p. 640.
- Augustine, J; Kumar, Y; Sharma, J. 2001. Orchids of India-II: Biodiversity and status of Bulbophyllum Thou. Daya publishing house, Trinagar, New Delhi. 113 p.
- Bertolini, V; Damon, A; Rojas, A. 2014. Quelato de hierro y agua de coco en la germinación in vitro de *Rossioglossum grande* (Orchidaceae). Mexico2-5. Disponible en [https://www.academia.edu/7621199/Vincenzo\\_Bertolini\\_Anne\\_Damon\\_Ashby\\_y\\_%C3%81ngel\\_Natanael\\_Rojas\\_Vel%C3%A1zquez\\_Quelato\\_de\\_hierro\\_y\\_agua\\_de\\_coco\\_en\\_la\\_germinaci%C3%B3n\\_in\\_vitro\\_de\\_Rossioglossum\\_grande\\_Orchidaceae\\_https://www.academia.edu/7621199/Vincenzo\\_Bertolini\\_Anne\\_Damon\\_Ashby\\_y\\_%C3%81ngel\\_Natanael\\_Rojas\\_Vel%C3%A1zquez\\_Quelato\\_de\\_hierro\\_y\\_agua\\_de\\_coco\\_en\\_la\\_germinaci%C3%B3n\\_in\\_vitro\\_de\\_Rossioglossum\\_grande\\_Orchidaceae\\_](https://www.academia.edu/7621199/Vincenzo_Bertolini_Anne_Damon_Ashby_y_%C3%81ngel_Natanael_Rojas_Vel%C3%A1zquez_Quelato_de_hierro_y_agua_de_coco_en_la_germinaci%C3%B3n_in_vitro_de_Rossioglossum_grande_Orchidaceae_https://www.academia.edu/7621199/Vincenzo_Bertolini_Anne_Damon_Ashby_y_%C3%81ngel_Natanael_Rojas_Vel%C3%A1zquez_Quelato_de_hierro_y_agua_de_coco_en_la_germinaci%C3%B3n_in_vitro_de_Rossioglossum_grande_Orchidaceae_)
- Billard, CE; Dalzotto, CA; Lallana, V.H. 2014, Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género *Oncidium*. Revista Polibotánica Núm. 38, pp. 145-157, ISSN 1405-2768; México
- Del Pozo, JC; López-Matas, MA; Ramírez-Parra, E; Gutiérrez, C. 2005. Hormonal control of the plant cell cycle. *Plant Physiol.* 123:173-183.
- Duarte, E.R; Mangeon, V; Koppers, G; Rocha, P; Niellia, F. 2017. Tamaño y viabilidad de semillas: implicancias en la evolución y conservación de *Phaius tankervilleae* (Orchidaceae). *Revista conservación* 39(2):388-399.2017.- Disponible en Doi: <https://dx.doi.org/10.1544/6/caldasia.v39n2.62184>
- Dutra, D; Kane, M; Richardson, L. 2009. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 96:235–243.
- Jiménez, I; Quezada, J; Bermejo, J. 2015. Orquídeas de Cotapata. Universidad Mayor de San Andrés 1-7. Disponible en [https://fieldguides.fieldmuseum.org/sites/default/files/rapid-color-guides-pdfs/361\\_bolivia-orquideas\\_de\\_cotapata.pdf](https://fieldguides.fieldmuseum.org/sites/default/files/rapid-color-guides-pdfs/361_bolivia-orquideas_de_cotapata.pdf)
- Kitsaki, C.; Zigouraki, S.; Ziobora, M.; y Chintziest, S. 2004. In vitro

- germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys* species (Orchidaceae). *Plant Cell Rep.* 23:284 - 290
- Morales I. 2011. Manual para el cultivo in vitro de la orquídea *Catleya nobilior* Flor símbolo de Concepción. 46 pp. Santa Cruz, Bolivia. Disponible en <https://www.festivaldelaorquidea.com/docs/ManualOrquideas2011.pdf>
- Nagaraju, V; Mani, SK. 2005. Rapid in vitro propagation of orchid *Zygopetalum intermedium*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 14(1). Disponible en <https://www.researchgate.net/journal/Journal-of-Plant-Biochemistry-and-Biotechnology-0971-7811>
- Muñoz, M; Jiménez, Víctor M. Capsule development, in vitro germination and plantlet acclimatization in *Phragmipedium humboldtii*, *P. longifolium* and *P. Pearcei*. 2008. *Lankesteriana International Journal on Orchidology*, vol. 8, núm. pp. 23- 31
- Universidad de Costa Rica Cartago, Costa Rica
- Patiño, C; Mosquera, F; Tulio R. 2011. Efecto inductor del agua de coco sobre la germinación de semillas y brotamiento de los cormos de la hierba de la equis *Dracontium grayumianum* *Acta Biol. Colomb.*, Vol. 16 N.º 1, 2011 133 - 142
- Stewart, S; Kane, M. 2006. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid plant. *Cell. Tiss. Organ Cult.* 86:147 – 158
- Santiago, T; Carballar, S; Chávez, V. 2015. Germinación y regeneración in vitro de *Epidendrum falcatum* LINDL *Ciencias de la Biología y Agronomía. Handbook T-I.* -©ECORFAN, Texcoco de Mora-México
- Vázquez, R; Ibisch P. (Eds). 2004. *Orquídeas de Bolivia*. Ed. FAN. Vol I y Vol II. Santa Cruz, Bolivia.

Universidad Mayor de San Simón  
Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias  
Departamento de Fitotecnia

Cochabamba – Bolivia

## **Optimización de medios de cultivo para la micropropagación *in vitro* de cinco nuevas variedades de plátano (*Musa x paradisiaca L.*) proveniente del Centro de Tránsito del INIBAP**

Gladys Geronimo<sup>1</sup> ; José Gino Aguirre<sup>2</sup>; Marcelo Flores <sup>3</sup>; Karen Melgarejo <sup>4</sup>  
E- mail: gladyscaranavi@gmail.com

### **Resumen**

El plátano (*Musa x paradisiaca L.*) es de vital importancia para la seguridad alimentaria debido a su alta demanda en el ámbito nacional y mundial.

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la FCAPF y V; el objetivo del presente trabajo fue encontrar un nivel apropiado de los reguladores de crecimiento; donde se evaluó la optimización de medios de cultivo para la micro propagación *in vitro* de cinco variedades de plátano con genotipos AAB del banco de germoplasma del INIBAP. El diseño utilizado fue completamente al azar (DCA), con cuatro repeticiones; en la fase de multiplicación se probaron cuatro diferentes niveles de citoquinina (BAP) 1.5, 2.5, 3.5 y 4.5 mg/l y en la fase de enraizamiento se utilizaron tres niveles de auxina (AIA) de 0.5, 1.5 y 2.5 mg/l. Los mejores resultados obtenidos para la maximización del número de brotes laterales por explante fueron para la variedad Congo2 el nivel de 2.48 mg (BAP)/l, para Corne1 con 3.42 mg (BAP)/l y para la variedad Moufoubila 2.60 mg/(BAP). Los resultados obtenidos en la segunda fase para el número de raíces se maximizan en la variedad Moufoubila con 1.16mg AIA/l y en la variedad Pelipita para longitud de raíz aplicando 1.38 mg/l de AIA.

**Palabras Clave: genotipos, *in vitro*, BAP, AIA.**

### **INTRODUCCIÓN**

El plátano es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial al constituir el alimento básico de millones de personas en los países tropicales en vías de desarrollo y una importante fuente de ingresos para los mercados locales e internacionales (Frisón y Sharrock, 2000).

La producción mundial de plátano ha mostrado una tasa de crecimiento en continuo ascenso, en los últimos diez años la producción mundial de plátano fue de 33.503.221 Tn, según información de los datos que lleva el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, este país y Europa son los principales importadores de plátano de América del Sur y Centroamérica, los mayores aportes lo hacen África, América Latina y el

Caribe (LAC) y Asia en muchos casos esta disociada al mercado interno, donde este producto suele formar parte de la agricultura de subsistencia (FAO, 2008).

El plátano es altamente energético, sus carbohidratos son fácilmente asimilables por el organismo, compuesto principalmente de agua, carbohidratos, proteínas y grasas; es rico en vitamina A, B, C y minerales (Simmons, 1973). Además, posee diferentes usos entre los que se destacan el medicinal, la producción de alcohol y como fuente de fibra (INIBAP, 2001, INIBAP, 2002).

El cultivo del plátano en Bolivia tiene una alta importancia social y económica, por ser uno de los productos fundamentales de la canasta familiar principalmente del poblador de la Amazonia y Yungas, comprendidas entre los

departamentos del Norte de La Paz, Cochabamba, Beni, Santa Cruz y Pando. Actualmente se tiene una producción de 338.90 Tn. Rendimientos de 9.286 kg /ha y una superficie cultivada de 36.516 ha. Por otro lado, permite la generación de ingresos económicos en forma permanente como producto de la comercialización local y regional (INE, 2010). La producción se destina al consumo familiar y a la venta, siendo sus precios muy variables de acuerdo a la época lluviosa o seca y su precio está determinado en función al precio de la papa.

Estudios realizados en el Proyecto: Plan de promoción de producción de plátano en el Municipio de la Asunta publicada en el Manual de Escuelas de Campo ACADI/VOCA (2010); mencionan que los problemas de mayor importancia son las plagas de insectos como el *Cosmopolites sordidus* que en estado larval ocasiona las mayores pérdidas en los plantines (cormos), provocando un severo daño en las parcelas cultivadas.

Una de las desventajas de la propagación tradicional por cormos es precisamente la diseminación de plagas, además de tener una baja de tasa de multiplicación, de 6 a 9 hijuelos /año. En tal sentido se ha visto como alternativa el uso del cultivo de tejidos como la manera más segura de propagar plantas libres de plagas y enfermedades. Asimismo, las variedades obtenidas del germoplasma de musáceas del INIBAP permitirán diversificar el germoplasma local de las variedades de plátano de nuestro país.

El objetivo general de la presente investigación fue optimizar los medios de cultivo para la micro propagación *in vitro* de cinco variedades de plátano (*Musa AAB*) del banco de germoplasma del INIBAP, cuyos objetivos específicos son:

- ❖ Determinar el nivel óptimo de citoquinina (BAP) para obtener un mayor número de brotes laterales por explante de plátano.

- ❖ Determinar el nivel de concentración de auxina (AIA) para el enraizamiento de plántulas *in vitro* de plátano.

- ❖ Evaluar tres formas de inoculación de las vitroplantas de plátano en la fase de aclimatación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la FCAPV y F- UMSS. El experimento fue desarrollado en dos fases: Fase I multiplicación y Fase II enraizamiento.

La metodología comprendió: esterilización del material de laboratorio, preparación de medios de cultivo (Murashige & Skoog MS; 1962), con los diferentes reguladores de crecimiento (BAP y AIA), ajustados a un pH: +-5.8.

El material vegetal se obtuvo de la colección del germoplasma del INIBAP el mismo que se detalla en el cuadro 1.

**Cuadro 1.** Variedades de plátano del Germoplasma del INIBAP

Variedades de Plátano	Código de registro	Número de tubos
Baka	ITC0098	5
Congo 2	ITC0027	5
Come 1	ITC0754	5
Moufoubila	ITC0023	5
Pelipita	ITC0095	4

### Fase de Multiplicación

Para esta etapa se estableció un experimento con 20 tratamientos que se evaluaron en un diseño completamente al azar (DCA) en arreglo factorial de 5x4 con cuatro repeticiones, variando las concentraciones de BAP; se consideraron rangos de: 1.5, 2.5, 3.5 y 4.5 mg /l de BAP con el fin de determinar en cuál de ellos se observaría un mejor efecto en la generación de brotes laterales/explante de plátano. Para cada tratamiento se prepararon 1000 ml de medio, estableciendo cuatro

repeticiones cada una con 25 ml de medio de cultivo, presentando los siguientes componentes fijos: sales M&S, myo-inositol 100mg/l, azúcar 30gr/l, tiamina 0.3mg/l, AIA 0.2mg/l, con un pH de 5.8.

Se tomaron plantas bien desarrolladas, de tamaño uniforme de 0.8 a 2.4 cm, se efectuó la limpieza del tejido oxidado. Luego se procedió a transferirlos al medio de multiplicación enriquecido con citoquininas (BAP); los explantes fueron incubados a  $27^{\circ}\text{C} \pm 1$  y un fotoperíodo de 16 horas luz, una intensidad lumínica de 2500 lux suplidos por fluorescentes de luz blanca marca Gro-lux de 20 w; los tratamientos se evaluaron a los 60 días, en cada unidad experimental se registró el número de brotes/ tratamiento según la variable: número de brotes laterales/explante.

### Fase de Enraizamiento

Se diseñaron tratamientos considerando dos factores, variedades de plátano (V) y tres niveles de AIA (N) combinados, los mismos que se consideraron en rangos de: 0.5, 1.5 y 2.5 mg /l de AIA, obteniendo 6 tratamientos con 10 repeticiones /tratamiento.

La metodología consistió en separar los brotes laterales con 2.5 cm de altura; se transfirieron al medio de cultivo enriquecido con los diferentes niveles de auxinas.

Las evaluaciones se realizaron a los 60 días, durante los cuales se observó el crecimiento y emisión de raíces y el desarrollo de las plantas. Las variables consideradas fueron: Número de raíces y longitud de raíces.

### Aclimatación

Se consideraron dos factores de estudio: dos variedades de plátano Moufoubila y Pelipita (V) y tres formas de inoculación (F) inmersión en raíz desnuda, inoculación en el sustrato y testigo; el producto está a base de micorrizas, *Bacillus subtilis* y *Trichoderma* en etapa de prueba de PROINPA (Noel Ortuño comunicación personal 2011). La variable

evaluada fue: Porcentaje de sobrevivencia a los 45 días.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Fase de multiplicación

En esta fase se determinó el número de brotes/explante de las cinco variedades de plátano en un período de 60 días.

Mediante el análisis de varianza presentaron diferencias significativas ( $Pr < 0.01$ ) en las cinco variedades de plátano. Efectuadas las comparaciones de medias entre variedades, se determinó que la variedad Moufoubila tuvo una mejor respuesta en la tasa de multiplicación con 10.42 brotes laterales por explante seguido de la variedad Congo 2 con 10.10 brotes laterales; la variedad Corne 1 con 9.67 brotes, Pelipita con 9.21 brotes y finalmente Baka con 8.75 brotes laterales por explante, donde se observa que la tasa de multiplicación es varietal (figura1).

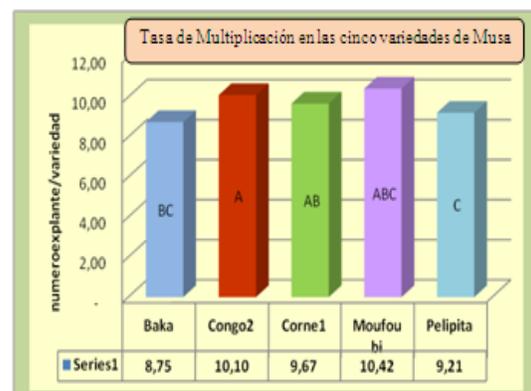


Figura 1. Número de brotes en las cinco variedades de plátano.

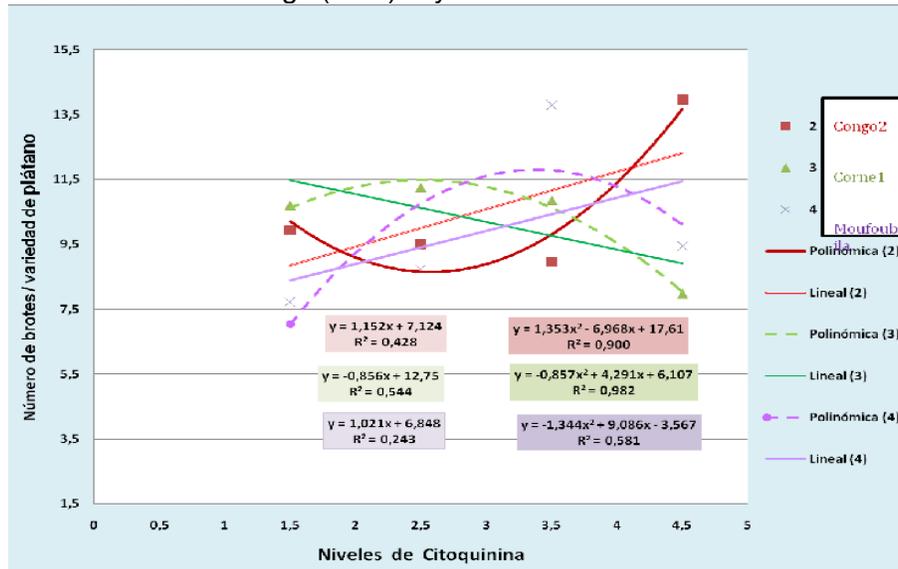
Conam (2005), expresa que, en una población de una especie vegetal, no existen individuos que tengan la misma información genética (ADN), lo que se conoce como variabilidad genética, lo que influye en la variación de las concentraciones hormonales y en la regeneración de brotes.

Según los análisis estadísticos realizados entre la tendencia lineal y cuadrática se observa diferencias estadísticas ( $Pr < 0.01$ ) en

tres variedades de plátano (Congo2, Corne1 y Moufoubila) el mismo que se observa en la figura 2.

En la variedad Congo2 se determinó que el número de brotes laterales por explante se maximiza con 2.48 mg (BAP)/l seguido de la variedad Corne 1 con 3.42 mg (BAP)/l y

finalmente la variedad Moufoubila donde se maximiza el número de brotes/ explante de plátano con 2.60 mg/ l (BAP) figura 2. Sin embargo, estudios realizados por Canchignia, 2004, con concentraciones de 2.5 mg/l de BAP y 0.8 mg/l de AIA obtuvo 5.25 brotes en la variedad Barraganete.



**Figura2.** Efecto de BAP en la generación del número de brotes laterales por explante en las tres variedades de plátano (Congo2, Corne1 y Moufoubila).

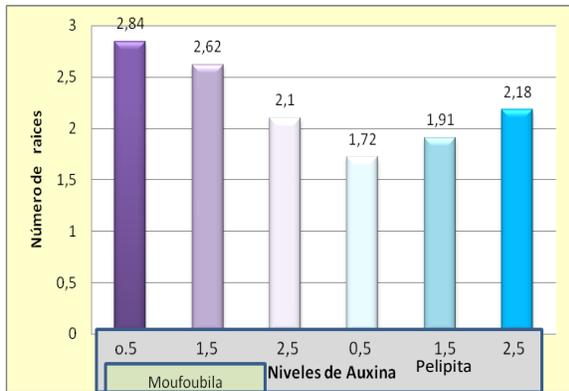
Investigadores como: Chaix, (1981); Kester *et al.*, (1977), citado por Grattapaglia y Machado (1997), indican que las citoquininas, especialmente bencilaminopurina (BAP) estimulan el desarrollo de yemas y en altas concentraciones suprime la elongación. Se han utilizado concentraciones de hasta 10 mg/l de BAP, los cuales en el clon Zanzibar (AAB) forman yemas múltiples.

### Fase de enraizamiento

El objetivo de esta fase fue lograr que emitan suficiente cantidad de raíces para facilitar la absorción de agua y nutrientes del sustrato ayudando a la adaptación de las plantas en condiciones ambientales (Juárez y Zamora 2008).

Mediante el análisis de varianza, los seis tratamientos asignados presentaron

diferencias significativas ( $P < 0.01$ ) para la fase de enraizamiento. Según las medias obtenidas, el mejor tratamiento para la variedad Moufoubila fue el T1 con 0.5mg de AIA/l donde se obtuvo 2.84 raíces por explante de plátano, seguido de T2 con 1.5mg AIA/l y finalmente T3 con 2.5mg/l que tuvo 2.10 raíces. En la variedad Pelipita el mejor tratamiento fue el T6 con 2.5mg AIA/l obteniéndose 2.18 raíces /explante de plátano, seguido de T5 con 1.5mg AIA/l con 1.91 raíces y finalmente T4 con 0.5mg AIA/l que generó 1.72 raíces por explante, lo cual indica que existen diferencias entre las dos variedades, (figura 3).

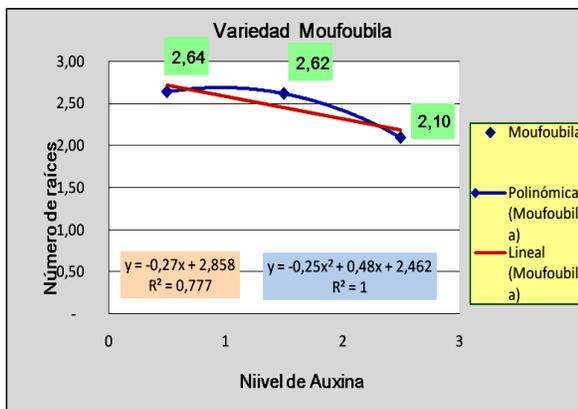


**Figura 3.** Efecto del AIA en el número de ápices en dos variedades de plátano Moufoubila y Pelipita

Analizadas las tendencias se determinó que existe un incremento lineal del número de raíces a medida que aumenta el nivel de la auxina AIA, hasta el punto de inflexión donde disminuye tal como se observa en la figura 4. En donde el número de raíces en la variedad Moufoubila se maximiza con 1,16 mg AIA /l en donde se tiene mayor número de raíces (figura 4.)

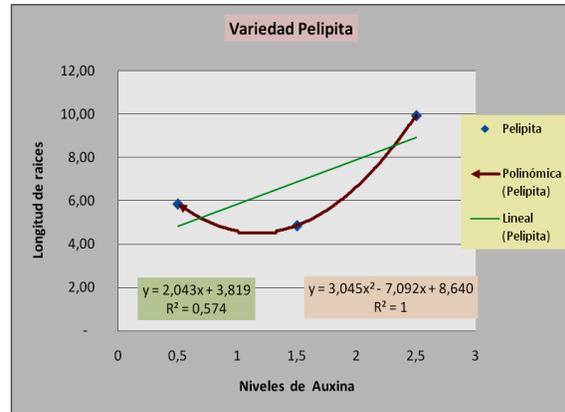
Rangan y Mathews (1980), reportan que obtuvieron mayor desarrollo y crecimiento de raíces en el medio White modificado por Rangaswamy (1961) con adiciones de 0.05

mg/l de ANA y 0.40 mg/l de AIB.



**Figura 4.** Número de raíces en las variedades de plátano Moufoubila.

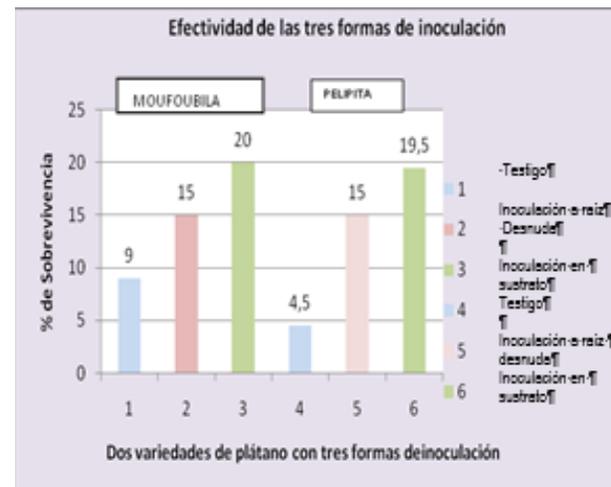
Para la longitud de raíces se concluye que la longitud de raíz de la variedad Pelipita se maximiza aplicando 1.38 mg/l de AIA ver (figura 5).



**Figura 5.** Longitud de raíces variedad Pelipita

### Fase de aclimatación

En esta fase se observa un efecto significativo del porcentaje de sobrevivencia a los 45 días, en la interacción de variedades con formas de inoculación, destacándose el sustrato inoculado con 5 gr de producto/planta (T3) en ambas variedades, obteniéndose 20 plantas vivas como promedio, seguido de la inoculación a raíz desnuda (T2) con 15 plantas vivas y finalmente se ubicó el testigo con 9 plantas vivas en la variedad Moufoubila y 4 plantas vivas en la variedad Pelipita, como se observa en la (figura 6).



**Figura 6.** Efectividad de las tres formas de inoculación

### CONCLUSIONES

❖ Las cinco variedades de Plátano fueron manejadas bajo las mismas condiciones de

laboratorio obteniendo variantes significativas en su comportamiento, como respuesta de la variabilidad genética del material vegetal, resultando como la más promisorio la variedad Congo2.

En general se observó una respuesta lineal directa del número de brotes por explante respecto a los cuatro niveles de BAP.

❖ El análisis de la interacción de los factores de estudio: variedades y niveles de BAP, determinó como los niveles óptimos para la maximización de los brotes laterales por explante, la aplicación en la variedad Congo2 de 2.48 mg (BAP)/l, en Corne1 3.42 mg (BAP)/l y finalmente para la variedad Moufoubila 2.60 mg/ (BAP).

❖ Con las variedades Pelipita y Baka estadísticamente no existen niveles apropiados que influyen en la generación del número de brotes laterales por explante.

❖ El número de raíces para la variedad Moufoubila se maximiza con 1.16mg AIA/l y no existe un nivel apropiado para la variedad Pelipita.

❖ La longitud de raíz de la variedad Moufoubila, no requiere de un nivel óptimo, porque luego de aplicados los diferentes niveles no existen diferencias significativas en la longitud. En la variedad Pelipita, se maximiza la longitud de raíz aplicando 1.38 mg/l de AIA.

❖ En la fase de aclimatación la inoculación con 5 gr/planta de producto (T3) fue el más eficiente en la sobrevivencia de las vitroplantas, obteniéndose como promedio 20 plantas vivas en ambas variedades (Moufoubila y Pelipita).

## RECOMENDACIONES

❖ Emplear los protocolos establecidos en nuevos estudios para obtener mejores tasas de multiplicación y elaborar una guía metodológica que sirva como soporte a futuros trabajos en cultivo de musáceas en Bolivia.

❖ Realizar más estudios en la fase de aclimatación para evitar pérdidas del material vegetal de las vitroplantas.

## REFERENCIAS CITADAS

Canchignia, F; Ramos, L. 2004. Micropropagación de plátano variedad Barraganete. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Ecuador, 2004. (en línea). Consultado en 30 de ago. 2011. Disponible en <http://www.visagesoff.com>

Conam, L. 2005. Variabilidad Genética. (en línea). Consultado el 24 oct. 2011. Disponible en [http://portalagrario.gov.pe/rnnc\\_gene.shtml](http://portalagrario.gov.pe/rnnc_gene.shtml)

Barrientos, R. 2010. Plátano-Manual para las Escuelas de Campo “Proyecto Plan de Promoción y Producción del plátano en el Municipio de la Asunta”, Fondo Comunitario (FCDI) implementado por ACDI/VOCA primera ed. Septiembre. Editor. Ríos L. La Paz- Bolivia.

FAO. 2008. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación). Estadísticas (en línea). Consultado 30 de noviembre de 2010. Disponible: [http://www.faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=291&lang=es\\_r](http://www.faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=291&lang=es_r)

Frisón, EA; Sharrock SL. (2000). Biodiversidad y producción sostenible del banano. (en línea). Consultado 20 de jul. 2011. Disponible en: <http://www.Bananafair.de/publ/report/spa/5.htm>

Grattpalgia, D; Machado, MA. 1997. Micropropagación en: Curso de Sistemas de Micropropagación de Plantas. Cood. Torres, A.C. Empresa Brasileira de Pesquería Agropecuaria. Centro Nacional de Pesquisa de Hortalizas. Ministerio de Agricultura y Abastecimiento. Ministerio de Ciencia y Tecnología. Programa Cooperativo

- para el desenvolvimiento. Tecnológico Agropecuario del Cono Sur. (PROCISUR). Brasilia, D. F. P. 71-79.
- Juárez, DA; Zamora, DM. 2008. Micro propagación de Piña (ananas comusus L. (Merr).Cultivar MD2. (Tesis). Universidad Nacional Agraria. Managua, Nicaragua. 32p.
- INE (Instituto Nacional de Estadística) (en línea). Consultado 18 jun. 2010. Disponible en <http://www.ine.org>
- INIBAP (Centro internacional del Banano y Plátano). 2001. Muchos usos del banano. (en línea). Consultado en 30 de oct. 2010. Disponible en <http://www.inibap.org>
- Roca, W; Mrogiski, L. 1993. Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali Colombia.
- Simmonds, NW. 1973. Los Plátanos. Barcelona España: Editorial Blume. 539 p.

Universidad Mayor de San Simón  
Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias  
Departamento de Fitotecnia

Cochabamba – Bolivia

## Experiencias de micropropagación de plátano (*Musa parasidiaca* L.) y banano (*Musa balbisiana* L.)

Gerónimo G. Aguirre G. Ancasi G. Pérez J., Pardo M., Mamani  
E mail: g.aguirre@umss.edu.bo

### Resumen

El plátano y banano en Bolivia es un producto fundamental en la alimentación del poblador de zonas bajas siendo así que si bien Bolivia no es un centro de origen estos cultivos forman a ser parte fundamental de la dieta de los pobladores de zonas baja, según el INE, 2022, registra aproximadamente una superficie cultivada de banano 19,994 ha, con una producción de 15,047 t/año y un rendimiento promedio de 30,080 t/ha. y no así para plátano que contempla una superficie de 40,788 ha, producción 11,677tm y rendimiento de 476, 298 tn. Para contar con material madre, se han efectuado recolecciones en zonas plataneras y bananeras de toda la cuenca andina amazónica en donde se identificó las zonas de estos cultivos. Logrando establecer una colección de variedades de locales en cada fundo universitario, donde se caracterizó la morfología de ambos cultivos, y se ha recuperado parte del vasto conocimiento local sobre este cultivo. En los Laboratorio de las diferentes universidades se procedió a establecer y multiplicar *in vitro* para su posterior enraizamiento y la validación en campo, sin embargo, se requiere aun generar los protocolos óptimos para la multiplicación masiva de estos materiales, debido a la fuerte presencia de fenoles en los sub cultivos, los mismos que intoxican a los explantes inviabilizando su propagación. Una vez superadas las limitaciones existentes el Laboratorio podrá brindar a los productores plantas de alta calidad sanitaria.

**Palabras clave:** conocimiento local, caracterización morfológica, plátano, cultivo *in vitro*

### INTRODUCCIÓN

En Bolivia, las musáceas tienen una particular importancia debido a que son parte imprescindible en la dieta diaria y en la seguridad alimentaria de quienes habitan en toda la cuenca andino – amazónica; sin embargo, uno de los mayores problemas que se presentan en estos cultivos son las plagas de insectos como el *Cosmopolites sordidus* que en estado larval ocasiona serias pérdidas en el cultivo, reportándose daños de hasta un 70% en las parcelas de agricultores, seguido de la sigatoka amarilla y negra, Las zonas visitadas en el proyecto referido a la **“Recuperación de saberes locales y recolección de cultivares de banano y plátano para su caracterización morfológica y multiplicación *in vitro*”**, que la UMSS

ejecuto en coordinación con la UAGRM, EMI, UAB y UAP, dentro de los proyectos del PIA ACC que apoyo COSUDE y administrada por AGRUCO.

Mencionar que el interés del proyecto fue tomar énfasis en la importancia de estos cultivos porque atraviesan problemas de propagación tradicional por cormos es precisamente la diseminación de insectos y otros patógenos de suelo, principalmente bacterias y nematodos, de un lugar a otro a través de los hijuelos, siendo además su baja tasa de multiplicación, (6 a 9 hijuelos /año). En tal sentido, se ha visto como alternativa el uso del cultivo de tejidos como la manera más segura de propagar plantas libres de plagas y enfermedades.

Según el INE, 2022, Bolivia registra aproximadamente una superficie cultivada de banano 19,994 ha, con una producción de 15,047 t/año y un rendimiento promedio de 30,080 t/ha. y no así para plátano que contempla una superficie de 40,788 ha, producción 11,677tm y rendimiento de 476, 298 tn.

### Origen y Distribución

Los bananos y plátanos son nativos del sudeste asiático y se derivan de dos especies silvestres, *Musa acuminata* Colla y *M. balbisiana* Colla (Simmunds y Sherpherd 1955, Simmonds 1973). Pertenece a la familia de las musáceas, es un híbrido triploide de *Musa Acuminata* y *Musa balbisiana* (Simmonds, 1962). El plátano y banano se cultiva alrededor de la India. Cerca del siglo V antes de Cristo fue introducido posiblemente en África del este y oeste entre los años 1000 y 1500 de la era cristiana. (FAO, 2000). Los plátanos comestibles más antiguos fueron, por tanto, linajes diploides comestibles de *Musa acuminata* Colla, como los que aún persisten en gran número en el sudeste de Asia (Simmonds, 1962).

### Clasificación Taxonómica

Las musáceas pertenecen a la clase de las monocotiledóneas, al orden Zingiberales y a la familia Musaceae, la cual incluye a los géneros *Musa* y *Ensete*. El género se divide en cuatro secciones: *Australimusa*, *Callimusa*, *Rhodochlamys* y *Emusa*. Esta última sección comprende a las especies *M. acuminata* y *M. balbisiana*. El número básico cromosómico para la sección *Eumusa* es de  $n=11$ . Las musáceas comestibles usualmente se dividen en dos especies *M. acuminata* y *M. balbisiana* que son diploides (Simmonds 1962). La poliploidía y el genomio de cada cultivar está representado con la letra A para indicar la procedencia de *M. acuminata* y con la letra B para *M. balbisiana*. Según Vergara (2012), los frutos dan entre 80 y 180 días en desarrollarse por completo, el plátano es polimórfico, cada racimo puede tener de 5 a 20 manos, y cada mano de 2 a 20 frutos. El fruto, oblongo, baya

alargada de 10 a 30 cm de longitud, encorvada, corteza lisa, color amarillo-verdoso, amarillo, amarillo-rojizo o rojo; durante su desarrollo estos se doblan geo trópicamente, según su peso, dobla el pedúnculo o vástago, esta reacción determina la forma del racimo ([www.promusa.org/Morfolog](http://www.promusa.org/Morfolog)). La pulpa es blanca a amarilla pero varía en función a la variedad, rica en almidón y dulce; en los plátanos puede resultar algo astringente o gomosa por su contenido en látex, harinoso y seco.

### Cultivo *in Vitro* de Musáceas

Los primeros reportes del uso de cultivo de tejidos en banano fueron reportados en Taiwan y China a principios de 1970. Sin embargo, la propagación a nivel comercial se ha desarrollado en la década de los ochenta principalmente por Israel, Australia, Costa Rica y Venezuela entre otros. (Pocasangre L. 1993). La mayoría de los investigadores en *Musa* utilizaron el medio de las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962). Este medio sirve de base pero es modificado de acuerdo a las necesidades y objetivos de la investigación y se va acomodando al requerimiento que se desea de los explantes en cada fase.

La ventaja de este sistema es que las plantas son uniformes en sus características y están libres de nematodos y de la mayoría de las enfermedades. Existen algunas desventajas, no obstante, y consisten en el riesgo de presentar, luego de numerosas multiplicaciones, variantes somaclonales, del largo período de tiempo que toma a las plantas pequeñas obtenidas por este método en alcanzar el tamaño adecuado para ser sembradas en campo y, consecuentemente, en que no existe una amplia disponibilidad de este material.

Para la micro propagación de musáceas, generalmente se utiliza el medio Murashige y Skoog (Sandoval, 2001), adicionados con vitaminas (myo inositol, tiamina-HCl, piridoxina-HCl, glicina y ácido nicotínico), sacarosa, reguladores de crecimiento

(benciladenina) y gelificando generalmente con Agar (Palma y Montero, 2002).

utilizando un agitador. Se aforo la solución a 1 litro de agua des ionizada seguidamente se midió y ajusto el pH a 5.8. Seguidamente se adiciono solidificante phytigel de 2.5gr/l.

## METODOLOGIA

La preparación de medio de cultivo se preparo en cada fase y se escoge de acuerdo a los objetivos que persigue el propagador de plantas. La cantidad de BAP es de acuerdo a cada fase (cuadro 1); se adiciono 30gr/l de azúcar blanca refinada, misma que se diluye

La distribución del medio en frascos o tubos de ensayo se dispense en volumen uniforme. En caso de tubos se usó de 10-15ml y las de gerber 25 a 30ml. Luego se esterilizo a 15 libras de presión y 120 °C durante 20 minutos.

**Cuadro 1. Medios de cultivos para Musáceas**

Componentes de medio de cultivo	Fase de inicio	Fase de multiplicación	Fase de enraizamiento
Sales Ms	Completo	Completo	Completo
BAP	2ml/l	3.5ml/l	.....
AG3	0.3ml/l	-----	.....
AIB	-----	.....	1,5ml/l
My-inositol	100mg/l	100mg/l	100mg/l
Tiamina	100mg/l	-----	-----
Azúcar	30 gr/l	30 gr/l	30 gr/l
Carbón active	1gr	-----	-----
Phytigel	2.5gr/l	5 gr/l	2.5gr/l
pH	5.8	5.8	5.8

Así mismo Pérez et al. (2013), indica que suplementado con 2 mg.L-1 de 6-BAP; 3,5 mg.L-1de AIA; tuvo mejores resultados en la propagación del cultivar de plátano vianda «INIVITPV-2011» (AAB), aplicando el método de inmersión temporal. Del mismo modo usando medio líquido MS Ríos et al. (2013) propagaron plátano «cambumber manzano» usando medio de cultivo MS, con varias concentraciones de BA (0, 2,5 y 5 mg/l con yemas apicales mostro mejores resultados con 3.5 BAP para el cultivar de plátano bocadillo.

### Selección y preparación del material vegetal

Seleccionar plantas madre sin síntomas de enfermedades y bastante vigorosas. Los hijuelos deben tener una altura de 30 a 50cm, el material es extraído con sumo cuidado con la ayuda de un machete o pala recta para evitar las heridas al hijuelo, el transporte del rizoma debe hacerse en recipientes o bolsas que tengan buena ventilación.

En la sala de lavado los rizomas deben lavarse con agua; se elimina la vaina foliar y se realiza una primera reducción a un tamaño de 10cm, considerando que la parte basal tiene un tamaño de 5cm y la parte superior otros 5cm.

### Desinfección y fase establecimiento e induccion del crecimiento De Los Explantes

Se eliminan las vainas foliares hasta un tamaño de 4cm por 4cm. remojar en una solución fúngica y bactericida (fungobact) a razón de 1g/l durante 20 minutos, se realiza un enjuague con agua de grifo, sumergir los rizomas en lavandina al 3.6% durante 15 minutos; seguidamente se enjuaga tres veces con agua esterilizada y se realiza una nueva disminución de tamaño. Menor a 3cm. Ramírez-Villalobos et al. 2004), altas concentraciones de NaClO y/o tiempos muy prolongados (mayores a 20 min), se inhibe el crecimiento del explante. Asimismo Araya (2000), menciona que a mayor concentración y

tiempo de exposición en NaOCl, hay un menor porcentaje de contaminación.

En la cámara de flujo laminar, se realizó la segunda desinfección con NaCl al 5% durante 8 minutos; enjuague tres veces con agua estéril por 3 minutos en agitación constante. Los explantes se depositan en frascos con una solución antioxidante de ácido ascórbico (100 mg/l) o con cisteína estéril (60 mg/l) durante 10 minutos esto para evitar la oxidación. Geronimo 2012. Del mismo modo, Utino et al. (2001).

Las condiciones de incubación son de 27 a 28 °C con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. A los 7 a 10 días en oscuridad, los frascos se llevan a la cámara de crecimiento hasta completar los 30 días en donde se apreciará el verdeo del explante; en esta etapa es conveniente cambiar de medio de cultivo y realizar el rompimiento de la dominancia apical. Ver figura 1



**Figura 1. Reducción del explante**



**Figura 2. Verdeo del explante de plátano**

Murashige (1974), (Amiot *et al.* 1996, Bray *et al.* 2000), señalan que en la etapa de establecimiento *in vitro* en algunas especies es necesario agregar al medio de cultivo antioxidantes para evitar la oxidación del explante. Los antioxidantes más usados en el plátano son el ácido ascórbico, ácido cítrico adicional al medio de cultivo (George 1996, Jiménez 1998). Aliyu (2005), mencionan que mediante la adición de carbón activo (CA) se evita la oxidación del explante.

Fase de multiplicación y crecimiento de los brotes

Los brotes laterales a partir del explante inicial varía de acuerdo a los cultivares propagados. Pero aproximadamente es de 45 días; la tasa de multiplicación depende del material propagado y de la manipulación *in vitro*, principalmente del medio de cultivo y del número de subcultivos en el caso del banano puede oscilar entre 2 a 5, mientras en el caso del plátano es de 2-4 explantes Gerónimo 2013. Al respecto, Canchignia, (2004), obtuvo en la etapa de multiplicación 5.25 brotes al utilizar concentraciones de 2.5 mg BAP /l con/ 0.8 mg/l de AIA en la variedad Barraganete, lo cual demuestra que la tasa de multiplicación es varietal, (figura3 y 4).



**Figura 3. Limpieza del tejido oxidado**



**Figura 4. Generación de brotes**

Al respecto, Jiménez (1992) menciona que la oxidación fenólica constituye un problema en el establecimiento de meristemas y ápices, los cuales se manifiestan como un ennegrecimiento del medio de cultivo que comienza cerca al explante y puede extenderse a todo el medio produciendo una serie de afecciones en el crecimiento del mismo, al que puede provocar la muerte. (Palma y Montero, 2002).

Se las transfirió a un medio de multiplicación con cito quininas, para estimular la formación y multiplicación de brotes. A los 34 días aproximadamente. Concluido el repique de los explantes, éstos son llevados a la sala de crecimiento (Sandoval, 1991). Posteriormente se dejan otras 4-5 semanas donde se observa la generación de brotes laterales o hijos de plátano tal como se observa en la (figura 4). Se realizan ocho etapas de multiplicación cada 22 días, y se siembran al nuevo medio de multiplicación, para su continua reproducción.

### **Enraizamiento y Aclimatación**

Para la fase de enraizamiento se adiciono 1.5 mg/l de AIB al medio de cultivo con la cual presentan un mayor número de raíces y 1gr/ l de carbón activo. Al respecto (Hermosilla, 2003), menciona que los explantes transferidos a un sustrato limpio favorecen a la emisión de hojas bien desarrolladas ya que inician los procesos de fotosíntesis.

Transcurridos los 15 -20 días de sembradas en el medio se desarrollan las raíces, seguidamente a los 40 días de iniciado el

enraizamiento se pueden establecer a condiciones de invernadero es importante considera que las vitroplantas que tengan una altura de 6 a 8 cm con 3 a 5 hojas.

### **BIBLIOGRAFÍA**

Angarita, A; Perea, M. 1990. Micro propagación de plátano y Banano, CIAT-VE. 28p.

Aular J, Cáceres M. 2011. Consideraciones sobre la producción de frutas en Venezuela.

Rev Bras Fruticultura. 3 (1): 187- 98.

Amiot M, Forget F, Goupy P. Polyphenol, oxidation and colour: progress in the chemistry of enzymatic and non-enzymatic derived products. *Herba-Polonica*. 1996; 42: 237-47.

Canchignia, H. F., Sigcha, L. E., Toaquiza, J. P., Ramos, L. E., Saucedo, S. G., Carranza,

M. S., & Cevallos, O. F. (2007). Alternativas para la propagación in vitro de plátano variedad

Maqueño (*Musa balbisiana* AAB). Informe Técnico s/n. Unidad de Investigación Científica y

Tecnológica. Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CR.). 2005. Estudio del

Potencial Antagonista de Hongos Edáficos para el Control Biológico del Nematodo Barrenador

*Rhodophulus similis* (Coob) Thorne en plantaciones de banano

en Costa Rica. (en línea). Consultado 4 de junio 2011. Disponible en internet:

- [http://musalit.inibap.org./pdf/IN070511\\_es.pdf](http://musalit.inibap.org./pdf/IN070511_es.pdf)
- Etienne, H; Anthony, F; Dussert, D; Fernandez, D; Lashermes, P; Bertrand, B. 2002.
- Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). In Vitro
- Cellular and Developmental Biology – Plant 38:129-138.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2001.
- El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo 2001. Consultado 15 julio 2017.
- Disponible (en línea): <http://www.fao.org/SOF/soti/index.htm> Ultrastructural changes associated with cryopreservation of banana (*Musa* spp.) highly proliferating meristems.
- Plant Cell Reports 21:690-698.
- Geronimo, G. Aguirre G. Melgarejo K. 2013. Optimización de medios de medios de cultivo para la micropropagación in vitro de cinco variedades de plátano (*Musa balbisiana* L.) del germoplasma del INIBAP. Tesis. Agr.Cochabamba Bolivia. Universidad Mayor de San Simón 110 p.
- INE (Instituto Nacional de Estadística BO). Encuesta Nacional Agropecuaria – ENA 2013). (en línea). Consultado 18 julio 2017 disponible en <http://www.ine.gob.bo/indice/general.aspx?codigo=40104>
- IPGRI-INIBAP/CIRAD. Descriptores para el banano (*Musa* spp.). Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia. Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano, Montpellier, Francia y el Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Developpement, Montpellier, Francia; 1996. Disponible en: <http://www.ipgri.cgiar.org/Publications>

Centro Fitotécnico y de Semillas Pairumani

Cochabamba - Bolivia

## Evaluación molecular de genes de resistencia a la antracnosis en seis ecotipos y una variedad de vaina

Aguilar Vásquez N.N, Rivera C. y Ávila Alba T.  
n.aguilar@fundacionpatino.org

### Resumen

La producción de vainita está limitada por la alta incidencia de la antracnosis, enfermedad que puede presentarse durante todo el ciclo del cultivo. La resistencia a antracnosis en *Phaseolus vulgaris* L. está condicionada principalmente por diez genes mayores independientes, numerados de Co-1 a Co-11, estos genes distribuidos a lo largo del genoma, ofrecen a los mejoradores la oportunidad de piramidar genes. En el presente trabajo se evaluó 6 ecotipos, una variedad de vaina y una de frijol con 12 marcadores SCAR, que fueron ajustados para identificar los genes de resistencia a la antracnosis. En los materiales de evaluación se pudo identificar la presencia de los genes de resistencia *Co-4*<sup>2</sup>, *Co-2*, *Co-4*, *Co-6*, *Co-3/Co9*, *Co-10* y *Co-9*. La amplificación de los marcadores fue corroborada mediante la secuenciación lo que permitió identificar que los fragmentos amplificados por los cebadores SZ20 y SC08 no corresponden a genes de resistencia.

**Palabras clave: Antracnosis, SCAR, Resistencia, secuenciación.**

### INTRODUCCIÓN

Vainita o habichuela son nombres comunes dados a variedades de *Phaseolus vulgaris* L. desarrolladas para consumo como vainas verdes, caracterizadas por tener bajo contenido de fibras. En su mayoría estas variedades provienen de Estados Unidos de América y de Europa (Voyses, V., 2000).

La producción de vainita está limitada por la alta incidencia de la antracnosis, enfermedad que puede presentarse durante todo el ciclo del cultivo, trayendo como consecuencia la reducción drástica del rendimiento y la pérdida de calidad de mercado por las lesiones en las vainas. La alta prevalencia y severidad de esta enfermedad ocasiona pérdidas en rendimiento, superiores al 40% si no se realizan medidas oportunas de control y las pérdidas pueden ser del 100% cuando se siembran semillas severamente infectadas bajo condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad. El empleo de variedades resistentes obtenidas a través del mejoramiento genético es la mejor

medida de control y la más económica para el agricultor (Morros & Pire, 2003).

La resistencia a antracnosis en *Phaseolus vulgaris* está condicionada principalmente por diez genes mayores independientes, numerados de Co-1 a Co-11 (Kelly & Vallejo, 2004). Con excepción de Co-7 y co-8, todos los loci descritos han sido mapeados en diferentes grupos de ligamiento. La independencia de estos genes distribuidos a lo largo del genoma ofrece a los mejoradores la oportunidad de piramidar genes complementarios y con base en su espectro de resistencia, escoger los alelos más efectivos para obtener una resistencia durable (Kelly & Vallejo, 2004).

Dentro de los marcadores que se han descrito por estar ligados a genes de resistencia a antracnosis en frijol, se encuentran varios de tipo SCAR (Sequence Characterised Amplified Region), dos de los cuales son específicos para los genes de G2333. El primero es SAS13, que amplifica una sola banda dominante y polimórfica con un peso de 950

pb, presente sólo en los materiales resistentes a antracnosis que portan el gen Co-42 (Young *et al.*, 1998) y el segundo es SAB3, que amplifica una sola banda polimórfica de 450 pb asociada a la resistencia conferida por el gen Co-5 (Vallejo & Kelly, 2001). Estos marcadores han sido utilizados para el mejoramiento de frijoles arbustivos en Brasil y Estados Unidos (Garzón *et al.*, 2007).

El objetivo de esta investigación fue evaluar 6 ecotipos, una variedad de vaina y una de frijol, con el fin de analizar la resistencia a la antracnosis a través de marcadores específicos SCAR, para generar información sobre los genes de resistencia presentes en el material de estudio y usar esta información para el desarrollo de variedades de vaina con resistencia duradera a la antracnosis.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En el Centro Fitotecnico y de Semillas Pairumani se trabajó con 12 marcadores SCAR diseñados específicamente para identificar genes de resistencia a antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*). Los ecotipos usados fueron 6 denominados como: V1, V2, V3, V4, V5, cola de ratón y las variedades Vainita enana y Carioca Mairana. Los marcadores ajustados fueron: SQ4, SW12, SY20, SBB14, SC08, SAS13, SH18, SAB3, SZ20, SZ04, SB12 y SF10. La extracción de ADN fue realizada por el método Cloroformo INTA 2015, las condiciones de PCR para la amplificación de los marcadores SCAR fue ajustada en función a los autores indicados en el trabajo de Kelly *et al.* (2003). Los fragmentos amplificados fueron limpiados con el kit GenElute Gel Extraction y posteriormente enviados a la empresa MacroGen GeneScan Service, para su secuenciación.

## RESULTADOS DISCUSIÓN

Los fragmentos amplificados fueron enviadas a secuenciar para verificar que el fragmento pertenece al gen de resistencia, esto debido a que algunas amplificaciones no estaban en el tamaño esperado. Los productos PCR de ocho cebadores fueron secuenciados, los resultados

se compararon mediante un Blast entre la secuencia problema y las bases de datos disponibles en NCBI. Los resultados de los alineamientos de los fragmentos amplificados con el marcador SZ20 no corresponden al gen de resistencia, según Kelly *et al.* (2003), la secuencia amplificada por el marcador se reporta en el cromosoma 7 y al realizar el alineamiento, el fragmento se reporta en el cromosoma 3. De igual manera para el marcador SC08, el gen es reportado en el cromosoma 8, después del Blast con el mismo marcador este es reportado en el cromosoma 1 (tabla 1). Al respecto Sánchez-Betancourt *et al.* (2008) indican que la diferencia en los resultados utilizando los mismos marcadores se podría explicar por la variabilidad genética molecular de los genotipos. De los doce cebadores usados en este trabajo dos no amplificaron (SH18, SAB3 que identifican los genes *Co-4*<sup>2</sup> y *Co-5* respectivamente).

La secuenciación permitió corroborar los resultados de correspondencia con los genes amplificados en las diferentes variedades. En el presente trabajo los genes de resistencia *Co-4*<sup>2</sup> y *Co-6* están presentes en todas las variedades, según Balardin & Kelly (1998) el gen *Co-4*<sup>2</sup> es el único gen capaz de superar el patotipo 2047, Gallego *et al.* (2010) indica que el gen *Co-6* presenta una amplia base de resistencia a un gran número de razas del patógeno, especialmente aquellas de origen Andino.

En el presente trabajo se pudo identificar la presencia de genes *Co-4*<sup>2</sup>, *Co-4*, *Co-2* y *Co-6* *Co-3/Co9* (verificados por secuenciación) y los genes *Co-10* y *Co-9* visualizados en gel de agarosa. Estos genes son de resistencia a la antracnosis en las diferentes variedades y ecotipos, los que pueden ser usados en programas de mejoramiento, al respecto Balardin & Kelly (1998) indican que la pirámide de genes de resistencia diversos genéticamente, usando la SAMM y desplegando combinaciones de genes diferentes en regiones diferentes, es propuesta como la prueba más práctica y realista para proporcionar un eficiente control a largo plazo de antracnosis en *Phaseolus vulgaris* en un

período de tiempo de obtención relativamente corto. NA=no amplifico, SC=Sin secuenciar

**Cuadro1: SCARs amplificados y secuenciados**

SCAR	Cromosoma reportada	Cromosoma blast	Gen de resistencia
SZ04	7	7	Co-6
SBB14	8	8	Co-4 <sup>2</sup>
SQ4	11	11	Co-2, Ur-11
SC08	8	1	Co-4
SAS13	8	8	Co-4 <sup>2</sup>
SW12	4	4	Co3/Co9.
SY20	8	8	Co-4
SZ20	7	3	Co-6
SH18	8	NA	Co-4 <sup>2</sup>
SAB3	7	NA	Co-5
SB12	4	SC	Co-9
SF10	4	SC	Co-10

**Cuadro2: Genes identificados en las variedades**

Ecotipo-Varietalidad	Genes amplificados	Primer
Vaina enana (VE)	Co-4 <sup>2</sup> , Co-2, Co-4, Co-6	SBB14, SQ4, SY2, SZ04, SAS13.
Cola de ratón (CR)	Co-4 <sup>2</sup> , Co-2, Co-4, Co-6	SBB14, SQ4, SY20, SZ04, SAS13.
V 1	Co-4 <sup>2</sup> , Co-6, Co-4, Co-9	SBB14, SY20 SZ04, SAS13, SB12
V 2 (V. negra)	Co-4 <sup>2</sup> , Co-3/Co-9, Co-4, Co-6, Co-10.	SW12, SY20, SBB14, SZ04, SAS13, SF10.
V 3	Co-4, Co-4 <sup>2</sup> , Co-10, Co-6	SBB14, SZ04, SAS13, SY20, SF10.
V 4	Co-4, Co-4 <sup>2</sup> , Co-6, Co-10.	SY20, SBB14, SZ04, SAS13, SF10.
V 5	Co-4, Co-4 <sup>2</sup> , Co-6	SY20, SBB14, SZ04, SAS13, SC08, SZ20.
C. Mairana	Co-4 <sup>2</sup> , Co-3/Co-9, Co-2, Co-6, Co-10, Co-9, Co-4	SBB14, SW12, SQ4, SZ04, SAS13, SF10, SB12, SY20

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se pudo identificar la presencia de los genes *Co-4<sup>2</sup>*, *Co-4*, *Co-2*, *Co-6* (verificados por secuenciación) y la visualización de los genes *Co-3/Co-9*, *Co-10*, *Co-9*, como genes de resistencia a la antracnosis en los diferentes ecotipos y variedades.

Los cebadores SZ20 y SC08 que identifican genes *Co-6*, *Co-4* respectivamente, no corresponden al gen de resistencia, verificado mediante secuenciación.

La secuenciación permitió corroborar los resultados de correspondencia con los genes de resistencia amplificados en las diferentes accesiones.

De los doce cebadores usados en este trabajo, los cebadores SY20 y SAB3 que identifican los genes *Co-4* y *Co-5* no amplificaron.

## BIBLIOGRAFÍA

Balardin, R.S. & Kelly, J.D. 1998. Interaction between races of *Colletotrichum lindemuthianum* and gene pool diversity in *Phaseolus vulgaris*. Journal of the American Society for Horticultural Science 123:1038-1047.

Gallego, C., Ligarreto, G. A., Garzón, L. N., Oliveros, O. A. & Rincón, L. J. 2010. Rendimiento y reacción a *Colletotrichum lindemuthianum* en cultivares de frijol voluble (*Phaseolus*

- vulgaris L.). Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín 63(2): 5477-5488.
- Kelly, J. D. & Vallejo, V. A. 2004. A comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean. HortScience 39(6): 1196-1207.
- Kelly, J. D., P. Gepts, Miklas, P. N. & Coyne, D. P. 2003. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker – assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. Field Crops Research 82: 135-154.
- Morros, M. E. & Pire, A. 2003. Evaluación participativa de materiales promisorios de vainita Phaseolus vulgaris L. en las zonas altas del estado Lara. Rev. Fac. Agron. 20:21-33.
- Sánchez-Betancourt, E. & Núñez, S.V. 2008. Evaluación de marcadores moleculares tipo SCAR para determinar sexo en plantas de papaya (Carica papaya L.). Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria. Colombia 9(2): 31-36.
- Vallejo, V. & Kelly, J. D. 2001. Development of a SCAR marker linked to Co-5 locus in common bean. Annu Rep. Bean Improvement Coop. 44: 121-122.
- Voysest, V., O. 2000. Mejoramiento genético del frijol (P. vulgaris L.). Legado de variedades de América Latina 1930-1999. Cali, Col.: Centro Internacional de Agricultura Tropical. 195 p.
- Young, R. A., M. Melotto, R.O. Nodari & J.D. Kelly. 1998. Marker assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar, "G2333". Theor. Appl. Genet. 96: 87-94.

