

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**CARRERA DE AGRONOMÍA**



**INFORME FINAL DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

“Evaluación de la capacidad de fijación del nitrógeno atmosférico de las bacterias asociadas con la rizosfera de plantas de *Solanum tuberosum* L. Var. Superchola en la provincia de Tungurahua”

**DOCUMENTO FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN COMO  
REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE INGENIERA AGRÓNOMA**

**AUTORA:**

Vanessa Carolina Altamirano Diaz

**TUTOR:**

Ing. Michel Leiva Mora Dr.C

**CEVALLOS - ECUADOR**

**2023**

**“Evaluación de la capacidad de fijación del nitrógeno atmosférico de las bacterias asociadas con la rizosfera de plantas de *Solanum tuberosum* L. Var. Superchola en la provincia de Tungurahua”**

**REVISADO POR:**



Ing. Michel Leiva Mora. Dr.C

**TUTOR**


**APROBADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN:**

**Fecha**




  
.....  
Ing. Patricio Núñez Torres, PhD  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

.....  
31/08/2023

  
.....  
Ing. Mg. Rita Santana Mayorga  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN**

.....  
30-08-2023

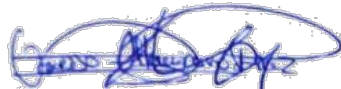
  
.....  
Ing. Mg. David Guerrero Cando  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN**

.....  
31-08-2023

## AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

“La suscrita, VANESSA CAROLINA ALTAMIRANO DIAZ, portador de cédula de identidad número: 1804405007, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: “Evaluación de la capacidad de fijación del nitrógeno atmosférico de las bacterias asociadas con la rizosfera de plantas de *Solanum tuberosum* L. Var. Superchola en la provincia de Tungurahua” es original, auténtico y personal.

En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas”.




.....  
**Altamirano Diaz Vanessa Carolina**

## DERECHOS DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “Evaluación de la capacidad de fijación del nitrógeno atmosférico de las bacterias asociadas con la rizósfera de plantas de *Solanum tuberosum* L. Var. Superchola en la provincia de Tungurahua” como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Ingeniera Agrónoma, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.



.....  
**Altamirano Diaz Vanessa Carolina**

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Luis Altamirano y Nancy Díaz, por su ejemplo, apoyo y amor incondicional, sin ustedes nada de esto sería posible.

A mis hermanos David y Alejandra, por la inspiración, equilibrio y refugio en momentos de infortunio.

A mi confidente Elian, por su amor, cariño y paciencia, te amo con cada latido de mi corazón que es tuyo.

Y a toda mi familia, amigos y a todos los que han hecho posible este trabajo que en realidad ha sido un sueño realizado.

## AGRADECIMIENTO

Ante todo, le doy gracias a Dios por concederme el don de la vida, por el propósito que ha puesto en mis manos y, por cuidarme y guiarme en cada momento.

A mis padres, Luis Altamirano y Nancy Diaz, no podría estar más agradecida por ayudarme a cumplir mis sueños. Este logro se lo debo eternamente a ustedes.

A mi Elian, gracias por inundarme con su amor, por la comprensión y por sacar siempre lo mejor de mí.

A mi querida Alma Mater, especialmente a la Facultad Ciencias Agropecuarias, a la cual me siento orgullosa de pertenecer.

Mi gratitud a todos los docentes de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, de manera especial al Dr. Michel Leiva Mora por su orientación, caracterizada por un alto y riguroso nivel científico, un interés permanente, una visión crítica y oportuna y motivación y al Ing. Olguer León Mg. por su amistad, ayuda, sugerencias y contribución durante la ejecución de este proyecto, hoy los guardo a cada uno en mi corazón.

A los compañeros del laboratorio de Bioproductos por la convivencia, aprendizaje y ayuda en especial a la M.Sc. Nataly Solís, por su colaboración en todo momento.

Gracias a todas las personas que han sido parte de esta historia y me han apoyado en cada paso del camino. Nada de esto hubiese sido posible sin su cariño, paciencia y confianza. No puedo creer que he llegado hasta aquí. Estoy emocionada por lo que me espera a continuación.

## ÍNDICE GENERAL

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	iii
DERECHOS DE AUTOR .....	iv
DEDICATORIA .....	v
AGRADECIMIENTO .....	vi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
CAPÍTULO I.....	3
MARCO TEÓRICO.....	3
1.1. Introducción .....	3
1.2. Antecedentes investigativos .....	5
1.3. Objetivos .....	7
1.4. Características fundamentales .....	8
1.4.1. Generalidades del nitrógeno.....	8
1.4.2. Proceso de fijación de N <sub>2</sub> .....	8
1.4.3. Ciclo del nitrógeno.....	9
1.4.4. Diversidad microbiana de la rizosfera.....	9
1.4.5. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal .....	10
1.4.6. Microorganismos fijadores de nitrógeno .....	11
1.4.7. Bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno atmosférico .....	12
1.4.8. Generalidades del cultivo de papa.....	12
1.4.8.1. Clasificación taxonómica.....	13
1.4.8.2. Descripción botánica.....	14
1.4.8.3. Condiciones edafoclimáticas.....	15
1.4.8.4. Ciclo vegetativo .....	16
1.5. Biofertilizantes .....	17
CAPÍTULO II .....	18
METODOLOGÍA .....	18
2.1. Ubicación del experimento .....	18
2.2. Características del lugar .....	18
2.3. Equipos y materiales .....	18