Centro Fitotécnico y de Semillas Pairumani

Cochabamba – Bolivia

## **Cultivo *in vitro* de *Fusarium* sp. para la inoculación y selección de tolerancia en 84 familias de maíz de la variedad Pairumani Choclero 2**

Céspedes Polo Lúgia M., Vera C. Jhonny y Choque Ariel,

### **Resumen**

El cultivo de maíz en Bolivia en las zonas de valles interandinos es atacado por hongos del género *Fusarium*, con resultados de pérdidas mayores al 50 % del rendimiento en grano sobre todo en variedades susceptibles que han dejado de ser sembradas por esta causa, en la mayoría de las zonas con tradición en la producción de variedades nativas.

En el Centro Fitotécnico y de Semillas Pairumani se formó la variedad de maíz Pairumani Choclero 2 (con demanda alta en estado de choclo y de grano), para las zonas con alta incidencia de enfermedades como el palmarado y la fusariosis de planta y mazorca. Esta variedad se encuentra en un programa de selección para incrementar la tolerancia al ataque *Fusarium verticillioides*; para lo cual, se viene empleando la técnica de inoculación artificial del patógeno, para asegurar su presencia y evitar escapes que podrían llevar a resultados erróneos.

**Palabras claves:** Selección, tolerancia, pudrición de mazorca, inoculación.

### **INTRODUCCIÓN**

Una de las enfermedades en el cultivo de maíz que ocasiona pérdidas considerables es la pudrición de la mazorca ocasionada por el hongo *Fusarium verticillioides*, por lo que se vio la posibilidad de seleccionar familias con tolerancia en la variedad Pairumani Choclero 2, de muy buena aceptación y demanda del mercado, mediante la colecta de este patógeno y la multiplicación *in vitro* del mismo para la inoculación artificial que permite una evaluación más uniforme de las familias y una nueva selección de los materiales con mayor tolerancia al ataque del patógeno, evitando la posibilidad de escapes por ausencia del mismo. De esta manera se logró la selección de una porción con mayor tolerancia para el mercado actual.

Las pudriciones de mazorcas de maíz causadas por *Fusarium* son atribuidas a dos especies de este género: *F. graminearum* y un complejo de hasta cuatro especies entre ellas a *F. moniliforme* (Rivas P. *et al.* 2011), actualmente *F. verticillioides* (CIMMYT, 2004).

Hongos de este género están relacionados también con otras enfermedades del maíz como pudrición de semillas, plántulas, raíces y tallos y en ocasiones hasta manchas foliares y pueden producir toxinas que ocasionan serios trastornos de la salud en animales y humanos que se alimentan con granos contaminados (Rivas Patricia *et al.*). Este patógeno penetra a través de los estigmas, con infección y crecimiento de las hifas hasta los granos (Warren, 1978) o por heridas de insectos (Kommedahl y Windels, 1981), Ambos hongos tienen amplia distribución y son endémicos en todas las regiones productoras de maíz del mundo (Martinson, 1990). En semilla pueden invadir y ocasionar manchas en el exterior, disminuyendo la tasa de germinación por la muerte del embrión (De León, 1997; Gonzales *et al.*, 2006).

Para confirmar la resistencia o tolerancia a la enfermedad observada en campo, es necesaria la evaluación con inoculación artificial para descartar el escape a la misma. Por otro lado, en trabajos similares para la selección de material tolerante, la colecta de inóculo fue realizada en campos de cultivo con

materiales susceptibles, para asegurar la presencia del mismo y evitar escapes que podrían llevar a resultados erróneos (Briones, *et al.*, 2015).

## MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo fue realizado en predios del Centro Fitotécnico y de Semillas Pairumani, así como la colecta de las variantes de *Fusarium* spp. para la preparación del inóculo. Se sembraron 84 familias de la variedad comercial de maíz Pairumani Choclero 2, seleccionadas el ciclo anterior y se verificó el estado de choclo como punto de referencia para iniciar la colecta del inóculo y la multiplicación, a partir de los aislamientos colectados en campos con material susceptible y con ataque evidente a nivel de mazorca. Luego de verificar las características de crecimiento se realizó la evaluación *in vitro* determinando la especie, para realizar la multiplicación pertinente de acuerdo con la etapa fenológica del cultivo.

Para la inoculación se utilizaron brocas de taladro de 3 mm de diámetro en dos etapas; en la primera etapa que fue la de perforación se utilizó una broca alcanzando entre 2 y 3 cm de profundidad, y en la segunda de introducción del inóculo se utilizó una segunda broca embebida en el inóculo, el cual fue preparado a una dilución final de 500000 esporas/ml y fue introducido con la broca a una profundidad de 2 a 3 cm, a la altura del primer tercio a partir de la base de la mazorca.

Se consideraron dos grupos por cada familia para la evaluación, el primero conformado por las mazorcas que pudieron ser inoculadas en forma natural y otro conformado por un máximo de 8 mazorcas inoculadas en forma artificial.

La evaluación fue realizada en estado de grano maduro estimando el porcentaje de área atacada por el hongo, tanto en la porción inoculada como en la no inoculada; se consideró la selección de las familias con promedios de porcentajes de pudrición menores a 20 % (tanto en la porción inoculada como la no inoculada). Se utilizó la siguiente

escala de calificación de la severidad de ataque: donde **0= sana, 1= 1-10%, 2= 11-25%, 3= 26-50%, 4= 51-75%, 5= 76-100% de pudrición** (Jeffers, D. P., *et al.*).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó la colecta y evaluación de 17 aislamientos y se seleccionaron 5 en función al potencial de desarrollo y la verificación de especie (*F. verticillioides* encontrado en un 85 % de casos en evaluaciones anteriores), para realizar la inoculación y evaluación en condiciones de campo, en la población.

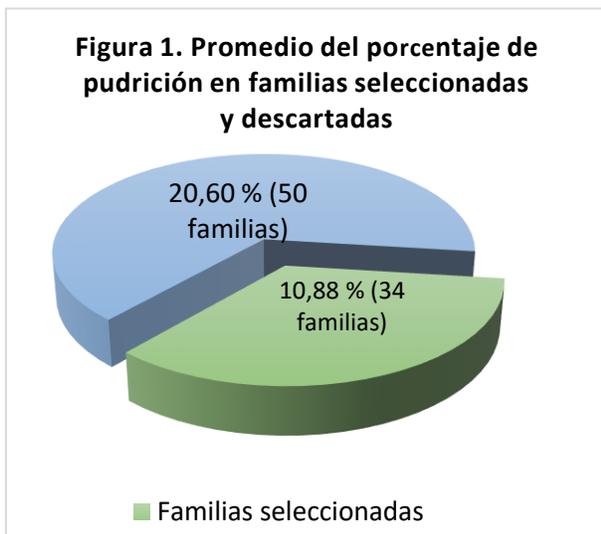
Se evaluaron, hasta 10 mazorcas inoculadas y se verificó la efectividad de la inoculación artificial al no encontrar mazorcas sanas en este grupo; y entre 5 y 14 mazorcas con inoculación natural (en 21 familias se registraron entre 0 y 6 mazorcas con y sin inoculación artificial).

La evaluación se realizó en estado de grano, tomando en cuenta un tratamiento testigo con inoculación natural para cada familia, para verificar la presencia de otras especies del hongo y de otros patógenos. Además, como menciona Pineda *et al.*, para verificar la eficiencia de la inoculación artificial en proporcionar una respuesta rápida, efectiva y confiable en la manifestación de la enfermedad, y ofrecer una fácil y práctica aplicación a una gran población de plantas y materiales genéticos.

Se evaluaron las 84 familias cada una con 5 a 10 mazorcas inoculadas artificialmente y con 5 a 13 mazorcas con inoculación natural. Se seleccionaron 34 familias de la variedad con promedios de porcentajes de pudrición menores a 25 % (Tabla 1), tomando en cuenta las familias con escala 1 y 2 (tolerantes al ataque de *Fusarium* sp. y *Fusarium verticillioides*), para continuar con el ciclo de recombinación y multiplicación, descartando las familias con escalas de 3 a 5.

Tabla 1. Porcentaje de pudrición en cada grupo		
	34 Familias Seleccionadas	54 Familias descartadas

Min.	3,4	4,3
Max.	24,6	56,6
Promedio	10,9	20,6



Las familias seleccionadas pueden ser consideradas para el siguiente ciclo de multiplicación y posterior verificación en varios ambientes a nivel de tolerancia al ataque de *Fusarium* sp.

Se recomienda que las familias seleccionadas 12, 24, 25, 26, 29, 33, 56, 62, 67, 68, 70, 71, 73, 74, 78, 10, 11, 39, 41, 42 y 52, en las que se encontraron entre 1 y 4 mazorcas con porcentajes de severidad mayores a 25 %, no sean incluidas dentro del esquema de recombinación general y se considere realizar un seguimiento específico en el siguiente ciclo de mejoramiento.

## CONCLUSIONES

La información obtenida permitirá determinar las actividades y estrategias de selección para continuar con el mejoramiento de la variedad Pairumani Choclero 2.

El siguiente ciclo de evaluación se verificará el avance logrado a nivel de aumento de tolerancia al ataque del hongo *Fusarium verticillioides*, con la metodología de inoculación artificial utilizada.

## Bibliografía

- Briones, D., Castillo F., Chávez J.L., Aguilar, V., de León C. y Ramírez, A. 2015. Respuesta del maíz nativo del altiplano mexicano a pudrición de mazorca, bajo infección natural. *Agronomía Mesoamericana* 26(1):73-85.
- Castro, C. y McNab, A. 2004. Enfermedades del maíz: una guía para su identificación en el campo. 118 pg.
- De León, C. and Pandey, S. (1989). Improvement of resistance to ear and stalk rots and agronomic traits in tropical maize gene pools. *Crop Sci.* 29:12-17.
- González, H. A.; Sahagún, C. J.; Pérez, L. D. J.; Domínguez, L. A.; Serrato, C. R.; Landeros, F. V. y Dorantes, C. E. (2006). Diversidad fenotípica del maíz Cacahuacintle en el Valle de Toluca, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 29(3):255-261.
- Jeffers, D. P., J. L. Gómez Gallegos y J. E. Lothrop. 1996. Evaluación de líneas endogámicas precoces de grano blanco semidentado de maíz de valles altos para resistencia a la pudrición de mazorca por *Fusarium moniliforme*. In: Memoria 3ra Reunión Latinoamericana y 16a Reunión de la Zona Andina de Investigadores en Maíz. Cochabamba, Santa Cruz (Bolivia), 1995. Avila L. G. y P. L. M. Céspedes (eds.). Fundación Simón I. Patiño. pp: 417-428.
- Kommedahl, T. y Windels, C.E. 1981. Root-, stalk-, and ear-infecting *Fusarium* species on corn in the USA. In: Nelson, P.E.; Toussoun, T.A. and Cook, R.J. eds. *Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy*: Pennsylvania State University Press. University Park. pp. 94-103.
- Martinson, Ch. 1990. Pudrición de mazorcas de maíz por *Fusarium* spp. *Ceiba*. Volumen 31 (1):43-46.

- Programa de Maíz del CIMMYT. 2004. Enfermedades del maíz: una guía para su identificación en el campo. Cuarta edición. México, D.F.: CIMMYT. 118 pg.
- Pineda, J., Hernandez A., Gonzales A. arrientos V., Nass, H. y Gil E. 2005. Técnica de inoculación rápida y eficiente para la evaluación de materiales de maíz ante *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Bioagro* 17(2): 93-98. 2005.
- Rivas, P., Virgen, J., Rojas, I., Cano, A. y Ayala V. 2011. Evaluación de pudrición de mazorca de híbridos de maíz en valles altos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas (Mexico)* volumen (2):845-854.
- Warren, H.L. 1978. Comparasion of normal and high-lysine maize inbreds for resistance to kernel rot caused by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 68:1331-1335.

Universidad Mayor de San Andrés  
Facultad de Ciencias Puras y Naturales  
Carrera de Biología  
Instituto de Biología Molecular y Biotecnología

La Paz – Bolivia

## Efecto de estrés salino (NaCl) e hídrico (PEG 6000) en la germinación de tres variedades de *Chenopodium quinoa* Willd

Lineth C. Quispe-Calle<sup>1</sup> & J. Quezada-Portugal<sup>1</sup>  
Contacto: [lineth.carly19@gmail.com](mailto:lineth.carly19@gmail.com)

### Resumen

Los factores estresantes llegan afectar la fase crítica del ciclo de vida de la planta, la germinación. La quinua forma parte de los cultivos de gran interés, por sus beneficios alimenticios, por presentar una amplia variabilidad genética y una alta capacidad de adaptación a condiciones de clima y de suelo. Se utilizó diferentes potenciales osmóticos de NaCl, PEG 6000 y la combinación de ambos para evaluar la germinación. Las variedades utilizadas presentaron tolerancia al estrés hasta -1.5 MPa. A partir de -2.0 MPa, las variedades estudiadas casi no germinaron.

**Palabras claves:** Estrés ambiental, Salinidad, Déficit hídrico, Germinación

### INTRODUCCIÓN

La germinación es la fase de crecimiento crítica del ciclo de vida de una planta, y más aún cuando se encuentra en condiciones de estrés (Hirich *et al.* 2020). Los factores estresantes abióticos son la principal causa de bajo rendimiento de los cultivos en el mundo (Mittler & Blumwald 2010, Mengel & Kirkby 1987) y conducen a cambios morfológicos, fisicoquímicos, bioquímicos y moleculares en las plantas (Tandzi & Mutengwa 2020). Por lo tanto, la identificación de cultivos con gran potencial de producir alimentos de calidad, aun en condiciones de estrés ambiental, es necesaria para contribuir a la seguridad alimentaria (Bonifacio *et al.* 2015) y garantizar una producción agrícola sostenible (Tandzi & Mutengwa 2020).

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) forma parte de los cultivos de creciente interés por ser altamente nutritivo, por la presencia de aminoácidos esenciales (Nivardo 2017), bajo costo de producción, variabilidad genética amplia y una alta capacidad de adaptación a

condiciones adversas de clima y de suelo (Rojas *et al.* 2011), teniendo una adaptabilidad mayor en comparación con los cereales (García-Parra *et al.* 2019).

A pesar de los estudios referidos al tema en *Chenopodium quinoa* Willd., existen escasos trabajos donde se evalúen al mismo tiempo dos factores de estrés, siendo que estos factores ocurren naturalmente en combinación de dos o más (Sánchez-Díaz & Aguirreolea 2013). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es evaluar la influencia de diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) como estrés salino y polietilenglicol 6000 (PEG 6000) como estrés hídrico sobre la germinación de las variedades de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) Chipaya, Maniqueña y Qanchis blanco.

### MÉTODOS

Se preparó diferentes soluciones de NaCl y PEG 6000 (Tabla 1) en agua destilada, al igual que soluciones combinadas presentadas en la Tabla 2.

La germinación se realizó en cajas Petri de 60x15mm donde se agregó 2ml de las diferentes soluciones. Para los controles, se utilizó únicamente agua destilada. Se agregó 20 semillas de quinua por caja Petri, con tres réplicas por tratamiento. Estaban a una temperatura promedio de 20 °C, en oscuridad. El conteo de semillas germinadas se realizó pasadas las 24 hr.

**Tabla 1.** Tratamientos de cloruro de sodio (NaCl) y polietilenglicol 6000 (PEG 6000) en g L<sup>-1</sup> para obtener soluciones con diferentes niveles de potencial osmótico (Villega *et al.* 1991, Barbieri *et al.* 2019).

Potencial osmótico (MPa)	NaCl (g L <sup>-1</sup> )	PEG 6000 (g L <sup>-1</sup> )
-0.5	6.67	192.624
-1.0	13.33	284.021
-1.5	20.00	354.367
-2.0	26.67	413.744
-3.0	40.00	513.435

Para el análisis estadístico se realizó un modelo lineal generalizado (GLM) con distribución de errores binomial con la función

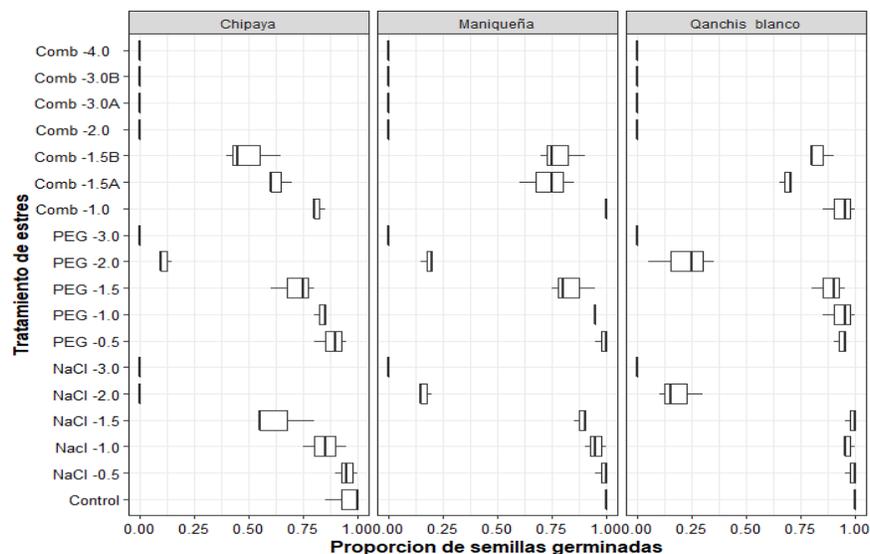
de enlace logit, con comparación de modelos Akaike (AIC), en el programa R-project.

**Tabla 2.** Tratamientos de combinaciones de cloruro de sodio (NaCl) y polietilenglicol 6000 (PEG 6000).

Nivel de potencial osmótico (MPa)	NaCl (g L <sup>-1</sup> ) + PEG 6000 (g L <sup>-1</sup> )
-1.0	6.67 + 192.624
-1.5A	13.33 + 192.624
-1.5B	6.67 + 284.021
-2.0	13.33 + 284.021
-3.0A	26.67 + 284.021
-3.0B	13.33 + 413.744
-4.0	26.67 + 413.744

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los resultados de este trabajo mostraron que las variedades de Qanchis blanco, Chipaya y Maniqueña llegan a germinar dentro de las 24 hrs hasta el 100%, excepto Chipaya, que presenta una menor tasa de germinación llegando a ser mayor al 90% ( $z=-7.503$ ,  $P<0.001$ ) (Figura 1).



**Figura 1.** Efecto de los tratamientos de estrés sobre la germinación de variedades de quinua, Maniqueña, Chipaya y Qanchis blanco.

Con el aumento de potencial osmótico, a partir de -1.5 MPa de NaCl, las variedades presentan una disminución en la germinación ( $z=-4.082$ ,  $P<0.05$ ), siendo más evidente en -

2.0 MPa ( $z=-10.098$ ,  $P<0.05$ ). Se muestra una alta tolerancia a la salinidad en Maniqueña y Qanchis blanco. En Zurita-Silva & Ruiz (2015) se informa que la quinua llega a germinar

semillas en una solución de cloruro de sodio con 42.2 dm/s (cercano a -2.0 MPa). La quinua Real, de la cual forman parte las variedades utilizadas, muestra una tasa de germinación cercana al 19% en 400 mM de NaCl (< -2.0 MPa) (Chilo *et al.* 2009), siendo similar con las variedades utilizadas.

Con el estrés hídrico causado por PEG, desde -0.5 MPa se tiene una disminución de la germinación hasta una tasa de 87% en Chipaya y mayor a 90% en Maniqueña y Qanchis blanco ( $z=-2.217$ ,  $P<0.05$ ). En -1.5 MPa, la tasa de germinación se reduce hasta 75% para las tres variedades, mostrando una menor tolerancia al déficit hídrico. Sin embargo, las tres variedades utilizadas en el presente trabajo son más tolerantes que otras variedades, como Titicaca, Gizal y Red Carina, cuya germinación baja a 65% de 75%, con -0.5 MPa de PEG, y con -1.0 MPa a menos de 15% (Al-Jabwi *et al.* 2020).

Con el estrés combinado, desde el menor potencial usado, -1.0 MPa, se redujo la germinación, hasta 80% en Chipaya y 90% en Maniqueña y Qanchis blanco ( $z=-2.645$ ,  $P<0.05$ ). Esto sugiere que un estrés combinado tiene efecto negativo sobre la germinación de la quinua, teniendo en cuenta que puede retrasar su germinación frente a estos tipos de estrés (Hinojosa *et al.* 2018).

## CONCLUSIONES

Las tres variedades presentaron alta tolerancia a NaCl y PEG 6000 hasta -1.5 MPa. Chipaya es menos tolerante que Maniqueña y Qanchis blanco. La combinación de los factores de estrés tuvo mayor efecto negativo sobre la germinación.

## REFERENCIAS

- Al-Jabwi, E., F. Abbas, & T. Al-Huniesh. 2020. Effect of Water Stress on Germination Process and Initial Seedling Growth of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Research Journal of Science*, 1(1), 1–9.
- Barbieri, G. F., R. Stefanello, J. F. Menegaes, J. D. Munareto, & U. R. Nunes. 2019. Seed Germination and Initial Growth of Quinoa Seedlings Under Water and Salt Stress. *Journal of Agricultural Science*, 11(15), 153.
- Bonifacio, A., A. Vargas, & M. Mamani. 2015. Uso de variedades de quinua y semilla de calidad. In Fundación PROINPA (Issue Informe Compendio 2011-2014).
- Chilo, G., M. Vacca Molina, R. Carabajal, & M. Ochoa. 2009. Efecto de la temperatura y salinidad sobre la germinación y crecimiento de plántulas de dos variedades de *Chenopodium quinoa*. *AgriScientia*, 26(1), 15–22.
- García-Parra, M. A., J. F. García-Molano, & C. A. Quito Martínez. 2019. Efecto de la salinidad por NaCl en el crecimiento y desarrollo de plantas de *Chenopodium quinoa* Willd. *Ciencia En Desarrollo*, 10(1), 19–29.
- Hinojosa, L., J. A. González, F. H. Barrios-Masias, F. Fuentes, & K. M. Murphy. 2018. Quinoa abiotic stress responses: A review. *Plants*, 7(4), 106.
- Hirich, A., R. C.- Allah, & R. Ragab. 2020. *Emerging Research in Alternative Crops*. Springer International Publishing. Cham, Suiza. 360 pp.
- Mengel, K., & E. A. Kirkby. 1987. *Principios de nutrición vegetal*. International Potash Institute. Basel, Suiza. 693 pp.
- Mittler, R., & E. Blumwald. 2010. Genetic engineering for modern agriculture: Challenges and perspectives. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 443–462.
- Nivardo, N. T. 2017. La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) alternativa de seguridad alimentaria para zonas desérticas. *Ciencia & Desarrollo*, 0(19), 19–24.
- Rojas, W., G. Alandia, J. Irigoyen, J. Blajos, & T. Santivañez. 2011. La Quinua: Cultivo

- milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial. *Oficina Regional Para America Latina y El Caribe, FAO*. 66 pp.
- Sánchez-Díaz, M., & J. Aguirreolea. 2013. Fisiología de las plantas y el estrés. 577-598. In J. Azcón-Bieto & M. Talón. 2013. Fundamentos de fisiología vegetal. Barcelona. Universitat de Barcelona, España. 669 pp.
- Tandzi Ngoune, L., & C. Mutengwa Shelton. 2020. Factors affecting yield of crops. 1-16. In Amanullah & Khalid, S. 2020. Agronomy - Climate change and food security. IntechOpen. London, Reino Unido. 110 pp.
- Villela, F. A., L. Doni Filho, & E. L. Sequeira. 1991. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6.000 e da temperatura. In Pesquisa Agropecuária Brasileira, 26 (11/12), 1957–1968.
- Zurita-Silva, A., & K. Ruiz. 2015. Sequía, frío y salinidad: respuesta de la quínoa al desafío ambiental. *Tierra Adentro*, 108, 42–47.

Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Agronomía  
Catedra de Microbiología Agrícola  
CONICET

Buenos Aires – Argentina

## Análisis de comunidades microbianas rizosféricas asociadas a cultivos de cobertura secados con glifosato

Escobar Ortega, J.S.\* (1); García de Salamone, I.E.

\*Autor de contacto: jhovana@agro.uba.ar

### Resumen

Para evaluar el efecto sobre las comunidades microbianas rizosféricas (CMR) de los cultivos de cobertura (CC) en rotación con soja manejados con glifosato, se condujeron tres ensayos en el mismo lote en las campañas 2008-2009, 2010-2011 y 2011-2012 en Treinta de Agosto, Buenos Aires con un diseño factorial en bloques completos aleatorizados con tres repeticiones en parcelas divididas. En cada ensayo, tres momentos de muestreo (MM) fueron considerados: antes de aplicar glifosato (AG), un mes después de aplicar glifosato (DG) y a cosecha de soja (CS). Los perfiles de uso de fuentes carbonadas y el índice H de diversidad de Shannon de las CMR presentaron diferencias significativas entre ensayos y para la interacción de estos con MM. Los datos presentados evidencian cambios en la fisiología y diversidad microbianas que podrían tener impacto sobre la calidad y salud del suelo y así en la sustentabilidad del agroecosistema.

**Palabras clave:** Centeno; avena; soja; glifosato; CLPP.

### INTRODUCCIÓN

La agricultura continua trajo como consecuencia el uso intensivo del suelo, impulsado por la expansión de la frontera agrícola sobre zonas no aptas para la agricultura, donde los suelos son mucho más frágiles y más susceptibles a la erosión hídrica y eólica (Sasal 2013). Las características de este fenómeno denominado agriculturización son, por un lado, el incremento de los cultivos anuales de verano a expensas del estancamiento de los cultivos de invierno, y por el otro, el crecimiento exponencial de la soja (*Glycine max* L. Merrill) en comparación al resto de las especies (Carreño y Viglizzo 2011). Actualmente, es común el monocultivo de soja, el uso intenso de agroquímicos y la escasa reposición del carbono y nutrientes (Scianca et al. 2009). Debido a la alta rentabilidad de la soja, los productores

agropecuarios se enfocaron casi exclusivamente a la siembra de esta leguminosa transgénica con resistencia al herbicida glifosato.

Por otro lado, los limitados aportes de rastrojo de la soja, aún bajo siembra directa, afectan los contenidos de materia orgánica (Satorre 2003) con un consecuente balance negativo de carbono en el suelo que favorece los procesos de degradación del mismo (Álvarez et al. 2006).

Debido a la importancia económica que representa el cultivo de soja en Argentina y dado que su residuo es escaso con baja relación C/N se descompone rápidamente y deja el suelo expuesto a la acción erosiva y con un balance negativo de N que contribuye al empobrecimiento del suelo (Sasal 2013; Zotarelli et al. 2002), se plantea incorporar

herramientas para favorecer la sustentabilidad del sistema.

Una de las alternativas es incluir en la rotación cultivos de cobertura (CC) para aumentar el aporte de carbono a través de los residuos. Así se mejora la calidad del suelo (Martínez et al. 2013) y en el mediano plazo se mitiga el balance negativo de carbono que sufren los sistemas de producción agrícola (Scianca et al. 2006). Sin embargo, muy poco se conoce sobre las propiedades biológicas asociadas a este sistema.

Para el secado de los CC generalmente se utiliza el herbicida glifosato (Nivia 2001). Este herbicida puede afectar la actividad microbiana por la intervención en el ciclo metabólico del ácido shikímico que está presente en la mayoría de los microorganismos (Tejada 2009). Por ello, el potencial de degradación del glifosato depende de la capacidad de los microorganismos para adaptarse a las nuevas condiciones ambientales que requiere ser analizado para cada sistema en estudio (Zucchi et al. 2003).

Conocemos muy poco acerca de la influencia de las prácticas de manejo sobre las comunidades microbianas rizofericas (CMR), debidos a la implantación de los CC y el secado de los mismos con glifosato. Por ello, existe la necesidad de estudiar el efecto del secado con glifosato de los CC sobre las CMR en condiciones de campo para así generar información que permita evaluar el impacto del manejo del agrosistema CC-soja sobre la sostenibilidad del mismo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se condujo tres ensayos en el mismo lote para evaluar la rotación CC-Soja en las campañas

2008-2009 (1<sup>o</sup>E), 2010-2011(2<sup>o</sup>E) y 2011-2012 (3<sup>o</sup>E). Los mismos se realizaron en el Establecimiento “El Correntino”, ubicado a 36° 8´ 50.9” Latitud Sur y 62° 21´ 51.9” Longitud Oeste de la localidad de 30 de Agosto, provincia de Buenos Aires (Región Subhúmeda Pampeana). Se utilizó un diseño en bloques completos aleatorizados con arreglo factorial en parcelas divididas, con tres repeticiones.

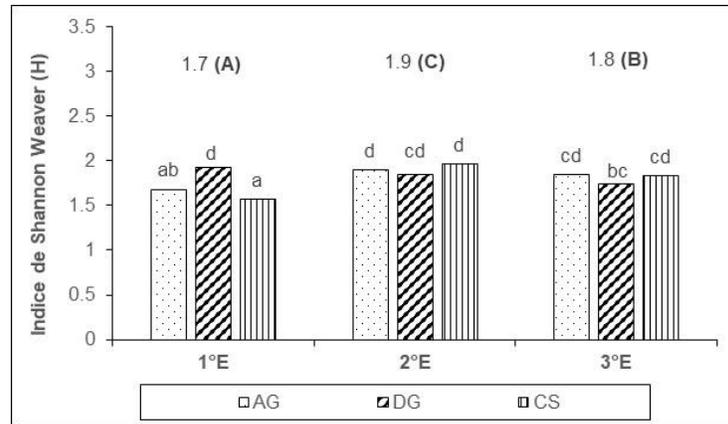
Los factores para los tres ensayos fueron: tipo de CC y momento de muestreo (MM). Dos niveles de fertilización nitrogenada (0 y 46 Kg N ha<sup>-1</sup>) aplicados a la siembra de los CC, se combinaron con “centeno var. Quehué ” (Secale cereale); “avena var. Aurora” (Avena sativa) y “soja” (Glycine max) continúa sin CC (testigo). Los tres MM en cada ensayo fueron: antes del aplicado con glifosato (AG), después del aplicado de glifosato (DG) y cosecha de soja (CS) que se realizaron sobre suelo rizosférico superficial. El secado de los CC se realizó con una dosis de 5 L ha<sup>-1</sup> de la formulación comercial de glifosato 54% p/v Roundup Full® (Monsanto Argentina) suministrado con mochila.

Se analizó perfiles de uso de fuentes carbonadas (CLPP), mediante análisis multivariado de Componentes Principales (CP) e índices Shannon-Weaver de diversidad (H).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de comunidades microbianas rizofericas (CMR) para el CP1 mostró diferencias significativas (DS) solamente en 1<sup>o</sup>E y 2<sup>o</sup>E. Donde los MM difieren entre si significativamente. En cambio, en el 3<sup>o</sup>E observamos DS entre los CLPP de las CMR de DG con respecto a AG y CS para el CP2. Estos dos MM mostraron DS para el CP1.





**Figura 2.** Índice de Shannon-Weaver (H) para los tres ensayos y sus respectivos muestreos. 1°E: 1° ensayo; 2°E: 2° ensayo; 3°E: 3° ensayo; AG: Antes del aplicado con glifosato; DG: Después del aplicado con glifosato; CS: Cosecha de soja. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos, mediante test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

## CONCLUSIONES

Es importante tener en cuenta que la dosis de glifosato usada en este trabajo, es la que se utiliza comúnmente en los lotes de producción y que los resultados de los tres ensayos mostraron efectos estimulantes, inhibitorios y nulos.

En base a los resultados de este trabajo, se puede concluir que se deberá tomar en cuenta el secado con glifosato de los CC por el impacto sobre las CMR, ya que cada microorganismo realiza funciones vitales generales y específicas dentro de su nicho ecológico, es así, que los cambios en las cantidades de células, en un determinado ambiente significan cambios que tienen impacto en los procesos biológicos y por ende en el equilibrio ecológico del suelo (Whitman et al. 1998). Los cambios microbiológicos, se encadenan con cambios agronómicos y en la mayoría de los casos no han sido evaluados.

Los datos presentados evidencian cambios en la fisiología de las CMR y su diversidad que podrían tener impacto sobre la calidad y salud del suelo y por ende en la sustentabilidad del agroecosistema.

## REFERENCIAS

- Álvarez, C., Scianca, C., Barraco, M., Díaz Zorita, M. 2006. Inclusión de los cultivos de cobertura en rotaciones con base soja. Aporte de carbono e Influencia sobre propiedades edáficas. Ediciones INTA. p 21-23.
- Carreño, L., Viglizzo, E. 2011. Provisión de los servicios ecológicos y gestión de los ambientes rurales en Argentina. Buenos Aires: INTA, Área estratégica de gestión ambiental.
- Martínez, J.P., Barbieri, P.A., Sainz Rozas, H.R., Echeverría, H.E. 2013. Incorporación de cultivos de cobertura previos a soja en el sudeste bonaerense. En: Informaciones Agronómicas de Hispanoamérica. 21-25.
- Naiman, A.D., Latronico, A.E., García de Salamone, I.E. 2009. Inoculation of Wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: impact on the production and rhizospheric microflora. *European Journal of Soil Biology*. 45:44-51.

- Nivia, E. 2001. Las fumigaciones aéreas sobre cultivos ilícitos si son peligrosas – Algunas aproximaciones en: Conferencia “Las Guerras en Colombia: Drogas, Armas y Petróleo” “The Wars in Colombia: Drugs, Guns and Oil” Instituto Hemisférico de las Américas. Universidad de California, Davis. p 17-19.
- Osorio, N.W., Pérez JC. 2001. Microbial solubilization of phosphates in soil. A review. X Congreso de la Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo, Medellín.
- Sasal, M.C. 2013. Nota: La sustentabilidad de sistemas bajo SD depende de la secuencia de cultivos implementada. Revista de Investigaciones Agropecuarias RIA. 39 (2): 120-121.
- Satorre, E. 2003. Las posibilidades ambientales y tecnológicas de la pradera pampeana para la producción de granos. Las Ciento y Una “Hacia los 100 millones de toneladas 114 de granos y la exportación de 1 millón de toneladas de carne. Bolsa de Cereales de Buenos Aires p 37-38
- Scianca, C., Barraco, M., Álvarez, C. 2009. Estrategias de manejo de centeno utilizado como cultivo de cobertura en un argiudol típico del noroeste bonaerense. Memoria técnica 2008-2009. Ediciones INTA EEA General Villegas. 22. ISSN 1850-6038.
- Tejada, M. 2009. Evolution of soil biological properties after addition of glyphosate, diflufenican and glyphosate more diflufenican herbicides. Chemosphere 76: 365-373.
- Whitman, W.B., Coleman, D.J. Wiebe W.J. 1998. Prokaryotes: The unseen majority. Proceeding of the National. Academy of. Science. USA 95: 5578–6583.
- Zabaloy, M. C., Gómez, E., Garland, J. L., Gómez, M. A. 2012. Assessment of microbial community function and structure in soil microcosms exposed to glyphosate. Applied Soil Ecology. 61: 333-339.
- Zotarelli, L., Torres, E., Boddey, R.M., Urquiaga, S., Alves, B.J.R. 2002. Role of legumes in the N economy of cereal production in crop rotation under conventional and no-tillage. In: World Congress of soil Science. Proceeding of the 17PthP World Congress of Soil Science. Bangkok. Tailandia.
- Zucchi, M., Angiolini, L., Borin, L., Dietrich, N., Gingiotti, C., Barbieri, P., Sorlini, C., Daffonchio, D. 2003. Response of bacterial community during bioremediation of an oil-polluted soil. Journal of Applied Microbiology. 94: 248-257.

Universidad Mayor de San Simón  
Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias  
Laboratorio de Microbiología Agrícola y Bioinsumos  
Centro de Investigación de Ciencias Exactas e Ingenierías

Cochabamba - Bolivia

## Consortios microbianos nativos para la biodegradación de residuos orgánicos

<sup>1</sup> Consultor independiente <sup>2</sup> Docente titular, investigador y responsable del Laboratorio de Microbiología Agrícola y Bioinsumos de la "FCAyP" de la Universidad Mayor de San Simón.

<sup>3</sup> Docente, investigador y coordinador del Centro de Investigación de Ciencias Exactas e Ingenierías

Fabio Ortuño<sup>1</sup>, Paul d'Abzac y Noel Ortuño<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dirección de contacto fortunoramallo@gmail.com

<sup>2</sup>Dirección de contacto n.ortuno@umss.edu.bo

<sup>3</sup>Dirección de contacto pdabzac@ucb.edu.bo

### Resumen

El presente proyecto fue diseñado para aumentar la eficiencia de la biodegradación de residuos sólidos urbanos en la ciudad de Cochabamba. Se trabajó con un consorcio de microorganismos nativos aislados de compostaje, productos lácteos y el suelo. Se estudiaron las características biológicas y químicas de los microorganismos para seleccionar uno de cada género: *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Trichoderma*. El seguimiento de las cantidades de C y N mostraron que la bioaumentación de estos organismos aumentó la capacidad de biodegradación de la materia orgánica en 20% frente al compostaje sin bioaumentación, siendo superior en 3% frente a un producto comercial.

**Palabras claves:** Bioaumentación, Consortios Microbianos, Manejo de residuos orgánicos.

### INTRODUCCIÓN

Cochabamba generó 131.866 toneladas de basura en 2010, del cual el 66% fue de materia orgánica (Ministerio de Medio Ambiente y Agua, 2018), estos residuos van creciendo a una tasa de cuatro mil toneladas año las cuales no son aprovechadas por razones de logística y económicas (Molino, 2019). Para reducir eso, se elaboraron compost con RO procedentes de los mercados de la ciudad, se hizo una pila con activadores en la cual se observaron resultados en dos meses, mientras que por el método tradicional se observaron resultados a los 4 meses (Ortuño *et al.*, 2002).

También, se ha demostrado que la bioaumentación con consorcios mixtos de

bacterias es una estrategia viable para la degradación de materia. Sin embargo, se ha evidenciado que los consorcios de hongos-bacterias han tenido más eficiencia en la degradación de materia comparado con consorcios bacterianos o cultivos bacterianos individuales (Tyagi *et al.*, 2011).

En general, el compostaje es un proceso bioquímico realizado por microorganismos y que, además, se tiene factores que afectan al desarrollo del proceso, como los factores químicos (pH, temperatura, humedad, composición de los residuos, etc.), el desarrollo del microorganismo (disponibilidad de nutrientes, compatibilidad de los microorganismos, adaptación de los microorganismos al medio ambiente, aceptación de los Microorganismos al sustrato,

etc.) y factores del sustrato (relación C/N, tamaño de partícula, conductividad eléctrica, materia orgánica, fracción de vacío, etc.). Y hay factores ambientales que no pueden ser controlados ni modificados.

La investigación se realizó en la FCAyP de la UMSS, ubicada a 4,5 km de la Av. Petrolera, zona “La Tamborada”. Para el aislamiento de *Bacillus* se tomaron muestras de compost en diferentes estados de maduración en la “FCAyP- UMSS”. Fueron tomadas de la etapa de activación, calentamiento, enfriamiento y maduración. Se aislaron bacterias tipo *Bacillus* en PDA (medio de cultivo), tras ser sometido a un shock térmico. En el cepario de la FCAyP se tiene cepas ya aisladas, las que fueron activadas, principalmente *Bacillus subtilis* y *Trichoderma* spp. Se utilizó medios de cultivo con Leche en Polvo, Lactosa, PDA TSA y TSA ácido (pH=5) y se observó su crecimiento.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para aislar las bacterias lácticas se tomaron muestras de leche fresca de vacas del establo de la FCAyP de la UMSS, de suero de leche y yogurt elaborado en la misma Facultad. Además, la leche se incubó durante 3 días a 28°C, luego se observó la separación en dos fases y se tomó muestra de la fase más líquida (inferior). Se sembró en triplicado en los diferentes medios preparados (Leche en Polvo, Lactosa, TSA y TSA5), se incubó a 28°C durante 3 días y se aislaron las bacterias presentes en placas Petri (divididas en cuatro) en medio de cultivo TSA. Luego se las sembró en leche ultra esterilizada, y fermentó durante 72 horas a 30°C, observándose la formación de dos fases, que indican presencia de las bacterias lácticas. El porcentaje de coagulación se midió en base a 3 parámetros: cantidad y tamaño de coágulos (visibles) y cantidad de suero de leche presente, con una escala arbitraria de 0 a 10 (siendo 0 más parecido a leche esterilizada y 10 el más parecido a la muestra más coagulada). Los grados Brix (°Brix) fueron medidos con un refractómetro con rango de 0-40 °Brix.

Se realizaron pruebas bioquímicas (Gram y de la catalasa). Después del proceso de maduración se realizó la cuantificación de carbono (de cada experimento individualmente, y teniendo duplicado), seguidamente se analizó los resultados y se vio cuál presentó una mayor variación de carbono, para seleccionarlo para una siguiente fase. Para realizar la cuantificación de carbono se realizó con el método de Micro-DQO.

Como sustrato orgánico se utilizó pasto fresco (Ryegrass; 70% de humedad) el cual fue cortado el mismo día, al inicio del compostaje. Para inicio del compostaje fue necesario preparar el caldo con el cual se realizaría la inoculación.

En la preparación de los tratamientos A corresponde a Bs, B corresponde a L10 y C corresponde a T13. Se hizo las correspondientes permutaciones para conocer la incidencia de los consorcios establecidos frente al efecto único de los microorganismos. El tratamiento comercial corresponde a un producto comercial elaborado en la Facultad de ciencias pecuarias y agronómicas de la UMSS. Para una inoculación apropiada y homogénea primero se introdujeron 30 g. de sustrato. Se inoculó y posteriormente se agregó otros 30 g de sustrato, para así tener en total los 60 g.

El compostaje fue preparado en recipientes de plástico de 500 mL, con una cantidad de 60 g de sustrato (Antizar-Ladislao *et al.*, 2005). El proceso de compostaje es un proceso aerobio, por lo tanto, se dejó abierto al ambiente, siguiendo el método ya mencionado de Antizar-Ladislao, *et al.* (2005). Durante el proceso de compostaje se evaluó: Temperatura con termómetro digital, Materia orgánica con la ayuda del método de análisis de cenizas y Nitrógeno con la ayuda de análisis de nitrógeno total con micro Kjeldhal

Para la toma de estas muestras se realizó tres tratamientos ABC adicionales, con sus respectivos triplicados. Esto es debido a que el análisis es destructivo, y se desea no afectar los resultados finales. Para poder cuantificar la

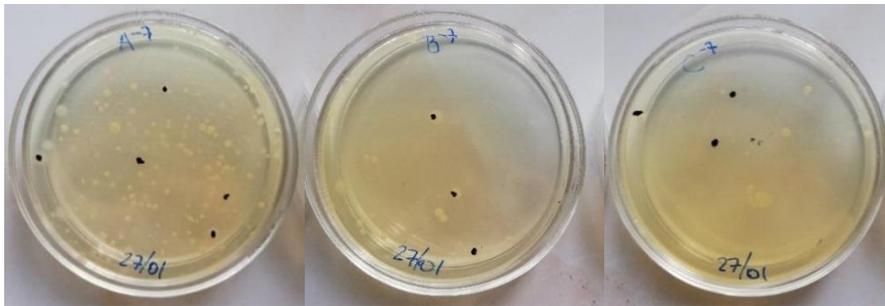
degradación, es decir, el avance de la misma fueron necesarios análisis químicos antes y después del compostaje. Se utilizó el método de terminación de Nitrógeno mediante micro Kjeldhal, para la determinación de Nitrógeno (Norma Determinación de proteínas totales en alimentos - Método micro Kjeldahl, 2008), el carbono se determinó mediante el análisis de ceniza (Residuos sólidos Determinación de cenizas, 1996).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Aislamiento y activación de Bacterias y Hongos*

En muestra A, la cual corresponde al periodo de activación, se puede observar claramente que se tiene mayor actividad microbiana. A medida que la cantidad de materia orgánica fácilmente degradable va decayendo la actividad microbiana y la cantidad de UFC también va decayendo (Jiang *et al.*, 2019). Placa B, corresponde a la etapa de calentamiento y posteriormente la etapa C corresponde a una etapa de enfriamiento.

**Ilustración 1 Siembra de muestras A, B y C respectivamente.**



Fuente: Elaboración Propia (2021).

Se usó como única fuente de carbono a la lactosa, por lo tanto, se presume que estos medios son selectivos ya que la característica de las bacterias lácticas es su capacidad para degradar la Lactosa. Por otro lado, el hecho de acidificar el medio de TSA, es debido a que las bacterias lácticas acidifican el sustrato debido a sus propiedades y al tipo de compuestos que produce (Ácidos Lácticos) (Salminen & Wright, 2004).

Para la activación de hongos del género *Trichoderma* se tomaron los hongos que se disponen en el cepario Laboratorio de Microbiología Agrícola y Bionsumos de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias de la UMSS. Los hongos son nativos del género *Trichoderma* que fueron aislados de suelos de cultivo de distintas zonas agrícolas del departamento de Cochabamba la codificación se realizó en base el código que se tiene en el cepario del ya mencionado del laboratorio.

### **Selección Biológica de Bacterias**

Una vez obtenido las bacterias lácticas y los *Bacillus* aislados, se continuó con la tinción de Gram. En la presente investigación se decidió trabajar con bacterias Gram positivas.

Se hizo el porcentaje de coagulación y los grados Brix. En base a estos resultados, se seleccionaron las bacterias lácticas que sobrepasaron el 50% de coagulación de leche. En esta coagulación debido a las propiedades de las bacterias lácticas, suelen tender a un pH de 4 ya que es el pH óptimo para dichas bacterias y el funcionamiento de sus enzimas (Arévalo & Quispe, 2008). Sin embargo, se pudo calcular que la mayoría de las bacterias lácticas obtuvieron en general un pH promedio de 5,7.

- **Prueba de multiplicación bacteriana**

Las bacterias lácticas y las bacterias *Bacillus*, se multiplicaron en medio de cultivo MS (Melaza-Soya). Se realizó durante 2 semanas, a esta prueba se agregó la bacteria, que se

tenía en el cepario del Laboratorio de Microbiología Agrícola y Bionsumos de la FCAYP de la UMSS, la bacteria agregada se debió por ser nativa ya identificada, la cual pertenece a la especie *Bacillus subtilis*. Además ésta siempre se encuentra presente en el proceso de compostaje (Storm, 1985).

Después de multiplicarlas, los microorganismos que tenían una cantidad de UFC menores a  $10^{-6}$  fueron descartados, a mayor multiplicación, mayor capacidad de degradación (Jian *et al.*, 2019).

### Selección Biológica de Hongos.

Se seleccionaron hongos que tuvieron una esporulación mayor al 50% en la superficie líquida.

### Selección química de bacterias

Se decidió trabajar con la bacteria Bs, porque tiene una menor cantidad de materia orgánica (frente al blanco) lo cual significa mayor degradación de materia oxidable. Asimismo, por el lado de las bacterias lácticas se decidió trabajar con la bacteria L10, ya que al igual que en los *Bacillus* presentó una mayor degradación de la fuente de carbono. El aumento de la DQO en las bacteria L14 puede ser debido a que estas, bacterias lácticas, pueden fijar el dióxido de carbono mediante la reacción de Wood-Werkman (Pine, 1956).

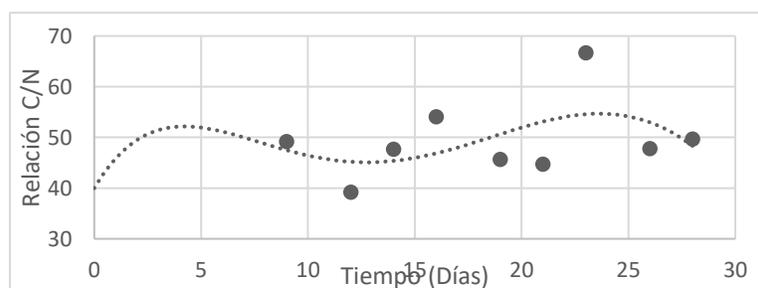
Se trabajó con el hongo que tuvo una mayor variación respecto al blanco (T13). Esta variación puede ser debido a que los hongos produjeron metabolitos secundarios para la degradación del precipitado del sustrato MS, los cuales fueron disueltos en agua como policétidos, terpenos, terpenoides, pirógenos, fenoles y alcaloides (Harman & Kubicek, 2002) y estos fueron detectados por el método de DQO como compuestos degradables y por eso se ve un aumento del DQO en el caso de los hongos.

El carbono y el nitrógeno en función del tiempo fueron medidos únicamente en el experimento que contenía *Bacillus*, Lácticas y *Trichoderma* (ABC). Después de 12 días se alcanzan los 30°C (fase mesófila) la temperatura sigue subiendo hasta llegar aproximadamente a 40°C. A esa temperatura empieza la fase termófila. La mayor parte de los microorganismos que se encontraban al principio mueren y son reemplazados por otros resistentes a esa temperatura. Esta fase termina cuando la generación de calor es igual a la pérdida de calor en la superficie (Rynk *et al.*, 1992).

EL Nitrógeno tuvo una tendencia lineal con pendiente negativa, ésta pendiente indica que el nitrógeno se ve reducido.

- **Relación Carbono/Nitrógeno**

**Ilustración 2 Comportamiento C/N en el tiempo.**



Fuente: Elaboración Propia (2021).

La relación Carbono/Nitrógeno es un parámetro el cual indica la madurez del compostaje, sin embargo, este parámetro varía según el sustrato a utilizar. La tendencia en el caso del tratamiento es ondulatoria. La bacteria de género *Bacillus* es una bacteria fijadora de nitrógeno (Kuan *et al.*, 2016), aun así, degrada el carbono, de igual manera, el hongo *Trichoderma* y la bacteria *Lactobacillus* degradan el carbono. Por lo tanto, la tendencia observada en la ilustración 20 se debe a la propiedad fijadora del *Bacillus*.

- **Materia orgánica**

Se observa que los tratamientos tuvieron una reducción de la materia orgánica, con excepción del blanco, y por lo tanto la bioaumentación se evidenció. En principio se ve una cantidad inicial de materia orgánica para posteriormente descender de manera no lineal.

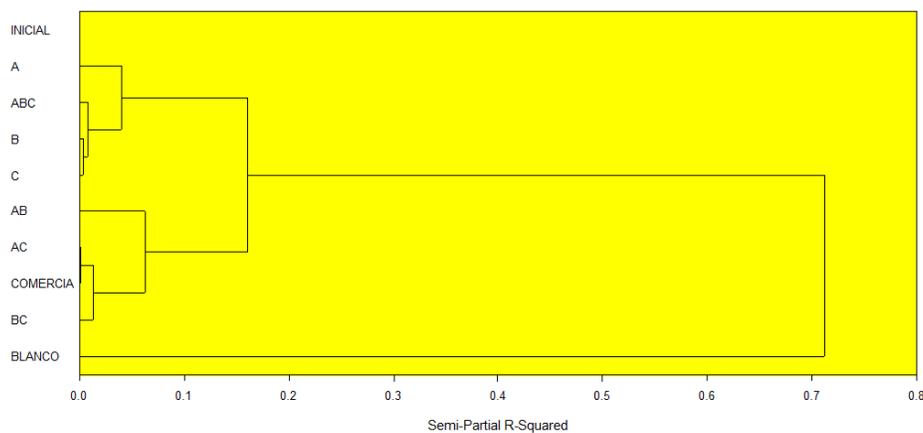
Se observaron 3 grupos:

- Dentro del grupo “a” están aquellos que tienen una mayor cantidad de materia orgánica. Siguiendo el comportamiento de la materia orgánica se ve una menor degradación, por lo tanto, una mayor cantidad de materia orgánica.
- En el grupo “b” incluye únicamente los consorcios binarios AB y BC y corresponde a una degradación intermedia de la materia orgánica.
- El grupo “c” al cual pertenecen la mayoría de los consorcios de bioaumentación, corresponde a los tratamientos con la menor cantidad de materia orgánica, lo que significa una mayor degradación. Dentro del grupo “c” aún existen variaciones, no significativas estadísticamente.

Se observa que el tratamiento ABC, B y C son los que más ayudan a la degradación de la materia orgánica, en estos tratamientos se ven mejores resultados, incluido el comercial (en cuanto a la degradación de materia orgánica).

## Análisis de agrupación

**Ilustración 31 Análisis Cluster.**



**Fuente: Elaboración Propia**

La Ilustración 3 muestra que un consorcio triple es comparable con tratamientos simples, es decir, con tratamientos que incluyan únicamente un microorganismo. Con los tratamientos dobles se observan que son comparables con el comercial, sin embargo, en base a los resultados previos pudimos

observar que la eficiencia del comercial no es comparable con la del consorcio triple.

Eso representaría que, bajo las condiciones de estudio, se ha aislado microorganismos que funcionan en consorcios independientes (de dos en dos) similares al producto comercial. Por lo tanto, se dispone de nuevos consorcios en base a los nuevos aislamientos de microorganismos nativos, que en consorcios alcanzan la misma eficiencia que el producto comercial.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Antizar-Ladislao, B., Lopez, J., & Beck, A. J. (2005). Laboratory studies of the remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soil by in-vessel composting. *Waste Management*, 25(3), 281–289. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2005.01.009>
- Arévalo, F. H., & Quispe, A. (2008). Control y regulación del pH en una fermentación láctica utilizando carbonato de calcio como regulador y microbiota de granos de Kefir como agente biológico. *Ciencia y Desarrollo*, 9(0), 5–10. <https://doi.org/10.21503/cyd.v9i0.1175>
- Harman, G. E., & Kubicek, C. P. (2002). *Trichoderma And Gliocladium*. Volume 1: Basic Biology, Taxonomy and Genetics. CRC Press.
- Residuos sólidos—Determinación de cenizas, NB 746:1996 (1996). <https://www.ibnorca.org/ibnorca/tienda/catalogo/detalle-norma/NB%20746:1996%20nid=1635-6#scrollSlider>.
- Norma Determinación de proteínas totales en alimentos—Método micro Kjeldahl, NB 329032:2008 (2008). <https://www.ibnorca.org/tienda/catalogo/detalle-norma/nb-329032:2008-nid=1254-3#scrollSlider>
- Jiang, Lu, Y., Xu, J., Li, M., Shan, G., & Li, Q. (2019). Exploring the characteristics of dissolved organic matter and succession of bacterial community during composting. *Bioresource Technology*, 292, 121942. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121942>
- Kuan, K. B., Othman, R., Rahim, K. A., & Shamsuddin, Z. H. (2016). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Inoculation to Enhance Vegetative Growth, Nitrogen Fixation and Nitrogen Remobilisation of Maize under Greenhouse Conditions. *PLOS ONE*, 11(3), e0152478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152478>
- Ministerio de Medio Ambiente y Agua. (2018). Anteproyecto POA.
- Molino, B. (2019, diciembre 30). Basura de Cercado aumenta en 4 mil toneladas cada año. *Opinión Bolivia*. <https://www.opinion.com.bo/articulo/cochabamba/basura-cercado-aumenta-4-mil-toneladas-cada-ano/20191229214301743414.html>
- Pine, L. (1956). Fixation of Carbon Dioxide by *Actinomyces* and *Lactobacillus bifidus*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 93(3), 468–472. <https://doi.org/10.3181/00379727-93-22790>
- Rynk, R., van de Kamp, M., Willson, G. B., Singley, M. E., Richard, T. L., Kolega, J. J., Gouin, F. R., Laliberty, L., Kay, D., Murphy, D., Hoitink, H. A. J., & Brinton, W. F. (1992). *On-Farm Composting Handbook* (NRAES 54). Northeast Regional Agricultural Engineering Service (NRAES). <https://ecommons.cornell.edu/handle/1813/67142>
- Salminen, S., & Wright, A. von. (2004). *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, Third Edition. CRC Press.

Strom, P. F. (1985). Identification of thermophilic bacteria in solid-waste composting. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(4), 906–913.

Tyagi, M., da Fonseca, M. M. R., & de Carvalho, C. C. C. R. (2011).

Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 22(2), 231–241. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9394-4>

Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas  
Universidad Mayor de San Andrés

La Paz - Bolivia

## Biomíneralización de estruvita por *Chryseobacterium sp.* 2CANA<sup>T</sup> para la recuperación de magnesio de la bischofita y fósforo del suero lácteo

Gonzales Mamani, Virginia\*; Crespo Melgar, Carla; Álvarez Aliaga, María Teresa

\*Contacto: vikirigo123@gmail.com

### Resumen

La recuperación de fósforo y nitrógeno de aguas residuales mediante la producción de estruvita representa una alternativa tecnológica. La estruvita, fertilizante de liberación lenta requiere una fuente de magnesio. Para su producción se utilizan  $Mg(OH)_2$  y  $MgCl_2$ , pero pueden utilizarse minerales como la bischofita ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ). Se evaluó la producción de bioestruvita mediante la recuperación de P y N del suero lácteo y Mg de la bischofita. Se evaluó a *Chryseobacterium sp.* en medios formulados con suero lácteo en: **1)Proceso simultáneo**, se empleó urea o  $(NH_4)_2SO_4$  como fuente de N y  $MgSO_4$ ,  $MgCl_2$  o bischofita como fuente de Mg. **2)Proceso separado**, variando DQO (0,5-32g/L) y urea (44-2843mg/L). **Proceso 2**, la producción de estruvita (5,1g/L), remoción de P (94%), N (82%); superior al proceso fisicoquímico. Los cristales se identificaron mediante DRX, SEM-EDS. La estruvita como fertilizante puede ser útil para una variedad de cultivos agrícolas y representa una alternativa novedosa en Bolivia.

**Palabras clave:** Bischofita, estruvita, fertilizante, suero lácteo, *Chryseobacterium*.

### INTRODUCCIÓN

Las fuentes de agua suelen verse afectadas por diversos contaminantes, como los residuos y compuestos orgánicos, las sustancias inorgánicas, los microorganismos patógenos y no patógenos, y los nutrientes como el nitrógeno (N) y el fósforo (P) (Munch, Barr, & Münch, E. V., & Barr, 2001). El N y el P son elementos que destacan no sólo por su abundancia, sino también por su peligrosidad, ya que son los principales causantes de la eutrofización de cuerpos de agua (De-Bashan & Bashan, 2007). La recuperación de P y N mediante la producción de estruvita es una alternativa de tratamiento del agua. La estruvita ( $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$ ) es un mineral compuesto por cantidades equimolares de Mg, N y P, se caracteriza por ser un fertilizante de liberación lenta por lo que las plantas pueden utilizar dosis controladas de nutrientes durante tiempos prolongados (Li et al., 2019).

La producción de estruvita además de N y P requiere la adición de magnesio (Mg). Las principales fuentes son el  $Mg(OH)_2$  y el  $MgCl_2$ . Existen diferentes fuentes naturales de Mg. Bolivia tiene la mayor reserva de litio del mundo en el Salar de Uyuni; sin embargo, la abundancia de magnesio disuelto reduce la calidad del litio, precipitándose prematuramente como impurezas en las sales de magnesio. La bischofita, formada por  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , es un subproducto abundante de la industrialización del litio y actualmente no se industrializa a pesar de ser una valiosa fuente de magnesio que podría utilizarse para obtener estruvita, reduciendo los costes de producción.

La producción biológica de estruvita (o Bioestruvita) es una alternativa al proceso químico convencional (Kataki, West, Clarke, & Baruah, 2016), aprovecha las características metabólicas y estructurales de algunas bacterias que favorecen la biomíneralización de los cristales de estruvita, por lo que no se requieren procedimientos adicionales para

formar el mineral. Las bacterias pueden servir de núcleo para la precipitación del mineral mediante la adsorción de cationes (como el magnesio) alrededor de la membrana de la superficie celular, la pared celular o las capas de sustancias poliméricas extracelulares y son mediadores activos en el proceso (Sánchez-Román, Rivadeneyra, Vasconcelos, & McKenzie, 2007). En ese sentido, se evaluó la producción de bioestruvita mediante la recuperación de P y N del suero lácteo y Mg de la bischofita.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismo, preparación de inóculo y condiciones de cultivo

*Chryseobacterium* sp. 2CANA<sup>T</sup> aislado previamente de BIOFOS, un consorcio microbiano acumulador de fósforo (Gonzales, Crespo, & Alvarez, 2021), fue usado en este estudio. Una Colonia de la cepa 2CANA fue activada en agar soya tripticasa, crecida en caldo soya tripticasa a 30°C por 24 h y usada como cultivo iniciador.

### Sustratos

- 1) **Suero lácteo:** fue colectado en frascos plásticos de la empresa procesadora de leche “Flor de Leche” S.R.L. (La Paz-Bolivia) en octubre, 2018. El pH del suero lácteo fue ajustado a 7.0 con NaOH (6N) y esterilizado a 121 °C, 15 PSI por 15 min. El suero fue filtrado al vacío usando papel filtro (Whatman No. 1). DQO, nitrógeno total, NH<sub>4</sub>, P y pH fueron determinados en el suero filtrado.
- 2) **Cristales de bischofita:** proporcionado por la empresa procesadora de litio YLB, su composición iónica fue analizada por espectroscopia de energía dispersa (EDS, Jeol, Japón) en el laboratorio de análisis químico de YLB (Llipi, Potosí - Bolivia).

### Biomíneralización de estruvita en medios formulados

La biomíneralización de estruvita fue evaluada comparando dos estrategias, descritas a

continuación. Ambos experimentos fueron inoculados con una suspensión de *Chryseobacterium* sp. 2CANA (3 %, v/v) en NaCl (0.9 %) e incubada a 30 °C y 100 rpm.

- a) **Proceso simultáneo de cultivo y producción de estruvita:** se realizó un diseño factorial incompleto de 32 con dos factores, fuente Mg y fuente de N. Mg (14,5 mM) con tres niveles: MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O (3.6 g/L), MgCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O (3.0 g/L) o bischofita (5.5 g/L) y N (11.5 mM) con dos niveles: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.8 g/L) o urea (0.35 g/L). Ambas fuentes de Mg y N se mantuvieron en una relación molar 1.3:1, respectivamente. Todas las soluciones se esterilizaron a través de una membrana de metilcelulosa (0.45 µm) en una base formulada previamente esterilizada que contenía suero lácteo filtrado (DQO 75500 mg/L) y P como K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2 g/L). Todas las pruebas se inocularon al 3% (v/v) y se incubaron durante 15 días. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 5000 rpm por 5 min para analizar P, DQO y pH, los cristales de estruvita producidos se recuperaron por filtración, se caracterizaron y se cuantificaron como se describe en la sección 2.4.
- b) **Proceso separado de cultivo y producción:** En la primera etapa se formularon medios de cultivo con suero lácteo filtrado a 4 niveles de DQO (500, 2000, 8000 y 32000 mg /L). Los medios se adicionaron con soluciones de urea (1000 g/L): 44, 178, 711, 2843 mg NH<sub>4</sub>/L y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1000 g/L): 27, 111, 446, 1784 mg P/L para mantener constante la relación C: N: P 100: 5: 1. 100 mL de los medios formulados en matraz de 250 mL se inocularon (3 % v/v) y se incubaron a 30 °C, 100 rpm durante 24 h. Se tomaron muestras cada 2 h para determinar la turbidez (600 nm), el pH, P, DQO y NH<sub>4</sub> se analizaron al final de la primera etapa. En la segunda etapa se añadieron 240 y 10 µL de soluciones bischofita y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, concentraciones similares al proceso 1 y se incubaron durante 2 días. Finalmente

se analizaron el P, la DQO, el NH<sub>4</sub>, el pH y la estruvita.

### Purificación y análisis de cristales de estruvita

Los cristales se colectaron con una espátula de plástico, se filtraron (Whatman n° 1), se lavaron con agua destilada alcalinizada a pH 10 con NaOH, se secaron a 25 °C durante 24 h y se pesaron. A continuación, los cristales se identificaron mediante difracción de rayos X (XRD, Rigaku, Japón), espectrometría de dispersión de rayos X acoplada a microscopía electrónica de barrido (SEM-EDS, Jeol, Japón).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Características químicas del suero lácteo y los cristales de bischofita

El suero lácteo se caracterizó por su contenido de DQO 70400 mg/L, P-PO<sub>4</sub> de 140.0 mg/L, NT de 1010.0 mg/L, N-NH<sub>4</sub> de 55.2 mg/L y pH de 4.5 (Tabla 1). Estos parámetros son característicos del suero lácteo. Debido al elevado contenido de C, N y P en el suero lácteo, podría ser empleado para la recuperación de P y N a través de la formación de estruvita (Lavanya, Sri, & Thanga, 2020).

La composición elemental de la bischofita mostrada en la tabla 1 sugiere que las sales presentes corresponden a MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O y CaSO<sub>4</sub> en una relación 2: 1. La bischofita es una fuente de Mg disponible y abundante en la región sur del Salar de Uyuni. Además, es económico al ser un subproducto en el proceso de extracción de litio. Es así que podría ser utilizada para la producción de estruvita.

Tabla 1. Composición química del suero lácteo “flor de Leche” SRL y la bischofita Salar de Uyuni, Bolivia.

SUERO LACTEO			BISCHOFITA		
Parámetro	Flor de Leche S.R.L.	Valores de referencia	Componente	Salar de Uyuni (% p/p)	Salar de Atacama (% p/p)
DQO	70400	64000-94000	Li	0,33	0,30–0,35
			Mg	6,36	10,84–11,45
P-PO <sub>4</sub>	140	300-379	K	0,14	0,26–0,30
			Na	0,19	0,32–0,36
NT	1010	1020-1462	Ca	5,28	0,007–0,008
			SO <sub>4</sub>	14,27	1,29–1,51
N-NH <sub>4</sub>	55	60	Cl	19,05	33,66–34,92
			B	0,33	-
pH	4,5	4,0-7,0	H <sub>2</sub> O	54,05	-

### Producción de estruvita obtenida por proceso biológico simultáneo y separado, y proceso fisicoquímico.

Actualmente la recuperación de P y N mediante la precipitación de cristales de estruvita se realiza usando procesos fisicoquímicos, si bien es altamente eficiente, su implementación es costosa debido a que requiere el empleo de reactivos y equipos especializados (Cerrillo, Palatsi, Comas, Vicens, & Bonmatí, 2015). Los resultados del proceso biológico simultáneo de cultivo y producción de estruvita muestran que los porcentajes de remoción y recuperación de P

alcanzaron del 54 y 52 % en un tiempo de 15 días; con el proceso biológico separado de cultivo y producción se alcanzó un 84 % de remoción de amonio y un 94 % de remoción y recuperación de P, en 3 días.

En comparación con la remoción y recuperación de P como estruvita mediante el proceso fisicoquímico, fue del 88 %, la producción de estruvita fue de 2,34 g/L y se alcanzó una remoción máxima de amonio de 74 %, P de 88 %, en un tiempo de 3 días. El proceso biológico separado de cultivo y producción de estruvita presentó mayor porcentaje de remoción y recuperación de P,

posiblemente se debido al incremento de la biomasa en la primera etapa y una relación de P como estruvita (Capdevielle, Sýkorová, Mg: N: P de 1,3: 1: 1, considerada como la más adecuada para garantizar la eliminación de P como estruvita (Capdevielle, Sýkorová, Biscans, Béline, & Daumer, 2013).

Proceso	pH final	Estruvita (g/L)	Remoción NH <sub>4</sub> (%)	Disminución DQO (%)	Remoción P (%)	Tiempo (días)	Recuperación P (%)	Costo de producción (Bs/kg)	Costo de producción (\$US/kg)
Biológico <sup>1</sup>	7,28	4,57±1,08	ND	4±5,6	54	15	52	1705,7	243,7
Biológico <sup>2</sup>	8,72	3,5±0,31	84	71±1	94	3	94	347,6	49,7
Fisicoquímico	8,20	2,34±0,06	74	ND	88	3	88	414,0	59,1

<sup>1</sup>Proceso biológico simultáneo de cultivo y producción  
<sup>2</sup>Proceso biológico separado de cultivo y producción  
 ND: No Determinado

### Características de los cristales de estruvita

La formación de cristales de estruvita depende de un conjunto de factores físico-químicos, a saber: pH, agitación, temperatura, tamaño de los cristales, grado de sobresaturación de los componentes y presencia de impurezas. El tamaño y la composición de los cristales de estruvita obtenidos fueron corroborados por el análisis SEM-EDS. los cristales formados en medio formulado con suero lácteo empleando el proceso biológico simultáneo de cultivo y

producción fueron de 400 – 450µm de longitud y los cristales obtenidos en medio formulado con suero lácteo en el proceso biológico separado de cultivo y producción fueron de 250 – 450 µm de longitud. El tamaño de los cristales obtenidos en este estudio es mayor respecto a cristales obtenidos en medios sintéticos reportados, de 100–300 µm de longitud (Cerrillo et al., 2015).

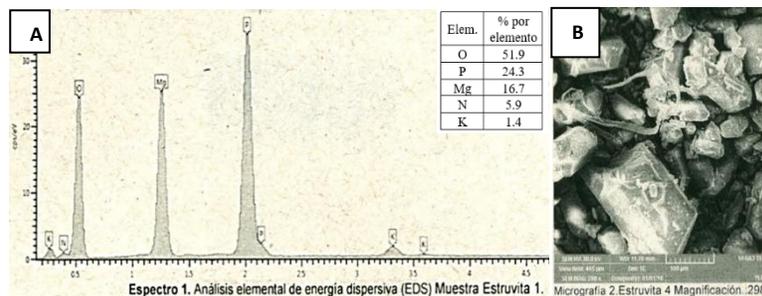


Figura 1. Composición elemental en cristales de estruvita

### CONCLUSIONES

Los máximos rendimientos de producción de estruvita y remoción de P se obtuvieron con el proceso biológico separado de cultivo y producción (5,1 g/L estruvita y 94 % P)

comparado al método fisicoquímico (2,34 g/L estruvita y 84 % P) y de acuerdo al análisis económico realizado es el método que presenta el menor costo de producción de estruvita (49,7 \$US/kg). En ese sentido, este proceso constituye un método de remoción y recuperación de P y N del suero lácteo y una

alternativa innovadora para la valorización del suero lácteo y la bischofita, subproductos industriales abundantes y de bajo costo, para la formación de estruvita.

## REFERENCIAS

- Capdevielle, A., Sýkorová, E., Biscans, B., Béline, F., & Daumer, M. (2013). Optimization of struvite precipitation in synthetic biologically treated swine wastewater - Determination of the optimal process parameters. *Journal of Hazardous Materials*, 244–245(1), 357–369.
- Cerrillo, M., Palatsi, J., Comas, J., Vicens, J., & Bonmatí, A. (2015). Struvite precipitation as a technology to be integrated in a manure anaerobic digestion treatment plant - removal efficiency, crystal characterization and agricultural assessment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 90(6), 1135–1143. <https://doi.org/10.1002/jctb.4459>
- De-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2007). Fertilizer potential of phosphorus recovered from wastewater treatments. *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*, 179–184. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5765-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5765-6_2)
- Gonzales, V., Crespo, C., & Alvarez, M.-T. (2021). Producción de estruvita mediante un proceso biológico basado en la recuperación de fósforo y nitrógeno del suero lácteo y magnesio de bischofita. Universidad Mayor de San Andre.
- Kataki, S., West, H., Clarke, M., & Baruah, D. C. (2016). Phosphorus recovery as struvite: Recent concerns for use of seed, alternative Mg source, nitrogen conservation and fertilizer potential. *Resources, Conservation & Recycling*, 107, 142–156. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2015.12.009>
- Lavanya, A., Sri, R., & Thanga, K. (2020). Effective removal of phosphorous from dairy wastewater by struvite precipitation: process optimization using response surface methodology and chemical equilibrium modeling. *Separation Science and Technology*, 00(00), 1–16. <https://doi.org/10.1080/01496395.2019.1709080>
- Li, B., Boiarkina, I., Yu, W., Huang, H. M., Munir, T., Wang, G. Q., & Young, B. R. (2019). Phosphorous recovery through struvite crystallization: Challenges for future design. *Science of the Total Environment*, 648(1), 1244–1256. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.166>
- Munch, E. V., Barr, K., & Münch, E. V., & Barr, K. (2001). Controlled struvite crystallisation for removing phosphorus from anaerobic digester sidestreams. *Water Research*, 35(1), 151–159. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00236-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00236-0)
- Sánchez-Román, M., Rivadeneyra, M. A., Vasconcelos, C., & McKenzie, J. A. (2007). Biomineralization of carbonate and phosphate by moderately halophilic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 61(2), 273–284. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00300336.x>

Universidad Mayor de San Andrés  
Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas  
Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas

La Paz – Bolivia

## Actividad antagónica de filtrados fúngicos frente a *Colletotrichum sp.*, agente causal de la Antracnosis del Mango (*Manguifera indica* L.)

Llanos, Marisol; Crespo, Carla & Álvarez, María.  
Sol2llanos@gmail.com

### Resumen

La agricultura se encuentra en constante amenaza por enfermedades y plagas. *Colletotrichum sp.* agente causal de la antracnosis, disminuye severamente la producción agrícola. El control fitosanitario emplea fungicidas químicos, que generan efectos perjudiciales a la salud humana y ambiental. Los biopesticidas constituyen una alternativa amigable para el manejo de fitoenfermedades. En el presente estudio 4 cepas fúngicas fueron seleccionadas (CP12, CP17, CP18 y CP34), clasificadas como agentes de control biológico por su actividad antagónica frente a *Colletotrichum sp.* con inhibición (60%). En cultivo líquido, se obtuvieron filtrados fúngicos con actividad antagónica leve (51- 56 %). Al realizar optimizaciones de condiciones de cultivo [fotoperiodo, agitación y suplementación del medio con glucosa y cloruro de amonio] se obtuvieron filtrados fúngicos con actividad antagónica superior (88-91 %) ( $p < 0.01$ , ANOVA;  $p < 0.05$ , Tukey test).

**Palabras clave:** *Colletotrichum sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, actividad antagónica, agentes de control biológico.

### INTRODUCCIÓN

El cambio climático es uno de los mayores problemas que enfrenta nuestro medio (Garitano-Zavala, 2016). Problemática que repercute en los ciclos naturales de los ecosistemas, provocando alteraciones en la precipitación, la temperatura y la distribución de fitopatógenos en cultivos agrícolas (FAO, 2008a; Hódar et al., 2012). La antracnosis es una fitoenfermedad que provoca extensas pérdidas económicas, por la infección de hongos del género *Colletotrichum* que afecta a diversos cultivos agrícolas (Arauz, 2000; Hoz et al., 2016; Khanzada et al., 2018). El control fitosanitario se basa en el empleo de plaguicidas químicos. Sin embargo, debido a su vasto e irracional uso, estos ocasionan efectos nocivos en la salud humana y ambiental (OMS, 2016).

Los bioplaguicidas y biofungicidas formulados a partir de metabolitos bioactivos de

microorganismos y plantas, poseen ventajas que son valoradas en el sector agrícola, al ser biodegradables y no dejar residuos nocivos en el suelo o en los frutos. Así también, estos se destacan al ser específicos y al no intervenir sobre la población de organismos benéficos (Chávez et al., 2014; Hoyos, 2011). Por tanto, el presente estudio evalúa la actividad antagónica de metabolitos producidos por cepas fúngicas, con la finalidad de proponer formulaciones que puedan ser empleadas como bioinsumos agrícolas, para reducir el desarrollo de fitopatógenos, como *Colletotrichum sp.* agente causal de antracnosis.

### MÉTODOS

#### a. Material biológico

Cepas fúngicas aisladas a partir de suelos de cultivos de quinua en el altiplano boliviano fueron evaluadas en función de su actividad antagónica como agentes de control biológico

frente a *Colletotrichum sp.* agente causal de la antracnosis en cultivos de mango.

#### **b. Estudio de agentes de control biológico (BCAs)**

Se evaluó la actividad antagónica de 35 cepas fúngicas contra *Colletotrichum sp.*, empleando la prueba de enfrentamiento dual in vitro descrita por Weller, et al. (1985). Empleando placas petri con medio PDA con dos horadaciones laterales (con 5 mm diámetro y una separación de 4 cm entre horadaciones) y se inoculó por separado en cada horadación: 75  $\mu\text{L}$  de una suspensión de  $1.5 \times 10^6$  esporas/mL de cada cepa fúngica (posibles BCA) y de *Colletotrichum sp.* Adicionalmente, para el control de crecimiento del patógeno en medio PDA con una horadación central.

Posteriormente, todos los cultivos fueron incubados a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  por siete días con fotoperiodos de 12h. La inhibición del crecimiento hifal del patógeno fue determinada mediante el porcentaje de inhibición. La actividad antagónica de las cepas fúngicas fue clasificada de acuerdo a la escala de Bell et al., (1982) y se seleccionó como agentes de control biológico (BCAs) a las cepas que presentaron un porcentaje de inhibición mayor o igual al 60%, equivalente al nivel II en la escala de Bell.

#### **c. Producción de filtrados fúngicos y evaluación de su actividad antagónica contra *Colletotrichum sp.***

La producción basal de filtrados fúngicos empleando BCAs seleccionados se realizó en cultivo batch. Para ello, un inóculo de 80  $\mu\text{L}$  de una suspensión de esporas ( $1 \times 10^6$  esporas/mL) fue suspendido en 80 mL de caldo CPD e incubado a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  por 15 días bajo las siguientes condiciones de cultivo: estanco (sin agitación) y en fotoperiodo (luz natural / oscuridad) 12 h/d. Concluido el tiempo de incubación, se recuperó el sobrenadante de cada cultivo, el cual fue procesado para su posterior evaluación de actividad antagónica contra *Colletotrichum sp.*

#### **d. Optimización de condiciones de cultivo y producción de filtrados con actividad antagónica**

La producción optimizada de filtrados fúngicos se basó en la evaluación de parámetros físicos, biológicos y químicos para inducir la producción de metabolitos bioactivos contra el desarrollo de *Colletotrichum sp.* Los parámetros físicos, se basó en evaluar el efecto de la fotoinducción [filtros de luz: luz blanca ( $\lambda$  400-750 nm), luz roja ( $\lambda$  680 nm), luz amarilla ( $\lambda$  580 nm), luz verde ( $\lambda$  520 nm), luz violeta ( $\lambda$  410 nm) y fotoperiodo (luz natural / oscuridad) 12 h/d] y agitación (120 rpm). El parámetro biológico se basó en el co-cultivo de los BCA y *Colletotrichum sp.* Los parámetros químicos, se basó en evaluar la concentración de glucosa como fuente de carbono (5, 10, 15 y 20 g/L.) y la fuente de nitrógeno (cloruro de amonio, sulfato de amonio y urea).

#### **e. Evaluación del efecto inhibitorio de extractos sobre fitopatógenos**

Concluido el tiempo de cultivo, se recuperó la parte líquida de cada cultivo y se centrifugó a 6500 rpm por 20 minutos. Posteriormente, cada sobrenadante fue filtrado a través de papel whatman N°1, membrana millipore (0.22  $\mu\text{m}$ ). La evaluación de su actividad antagónica contra *Colletotrichum sp.* fue realizada de acuerdo a la técnica de vertido en placa de Sivan et al., (1984). En placas petri se preparó una mezcla entre cada filtrado fúngico y PDA en una relación de 1:1 (v/v). Al realizar una horadación central de 5 mm de diámetro e inoculó 75  $\mu\text{L}$  de una suspensión de esporas ( $1 \times 10^6$  esp/mL) de *Colletotrichum sp.* e incubadas a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  por 15 días.

#### **f. Efecto de la concentración de filtrados fúngicos y su actividad antagónica**

Adicionalmente, a la evaluación de las condiciones de cultivo optimas, se evaluó la actividad inhibitoria de los filtrados fúngicos al emplear una dilución de los mismos al realizar la técnica de vertido en placa diluciones:  $\frac{1}{2}$ ;  $\frac{1}{4}$  y  $\frac{1}{8}$ . Asimismo, se comparó su actividad

inhibitoria con un fungicida agrícola Ramcaf® (4 g/L) en PDA. La actividad antagónica de filtrados fúngicos se estimó a través del porcentaje de inhibición.

### g. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados empleando un análisis de varianza con un valor de significancia de  $p < 0,01$  y comparación múltiple: Test de Tukey con un valor de significancia de  $p < 0,05$ . Empleando el software de GraphPad InStat (Versión 6.01, GraphPad Software Inc.). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y los resultados que se presentan corresponden a la media y  $\pm$  desviación estándar.

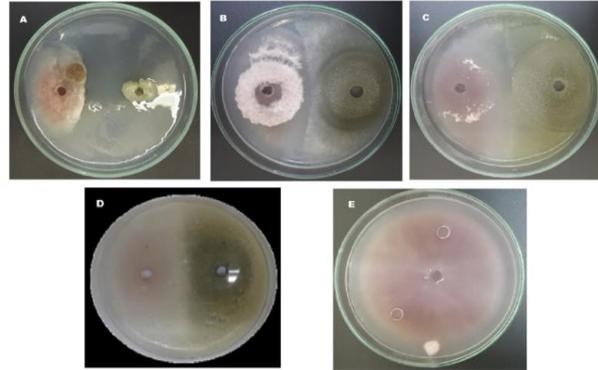
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### a. Cepas fúngicas con actividad antagónica directa frente a *Colletotrichum sp.*

En el presente estudio se evaluó el potencial de 35 cepas fúngicas viables, como potenciales agentes de control biológico del patógeno fúngico *Colletotrichum sp.* para ello se empleó la técnica de enfrentamiento dual como prueba directa para seleccionar a cepas fúngicas como BCAs, obteniendo resultados variables con porcentajes de inhibición entre el 22 y el 70% contra *Colletotrichum sp.* Consiguientemente, los datos obtenidos fueron clasificados según la escala de Bell, la cual emplea cinco niveles de inhibición para la selección de BCAs potenciales (Bell et al., 1982).

De acuerdo a la escala de Bell se seleccionaron 4 cepas fúngicas con actividad inhibitoria óptima, nivel II. Las cepas: CP12, CP17, CP18 y CP34, las cuales presentaron porcentajes de inhibición entre el 60 y 70% contra el desarrollo del fitopatógeno *Colletotrichum sp.* Por otro lado, las cepas fúngicas restantes presentaron una actividad inhibitoria leve (59 – 40 %) y deficiente (39 – 22%). Asimismo, en las placas de enfrentamiento dual de las cepas seleccionadas CP12, CP17, CP18 y CP34 se

observó dos posibles mecanismos antagónicos: la antibiosis desarrollada por la cepa CP34, que se caracteriza por la inhibición a distancia del crecimiento y desarrollo de *Colletotrichum sp.* (Fig. 1A) y la competencia desarrollada por las cepas CP18, CP17 y CP12.



**Figura 1.** Actividad antagónica directa de cepas fúngicas contra *Colletotrichum sp.*: **A.** CP34 inhibe a *Colletotrichum sp.* sin contacto directo (antibiosis), **B, C, D.** Cepas CP12, CP17 y CP18 inhiben a *Colletotrichum sp.* a través de mecanismos de competencia. **E.** *Colletotrichum sp.* (control de crecimiento).

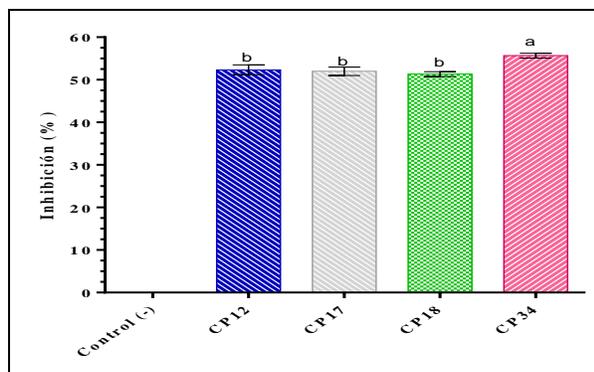
En el presente estudio, se observó una mayor actividad antagónica empleando la cepa CP34, presentando un porcentaje de inhibición del 70% frente al desarrollo micelial de *Colletotrichum sp.* De acuerdo a la figura 6A, se observa la ausencia de contacto directo entre la cepa CP34 y *Colletotrichum sp.* Cabe recalcar que las cepas seleccionadas en este estudio CP12, CP17, CP18 y CP34; potenciales BCAs son hongos filamentosos, clasificados anteriormente como *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.* (Cardenas, 2016); géneros que han sido ampliamente reportados por su capacidad de producir una variedad de metabolitos secundarios.

### b. Actividad antagónica de filtrados fúngicos frente a *Colletotrichum sp.*

Los filtrados fúngicos presentaron actividad antagónica frente a *Colletotrichum sp.*, obteniendo porcentajes de inhibición entre el 51 y 56% (figura 2). Por lo cual, los resultados

de actividad antagónica moderada (porcentaje de inhibición mayor o igual al 60 %; nivel II según la escala de Bell) obtenidos al emplear los filtrados de *Aspergillus sp.* CP12, CP17, CP18 y *Penicillium sp.* CP34 son comparables a los ya reportados en otros estudios y albergan la posibilidad de ser empleados potencialmente en contra de *Colletotrichum sp.* Sin embargo, cabe notar que las condiciones de cultivo para la obtención de los mismos pueden afectar su producción y por tanto su actividad antagónica contra el patógeno.

A través de la optimización de las condiciones de cultivo, los filtrados fúngicos presentaron mayor actividad antagónica frente a *Colletotrichum sp.* al evaluar el efecto de la agitación y el fotoperíodo obteniendo porcentajes de inhibición mayores al 70%. Del mismo modo, al evaluar parámetros químicos como la concentración de glucosa y la fuente de nitrógeno. Los filtrados fúngicos de los cultivos suplementados con 20 g/L glucosa y 19, 11 g/L cloruro de amonio en el medio, presentaron porcentajes de inhibición mayores entre el 88 al 91 % frente a *Colletotrichum sp.* para las cepas *Aspergillus sp.* CP17 y *Penicillium sp.* CP34. Siendo este la formulación óptima para obtener mayor actividad antagónica frente al patógeno. Por otro lado, el co-cultivo de los BCAs con *Colletotrichum sp.*, reveló porcentajes de inhibición menores en comparación a los obtenidos en cultivos axénicos. Por tanto, siendo descartada como condición de cultivo óptimo.

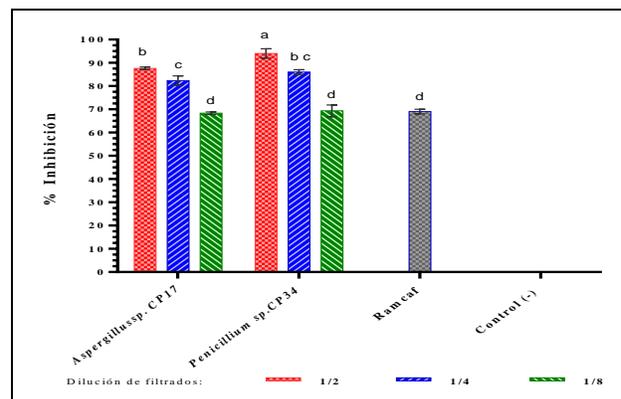


**Figura 2.** Actividad antagónica de filtrados fúngicos producidos en cultivo batch a  $27\pm 1^\circ\text{C}$

por 15 días de BCAs (*Aspergillus sp.* CP12, CP17, CP18 y *Penicillium sp.* CP34) frente a *Colletotrichum sp.* durante 15 días de incubación, empleando la técnica de vertido en placa (dilución 1:2, v/v). Las líneas verticales representan la desviación estándar de tres replicas. Las letras no comunes indican agrupaciones con diferencia significativa en el Test de Tukey ( $p < 0.05$ )

### c. Actividad antagónica a diferentes concentraciones de los filtrados fúngicos frente a *Colletotrichum sp.*

En la figura 3, se observa la actividad antagónica de los filtrados fúngicos de las cepas de *Aspergillus sp.* CP17 y *Penicillium sp.* CP34. Los porcentajes de inhibición variaron entre 88 al 94 % empleando una dilución 1:2; de 82 al 86 % empleando una dilución 1:4 y por último entre 67 al 69 % al emplear una dilución 1:8, presentando diferencia estadísticamente significativa respecto al control negativo (*Colletotrichum sp.* desarrollado en ausencia de filtrados de BCAs) y con el fungicida agrícola Ramcaf® (Control positivo).



**Figura 3.** Actividad antagónica de filtrados fúngicos de las cepas *Aspergillus sp.* CP17, *Penicillium sp.* CP34 y fungicida agrícola Ramcaf® frente al desarrollo de *Colletotrichum sp.*

Durante 15 días de cultivo. Ensayo realizado con la técnica de vertido en placa: dilución 1:2; 1:4 y 1:8 (v/v). Las líneas verticales

representan la desviación estándar de tres replicas. Las letras no comunes indican agrupaciones con diferencia significativa para el Test de Tukey ( $p < 0.05$ ). Control negativo (-): *Colletotrichum* sp. cultivado en PDA en ausencia de BCAs

## CONCLUSIONES

En el presente estudio, cuatro cepas fúngicas: *Aspergillus* sp. CP12, CP17 y CP18, y *Penicillium* sp. CP34 fueron seleccionadas como BCAs por su actividad antagonista frente a *Colletotrichum* sp., presentando porcentajes de inhibición mayores al 60%. A través de la optimización de condiciones de cultivo de los BCAs seleccionados, se determinó que las condiciones de cultivo óptimas para la obtención de filtrados fúngicos con mayor actividad antagonista es el fotoperiodo, agitación y suplementación del medio con glucosa y cloruro de amonio al presentar porcentajes de inhibición entre el 88-91 % frente a *Colletotrichum* sp.

## REFERENCIAS

- Garitano-Zavala, A. (2016). Desarrollo Urbano Sostenible Una visión desde la Biología.
- FAO. (2008a). Conferencia de Alto Nivel sobre la Seguridad Alimentaria Mundial: Los Desafíos del Cambio Climático y la Bioenergía. Fao.org. <http://www.fao.org/foodclimate/expert/em3/narrative-em3/es/>
- Hódar, J. A., Zamora, R., & Cayuela, L. (2012). Cambio climático y plagas: Algo más que el clima. *Ecosistemas*, 21(3), 73-78. <https://doi.org/10.7818/ECOS.2012.21-3.09>
- Arauz, L. F. (2000). Mango Anthracnose: Economic Impact and Current Options For Integrated Management. *Plant Disease*, 84(6), 600-611. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.6.600>
- Hoz, C. J. P.-D. la, Calderón, C., Rincón, A. M., Cárdenas, M., Danies, G., López-Kleine, L., Restrepo, S., & Jiménez, P. (2016). Species from the *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum boninense* and *Colletotrichum gloeosporioides* species complexes associated with tree tomato and mango crops in Colombia. *Plant Pathology*, 65(2), 227-237. <https://doi.org/10.1111/ppa.12410>
- Khazada, M. A., Ansari, A., Rajput, M. A., Maitlo, S., Rajput, A. Q., & Ujjan, A. A. (2018). Effect of different abiotic factors on the growth and sporulation of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose of mango. *Plant Protection*, 2(1), 23-30.
- OMS. (2016). OMS | ¿Residuos de plaguicidas en los alimentos? WHO; World Health Organization. <http://www.who.int/features/qa/87/es/>
- Chávez, G., Tenorio, R., Mamani, M., Crespo, C., Espinal, C., & Alvarez, M. (2014). Potencial de cepas fúngicas aisladas en el área de Biotecnología Fúngica. Segunda parte: Biocontroladores fúngicos. *Revista CON-CIENCIA*, 2(1), 49-55.
- Hoyos, Carvajal Liliana. (2011). Enfermedades de planta: Control Biológico -. <http://www.etp.com.py/fichaLibro?bookId=83931>
- Weller, DM, Zhang, BX, & Cook, RJ. (1985). Application of a rapid screening test for selection of bacteria suppressive to take-all of wheat. *Plant Disease*, 69, 710-713.
- Bell, DK, Wells, HD, & Markham, CR. (1982). Antagonismo in vitro de especies de *Trichoderma* contra seis patógenos fúngicos de plantas. *Phytopathology*, 72(4), 379-382.
- Cardenas, O., M., M. ., M. (2016). Estudio de las comunidades fúngicas en suelos de cultivos de Quinoa (*Chenopodium quinoa*)

del altiplano norte, central y sur de una  
gestión agraria (Final). Instituto de

Investigaciones Fármaco Bioquímicas.

Universidad San Francisco Xavier de Chuquisaca  
Facultad de Ingeniería

**Sucre – Bolivia**

## **Obtención de Nanopartículas de Óxido de Hierro Procedente de Viruta con Tecnología Bottom - Up**

*Torres Espada Juan Simón <sup>1</sup>  
Av. Jaime Mendoza 1202 Sucre – Bolivia  
Tel: 591-46454714;  
Email: torresespada@g.mail.com*

### **Resumen**

Esta investigación muestra los resultados del reciclado de viruta de hierro fundido y su transformación en nanopartículas de óxido de hierro mediante tecnología bottom-up, por vía electroquímica. Las nanopartículas obtenidas tienen un contenido de hierro de 99.43 %, un tamaño en el rango de 40 y 200 nanómetros, de forma redondeada y regular, fueron aplicadas en la remediación de aguas contaminadas con metales pesados proveniente de ingenios mineros, se pudo remover cadmio en un porcentaje de 84,27 luego el plomo en un porcentaje de 4,42 y el zinc en un porcentaje de 92,74.

También se aplicó en remediación de aguas subterráneas naturales contaminadas con arsénico con capacidad de adsorción 38% para el Arsénico (III). Esta capacidad es bastante superior a las arenas recubiertas con óxido férrico (0,32 a 0,64 mg/g), lo cual es bastante promisorio.

**Palabras clave: viruta, reciclado, bottom-up, deposición electroquímica, nanopartículas de óxido de hierro.**

### **Abstract**

This research shows the results of the recycling of cast iron chips and their transformation into iron oxide nanoparticles using bottom-up technology, via electrochemistry. The nanoparticles obtained have an iron content of 99.43%, a size in the range of 40 and 200 nanometers, rounded and regular, were applied in the remediation of water contaminated with heavy metals from mining mills, cadmium could be removed in a percentage of 84.27 then lead in a percentage of 4.42 and zinc in a percentage of 92.74. It was also applied in remediation of natural groundwater contaminated with arsenic with adsorption capacity 38% for Arsenic (III).

This capacity is much higher than sands coated with ferric oxide (0.32 to 0.64 mg/g), which is quite promising.

**Keywords: chip, recycling, bottom-up, electrochemical deposition, iron oxide nanoparticles.**

## **INTRODUCCIÓN**

La industria metalmeccánica utiliza para la fabricación de piezas y partes metálicas el proceso de mecanizado por arranque de viruta, que produce una gran cantidad de desperdicio en la transformación de materiales

metálicos en productos terminados, el material es arrancado o cortado con una herramienta de corte (Tschätsch, 2009).

El proceso de mecanizado está bastante extendido sin embargo el aprovechamiento del material es bajo, ya que las dimensiones de la pieza en bruto o lingote deben corresponder a

medidas mayores a la pieza a fabricar. Cuando se comparan los pesos de la pieza terminada y de la pieza en bruto, se puede observar que entre el 40 al 80% del peso del lingote se elimina en viruta dependiendo de la forma de la pieza. (Tschätsch, 2009). La productividad del proceso de transformación por mecanizado está en relación directa con la producción de la viruta, por lo tanto, a mayor producción de piezas se tiene una mayor producción y volumen de viruta.

El mecanizado por arranque de viruta ha sido un componente importante de la fabricación mundial del siglo XX y lo seguirá siendo en el siglo XXI, esto lo confirma la creciente demanda y producción de máquinas y herramientas para este proceso en la última década. De hecho, ambos aspectos representan un componente importante del producto interno bruto de un país y es un indicador del bienestar de la economía de un estado (ICEX, 2013).

En la actualidad la demanda del mercado exige la producción industrial en masa para lo cual se han desarrollado máquinas de control numérico computarizado (CNC), que permiten una mayor producción de piezas en un menor tiempo y por lo tanto también la generación de mayor volumen de viruta (Martínez, 2008)

Otro factor importante a considerar es que, en el proceso de mecanizado por arranque de viruta, se utilizan fluidos de corte tales como aceites de corte o taladrinas, para refrigeración y lubricación del proceso, que se mezclan con la viruta, si no son tratados por centrifugación u otros métodos normalmente contienen de 20 a 30% de fluido de corte, por lo cual puede ser considerado como residuo peligroso si llega al suelo o se vierte en los vertederos. (IHOBE, 2012)

La viruta de hierro fundido procedente del proceso de mecanizado es un desperdicio y contamina el medio ambiente, pero podría ser valorizado mediante la conversión en una fuente potencial para la generación de nanopartículas para la remediación de aguas y suelos contaminados.

El proceso de reutilización de la viruta de hierro fundido, abre las posibilidades de obtener nano partículas de óxido de hierro con alto valor agregado para diferentes aplicaciones en nanotecnología, además que en su procesamiento pueden obtenerse subproductos para diversas aplicaciones.

Proponemos producir nanopartículas de óxido de hierro a través del método bottom-up con características de talla, propiedades físicas y químicas que permitan su aplicación económica y competitiva, en el campo de la remediación de aguas contaminadas, que permitirá la reducción de la contaminación ambiental.

En la presente investigación se realizó el reciclado de la viruta de hierro fundido mediante la tecnología bottom-up obteniéndose nanopartículas de óxido de hierro para diferentes aplicaciones en nanotecnología, especialmente en la remediación de aguas y suelos contaminados, además que en su procesamiento pueden obtenerse subproductos para diversas aplicaciones. Así mismo se estableció el procedimiento óptimo de transformación de viruta de hierro fundido procedente del mecanizado en nanopulvo de óxido de hierro, por vía electroquímica.

Se realizaron los ensayos y pruebas adecuadas para la caracterización y verificación de la calidad de las nanopartículas obtenidas. Finalmente se evaluó la eficiencia del proceso en la producción y su posibilidad de escalamiento a nivel industrial.

## MÉTODO Y MATERIALES

La metodología aplicada para la obtención de nanopulvo de óxido de hierro fue la tecnología bottom-up por vía electroquímica en una celda electrolítica con una solución de agua destilada y sulfato de hierro, entre el cátodo (placa de acero inoxidable) y ánodo (barra conductora de micropartículas de hierro de 45  $\mu\text{m}$  compactado) se aplicó corriente eléctrica con una tensión en corriente continua, dando lugar a una deposición y acumulación de

nanopartículas de óxido de hierro en las placas del cátodo y en el fondo de la cuba.

### Producción de nanopartículas de óxido de hierro

Se usó micropartículas de hierro de 45  $\mu\text{m}$  obtenidas por triturado y tamizado con

tecnología top-down a partir viruta de hierro fundido, la que fue recolectada de empresas metalmeccánicas y rectificadoras del medio. El tamaño y la forma de la viruta de hierro fundido es muy variado, su característica principal es la de ser fraccionada y discontinua en tamaños entre 1 a 15 mm, y ángulos de torsión de 0 a 180 grados con una consistencia frágil.



**Figura 1. Tamiz de malla MESH 325 para la obtención de polvo fino de hierro de 45  $\mu\text{m}$  (Fuente: producción propia)**

La preparación de polvo fino de hierro de 45  $\mu\text{m}$  consistió en realizar una selección minuciosa para evitar la presencia de materiales extraños para lo cual se utilizó electroimanes que permiten seleccionar solo lo metálico.

Una vez clasificadas las micropartículas de hierro de 45  $\mu\text{m}$  se procedió a la compactación en troqueles de acero SAE 1045 tratados

térmicamente, contruidos especialmente para este propósito, se rellenó los troqueles con polvo fino de hierro de 45  $\mu\text{m}$ , al cual se sumergió un hilo conductor de cobre para facilitar la conexión eléctrica. En una prensa hidráulica el polvo fino de hierro fue comprimido a una presión de 200 Bar, para la obtención de barras conductoras o ánodos de sección circular con un diámetro de 17 mm y 50 mm de longitud, como se muestra en la Fig.2.



**Figura 2a. Troqueles de acero SAE 1020**



**Figura 2b. Barras conductoras obtenidas por compresión**

(Fuente: producción propia)

que se armaron 14 cátodos y 12 ánodos con una distancia entre los mismos de 1 cm de forma alternada.

Las características de la prensa hidráulica (Fig.3) son:

Presión de trabajo máx.: 400 bares

Diámetro externo del pistón: 90 mm

Accionamiento de la bomba hidráulica con motor eléctrico:

Potencia del motor: 3.5 kW

Recorrido útil: 300 mm

Como cátodo se utilizaron láminas de acero inoxidable AISI 316 de dimensiones 5x5 cm, y 1.5 mm de espesor. Se construyó una cuba de vidrio de dimensiones 370x150x110 mm en la



**Figura 3. Prensa hidráulica para compresión del polvo fino de hierro en los troqueles de acero SAE 1045 (Fuente: producción propia)**



**Figura 4. Cuba electrolítica de 370x150x110 mm (Fuente: producción propia)**

Como electrolito se usó una solución de 16 gr. Sulfato de amonio ferroso (sal de Mohr)  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  por litro de agua destilada ( $\text{H}_2\text{O}$ ).

El circuito eléctrico se instaló con una fuente de alimentación o transformador monofásico con relación de 220/12 V de corriente alterna a corriente continua e interruptor de paso.

Después de un periodo de aplicación de 10 horas se contabilizó la producción de 50 gr. con un rendimiento promedio de 5,0 gr/Hr.

Recolección de nanopartículas de óxido de hierro

Una vez terminada cada prueba se procedió al secado de los cátodos en una estufa eléctrica a temperatura de 100°C posteriormente se rasparon los cátodos con una paleta en un recipiente con base magnética, las nanopartículas de óxido de hierro quedaron atrapadas también en la base del recipiente procediéndose de la misma manera.



**Figura 5. Deposición y acumulación de nanopartículas de óxido de hierro en las placas del cátodo y en el fondo de la cuba. (Fuente: producción propia)**

Determinación de la composición de las nanopartículas de óxido de hierro.

Los componentes presentes en las muestras de nanopartículas de óxido de hierro fueron determinados mediante el método de espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) en un equipo de las siguientes características: Equipo portátil de Fluorescencia de Rayos X Nombre del equipo: X-RAYFLUORESCENCE SPECTROMETER, MARCA ELVAX Modelo: CEP-01AAEC412131001 Marca Proespector LE se opera mediante iPaQ integrada, con software en ambiente Windows con señales tanto luminosas como auditivas.

Determinación del tamaño de las nanopartículas de hierro

La determinación del tamaño de las nanopartículas de óxido de hierro se realizó en un equipo de las siguientes características:

Microscopio electrónico de barrido; Scanning Electron Microscope (SEM)

Marca del instrumento de medida: JEOL (field emission cannon JSM 7900f)

Capacidad de aumentos: 500X a 200000X en ampliación de la imagen

Detector: Upper Electron Detector (UED); tensión de aceleración i.e. 1.00 kV

Mode Gb = Electron type

El procedimiento experimental seguido para este proceso consistió en:

Preparación de la muestra con los siguientes pasos:

1. Deposición de los polvos a observar en pequeñas placas de silicona recubiertas de oro.
2. Eliminación de grumos y exceso de polvo soplando aire con una pipeta
3. Metalización de los polvos con 15 nm de oro para repararlos y evitar la contaminación de la cámara del microscopio.

## RESULTADOS

Las nanopartículas de óxido de hierro fueron obtenidas mediante el proceso electroquímico a partir de micro partículas de 45  $\mu\text{m}$  de viruta procedente del proceso de mecanizado.

En el proceso electroquímico se determinó que la producción y el rendimiento mejoran sustancialmente al aumentar el número de electrodos y la tensión aplicada entre los mismos, alcanzándose una producción de 50 gr en un tiempo de 10 Hr. con un rendimiento de 5,0 gr/Hr.

Los componentes presentes en las muestras de nanopartículas de óxido de hierro fueron determinados mediante el método de espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS). Los resultados obtenidos se detallan en la Fig. 6.

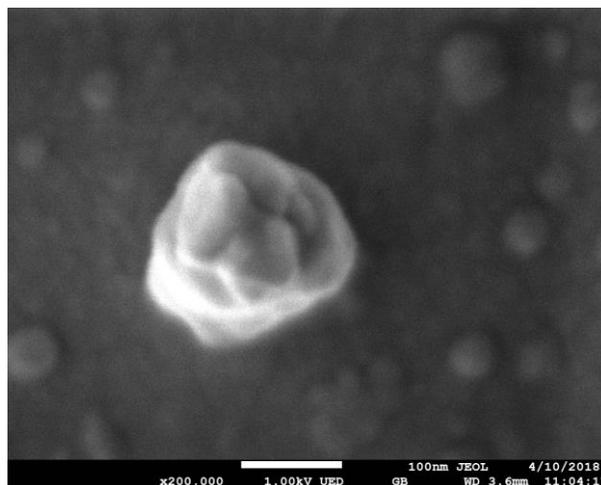


**Figura 6. Composición química de nanopartículas de óxido de hierro. (Fuente: producción propia)**

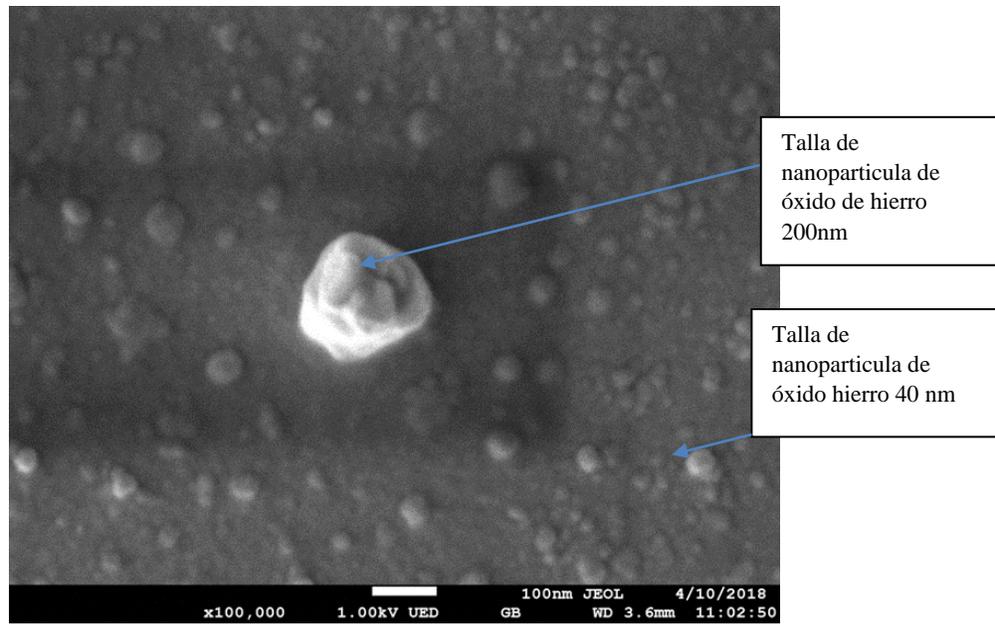
El contenido de hierro es de 99,43%, el resto de los componentes es próximo a cero.

El tamaño de las nanopartículas se determinó en un Microscopio electrónico de barrido (SEM) de 100000X de aumento se observaron

nanopartículas con una morfología regular, en forma de esferas que se distribuyen regularmente sobre la superficie con una talla de 40 a 200 nanómetros.



**Figura 7. Imagen de nanopartículas de óxido de hierro observadas con aumento de 200.000X Fuente: Lab. Nanomateriales Uni. La Salle - Francia)**



**Figura 9. Imagen de nanopartículas de óxido de hierro observadas con aumento de 100.000X Fuente: Lab. Nanomateriales Uni. La Salle - Francia)**

Según el el trabajo de proyecto de grado para optar título de licenciado en ingeniería química de la postulante Silvia Eugenia Quispe Céspedes titulado “Remoción de metales pesados zinc, cadmio y plomo de las aguas de copajira provenientes de la mina siglo XX, mediante nanopartículas de óxido de hierro”

Se obtuvieron los siguientes resultados, en el cual se aplicaron las nanopartículas obtenidas, se pudo remover uno de los metales más pesados como el cadmio en un porcentaje de 84,27 luego el plomo en un porcentaje de 4,42 y el zinc en un porcentaje de 92,74 y cuyo resultado se muestra en la siguiente Tabla 1.

**Tabla 1 Resultados de remoción de metales (Quispe, 2019)**

PARÁMETROS	RESULTADOS						REFERENCIA*	
	Prueba -1 Inicial	P <sub>Remoción</sub> -1 Final	Prueba -2 Inicial	P <sub>Remoción</sub> -2 Final	Prueba -3 Inicial	P <sub>Remoción</sub> -3 Final	Mínimo	Máximo
Zinc (mg/L)	613,9	44,55	858,6	0,127			-----	3,0
Plomo (mg/L)	0,871	0,83	1,76	0,943	1,419	0,563	-----	0,6
Cadmio (mg/L)	30,48	4,81	35,4	0,02			-----	0,3

Aplicación de nanopartículas de óxido de hierro y hierro en aguas subterráneas contaminadas con arsénico con las siguientes características: calidad del agua sin tratar es relativamente dulce, de conductividad moderada a baja, salinidad baja, bajo contenido de aniones competitivos con el

arsénico para remoción por adsorción sobre la superficie de las nanopartículas; i. e. nitratos, sulfatos cloruros y bicarbonatos. El arsénico se encuentra presente en el agua en forma de arsenitos, As (III). Esta especie es más difícil de adsorber que el arseniato, As (V).

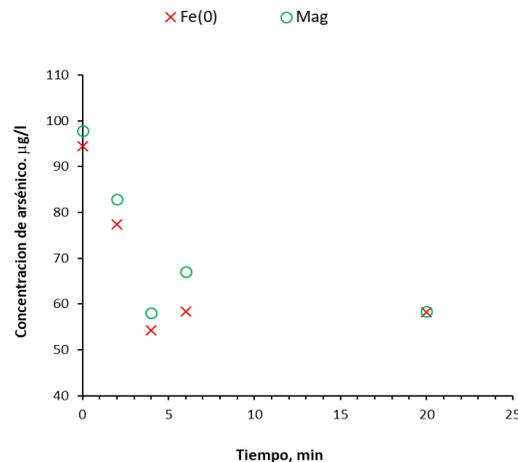
**Tabla 2. Análisis de la calidad de las aguas subterráneas tratadas  
RESULTADOS DE LABORATORIO**

Parámetro	Unidad	Método de análisis	Límite de cuantificación	Resultado	Norma Boliviana 512	Observaciones
Arsénico	µg-As/L	SMWW 3125 B. ICP/MS	0,06	113	10	No satisface

En pruebas realizadas el 6 de mayo de 2022 (Escalera R.) en pozos de agua contaminados con arsénico se tuvieron los siguientes resultados:

**Tabla 3. Resultados de prueba de adsorción sobre nano partículas de hierro metálico, Fe(0) y magnetita, FeO.Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Concentración de nano partículas = 10 mg/l (Escalera R.)**

Tiempo, min	Concentración de arsénico, □g-As(III)/l, Fe(0)	Concentración de arsénico, □g-As(III)/l, Magnetita	Capacidad de adsorción, mg-As(III)/g. Fe(0)	Capacidad de adsorción, mg-As(III)/g. Magnetita	% remoción de As(III), Fe(0)	% remoción de As(III), Magnetita
0	94,44	97,73	0	0	0%	0%
2	77,34	82,85	1,71	1,49	18%	15%
4	54,29	58,00	4,02	3,97	43%	41%
6	58,37	66,99	3,61	3,07	38%	31%
20	58,27	58,40	3,62	3,93	38%	40%



**Figura 10. Resultados de prueba de adsorción sobre nano partículas de hierro metálico, Fe(0) y magnetita, FeO.Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Concentración de nano partículas = 10 mg/l (Escalera R.)**

Estos resultados nos muestran que las nanopartículas de óxido de hierro, son aptas y eficientes para la remediación de aguas contaminadas por metales pesados procedentes de ingenios mineros existentes en diferentes zonas mineras de Bolivia

## DISCUSIÓN

Los resultados de la investigación experimental indican que las nanopartículas obtenidas tienen un contenido de óxido de

hierro de 99,43% con ausencia de metales pesados y un tamaño que está en el rango entre 40 y 200 nanómetros con una morfología regular en forma de esfera distribuidas regularmente sobre la superficie especialmente los de 40nm, estas características permiten su aplicación en el campo de la remediación de aguas residuales industriales contaminadas con cromo, mercurio, arsénico, vanadio y otros metales pesados.

En el artículo Structural, optical, electrical and dielectrical properties of electrosynthesized nanocrystalline iron oxide thin films (S.S. Kulkarni, 2003) se detalla la obtención por electrodeposición de una película delgada de óxido de hierro nanocristalino sobre sustrato de acero inoxidable a partir de un baño de sulfato alcalino, como ánodo se utilizó grafito puro. En el presente proyecto se siguió el mismo procedimiento con la diferencia de que el material de origen es viruta metálica de hierro fundido procedente del mecanizado de piezas, considerado como desperdicio contaminante.

La utilización de nanomateriales de óxido de hierro ha recibido mucha atención debido a su propiedad única, como alta relación de área de superficie a volumen, modificabilidad de la superficie, excelentes propiedades magnéticas y gran biocompatibilidad. Los nanomateriales de óxido de hierro son nanosorbentes eficientes para metales pesados y orgánicos contaminantes son las aplicaciones más atractivas y exitosas. (Xu, 2012 ).

Por otra parte, algunos autores indican que las nano partículas de hierro no ejercen efectos tóxicos en la comunidad bacteriana acuática de ríos. (Gheju, 2017)

En el artículo “El biogás del futuro se alimenta de hierro” de la revista BIOTECH dice: “Uno de los descubrimientos más destacados de esta investigación liderada por el profesor ICREA Víctor Puentes, del ICN2, y el doctor Antoni Sánchez, de la UAB, fue que las nanopartículas de óxido de hierro que llegan a las depuradoras no sólo no eran tóxicas para los microorganismos, sino que aumentaban dramáticamente la producción de biogás”.

La remediación de aguas contaminadas por metales pesados procedente de ingenios mineros a través de nanopartículas de óxido de hierro obtenidas a partir de viruta de hierro, en la presente investigación se constituye en potencial recurso en la protección del medio ambiente.

Del análisis de costo de producción de nanopartículas de óxido de hierro a partir de viruta de hierro fundido se evidencia que en comparación al producto importado es muy conveniente en términos de costo-beneficio debido a que alcanza a un 30% menos del precio internacional nanopartículas(\$86/100g) (US Research Nanomaterials, Inc., 2017).

Por otra parte, con la producción de nanopartículas de óxido de hierro a partir de viruta de hierro fundido es posible reducir la cantidad de viruta a nivel departamental y nacional.

## CONCLUSIONES

Mediante la presente investigación se logró obtener nanopartículas de hierro con talla comprendida entre 40 y 200 nanómetros y pureza de 99,43% utilizando la tecnología bottom-up conseguido con equipo diseñado y construido específicamente para este propósito, la metodología desarrollada permite una producción competitiva y factible de escalamiento a gran escala con costos muy accesibles.

El aporte de la investigación radica fundamentalmente en la obtención de nanopartículas de óxido de hierro a partir de viruta de hierro fundido, que puede ser aplicado en la remediación de aguas contaminadas con metales pesados especialmente en las zonas en las que existe explotación minera, y agua subterránea natural contaminada con arsénico presente en varias zonas de en Bolivia.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Víctor Acha y los laboratorios de la universidad La Salle Francia por la colaboración en el análisis de las muestras de nanopartículas de hierro obtenidas. Al Ing. Gonzalo Benito Pérez Serrudo Director de Ingeniería Química y sus colaboradores.

## BIBLIOGRAFIA

- AMBIENTE, M. D. (2015). *tecnología top down*". Sucre: MMAyA/VAPSB/DGGIRS/ Programa UMSFXCH.  
*Plurinacional de Gestión Integral de Residuos Sólidos/2011-2015*. LA PAZ.
- Anjum, N. A. (2017). Enhancing Cleanup of Environmental Pollutants. *Enhancing Cleanup of Environmental Pollutants*.
- Ayaviri, A. (2019). *TRATAMIENTO DE AGUAS CONTAMINADAS PROCEDENTE DE LOS INGENIOS MINEROS UTILIZANDO NANO PARTÍCULAS DE HIERRO*. Sucre.
- BANCO MUNDIAL. (2016). *A Global Review of solid waste Management*, 1-3.
- Bhada-Tata, D. H. (2012). WHAT A WASTE A Global Review of Solid Waste Management. *Urban Development Series - The World Banck*, 19-21.
- Bhateria, R. (2019). A review on nanotechnological application of magnetic iron oxides for heavy metal removal. *Journal of Water Process Engineering*, 1-10.
- Biswas, A. (2020). Synthesis of Highly Magnetic Iron Oxide Nanomaterials from Waste Iron by One-step Approach. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 1-29.
- C. Pascal, J. L. (1999). Electrochemical Synthesis for the Control of  $\zeta$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanoparticle Size. Morphology, Microstructure, and Magnetic Behavior. *American Chemical Society*, 141-147.
- Cao, W. (2016). *Synthesis of Nanomaterials by High Energy Ball Milling*. Recuperado el 2017, de <http://www.ssnano.com>, wcao@ssnano.com.
- Conde, P. (2018). *Tratamiento experimental de aguas contaminadas por cromo (VI) mediante el uso de partículas de hierro obtenidas del reciclaje de viruta por la*
- Devotta, A. (2015). Quantitative characterization of chip morphology using computed tomography in ortogonal turning process. *CIRP Conference Intelligent computation in manufacturing Engeniering*, 299-304.
- Donya Ramimoghadam, S. B. (29 May 2014). Progress in electrochemical synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 227-229.
- Fouda, M. F. (2012). Synthesis and Characterization of Nanosized Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Pigments. *International Journal of Inorganic Chemistry*, 3-12.
- Gheju, M. (2017). Decontamination of Hexavalent Chromium-Polluted Waters Significance of Metallic Iron Technology. *Enhancing Cleanup of Environmental Pollutants - Springer*, 210-230.
- Gonçalves, J. R. (2016). The Soil and Groundwater Remediation with Zero Valent Iron Nanoparticles. *Procedia Engineering*, 1268–1275.
- Guillermo, Q. M. (2012). *Gestion ambiental de residuos solidos*. Latinas editores Ltda.
- Hasany, S. F. (2012). Systematic Review of the Preparation Techniques of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles. *Nanoscience and Nanotechnology*, 148-158.
- ICEX. (2013). El mercado de la maquina herramienta en Argentina (ICEX. Oficina Económica y Comercial de la Embajada de España en Buenos Aires, 2013). *Notas sectoriales*, 10-13.
- IHOBE Sociedad Publica Gestion ambiental. (Julio de 2012). [www.ihobe.net](http://www.ihobe.net). Recuperado el 2017

- Jorge E. Muñoz, J. C. (9 May 2007). Iron nanoparticles produced by high-energy ball milling. *Researchgate*, 946-950.
- Lakshmanan, R. (2013). Effect of magnetic iron oxide nanoparticles in surface water treatment: Trace minerals and microbes. *Bioresource Technology*, 612-615.
- R.A. Crane, T. S. (2011). Nanoscale zero-valent iron: Future prospects for an emerging water treatment technology. (E. B.V., Ed.) *Journal of Hazardous Materials*, 113-119.
- Řehoř, J. (2016). Morphology of chip formation at orthogonal high speed milling of AISI H13. *Key Engineering Materials*, 45-50.
- S.S. Kulkarni. (2003). Structural, optical, electrical and dielectrical properties of electrosynthesized nanocrystalline iron oxide thin films. *Materials Chemistry and Physics*, 151–156.
- T. Shahwana, \*. S. (2011). Green synthesis of iron nanoparticles and their application as a Fenton-like. *Chemical Engineering Journal*, 259-260.
- Tschätsch, H. (2009). *Applied Machining Technology*. 01309 Dresden: Springer Dordrecht Heidelberg London New York.
- US Research Nanomaterials, Inc. (2017). <http://www.us-nano.com/inc/sdetail/594>. Obtenido de Service@us-nano.com.
- Weile Yan, \*. H.-L.-x. (2013). Iron nanoparticles for environmental clean-up: recent developments and future outlook. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 63-64.
- Wei-xian Zhang, D. W. (2006). Applications of Iron Nanoparticles for Groundwater Remediation. *REMEDIATION Spring 2006 - Wiley Periodicals, Inc.*, 7-12.
- Xu, P. (2012). Use of iron oxide nanomaterials in wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 1–10.
- Yan, W. (2013). Iron nanoparticles for environmental clean-up: recent developments and future outlook. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 63-77.

Fundación PROINPA

Cochabamba – Bolivia

## Desarrollo de un Protocolo para la Evaluación de Microorganismos Fijadores de Nitrógeno y Solubilizadores de Fósforo y Potasio

Giovanna Plata, Jesús Alberto Aguilar  
E mail: g.plata @proinpa.org

### Resumen

Los microorganismos benéficos pueden representar un potencial para el desarrollo de biofertilizantes para diversos cultivos, disminuyendo el uso de fertilizantes de origen sintético si se combinan con microorganismos fijadores de nitrógeno y solubilizadores de fósforo y potasio. En el presente estudio se ha desarrollado el protocolo de evaluación de microorganismos para la formulación de biofertilizantes, de las 30 cepas evaluadas de diferentes géneros: *Azospirillum sp.*, *Azotobacter sp.*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Penicillium bilaii*, *Trichoderma sp.*, *Bacillus methylothrophicus* y *Bacillus aryabhatai*, se ha determinado que el mejor método de selección es utilizando medios de cultivo líquido, porque permite determinar si su eficiencia será alta, moderada o baja. Se han identificado 6 cepas con alta eficiencia para los tres parámetros evaluados: *Azotobacter chroococcum* (3), *Azospirillum brasilense* (5 y 6), *Pseudomonas fluorescens* (25 y 26) y *Penicillium bilaii* (28 y 29). Para una mejor eficiencia se recomienda formular biofertilizantes utilizando consorcios microbianos de al menos tres microorganismos.

**Palabras clave: Microorganismos, solubilizadores, fijadores, cepas**

### INTRODUCCIÓN

En la agricultura moderna se aplican altos niveles de fertilizantes minerales y otros agroquímicos, con el fin de incrementar la producción y cubrir la creciente demanda de alimentos. Aunque el uso de estos insumos presenta ventajas inmediatas en el rendimiento de los cultivos, es bien sabido que su uso puede afectar negativamente la calidad y productividad de los suelos agrícolas. Debido a esta situación, el uso de microorganismos benéficos ha cobrado importancia como alternativa a la fertilización química.

La mayoría de suelos donde crecen plantas existen comunidades microbianas que abarcan una gran variedad de géneros y especies. Esta microbiota simbiote obligada o facultativa, está asociada al reciclaje de nutrientes, a aumentar el crecimiento vegetal y a acelerar el desarrollo o mejorar la resistencia de las plantas al estrés ambiental, a la producción de fitohormonas, metabolitos y enzimas, a inducir la resistencia basal de las plantas, a la

supresión de patógenos en el suelo o a desempeñarse como agentes entomopatógenos (Sturz *et al.*, 2000 y Harrison, 2005).

Existe una diversidad de microorganismos (hongos, bacterias, actinomicetos y otros) que viven dentro de las plantas (endófitos), estos se localizan en espacios intracelulares, intercelulares o en el tejido vascular; otros viven en la zona radicular (rizósfera y rizoplano). Estas últimas tienen un efecto directo sobre la nutrición de la planta o la defensa contra enfermedades de suelo.

El objetivo de este trabajo es desarrollar un protocolo de evaluación de cepas fijadoras de nitrógeno de vida libre y cepas solubilizadoras de fósforo y potasio. Como una alternativa para la formulación de biofertilizantes que contribuyan a mejorar los procesos de reciclaje de nutrientes que se encuentran fijados en los suelos.

En este momento, donde los fertilizantes han doblado su precio es una alternativa amigable

y de bajo costo para los productores, porque va a ayudar a incrementar el rendimiento de sus cultivos, va a reducir las enfermedades de suelo y lo más importante es que con la incorporación de microorganismos benéficos se va a potenciar la salud del suelo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Material de trabajo:

La Fundación PROINPA cuenta con un cepario de microorganismos nativos, de los cuales se han seleccionado los siguientes microorganismos para el estudio: *Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp., *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Penicillium bilaii*, *Trichoderma* sp., *Bacillus methylothrophicus* y *Bacillus aryabhatai*. Estos microorganismos se encuentran guardados en congelación a -20 °C bajo diferentes formas (Figura 1).



**Figura 1. Aislamientos conservados en diferentes medios: glicerol, leche y conservación en perlitas.**

### B. Activación de hongos y bacterias del cepario:

Para el estudio, los microorganismos fueron sacados de conservación 14 bacterias y 3 hongos y multiplicados en medios específicos según el género. Para todos los *Bacillus* se utilizó el medio agar Tripticasa de soya (TSA), *Pseudomonas fluorescens* fue activada en el medio King B con glicerol (KB), *Azospirillum* y *Azotobacter* en medio NFb y *Penicillium bilaii* y *Trichoderma* sp. en papa Dextrosa Agar (PDA). Las placas de bacterias fueron

incubadas a 28°C por 48 horas y el hongo a 24 °C por 7 días.

### C. Caracterización de los microorganismos:

Una vez activados los diferentes microorganismos, se procedió con la caracterización de los siguientes mecanismos de acción: fijación de nitrógeno, solubilización de fósforo y potasio, y producción de ácido indol acético (AIA).

El procedimiento utilizado para la caracterización fue el siguiente:

**c.1. Fijación de Nitrógeno:** Se trabajó en base al protocolo de Velázquez-Gurrola & Ramos-Alegría (2015). Todos los microorganismos fueron sembrados en medio Agar Pikovskaya sólido y líquido (sin agar), el tinte utilizado fue púrpura de bromocresol con un pH de 7. Las placas fueron incubadas de 5 a 10 días a 28 °C. El caldo fue sembrado en tubos, los cuales estuvieron en agitación constante de 180 rpm a una temperatura de 28 °C. La evaluación fue visual, se registraron como positivas aquellas cepas en las cuales se observó el cambio de color en placas como tubos. Simultáneamente, se realizaron lecturas a una longitud de onda 405.

**c.2. Solubilizadoras de Fósforo:** El procedimiento fue similar al del nitrógeno pero se trabajó con el medio de cultivo NBRIP con roca fosfórica; el tinte utilizado fue azul de bromotimol con un pH de 7. Tanto las placas como los tubos se incubaron durante 5 a 10 días a 28°C. La evaluación fue visual, registrándose como positivas aquellas cepas en las cuales se observó el cambio de color en placas como tubos. Simultáneamente, se realizaron lecturas a una longitud de onda 545.

**c.3. Solubilizadoras de Potasio:** El procedimiento fue similar al de nitrógeno, se utilizó el medio de cultivo Agar Pikovskaya modificado con suplemento de extracto de levadura, el tinte utilizado fue púrpura de bromocresol con un pH de 7. Tanto las placas como los tubos se incubaron durante 5 a 10

días a 28°C. La evaluación similar a N y P, para la lectura se utilizó la longitud de onda 405nm

#### c.4. Producción de ácido Indol Acético (AIA):

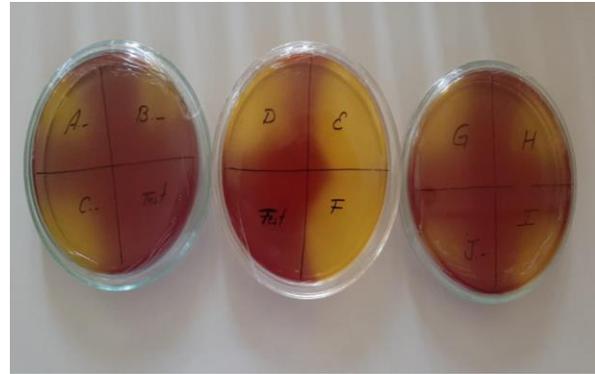
Para esta prueba las bacterias fueron multiplicadas en caldo nutritivo con adición de triptófano de 1g/L y *Penicillium* y *Trichoderma* en caldo de Papa con dextrosa, todos los matraces fueron incubados en agitación a 180 rpm a 28 °C durante 5 a 7 días. Transcurrido este tiempo, se realizó el revelado con el reactivo de Salkowsky en una relación 1:4. Se reportaron como positivas las muestras que viraron a tonos rojizos. Luego se realizó una lectura a 545 nm y para determinar los valores de AIA se comparó con los valores del patrón.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados de la caracterización 27 bacterias y tres hongos evaluados en este estudio.

### Fijación de Nitrógeno

Para la evaluación de fijación de nitrógeno se evaluaron 27 cepas de bacterias y tres de hongos. Todas fueron sembradas en medio sólido y en caldo. Se consideraron positivas las que viraron de color (Figura 2).



**Figura 2.** Desarrollo de bacterias en medio sólido de Pikovskaya.

Cómo se observa en la Figura 2, las 10 bacterias evaluadas son fijadoras de nitrógeno, por el tamaño del cambio de color se puede determinar que unas son más eficientes que otras, pero no se puede cuantificar.

Cuando se evalúa la misma reacción en caldo se determina mejor las diferencias de tonalidades obtenidas (Figura 3). Las cepas E y F serían las más eficientes, seguidas por C, luego estarían las cepas A, B, D, H y J. Las menos eficientes son G y J. Sí se compara las 10 cepas evaluadas con los testigos que se encuentran a los extremos, se puede observar que todas las cepas tienen la habilidad de fijar nitrógeno atmosférico.



**Figura 3.** Evaluación de la fijación de nitrógeno por diferentes cepas de *Azospirillum* y *Azotobacter* en medio líquido de Pikovskaya

De manera general, existe una correlación de la evaluación en medio sólido y medio líquido. La ventaja que en el medio líquido además se puede tener un dato cuantificable y se observa claramente, el proceso de fijación en el tiempo.

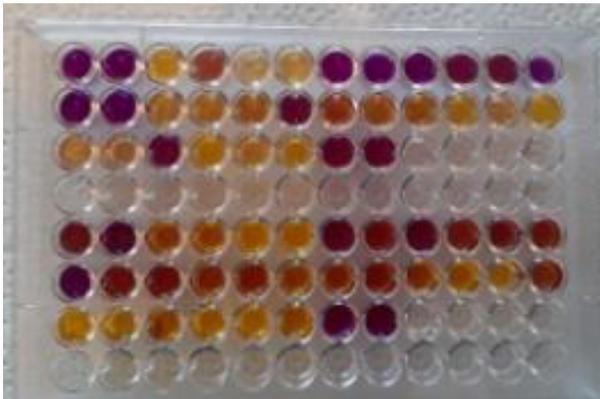
### Solubilización de Fósforo

Algo similar se observa en la solubilización del fósforo, la reacción en medio líquido es más clara que en sólido. Algunas cepas son más eficientes que otras.

### Solubilización de Potasio

El mismo comportamiento se observa en la solubilización de Potasio.

Por lo tanto, a continuación se presentan las placas con las soluciones de las tres pruebas, siendo las más eficientes las que viraron a color amarillo. Las muestras están colocadas en fila, son 30 muestras y las dos últimas es el medio control y a lado de ellas se encuentra simplemente agua. Las tres filas superiores corresponden a nitrógeno y las tres inferiores a potasio (Figura 4).



**Figura 4.** Placa de ELISA conteniendo las 30 cepas en estudio, dos testigos y un blanco, las tres filas superiores corresponden a la fijación de nitrógeno y las tres inferiores a solubilización de Potasio.

Los resultados de la solubilización de fósforo se observan en la Figura 5, los hoyos amarillos corresponden a las mejores cepas solubilizadoras de fósforo, seguidas por las tonalidades verdosas y luego las azules claras y las que no solubilizan son azul intenso.



**Figura 5.** Placa de ELISA conteniendo las 30 cepas en estudio, dos testigos y un blanco, las tres filas corresponden a la solubilización de Fósforo.

En el Cuadro 1, se observa la lectura y el viraje de color de los tres macronutrientes, pudiéndose observar que existen cepas que tienen la habilidad de fijar N y solubilizar Fósforo y Potasio como son: *Azotobacter chroococcum* (3), *Azospirillum brasilense* (5 y 6), *Pseudomonas fluorescens* (25 y 26) y *Penicillium bilaii* (28 y 29).

**Cuadro 1. Resultados de la evaluación de 30 cepas de la Fundación PROINPA, por sus habilidades en la fijación de Nitrógeno y la solubilización de Fósforo y Potasio.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
N	2,568	3,872	0,472	0,433	0,279	0,235	3,877	2,063	3,877	1,287	2,144	1,126
P	0,489	0,939	0,24	0,191	0,177	0,334	0,959	0,461	0,492	0,29	0,415	0,202
K	3,866	3,866	0,590	1,369	0,26	0,418	3,866	3,866	3,866	3,81	3,579	3,864
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
N	3,87	1,466	1,661	0,74	0,968	0,545	0,64	1,139	0,46	0,502	0,259	1,092
P	0,523	0,589	0,482	0,927	0,772	1,067	1,088	1,908	3,811	0,491	0,241	0,32
K	3,866	3,866	0,46	0,441	0,596	3,827	1,003	0,677	0,626	0,67	0,449	0,721
	25	26	27	28	29	30	31	32	33			
N	0,328	0,316	0,425	0,229	0,431	0,309	3,829	3,883	0,115			
P	0,277	0,246	0,368	0,126	0,32	1,863	1,204	1,515	1,115			
K	0,554	0,464	3,318	0,444	0,605	0,314	3,881	3,881	0,23			

Las cepas 3 y 4 corresponde a *Azotobacter chroococcum*, las cepas 1,2,5,6,7,8,9, 10,11,12,13,14 corresponden a *Azospirillum brasilense*, la 15 y 16 son *Paenibacillus polimixa*, 17 *Bacillus aryabhatai*, 18 *Bacillus methylotropicus*, 19, 20,21 y 22 son *Bacillus pumilus*, de la 23 a la 27 corresponden a *Pseudomonas fluorescens*, 28 y 29 son aislados de *Penicillium bilaii* y la 30 una cepa de *Trichoderma* que fija Nitrógeno.

Como se observa en los resultados, aunque muchas de las cepas corresponden a las mismas bacterias, se comportan de diferente manera, por lo cual es imprescindible caracterizar los mecanismos de acción siempre antes de utilizarlos en pruebas de invernadero o campo.

En estos últimos años se ha desarrollado fertilizantes de liberación lenta, los microorganismos con fijación moderada a lenta podrían ayudar a desarrollar este tipo de fertilizantes, pero lo que se debe estudiar es la concentración de estos microorganismos en la formulación a desarrollar.

Ya que para comprender mejor la habilidad de fijación o solubilización se realizó una prueba adicional colocando diferentes cantidades de microorganismos en los tubos, los resultados indican que a mayor concentración la

velocidad de fijación o solubilización se acelera (Figura 6). Es importante determinar la cantidad de biofertilizante a utilizar al momento de la siembra considerando que aún inicio las plántulas poseen un escaso sistema radicular.

La mayoría de las bacterias son fijadoras de N y solubilizadoras de Fósforo y Potasio con alta eficiencia, un menor número son moderadamente eficientes y el número de baja y ninguna actividad están casi a la par.

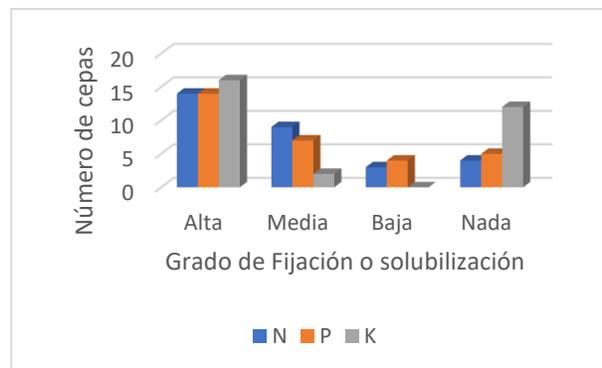


Figura 6. Grado de eficiencia de las diferentes cepas en fijación de nitrógeno y solubilización de Fósforo y Potasio

#### Producción de ácido Indol Acético (AIA):

En la evaluación de producción de AIA, las cepas de *Azotobacter*, *Azospirillum*,

*Pseudomonas fluorescens*, *Paenibacillus polimixa*, *Bacillus aryabhatai*, *Bacillus methylotropicus* producen de media a altas concentraciones de AIA; en cambio los hongos producen una cantidad baja.

Este factor es muy importante, porque el ácido indol acético ayuda a promover el desarrollo radicular de las plantas. Un volumen abundante de raíces va ayudar a absorber mejor los nutrientes y el agua, puede penetrar a mayores profundidades.

Una planta con un buen desarrollo radicular, desarrollo muy bien es resistente al ataque de plagas y enfermedades además soporta factores adversos como heladas y sequías. Por ende también tendrá un buen rendimiento.

## CONCLUSIONES

- Entre los dos medios de cultivo evaluados para a formulación de biofertilizantes, el medio líquido es más eficiente porque permite determinar el grado de eficiencia con mucha claridad, además que se puede cuantificar.
- Los microorganismos fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fósforo y potasio se encuentran ampliamente distribuidos en gran diversidad de suelos y cultivos agrícolas, sólo que algunos muestran mayor actividad que otros.
- La inoculación de consorcios de microorganismos puede incrementar la diversidad microbiológica del suelo, en especial en suelos empobrecidos o agotados, permitiendo el aprovechamiento del acervo mineral de los mismos y mejorando las condiciones de desarrollo de los cultivos.
- Es importante determinar la concentración de los microorganismos seleccionados en la formulación del biofertilizante, de tal forma que, en fases iniciales de desarrollo de las plantas, los microorganismos no fijen nitrógeno o solubilizan fósforo o potasio en grandes cantidades.

- Se debe considerar al menos dos aplicaciones del biofertilizante, una al inicio y otra al aporque o cuando la planta este de unos 20 cm.
- Se recomienda hacer evaluaciones de biofertilizantes con la adición de fertilizantes sintéticos o guanos descompuestos en diferentes proporciones, con el propósito de hacer más eficiente estas aplicaciones y disminuir la contaminación ambiental.

## REFERENCIAS CITADAS

- Bécquer, C., Lazarovits, G., Lalin, I. 2013. Interacción *in vitro* entre *Trichoderma harzianum* y bacterias rizosféricas estimuladoras del crecimiento vegetal. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. Tomo 47, Número 1.
- Gordon, S., R. Weber. 1950. Colorimetric estimation of indole acetic acid. Plant Physiol. 26: 192 -195.
- Rehm, G. y Schmitt M., 2002. Potassium for crop production. Retrieved February 2, 2011, from Regents of the University of Minnesota website; <http://www.extension.umn.edu/distribution/cropsystems/dc6794.html>
- Sturz, A., Christie, B., Nowak, J. 2000. Bacterial Endophytes: Potential Role in Developing Sustainable Systems of Crop Production Critical Reviews in Plant Sciences Prince Edward Island. Canada. 19(1):1–30.
- Velázquez- Gurrola, A. & Ramos-Alegría, MP., 2013. Beneficios de microorganismos solubilizadores de P y K en la recuperación y mantenimiento de suelos agrícolas. VIII Congreso Mundial de la palta. 13 al 18n de septiembre de 2015. Perú. P. 493-499
- Venkateswarlu B., Rao A.V., Raina P. y Ahmad N., 1984. Evaluation of phosphorus solubilization by microorganisms isolated from arid soil. J. Indian Soc. Soil Sci. 32:273-277.

Universidad Mayor de San Simón  
Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias

Cochabamba Bolivia

## Las micorrizas (MA) (*Glomus fasciculatum*) y el fósforo en papas nativas

Deyby Felipez S. y Noel Ortuño C.  
jos737@gmail.com<sup>2</sup>  
n.ortuno@umss.edu.bo

### Resumen

Con el objetivo de determinar el efecto de la micorriza arbuscular (MA) y niveles de fósforo *Glomus fasciculatum* en el desarrollo y productividad de cinco variedades nativas de papa. El diseño experimental que se utilizó fue el de Bloques Completos al Azar (BCA), con tratamientos estructurados de 6x2x3 con 3 repeticiones. Las variedades de papa nativa tuvieron diferentes respuestas tanto a la inoculación con *G. fasciculatum*, y a fósforo. La longitud de raíz incrementó linealmente en las variedades Malkacho 1 (63.7 cm), Polonia (51.75 cm), Waych'a (50.25 cm) y Yuraj Imilla (52.8 cm). El rendimiento fue mayor con la inoculación de 100 kg/ha de micorriza *G. fasciculatum* (5.41 tn/ha), siendo las variedades con mayor rendimiento las variedades Malkacho 1 (7.02 tn/ha) y Malkacho 2 (7.14 tn/ha). Las variables frecuencia de colonización (%), número de esporas, peso fresco de follaje fue mayor con la aplicación de 100 kg/ha de la micorriza *G. fasciculatum*, en las variedades Malkacho 1 (29.35%), Malkacho 2 (31.62 %), Yuraj imilla (29.16%) y Yana Runa (28.70%). El fósforo afectó la frecuencia de colonización (%) y número de esporas disminuyéndolas con dosis superiores a 60 kg/ha y 65 kg/ha, respectivamente.

**Palabras claves:** Micorrizas (MA), biofertilizante, papa nativa, fosforo.

### INTRODUCCIÓN

Según Guido *et al.* (2001), la papa es uno de los cultivos más importantes en el mundo. El consumo per cápita en Bolivia es 823 Kg/año. La aplicación de elementos biológicos que actúan de forma coordinada en la interface suelo-raíz, como ej. están los hongos formadores de micorrizas – arbusculares (Dodd, 1999 y Sylvia, 1999). El objetivo es determinar el efecto de la micorriza arbustiva (MA) y niveles de fosforo *Glomus fasciculatum* en el desarrollo y productividad de cinco variedades nativas de papa.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron equipos, material de vidrio, material de invernadero, reactivos y Superfosfato triple 0-46-0 (46% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). El material vegetal fue proporcionado por la Fundación PROINPA, las variedades nativas

de papa utilizadas son de la especie *Solanum tuberosum* ssp andigena y fueron: Polonia, Malkacho, Yana Imilla, Yuraj imilla y Waych'a. Se utilizó la Micorriza (HMA) *Glomus fasciculatum*, el cual conto con 15 esporas por gramo.

El diseño experimental que se utilizó fue el de Bloques Completos al Azar (BCA), con tratamientos estructurados de 6x2x3 con 3 repeticiones.

Las variables de respuesta fueron:

**Rendimiento:** Una vez realizada la cosecha se pesaron los tubérculos y se realizó la conversión a toneladas por hectárea asumiendo una densidad de 44.000 plantas/ha.

**Evaluación de la micorriza *Glomus fasciculatum***

- a. Método y procedimiento para evaluación de raíces: Las muestras de raíz de papa fueron lavadas y colocadas en tubos de ensayo, sumergidas en una solución de KOH al 10%, luego calentadas en estufa a 90°C durante 10 minutos y luego lavadas con agua, luego se introdujo en tubos de ensayo, sumergidas en una solución de tinta al 5% en vinagre, estos tubos se colocaron en baño María a 90°C por 15 minutos. Después reposaron por 20 minutos y luego se lavaron. Las raíces más finas se cortaron en segmentos de un centímetro de longitud y se colocaron 20 segmentos sobre un portaobjeto con una gota de agua y se cubrió con placa de vidrio y se observó en estereoscopia (Sánchez et al 2009). El método y procedimiento para evaluación de frecuencia de colonización (%) realizó con la siguiente fórmula:

$$\%F = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de segmentos colonizados}}{\text{N}^{\circ} \text{ de segmentos totales observados}} \times 100$$

- b. Método y procedimiento para conteo de número de esporas: Se tomaron muestras de 20 gramos de suelo proveniente de cada maceta, el cual se tamizó con tamiz de 2mm. Se pasó la muestra por tamices superpuestos, de tamaños de poro 450 µm, 120 µm y 40

µm. El material que quedó sobre los tamices intermedios (120 µm y 40 µm), fue recogido con una espátula de punta fina y pasó a tubos para centrifuga de 50 ml. El volumen del tubo con muestra y agua fue de 30 ml y 15 ml y se añadió sacarosa a los tubos. Luego se agitó el fondo de cada tubo con una espátula, luego se centrifugaron a 3200 rpm por 6 minutos. Esto para la separación clara en tres fases: agua, sacarosa y suelo. Posteriormente se tamizó el líquido en papel filtro, el cual se puso en caja petri cuadrículado y finalmente se realizó el conteo de esporas con un estereoscopio (Sánchez et. al, 2009).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- a) Rendimiento (tn/ha): Para la variable rendimiento se estimaron diferencias entre las Variedades (Pr=0.0001), Micorriza (Pr=0.0338) y Fósforo (Pr=0.0051). Para variedad y micorriza se realizó comparación de medias y para fósforo regresión lineal. La figura 1 muestra que las variedades con mayor rendimiento (tn/ha) fueron Malkacho 1 (7.02 tn/ha) y Malkacho 2 (7.14 tn/ha).

La

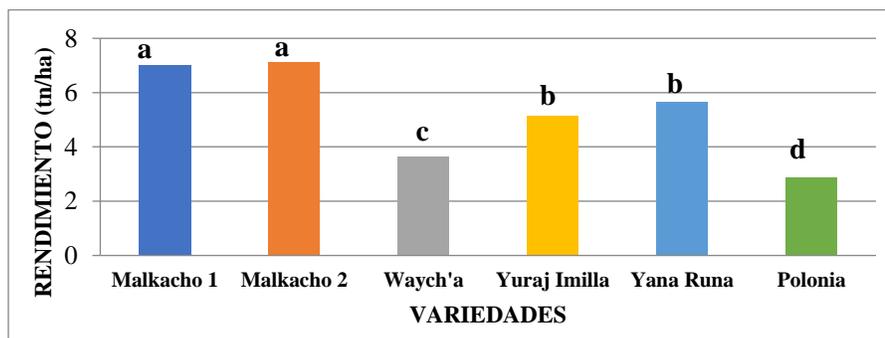
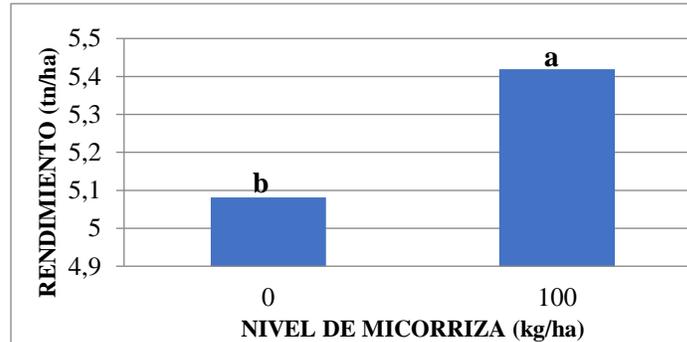


Figura 1. Rendimiento (tn/ha) en variedades de papa nativa

Con la aplicación de micorrizas con el nivel de 100 kg/ha el rendimiento de papa fue superior,

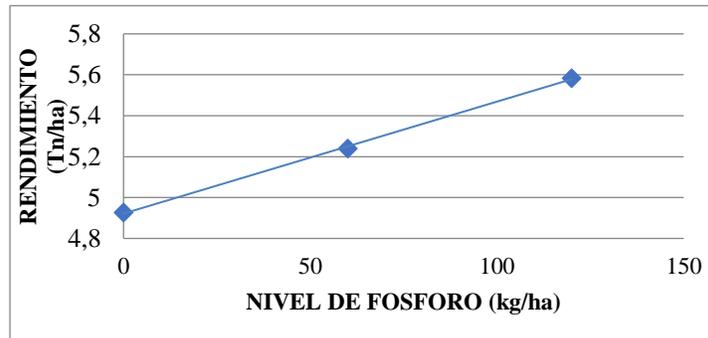
con el cual se obtuvo 5.41 tn/ha (Figura 2). Al respecto Monteiro y Susana (1983) afirman

que ensayos en invernadero incrementaron el rendimiento y contenido de nutrientes de las plantas.



**Figura 2. Rendimiento de la papa nativa (tn/ha) por efecto de la micorriza**

El rendimiento incrementó linealmente con la aplicación de fósforo, esto coincide con lo mencionado por Palmieri (1988), y Bolaños (2001), quienes afirman que el fósforo tiende a aumentar el rendimiento total (figura 3).

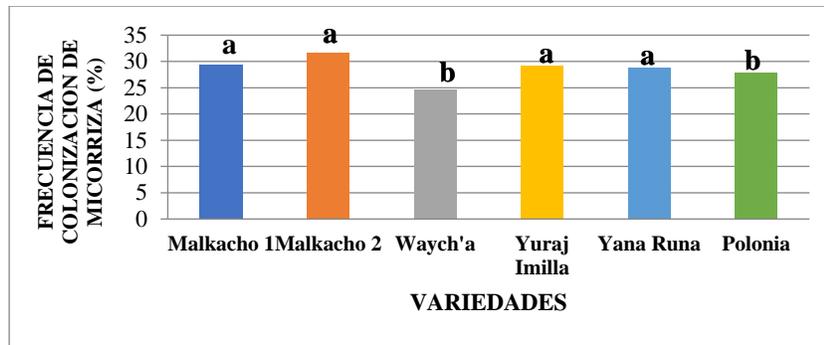


**Figura 3. Efecto del nivel de fósforo en el rendimiento del cultivo de papa nativa.**

- b) Frecuencia de Colonización de micorriza (%) en raíces de papa nativa:** El análisis de varianza de la variable frecuencia de Colonización de micorriza *MA Glomus fasciculatum* en las raíces de papa, mostró diferencias significativas para las variedades ( $Pr=0.0037$ ), niveles de micorriza ( $Pr=0.0001$ ) y niveles de fósforo ( $Pr=0.0042$ ). Para variedades y micorriza se realizó comparación de medias y para fósforo análisis de tendencias.

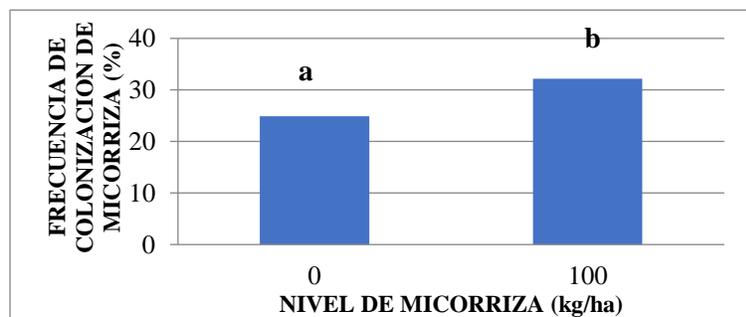
La frecuencia de colonización (%) de la micorriza *MA Glomus fasciculatum* fue superior ( $Pr=0.0019$ ) en las variedades Malkacho 2, (31.62 %), Malkacho 1 (29.35 %), Yuraj imilla (29.16 %) y Yana Runa (28.70 %) siendo Waych'a la de más baja porcentaje de colonización (Figura 4). Estos valores fueron

aproximados a los informados por Terry (2001), quien encontró un 39 % de colonización en plantas de tomate inoculadas con *G. fasciculatum*.



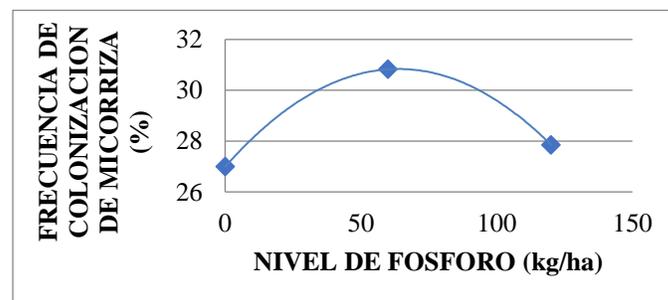
**Figura 4. Frecuencia de colonización de micorriza en variedades de papa nativa**

La frecuencia de colonización tuvo un valor elevado cuando se inoculo con 100 kg/ha siendo este de 32.19 % (Figura 5). Ruíz *et al.* (1997) y Terry *et al.* (1998), indican como positivos valores entre 30-40 % para las plantas de tomate inoculadas con HMA.



**Figura 5. Frecuencia de Colonización de micorriza en el cultivo de papa nativa.**

La variable frecuencia de colonización de micorriza incrementa cuadráticamente ( $Pr=0.0012$ ) a medida que aumenta los niveles de fósforo siendo el nivel óptimo 60 kg/ha (Figura 6).



**Figura 6. Regresión cuadrática para la variable Frecuencia de Colonización de micorriza en raíces de papa nativa.**

Con respecto a estos resultados, Diederichs y Moawad (1993), mencionan que la aplicación excesiva de fertilizantes químicos afecta el proceso de formación y desarrollo de la simbiosis micorrizica.

**4.3. Número de Esporas:** Respecto a la variable Número de esporas de *Glomus fasciculatum*, el cuadro 3 señala que existen diferencias significativas en variedad

(Pr=0.0094), micorriza (Pr=0.0001) y fósforo (Pr=0.022). Para variedad y micorriza se realizó comparación de medias y para fósforo análisis de tendencias.

La variedad Malkacho 1 es igual a Malkacho 2 (Pr<0.3861), Yuraj imilla (Pr< 0.1499) y Yana runa (Pr< 0.199) pero es diferente a Polonia (Pr< 0.012) (Figura 7) y muestra que el

número de esporas encontradas en 100 gr de suelo fue diferente entre variedades. Azcon y Barea (1980), mencionan que también el tipo de hospedero influye sobre la colonización y producción de esporas, siendo generalmente las plantas con elevada demanda de fósforo como en papa que responden mejor a la micorrización.

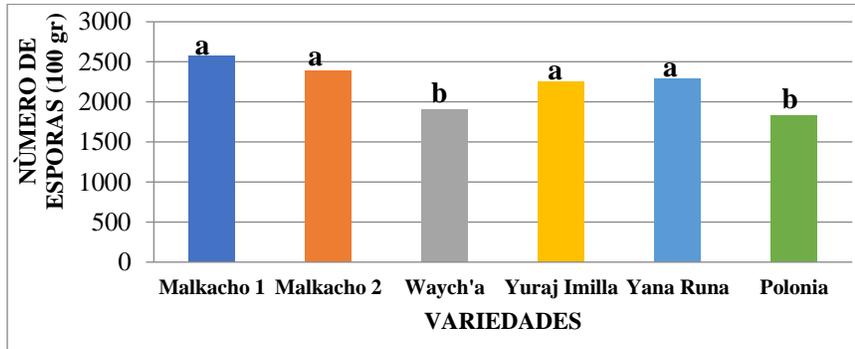


Figura 7. Número de esporas de micorriza/100 gr de suelo en cultivo de papa nativa.

En la figura 8 se observa que existe mayor número de esporas en el tratamiento con inóculo 100 kg/ha, en comparación con el testigo (0 kg/ha).

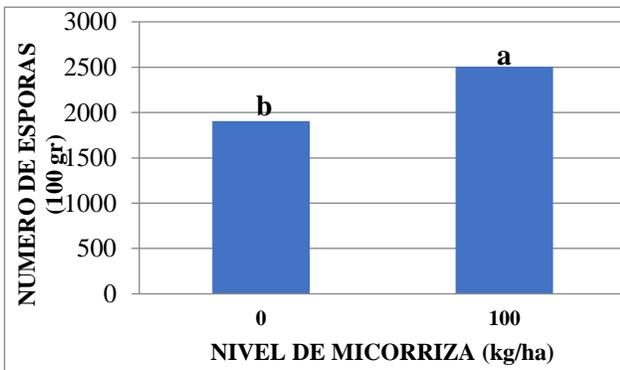


Figura 8. Número de Esporas/100 gr de suelo.

La variable Número de esporas incrementa linealmente y disminuye cuadráticamente (Pr<0.0081) a medida que aumenta los niveles de fósforo siendo el nivel óptimo 65 kg /ha (Fig. 9) Graham *et al.* (1996), de igual manera coinciden afirmando que existen numerosas

evidencias que demuestran que los altos niveles de P disminuyen la colonización.

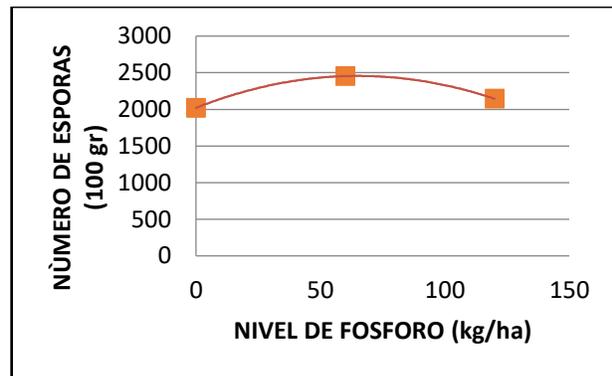


Figura 9. Regresión cuadrática para la variable Número de Esporas.

## CONCLUSIONES

El rendimiento se vio afectado por la inoculación de la micorriza *Glomus fasciculatum*, ya que el rendimiento fue mayor con la inoculación de 100 kg/ha de micorriza (5.41 tn/ha), siendo las variedades con mayor rendimiento las variedades Malkacho 1 (7.02 tn/ha) y Malkacho

2 (7.14 tn/ha). Las variables frecuencia de colonización (%) y número de esporas fue mayores con la aplicación de 100 kg/ha de la micorriza *Glomus fasciculatum*, en las variedades Malkacho 1 (29.35%), Malkacho 2 (31.62 %), además de Yuraj imilla (29.16%) y Yana Runa (28.70%). Con la inoculación de 100 kg/ha de micorriza se obtuvo una frecuencia de colonización (%) de 32.19 %. El fósforo afectó la frecuencia de colonización (%) y número de esporas disminuyéndolas con dosis superiores a 60 kg/ha y 65 kg/ha respectivamente.

## BIBLIOGRAFIA

- Azcon, A. C. y J. M. Barea. 1980. "Micorrizas". Investigación y ciencia. 15 (47): 8-16.
- Bolaños, H. A. 2001. Introducción a la orlicultura. EUNED. Costa Rica. San José 380 p.
- Coyne M. 2000. Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. España. Ed ITP Paraninfo
- Dodd, J. C. 1999. Recent advances in understanding the role of arbuscular micorrizas in plant production. In: Soil fertility, soil biology and plant nutrition interrelationships. Brasil. 687-704 p.
- Guido, A. F., P. R. Mamani. 2001. Características de la Cadena Agroalimentaria de la Papa y su Industrialización en Bolivia Fundación PROINPA – Proyecto Papa Andina Cochabamba – Bolivia. 93pag
- Graham, J. H., D. L. Drouillard, y N. C. Hodge. 1996. Carbon economy of sour orange in response to different *Glomus* spp. *Tree Physiology*, 16, 1023-1029.
- Marschner, H. 1986. Mineral Nutrition of Higher plants. Institute of Plant Nutrition University of Hohenheim. Federal Republic of Germany Academic Press. Harcourt Brace Javanovich, Publishers.
- Palmieri, V. 1988. Respuesta de papa (*Solanum tuberosum* L) a la fertilización con nitrógeno y fósforo en la zona de fraijanes, alajuela. Tesis Ing. Agr. Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica. San José.
- Sylvia, D. 1999. Fundamentals and applications of arbuscular mycorrhizae: a biofertilizer perspective. In: Soil fertility, soil biology and plant nutrition interrelationships. Siqueira. 705-724 p.
- Terry, E. 2001. Efectividad agronómica de biofertilizantes en el cultivo del tomate. Tesis presentada en opción al título académico de Maestro en Ciencias Agrícolas. ISCAH.

Universidad Mayor de San Simón  
Facultad de Ciencias Agrícolas Pecuarias y Forestales  
Laboratorio de Microbiología Agrícola y Bioinsumos

Cochabamba – Bolivia

## Uso de *Bacillus* sp. y técnicas de labranza para la multiplicación de esporas de micorriza arbusculares (MA)

Omar Flores<sup>1</sup>; Ilich Figueroa<sup>2</sup> y Noel Ortuño<sup>3</sup>  
omarfloresllanque@gmail.com

### Resumen

El objetivo fue evaluar el efecto de la labranza tradicional (LT) y labranza mínima (LM) en interacción con *Bacillus* sp.; Testigo, 1 kg/ha=NB1, 2 kg/ha=NB2 y 3 kg/ha=NB3. Se evaluaron las siguientes variables en microorganismos: Tasa de multiplicación de esporas de micorrizas arbusculares (MA), unidades formadoras de colonias (UFC) de hongos totales y bacterias totales; en las plantas se evaluaron: (altura de planta, diámetro de tallo, número de hojas, rendimiento comercial del bulbo y longitud de raíz). Los resultados obtenidos fueron los siguientes: La multiplicación de MA tuvieron mejores efectos con 3 kg/h y bajo labranza mínima. Se concluye que la labranza mínima contribuye a la producción de micorrizas arbusculares.

**Palabras clave:** Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal PGPR, Hongos micorrícicos arbusculares HMA, Labranza, Cebolla.

### INTRODUCCIÓN

Actualmente se buscan nuevas tecnologías sostenibles de producción orgánica y ecológica, como el uso de los microorganismos benéficos, controladores de patógenos y promotores de crecimiento, que conserven o mejoren las características del suelo, el rendimiento y calidad de los productos (Rojas *et al.* 2012).

El género *Bacillus* forma endosporas, como estructura de sobrevivencia en condiciones desfavorables, son habitantes regulares del suelo y constituyen parte de la rizosfera de las plantas como colonizadores eficaces, debido a que son productores de sustancias como hormonas, antibióticos y otros metabolitos que impiden el establecimiento de microorganismos patógenos (Gamarra, 2017).

Un 80 % de plantas, pero el 95% de las plantas micorrizadas son colonizadas por la especie de micorriza arbuscular (MA),

aportando múltiples beneficios, como en la absorción de nutrientes, resistencia a patógenos y resistencia en condiciones de estrés biótico y abiótico (Bustamante, 2019).

En la interacción biológica entre micorriza, bacteria y planta. Cada elemento de esta asociación juega un rol. Es muy importante saber que los hongos micorrícicos son simbioses obligados ya que necesitan una planta para sobrevivir y completar su ciclo biológico; de lo contrario, la bacteria *Bacillus* se desarrolla de manera natural en los suelos de todo el mundo (Tech 2015).

El Objetivo es evaluar el efecto de labranzas y microorganismos nativos PGPRs sobre la multiplicación de esporas de micorrizas arbusculares (MA).

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### Materiales

Se utilizaron cepas de micorrizas arbusculares (MA) y *Bacillus* sp. provenientes del “cepario de microorganismos nativos del Laboratorio de Microbiología Agrícola y Bioinsumos”, de la FCAPyF-UMSS. Se utilizaron plantas de cebolla (*Allium cepa* L.) como plantas trampa.

### Métodos

La multiplicación de las micorrizas arbusculares (MA) se realizó por el método de sustrato sólido que implica una selección de un sistema de propagación conformado por una planta hospedadora y un sustrato, generalmente se busca un medio que proporcione aireación, baja proporción de nutrientes disponibles, que no inhiban el establecimiento de la asociación y libre de patógenos (Osorio *et al.* 2008).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Microrganismos

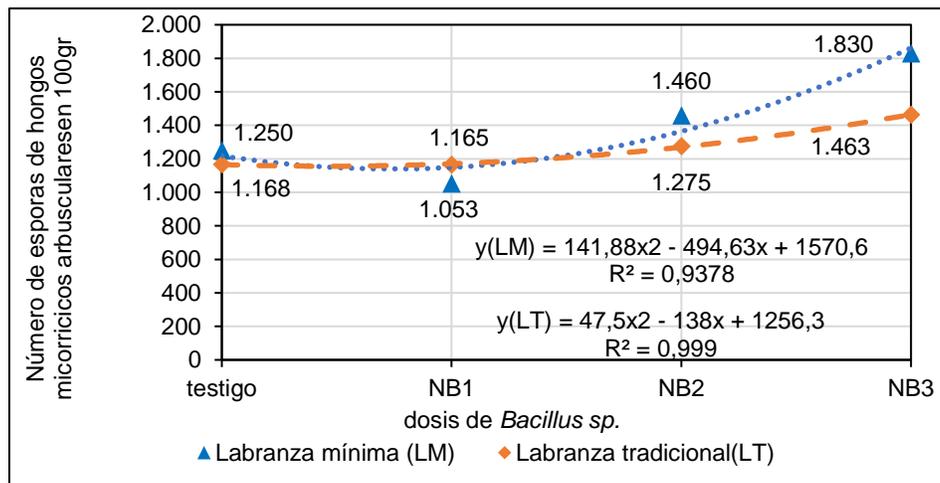


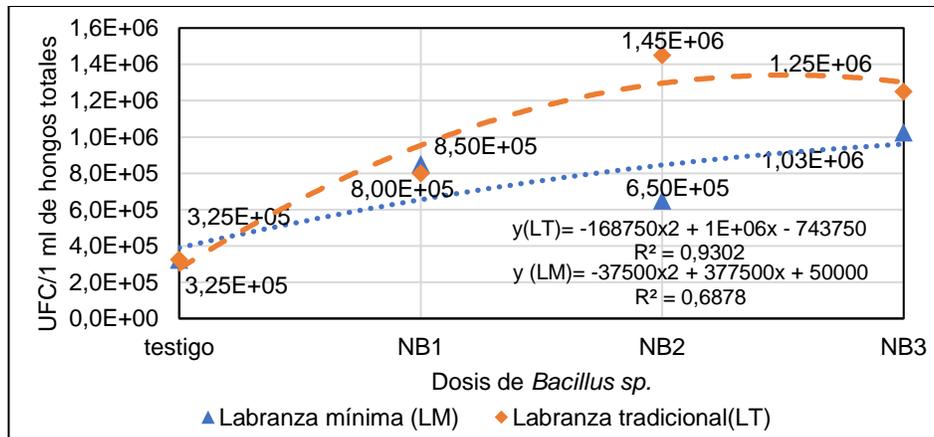
Figura 1. Efecto de la dosis de *Bacillus* sp. en combinación con las labranzas sobre la multiplicación de micorrizas (MA).

### Hongos totales (HT)

Para la variable hongos totales (HT) se encontraron diferencias altamente significativas entre las técnicas de labranzas ( $Pr < 0,0001$ ), *Bacillus* ( $Pr < 0,0001$ ) y en la combinación de ambos ( $Pr < 0,0001$ ).

### Micorrizas Arbusculares (MA)

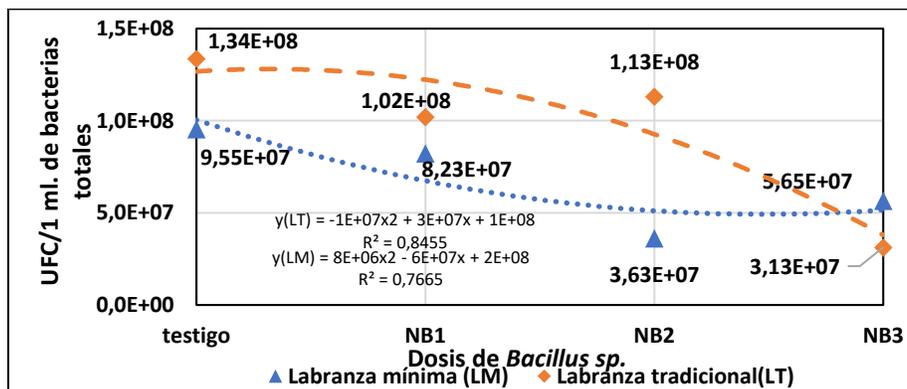
Para la variable esporas de (MA), se encontraron diferencias altamente significativas entre las labranzas ( $Pr < 0,0001$ ), *Bacillus* sp. ( $Pr < 0,0001$ ) y en la combinación de ambos ( $Pr < 0,0001$ ). Cuando se combinó las labranzas con *Bacillus* sp. (Figura 1), se mostró un incremento de esporas a media que incrementa el nivel de *Bacillus*, resultando con mejor efecto la LM+NB3 sobre la multiplicación de micorrizas (MA). La falta de labranza o labranza mínima suministra las condiciones más apropiadas para el establecimiento de la simbiosis entre las plantas y las micorrizas arbusculares (MA). Las prácticas de labranza mínima o reducida reflejan mayor presencia de los microorganismos del suelo, favorece la acumulación e incorporación de residuos vegetales sobre la superficie del suelo, la dinámica de colonización y esporulación (Alfonso y Ponciano, 2003).



**Figura 2. Efecto de las labranzas en combinación con la dosis de *Bacillus sp.* sobre las unidades formadoras de colonias (UFC) de hongos totales.**

### Bacterias totales (BT).

Para esta variable se encontraron diferencias altamente significativas entre las labranzas ( $Pr < 0,0001$ ), *Bacillus sp.* ( $Pr < 0,0001$ ), y en la combinación de ambos ( $Pr < 0,001$ ).



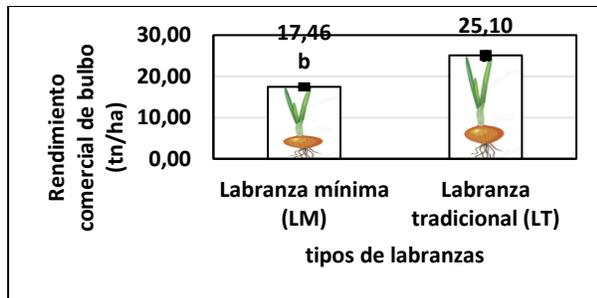
**Figura 3. Efecto del *Bacillus sp.* en combinación con las labranzas, sobre las unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias totales (BT).**

### Planta de cebolla (*Allium cepa* L.)

#### a) Rendimiento comercial del bulbo

Para el rendimiento comercial de bulbo se encontraron diferencias altamente significativas solo para las labranzas ( $p=0,002$ ). En la (Figura 4), se observa el mejor rendimiento con la labranza tradicional. Este hecho puede atribuirse a una característica distintiva de los sistemas de siembra directa o labranza mínima es la

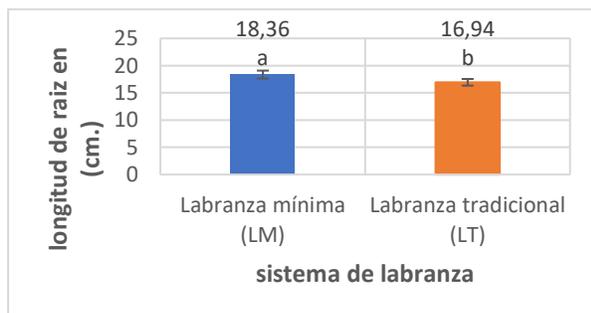
estratificación de los nutrientes poco móviles, básicamente P y K, en los primeros centímetros del suelo, debido a la falta de incorporación con herramientas. Esta acumulación en superficie puede limitar su absorción por las plantas (Schalamuk *et al.* 2003).



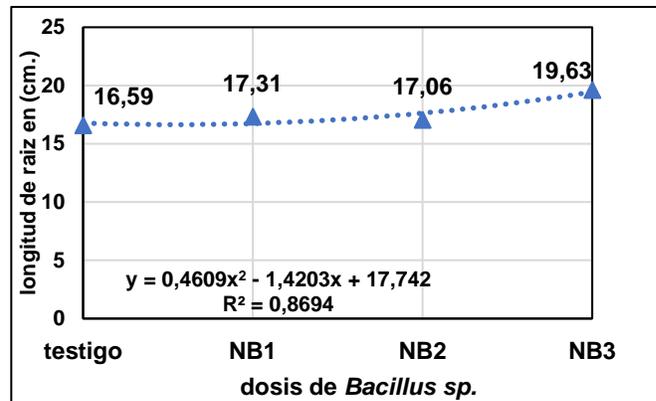
**Figura 4. Efecto de las labranzas sobre el rendimiento comercial del bulbo de cebolla (*Allium cepa* L.).**

#### a. Longitud de raíz

Para esta variable se encontraron diferencias significativas con las labranzas ( $p=0,0264$ ) y entre las labranzas en combinación con *Bacillus* sp. ( $p=0,0075$ ). Con la aplicación de las labranzas, Figura. 5, se observa mayor longitud con la LM=18,36 cm y menor efecto con la LT=16,94 cm. Cuando se aplicó *Bacillus* sp. Figura. 6, a medida que incrementa el nivel de *Bacillus*, incrementa ascendentemente la longitud de raíz, hasta el NB3=19,63 cm. Este resultado puede atribuirse al realizar las labores culturales como el aporque se dañaron las raíces y ocasiono un retardo en una formación de simbiosis entre la planta, micorriza y *Bacillus*, donde se afirma que el crecimiento del sistema radicular en los suelos es afectado por la gama de propiedades del mismo, pero a su vez, las propiedades del suelo son modificadas por las raíces, como también el riego que induce cambios significativos en el crecimiento radicular los cuales pueden tener consecuencias importantes para la producción y calidad del cultivo (Molina 2012).



**Figura 5. Efecto de las labranzas sobre la longitud de raíz de plantas de cebolla (*Allium cepa* L.).**



**Figura 6. Efecto del nivel de *Bacillus* sp. sobre la longitud de raíz.**

## CONCLUSIONES

Las plantas de cebolla (*Allium cepa* L.) en su función de plantas trampa, inoculadas con *Bacillus* sp. respondieron significativamente al incremento de esporulación de micorrizas arbusculares (MA).

Las plantas de cebolla (*Allium cepa* L.) en su función de plantas trampa, manejadas con técnica de labranzas respondieron significativamente al incremento de esporulación de micorrizas arbusculares (MA), mostrando mayor multiplicación de esporas, bajo labranza mínima LM.

Las densidades poblacionales microbianas, para las colonias de hongos totales, en las unidades experimentales inoculadas con *Bacillus* sp. respondieron significativamente un incremento.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Gamarra, Z. A. (2022). Efecto de bacterias *Azotobacter* sp en el crecimiento de plántulas de cebolla (*Allium cepa*) en condiciones de laboratorio. p. 16-30.

Molina, D G; Zapata, C M; Magaña, C G; Gonzalez, Z A; Pérez, S J. 2012.

- Efectos de tres sistemas de labranza y mejoradores de suelo en la disponibilidad de humedad y volumen de exploración de raíces. México. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 3(4). p. 719–727.
- Rojas, M P; Limachi, J M.; Ortuño, N. 2012. Uso de microorganismos nativos como promotores de crecimiento y supresores de patógenos en el cultivo de la papa en Bolivia. Revista Latinoamericana de la Papa, ISSN, Vol. 17. p.74-96.
- Schalamuk, S; Chidichimo, C M; Velázquez, S H. 2003. Efecto de la siembra directa y labranza convencional sobre la colonización micorrizica y esporulación en trigo. La Plata, Argentina, Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires, Boletín Micológico 18(1). p. 15.
- Tech, H. (2015). Roupael Arbuscular mycorrhizal fungi act as biostimulants in horticultural crops, Scientia Horticulturae, Vol. 196. p. 91-108.
- Bustamante Ochoa, M. A. (2019). Multiplicación de micorrizas en tres diferentes sustratos en simbiosis con plantas trampa de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) y albahaca (*Ocimum basilicum*) en condiciones de invernadero (Bachelor's thesis, Quevedo-UTEQ).
- Osorio, C. E., Castañeda Sánchez, D. A., & Franco Molano, A. E. (2008). Multiplicación de hongos micorriza arbuscular (HMA) y efecto de la micorrización en plantas micropropagadas de banano (*Musa* AAA cv. *Gran Enano*)(*Musaceae*). Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín, 61(1), 4279-4290.
- Alfonso, P. M. H., & Ponciano, C. S. (2009). Manejo de la inoculación micorrizica arbuscular, la *Canavalia ensiformis* y la fertilización nitrogenada en plantas de maíz (*Zea mays*) cultivadas sobre suelos Ferralíticos Rojos de La Habana. Tesis de grado, Universidad Agraria de La Habana.

Institución privada

Cochabamba – Bolivia

## **Cultivo de *Arthrospira máxima* (Spirulina) en fotobiorreactor condiciones ambientales bajo invernadero Valle Central Cochabamba – Bolivia**

Autor: Jahel Quiroz C:  
intirraymisig@gmail.com

### **Resumen**

El presente trabajo investigó el cultivo de microalga *Arthrospira máxima* (spirulina) en valores de productividad cultivado en fotobiorreactor, condiciones ambientales bajo invernadero con el fin de identificar y aprovechar temperaturas altas en las estaciones del año en el valle central de Cochabamba-Bolivia (**Latitud: 17° 24' 50" Sur Longitud: 66° 9' 55" Oeste**. Altitud 2555 m.s.n.m.). El fotobiorreactor es de PVC con 9 m<sup>2</sup> de superficie. La productividad del cultivo se evaluó en las diferentes estaciones del año. Obteniéndose 162 de litros 0.8 grs/lt semanalmente ó 0.114 grs/lt/día aproximadamente; descendiendo en invierno por bajas temperaturas.

**Palabras clave: Cultivo, fotobiorreactor, productividad, Cochabamba- Bolivia, spirulina**

### **INTRODUCCIÓN**

La disponibilidad de luz y un régimen de luz/oscuridad se consideran dos de los factores más importantes que limitan la productividad de la biomasa de las microalgas bajo condiciones ambientales (Richmond, 1990). El flujo turbulento en el cultivo representa un medio práctico para mejorar la distribución de la energía solar. Cuando la turbulencia es insuficiente se convierte en el patrón de flujo laminar, resultando en una disminución de la eficacia de la utilización solar. La turbulencia también aumenta las tasas de intercambio de nutrientes y metabolitos entre las células y su medio de crecimiento (Grobelaar, 1994). Se ha demostrado que aumentando el flujo turbulento en los cultivos de *Spirulina* en estanques, se incrementa la productividad, así como la densidad óptima (Richmond y Vonshak 1978; Vonshak *et al.*, 1982).

La elección de un diseño óptimo de fotobiorreactor para el cultivo masivo de microalgas es un factor importante que rige la productividad general fotosintética. Hasta la fecha, casi toda la producción comercial de esta alga se realiza en estanques en la que el cultivo es agitado con una rueda de paletas. Los fotobiorreactores cerrados proporcionan muchas ventajas como mayor

disponibilidad de luz (alta relación superficie/volumen), control de temperatura, alta concentración de biomasa, disminución de costos en la cosecha, baja tasa de contaminación, y facilidad de automatizar el proceso con el fin de lograr una mejor utilización de la energía solar y temperatura en todo momento. Por lo tanto, el propósito del diseño y desarrollo de los fotobiorreactores a condiciones ambientales es aprovechar la luz solar, disminuir costos y lograr la máxima producción de algas. La temperatura es un parámetro fundamental para el crecimiento de microalgas. La biomasa microalgal responde continuamente a la temperatura ambiental. La temperatura celular se iguala a la temperatura del medio de cultivo, en contraste con otros parámetros del medio como el pH. Además de afectar a las reacciones celulares, la temperatura también afecta a la naturaleza del metabolismo, los requerimientos nutricionales y la composición de la biomasa, si bien dentro de los rangos óptimos tiene poca influencia sobre la concentración final de biomasa, así como la producción y la composición bioquímica de las microalgas. (Abalde.J, Cid A. ,FidalgoP., Torres E, y Herrero C. ,1995)

En muchas regiones del mundo, la temperatura puede representar limitaciones para la producción de la biomasa óptima en cultivos al aire libre de la

spirulina. Aunque el efecto de la temperatura para evaluar la velocidad de crecimiento a nivel de laboratorio esta bien documentado, su efecto en cultivos al aire libre, todavía no se entiende de manera completa. Por las mañanas la temperatura del cultivo puede fluctuar en el rango de 15-20 °C; y se alcanza una temperatura óptima al principio de la tarde. Durante la estación de invierno, la spirulina no puede desarrollarse en estanques al aire libre, excepto en zonas tropicales. La única manera en donde los cultivos pueden ser mantenidas para superar las bajas temperaturas y poder reasumir la producción es ponerlo bajo invernadero y aumentar la concentración. (Spirulife, Primer taller del cultivo de spirulina máxima, 2020).

En Bolivia, la región semidesértica del valle cochabambino presenta una gran luminosidad solar caracterizada por el cielo despejado en las estaciones de Otoño e invierno y ausencia de lluvia; en cambio las estaciones de primavera y verano se caracterizan por altas temperaturas y gran luminosidad en días soleados, además de presentar altas temperaturas diurnas siendo adecuados para la producción de biomasa. Sin embargo, las mejoras en el diseño de un fotobiorreactor podrían capturar la luz solar disponible, siendo el objetivo del presente trabajo evaluar la productividad de *Arthrospira máxima* empleados en el cultivo masivo en fotobiorreactor rectangular bajo condiciones ambientales midiendo la biomasa producida 1 vez por semana de *A. máxima*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Organismo y condiciones del cultivo

El inóculo de *A. máxima* fue obtenido de la Colección de la primera biofábrica empresa boliviana SPIRULIFE S.R.L. Santa Cruz-Bolivia. El cultivo fue mantenido usando el medio de cultivo Jordan Todos los nutrientes fueron disueltos en agua de clorada y ajustados a pH= 9.3. El volumen

del cultivo de *A. máxima* en fotobiorreactor fue de 162 L manteniendo el rango de pH entre 9-9.7 y con una temperatura máxima de 30 °C y temperatura mínima de 23°C. El cultivo en invernadero en fotobiorreactor se localizó a 16°24'50'' de Latitud sur, 71°32'02'' de Longitud oeste, altitud de

### Diseño y operación del sistema

El sistema utilizado en este estudio consiste de tres partes: (1) Fotobiorreactor rectangular ocupa un área de 9 m<sup>2</sup> de 2) Bomba de aire, modelo SC-3500; 3) Piedra difusora, manguera de 3 mm de diámetro y largo 3 metros, codos, llaves de paso. El fotobiorreactor está dentro un invernadero con malla semisombra al 50%, para captar calor, evitar la excesiva radiación solar especialmente en las estaciones de primavera, verano y proteger de la contaminación (lluvia, viento etc.). Para el mezclado y oxigenación de la microalga se utilizó una bomba de aire. El fotobiorreactor tiene forma rectangular ocupa una superficie de 9 m<sup>2</sup>; la producción de biomasa se calcula gramos de biomasa seca por litro cada siete días en las cuatro estaciones del año. El volumen del fotobiorreactor está diseñado para 162 litros de solución microalgal. El volumen total del fotobiorreactor es 0.144 m<sup>3</sup>, considera la profundidad de 0.2 m para la producción microalgas.

### Observación microscópica de *Arthrospira máxima*

Se utilizó microscopio binocular con cuatro objetivos, la lente utilizada fué 40x. Las imágenes se registraron con cámara de celular HUAWEI. La spirulina es una microalga verde azulada, su forma espiralada, color verde. Son microscópicas, son organismos procariotas, reproducción asexual, pared celular gram negativa, organismos fotosintéticos, poseen clorofila a, b y d, tilacoides, pigmentos como: ficocianina, ficoeritrina, capacidad de fijar nitrógeno

**Figura 1. Fotobiorreactor diseñado para el cultivo de *Arthrospira máxima* (Spirulina) dentro invernadero. Vista externa del biorreactor rectangular**



**Figura 2. Estructura espiralada de Arthrospira máxima en estación épocas estacionales de primavera, verano**



**Figura 3 Estructura espiralada de Arthrospira máxima en estación de Otoño**

**Figura 4 Vista microscópica de biomasa de Arthrospira máxima**

#### Crecimiento de A. máxima

El crecimiento de *A. máxima* se desarrolló en fotobiorreactor rectangular con 162 L de cultivo con una concentración inicial de 7 cm de turbidez medido con disco de secchi

#### Determinación de la biomasa

Para determinar la biomasa algal se utiliza el de disco de secchi para medir el grado de turbidez que es el indicador para cosecha.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 1: Influencia de la temperatura en producción de biomasa en las estaciones del año**

Estación del año	Temperatura °C				Producción de biomasa (gr/lit)
	1	2	3	4	
<b>Invierno</b>	14.6°C	17.56°C	23.68°C	19.5°C	0.21 gr/lit
<b>Primavera</b>	20.60°C	23.57°C	29.3°C	28°C	0.85 gr/lit
<b>Verano</b>	19.75°C	24.1°C	30.2°C	27.1°C	0,8 gr/lit
<b>Otoño</b>	17°C	22.24°C	26.61°C	25.34°C	0.68 gr/lit

La biomasa microalgal responde continuamente a la temperatura. La figura 5 muestra una relación estacional entre el crecimiento de la biomasa de A máxima y la temperatura de 23,52 °C como temperatura mínima a 30,2 °C (Tabla 1, Figura 5)

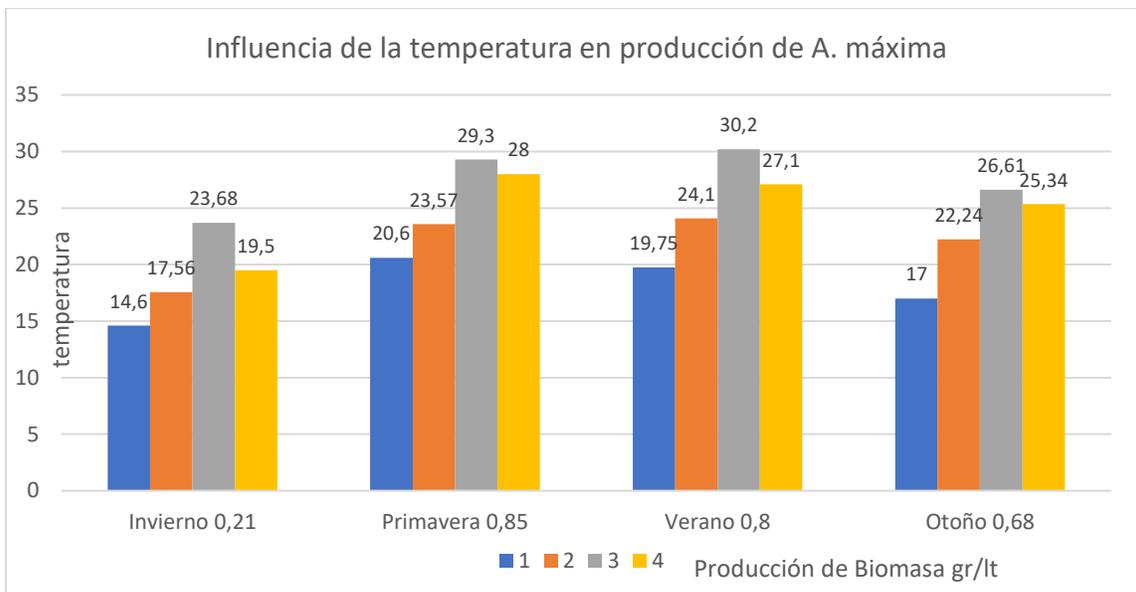


Figura 5: Variación de temperatura estacional en la producción de Arthrospira

Tabla 2: Productividad de biomasa de Arthrospira máxima

Tiempo	Factor de Producción biomasa peso seco diaria
92 días	34.5 gr
91 días	137.73
90 días	129.53 grs
92 días	110.35grs

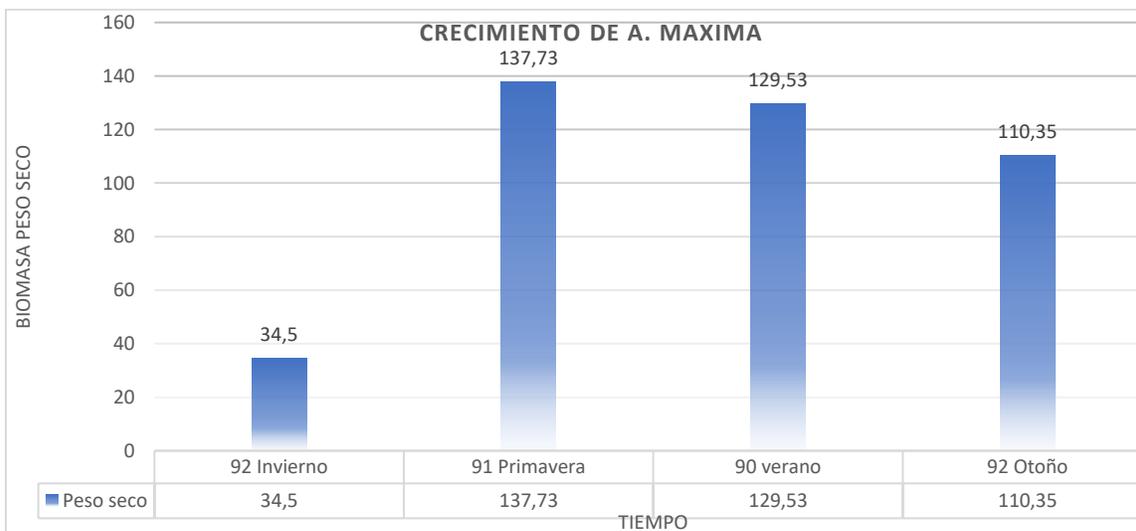


Figura 6: Crecimiento de Arthrospira máxima en fotobiorreactor rectangular

La relación del crecimiento de *A. máxima* en fotobioreactor rectangular en invernadero de *A. máxima* y la producción, varía de 0.68 gr/lt a 0.85 gr/lt, de un volumen de 162 lts ó 0.162 m<sup>3</sup>. La cosecha fue cada siete días. (Tabla2, Figura 6)

Los resultados presentan la productividad alcanzada bajo condiciones ambientales de la región de Cochabamba-Bolivia

## CONCLUSIONES

Los resultados indican que la temperatura estacional incide sobre el sistema de cultivo en fotobiorreactor rectangular bajo invernadero, afecta la productividad de *A. máxima* en invierno no es así en primavera, verano y otoño. Por lo tanto se puede optimizar el sistema de cultivo en fotobiorreactor rectangular bajo invernadero, evidenciada una productividad de biomasa 0.85 gr/lt, 0.8 gr/lt, 0.68 en primavera, verano y otoño respectivamente. La temperatura alcanzada durante el día mostró ser adecuadas para el cultivo de *A. máxima* en las estaciones de primavera, verano y otoño.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abalde, J., Cid A., Fidalgo P., Torres E, y Herrero C. (1995)

Fontes, A.G., Vargas, M.A., Moreno, J., Guerrero, M.G., Losada, M. (1991). Changes in the pigment content of *Anabaena variabilis* cells in outdoor culture. *Journal of Plant Physiology*, 137(4), 441 - 445.

Grobbelaar, J.U. (1994). Turbulence in mass algal cultures and the role of light/dark fluctuations. *Journal of Applied Phycology*, 6(3), 331-335.

Laws, E.A., Taguchi, S., Hirata, J., Pang, L. (1988). Optimization of microalgae production in a shallow outdoor flume. *Biotechnology and Bioengineering*, 32(2), 140-147.

Richmond, A. (1990). Large scale microalgal culture and applications. In: *Progress in Phycological Research* (eds F.E. Round & D.J. Chapman), pp. 269-330. Bioprocess, Bristol.

Richmond, A., Vonshak, A. (1978). *Spirulina Culture in Israel*. *Archiv für Hydrobiologie, Supplement*, 11, 274-280.

Sukenik, A. (2009). Photosynthetic performance of outdoor *Nannochloropsis* mass cultures under a wide range of environmental conditions. *Aquatic Microbial Ecology*, 56, 297-308.

Spirulife, Primer taller del cultivo de spirulina máxima, 2020.

Vonshak, A., Abeliovich, A., Boussiba, S., Richmond, A. (1982). Production of *Spirulina* biomass: effects of environmental factors and population density. *Biomass*, 2, 175-186.

Escuela Militar de Ingeniería

La Paz – Bolivia

## Evaluación del rendimiento de biodiesel obtenido a partir de microalgas nativas de la Bahía de Cohana empleando aguas residuales como medio de cultivo a nivel experimental

Aguilar Tintaya Melisa Lidia  
 Contacto: melisaaguilart@gmail.com

### Resúmen

El impacto ambiental negativo ocasionado por la producción y uso del diésel, así como del biodiesel de primera generación, ha motivado a indagar en alternativas, como el biodiesel a partir de microalgas que, integrado con el uso de aguas residuales como medio de cultivo es una vía prometedora como alternativa sostenible. El objetivo del presente estudio es, evaluar el rendimiento de biodiesel obtenido a partir de microalgas nativas de la Bahía de Cohana empleando agua residual láctea como medio de cultivo, para establecerse como una alternativa de biocombustible sostenible. Para su cumplimiento, fueron aislados los géneros *Chorella Acuminata* y *Scenedesmus sp*, a partir de cultivos mixtos obtenidos de la siembra de muestra de microalgas de la Bahía de Cohana; dichos géneros tras su escalamiento, fueron sometidos a distintos tratamientos con concentraciones diferentes de agua residual (100, 50 y 12,5%); evaluándose durante 14 días las condiciones del cultivo y disminución de los parámetros: nitrógeno total, fósforo total y DQO. La biomasa obtenida fue cosechada, secada y sometida a un proceso de extracción de aceite para la obtención de biodiesel, concluyéndose que del análisis estadístico el género *Chlorella Acuminata* es el nivel significativo para obtener mayor concentración de biomasa a ser empleada en la obtención de biodiesel, lográndose además, porcentajes representativos de remoción de fósforo total, nitrógeno y DQO (99,43%, 39,17% y 85,66% respectivamente); así también, es posible producir 250 ml biodiesel a partir de 463 g de biomasa de microalgas nativas con rendimiento del 93, 76 %.

**Palabras Clave.** Microalga, agua residual láctea, biodiésel, transesterificación, lípidos.

### INTRODUCCIÓN

La creciente dependencia a combustibles fósiles de uso automotor, que significan un riesgo al progresivo agotamiento del recurso petróleo y aporte a la contaminación atmosférica, ha motivado la ejecución de numerosas investigaciones relacionadas con la producción de combustibles alternativos de bajo impacto ambiental (Rodríguez et al., 2016).

El biodiésel ha surgido como una alternativa atractiva y viable para sustituir el diésel convencional, presentando diferentes ventajas al ser biodegradable y menos tóxico. Sin embargo, alternativas como el biodiesel de primera generación parecen no ser una solución total por los impactos

ambientales transversales que se generan durante su proceso de producción (Castillo et al., 2017).

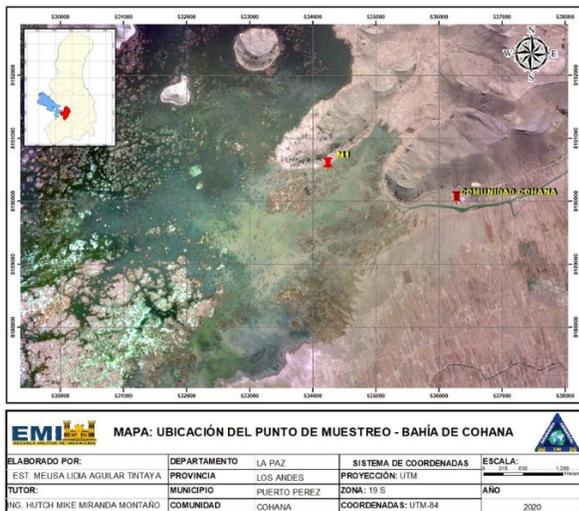
El biodiesel de tercera generación a partir de microalgas, es una solución cada vez más estudiada, por ser ambientalmente viable, sin embargo, aún no lo es en la dimensión económica. Para ello es importante la investigación de alternativas que reduzcan los costes de producción mediante la aplicación de vías sostenibles en sus procesos unitarios.

Por tanto, el presente trabajo busca evaluar el rendimiento de biodiesel obtenido a partir de microalgas nativas de la Bahía de Cohana empleando aguas residuales de la industria láctea como medio de cultivo, para

establecerse como una alternativa de biocombustible sostenible, frente al diésel y biodiésel de primera generación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La muestra de microalgas, se la obtuvo de La Bahía de Cohana, en coordenadas 534253.380 m. (19S) 8190581.608 m (Figura 1), esta se encuentra ubicada a orillas del Lago Titicaca, a cercanías de la comunidad Cohana, (municipio Puerto Pérez), a una altitud de 3.821 m.s.n.m, cuyas aguas de calidad D, tienen un elevado nivel de eutrofización, por su alto contenido en DBO<sub>5</sub>, N y P (Fontúrbel, 2005; BID, 2016).



**Figura 2.** Ubicación del punto de muestreo de microalgas Nativas. (Elaboración propia, 2021).

Se tomó 5 l de muestra, siguiendo el protocolo “método de toma de muestra directa de superficie”, propuesto por la Confederación Hidrográfica de Ebro, España (Ministerio de Medio Ambiente España, 2007).

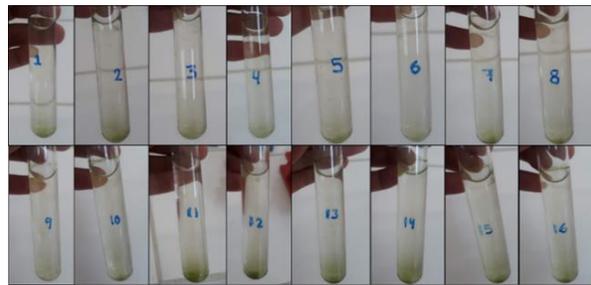


**Figura 2.** Toma de muestra de microalgas.

a) Colección de 5 l de muestra de microalgas. b) Muestra de microalgas colectadas

En instalaciones del laboratorio de Química de la Escuela Militar de Ingeniería EMI UALP, donde la muestra, fue filtrada con empleo de una malla de poliacrilonitrilo, obteniéndose una muestra sin restos visibles de otro material.

Seguidamente, se realizó un lavado de la muestra por centrifugación, en la centrifuga multipropósito DMO 636 DLAB, a una velocidad angular de 300 rpm para un tiempo de 20 min (se repitió el proceso seis veces).



**Figura 3.** Biomasa sedimentada tras la centrifugación.

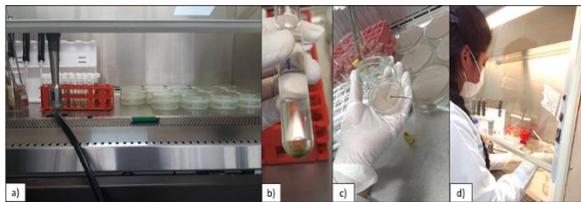
**Cuadro 1.** Componentes para la Preparación del Medio BG-11

#	Componente	Solución para 1 litro
1	Nitrato de amonio (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	1,4 g
2	Fosfato de sodio dibásico heptahidratado Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,05 g
3	Sulfato de Magnesio MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,075 g
4	Cloruro de Calcio CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,036 g
5	Ácido Cítrico C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	0,006 g
6	Cloruro de Hierro FeCl <sub>2</sub>	0,004 g

7	EDTA disódico de magnesio $MgNa_2 \cdot H_2O$	0,001 g
8	Carbonato de Sodio $Na_2CO_3$	0,02 g
9	Metales traza	1 ml
10	Agar Agar	15 g

El aislamiento de microalgas en medio sólido fue realizado en instalaciones del laboratorio de Microbiología dependiente del Instituto de Investigación Ciencia y Tecnología - IICYT de la EMI UALP. Para el mismo, se preparó el medio de cultivo BG-11, el cual utiliza concentraciones muy altas de nitrato y fosforo (Solano, 2017), en este sentido, se tomó como base, las proporciones indicadas según bibliografía (cuadro 1), para la preparación de 1 litro de medio de cultivo.

Una vez gelificado el medio de cultivo, se procedió a la siembra de microalgas, por rayado en estrías. El procedimiento se lo realiza según bibliografía (Arredondo y Voltolina, 2014).

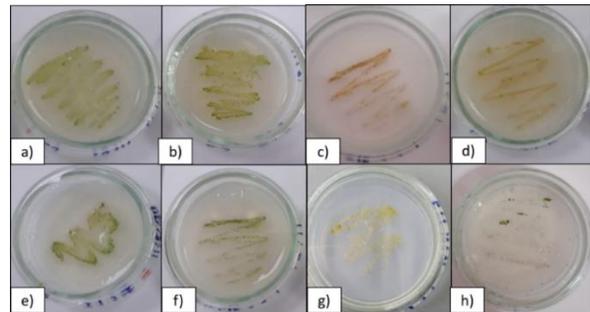


**Figura 3.** Siembra de microalgas en placas de agar. a) Materiales y equipos para la siembra en placas de agar. b) Concentrado de microalgas producto del lavado por centrifugación. c) y d) Barrido de 10  $\mu l$  de inóculo por estriado en medio sólido.

Por su parte, la identificación de géneros presentes en los cultivos en placas de agar, con base a sus características morfológicas, se lo realizó al interior de la cámara de flujo laminar; tomando como referencia el libro "Algas de Bolivia con énfasis en fitoplancton".

A fin de tener cultivos mono-específicos y axénicos, el aislamiento fue realizado siguiendo el protocolo del Manual de Microbiología General y Farmacéutica de la

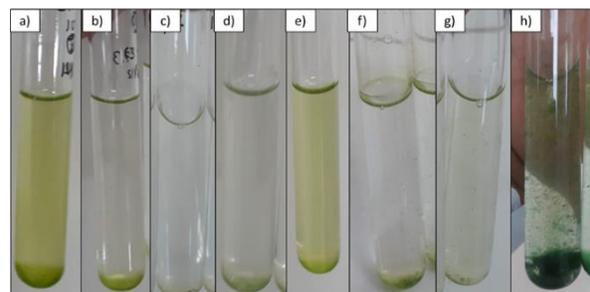
Universidad Nacional de San Luis (FQByF, 2017); inoculando en presencia de un mechero en el medio de cultivo preparado. Las 27 cajas Petri con géneros aislados fueron colocadas al interior de la incubadora, a temperatura controlada de 25 °C, y flujo luminoso de 650 lm, por un tiempo de 22 días.



**Figura 5.** Cajas Petri con Géneros Aislados

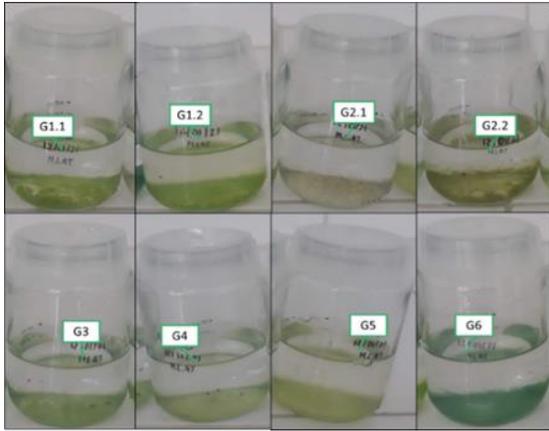
a) *Chlorella Vulgaris* b) *Chlorella Acuminata* c) *Nitzschia* sp. d) *Nitzschia Palea* e) *Ankistrodesmus falcatus* f) *Coelastrella* sp g) *Scenedesmus* sp h) *Komvophoron* sp

Las fases de escalamiento: cepa de trabajo (100 ml), primer escalado (350 ml) y segundo escalado (1 l), han sido realizadas en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del IICYT/ UALP, debido a que sus instalaciones contaban con control automático para el fotoperiodo luz/oscuridad (8:16).



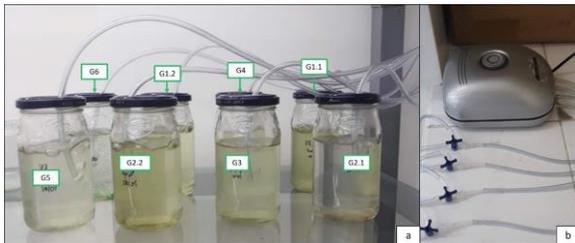
**Figura 6.** Cultivos en tubos de ensayo de 10 ml con géneros aislados, día 22.

a) *C. Vulgaris* b) *C. Acuminata* c) *N. sp.* d) *N. Palea* e) *A. falcatus* f) *C. sp* g) *S. sp* h) *K. sp.*



**Figura 7.** Géneros aislados escalados a 100 ml.

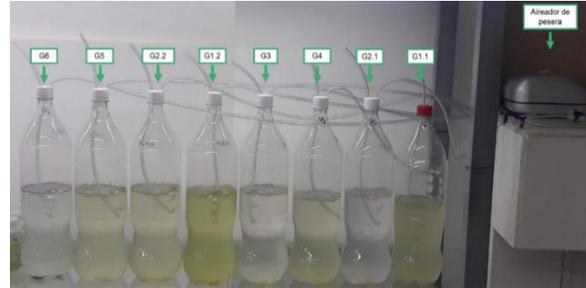
Las condiciones del cultivo escalados a 100 ml fueron: flujo luminoso 900 lm (proporcionado por un foco LED de 9W); temperatura del laboratorio oscilante entre 19 a 22 °C, fotoperiodo luz: oscuridad 16:8 y agitación manual realizada de manera periódica, por 6 días



**Figura 4.** Sistema de cultivo de géneros aislados en 350 ml.

a) Cultivos escalados a 350 ml. b) Sistema de suministro de aire para la agitación.

Las condiciones del cultivo escalado a 350 ml, durante 8 días, fueron: flujo luminoso 900 lm (promocionado por un foco LED de 9W); temperatura del laboratorio oscilante entre 19 a 22 °C, fotoperiodo luz: oscuridad 16:8 y agitación mecánica contante proporcionado por una bomba de aire.

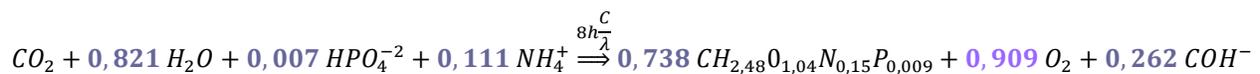


**Figura 9.** Sistema de cultivo de géneros aislados en 850 ml.

Las condiciones del cultivo a 850 ml, durante 15 días, fueron: flujo luminoso de 900 lm; temperatura del laboratorio oscilante entre 19 a 22 °C, fotoperiodo luz: oscuridad 16:8 y agitación mecánica contante proporcionado por una bomba de aire (con caudal por cultivo de 11,35 m/s).

Escalado los cultivos de microalgas, se procedió al diseño del fotobiorreactor a fin de obtener una gran cantidad de biomasa, para lo cual se empearon las siguientes ecuaciones:

**Ecuación 1.** Reacción balanceada de la producción de biomasa de microalgas



**Ecuación 2.** Ecuación del crecimiento cinético respecto a la irradiancia

$$\mu_{max}(t - t_0) = \ln\left(\frac{X}{X_0}\right) + \frac{I_K}{I_0} \cdot [K_a(0,8D)(X - X_0) + (e^{-K_a(0,8D)X} - e^{-K_a(0,8D)X_0})]$$

**Ecuación 3.** Ecuación del consumo del sustrato limitante

$$\mu_{max}(t - t_0) = \left( \frac{K_S}{\left(S_0 + \frac{X_0}{Y_{XS}}\right)} + 1 \right) \ln \left( \frac{Y_{XS}(S_0 - S)}{X_0} + 1 \right) - \left( \frac{K_S}{S_0 + \frac{X_0}{Y_{XS}}} \right) \cdot \ln \left( \frac{S}{S_0} \right)$$

Para finalmente obtener la ecuación del volumen del reactor:

**Ecuación 4.** Ecuación del volumen del reactor

$$V = \frac{\mu_{max}(t - t_0) - \ln \left( \frac{Y_{XS}(S_0 - S)}{X_0} + 1 \right)}{\frac{K_S}{S_0 + \frac{X_0}{Y_{XS}}} \cdot \left( \ln \left( \frac{Y_{XS}(S_0 - S)}{X_0} + 1 \right) - \ln \left( \frac{S}{S_0} \right) \right)}$$

Remplazando los valores empleados para las simulaciones, en el software Mathcad Express Prime 6.0.0.0, se obtiene un volumen de 8,135 l  $\approx$  8l.

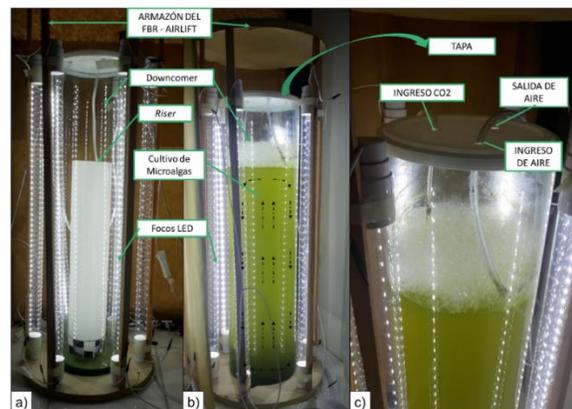
Cuadro 2. Valores empleados para la determinación del volumen del FBR

Item	Magnitud	Fuente	Unidades	Magnitud empleada
$X_0$	0.03 - 0.01	Giraldo, 2013	g/l	0,02
$Y_{XS}$	0,5	Martos, 2011	g biomasa / g $CO_2$	0,562
$t_0$	0,1	Propio estudio	día	0,1
$\mu_{max}$	0,331	Sandoval, 2013	1/día	0,1158
$K_S$	0,007-0,0009	Sánchez, 2019	g $CO_2$ /l	0,001
$S_0$	1.358	Sandoval, 2013	g $CO_2$ /l	1,001
S	0,251	Propio estudio	g $CO_2$ /l	0,859

Cuadro 3. Valores adoptados para las dimensiones del fotobiorreactor

Dimensiones del reactor		
Altura del downcomer	( $H_d$ )	60 cm
Altura del líquido	( $H_L$ )	45 cm
Altura del riser	( $H_r$ )	36 cm
Altura del fondo	( $H_f$ )	3,6 cm
Altura separador gas – líquido	( $H_s$ )	5,4 cm
Diámetro del downcomer	( $D_d$ )	15 cm
Diámetro del riser	( $D_r$ )	10,61 cm
Área del downcomer	( $A_d$ )	176,71 cm <sup>2</sup>
Área del riser	( $A_r$ )	88,41 cm <sup>2</sup>

Por las características de diseño del fotobiorreactor seleccionado, este no requirió de agitación mecánica, ya que es remplazado por los sistemas de suministro de aire y  $CO_2$ , los cuales fueron introducidos por la parte inferior del riser. Es debido a que el riser es la sección que canaliza el flujo de aire y  $CO_2$ , dando paso a la mezcla gas-líquido generando flujo ascendente y el downcomer da el espacio para el flujo descendente.



**Figura 10.** Componentes del FBR y funcionamiento

Las aguas residuales empleadas como medio de cultivo en el crecimiento de microalgas nativas de la Bahía de Cohana

para la producción de aceite aplicado a biodiesel pertenecen a la industria de productos lácteos artesanales “Flor de Leche”, ubicada en el municipio de Achocalla. En total, la empresa dotó de 40 litros de agua residual, las cuales fueron dispuestas en bidones de 10 l y cerradas herméticamente hasta su traslado al laboratorio.

Con el fin de que el biodiesel obtenido por transesterificación pueda constituirse en una alternativa de biocombustible sostenible de bajo impacto ambiental, se consideró el establecimiento de dos sistemas de cultivo de microalgas: con empleo de agua residual sin diluir y diluida, de acuerdo a los porcentajes 100%, 50% y 12,5 %.

Se definieron los factores, niveles y replicas para el la construcción del diseño experimental, determinándose que el apropiado es del tipo “factorial asimétrico fraccionario”. Por tanto, para su aplicación se empleó el software Minitab 19 TRIAL, obteniéndose un total de 54 corridas, sin embargo, se aplicó un diseño optimizado en función a la cantidad de reactores disponibles, siendo las corridas reducidas a 9.

Cuadro 4. Factores y niveles considerados para el diseño experimental

Factor	COD.	Niveles	
			Especificación
a	G1	a <sub>1</sub>	<i>Chlorella acuminata</i>
	G5	a <sub>2</sub>	<i>Scenedesmus sp</i>
	C	a <sub>3</sub>	Consortio
b	X <sub>01</sub> X <sub>02</sub>	b <sub>1</sub>	0,03 g/l
		b <sub>2</sub>	0,02 g/l
c	S <sub>01</sub> S <sub>02</sub> S <sub>03</sub>	c <sub>1</sub>	0,0525 g/l
		c <sub>2</sub>	0,0285 g/l
		c <sub>3</sub>	0,0057 g/l

Cuadro 5. Características de cada reactor en función a las corridas experimentales

Reactor	Combinación de tratamientos	Género	X <sub>0</sub> g/l	S <sub>0</sub> g/l
R1	a1 b1 c1	<i>Chlorella acuminata</i>	0,03	0,0525

R2	a2 b1 c1	<i>Scenedesmus sp</i>	0,03	0,0525
R3	a3 b2 c1	Consortio	0,02	0,0525
R4	a1 b2 c2	<i>Chlorella acuminata</i>	0,02	0,0285
R5	a2 b2 c2	<i>Scenedesmus sp</i>	0,02	0,0285
R6	a3 b1 c2	Consortio	0,03	0,0285
R7	a1 b2 c3	<i>Chlorella acuminata</i>	0,02	0,0057
R8	a2 b2 c3	<i>Scenedesmus sp</i>	0,02	0,0057
R9	a3 b1 c3	Consortio	0,03	0,0057



Figura 11. Sistema de producción de biomasa de microalgas

Para la cosecha de biomasa, se optó por la aplicación del método, sedimentación por gravedad. El proceso consistió en retirar la aireación de los reactores, a fin de dejar sedimentar la biomasa por un tiempo aproximado de 2 h a 3 h.

Sedimentada la biomasa, se extrajo el medio de cultivo, por medio de la técnica de sifonamiento, recuperándose por reactor un volumen aproximado de 500 ml de biomasa concentrada con medio.

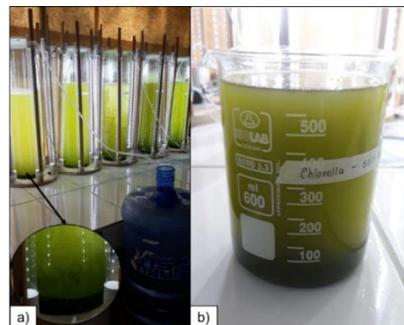
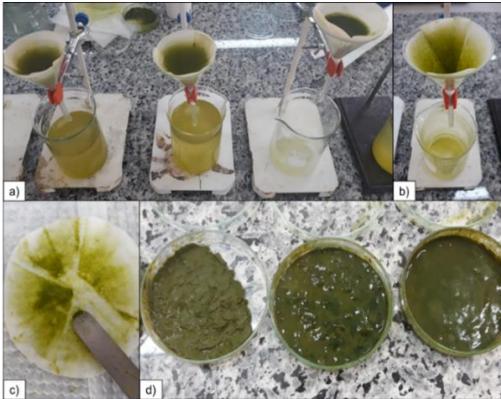


Figura 12. Recolección masiva de biomasa – técnica de sedimentación por gravedad.

Seguidamente, 500 ml de muestra con biomasa concentrada, fue filtrada para finalmente extraer la biomasa con la espátula por barrido.



**Figura 13.** Proceso de filtración de biomasa.

a) Sistema de filtración de biomasa. b) Retirado de biomasa del papel filtro. c) Biomasa filtrada.

Obtenida la biomasa filtrada, el proceso de secado, se lo realizó por la técnica de deshidratación al sol, por ser sencillo y económico. El tiempo de secado fue de 6 horas máximo y 4 h mínimo. Finalmente, la biomasa seca fue sometida a un proceso de trituración mecánica con ayuda de un mortero de porcelana.



**Figura 14.** Biomasa de microalgas seca y triturada

a, d y g: Biomasa seca de *Chlorella acuminata* reactores 1, 4 y 7; b, e y h: Biomasa seca de *Scenedesmus sp*

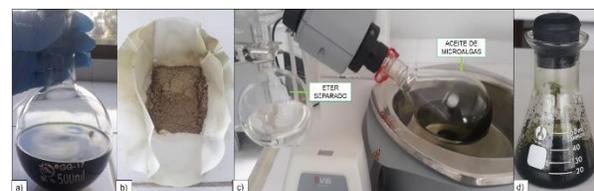
reactores 2, 5 y 8; d, f e i: Biomasa seca consorcio reactores 3, 6 y 9; j: Biomasa seca obtenida directamente de la Bahía de Cohana.

Para la lisis celular, se aplicó el método de ruptura química, siendo esta según Barajas, et, al. (2014) la vía óptima si se emplea HCl a una concentración de 0,5 M durante 30 min de exposición a temperatura ambiente.

Seguidamente, la extracción del aceite se lo ejecutó por el método Soxhlet con aplicación de un solvente químico es considerado una técnica que brinda buenos resultados En este método, se recomienda el uso de éter por ser un solvente no polar selectivo, al extraer lípidos no polares de las microalgas, como los triglicéridos, que son ideales para la producción de biodiésel (Salazar, 2012).



**Figura 15.** Sistema de extracción de aceite de microalgas con empleo del equipo Soxhlet



**Figura 16.** Obtención del aceite de microalgas

a) Muestra solvente: aceite. b) Biomasa tras la extracción del aceite. c) Aceite y disolvente separados. d) Aceite de microalgas.

El proceso de transesterificación se lo realizó con base a Aullon (2010), que, de acuerdo al tipo de catalizador, el método es del tipo catálisis básica. Considerando que la concentración del reactivo NaOH debe oscilar de 0,4 al 2% p/p de aceite obtenido.

Considerando una relación molar de aceite/metanol de 1:6, una concentración de 0,75 % p/p de NaOH, además del peso molecular teórico del aceite de microalgas de 857 g/mol (Aullon, 2010), la densidad del metanol de 0,79 g/cm<sup>3</sup> y peso del aceite de 213,50 g aceite, se calculó la cantidad de alcohol e NaOH requerido.

Seguidamente se realizó la separación de la capa ligera (biodiesel) de la glicerina formada, vertiendo la solución reaccionada al embudo de decantación y se dejó en reposo por 24 horas, pasado el tiempo, se observó dos capas: la inferior (glicerina) y la superior (biodiesel).

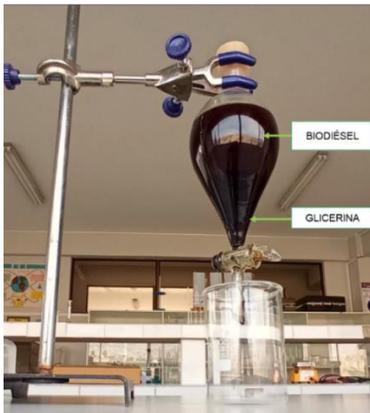


Figura 17. Separación Biodiesel - Glicerina

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los 28 cultivos mixtos de microalgas de la Bahía de Cohana sembradas en medio BG-11 sólido, tras 22 días de incubación no mostraron presencia de contaminación por hongos o bacterias, sin embargo, la proliferación de colonias fue distinta, siendo el día 22 en el cual se observó la presencia de microalgas en casi todas las cajas Petri.

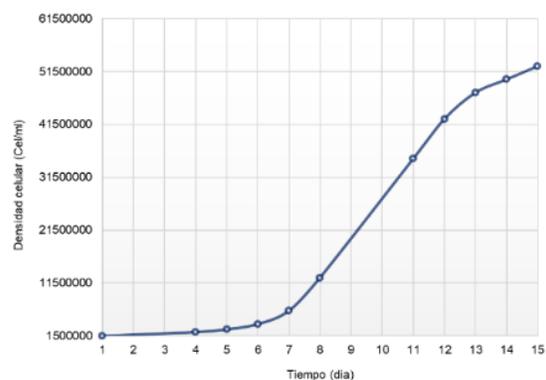
De acuerdo con Arredondo y Voltolina (2014) el tiempo teórico de aparición de

colonias en medio sólido oscila entre el día 4 al 10. Sin embargo, Barsanti & Gualtieri (2014) mencionan que, tras cultivar las microalgas a un entorno artificial en medio de cultivo sintético, se produce un proceso de adaptación y/o selección, durante el cual el crecimiento de la población no ocurre o es muy lento.

La identificación de géneros de microalgas de colonias presentes en los cultivos mixtos por medio de la comparación de sus características morfológicas, con base en fuentes bibliográficas, permitió el reconocimiento de ocho especies distintas, pertenecientes a seis géneros: *Chlorella Vulgaris*, *Chlorella acuminata*, *Nitzschia sp.*, *Ankistrodesmus Falcatus*, *Coelastrella sp*, *Scenedesmus sp* y *Komvophoron sp*.

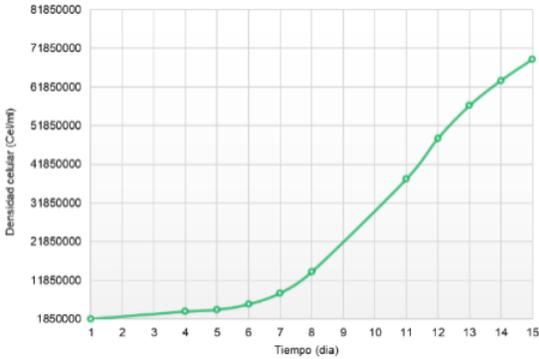
La identificación de géneros de microalgas en los cultivos mixtos, conjuntamente con el método de aislamiento empleado, permitió obtener 27 cajas Petri con cultivos mono-específicos y axénicos; donde, el tiempo de incubación reafirma lo mencionado por Barsanti & Gualtieri (2014), ya que indican que los géneros de microalgas aún continúan adaptándose al medio sintético.

En los cultivos escalados a 100 ml, se observó que para el día 6 el aumento de la densidad de las microalgas era notorio, indicando su adaptación al medio sintético BG-11; y de ocho días en cultivos escalados a 350 ml.

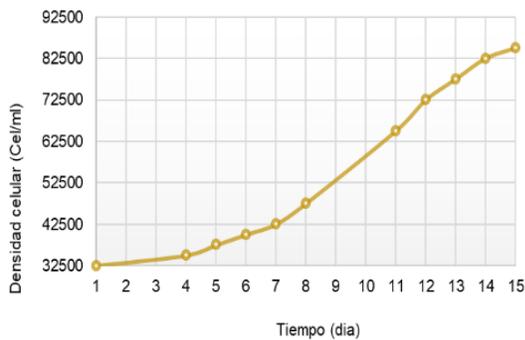


**Figura 18.** Curvas de crecimiento *Chlorella Vulgaris*.

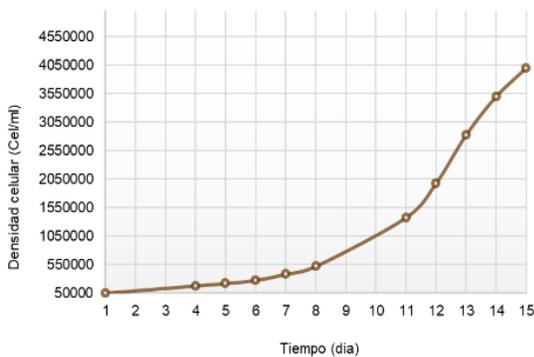
De la cuantificación realizada con empleo de la cámara de recuento de Newbauer en cultivos escalados a 850 ml, se construyó la curva de crecimiento para cada género aislado, mismos que son mostrados a continuación.



**Figura 19.** Curvas de crecimiento *Chlorella Acuminata*.



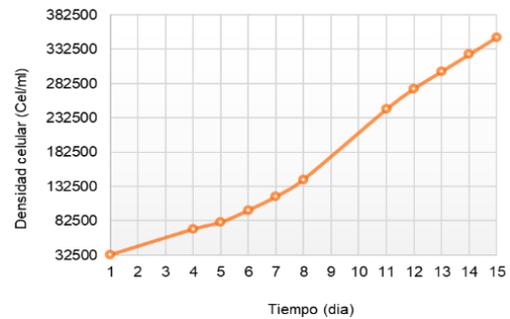
**Figura 20.** Curvas de crecimiento *Nitzschia sp.*



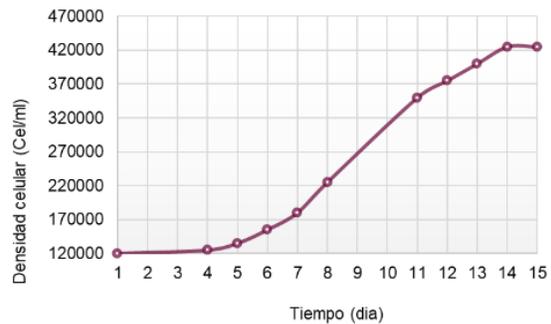
**Figura 21.** Curvas de crecimiento *Nitzschia Palea*



**Figura 22.** Curvas de crecimiento *Ankistrodesmus falcatus*



**Figura 23.** Curvas de crecimiento *Coelastrella sp.*



**Figura 24.** Curvas de crecimiento *Scenedesmus sp.*



**Figura 25.** Curvas de crecimiento *Komvophoron sp.*

Los géneros que contienen en su estructura celular un mayor porcentaje de lípidos, son: *Chlorella* (14 – 22 %) y *Scenedesmus* (12 – 28 %), a ellos les sigue el género *Ankistrodesmus* y *Coelastrella* donde ambos alcanzan un porcentaje en lípidos de hasta el 16 %, a ello se debe la elección de los dos primeros géneros mencionados para su escalado a 8 l en fotobiorreactores.

La determinación del incremento de biomasa en los fotobiorreactores por medio de la técnica de peso seco permitió construir la curva de crecimiento de las microalgas del tipo logístico, siendo evidenciable las fases: adaptación y exponencial, principalmente, comprobándose, además, que efectivamente los valores de incremento de pH a valores óptimos coinciden con la fase exponencial de las microalgas.

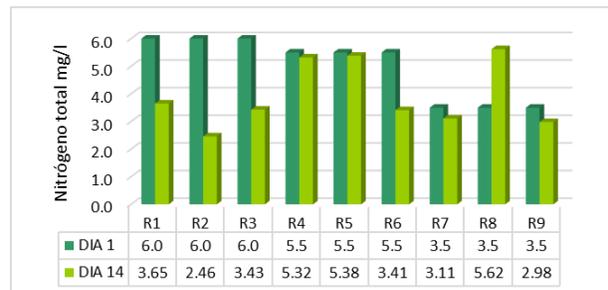
La concentración de fósforo total, alcanzó disminuciones considerables durante los 14 días de funcionamiento del sistema. Cabe recalcar, la relación existente entre la fase del cultivo (exponencial) con la concentración de nutriente disminuido, que parece confirmar la influencia de los procesos biológicos en la eliminación de nutrientes. Siendo el reactor R1 con cultivo *Chlorella Acuminata* el que presentó mejores resultados, con una reducción en la concentración de fósforo total del 99,43% respecto al inicial.



**Figura 26.** Reducción en la concentración de fósforo total

En los resultados obtenidos del análisis de nitrógeno total se observa que los mayores porcentajes de remoción se dio en los reactores 2, 3, 1 y 6, con el 59,00%, 42,83%, 39,17% y 38,00% respectivamente.

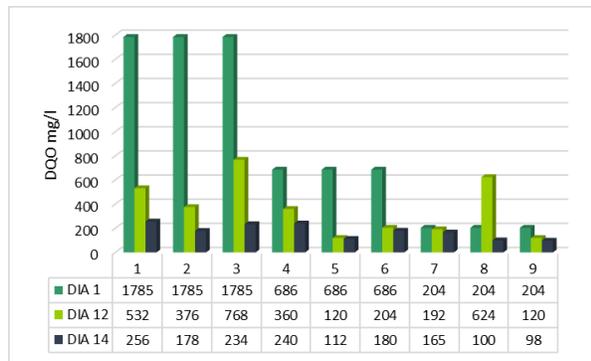
Se observa, por tanto, que en los reactores que fueron sometidos al 100% de agua residual láctea como medio de cultivo, se obtuvieron mayores porcentajes de reducción, en comparación a los porcentajes alcanzados en reactores donde se diluyó el agua residual con agua de lluvia, donde se observaron porcentajes de reducción inferiores al 14% a excepción del reactor 6.



**Figura 27.** Nitrógeno total presente en los cultivos respecto al día

Los resultados obtenidos del análisis de DQO, se observan que el mayor porcentaje de remoción de DQO se obtuvo en los reactores 1, 2 y 3, con un 85,66%, 90,03% y 86,89% respectivamente.

Por su parte, los reactores donde fueron realizadas las diluciones al 50 y 12,5 % presentan un menor porcentaje de remoción



**Figura 28.** Remoción del DQO

La colecta masiva de biomasa con aplicación de la sedimentación por gravedad, combinado con la técnica de sifonamiento facilitó la recolección de biomasa de microalgas cultivadas bajo distintos tratamientos en reactores, siendo la única desventaja del proceso el tiempo que demandó (5 días).

Por otro lado, de la extracción del aceite de microalgas por el método Soxhlet (empleando siete corridas del solvente) y separación solvente: aceite con rotavapor, se logró obtener la relación de cantidad de biomasa requerida para producir un ml de aceite, considerando que a partir de 35,366 g de biomasa se obtuvo 19,1 ml de aceite de microalgas.

La aplicación del método catalítico: catálisis básica, para el proceso de transesterificación con adición de metanol como alcohol, dio lugar a la obtención de 244 ml de biodiésel y 47 ml de glicerina a partir de 250 ml de aceite (213,50 g de aceite) extraído de 463 g de biomasa de microalgas.

Es posible la remoción de N, P y DQO en 10840 l aguas residuales de una industria láctea, al ser empleada como medio de cultivo de microalgas nativas de la Bahía de Cohana y obtener 1897 g de biomasa necesaria para ser empelada en la producción de un litro de biodiesel con un rendimiento de obtención del 93,76 %, aplicando 248,14 ml metanol y 6,561 g de

NaOH por litro de biodiesel. Cumpliéndose la  $H_A$ , y siendo comprobada la hipótesis formulada

## CONCLUSIONES

De las microalgas muestreadas de la Bahía de Cohana, se han asilado y escalado ocho especies distintas pertenecientes a 6 géneros: *C. Vulgaris*, *C. acuminata*, *N. sp*, *N. Palea*, *A. Falcatus*, *C. sp* y *S. sp*.

Del análisis estadístico de datos y resultados obtenidos se determina que el género *C. acuminata* es el nivel más significativo para obtener mayor concentración de biomasa a ser empleada para la obtención de biodiesel (0,175 g/l el día 14) si se emplea como medio de cultivo agua residual láctea al 100%, además del logro de porcentajes representativos de remoción de fósforo total, nitrógeno y DQO (99,43%, 39,17% y 85,66% respectivamente).

Es posible producir 250 ml biodiesel a partir de 463 g de biomasa de microalgas nativas de la Bahía de Cohana, a partir de un proceso de transesterificación del aceite obtenido con aplicación de la catálisis alcalina con 1,601 g de NaOH y 60,547 ml metanol, cumpliendo la relación molar 6:1 de metanol: aceite.

## REFERENCIAS

- Barsanti, L. & Gualtieri, L. (2014). *Algae Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. Instituto di Biofísica. Pisa, Italy: CRC Press.
- Barajas, A. et al. (2014). *Bioprospección de microalgas colombianas para la producción de biodiesel*. Centro de Investigaciones para el Desarrollo Sostenible en Industria y Energía, Universidad Industrial de Santander.
- Salazar, L. (2012). *Evaluación de métodos de extracción de aceite de microalgas para la producción de biodiesel*. Universidad de Piura, Facultad de Ingeniería: Área Departamental de Ingeniería Industrial y la Sistemas.

Universidad Mayor de San Simón  
Laboratorio de Fitopatología  
Centro de Tecnología Agroindustrial  
Fundación PROINPA  
Promoción e Investigación de Productos Andinos

Cochabamba-Bolivia

## Control biotecnológico del mildiu de la quinua

Rocío Mendez<sup>1</sup>; Giovanna Plata<sup>2</sup>; Antonio Gandarillas<sup>2</sup>; Bernardo López<sup>1</sup>; Nelson Hinojosa<sup>1</sup>  
Contacto del Autor: [rociomendez@fcyt.umss.edu.bo](mailto:rociomendez@fcyt.umss.edu.bo)

### Resumen

La producción de quinua orgánica en Bolivia se realiza principalmente en la zona del Altiplano dividido en Altiplano Sud, Norte y Centro, así como la zona de los valles en menor proporción que la anterior.

Debido a las características climáticas del Altiplano Norte, con mayor humedad respecto al resto de las zonas productoras, la producción de quinua se ve afectada en gran parte por el mildiu causado por el hongo *Peronospora variabilis* cuyo efecto es la defoliación de la planta. Por lo que se planteó el uso de extractos acuosos como se desarrolla en otros cultivos para el control de enfermedades foliares.

Los tratamientos fueron aplicados a plantines de invernadero. Al 95 % de confianza se ha establecido que el mejor tratamiento fue el extracto de ortiga aplicado al 0.2 % (P/V) con una velocidad de avance igual a 1.71 comparada con el testigo igual a 6.04, lo que equivale al 71.69 % de respuesta al tratamiento.

**Palabras clave:** *Mildiu, Quinua, Extractos Acuoso, Trichoderma sp.*

### INTRODUCCIÓN

La quinua es un producto de alto valor alimenticio debido a su elevado contenido de proteína, se la considera un pseudocereal por no ser parte de la familia de las *gramíneas*, a la que pertenecen los cereales. La quinua fue cultivada en los Andes bolivianos, peruanos, ecuatorianos y argentinos, al igual que la papa se constituye como uno de los principales alimentos de los pueblos andinos preincaicos e incaicos.

Las condiciones de crecimiento son variables, crece desde el nivel del mar en el Perú, hasta los 4000 m. de altura en la cordillera de los Andes, y se conoce que a mayor altura se favorece la producción.

La producción de quinua es afectada por diversos factores, uno de ellos es el ataque del

mildiu cuyo agente causal es *Peronospora variabilis*, con el fin de mantener a Bolivia como uno de los principales productores de quinua orgánica, es necesario desarrollar estrategias de manejo de esta enfermedad. Debido al surgimiento de nuevas enfermedades (alergias, problemas gástricos y otros) en la sociedad la población fue adquiriendo conciencia y preferencia por alimentos orgánicos, es decir, productos que no contengan agentes químicos sintéticos. Por lo mencionado, el presente trabajo propone desarrollar un control biotecnológico que permita garantizar la producción limpia (sin aplicación de plaguicidas de origen) de quinua.

### MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de Extractos

Se empleó un equipo de hidrodestilación en el cual se procedió con la siguiente metodología:

- 1) Triturar la materia prima.
- 2) Pesarse en una balanza la materia triturada e introducir en el equipo de hidrodestilación hasta unos 5 cm. por encima del enchaquetado.
- 3) Luego agregar agua destilada y con la ayuda de una probeta registrar la cantidad de agua hasta 1 cm. por encima de la chaqueta.
- 4) Hacer funcionar el equipo hasta observar la ebullición por unos 20 minutos y cortar el calentamiento.
- 5) Dejar reposar hasta que alcance temperatura ambiente y luego filtrar el extracto obtenido con algodón y posteriormente con papel filtro.
- 6) Introducir el filtrado en una botella y guardar refrigerado a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su aplicación.

El material vegetal empleado corresponde a plantas en estado fresco y las proporciones que se emplearon fueron las siguientes:

- Hojas de Papaya 350 g. para 2.5 litros de agua.
- Manzanilla 930 g. para 2 litros de agua.
- Cola de Caballo 450 g. para 2 litros de agua.
- Ortiga 500 g. para 2.5 litros de agua.
- Té Verde 200 g. para 2 litros de agua.
- Wira Wira 220 g. para 2 litros de agua.

### Multiplicación e inoculación natural de las plantas

Para estandarizar el protocolo se trabajó con una variedad susceptible (**Pisancalla**) y posteriormente con una variedad resistente (**Kurmi**).

Se utilizaron macetas de 10 x10 cm. se sembró en sustrato estéril aproximadamente 6 semillas regándose diariamente hasta que la planta alcanzó una altura de 10 a 15 cm.

Posteriormente, las plantas fueron colocadas en la cámara húmeda donde se le dio las condiciones favorables de humedad y temperatura del patógeno.

### Preparación de inóculo

Para el inóculo, se recolectaron hojas enfermas de plantas de quinua de parcelas de agricultor con alta incidencia en el Altiplano de Oruro. Estas hojas fueron colectadas y colocadas en una cámara húmeda. Se seleccionaron grupos de cinco hojas naturalmente enfermas, se las introdujo en tubos Falcon con aproximadamente 5 ml de agua destilada estéril, inmediatamente se agitó manualmente para lavar las esporas del envés de las hojas. Una vez obtenida la solución fue filtrada con la ayuda de una gasa y con un hemacitómetro se la concentró a  $1 \times 10^5$  esporangios/ml.

### Tratamiento en Invernadero

Una vez que las plantas alcanzaron una altura entre los 10 a 15 cm, con la ayuda de un gotero, se inocularon tres hojas /planta (**Figura 1**). Las plantas inoculadas con la enfermedad fueron colocadas dentro de bolsas plásticas de color negro para estimular la apertura de los estomas y favorecer el ingreso del patógeno. Transcurridas las 24 horas se quitó la bolsa y se las dejó en una cámara húmeda (ambiente con riego por nebulización cada 3 horas) por 5 días, tiempo en el cual la enfermedad alcanza normalmente una severidad entre el 5 al 15%.



**Figura 1.** Secuencia de inoculación de plantas de quinua con mildiu.

Inmediatamente, se procedió a aplicar los extractos en diferentes concentraciones: pura y diluida. La aplicación se realizó con un aspersor para lograr una buena distribución y adherencia del extracto en las hojas.

Previa a la inoculación se cuantificó la severidad inicial en cada una de las plantas, una vez realizado el tratamiento, se procedió a evaluar diariamente el avance de la enfermedad (severidad) durante una semana siguiendo el protocolo de Danielsen (2004).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados obtenidos:

### Obtención de extractos acuosos vegetales

Se obtuvieron extractos acuosos de las especies seleccionadas y se estudió su efecto sobre la enfermedad, para lo cual se aplicaron en plantines dentro de un vivero en condiciones controladas de humedad con cinco repeticiones escogidas al azar. Las pruebas de extracción de los principios activos se realizaron con material vegetal fresco. A partir de la respuesta obtenida con el tratamiento aplicado en los plantines de vivero, se procedió a la formulación de preparados con los extractos en el orden del 0,2, 0,3, y 0,4 % (P/V).

Para obtener el extracto crudo libre de agua, se sometió a un proceso de liofilización y de esta forma determinar el rendimiento del proceso de extracción, los resultados se resumen en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Obtención de extracto crudo liofilizado por gramo de material vegetal.

N°	Extracto	Volumen para liofilizado (ml)	Masa de extracto crudo liofilizado	Masa de materia vegetal (g)	Volumen de agua de extracción (ml)	Rendimiento en % (g extracto/ g planta)
1	Hojas de	75	1.1975	558.05	4000	11.44
2	Manzanilla	75	1.52	968.90	3500	7.32
3	Cola de	75	0.48	500	3500	4.48
4	Ortiga	75	0.8225	663.5	3000	4.96
5	Wira Wira	100	0.71	88.22	2500	20.12
6	Té Verde	100	3.02	197.15	2500	38.04

**Fuente:** Elaboración propia.

Según los resultados anteriormente presentados se tienen elevados rendimientos en el proceso de extracción, específicamente para el té verde con 38.04 %, la wira wira con 20.12 % y las hojas de papaya con 11.44 %.

### **Comparación de resultados de acuerdo a la concentración aplicada**

Con el fin de establecer el efecto de la concentración en el avance de la enfermedad, a continuación, se comparan los resultados de la aplicación de extractos en la misma concentración:

Comparando la respuesta de la enfermedad al aplicar los extractos en la concentración de 0.2% se puede observar que el mejor control reportado es del extracto de ortiga con 71.63 de porcentaje de respuesta, cuyo control tiene su mayor efecto en los dos primeros días, tiempo en el cual la enfermedad no presenta ningún avance. Seguido por la manzanilla con 42.79 % donde se observa que el mayor control se presenta entre el primer y tercer día.

En el caso de los extractos aplicados al 0.3 % (P/V) se puede observar nuevamente que el extracto de ortiga es el que mejor control reporta con 53.90 %, presentando un comportamiento ascendente con respecto al avance de enfermedad, pero en menor proporción que el testigo. Seguido de la cola de caballo con 28.37 % y té verde con 17.02 %, cuyo comportamiento es similar al de la ortiga, notándose que el cuarto día se presenta un incremento notable de enfermedad para ambos casos. Así mismo se puede afirmar que el efecto de los extractos aplicados en esta concentración tiene menor porcentaje de respuesta que los extractos aplicados al 0.2 % (P/V).

La evaluación de la respuesta de la enfermedad al aplicar los extractos acuosos al 0.4 % (P/V) establece al extracto de ortiga como el que mejor control reporta con 43.74 % seguido de la cola de caballo con 26.32 %.

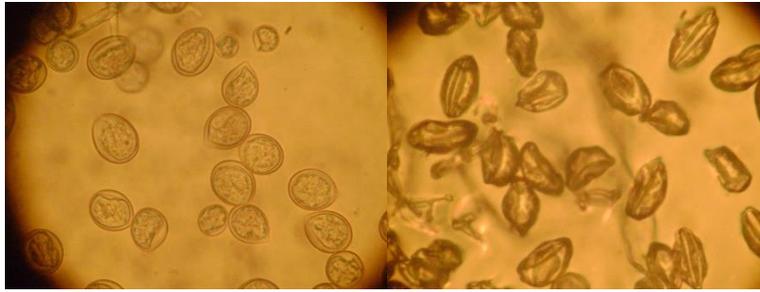
Comparando estos resultados con las concentraciones de 0.2 % y 0.3 % se puede

afirmar que al incrementar la concentración se tiene un porcentaje de respuesta menor en el caso del extracto de ortiga al 0.2% siendo su mayor efecto 71.63 %, seguido de la manzanilla al 0.2 % con 42.79% cuyo efecto disminuye considerablemente al aumentar la concentración. En el caso del extracto de cola de caballo se tiene una mejor respuesta al 0.3 % de concentración con 28.37 %, siendo, aparentemente, esta su concentración óptima, ya que a mayor concentración disminuye el porcentaje de respuesta y a menor concentración no se observa ningún control sobre la enfermedad.

### **Mecanismo de acción de los extractos acuosos sobre el mildiu de la quinua**

Con el objeto de entender el mecanismo de acción de los extractos se colectaron hojas enfermas de invernadero y se procedió al tratamiento con los diferentes extractos, después de las 24 horas de aplicación se observaron los esporangios al microscopio determinándose la destrucción de la pared celular. Estas evaluaciones fueron realizadas durante 3 días, tiempo en el cual se observó que el extracto de hojas de cola de caballo destruye la mayor cantidad de esporangios.

Como se puede observar en la **figura 2**, el extracto de hojas de papaya destruye las paredes de los esporangios en las 24 horas después del tratamiento, pero se observa que como el producto no ingresa al interior de la hoja, los esporangios que estaban en el interior afloran a la superficie. El efecto de la ortiga y el té verde es inverso a la papaya, en las primeras 24 horas no controla el avance de la enfermedad, pero posteriormente causa lisis en las paredes. En cambio, la wira wira lisa pared en las 24 horas y mantiene por 24 horas más.



**Figura 2.** Observación al microscopio de esporas tratadas con agua versus el extracto de hojas de papaya después de 24 horas de aplicación.

Estos resultados sugieren la mezcla de extractos para así tener un control más amplio de la esporulación que es la principal forma de diseminación de la enfermedad.

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se han establecido seis especies para el control del mildiu de la quinua que son:

- Ortiga
- Cola de Caballo
- Hojas de Papaya
- Manzanilla
- Té Verde
- Wira Wira

Realizándose una prueba prospectiva en invernadero se ha establecido que los extractos acuosos crudos de estas especies ejercen control sobre la enfermedad.

Se ha estudiado el efecto que causan los extractos sobre la enfermedad a nivel microscópico, determinándose que todos los extractos causan lisis interna de forma inicial y posteriormente en la pared celular de las esporas de *P. variabilis*.

Así mismo se ha determinado que el efecto sobre las esporas tratadas es permanente en todos los casos, pero al ser un producto de contacto el extracto acuoso no logra ingresar dentro de la hoja donde la multiplicación del patógeno continúa.

Se ha establecido que de todos los tratamientos, el extracto acuoso de ortiga al 0.2% es el que mejor control ejerce sobre el mildiu de la quinua, con un promedio de

velocidad de avance igual a 1.71 (% de avance de enfermedad/días de evaluación) y un porcentaje de respuesta de 71.69, en condiciones de invernadero; comparado con el testigo cuya velocidad de avance es 6.04.

De la misma forma se han aplicado y evaluado los extractos acuosos a distintas concentraciones y se ha evidenciado que el incremento en la concentración tiene un efecto negativo sobre los plantines de quinua, favoreciendo a la enfermedad debido a una posible fitotoxicidad.

## BIBLIOGRAFÍA

Alviar, C., Manual de agricultura alternativa, Quebecor World Bogotá S. A., 1ra edición, pág. 68 – 89.

Año Internacional de la quinua (2013) url. <http://www.fao.org/quinoa-2013/what-is-quinoa/nutritional-value/es/> (accedido en marzo de 2016).

Bonifacio A, (2011) Los factores adversos de tipo biótico y abiótico: Consecuencias sobre el cultivo de la quinua y alternativas de adaptación, Centro de Investigación Quipaquipani: PROINPA – La Paz.

Cámara boliviana de exportadores de quinua y productores orgánicos (2013), url. <http://www.cabolqui.org/es/quinoa-real/> (accedido en julio de 2015).

Choi, Y., Danielsen, S., Lu, M., Beck, Seung-Beom Hong, Rolf Delhey, Hyeon-Dong Shin (2009) Morphological and

- Molecular Characterization of the Causal Agent of Downy Mildew on Quinoa (*Chenopodium quinoa*), pág. 407 – 408.
- Danielsen, S., El mildiu de la quinua en la zona andina, Centro Internacional de la papa, ed. KVL., protocolo 10.
- Danielsen, S. y T. Ames, (2000) El mildiu de la quinua: Manual práctico para el estudio de enfermedad y del patógeno. Lima, CIP – KVL, p. 38.
- Fernández, J., (2011), Cambio climático retrasa las lluvias y arriesga la agricultura, Opinión 11/12/2011.
- Fundación PROINPA (2013), url. [www.proinpa.org](http://www.proinpa.org) (accedido en julio de 2013).
- Geilfus, F., (1994) El árbol al servicio del agricultor: Guía de especies, Anda Caribe vol. 2 Turrialba, Costa Rica, pág 61 – 67.
- Koziol, (1992) Organización para la Agricultura y la Alimentación.
- León, J., Huaca A., Edison, G. (2011) Efecto de dos dosis de *Bacillus* spp y *Trichoderma* spp, para el control del Mildiu vellosa (*Peronospora destructor*) en el Cultivo de Cebolla de Bulbo, en la Zona Cuesca, cantón Bolívar, Provincia del Carchi, ed. Babahoyo.
- Ministerio de Desarrollo Rural y Tierras (2013), Municipios productores de quinua, Encuesta Nacional Agropecuaria, serie agrícola 2013 – 2014.
- Ministerio de Desarrollo Rural y Tierras – INE, 2016
- Ministerio de Planificación de Desarrollo (2007) “Plantas medicinales en Bolivia”.
- Morán F., (2014) Uso de extractos vegetales y *Trichoderma asperellum* para el manejo de patógenos foliares en el cultivo de sandía. Universidad de Guayaquil, p. 14.
- Ortega-Hernández, M., (2006) Plantas medicinales para enfermedades reumáticas, ed. Complutense, 1ra edición, pág. 40.
- Quinoa internacional (2013) url. <http://www.quinuainternacional.org.bo> (accedido en julio de 2013).
- Santana R., (2014) Evaluación de métodos de extracción y dosis de aplicación de cola de caballo (*Equisetum arvense*) para el control ecológico de roya (*puccinia* sp.) en el cultivo de cebolla blanca (*Allium fistulosum*), Universidad Técnica de Ambato, p. 42-67.
- Solveig Danielsen, Alejandro Bonifacio and Teresa Ames, 2003, Diseases of Quinoa (*Chenopodium quinoa*), pág. 47 – 48.
- Stevens, N., (2003) El Té Verde, ed. Sirio S. A., 2da edición, página 117.
- Tayupanta V. (2012) Control in vitro de *Botrytis* (*Botrytis cinerea*), mildiu (*Bremia lactucae*) y esclerotinia (*Sclerotinia sclerotiorum*) en lechuga (*Lactuca sativa*), usando extractos de cola de caballo, ortiga, ruda y tomillo. Universidad Politécnica Sede Quito, p. 55 – 122.
- Vademécum colombiano de plantas medicinales (2013) Ministerio de Salud – Colombia, p. 217 – 218.
- Vargas, A., A. Bonifacio y W. Rojas. (2013). Mejoramiento para la calidad industrial de la quinua. Memorias Congreso Científico de la Quinoa. Editor M. Vargas. La Paz Bolivia, p. 410 – 431.

### Software

The SAS System, SAS Institute versión 8e for Windows.

Universidad Mayor de San Simón  
Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias

Cochabamba – Bolivia

## ***Trichoderma* spp. como inductor de resistencias sistémicas a nemátodos en cultivo de papa**

Olga Cabrera, Fátima Rojas y Noel Ortuño  
rutct.1994@gmail.com

### **Resumen**

Se utilizó 19 cepas de *Trichoderma* spp. Del laboratorio de AgroMicrobiología y Bioinsumos de la FCAP-UMSS. Se inoculó plantas de papa, en macetas de 4 Kg, con 1 gr de suelo con 10 quistes de *Globodera* spp. Por cada maceta, con 95% de viabilidad los huevos, asimismo fueron inoculadas 19 cepas de *Trichoderma* spp. y dos testigos (testigo absoluto y testigo con nematodo) con 8 repeticiones. *Trichoderma* spp. ayudó al desarrollo de plantas de papa atacadas con *Globodera* spp. Con la cepa T1 de *Trichoderma* spp. se observó mayor número de tubérculos en relación al testigo con nematodo. En el rendimiento se observó mayor peso de tubérculos con la inoculación de la cepa T11, a pesar de tener el ataque de nematodo, demostrando así que esta cepa induce tolerancia a través del mecanismo de ISR. Por lo que *Trichoderma* spp. es un potencial para el manejo poblaciones de este nematodo en el cultivo de la papa.

**Palabras Claves:** *Solanum tuberosum* spp. promotores de crecimiento (PGPR).

### **INTRODUCCIÓN**

El cultivo de la papa es originario de la región andina de Bolivia y Perú en la actualidad se encuentra propagada por todo el mundo. En Bolivia este cultivo es de alta importancia económico y social, constituyéndose en uno de los cultivos más importantes para la alimentación de la población urbana y rural, por constituirse en una fuente de ingresos económicos para una gran parte de los pobladores que radican en el área rural.

En Bolivia, los nematodos vienen a ser uno de los grupos que ocasionan daños severos, siendo los géneros *Globodera* y *Nacobbus*, los máximos representantes de aquellos nemátodos formadores de agallas o nódulos y de quistes en raíces del cultivo. Fundamentalmente el género *Globodera*, conocido como el nematodo quistes de la papa, está constituida por dos especies, *Globodera rostochiensis* y, *Globodera pallida*, estas especies están ampliamente distribuidas

en la región Andina de Bolivia, causando importantes pérdidas económicas en el rendimiento de papa (US \$ 128.393.257) (Franco 2008).

Por otro lado, las plantas interactúan constantemente con patógenos (virus, bacterias, hongos, oomicetos) y parásitos (insectos herbívoros, nemátodos) por lo que han desarrollado mecanismos que les permiten defenderse de estas plagas, mediante un complejo sistema que incluye múltiples niveles de protección. Esta protección puede ser física o química y constitutiva o inducida. Por ejemplo, la pared celular es una defensa física constitutiva; mientras que la formación de callos es una defensa física inducida. De igual forma, las saponinas son una protección química constitutiva, mientras que las fitoalexinas y quitinasas son inducidas (Díaz 2012).

Por todo es importante establecer el efecto de cepas nativas de *Trichoderma* spp.

en plantas atacadas por *Globodera* spp. con medio de cultivo de PDA estéril, de lo cual se obtuvo inóculo en estado líquido.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación

La investigación se realizó en los predios de la Facultad de Ciencias Agrícolas Pecuarias y Forestales “Dr. Martín Cárdenas” de la Universidad Mayor de San Simón, ubicada en km 5 de la Av. Petrolera zona Tamborada en la provincia de Cercado, del Departamento de Cochabamba, geográficamente entre los 17°26' de latitud sur y 66°19' de longitud oeste, a una altitud de 2582 msnm, con una temperatura promedio anual de 16°C y una precipitación pluvial de 560 mm por año.

### Materiales

#### Materiales biológicos

- Semilla de Papa variedad Desiré.
- Cepas de *Trichoderma* spp. Procede de laboratorio de AgroMicrobiología y Bioinsumos FCAyP- UMSS.
- Muestras de suelos infestados con *Globodera* spp.

### Metodología

#### a) Preparación inóculo

Este procedimiento se realizó con el método de flotación.

Los quistes de *Globodera* spp. fueron extraídos y cuantificados en el laboratorio de AgroMicrobiología y Bioinsumos de la FCAyP de muestras de suelos naturalmente infestados, provenientes de la zona de Lope Mendoza de la provincia Carrasco.

#### b) Preparación inóculo *Trichoderma* spp.

Las 19 cepas de *Trichoderma* spp. provenientes del cerapio del Laboratorio de Biotecnología y Microbiología de la FCA y P-UMSS, las que multiplicaron en placas Petri,

### Siembra

La siembra se realizó en bolsas de polietileno de 40x50 con sustrato estéril de 6 kg, donde se sembró una semilla de papa por maceta, e inmediatamente se inoculó con 1 gr de suelo que contenía 10 quistes de *Globodera* spp. por cada maceta, los cuales tenían huevos con el 95% de viabilidad.

### Aplicación de *Trichoderma* spp.

Las 19 cepas de *Trichoderma* spp. a los 30 días después de la siembra (DDS), fueron inoculados en una dosis de 5 cc por planta, (en cual tenía una concentración de  $2 \times 10^9$  conidas/ml), por cada tratamiento, con la ayuda de una jeringa se aplicó las dosis indicadas en la parte superior del cuello de la planta de papa.

### Peso de la raíz

Al observar diferencias en el desarrollo radicular, con la inoculación de las diferentes cepas de *Trichoderma* spp. a través de la comparación de medias, se observó que las plantas a las que se inoculó las cepas T5 (6,43 gr) favorecieron relativamente mayor desarrollo radicular en relación al Testigo con nematodo (3,25 gr) y el testigo absoluto (4,17 gr).

Además de proteger el sistema radical la adición de *Trichoderma* al suelo, resulta en la biofertilización por la solubilización del metal, incrementando la riqueza del mismo, en forma tal, que puedan ser asimiladas por las plantas (Altomare *et al.*1999).

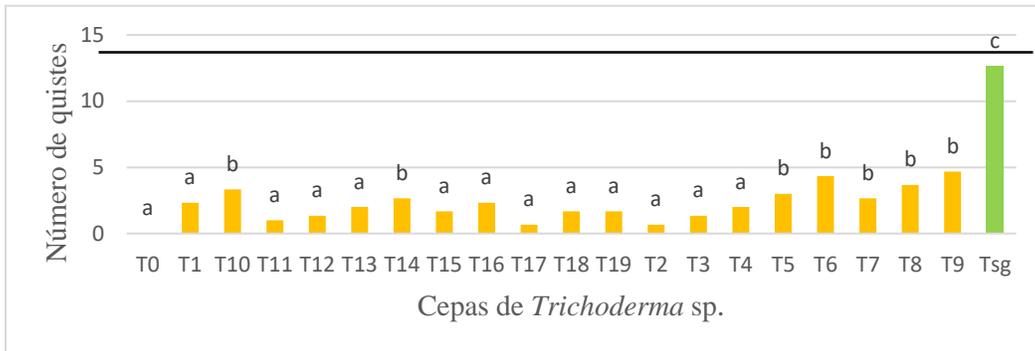
### Variables Nematológicas

#### Población final de quistes de *Globodera* spp.

Se observó menor cantidad de quistes del nematodo con la inoculación de las cepas de *Trichoderma* spp. T1(2,3), T11(1), T12(1,33), T13(2), T15(1,66), T16 (2,33) T17(0,66), T18 (1,66), T19(1,66), T2(0,66), T3(1,33) y T4(2) en comparación al Testigo con nematodo

(12,66), spp. el que presentó el mayor número de quistes. Sin embargo, en el testigo absoluto T0 al cual no se inoculó quistes de nematodo tuvo cero quistes (0) en la muestra evaluada.

Por lo que estas cepas de *Trichoderma* spp. podrían estar inhibiendo la multiplicación del nematodo.



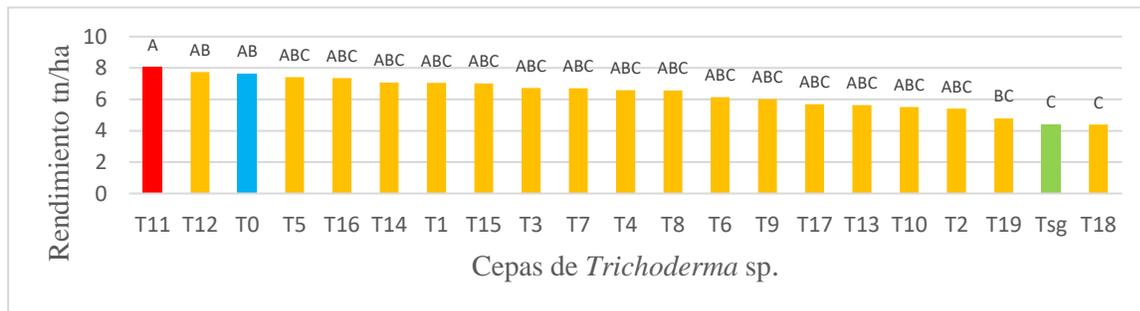
**Figura 1. Efecto de las cepas de *Trichoderma* spp. sobre el número de quistes de *Globodera* spp. en papa de la variedad Desirée.**

Asimismo, existe poca información sobre los mecanismos utilizados por las especies de *Trichoderma* spp. en el control de nematodos. Sin embargo, se hablan de dos mecanismos, el primero es el parasitismo directo a huevos y juveniles del nematodo, mediante el aumento de la actividad de quitinasas o proteasas, siendo

**Rendimiento**

Asimismo, través de la comparación de medias, se observó mayor peso de tubérculos con la inoculación de la cepa T11 (8,06 tn/ha), en relación al Testigo (4,4 tn/ha) ambos parasitados con el nematodo. Asimismo, el testigo absoluto T0 (7,6 tn/ha) sin nematodo desarrolló relativamente mayor peso de tubérculos que el testigo absoluto (T0). Por lo que estas cepas T11 podrían constituirse en un factor para favorecer el desarrollo de tubérculos con más peso en el cultivo de la papa.

este un indicador de parasitar los huevos de nematodos y el segundo es la inducción de los mecanismos de defensa en la planta (Howell 2003).



**Figura 2. Efecto de las cepas de *Trichoderma* spp. sobre el rendimiento en T/ha de la papa variedad Desirée.**

Soria et al. (2021), encontró resultados similares en los pesos totales de tubérculos obtenidos en la cosecha, para los diferentes tratamientos, donde mostraron un incremento positivo respecto al testigo absoluto y testigo con nematodo, es decir, las plantas a pesar de ser atacadas con *Globodera* spp. y tratadas con microorganismo promotores de crecimiento (PGPR) rindieron mejor que el testigo absoluto (T01) y testigo con nematodo (T0). Donde los mejores tratamientos están el T13 (*Trichoderma* + *Pochonia* + *Pleurotus*) con 27.8 t/ha, T5 (*Trichoderma* + *Bacillus*), T11 (*Trichoderma* + *Bacillus* + *Pochonia*) y T7 (*Trichoderma* + *Pleurotus*) con rendimientos de 27.7, 27.6, y 26.6 t/ha, respectivamente en comparación al testigo absoluto (T01) produjo 24.5 t/ha y el testigo con nematodo (T0) produjo 23.6 t/ha.

### Número de tubérculos

Se estimaron diferencias a través del análisis de varianza ( $p=0,05$ ) entre las diferentes cepas de *Trichoderma* spp. donde se estimó mayor número de tubérculos con la inoculación de la cepa T1 (13,37), en relación al Testigo con nematodo (9,5) con la inoculación con solo quistes de nematodos, el cual desarrollo menor número de tubérculos. Por otra parte, el testigo absoluto T0 (11,25) sin inóculo, tanto de quistes de nematodos y *Trichoderma* spp., desarrolló mayor cantidad de tubérculos. Por lo que la cepa T1 podría utilizarse para favorecer el desarrollo del número de tubérculos en el cultivo de la papa.

### CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados y los resultados obtenidos en la investigación realizada se tienen las siguientes conclusiones:

El efecto que hubo de las diferentes cepas nativas de *Trichoderma* spp. en plantas de papa variedad Desirée, atacadas por *Globodera* spp., se observó menor cantidad de quistes de nematodos con la inoculación de las cepas de *Trichoderma* sp T1, T11, T12, T13,

T15, T16, T1, T18, T19, T2, T3 y T4, respecto al testigo con nematodo.

El número de tubérculos fue similar con la inoculación de las diferentes cepas de *Trichoderma* spp. excepto con la inoculación de la cepa T1, observándose mayor número de tubérculos en relación al testigo con nematodo, el cual desarrolló menor número de tubérculos. Por otra parte, el testigo absoluto desarrolló mayor cantidad de tubérculos.

En el rendimiento se observó mayor peso de tubérculos con la inoculación de la cepa T11 a pesar de tener el ataque de nematodo demostrando que la cepa de *Trichoderma* spp. induce tolerancia a través del mecanismo de ISR. Asimismo, el testigo absoluto desarrolló relativamente mayor peso de tubérculos.

En general, estos resultados demuestran que el hongo nativo *Trichoderma* spp. tiene la capacidad de inducir tolerancia por la planta al nematodo a través de un mecanismo poco comprendido en este estudio, el cual será necesario estudiar.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altomare C. A. Norvell. T Björkman, G Harman. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai. 1999.
- Diaz N. 2012. Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos una revisión de agentes bióticos y abióticos como inductores de resistencia a enfermedades en el cultivo de papa, saltillo México. Vol.- 2: 257-267 p.
- Franco J. 2008. Manejo integrado de los nematodos de la papa. Fundación PROINPA. XXIII Congreso de ALAP. Mar de Plata, Argentina. Pérdidas causadas por el nematodo Quiste de la papa (*Globodera* sp.) en Bolivia y Perú.

- Revista Latinoamericana de la Papa. Soria E. 2019. Inducción de tolerancia al ataque de *Globodera* spp. con microorganismos promotores de crecimiento en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum tuberosum*. 1-45 p.
- Guillen C. A. Soto. y M. Springer. 2006. variables físicas, químicas y biológicas del suelo sobre las poblaciones de colémbolos en Costa Rica. En: *Agronomía Costarricense*, 30(2), 19-29 p.

Universidad Mayor de San Simón  
Centro de Biotecnología

Cochabamba – Bolivia

## **Fitorremediación de Suelos Contaminados por Cadmio y Plomo Mediante Plantas Florales Plantadas en Terreno Agrícola en Ensayos Con Medios Salinos**

Ferrufino E, Estívariz C, Guamán M.  
Dirección: Calle Sucre y parque la Torre. Fono: 591-4-4250660.  
Correo Electrónico: biotec@fcyt.umss.edu.bo.

### **Resumen**

Las especies florales *Calendula officinalis*, *Plumbago auriculata* y *Chrysanthemum morifolium* fueron estudiadas por su potencial aplicación en la fitorremediación de suelos contaminados con cadmio y plomo. El estudio fue llevado a cabo *in situ* durante 12 semanas dividido en 2 etapas de muestreo, donde en la segunda etapa se añadió a las plantas soluciones salinas. Los resultados obtenidos demuestran que estas especies florales son hiperacumuladoras de plomo y cadmio y poseen la capacidad de extraer y tolerar en sus tejidos elevadas concentraciones sin sufrir alteraciones en su desarrollo. En el caso de las especies *Calendula officinalis* y *Plumbago auriculata* el medio salino y el tiempo de crecimiento son factores favorables para el incremento en la acumulación de dichos metales pesados. La investigación también reveló de qué forma se distribuyen estos metales pesados en las distintas partes de las plantas, permitiendo analizar la capacidad de translocación que poseen.

**Palabras clave:** Fitorremediación, metales pesados, especies florales, *in situ*, medio salino.

### **INTRODUCCIÓN**

En las décadas recientes la contaminación del suelo con distintos metales pesados provenientes de las actividades mineras, petroleras, metalurgia, industrias de fertilizantes o la incineración de residuos se ha ido incrementando enormemente a nivel mundial. Esto representa una grave amenaza a la seguridad de los alimentos y a los ecosistemas ambientales en todo el mundo, además de provocar la alteración de la diversidad de poblaciones biológicas en los suelos, lo que resulta en problemas con el crecimiento de las plantas y su supervivencia.

Asimismo, los cultivos que se desarrollen en estos suelos pueden contener niveles altamente alarmantes de metales pesados que pueden ser transferidos a la cadena trófica animal y humana, llegando a causar diversas y graves enfermedades en las personas.

Debido a este problema nacieron técnicas mecánicas y químicas para enmendar los suelos, sin embargo, estas técnicas son demasiado costosas y en ocasiones generan impactos adicionales sobre los ecosistemas. Por ello surge la fitorremediación como una alternativa más verde y sustentable. La fitorremediación es el proceso de utilizar plantas que tengan la capacidad de extraer, acumular y/o degradar los contaminantes en sus tejidos, sin sufrir alteraciones en su desarrollo. Esta tecnología posee los beneficios de ser menos costosa, aplicarse *in situ*, no requiere remoción de tierra con maquinaria, se aplica en grandes superficies de suelo y tiene una buena aceptación pública debido a la atractiva percepción de las plantas o flores.

Existen muchas especies que han tenido éxito en la absorción de metales pesados como plomo, cadmio, cromo y arsénico, desde

plantas herbáceas hasta plantas florales. Estas últimas, tienen un beneficio adicional al ser utilizadas en la absorción de metales pesados, y es que una vez que hayan extraído los metales pesados en sus tejidos, pueden ser cosechadas y comercializadas, y de esta forma establecerse como una actividad más sustentable financieramente.

Esta investigación, tuvo como principal objetivo la evaluación del desempeño de tres especies florales nativas hiperacumuladoras de metales pesados (*Calendula officinalis*, *Plumbago auriculata* y *Chrysanthemum morifolium*) en la absorción y descontaminación *in situ* de suelos con plomo y cadmio.

Considerar un estudio *in situ* puede examinar mejor la eficacia de la fitorremediación, ya que simulan las condiciones reales y los resultados de los ensayos realizados a esta escala son más ventajosos en aplicaciones prácticas de métodos de fitorremediación.

## MÉTODOS Y MATERIALES

### Preparación del suelo

Se prepararon 9 parcelas en el terreno agrícola proporcionado por la Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y Forestales de la UMSS. Cada parcela tenía una superficie de 3 metros en cada lado. En cada una se realizaron 3 surcos con una separación de 50 cm entre surcos y parcelas.

En cada surco de cada parcela se plantaron 3 plantas de la misma especie, para tener 9 plantas en cada parcela, haciendo un total de 27 plantas por especie. Se definió una separación de 20 cm entre plantas de cada surco.

### Contaminación del suelo

El suelo fue contaminado con sales de cadmio y plomo del agua proveniente principalmente de la refinería de YPFB "Guarbelto Villarroel" y en menor medida de la represa de La Angostura, esta agua de riego tenía una concentración promedio 9.47 ppm de Cd y

585.69 ppm de Pb. Semanalmente todas las parcelas eran regadas con grandes cantidades de estas aguas, debido principalmente a que el suelo era muy seco.

### Preparación de soluciones salinas

Se prepararon dos soluciones de cloruro de sodio de concentraciones diferentes, una solución de 100-ppm y otra de 300 ppm. Asumiendo que cada planta abarcaba 4 kg de tierra se determinó que para la solución de 100 ppm se requería 8 g de NaCl por litro y para la solución de 300 ppm se requería 24 g de NaCl por litro.

### Tratamiento de las plantas

Durante 12 semanas las 9 parcelas fueron regadas con agua contaminada con plomo y cadmio. Posteriormente, a partir de la séptima semana se agregó también soluciones salinas de cloruro de sodio a dos de las parcelas de cada especie. El tratamiento con agua contaminada con cadmio y plomo se realizó dos veces por semana a todas las parcelas, mientras que el tratamiento con soluciones salinas se realizó una sola vez por semana. Una de las parcelas de cada especie fue regada con solución salina de 100 ppm, y la otra fue regada con solución salina de 300 ppm. El tratamiento con soluciones salinas consistía en inyectar 50 mL de la solución de cloruro de sodio directamente hacia la raíz a una distancia de 5 a 10 cm del tallo.

### Toma de muestras de tierra, plantas y agua de riego

Durante la etapa experimental se realizaron 2 muestreos. El primer muestreo se llevó a cabo 6 semanas después de haber realizado la plantación donde se extrajeron 2 plantas de cada especie por parcela con un aproximado de 1 kilogramo de su tierra, haciéndose un total de 18 plantas. El segundo muestreo se llevó a cabo 6 semanas después de haber realizado la plantación, se extrajeron 3 plantas de cada especie por parcela, con aproximadamente medio kilogramo de su respectiva tierra para las dos primeras plantas

y un kilogramo correspondiente a la tercera planta.

Al extraer la tierra de cada planta, se consideró un perímetro de 10 cm alrededor de la planta, esta cantidad de tierra fue homogeneizada y se retiró alrededor de 1 kg por cada planta. Además, cada planta fue cortada y dividida en raíz, tallo, hojas y flor, este procedimiento se realizó con todas las plantas del primer muestreo, y con la tercera muestra de cada parcela del segundo muestreo.

### Determinación de la concentración de metales pesados

Todas estas muestras se expusieron al sol durante 3 a 4 días para su secado para luego obtener su peso en seco. Tras el secado, se procedió a moler todas las muestras de las plantas con una moladora manual y luego se realizó la digestión abierta con soluciones de ácido nítrico para las plantas y una mezcla digestora de ácido nítrico con ácido perclórico para las muestras de tierra, esta etapa se llevó a temperaturas entre 200° C y 300° C.

Las muestras digestionadas fueron filtradas y diluidas para finalmente determinar la concentración de plomo y cadmio mediante el uso del espectrofotómetro de absorción atómica (marca PerkinElmer).

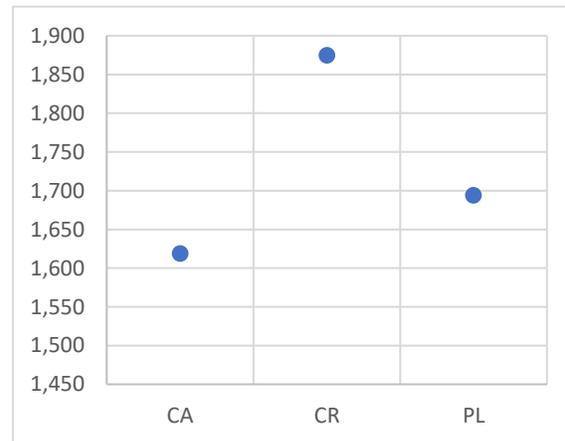
Las muestras del agua de riego fueron tomadas en 4 ocasiones: al inicio de la plantación, 2 semanas después, en la fase de primer muestreo y al haber transcurrido 3 meses desde la plantación inicial. En la determinación de los metales pesados de este tipo de muestras se utilizó la misma técnica de la digestión ácida seguida de la toma de lectura con el espectrofotómetro.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Con los datos de las lecturas obtenidas para cada especie se determinará el factor de bioconcentración (BC), que es la relación de la concentración del metal en la raíz respecto de la concentración del metal en la tierra después de que las plantas absorbieron los metales:

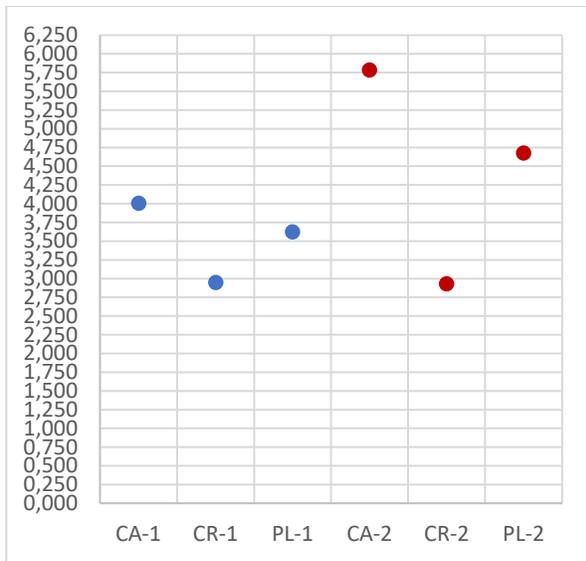
$$BC = \frac{C_{\text{metal en raíz}}}{C_{\text{metal en tierra al final del tratamiento}}}$$

Este factor es un importante indicador que nos permite identificar si una especie vegetal es o no hiperacumuladora de un determinado metal pesado. Esto se confirma si BC es >1. Los resultados de este factor pueden ser apreciados en la figura 1 y 2.



**Figura 1. Factor de bioconcentración de Cd para las 3 especies estudiadas. CA representa a Caléndula, CR a Crisantemo y PL a Plumbago. Datos pertenecientes a la primera etapa de muestreo.**

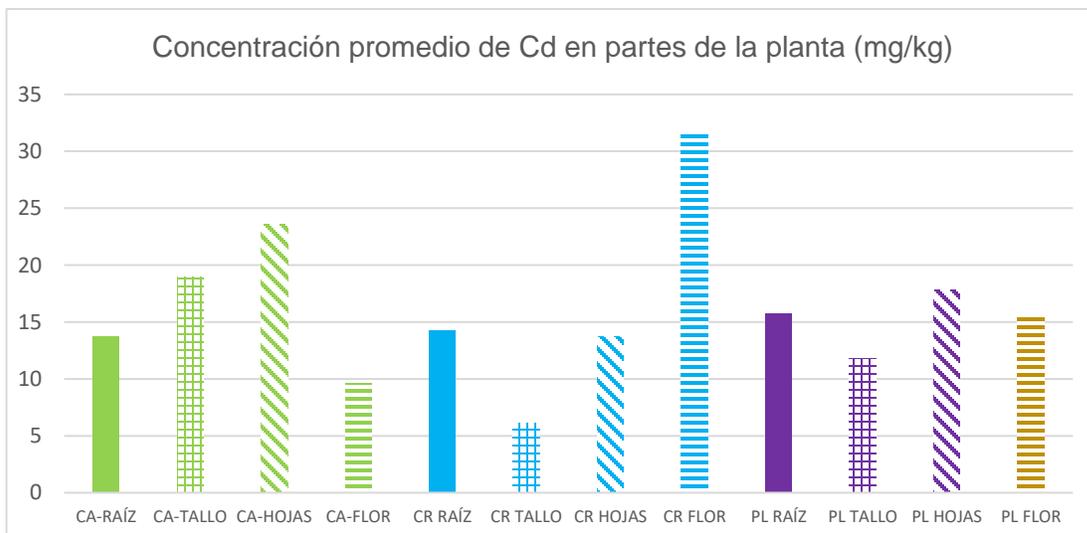
Es importante mencionar que las 3 especies florales lograron extraer el cadmio y plomo que se encontraban presentes en la tierra de las parcelas donde se plantaron y en el agua con la que se regó. En la Figura 1 y Figura 2 podemos evidenciar que en el caso del cadmio, los BC de las 3 especies se sitúan entre 1.6 y 1.9, y para el primer muestreo del plomo es aún mayor, estando entre 3 y 4, lo cual nos indica que las plantas llegaron a acumular mayores concentraciones de plomo que de cadmio, esto podría deberse a que la concentración de plomo en el agua de riego era superior que la del cadmio. Estos resultados demuestran que estas especies florales efectivamente son hiperacumuladoras de cadmio y plomo en condiciones *in situ*.



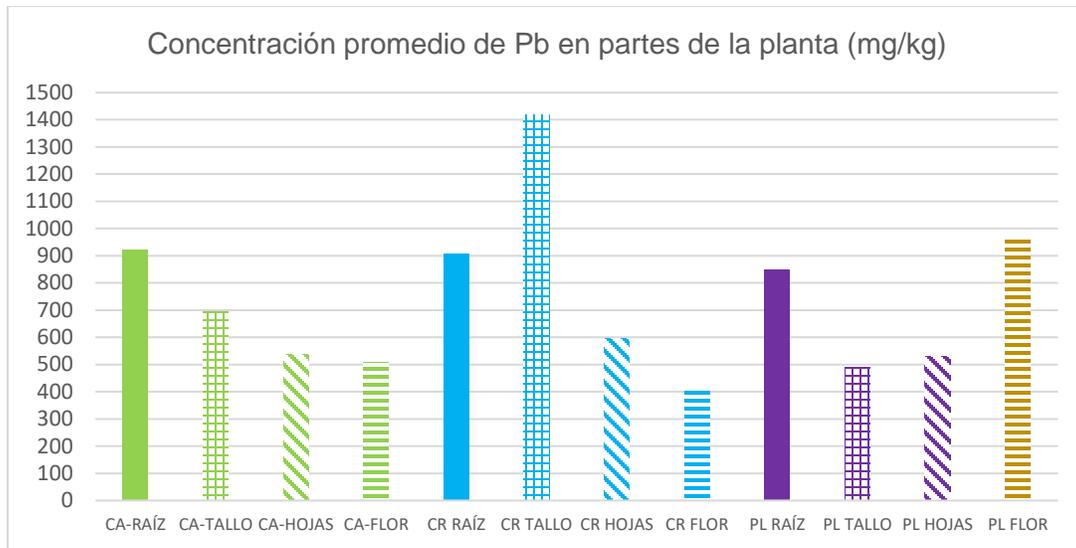
**Figura 2. Factor de bioconcentración de Pb para las especies Caléndula, Crisantemo y Plumbago perteneciente al primer muestreo (puntos azules) y al segundo muestreo (puntos rojos).**

También podemos observar que el crisantemo es el mejor absorbedor de cadmio, seguido por el plumbago, y para el plomo, la especie con mejor desempeño de absorción es la caléndula seguido por el plumbago.

En la Figura 2 podemos apreciar que, con el paso del tiempo y el efecto de las soluciones salinas aplicadas, los factores de bioconcentración del plomo de la caléndula y del plumbago se incrementaron desde 4 hasta 5,78 y desde 3,62 hasta 4,67 respectivamente, en el caso del crisantemo el BC se mantuvo. Por lo cual, es probable que la aplicación del cloruro de sodio y a mayor tiempo de desarrollo de las plantas, se logre una mayor extracción de plomo encontrado en el suelo contaminado, especialmente con las especies de Caléndula y Plumbago. A continuación se presentan las gráficas donde se puede observar la distribución del cadmio y plomo en las distintas partes de cada planta:



**Figura 3. Concentración promedio de Cd en partes de la planta (mg/kg)**



**Figura 4. Concentración promedio de Pb en partes de la planta (mg/kg)**

En las figuras 3 y 4 observamos que no existe una clara tendencia de la forma en la que las especies florales distribuyen al cadmio y plomo en sus distintas partes, por lo cual se requerirían futuros estudios con mayor tiempo de desarrollo para las plantas con el objetivo de encontrar una tendencia y evaluar la capacidad de translocación de cada especie, es decir, qué tan bien trasladan al metal pesado desde sus raíces hacia sus demás partes como los tallos u hojas.

Los resultados obtenidos de los factores de bioconcentración de plomo para la Caléndula fueron superiores a los obtenidos en el estudio realizado por Dinesh *et al.* (2020), una causa probable podría ser que en dicho estudio la concentración inicial en el suelo contaminado era 20 veces menor que la concentración de plomo en los suelos donde se plantaron las caléndulas de nuestra investigación.

Realizando el mismo análisis para el crisantemo, utilizando como referencia el estudio llevado a cabo por Tokarz, *et al.* (2020), el BC de cadmio encontrado en ese estudio es algo superior al encontrado en el realizado en este trabajo, por lo cual los resultados que se obtuvieron serían bastante parecidos entre ambos estudios. Comparando el BC del plomo, se encuentra que el BC de la

presente investigación es el triple de la investigación china.

Para la comparación de los resultados obtenidos del plumbago se revisó el estudio por Tokarz, *et al.* (2020), en dicho estudio se presentan las concentraciones de plomo en las raíces y tallos, donde se observa que el plomo se deposita más que todo en las raíces, hecho que coincide con los resultados que se obtuvieron, lo que indicaría que el plumbago no tiene mucha capacidad de transferir el plomo de sus raíces hacia sus tallos.

## CONCLUSIONES

Se documentó el desempeño de estas plantas en el medio contaminado durante 12 semanas, donde la mayoría de las plantas se desarrollaron de forma normal, incluso en muchos casos, los plumbagos y crisantemos lograron obtener buenas cantidades de biomasa.

El cloruro de sodio es beneficioso para la extracción de plomo en las especies de crisantemos y plumbagos, pero perjudicial para la caléndula. Además, el medio salino aplicado no impidió que continúen creciendo de manera normal, por lo cual los crisantemos y plumbagos tendrían éxito en la

fitorremediación de suelos salinos Tokarz K., Makwoski W., Tokarz B., Hanula M., Sitek E., Muszynska E., . . . Mazur S. (2020). Can Ceylon Leadwort (Plumbago zeylanica L.) Acclimate to Lead Toxicity? - Studies of Photosynthetic Apparatus Efficiency. International Journal of Molecular Sciences

La caléndula y el plumbago son las mejores especies para extraer plomo y para cadmio son el crisantemo y el plumbago.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Dinesh M., Vipin S., & Becham S. (2020). BIOACCUMULATION OF As AND Pb IN POT MARIGOLD GROWN IN SEWAGE IRRIGATED SOILS OF PRAYAGRAJ, UTTAR PRADESH, INDIA. Plant Archives, 5100-5106.

Zhang C., Qian J., Zhang W., Lei Y., Wang S., Liu J. Zhang, C. (2020). Study on the remediation effect and environmental benefits of ornamental plants on heavy metal soil: A case study of Kaifeng City chrysanthemum. Eco-Enviornmental Knowledge Web, 1883-1893.

Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Agronomía  
Cátedra de Microbiología Agrícola  
Centro Fitotecnico y de Semillas Pairumani  
CONICET

Cochabamba – Bolivia

## **Caracterización de la diversidad estructural de las comunidades microbianas rizosféricas asociadas a los cultivos de cobertura avena y centeno inoculados con dos PGPR**

Aguilar Vásquez N.N (1), Escobar Ortega J.S. (2), Avila Alba T. (1), García de Salamone I.E. (3)  
n.aguilar@fundacionpatino.org

### **Resumen**

Se evaluaron los efectos de la inoculación combinada de dos cultivos de cobertura con las PGPR *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens* sobre la diversidad estructural de las comunidades microbianas asociadas (CMR). En subparcelas se sembraron centeno, avena y un testigo sin cobertura, los tratamientos con y sin aplicación de PGPR, se ubicaron en sub-subparcelas. Muestras de suelo rizosférico hasta 20cm de profundidad se obtuvieron en estado de macollaje y se extrajo ADN, para amplificar el gen 16S ARNr con los primers 27f y 1392r y se usó la enzima MspI. La diversidad estructural de las CMR se caracterizó mediante análisis multivariado discriminante de los perfiles T-RFLP y el índice de diversidad de Shannon (H). Se observó que las CMR del tratamiento testigo sin cultivo de cobertura (CC) exhibió menos abundancia relativa de T-RF y el centeno inoculado mostró una mayor abundancia relativa de T-RF con respecto al tratamiento sin inoculación.

**Palabras clave: Comunidades microbianas, PGPR, Rizosfera, T-RFLP.**

### **INTRODUCCIÓN**

Las prácticas de manejo agrícola pueden tener grandes impactos en el tamaño, la actividad, la composición y diversidad de las comunidades microbianas del suelo (Nadarajah, 2016). Debido a que los microorganismos afectan la mayoría de las transformaciones de nutrientes, la presencia de comunidades microbianas diversas en el suelo es esencial para la sustentabilidad de los agroecosistemas (Chatterjee *et al.* 2016). La actividad microbiana contribuye a procesos fisiológicos como la absorción de nutrientes y las respuestas de defensa (Berendsen *et al.* 2012). Por ende, el uso inapropiado del suelo puede alterar estas comunidades y disminuir sus interacciones benéficas (Shen *et al.*, 2010).

Por tanto, resulta importante buscar y mejorar las prácticas agronómicas tendientes a aumentar y mantener los altos niveles productivos de manera más sostenible (Sengupta & Haldar, 2016). Una de las alternativas es incluir en la rotación cultivos de cobertura (CC) para aumentar el aporte de carbono a través de los residuos. Se puede combinar la inclusión de CC, con otras alternativas tecnológicas como la utilización de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR, las cuales tienen un efecto significativo en la sustentabilidad de los agroecosistemas (Antoun & Prevost 2006; Escobar & Garcia de Salamone 2017).

En el presente estudio se llevó a cabo la caracterización de la diversidad estructural de las comunidades microbianas rizosféricas (CMR) con los CC avena y centeno en

combinación con la coinoculación con PGPR, mediante el análisis de los perfiles obtenidos por la técnica de análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción terminal denominada T-RFLP del gen 16S ARNr.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo fue realizado en el establecimiento "El Correntino", de la localidad Treinta de agosto, provincia de Buenos Aires Argentina. Se evaluaron los efectos de la inoculación combinada de dos CC con las PGPR: *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens* sobre la diversidad estructural de las CMR. En subparcelas se sembraron centeno y avena incluyéndose también un testigo sin CC. Los tratamientos con y sin aplicación de PGPR a la siembra con 4ml/Kg de semilla se ubicaron en sub-subparcelas. Muestras de suelo hasta 20 cm de profundidad se obtuvieron en estadio ontogénico macollaje.

El estudio molecular se realizó en el Laboratorio de Biología molecular del Centro Fitotécnico y de Semillas Pairumani. El ADN total se extrajo de 0,5 g de muestra, se amplificó el gen 16S rRNA con primers 27f y 1392r. Los productos de PCR fueron digeridos con la enzima MspI, las muestras se enviaron a MacroGen Korea para su secuenciación. Los diferentes tamaños de T-RF obtenidos fueron analizados por PeakScanner v1.0. La diversidad estructural de las CMR de los tratamientos aplicados se caracterizó mediante análisis multivariado de los perfiles T-RFLP y por el índice de diversidad de Shannon (H). Los resultados se contrastaron con la digestión *in silico* realizada mediante el Software Microbial Community Analysis III (MiCA), con secuencias de cebadores y la enzima de restricción MspI que se utilizó en este trabajo.

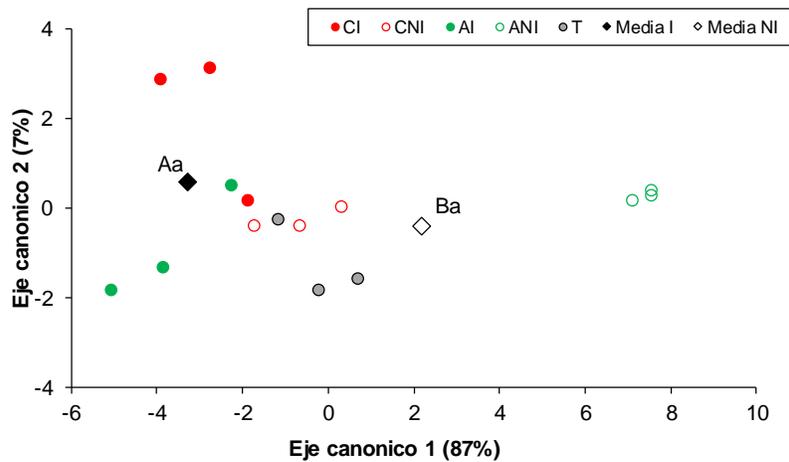
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el análisis discriminante de los T-RFLP se observó que la estructura de las CMR asociadas a la rizosfera de los CC estuvo determinada por la inoculación (Figura 1), observándose que los promedios de todas las

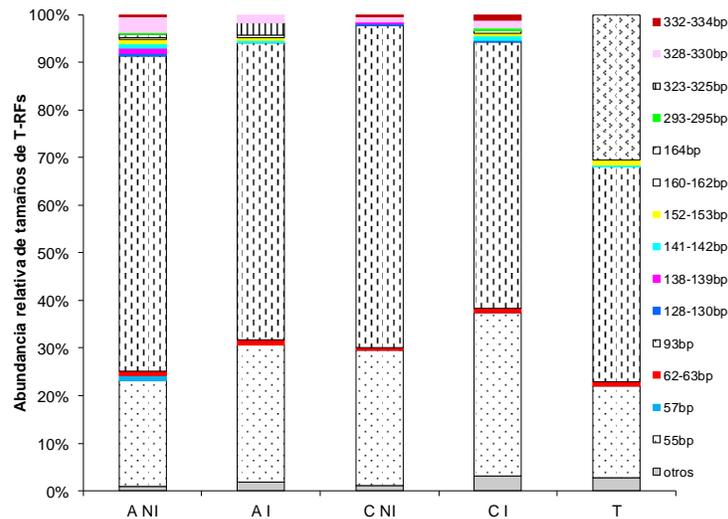
muestras inoculadas y no inoculadas difieren entre ellos para el Eje 1. Además, se observan diferencias significativas entre centeno y avena sin inocular. Por otro lado, las CMR asociadas a las parcelas control sin CC se agruparon cerca de los tratamientos no inoculados (Figura 1). En todos los casos no se observó efectos sobre los índices de diversidad estructural. Los valores promedio y los errores estándar de los índices de riqueza, Shannon, Simpson y McIntosh fueron iguales a  $4.4 \pm 0.62$ ,  $0.8 \pm 0.08$ ,  $0.5 \pm 0.03$  y  $7.1 \pm 0.24$ , respectivamente. Por otro lado, el análisis discriminante para la combinación entre los tratamientos de CC y la inoculación con las PGPR consideró los T-RF más significativos indicados en la Figura 2, donde además se observa las abundancias relativas de estos T-RF. El grupo llamado "otros" incluye los tamaños de T-RF, que indicaron como menos importantes para el análisis discriminante los cuales son: 51-54 pb, 64-67 pb, 90-92 pb, 143-145 pb, 338 pb y 387 pb. En la Figura 2 se puede observar que las CMR del tratamiento testigo sin CC exhibió menos abundancia relativa de T-RF y el centeno inoculado mostró una mayor abundancia relativa de T-RF con respecto a los CC no inoculados. Situación opuesta se observó para la avena CMR. Al respecto Gewin (2010) indica que cada combinación PGPR-cultivo debe ser estudiada para mantener un equilibrio adecuado entre el cultivo y los microorganismos nativos y aplicados.

El centeno inoculado a diferencia del control sin cultivo de cobertura exhibió el tamaño de T-RF de 128-130 pb, donde el T-RF de 130 pb ha sido vinculado a bacterias PGPR como *Azospirillum* spp. y *A. amazonense* y otros géneros de bacterias de suelo, como *Paracoccus*, *Thiothrix*, *Anaeromyxobacter* y *Gluconacetobacter* que se encontraron en la rizósfera de café (Fuentes-Ramírez *et al.*, 2001).

Los resultados de este trabajo también destacan el potencial de la inoculación de PGPR y la necesidad de obtener nuevas cepas PGPR competitivas.



**Figura 1: Análisis discriminante de los perfiles estructurales (T-RFLP) de las comunidades microbianas de la rizosfera para la interacción entre cultivos de cobertura e inoculación**



**Figura 2: Abundancia relativa de los tamaños de fragmentos de restricción (T-RF).**

**CONCLUSIÓN**

La inoculación con PGPR cambió el perfil estructural de las comunidades microbianas rizosfericas de tal forma que los promedios de todos los tratamientos inoculados y no inoculadas difirieron entre sí. El análisis del

índice de diversidad H calculado con los datos T-RF mostraron que los CC y la inoculación no modifico la diversidad estructural de las CMR. El centeno inoculado presento mayor abundancia relativa de T-RF con respecto a los cultivos de cobertura no inoculados mientras que este efecto no fue observado en avena, además se obtuvo que el T-RF de 130

pb presente en centeno inoculado ha sido vinculado a bacterias PGPR como *Azospirillum* spp. y *A. amazonense* y otros géneros de bacterias de suelo

## BIBLIOGRAFÍA

- Antoun, H., Prevost, D. 2006. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In: Z.A. Siddiqui, Editor, PGPR: Biocontrol and Biofertilization, Springer, Netherlands. p 1-38.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M., Bakker, P. A. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci* 17(8):478–486.
- Escobar Ortega, J.S. García de Salamone, I.E. 2017. Effect of fertilization and combined inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* of *Avena sativa* (oats) and *Secale cereale* (Rye) grown as cover crops. 19th International conference on crop, soil, agricultural and environmental sciences hereby certifies that. World Academy of Science, Engineering and Technology, International Science Index, Agricultural and Biosystems Engineering, 4(4), 1433
- Fuentes-Ramírez, L. E., Bustillos-Cristales, R., Tapia-Hernández, A., Jiménez-Salgado, T., Wang, E. T., Martínez-Romero, E., & Caballero-Mellado, J. 2001. Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 1305-1314.
- Haldar, S. & Sengupta, S. 2016. Microbial Ecology at Rhizosphere: Bioengineering and Future Prospective. 64 – 97. En: Choudhary D., K., Varma A., and Tuteja, N. 2016. *Plant-Microbe Interaction: An Approach to Sustainable Agriculture*, Springer Nature. Singapore. 516.
- Madhurima Chatterjee, M., Bhattacharya, R. and Bhattacharyya, R. 2016. Shaping the Other Sides: Exploring the Physical Architecture of Rhizosphere. 42 –52. En: Choudhary D., K., Varma A., and Tuteja, N. 2016. *Plant-Microbe Interaction: An Approach to Sustainable Agriculture*, Springer Nature. Singapore. 516.
- Nadarajah, K. K. 2016. Rhizosphere Interactions: Life Below Ground. 21 – 41. En: Choudhary D., K., Varma A., and Tuteja, N. 2016. *Plant-Microbe Interaction: An Approach to Sustainable Agriculture*, Springer Nature. Singapore. 516.
- Shen J. P., Zhang L. M., Guo J. F., Ray J. L., He J. Z. 2010. Impact of long-term fertilization practices on the abundance and composition of soil bacterial communities in Northeast China. *Appl. Soil Ecol.* 46: 119 -214.

Universidad Católica Boliviana San Pablo  
Biotecnología

Santa Cruz de la Sierra – Bolivia

## Propiedades sensoriales, fisicoquímicas y antioxidantes del pitón (*Talisia esculenta* Radlk.)

Limpias Hurtado Jose A<sup>1</sup>; Montellano Duran Natalia<sup>1</sup>  
[josealbertolimpias16@gmail.com](mailto:josealbertolimpias16@gmail.com)

### Resumen

El pitón es un árbol de la Amazonía. El objetivo de este trabajo es caracterizar sensorial, fisicoquímicamente y determinar la capacidad antioxidante del fruto. La humedad se determinó por pérdida de peso. Se determinó el color con estándares de color digitalmente. La textura se determinó con un texturómetro. Se midieron las actividades antioxidantes de extractos etanólicos con los métodos de ABTS• (734nm) y DPPH• (517nm), con curvas de Trolox y flavonoides con una curva de quercetina. El pH del arilo fue 5 y el de cáscara 4,9. El %agua fue de 68±6%. Los parámetros de color fueron: L\*=52±2, b\*=28±5, a\*=18±1, La dureza fue de 753±5g y la firmeza 190±20g. En el arilo se obtuvo 28,33 µmol Trolox/g y 0,1672 mg QE/g, la cáscara dio 0,4354 mg QE/g. Mostraron un alto porcentaje de agua y cáscara y arilo ácidos. El color indicó una luminosidad media y tonalidad naranja. El fruto no es pegajoso, su cáscara es blanda y mostró mayor capacidad antioxidante que el arilo.

**Palabras clave:** pitón; fruto; colorimetría; TPA; antioxidantes.

### INTRODUCCIÓN

El pitón (*Talisia esculenta* Radlk.), es un árbol perteneciente a la familia *Sapindaceae* que se distribuye por la región amazónica de Brasil, Bolivia y Paraguay (Guarim Neto et al., 2003). Su fruto está formado por una cáscara y un arilo comestible.

Si bien escasea la información sobre el pitón boliviano, se han realizado estudios sobre la variedad brasileña donde algunos estudios preliminares han evaluado su constitución fenólica y aromática (de Souza et al., 2016); además, investigaciones sobre sus propiedades antioxidantes y antimutagénicas en modelos animales mostraron resultados prometedores (Neri-Numa et al, 2014).

El objetivo de este trabajo es caracterizar sensorial y fisicoquímicamente al fruto del pitón y determinar la capacidad antioxidante de sus moléculas bioactivas.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Se midieron (largo: a, ancho: b) y pesaron frutos para determinar estándares morfológicos descriptivos. Se hizo un extracto del arilo y de la cáscara para determinar el pH y la humedad se determinó por pérdida de peso, usando una incubadora a 60°C durante 15 días.

Se determinó el color con fotografías de alta calidad, usando una cámara NIKON D7500 y estándares de color digitalmente, mediante el software Adobe Photoshop modo LAB.

Las ecuaciones utilizadas fueron:

$$L * = \frac{L}{255} * 100$$

$$Croma = (a *)^2 + (b *)^2)^{0,5}$$

$$a^* = \frac{240a}{255} - 120$$

$$b^* = \frac{240b}{255} - 120$$

$$\text{Tono (HUE)} = \text{ATAN}\left(\frac{b^*}{a^*}\right) * 57,2958$$

$$\%IA = \frac{142,86b^*}{L^*}$$

La textura se determinó con un texturómetro (Brookfield CT3) haciendo análisis de perfil de textura con 2 punciones con sonda cónica (d=24mm, v=1mm/s, profundidad=6mm).

Se prepararon extractos etanólicos (EE, 70%, 1:2) separados de cáscara y arilo (24 horas en agitación) y se midieron las actividades antioxidantes de los EE con los métodos de ABTS• (734nm) y DPPH• (517nm), con curvas de Trolox. También, se hicieron mediciones de flavonoides con una curva de quercetina.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El peso promedio fue de: 14,6±0,6g. El pH del arilo fue 5 y el de cáscara 4,9. El %agua fue de 68±6%.

Los parámetros de color fueron: L\*=52±2, b\*=28±5, a\*=18±1, mostrando Croma=33±4, Tono=57±7, índice de amarillez=76±10.

La dureza fue de 753±5g y la firmeza 190±20g.

El ensayo de ABTS• con los EE no mostró actividad antioxidante. En el arilo se obtuvo 28,33 µmol Trolox/g en el ensayo de DPPH•, pero la sensibilidad del método no permitió determinar la concentración en la cáscara; sin embargo, la cantidad de flavonoides dio 0,4354 mg QE/g del extracto de la cáscara y 0,1672 mg QE/g del arilo.

## CONCLUSIONES

Los pitones maduros mostraron un tamaño y peso constante, con un alto porcentaje de agua característico del clima húmedo en que se desarrolla. La cáscara y el arilo fueron ligeramente ácidos, por lo que pueden ser potenciales fuentes de vitaminas y minerales. Su parámetro de color indicó una luminosidad media y tonalidad naranja. El TPA señala que el fruto no es pegajoso y que su cáscara es blanda. La cáscara de pitón mostró mayor capacidad antioxidante que el arilo.

## REFERENCIAS

- De Souza M., Bataglion G., Silva F., Almeida R., Paz W., Nobre T., et al. 2016. Phenolix and aroma compositions of pitomba fruit (*Talisia esculenta* Radlk.) assessed by LC-MS/MS and HS-SPME/GC-MS. *Food Research International*;83:87-94
- Guarim Neto G., Santana S., da Silva J. 2003. Repertório botânico da "Pitombeira" (*Talisia esculenta* (A. ST.-HIL.) Radlk. - Sapindaceae). *Acta Amazónica (Brasil)*; 33(2):237-242.
- Neri-Numa I., Carvalho-Silva L., Macedo Ferreira J., Tomazela Machado A., Gomes Malta L., Gois Ruiz A., et al. 2014. Preliminary evaluation of antioxidant, antiproliferative and antimutagenic activities of pitomba (*Talisia esculenta*). *LWT - Food Science and Technology (Brasil)*;59:1233-1238.

Universidad Católica Boliviana San Pablo  
Biotecnología, Campus km 9 Norte

Santa Cruz de la Sierra – Bolivia

## Estudios preliminares de propiedades sensoriales y antioxidantes del pacay (*Inga edulis*) en bosques semidecíduos chiquitanos

Flores Rodríguez P. A.<sup>1</sup>, Montellano Duran N.<sup>1</sup>  
agustinafrgt@gmail.com

### Resumen

El pacay (*Inga edulis*) es un árbol de la Amazonía, se cuantificaron fenoles y antioxidantes en la Amazonía brasilera, no existen estudios en el ecosistema boliviano. Es necesario analizar propiedades sensoriales y antioxidantes del pacay en Bolivia. Para propiedades sensoriales se midió color con fotografías de alta calidad obteniendo: L\*, a\*, b\*, croma y tono. Textura con un texturómetro, dos punciones (TPA), sonda cónica (TA17). Antioxidantes se utilizó extractos etanólicos del arilo y cáscara (70%EE,1:2), empleando el método de DPPH con curvas de trolox (517nm), flavonoides con curvas de quercetina(376nm). Todo en espectrofotómetro UV-Vis por triplicado. Los parámetros colorimétricos fueron: L\*=45,0±0,5; a\*=-2,6±0,01; b\*=36±0,2; Croma=36,1±0,2 y Tono=-85,93±0,01. Textura: fracturabilidad=410±6, dureza=320±2 y firmeza=177±5. Flavonoides= 0.12g/L cáscara, DPPH=1.15g/L en el arilo.

Observamos luminosidad media, color verde-amarillo, una textura con mayor fracturabilidad a dureza (cáscara dura y un arilo blando). flavonoides moderados en la cáscara. El DPPH muestra cantidad moderada de antioxidante en el arilo del pacay.

**Palabras claves:** *inga edulis*, DPPH, textura, colorimetría.

### INTRODUCCIÓN

Los frutos nativos pertenecientes a la región de Bolivia poseen grandes capacidades medicinales, en la mayoría de estos casos sólo se conocen aplicaciones empíricas, se considera que es necesario investigar de manera cualitativa y cuantitativa las propiedades de estos.

El pacay (*Inga edulis*) es un árbol de la familia Fabaceae que se encuentra distribuido en la Amazonía de Brasil, Perú y Bolivia, se han cuantificado fenoles y antioxidantes en zonas de Amazonía brasilera, pero no se ha podido realizar análisis sobre el pacay del ecosistema boliviano (T.K. Lim, 2012)

El objetivo principal de esta investigación es analizar y describir las propiedades sensoriales y antioxidantes del pacay.

### MÉTODOS

Para poder determinar propiedades sensoriales del pacay (*inga edulis*) se tomó en cuenta dos características: color y textura, el color se determinó digitalmente con fotografías de alta calidad, de una cámara Nikon D7500, para luego ser analizada con el programa Adobe Photoshop y obtener los valores de:

$$L^* = \frac{\text{lightness}}{255} * 100, \quad a^* = \frac{240a}{255} - 120, \quad b^* = \frac{240b}{255} - 120, \quad \text{croma} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \text{ y } \text{tono} = \tan^{-1}(a^*/b^*)$$

La textura se determinó con un análisis de perfil con un texturómetro (Brookfield CT3, MA, EE. UU), con dos punciones (TPA), sonda cónica TA17, d=24 mm, v=2 mm/s, profundidad= 4mm todo este procedimiento por triplicado en cada muestra.

El estudio de antioxidantes del pacay (*inga edulis*) se realizó con los extractos etanólicos del arilo y cáscara (70% EE, 1:2), utilizando el método del radical DPPH con curvas de trolox a 517 nm como referencia. Asimismo, se cuantificó la cantidad de flavonoides con una curva de quercetina a 376 nm. Todos estos procedimientos fueron realizados con un espectrofotómetro UV-Vis por triplicado. (de Freitas FA *et al*, 2017)

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los parámetros colorimétricos fueron:  $L^*=45,0\pm 0,5$ ;  $a^*=-2,6\pm 0,01$ ;  $b^*=36\pm 0,2$ ; Cromo= $36,1\pm 0,2$  y Tono= $-85,93\pm 0,01$ . Los análisis de textura resultaron en una fracturabilidad= $410\pm 6$ , dureza= $320\pm 2$  y firmeza= $177\pm 5$ . El ensayo de flavonoides dio 0.12g/L en la cáscara de concentración y el del radical DPPH dio 1.15g/L en el arilo

## CONCLUSIONES

En colorimetría se pudo observar una luminosidad media con un tono alto y un color indicando hacia el verde amarillo. se pudo ver que la textura nos daba una fracturabilidad más alta que la dureza, indicando así que la cáscara dura y un arilo blando, siendo esto una característica de la familia Fabaceae.

El ensayo de flavonoides indicó que existe una alta cantidad en la cáscara comparándolo con el arilo de este mismo fruto pacay (*inga edulis*), asimismo el ensayo del radical DPPH nos muestra una cantidad moderada de antioxidantes en el arilo del fruto. estos resultados muestran una similaridad a los estudios realizados anteriormente en la amazonia brasileña.

## REFERENCIAS

De Freitas FA, Araujo RC, Soares ER, Nunomura CS, Da silva F, De souza A, Montalban FF, Acho L, Lima ES, Battalio H. 2017. Biological evaluation and quantitative analysis of antioxidant compounds in pulps of the Amazonian fruits bacuri (*Platonia insignis* Mart.), inga (*Inga edulis* Mart.), and uchi (*Sacoglottisuchi* Huber) *J Food Biochem*, e12455.

Lim TK, 2012, Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants, Springer Netherlands; vol 2. p. 715–9.

iGEM – Bolivia

Bolivia

## ARSEMÁFORO: Diseño de un biosensor para la detección de arsénico en agua de consumo

Jonatan Aliaga, iGEM Bolivia, firstofthechildren35@gmail.com  
 Andrea A. Tambo Santos, iGEM Bolivia, andreatambo17@gmail.com  
 Oskar Zeballos, iGEM Bolivia, zeksamosk@gmail.com

### Resumen

En nuestro país se ha reportado que las concentraciones de arsénico en cuerpos de agua del altiplano frecuentemente superan los límites seguros para su consumo, representando un riesgo importante para la salud de las comunidades de la región. Creemos que la implementación de mecanismos eficaces de monitoreo es esencial para una potencial solución. En consecuencia, **iGEM Bolivia** abordó el desafío de diseñar un biosensor para detectar arsénico de forma rápida, fiable y económica, este constará de una batería de 4 biosensores basados en *Escherichia coli* transformadas con diferentes constructos genéticos que expresará una cromoproteína violeta (mRFP1-Violet) cuando el Arsénico está presente en un rango de concentraciones determinado. Planeamos liofilizar la batería de biosensores en tiras de papel para generar patrones de semáforo visibles a simple vista y acoplar su interpretación a un dispositivo electrónico (FADSR) que permite la lectura y reporte de múltiples muestras simultáneamente.

**Palabras clave: Arsénico, biosensor de células enteras, cromoproteína, iGEM.**

### INTRODUCCIÓN

Las fuentes de agua de consumo disponibles en comunidades rurales, alrededor de lagos y/o ríos en el altiplano boliviano, se ven afectadas por una combinación de contaminantes naturales, actividades mineras y la liberación de drenaje ácido de mina (AMD). (Ormachea Muñoz & Quintanilla Aguirre, 2014)

Todos los tipos de agua de la meseta del Altiplano contienen arsénico, principalmente, en su forma oxidada (As V). (De Loma et al., 2019) La presencia de este metal tiene efectos altamente tóxicos, clasificados como tales por organismos internacionales, que provocan graves enfermedades en el ser humano y en casos extremos incluso cáncer, aunque se encuentren en muy bajas concentraciones. (Quaghebeur et al., 2019)

En vista de tales problemas, existe la necesidad de monitorear constantemente las concentraciones de arsénico en el agua de

consumo. (Rajakovic & Rajakovic-Ognjanovic, 2018). Por esta razón el proyecto presentado por nuestro equipo es un biosensor bacteriano para la detección y cuantificación de arsénico en fuentes de agua de consumo. De esta forma proponemos una alternativa innovadora y accesible, basada en herramientas de la biología sintética, que contribuye a un servicio de vigilancia ambiental.

### MÉTODOS

Agrupamos todo el proyecto en 3 fases; diseño, construcción y validación.

**Diseño.** Utilizamos la plataforma en línea *Benchling* para el diseño de las secuencias de los 4 constructos genéticos, estos incorporaron una amplia gama de sensibilidades al arsénico y una señal de salida visible a simple vista. Estas características fueron incluidas gracias a 3 estrategias: control de densidad de ArsR intracelular (ArsR-ParsR), amplificadores transcripcionales (HrpRS-RinA) y un reportero de cromoproteína violeta (mRFP1-violet).

**Constructo As0:** la más sensible de todos (>0.5 ppb), tiene un promotor constitutivo débil para la expresión de *arsR* y una cascada de doble amplificador (HrpRS-RinA).

**Constructo As2:** sensibilidad media (>3 ppb), también tiene un promotor constitutivo débil para la expresión de *arsR* y un elemento amplificador simple (HrpRS).

**Constructo As4:** sensibilidad media (>10 ppb), tiene un promotor constitutivo de fuerza media para la expresión de *arsR*, no hay un amplificador transcripcional presente.

**Constructo As5:** el menos sensible de todos (>50 ppb), tiene un promotor constitutivo muy fuerte para la expresión de *arsR*, no hay un amplificador transcripcional presente.

**Construcción.** Todas las secuencias diseñadas fueron codón optimizadas, insertadas dentro de plásmidos estándares y encargados para su síntesis dentro de la plataforma en línea de IDT (Integrated DNA Technologies). Una vez recibidas los constructos sintetizados se transformarán en cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  competente para dar inicio a los experimentos correspondientes.

Se agruparon los experimentos planeados en 5 etapas mencionadas a continuación:

- Toxicidad del arsénico y los constructos genéticos sobre el chasis bacteriano.
- Caracterización de la respuesta semicuantitativa del biosensor.

- Caracterización de la respuesta cuantitativa del biosensor1.

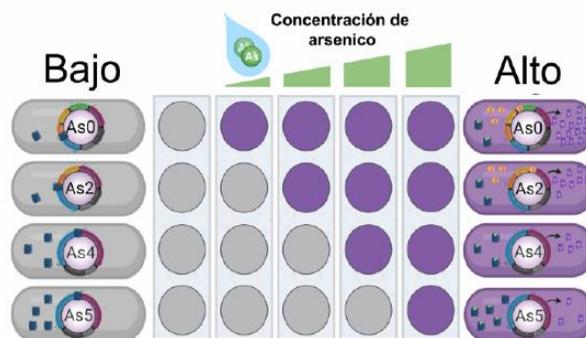
- Validación de la respuesta cuantitativa2.

- Evaluación de la respuesta del biosensor frente a muestras reales.

Los parámetros para caracterizar un biosensor de células enteras son obtenidos de una curva de respuesta (Absorbancia sobre diferentes concentraciones de arsénico), las cuales son los siguientes: **El límite de detección y el rango dinámico**, el primero es la concentración mínima del arsénico que provoca una respuesta observable (color), mientras que el segundo es la relación entre la respuesta máxima alcanzable y la respuesta ante la ausencia de arsénico (Wan et al., 2022).

2 En esta etapa se evalúa la selectividad, que es la propiedad cualitativa sobre la capacidad del biosensor en distinguir el Arsénico sobre otros metales pesados similares.

**Validación.** Para hacer posible las evaluaciones *in situ*, primero se inmovilizarán las bacterias en papel por medio de la liofilización que permite su portabilidad y detectar el arsénico de forma semicuantitativa, por lo que se dispondrán los 4 biosensores en patrones semáforo (Fig.1) (Etapa 2). Por último, pretendemos poner a prueba el funcionamiento de nuestro biosensor con muestras reales frente a métodos tradicionales como la cuantificación por espectroscopia de absorción atómica. (Etapa 5).



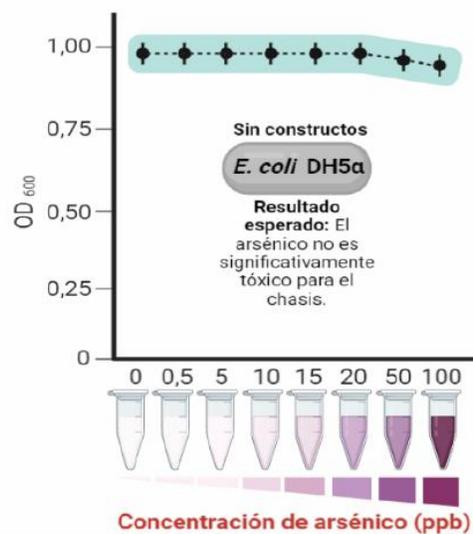
**Figura 1.** Biosensor en patrones semáforo dispuestos en tiras de papel

Las bacterias liofilizadas en papel también serán procesadas e interpretadas en un dispositivo electrónico denominado FADSR (Fast Arsenic Data Sample Reader), previamente construido por equipo de iGEM Bolivia.

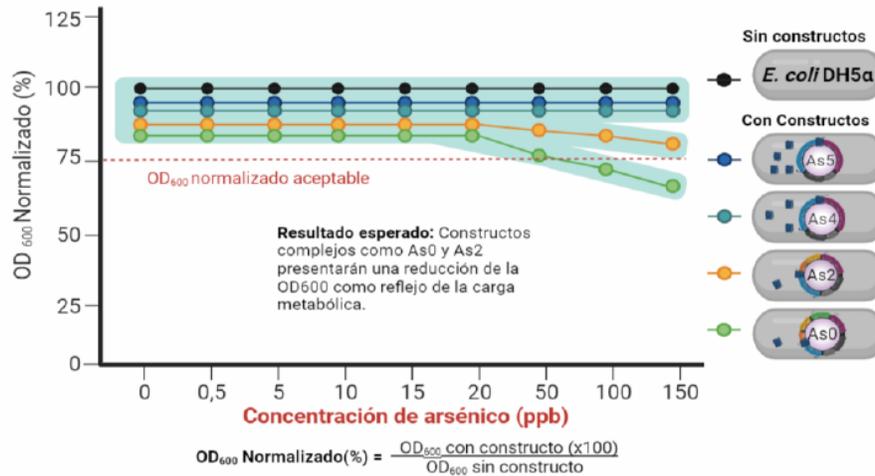
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido a situaciones relacionadas con la pandemia COVID-19, reactivos y entrada limitada al laboratorio no pudimos materializar el biosensor de nuestro proyecto hasta el momento, pero gracias a la información recopilada de la literatura científica podemos teorizar los resultados que esperamos para cada una de las 5 etapas de nuestro diseño experimental:

**Toxicidad del arsénico y los constructos genéticos sobre el chasis bacteriano.** Esperamos que la toxicidad ejercida sobre el biosensor sea mínima, ya que las concentraciones que planeamos usar son varias órdenes de magnitud más bajas que las concentraciones reportadas como tóxicas para el chasis. Nadra et al. probó un biosensor que utiliza cromoproteínas en concentraciones de arsénico de hasta 1000 ppb sin reportar una toxicidad significativa (Nadra et al., 2017), de igual manera, Zhuang et al. informó que el chasis bacteriano comenzó a verse afectado por los efectos tóxicos del arsénico en concentraciones superiores a 1874 ppb (Zhuang et al., 2010).



**Figura 2.** Toxicidad del arsénico sobre el desarrollo del chasis bacteriano.

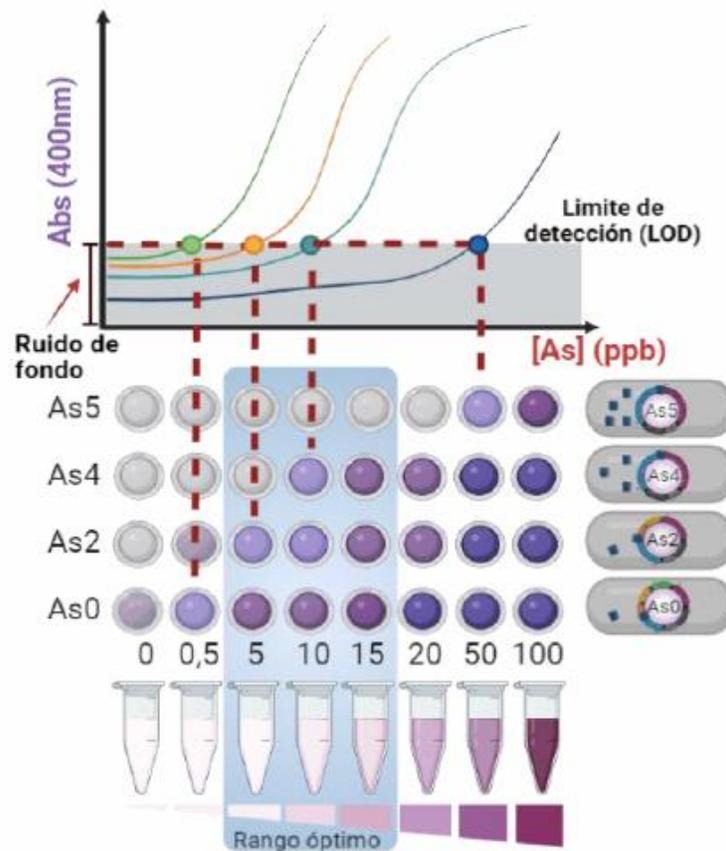


**Figura 3.** Carga metabólica de nuestras construcciones genéticas sobre el chasis bacteriano representado como una disminución de OD600.

Esperamos que en nuestro diseño los constructos As0 y As2 ejerzan una mayor carga metabólica sobre la bacteria en comparación con As4 y As5. La carga metabólica que ejercerán los constructos genéticos está estrechamente relacionada con su complejidad y con la longitud de la cascada de amplificación. Wang et al. notó una alta carga metabólica cuando la cascada estaba compuesta por tres amplificadores. Por el contrario, al reducir la longitud de la cascada a solo 2 amplificadores, la construcción presentó una carga menor. También se afirmó que la combinación de los amplificadores HrpRS-RinA dará como resultado un menor esfuerzo metabólico para el microorganismo (Wang et al., 2019).

**Caracterización de la respuesta semicuantitativa del biosensor.** El límite teórico de detección (LOD) de los constructos

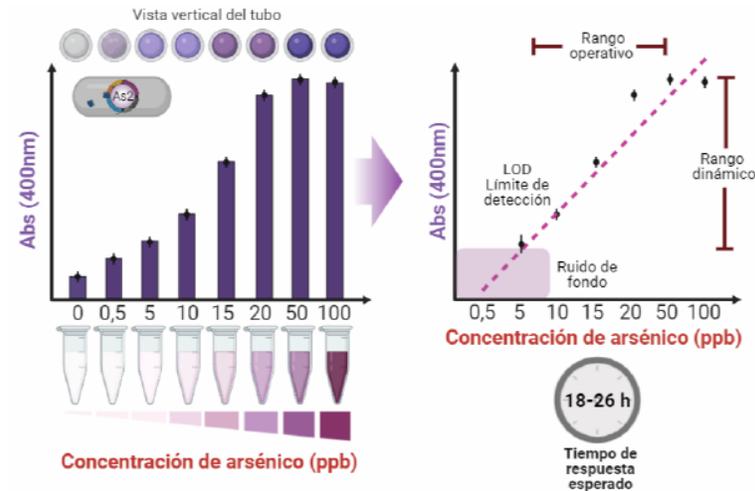
genéticos es  $\geq 0,5$  ppb para As0,  $\geq 3$  ppb para As2,  $\geq 10$  ppb para As4 y  $\geq 50$  ppb para As5. En este punto y sin el uso de ningún instrumento, los experimentos nos darán resultados semicuantitativos. Esperamos que los LOD informados sean considerablemente más altos que los teóricos, los datos recopilados serán útiles para pruebas posteriores. También esperamos que los niveles de ruido de fondo sean más altos que los informados por Wang et al. ya que nuestro diseño no contiene sitios de unión ArsR (ABS) adicionales para su mitigación (Wang et al., 2019). Para inmovilizar los microorganismos, realizaremos la liofilización de bacterias en tiras de papel junto con soluciones protectoras que asegurarán la viabilidad hasta 2 meses después del procesamiento, esperamos una pérdida mínima de su sensibilidad al arsénico en las condiciones de almacenamiento adecuadas (Stocker et al., 2003).



**Figura 4. Patrones semáforo de los biosensores expuestos a diferentes concentraciones de Arsénico.**

**Caracterización de la respuesta cuantitativa del biosensor.** En esta etapa se trabajará con los constructos que presenten una respuesta óptima a concentraciones  $\geq 5 - 20$  ppb de arsénico, siendo As2 y As4 principales candidatos para cumplir este criterio. Como se mencionó anteriormente, esperamos que el ruido de fondo sea considerablemente alto en As2 en comparación con As4, esto debido a la presencia de amplificadores transcripcionales

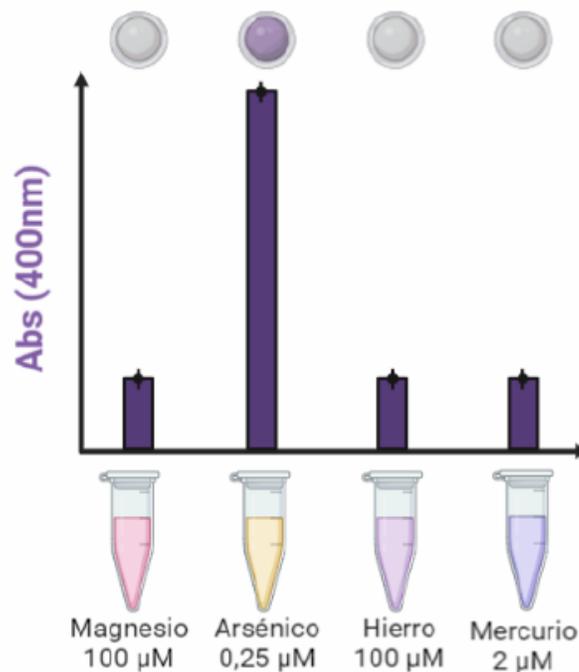
sin sitios ABS adicionales (Wang et al., 2019). Se espera que la señal de salida de As2 y As4 esté linealmente correlacionada con el arsénico dentro del rango de 5 - 100 ppb. Esperamos que la sensibilidad en este punto sea mayor que la de los métodos tradicionales, pero la repetibilidad aún debe confirmarse mediante la generación de curvas de calibración.



**Figura 5. Curva de calibración esperada para la respuesta del constructo As<sub>2</sub>/As<sub>4</sub>.**

**Validación de la respuesta cuantitativa.** En el intento de probar la especificidad de la respuesta al arsénico, expondremos el biosensor a tres metales diferentes (Fe, Hg, Mg) buscando cualquier tipo de respuesta no específica. No esperamos respuesta por encima del ruido de fondo contra estos 3

metales (Wang et al., 2019). El único caso reportado de resultados no específicos en este tipo de biosensor es causado por antimonio, este podría generar respuestas incluso mayores que el propio arsénico dependiendo del diseño empleado (Kaur et al., 2015).



**Figura 6. Selectividad del biosensor al arsénico, estimamos la ausencia de absorbancia ante la presencia de otros metales pesados.**

**Respuesta del biosensor con muestras reales.** Inicialmente, esperamos que las concentraciones reportadas por el biosensor sean más bajas que las reportadas por los métodos espectrométricos porque nuestro biosensor apunta al arsénico biodisponible en contraste con los métodos tradicionales que detectan el arsénico total (Liao & Ou, 2005). Pero la biodisponibilidad del arsénico depende de varios factores fisicoquímicos intrínsecos de la muestra y del medio de cultivo, dando como resultado posibles resultados sesgados relacionados con la naturaleza de la matriz. Por ejemplo, esperamos que la biodisponibilidad sea menor en muestras con alta concentración de materia orgánica disuelta. De manera similar, si la concentración de fosfato es alta, la absorción de As (V) también se reducirá significativamente (Pothier et al., 2018), lo que daría como resultado una concentración reportada considerablemente más baja que los métodos espectrométricos.

Por otro lado, una ventaja que tiene nuestro biosensor es la especiación de arsénico en agua potable recolectada de pozos. Esta agua contiene principalmente As (III) debido al contacto reducido del pozo con el oxígeno en contraste con las aguas superficiales, los biosensores de células enteras son especialmente sensibles a esta especie porque no necesita un paso de reducción extra (Pothier et al., 2020).

## CONCLUSIONES

Se realizó el diseño *in silico* de un biosensor bacteriano de células enteras para la detección y cuantificación de arsénico biodisponible en fuentes de agua de consumo. En el cual se detalla la forma de materializar su construcción y posteriormente realizar su validación. Por lo que, resulta prometedor afianzar la ejecución de los experimentos planteados, proporcionando lineamientos claros de los parámetros a evaluar, evitando de que el tipo de constructo u otros metales afecten negativamente en la respuesta, culminando en el desarrollo de los patrones semáforo del biosensor en papel que permitirá realizar análisis *in situ* de arsénico en muestras de

agua de consumo, con el fin de brindar una alternativa viable que contribuya a futuro un servicio de vigilancia ambiental.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- De Loma, J., Tirado, N., Ascui, F., Levi, M., Vahter, M., Broberg, K., & Gardon, J. (2019). Elevated arsenic exposure and efficient arsenic metabolism in indigenous women around Lake Poopó, Bolivia. *Science of The Total Environment*, 657, 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.473>
- Kaur, H., Kumar, R., Babu, J. N., & Mittal, S. (2015). Advances in arsenic biosensor development – A comprehensive review. *Biosensors and Bioelectronics*, 63, 533-545. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.08.003>
- Liao, V. H.-C., & Ou, K.-L. (2005). Development and testing of a green fluorescent protein-based bacterial biosensor for measuring bioavailable arsenic in contaminated groundwater samples. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(7), 1624-1631. <https://doi.org/10.1897/04-500R.1>
- Nadra, A. D., Barone, F., Dorr, F., Marasco, L. E., Mildiner, S., Patop, I. L., Sosa, S., Vattino, L. G., Vignale, F. A., Altszyler, E., Basanta, B., Carlotto, N., Gasulla, J., Giménez, M., Grande, A., Nieto Moreno, N., & Bonomi, H. R. (2017). Design and evaluation of an incoherent feed-forward loop for an arsenic biosensor based on standard iGEM parts. *Synthetic Biology*, 2(1), ysx006. <https://doi.org/10.1093/synbio/ysx006>
- Ormachea Muñoz, M., & Quintanilla Aguirre, J. (2014). DISTRIBUTION OF GEOGENIC ARSENIC IN

- SUPERFICIAL AND UNDERGROUND WATER IN CENTRAL BOLIVIAN HIGHLANDS. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 54-60.
- Pothier, M. P., Hinz, A. J., & Poulain, A. J. (2018). Insights Into Arsenite and Arsenate Uptake Pathways Using a Whole Cell Biosensor. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02310>.
- Pothier, M. P., Lenoble, V., Garnier, C., Misson, B., Rentmeister, C., & Poulain, A. J. (2020). Dissolved organic matter controls of arsenic bioavailability to bacteria. *Science of The Total Environment*, 716, 137118. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137118>
- Quaghebeur, W., Mulhern, R. E., Ronsse, S., Heylen, S., Blommaert, H., Potemans, S., Valdivia Mendizábal, C., & Terrazas García, J. (2019). Arsenic contamination in rainwater harvesting tanks around Lake Poopó in Oruro, Bolivia: An unrecognized health risk. *Science of The Total Environment*, 688, 224-230. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.126>
- Rajakovic, L., & Rajakovic-Ognjanovic, V. (2018). Arsenic in Water: Determination and Removal. En *Arsenic—Analytical and Toxicological Studies*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.75531>
- Stocker, J., Balluch, D., Gsell, M., Harms, H., Feliciano, J., Daunert, S., Malik, K. A., & van der Meer, J. R. (2003). Development of a Set of Simple Bacterial Biosensors for Quantitative and Rapid Measurements of Arsenite and Arsenate in Potable Water. *Environmental Science & Technology*, 37(20), 4743-4750. <https://doi.org/10.1021/es034258b>
- Wang, B., Wan, X., Volpetti, F., Petrova, E., French, C., & Maerkl, S. J. (2019). Cascaded amplifying circuits enable ultrasensitive cellular sensors for toxic metals. *Nature Chemical Biology*, 15(5), 540-548. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0244-3>
- Zhuang, G., Hu, Q., Li, L., Wang, Y., Zhao, W., & Qi, H. (2010). Construction of WCB-11: A novel phiYFP arsenic-resistant whole-cell biosensor. *Journal of Environmental Sciences*, 22(9), 1469-1474. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(09\)60277-1](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60277-1)

Universidad Mayor de San Simón  
Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias

Cochabamba Bolivia

## Evaluación de medios de cultivo y sustratos para la producción de inóculo de hongos comestibles

Fátima Rojas <sup>1</sup>; Mayra Claros <sup>1</sup>; Noel Ortuño <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Consultora independiente

E mail: fatima\_rojas@hotmail.com

### Resumen

La importancia económica de los hongos comestibles y las nuevas demandas culinarias en la sociedad, exigen desarrollar y establecer procesos de producción adaptados a nuestro medio. En esta línea, se evaluaron medios de cultivo y sustratos para la producción de inóculo. En una primera fase, se estudiaron diferentes medios de cultivo sólido *in vitro*, para el crecimiento micelial, donde se determinó el mejor medio para el hongo *Agaricus blazei* es MSA; para *Grifola frondosa* y *Lentinula edodes* son MSA, T y A; por último, para *Pleurotus ostreatus* los medios MSA, T, P y A. En una segunda fase se usaron diferentes semillas de cereal, como sustrato, contenidos en dos diferentes envases: bolsa plástica y frasco de vidrio, encontrándose respuestas diferentes al sustrato utilizado. En ambas fases se observaron cambios de coloración durante la maduración del micelio en cada una de las especies, aspecto característico de las especies de hongos comestibles.

**Palabras clave:** HONGOS COMESTIBLES, *Agaricus blazei*, *Grifola frondosa*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, CULTIVO *in vitro*, INÓCULO, SUSTRATO

### INTRODUCCIÓN

Entre la variedad de hongos que existe en la naturaleza, la mayoría tienen aplicaciones en la agroindustria, la medicina y poseen propiedades alimentarias, alucinógenas, toxicológicas, entre otras (Mizuno 1995, Mamede 2001 y OEI 2003). Estos incluyen especies venenosas y especies fitoparásitas, que causan pérdidas económicas en los cultivos agrícolas (Martinez – Carrera, 1998 y Stamets, 2005). También incluyen especies importantes por su comestibilidad y relación simbiótica con las plantas; otros por su valor nutritivo y características organolépticas (Eaton y Salmón 2000, Ardón 2007, López 2007).

El cultivo de hongos comestibles es considerado de interés a nivel mundial, tanto por las características mencionadas, como por ser un alternativa de aprovechamiento de residuos agroindustriales (Ferreira 1997 y

Ardón 2007); es por ello que su producción y estudio se ampliaron en los últimos años, enfocándose principalmente en las especies de mayor demanda mundial como *Agaricus bisporus* cultivado ampliamente por sus características organolépticas, *Lentinula edodes*, *Pleurotus sp.* De amplio consumo por sus características medicinales como también organolépticas, incluyendo en los últimos años a las especies *Agaricus blazei* y *Grifola frondosa*, por sus características, medicinales (Tormo 1996, Trabanino 2004, France y Cortez 2005, Suarez 2010).

Esta alternativa de producción ha sido explotada con éxito desde hace mucho tiempo en otros países, principalmente de Asia, donde se ha desarrollado toda una tecnología para la producción y conservación de los hongos comestibles como champiñón, hongo ostra, shiitake (Stamets 2005 y Suarez 2010).

En Bolivia existe muy poco conocimiento de las especies de hongos comestibles, su cultivo y le potencial que representan, por ello y por los bajos niveles de producción existentes, hacen necesarias la implementación de técnicas y tecnología adecuada a nuestro medio.

Según Quimio (2002), Stamets (2005) y Suarez (2010), el cultivo de hongos comprende dos etapas, una primera que tiene la finalidad de obtener semilla, termino con el cual es conocido el material de multiplicación o inóculo obtenido del micelio del hongo, la segunda etapa es ya propiamente de producción, destinada a la obtención de carpóforos o frutos, cultivados en troncos de árboles, paja de cereales, compost y residuos agroindustriales.

En el presente trabajo, se estudió el crecimiento y maduración del micelio, en respuesta a diferentes medios de cultivo *in vitro*, diferentes sustratos y envases, para la obtención de inóculo de cuatro especies de hongos comestibles.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó micelio de *A. blazei*, *L. edodes*, *G. frondosa* y *P. ostreatus*, estas especies se eligieron en función a su importancia comercial a nivel mundial. Los medios de cultivo *in vitro*, empleados para este trabajo, se seleccionaron en función a los elementos nutritivos que proporcionan un medio adecuado para el crecimiento micelial de los hongos.

**Los tratamientos estuvieron constituidos a partir de los siguientes factores:**

Factor 1: Especie de hongo:	Factor 2: Medio de cultivo:
ABM: <i>Agaricus blazei</i>	PDA = papa, dextrosa, agar
GF: <i>Grifola frondosa</i>	P = papa, dextrosa, levadura, agar
LE <i>Lentinula edodes</i>	A = avena, levadura, malta, agar
PO <i>Pleurotus ostreatus</i>	T = trigo, dextrosa, malta, agar
	MSA = malta, sorgo, levadura y agar

En base a los dos factores, se formaron 20 tratamientos, distribuidos en un diseño completamente aleatorio, cada uno con cuatro repeticiones. Cada unidad experimental estuvo constituida por una placa Petri. Las variables que se consideraron durante esta fase fueron:

Como sustrato se evaluó granos de avena, cebada, maíz, sorgo y trigo, estos cereales fueron seleccionados por la disponibilidad en el mercado y por su costo.

Para el proceso *in vitro*, se preparó medio de cultivo sólido comercial PDA (papa dextrosa agar), este se esterilizó a una temperatura de 121°C con 15 libras/pulg<sup>2</sup> de presión, durante 20 minutos. El mismo se dispensó en placas Petri dentro de una cámara de flujo laminar. En condiciones de asepsia se sembró cada especie debidamente codificada. Posteriormente fueron llevadas a la incubadora a 25°C, hasta que el micelio completó su crecimiento en toda la placa.

### **Fase I: Selección de medios de cultivo**

La preparación de los medios de cultivo, se realizó mediante las instrucciones del fabricante, ajustando el pH de cada medio a 6.0, para luego esterilizarlos en autoclave, durante 20 minutos, a una temperatura de 121°C con 15 libras/pulg<sup>2</sup> de presión. En condiciones de asepsia, se dispensó en placas Petri dejando reposar por 24 horas.

Dentro de la cámara de flujo laminar, se transfirió el micelio activo de cada especie en estudio, a un círculo de 5 mm de diámetro, en la parte central de cada placa Petri, la cual provenía de otra placa previamente activada. Posteriormente se llevaron las placas Petri inoculadas a una incubadora a 25°C.

crecimiento micelial y maduración del micelio.

El crecimiento micelial, se evaluó cada 48 horas después de la siembra en placa, midiendo en forma radial con la ayuda de una regla graduada, hasta que el micelio cubrió por completo la placa Petri.

**Fase II: Selección de sustratos:**

Inicialmente se realizó la limpieza de los cereales, eliminando impurezas (piedras, paja,

otras semillas). La preparación del sustrato se realizó siguiendo la metodología propuesta por Ferreira (1997).

**Los tratamientos estuvieron constituidos por la combinación de los siguientes factores:**

Factor 1. Especie de hongo	Factor 2. Sustrato	Factor 3: Envase
ABM = <i>Agaricus blazei</i>	A = Avena	F = Frasco
GL = <i>Grifola frondosa</i>	C = Cebada	B = Bolsa
LE = <i>Lentinula edodes</i>	M = Maíz	
PO = <i>Pleurotus ostreatus</i>	S = Sorgo	
	T = Trigo	

Como variable de respuesta se consideró al crecimiento micelial, el que fue evaluado mediante mediciones en porcentaje de la distancia recorrida por el micelio, sobre el sustrato en cada unidad experimental. Las mediciones se realizaron cada 48 horas, hasta que el micelio cubrió por completo el sustrato.

Los tratamientos fueron evaluados en un diseño completamente aleatorio con 40 tratamientos, cada uno con cuatro repeticiones. Cada unidad experimental estuvo constituida por un frasco de vidrio y una bolsa (paralelamente).

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN****Fase I: Selección de medios de cultivo**

**Crecimiento micelial en medios de cultivo *in vitro*.** El crecimiento micelial de cada especie, mostró diferente comportamiento en cada uno de los medios de cultivo. De acuerdo al ANVA se encontró diferencias significativas ( $p < 0.001$ ), para la interacción entre hongo, medio y día, por lo que cada hongo tuvo un desarrollo diferenciado en cada medio de cultivo en relación al tiempo.

**Crecimiento micelial de *Agaricus blazei* en los medios de cultivo *in vitro*.** En base a la comparación de medias, el crecimiento micelial de *A. blazei* en los diferentes medios de cultivo *in vitro* (A, MSA, P, PDA y T) a través del tiempo, presentó diferentes comportamientos.

El crecimiento micelial de *A. blazei*, duró 30 días, siendo superior estadísticamente ( $p = 0.001$ ) en el medio de cultivo MSA respecto a los medios de cultivo A, T, P y PDA, que duraron 46 días, bajo las mismas condiciones ambientales. Se observó que en el medio de cultivo MSA, el crecimiento micelial de *A. blazei* fue superior, en comparación con los medios de cultivo PDA, T, A y P.

**Crecimiento micelial de *Grifola frondosa* en los medios de cultivo *in vitro*.** El crecimiento micelial de *G. frondosa* en los diferentes medios de cultivo *in vitro*, presentó diferente comportamiento a través del tiempo. En el crecimiento micelial del hongo *G. frondosa*, se observa que en los medios de cultivo A, MSA y T completaron el crecimiento en placa en 20 días y superiores estadísticamente ( $p = 0.001$ ) a los medios PDA y P, en cambio el crecimiento micelial en los medios de cultivo P y PDA, mostró un ritmo lento, completando la placa Petri a los 46 días. También se observó que en los medios de cultivo T, A y MSA, el crecimiento micelial de *G. frondosa* completó la placa Petri, antes que en los medios de cultivo PDA y P.

**Crecimiento micelial de *Lentinula edodes* en los medios de cultivo *in vitro*.** En base a la comparación de medias, el crecimiento micelial de *L. edodes* en los diferentes medios de cultivo, presentó diferentes comportamientos a través del tiempo.

Se observó que el micelio del hongo *L. edodes*, en los medios de cultivo A, MSA y T,

presentó un crecimiento similar y superior estadísticamente ( $p = 0.001$ ), comparando con los medios PDA y P, llegando a completar la placa Petri en 8 días. En cambio, en el medio de cultivo P, completó su crecimiento a los 10 días. Por otro lado en el medio PDA completó la placa Petri en 16 días, siendo este el medio de cultivo que presenta un período de crecimiento más largo en relación a los otros. El crecimiento del micelio de *L. edodes* es similar en los medios de cultivo MSA, A, T y P, en cambio en el medio de cultivo PDA, presentó un crecimiento más lento.

**Crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus* en los medios de cultivo *in vitro*.** El crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus* en los medios de cultivo, presentó diferente comportamiento a través del tiempo. Los medios de cultivo A, MSA, P y T, para el crecimiento del micelio del hongo *P. ostreatus*, fueron superiores estadísticamente ( $p = 0.001$ ), al medio PDA, ya que completaron la placa Petri en 8 días. El crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus* en el medio de cultivo PDA, completó su ciclo en la placa en 10 días, siendo este el crecimiento más lento. El crecimiento del micelio de *P. ostreatus* completó la placa Petri en menor tiempo en los medios de cultivo MSA, T, P y A. También se debe mencionar que el micelio de cada especie tiene un comportamiento diferente en cada medio de cultivo y depende del tipo de medio de cultivo utilizado y del pH.

Estas especies pudieron completar su ciclo *in vitro* a los 30 días, lo cual está cercano a lo reportado por Suárez (2010), que indica que el micelio de los hongos comestibles, coloniza el medio de cultivo a los 21 o 28 días después de la inoculación, en medio de cultivo PDA.

Ardón (2007), menciona que los medios de cultivo que contienen extracto de levadura y extracto de malta, son utilizados frecuentemente para el crecimiento micelial y propagación de hongos comestibles. Suárez (2010), menciona que el crecimiento del micelio del hongo *L. edodes*, es mejor en el medio PDA.

Mediante este trabajo se proporcionan otros medios de cultivo alternativos para el crecimiento micelial de este hongo.

Suárez (2010), menciona que los medios de cultivo en el que el micelio de *Pleurotus ostreatus* crece con mayor velocidad, son PDA y P, completando la placa Petri hasta los 10 días.

## Fase II: Selección de sustratos

Para este análisis, se utilizó el micelio que se identificó en la etapa 1 de la primera fase del estudio.

**Crecimiento micelial de *Agaricus blazei* en los diferentes sustratos en bolsa.** El crecimiento micelial de *A. blazei* presenta diferentes comportamientos en cada uno de los sustratos utilizados en este estudio. El crecimiento micelial en bolsa de *A. blazei*, mostró que los sustratos T y S fueron estadísticamente superiores ( $P = 0.001$ ) respecto a los sustratos A, C y M, hasta el día 30, en cambio los sustratos C y M completaron el crecimiento a los 32 días, y en A completó a los 34 días, siendo este el crecimiento más lento. Además del tiempo, se observó que el micelio de este hongo creció más compacto y vigoroso en los sustratos T y S, en comparación con los sustratos A, C y M.

**Crecimiento micelial de *Agaricus blazei* en los diferentes sustratos en frasco.** El crecimiento del micelio de *Agaricus blazei* en frasco, fue superior estadísticamente ( $P = 0.001$ ) en los sustratos S y M con relación a los otros, teniendo en cuenta que en todos los sustratos la colonización del micelio se completó en 34 días. También se observó que en los sustratos S y M el micelio fue vigoroso y compacto, lo cual le permitirá un mejor desarrollo del inóculo.

**Crecimiento micelial de *Grifola frondosa* en los diferentes sustratos en bolsa.** El crecimiento micelial de *G. frondosa* presenta diferentes comportamientos en cada uno de los sustratos utilizados en este estudio, como se presenta a continuación. El crecimiento del

micelio, en bolsa de *G. frondosa* en el sustrato A, fue superior ( $P = 0.001$ ) estadísticamente hasta el día 30, respecto a los otros sustratos. Los sustratos M y C, completaron el crecimiento micelial hasta el día 32, en cambio los sustratos S y T, recién al día 34, presentando un crecimiento más lento que en el sustrato A. También se observó que el micelio más compacto y vigoroso, se presentó en los sustratos S y A, señal que muestra que es posible obtener un inóculo de mayor calidad, siendo el mejor sustrato para el crecimiento micelial del hongo, el sustrato A, por el tiempo de crecimiento y la vigorosidad del inóculo.

**Crecimiento micelial de *Grifola frondosa* en los diferentes sustratos en frasco.** El crecimiento de micelio de *G. frondosa* en frasco, fue superior en el sustrato T, pero similar con todos los demás sustratos. El micelio del hongo completó su crecimiento hasta el día 32, en todos los sustratos estudiados. Se observó que en los sustratos S y T, el micelio creció vigoroso y compacto, lo cual otorga buenas características para obtener un inóculo de mayor calidad.

**Crecimiento micelial de *Lentinula edodes* en los diferentes sustratos en bolsa.** El crecimiento micelial de *L. edodes* presenta diferente comportamiento en cada uno de los sustratos utilizados. El crecimiento de micelio de *L. edodes* en bolsa, mostró que los sustratos S y T fueron superiores estadísticamente ( $P = .001$ ), completando su crecimiento el día 28; los sustratos A y M completaron el crecimiento micelial a 32 días pos inoculación.

En el sustrato C se completó a los 36 días, siendo el crecimiento más lento en relación a los sustratos S, T, A y M. Además, el micelio en los sustratos S y T, fue más compacto y vigoroso respecto a los otros sustratos, generando a futuro un inóculo de mejor calidad.

**Crecimiento micelial de *Lentinula edodes* en diferentes sustratos en frasco.** El crecimiento de micelio de *L. edodes* en frasco,

fue similar en los sustratos A, S, y T y superior ( $P = 0.001$ ) estadísticamente a los otros sustratos, completando su crecimiento hasta el día 20. Se observó que en los sustratos C y M, el micelio detuvo su crecimiento a los 24 días.

En los sustratos S y T el micelio de *L. edodes* fue más compacto y vigoroso, lo que permitió obtener inóculo de mejores condiciones para la producción masiva.

**Crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus* en diferentes sustratos en bolsa y frasco.**

Se observó que *P. ostreatus* en bolsa y en frasco tuvo comportamiento similar en los sustratos S, T, M y C, completando el crecimiento micelial el día 8, en cambio en el sustrato A completó a los 10 días. En los sustratos S y T el micelio fue más vigoroso y compacto en comparación con los sustratos A, M y C tanto en bolsas como en frascos.

El micelio de cada una de estas cuatro especies producido *in vitro*, en general creció mejor en sustrato de S y T, pero en algunas especies además en A, C y M, lo cual coincide con OEI (2003), quién indica que el micelio de los hongos comestibles requiere de un gran contenido de lignina (como es el caso del sorgo) para un buen crecimiento.

Alave (2008), menciona que el micelio de *Agaricus blazei* presenta una mayor velocidad de crecimiento en sustrato C que en los sustratos S, T y M, llegando a completar su crecimiento en 15 días y no así como se observa en es este estudio, donde los sustratos con mayor velocidad de crecimiento colonizaron el sustrato López (2007), indica que comúnmente se utilizan los granos de cereales de trigo, sorgo y maíz para la producción de inóculo de *G. frondosa*. Alave (2008), menciona que el micelio de *L. edodes* avanza con mayor velocidad en sustrato S, completando su crecimiento en ocho días, por lo que es conveniente el empleo de este sustrato para este hongo. También OEI (2003), indica que el micelio de *L. edodes* requiere un gran contenido de lignina (como es el caso del sorgo S) para un crecimiento vigoroso.

Suárez (2010), indica que el mejor sustrato para el crecimiento del micelio de *Pleurotus ostreatus* es T. Alave (2008), menciona que el mejor sustrato para el crecimiento micelial de *P. ostreatus* es S y llega a completar su crecimiento en 10 días.

## CONCLUSIONES

- En general, el medio de cultivo para el crecimiento micelial de *Agaricus blazei* fue MSA, para *Grifola frondosa* y *Lentinula edodes* fueron MSA, A y T, hasta los 30 días en cambio para *Pleurotus ostreatus* fueron MSA, A, T y P.
- *A. blazei* presentó un crecimiento micelial superior en bolsa, con sustratos de trigo y sorgo; en frasco tuvo mejor crecimiento con sustrato de maíz y cebada. Para *G. frondosa*, el mejor sustrato en bolsa, fue avena y en frasco trigo.
- Los mejores sustratos para *Lentinula edodes* en bolsa, fueron trigo y sorgo, y en frasco fueron avena, sorgo y trigo. Para *P. ostreatus* los mejores sustratos fueron avena, sorgo, cebada y trigo, tanto en bolsa como en frasco.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alave P. 2008. Evaluación del crecimiento micelial de hongos comestibles en tres cereales como sustrato.
- Ardón C. 2007. La producción de los hongos comestibles. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Humanidades, Departamento de Postgrado.
- Eaton G., Salmón P. 2000. Hongos venenosos del estado de Baja California, del orden Agaricales. Universidad Autónoma de Baja California. México. En línea. Disponible en:  
<http://alpha.rec.uabc.mx/matdidac/micologa/hongostoxicos/hongotox.htm>. Consultado el: 20/7/2016.

Ferreira, J. G. 1997. Manual teórico práctico del cultivo de hongos comestibles. UNESP. Sao Paulo. 125 p.

France A., Cortez A. 2005. El hongo Shiitake Revista Tattersall, edición 171. Santiago de Chile. 5 p. En línea. Disponible en:  
<http://www.tattersall.cl/revista/REV171.htm>.

López R. 2007. Cómo elaborar micelio activado para cultivo doméstico y semi industrial de hongos comestibles. Instituto de Genética Forestal Universidad Veracruzana.

Martinez-Carrera. 1998. La producción de *Pleurotus* en México. In: Memorias del primer Simposio de Hongos Comestibles. (Pachuca, HGO. SEP). INIFP-UAEH: p. 33-38.

Mamede. R. 2001. Efecto de linajes y sustratos en el crecimiento micelial y productividad en el cultivo del hongo shiitake (*Lentinula edodes*) BERK PLEGER. Facultad de Ciencias Agronómicas UNESP. Botucatu - SP. Brasil. 73 p.

Mizuno T. 1995. *Kawariharatake, Agaricus blazei murill*: medicinal and dietary effects. Food reviews international.

OEI. 2003. Mushroom cultivation: technique, species and opportunities for commercial application in developing countries. Third Edition. TOOL Publication, Amsterdam, The Netherlands.

Quimio T. 2002. La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp.,. Preparación de la semilla. Sánchez J. comp. Colegio de la Frontera del Sur (ECOSUR). Chiapas, México D.F. Limusa. pp. 125-137 p.

Suárez C. 2010. Obtención in vitro de hongos comestibles, Shiitake (*Lentinula*

- edodes) y Orellanas (Pleurotus ostreatus y Pleurotus pulmonaris), a partir de aislamiento de cuerpos fructíferos. Disponible en:<http://www.unex.es/polen/LHB/hongos/hongos0.htm> Consultado el 15/8/2016.
- Stamets P. 2005. Mycelium running. How mushrooms can help save the world. Trabanino, F. 2004. Sociedad Micológica de Madrid Conferencia sobre Pleurotus eryngii. Madrid, España. Disponible en [www.socmicolmadrid.org](http://www.socmicolmadrid.org).
- Tormo R. 1996. Los hongos: generalidades. Lecciones hipertextuales de botánica. España. En línea.

Universidad Mayor de San Simón  
Laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina  
Université Libre de Bruxelles (ULB)  
Unité de Microbiologie Pharmaceutique etHygiène, Faculté de Pharmacie

**Cochabamba – Bolivia**

## **Distribución Genotípica del VPH de Alto Riesgo en Mujeres con Lesiones Preneoplásicas y Cancerosas en Cochabamba**

Andrea Torrico<sup>1</sup>, Pedro Surriabre<sup>1</sup>, Patricia Rodriguez<sup>1</sup> Tania Vargas<sup>1</sup>, Véronique Fontaine<sup>2\*</sup>  
Contacto: an.torrico@umss.edu

### **Resumen**

El cáncer de cuello uterino (CaCU) es el tipo de cáncer más frecuente en las mujeres bolivianas. Las lesiones precursoras de CaCU se clasifican en tres grados: NIC I, NIC II y NIC III, dichas lesiones son causadas por infecciones persistentes del virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR).

La implementación de pruebas de genotipificación molecular de VPH-AR permitirá conocer la distribución de los genotipos tanto en la población en general como en la población que presenta la enfermedad.

El estudio de genotipificación fue realizado en el Laboratorio de Virología - UMSS, mediante la técnica qPCR Anyplex II HPV-HR. Esta técnica identifica 14 tipos de VPH-AR. En las muestras analizadas se determinó que los genotipos más prevalentes en las lesiones intraepiteliales en diferente grado es el VPH16 y VPH31.

Estos resultados pueden servir para planificar acciones preventivas para el diagnóstico temprano de lesiones cancerosas de cuello uterino.

**Palabras clave: CACU, NIC, HPV, PCR en tiempo real, genotipificación**

### **INTRODUCCIÓN**

Las preneoplasias intraepiteliales cervicales (CIN) se clasifican en tres grados CIN I, CIN II y CIN III (Origoni et al., 2014), son causados por la infección persistente del virus del papiloma humano (VPH). es el segundo tipo de cáncer con mayor incidencia a nivel mundial. En Bolivia la incidencia esta de 47 por cada 100.000 mujeres y se estima que es el más alto de América Latina con una tasa de mortalidad de 21 por cada 100.000 mujeres (Sung et al., 2021)

De manera general el mayor número de casos diagnosticados de cáncer de afectan principalmente a las mujeres, en edades comprendidas entre los 20 y 69 años.(García et al, 2021) (Alaguero, 2017)

Los VPH que infectan la zona del cervix se han clasificado en dos grupos, de acuerdo a su capacidad oncogénica. Los genotipos incluidos en los VPH de alto riesgo son los siguientes: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82. Los genotipos con bajo riesgo son: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81. Hay tres genotipos, 26, 53 y 66, que se han clasificado como de probable alto riesgo. (Chacón et al., 2006)

La infección persistente del VPH de alto riesgo oncogénico es el factor etiológico principal causante de lesiones preneoplásicas y cáncer(Amador Perez et al., 2013).

Según la estadística internacional los genotipos más prevalentes y oncogénicos son el HPV16 y 18 García et al. (2010); en Bolivia no contamos con mucha información en

cuanto a la distribución genotípica en mujeres con y sin lesiones. Por tanto, resulta imprescindible implementar el análisis y genotipificación molecular del VPH como método para conocer cuáles son los genotipos de alto riesgo que más frecuentemente afectan a nuestros pacientes, de manera que a futuro se puedan implementar conductas de manejo más adecuadas en dichos pacientes.

## METODOLOGÍA

Es un estudio retrospectivo y descriptivo.

*Muestras clínicas.* A partir del año 2014 hasta el 2018 dentro del marco de un proyecto la Facultad de Medicina Universidad Mayor de San Simón realizó un tamizaje a más de 10 000 mujeres, se seleccionaron muestras de ADN de 168 mujeres (68 se tomaron la muestra por autotoma y 86 por ginecólogo) con HPV positivo de alto riesgo consenso y un estudio histológico (biopsia), en total 70 mujeres sin lesiones, 46 con NIC I, 9 con NIC II, 19 con CIN III y 23 con cáncer invasor. Debido que no se encontraron muchas muestras CIN II se analizaron los resultados junto a las lesiones CIN III.

*Reacción de polimerasa en cadena (RPC) en tiempo real:* Se llevo a cabo utilizando Anyplex II HPV HR (Seegene) que detecta de manera simultánea y diferenciado 14 tipos de VPH de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68), utilizando la tecnología TOCE (marcado en la extensión fragmentada de los oligonucleótidos), también proporciona información semicuantitativa (carga viral).

*Análisis de datos:* Se recabaron los siguientes datos de los genotipos de HPV presente, mono infecciones (la presencia de un solo genotipo de HPV) o múltiples (la presencia de dos o más genotipos de HPV). Se calcularon los

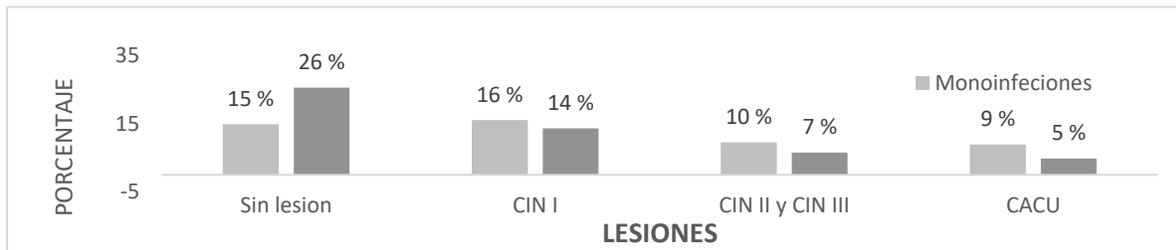
porcentajes de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 65 para la muestra total y discriminada por lesión.

*Aspectos éticos:* se establecieron medidas para la protección de datos de las pacientes, de manera que quedaron ocultos desde el inicio del trabajo. Se les asignó una clave numérica, quedando la correlación clave numérica-paciente en un ordenador protegido con contraseña.

## RESULTADOS

- Se detectaron los genotipos de HPV de alto riesgo en las 168 muestras seleccionadas
- Se pudo determinar la presencia de mono infecciones y multi infecciones por lesiones, en lesiones CIN I el 16% presenta mono infecciones y 14% múltiples infecciones, en CIN II y CIN III el 10% presenta mono infecciones y el 7% multi infecciones. El resto de las mujeres que no presentaban lesiones se detecto el 15% mono infección y el 26% múltiples infecciones. (Figura 1)
- La distribución genotípica dio el siguiente resultado: en las muestras seleccionadas sin lesiones se hallaron 13 genotipos de HPV de alto riesgo a excepción del HPV 33, y el HPV mas prevalente fue el HPV 51 seguido del HPV 16, las muestras CIN I se encontraron 13 genotipos HPV AR a excepción del HPV 33, el genotipo más prevalente es el HPV 16 seguido del HPV 31, en las muestras CIN II y CIN III se encontraron 10 genotipos a excepción del HPV 18, 33, 35 y 45, los más prevalentes fueron el HPV16, finalmente las muestras que venían de cáncer invasor se encontraron 9 genotipos a excepción de los HPV18, 33, 45, 52 y 68, el genotipo mas prevalente es el HPV 16. (Figura 2-5)

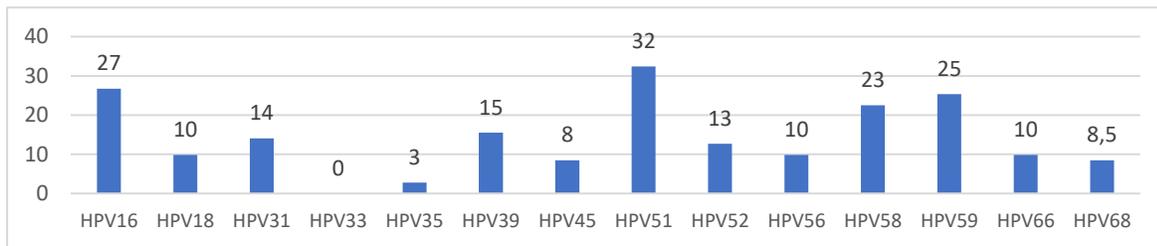
**Figura 1.** Porcentaje de Mono infecciones y Múltiples infecciones por lesión preneoplásicas



**Fuente:** Elaboración propia

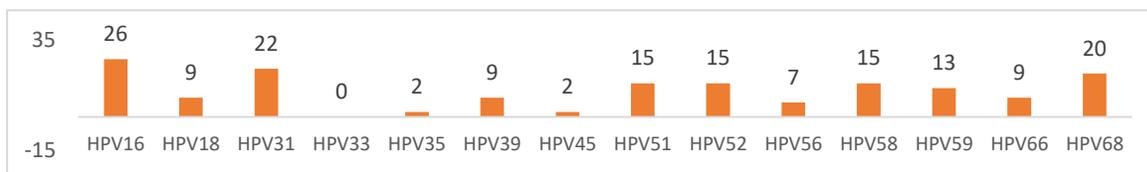
En la imagen se observa la relación entre mono infecciones y múltiples infecciones según lesión preneoplásica (CIN I, CIN II, CIN III, Cáncer (CACU) y un grupo control Sin lesiones).

**Figura 2.** Distribución Genotípica de HPV de Alto Riesgo en Muestras que fueron Diagnosticadas Sin Lesiones



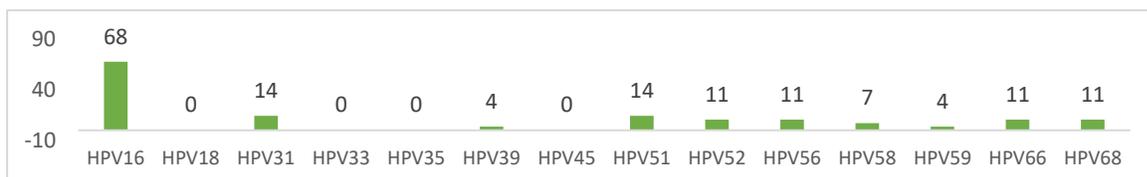
**Fuente:** Elaboración propia

**Figura 3** Distribución genotípica de HPV de alto riesgo en lesiones de grado **CIN I**

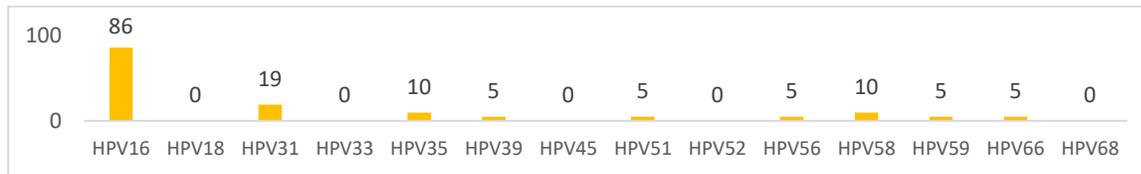


**Fuente:** Elaboración propia

**Figura 4** Distribución genotípica de HPV de alto riesgo en lesiones de grado **CIN II y III**



**Fuente:** Elaboración propia

**Figura 5** Distribución genotípica de HPV de alto riesgo en muestras diagnosticadas con **CACU**

**Fuente:** Elaboración propia

## DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados se pudo observar la presencia de múltiples infecciones y con mayor porcentaje en mujeres que no presentaban lesiones, según Cardozo et al., (2012) con respecto a las infecciones múltiples de HPV de alto riesgo, se han realizado trabajos que demuestran que estas son relativamente frecuentes y poseen un significado controversial en relación con el desarrollo de cáncer de cuello uterino.

Según Amador Perez et al. (2013) en mujeres jóvenes infectadas con los genotipos 16 y 18 tiene un riesgo muy importante de presentar NIC III, sin embargo en este estudio los genotipos más prevalentes a medida que va avanzando la lesión preneoplásica son los HPV 16 y 31, datos que revelan un mayor riesgo de cáncer por estos genotipos, el autor Bottari F, Iacobone AD & Al., (2021) comenta que la persistencia del genotipo identificado al inicio es útil para estratificar el riesgo de recurrencia de las lesiones preneoplásicas intraepiteliales NIC.

## CONCLUSIÓN

De acuerdo al estudio se concluye que en las 168 mujeres presentan mono infecciones y multi infecciones de los diferentes tipos de HPV de alto riesgo. Se identificaron en todas las muestras 13 genotipos exceptuando el HPV 33.

Se determino la distribución genotípica por lesiones intraepiteliales en diferente grado CIN I, II y III concluyendo que el genotipo mas prevalente es el HPV 16 y 31.

## Implicancias de los resultados. -

Estos resultados pueden servir para planificar acciones preventivas en cuanto al diagnóstico temprano del Virus del Papiloma Humano y de esta manera la prevención de cáncer de cuello uterino.

Desde un punto de vista clínico, la persistencia del HPV 16 y 31 nos permitiera identificar las lesiones que regresarán espontáneamente de aquellas destinadas a progresar.

## REFERENCIAS

- Alaguero, C. C. (2017). GENOTIPADO DEL VIRUS DEL PAPILOMA PAPILOMA HUMANO EN CIN I (S. L. ÁREA DE INNOVACIÓN Y DESARROLLO (ed.); Primera ed). 3CIENCIAS. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.17993/CcyLI.2018.20>
- Amador Perez, C., Lopez Velasquez, L. J., Herrera Cintora, J., Tamriz Herrera, E., De la Torre Rendon, F., Barriga Araujo, F., & Mendoza Larios, D. L. (2013). Genotipificación del Virus de Papiloma Humano de Alto Riesgo en pacientes. Archivos Medicos de Actualización En Tracto Genital Inferior. Universidad de Guadalajara, 15(9), 8. <http://www.medigraphic.com/pdfs/archivostgi/tgi-2013/tgi139d.pdf>
- Bottari F, Iacobone AD, R. D., & Al., E. (2021). Anyplex II HPV test in detection and follow-up after surgical.pdf. Medical of Virology, 1–7.

- <https://doi.org/http://orcid.org/0000-0003-1838-0163>
- Cardozo, F., Mendoza, L., Páez, G., Mongelós, P., Castro, A., & Giménez, G. (2012). Detección molecular de infecciones múltiples en mujeres con y sin lesión de cuello uterino positivas para el virus del papiloma humano de alto riesgo. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*, 10(2), 5–12.
- Chacón, J., Mateos, M. L., Sanz, I., Rubio, M. D., & Baquero, F. (2006). Genotipos de virus del papiloma humano más frecuentes en mujeres con citología cervicovaginal alterada utilizando técnicas de captura de híbridos y reacción en cadena de la polimerasa. *Clinica e Investigación En Ginecología y Obstetricia*, 33(3), 97–101. [https://doi.org/10.1016/S0210-573X\(06\)74093-X](https://doi.org/10.1016/S0210-573X(06)74093-X)
- García, D. A., Schmitt, M., Cid-Arregui, Á., Castillo, M., Briceño, I., & Aristizábal, F. A. (2010). Genotyping the human papilloma virus (HPV) in cytobrush samples taken from patients attending different hospitals in bogotá (Colombia) and evaluating agreement between two PCR-based methods. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 61(4), 310–318. <https://doi.org/10.18597/rcog.253>
- García Regalado, Jorge; Quinde Rosales, Víctor; Bucaram Leverone, Rina; Sánchez Giler., S. (2021). Situación Epidemiológica del Cáncer Cérvicouterino en el Ecuador. 2020. *Venezolana de Oncología*, 55(2), 13. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?>
- Origoni, M., Salvatore, S., Perino, A., Cucinella, G., & Candiani, M. (2014). Cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in pregnancy: The state of the art. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 18(6), 851–860.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

**LISTA DE PARTICIPANTES**

<b>FORMA DE PARTICIPACIÓN</b>	<b>NOMBRES Y APELLIDOS</b>	<b>CORREO ELECTRÓNICO</b>
1 Conferencista invitado	Ph. D. María Mercedes Roca	prof.mariamercedesroca@gmail.com
2 Conferencista invitado	Spiros Agathos	spiros.agathos@uclouvain.be
3 Conferencista invitado	Sabina Vidal Macchi	svidal@fcien.edu.uy
4 Conferencista invitado	Raúl Blas Sevillano	rblas@lamolina.edu.pe
5 Conferencista invitado	Martha Teresa Ávila Alba	mtereavila@hotmail.com
6 Conferencista invitado	MSc María de Lourdes Tapia y Figueroa	ltapia@lamolina.edu.pe
7 Conferencista invitado	Jheanete Pérez Guzmán	jperez@adm.emi.edu.bo
8 Conferencista invitado	Lucia Elena Alvarado Arnez	lucia.alvarado@unifranz.edu.bo
9 Conferencista invitado	Gabriela Bottani Claros	gabrielabottani@yahoo.com
10 Conferencista invitado	Sergio Daniel Moreira Ascarrunz	seridbolivia@gmail.com
11 Conferencista invitado	Ph. D. María Mercedes Roca	prof.mariamercedesroca@gmail.com
12 Conferencista invitado	Marín Condori Mamani	marincondori7@gmail.com
13 Conferencista invitado	José Gino Aguirre Villarroel	gino1356@yahoo.com
14 Conferencista invitado	Jorge Ángel Nicolás Quezada Portugal	jorgequezada@yahoo.com
15 Conferencista invitado	Elizabeth Hodson de Jaramillo	ehodson8@outlook.com
16 Conferencista invitado	Jose Antonio del Castillo	jcastillo@yachaytech.edu.ec
17 Conferencista invitado	Carla Ximena Colque-Little	grt699@alumni.ku.dk
18 Conferencista invitado	Curutchet Gustavo Andres	gcurut@gmail.com
19 Conferencista invitado	Ilich Alberto Figueroa Candia	i.figueroa@umss.edu
20 Conferencista invitado	Erick Vladimir Ferrufino Guardia	nanferru@hotmail.com
21 Conferencista invitado	Alba Marina Cotes Prado	amcotes@agrosavia.co
22 Conferencista invitado	Felipe Noel Ortuño Castro	n.ortuno@umss.edu.bo
23 Conferencista invitado	Doris Elizabeth Zúñiga Dávila	dzuniga@lamolina.edu.pe
24 Apoyo en el área tecnológica	Franz Troche Araujo	trochearaujo@gmail.com
25 Apoyo en el área tecnológica	Carlos Elio Céspedes	ccarlos.elio@gmail.com
26 Espositor/a	Rocío del Carmen Viraca Rodríguez	rocio.viraca.r@gmail.com
27 Espositor/a	Carmen Ormachea Orellana	ormacheacarmen@gmail.com
28 Espositor/a	Jorge Ángel Nicolás Quezada Portugal	jorgequezada@yahoo.com
29 Espositor/a	Ing. Jhoselyn Quelca Helguero	jhoselyn.agroindustria@gmail.com
30 Espositor/a	Melanny Araceli Arano Tapia	melannyarano46@gmail.com
31 Espositor/a	Beatriz Mamani Sánchez	bmamani@uac-cp.edu.bo
32 Espositor/a	Ruth Gabriela Ancasi Espejo	redbiobolivia@gmail.com
33 Espositor/a	Ayelen Jenifer Camacho Crespo	ayelen.camacho@ucb.edu.bo
34 Espositor/a	Máximo Lucio Nova Pinedo	mnova@uac-cp.edu.bo
35 Espositor/a	Noemi Nancy Aguilar Vasquez	n.aguilar@fundacionpatino.org
36 Espositor/a	Ligia Marcia Céspedes Polo	m.cespedes@fundacionpatino.org
37 Espositor/a	Carla Lineth Quispe Calle	lineth.carly19@gmail.com

38	Espositor/a	Jhovana Silvia Escobar Ortega	jhovana@agro.uba.ar
39	Espositor/a	Fabio Ortuño Ramallo	fortunoramallo@gmail.com
40	Espositor/a	Virginia Rigoberta Gonzales Mamani	vikirigo123@gmail.com
41	Espositor/a	Marisol Llanos Vargas	sol2llanos@gmail.com
42	Espositor/a	Juan Simón Torres Espada	torresespadaj@gmail.com
43	Espositor/a	Giovana Plata Rosales	g.plata@proinpa.org
44	Espositor/a	Joseph Deyby Felipez Soliz	jos737@gmail.com
45	Espositor/a	Ing. Omar Flores Llanque	redbiobolivia@gmail.com
46	Espositor/a	Jahel Olga Quiroz Condoretti	intirraymisig@gmail.com
47	Espositor/a	Melisa Lidia Aguilar Tintaya	redbiobolivia@gmail.com
48	Espositor/a	Rocío Scarleth Méndez Aguayo	rociomendez@fcyt.umss.edu.bo
49	Espositor/a	Olga Ruth Cabrera Trujillo	ruthct.1994@gmail.com
50	Espositor/a	Christian Estivariz Lopez	201700024@est.umss.edu
51	Espositor/a	María Micaela Guaman Torres	201700024@est.umss.edu
52	Espositor/a	Noemi Nancy Aguilar Vasquez	n.aguilar@fundacionpatino.org
53	Espositor/a	Jose Alberto Limpas Hurtado	josealbertolimpas16@gmail.com
54	Espositor/a	Paula Agustina Flores Rodríguez	agustinafrgt@gmail.com
55	Espositor/a	Andrea Aracely Tambo Santos	and.andreatambo17@gmail.com
56	Espositor/a	Jonatan Joel Aliaga Rodríguez	redbiobolivia@gmail.com
57	Espositor/a	Oskar Samuel Zeballos Huarachi	redbiobolivia@gmail.com
58	Espositor/a	Elva Fátima Rojas	fatimajrojas@gmail.com
59	Espositor/a	Andrea Maria Torrico Ferrufino	an.torrico@umss.edu
60	Espositor/a	Mary Isabel Hidalgo Sánchez	mi_20hidalgo@yahoo.es
61	Espositor/a	Gladys Geronimo Fernandez	gladyscaranavi@gmail.com
62	Asistente	Manuel Diogenes Almendras Vargas	diogenes_7jne@hotmail.com
63	Asistente	Sirley Escarley Arana Antezana	escarlet_arana_1@hotmail.com
64	Asistente	Brenda Mariola Cruz Benavent	brenda.cruz@ucb.edu.bo
65	Asistente	Janett Cespedes Anturiano	janetca76@gmail.com
66	Asistente	Elvia Quispe Guillen	201907068@est.umss.edu
67	Asistente	Fabián Quispe Ordoñez	fabianqo27@gmail.com
68	Asistente	Linda Iris Garcia Cabrera	garciaciris9@gmail.com
69	Asistente	Claudia Guarachi Panamá	claudiagarachi@hotmail.com
70	Asistente	Alejandra Guzmán Jaldin	alejandraguzmanj23@gmail.com
71	Asistente	María Angélica Hernández Melgar	angelicahernandez2000@gmail.com
72	Asistente	Lilibeth Silvia Leigue Arnéz	lleigue@gmail.com
73	Asistente	Magaly Pardo Cuellar	magi_pc@hotmail.com
74	Asistente	Carlos Fernando Rivadeneira Michel	rivadeneiramcarlos1@gmail.com
75	Asistente	Margarita López Zabala	margaritalopezabala2@gmail.com
76	Asistente	Natalia Montellano Duran	natalia.montellano@gmail.com
77	Asistente	Ingrid Morales Benavent	ingridmoralesuagrm@gmail.com
78	Asistente	Nathalia Lavayen Cuellar	nathicita-@hotmail.com

79	Asistente	Ing. Miriam Orellana Onorio	orellanamiriam539@gmail.com
80	Asistente	Yerco Milivoy Pozo Rocha	yerco Pozo1999@gmail.com
81	Asistente	Cintia Susana Contreras Calle	Cintialexpa@yahoo.es
82	Asistente	René Arenas Martínez	arenastja@gmail.com
83	Asistente	Pedro Eduardo Surriabre Dick	pedro.surriabre@gmail.com
84	Asistente	Lizeth Terrazas Arnez	choutenki@gmail.com
85	Asistente	Camila Alejandra Sosa Céspedes	camila.sosa.cespedes255@gmail.com
86	Asistente	Camilo Ernesto Avalos Benavides	camiloavalosbenavides@gmail.com
87	Asistente	REYNALDO MAGNE RAMÍREZ	rey_biotec@yahoo.com
88	Asistente	Leandra Hinojosa Mamani	leandrahinojosa19@gmail.com
89	Asistente	Lucía Isabel Velasquez Araya	velasquezaraya luciaisabel@gmail.com
90	Asistente	Ran Wara Onishi Gutiérrez	waraonishi@gmail.com
91	Asistente	Ingrid Ximena Reyes Colque	rastaxi@gmail.com
92	Asistente	Alba Paredes Salinas	eate.alba.paredes.sa@unifranz.edu.bo
93	Asistente	Erika Teresa Montes Menacho	monteseri@gmail.com
94	Asistente	Rose Mary Cruz Morales	marycruz_morales2@hotmail.com
95	Asistente	Luz Marina Mamani Pozo	luzmarinamamanipozo@gmail.com
96	Asistente	Ruth Marcela Bernal Rosas	marcelabernalrosas@gmail.com
97	Asistente	María Lizzie Cuellar Gutiérrez	marializziecuellar@gmail.com
98	Asistente	Dutsi Gonzales Guzmán	dutsigonzales@yahoo.com
99	Asistente	Joel Claire Gonzales	clairegonzalesjoel@sanagustin.edu.bo
100	Asistente	Joasir Saya Buendía	201805735@est.umss.edu
101	Asistente	Ing. Delia Vargas Poma	iniaf-delia@hotmail.com
102	Asistente	Yvan Ferrufino Gómez	yvancho.fg@hotmail.com
103	Asistente	Lilian Estela Quiñones Mamani	201309705@est.umss.edu
104	Asistente	Fermin Hoffman Osvaldo Alen	alenfh2@gmail.com
105	Asistente	Melissa Graciela Arispe Jaldin	melissa.arispejaldin@gmail.com
106	Asistente	Daira Nicole Arancibia Aguilar	darancibiaa@fcpn.edu.bo
107	Asistente	Rozzana Medina Leon	rozzmedina@gmail.com
108	Asistente	Edwin Ariel Choque Siles	archya2e@gmail.com
109	Asistente	Carmen Licht Villarroel Vogt	villarroelvogt.c@gmail.com
110	Asistente	Dante Ruben Flores Urizacari	rubenurizacari@gmail.com
111	Asistente	Gladys Susana Quezada Rea	gquezadar@fcpn.edu.bo
112	Asistente	Carla Cecilia Gomez Aramayo	carla.gomez.aramayo@gmail.com
113	Asistente	José Roberto Soto Solíz	robertosoto.s@ficyt.umss.edu.bo
114	Asistente	Ruth Espinoza Gómez de Suarez	egruth@hotmail.com
115	Asistente	Karina Rossio Ustariz Olivera	karinaustariz@hotmail.com
116	Asistente	Roberto Antonio Chiri Guzmán	rchiriguzman@gmail.com
117	Asistente	Gabriela Gheraldine Ayala Miranda	gabbygam@gmail.com
118	Asistente	Dulce Valeria Claire Villca	lightzamasu@gmail.com
119	Asistente	Nicol Reyna Pacosillo Ticona	reynahanticona24@gmail.com
120	Asistente	Anelyn Brenda Ugarte Agreda	cbbe.anelinbrenda.ugarte.ag@unifranz.edu.bo

		du.bo
121 Asistente	Nataly Mamani Gonzales	nata.mamani@umss.edu
122 Asistente	Jimena Zubieta Rojas	zubietajime@gmail.com
123 Asistente	Daniela Alvarez Portugal	dalvarezp@fcpn.edu.bo
124 Asistente	Agr. Fátima Shirley Duarte Royder	fatita137@gmail.com
125 Asistente	María Fernanda Rivera Ramírez	lpze.mariafernanda.rivera.ra@unifranz.ed u.bo
126 Asistente	Angel Zapata Siles	azapata36bo@yahoo.es
127 Asistente	Ana Eva Mamani Muriel	anaevamaman@gmail.com
128 Asistente	Miguel Alejandro Eguivar Santelices	miguelitocw@gmail.com
129 Asistente	Virginia Martinez Laura	piterdggf@gmail.com
130 Asistente	Piterd Luis Galindo Flores	piterdggf@gmail.com

**PROGRAMA DEL EVENTO****Moderadores**

Jueves 28 de julio del 2022 Sala de Zoom 1

José Gino Aguirre Villarroel  
Martha Teresa Ávila Alba  
Ingrid Ximena Reyes ColquePor la mañana  
Por la tarde  
Por la tarde

<b>ÁREA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL SALA DE ZOOM 1</b>		
<b>HORA</b>	<b>NOMBRE</b>	<b>TEMA</b>
8:15 – 8:45	<b>Inauguración del evento</b>	Gino Aguirre presidente del CIAB Cochabamba Teresa Ávila Coordinadora REDBIO Carlos Rojas Decano de la FCAyP – UMSS Julio Medina Gamboa Rector - UMSS
9:00 – 9:45	<b>Conferencia Magistral</b> María Mercedes Roca BioScience Think Tank	Retos y avances en la Biotecnología y la Biología sintética
9:45 – 10:30	<b>Conferencia Magistral</b> Spiros Agathos Universidad Católica de Lovaina – Bélgica	Microbial engineering for sustainability
10:30 – 11:15	<b>Conferencia Magistral</b> Sabina Vidal Macchi Universidad de la República – Uruguay	Fundamentos y aplicaciones de CRISPR-Cas9 en plantas
11:15 – 12:00	<b>Conferencia Magistral</b> Raúl Blas Sevillano Universidad Agraria La Molina – Perú	Retos de conservación <i>in situ</i> y uso de las razas de maíz en el Perú
12:00 – 12:45	<b>Conferencia Magistral</b> Teresa Ávila Alba Universidad Mayor de San Simón	Fundamentos y aplicaciones de los marcadores epigenéticos
<b>ALMUERZO</b>		
14:00 – 14:45	<b>Conferencia Magistral</b> Lourdes Tapia y Figueroa Universidad Nacional Agraria la Molina - Perú	Micropropagación de <i>Stevia rebaudiana</i> en Sistema de Biorreactores de Inmersión Temporal
14: 45 – 15:05	Expositora Rocío del Carmen Viraca Rodríguez	Micropropagación de stevia ( <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) a partir de segmentos nodales en medio de cultivo líquido
15:05 – 15:25	Expositora Carmen Ormachea Orellana	Micropropagación y aclimatación de <i>Schoenoplectus californicus</i> “totora” destinados a estudios de repoblamiento en el lago Titicaca
15:25 – 15:45	Expositor Jorge Quezada Portugal	Propagación <i>in vitro</i> de cacao ( <i>Theobroma cacao</i> L.) nativo vía embriogénesis somática
15:45 – 16:05	Expositora Jhoselyn Quelca Helguero	Optimización de medios de cultivo <i>in vitro</i> para la micropropagación de tuna forrajera ( <i>Opuntia ficus indica</i> L. Mill.)

<b>Conferencia Magistral</b>		
16:05 – 16:50	Jheanete Pérez Guzmán Escuela Militar de Ingeniería	Cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i>
16:50 - 17:10	Expositora Melani A. Arano Tapia	Cultivo <i>in vitro</i> de lavanda ( <i>Lavandula dentata</i> L.) en la etapa de introducción a partir de yemas axilares y apicales
17:10 - 17:30	Expositora Beatriz Mamani Sánchez	Germinación <i>in vitro</i> de <i>Epidendrum secundum</i> con diferentes agentes gelificantes y concentraciones de agua de coco
17:30 - 17:50	Expositora Ruth Gabriela Ancasi Espejo	Meta-Topolina y modificaciones en las condiciones de cultivo como alternativa en la micro propagación del plátano ( <i>Musa paradisiaca</i> L.)
17:50 - 18:10	Expositora Ayelen Jenifer Camacho Crespo	Caracterización biológica del fruto <i>Allagoptera leucocalyx</i> (motacuchí)
18:10 - 18:30	Expositor Máximo Nova Pinedo	Germinación <i>in vitro</i> de <i>Zigopetalum maculatum</i> con diferentes protocolos de desinfección y adición de agua de coco en el medio de cultivo

**Moderadores**

Jueves 28 de julio del 2022 Sala de Zoom 2

Erick Vladimir Ferrufino Guardia  
Felipe Noel Ortuño CastroPor la mañana  
Por la tarde

<b>AREA BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA E INDUSTRIAL SALA DE ZOOM 2</b>		
<b>HORA</b>	<b>NOMBRE</b>	<b>TEMA</b>
8:15 – 9:00	<b>Inauguración evento</b>	Gino Aguirre presidente del CIAB Cochabamba Teresa Ávila Coordinadora REDBIO Carlos Rojas Decano de la FCAyP – UMSS Julio Medina Gamboa Rector - UMSS
9:00 – 9:45	<b>Conferencia Magistral</b> María Mercedes Roca BioScience Think Tank	Retos y avances en la Biotecnología y la Biología sintética
9:45 – 10:30	<b>Conferencia Magistral</b> Spiros Agathos Universidad Católica de Lovaina – Bélgica	Microbial engineering for sustainability
10:30 – 11:15	<b>Conferencia Magistral</b> José Antonio del Castillo Universidad de investigación tecnológica Yachay Tech en el Ecuador	Diversidad y dinámica evolutiva de las proteínas de la cubierta de esporas en especies del orden Bacillales
11:15 – 12:00	<b>Conferencia Magistral</b> Carla Ximena Colque-Little Universidad de Copenhague - Dinamarca	<i>In vitro</i> pathogenic/endophytic evaluation of four Aschomyces related to the quinoa crop
12:00 – 12:45	<b>Conferencia Magistral</b> Gustavo Curutchet Universidad Nacional de San Martín - Argentina	Procesos biocatalizados por microorganismos nativos para potencial biorremediación en ríos urbanos: un enfoque transdisciplinario
<b>ALMUERZO</b>		
14:00 – 14:45	<b>Conferencia Magistral</b> Ilich Figueroa Candia Universidad Mayor de San Simón	Biotecnología en la protección vegetal y gestión de residuos orgánicos con insectos benéficos
14: 45 – 15:05	Expositora Jhovana Silvia Escobar Ortega	Análisis de comunidades microbianas rizosféricas asociadas a cultivos de cobertura secados con glifosato
15:05 – 15:25	Expositor Fabio Ortuño Ramallo	Consorcios microbianos nativos para la biodegradación de residuos orgánicos
15:25 – 15:45	Expositora Virginia Rigoberta Gonzales Mamani	Biomíneralización de estruvita por <i>Chryseobacterium</i> sp. 2CANAT para la recuperación de magnesio de la bischofita y fósforo del suero lácteo
15:45 – 16:05	Expositora Marisol Llanos Vargas	Actividad antagónica de filtrados fúngicos frente a <i>Colletotrichum</i> sp., agente causal de antracnosis del mango ( <i>Mangifera indica</i> L.)
16:05 - 16:25	Expositor Juan Simón Torres Espada	Obtención de nanopartículas de óxido de hierro procedente de viruta con tecnología Bottom-Up

16:25 - 16:45	Expositora Giovanna Plata y Jesús Alcocer	Desarrollo para la evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fósforo y potasio
16:45 - 17:05	Expositor Joseph Deyby Felipez Soliz	Las micorrizas (MA) ( <i>Glomus fasciculatum</i> ) y el fosforo en papas nativas
17:05 - 17:25	Expositor Omar Flores Llanque	Uso de <i>Bacillus</i> sp. y técnicas de labranza para la multiplicación de esporas de micorriza arbusculares (MA)
17:25 - 17:45	Expositora Jahel Olga Quiroz Condoretti	Cultivo de <i>Arthrospira máxima</i> ( <i>Spirulina</i> ) en fotobioreactor condiciones ambientales bajo invernadero Valle Central Cochabamba - Bolivia
17:45 - 18:05	Expositora Melisa Lidia Aguilar Tintaya	Evaluación del rendimiento de biodiesel obtenido a partir de microalgas nativas de la Bahía de Cohana empleando aguas residuales como medio de cultivo a nivel experimental.
18:05 - 18:25	Expositora Rocío Scarleth Méndez Aguayo	Control biotecnológico del mildiu de la quinua

**Moderadores**

Viernes 29 de julio del 2022 Sala de Zoom 1

Jorge Á. N. Quezada Portugal

Por la mañana

Ingrid Morales Benavent

Por la mañana

Ingrid Ximena Reyes Colque

Por la tarde

<b>ÁREA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL Y AGROPECUARIA SALA DE ZOOM 1</b>		
<b>HORA</b>	<b>NOMBRE</b>	<b>TEMA</b>
8:15 – 9:00	<b>Conferencia Magistral</b> Lucia Alvarado Arnez Universidad Franz Tamayo	Biotecnología como una necesidad y epidemiología genética como un ejemplo
9:00 – 9:45	<b>Conferencia Magistral</b> Gabriela Bottani Claros Universidad Mayor de San Simón	Ganado Criollo Boliviano: Diversidad genética y estructura de la población
9:45 – 10:30	<b>Conferencia Magistral</b> Sergio Daniel Moreira Ascarrunz Universidad Católica Boliviana – Santa Cruz	Análisis crítico y propuesta sobre cambios y adiciones al Reglamento Boliviano sobre Bioseguridad (DS24676) para tener un Comité Nacional de Seguridad de la Biotecnología en funcionamiento: una mirada al futuro
10:30 – 11:15	<b>Conferencia Magistral</b> María Mercedes Roca BioScience Think Tank	Biotecnología agrícola en Bolivia: avances y retos regulatorios
11:15 – 12:00	<b>Conferencia Magistral</b> Marín Condori Mamani Universidad Autónoma Gabriel Rene Moreno	Mejoramiento genético y biotecnología como una herramienta básica para la seguridad alimentaria del país: Estudio de zonificación para el uso de maíz genéticamente modificado en Bolivia
12:00 – 12:45	<b>Conferencia Magistral</b> Gino Aguirre Universidad Mayor de San Simón	La estrategia universitaria para impulsar el cultivo del banano y el plátano en las zonas bajas de Bolivia
<b>ALMUERZO</b>		
14:00 – 14:45	<b>Conferencia Magistral</b> Jorge Quezada Universidad Mayor de San Andrés	Generación de vectores para la caracterización funcional de genes mediante alteración de su expresión génica
14: 45 – 15:05	Expositora Noemi Nancy Aguilar Vásquez	Evaluación molecular de genes de resistencia a la antracnosis en seis ecotipos y una variedad de vaina
15:05 – 15:25	Expositora Ligia Marcia Céspedes Polo	Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Fusarium</i> sp. para la inoculación y selección de tolerancia en 84 familias de maíz de la variedad Pairumani Choclero 2
15:25 – 15:45	Expositora Carla Lineth Quispe Calle	Efecto de estrés salino (NAACL) e hídrico (PEG 6000) en la germinación de tres variedades de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
15:45 – 16:30	<b>Conferencia Magistral</b> Elizabeth Hodson Profesora emérita Pontificia Universidad Javeriana (Bogotá, Colombia)	<b>Bioeconomía circular y ODS</b>
16:30 - 17:00	<b>Clausura</b>	<b>Conclusiones de la VII Reunión</b> Jorge Quezada

	<b>Palabras de circunstancia:</b> Cnl. José Pedro Illanes Rivero, Director Académico EMI – La Paz <b>Palabras de clausura:</b> María Eugenia García Moreno Vicerrectora de la Universidad Mayor de San Andrés
17:00 - 19:00	Reunión REDBIO Bolivia

<b>Moderadores</b>		
Viernes 29 de julio del 2022 Sala de Zoom 2		
	Jerry Luis Solis Valdivia Lucía Elena Alvarado Arnez	Por la mañana Por la tarde
<b>ÁREA BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA E INDUSTRIAL SALA DE ZOOM 2</b>		
HORA	NOMBRE	TEMA
8:15 – 9:00	<b>Conferencia Magistral</b> Erick Ferrufino Universidad Mayor de San Simón	Estrategias de biorremediación y fitorremediación
9:00 – 9:45	<b>Conferencia Magistral</b> Alba Marina Cotes Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA	de La salud vegetal mediada por los microorganismos benéficos
9:45 – 10:30	<b>Conferencia Magistral</b> Noel Ortuño Universidad Mayor de San Simón	Mecanismos microbiológicos para mitigar efectos de la actividad agrícola ante el cambio climático
10:30 – 10:50	Expositora Ruth Olga Cabrera Trujillo	<i>Trichoderma</i> spp. como inductor de resistencias sistémicas a nemátodos en cultivo de papa
10:50 – 11:10	Expositor Christian Estivariz López	Fitorremediación de suelos contaminados por cadmio y plomo mediante plantas florales plantadas en terrenos agrícolas
11:10 – 11:30	Expositora Noemi Nancy Aguilar Vásquez	Caracterización de la diversidad estructural de las comunidades microbianas rizosféricas asociadas a los cultivos de cobertura avena y centeno inoculados con dos PGPR
11:30 – 11:50	Expositor José Alberto Limpías Hurtado	Propiedades sensoriales, fisicoquímicas y antioxidantes del pitón ( <i>Talisia esculenta</i> Radlk.)
11:50 – 12:10	Expositora Paula Agustina Flores Rodríguez	Estudios preliminares de propiedades sensoriales y antioxidantes del pacay ( <i>Inga edulis</i> ) en bosques semidecíduos chiquitanos
12:10 – 12:30	Expositora Andrea Tambó	ARSEMÁFORO: Diseño de un biosensor para la detección de arsénico en agua de consumo
<b>ALMUERZO</b>		
14:00 – 14:45	<b>Conferencia Magistral</b> Doris Zúñiga Dávila Universidad Nacional Agraria La Molina – Perú	Importancia de los microorganismos en la agricultura y producción de inoculantes
14:45 – 15:05	Expositora Elva Fátima Rojas	Evaluación de medios de cultivo y sustratos para la producción de inóculo de hongos comestibles

15:05 – 15:25	Expositora Andrea María Torrico Ferrufino	Distribución Genotípica del VPH de Alto Riesgo en Mujeres con Lesiones Preneoplásicas y Cancerosas en Cochabamba
15:25 – 15:45	Expositora Mary Hidalgo	Programa de Ingeniería en Biotecnología UMSS
15:45 – 16:30	<b>Conferencia Magistral</b> Elizabeth Hodson Profesora emérita Pontificia Universidad Javeriana (Bogotá, Colombia)	Bioeconomía circular y ODS
16:30 - 17:00	<b>Clausura</b>	<b>Conclusiones de la VII Reunión</b> Jorge Quezada <b>Palabras de circunstancia:</b> Cnl. José Pedro Illanes Rivero, Director Académico EMI – La Paz <b>Palabras de clausura:</b> María Eugenia García Moreno Vicerrectora de la Universidad Mayor de San Andrés
17:00 - 19:00		Reunión REDBIO Bolivia