2.3.1. Material experimental .....	18
2.3.2. Equipos.....	19
2.3.3. Materiales.....	19
2.4. Factores de Estudio .....	21
2.5. Tratamientos.....	22
2.6. Diseño Experimental.....	22
2.7. Hipótesis.....	23
2.8. Manejo del Experimento .....	23
2.8.1. Fase 1 del manejo del experimento: Implementación del experimento para la obtención de muestras.....	23
2.8.2. Fase 2 del manejo del experimento .....	25
2.9. Variables Respuesta .....	41
2.10. Procesamiento de la información .....	43
CAPÍTULO III.....	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	44
3.1. Aislamiento y cuantificación de rizobacterias de <i>S. tuberosum</i> L. Var. Superchola cultivadas en distintas muestras de suelo .....	44
3.2. Identificación de la morfología y colonias de los aislados bacterianos obtenidos.....	46
3.3. Determinación del potencial de fijación de nitrógeno atmosférico de estas bacterias.....	56
CAPÍTULO IV.....	59
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	59
4.1. Conclusiones .....	59
4.2. Recomendaciones.....	60
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
ANEXOS.....	68



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> <i>Clasificación botánica de la papa Solanum tuberosum.</i> .....	14
<b>Tabla 2</b> <i>Etapas fenológicas de la papa.</i> .....	16
<b>Tabla 3</b> <i>Tratamientos que resultaron de la combinación de los factores.</i> .....	22
<b>Tabla 4</b> <i>Localidades donde se encuentran ubicados los puntos de muestreos de suelo pertenecientes a los cantones de la provincia de Tungurahua.</i> .....	24
<b>Tabla 5</b> <i>Composición del medio Jensen.</i> .....	26
<b>Tabla 6</b> <i>Características culturales las colonias.</i> .....	31
<b>Tabla 7</b> <i>Comparación de la cantidad de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo rizosférico de distintas localidades de la provincia de Tungurahua utilizando medio Jensen libre de nitrógeno.</i> .....	45
<b>Tabla 8</b> <i>Caracterización de los aislados bacterianos del sector el Placer del cantón Quero en medio Jensen.</i> .....	47
<b>Tabla 9</b> <i>Caracterización de los aislados bacterianos del sector San Martín del cantón Mocha en medio Jensen.</i> .....	48
<b>Tabla 10</b> <i>Caracterización de los aislados bacterianos del sector El Salado del cantón Ambato en medio Jensen.</i> .....	50
<b>Tabla 11</b> <i>Caracterización de los aislados bacterianos del sector Santa Rita del cantón Pillaro en medio Jensen.</i> .....	52
<b>Tabla 12</b> <i>Caracterización de los aislados bacterianos del tratamiento control con un sistema que no emplea el suelo para su desarrollo.</i> .....	54
<b>Tabla 13</b> <i>Comparación entre aislados bacterianos de la rizosfera de Solanum tuberosum L. Var. Superchola respecto a la capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico en el medio de cultivo Jensen modificado.</i> .....	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> <i>Diagrama de la fase 1 del manejo del experimento.</i> .....	25
<b>Figura 2</b> <i>Diagrama de actividades realizadas para el aislamiento y cuantificación de unidades formadoras de colonia por gramo de suelo.</i> .....	29
<b>Figura 3</b> <i>Diagrama del conteo de las UFC. g<sup>-1</sup> de suelo.</i> .....	30
<b>Figura 4</b> <i>Diagrama de las actividades realizadas para la identificación morfológica y agrupación de los aislados bacterianos.</i> .....	35
<b>Figura 5</b> <i>Reacción de Gram, morfología y agrupación de los aislados bacteriano</i> .....	36
<b>Figura 6</b> <i>Prueba preliminar para la selección de bacterias fijadoras de nitrógeno</i> .....	38
<b>Figura 7</b> <i>Diagrama de actividades realizadas para evaluar el potencial de fijación de nitrógeno atmosférico.</i> .....	39
<b>Figura 8</b> <i>Diagrama de actividades realizadas para la conservación los aislados bacterianos con capacidad de fijación de nitrógeno en glicerol al 15% y BHI + glicerol al 20% a -20°C.</i> .....	41
<b>Figura 9</b> <i>Caracterización cultural de las bacterias aisladas.</i> .....	55
<b>Figura 10</b> <i>Caracterización morfológica de las bacterias aisladas.</i> .....	55
<b>Figura 11</b> <i>Zona de coloración de aislados bacterianos.</i> .....	58

## RESUMEN

El presente estudio se desarrolló con la finalidad de aislar, cuantificar, caracterizar, evaluar y conservar bacterias de vida libre asociados a la rizosfera de la papa con capacidad de fijación nitrógeno atmosférico, a partir de muestras de suelo de cuatro localidades de la provincia de Tungurahua. En primer lugar, se recolectaron muestras de suelo del cultivo de papa, que se depositaron en recipientes plásticos de 6 L de capacidad, donde se plantaron tubérculos de la variedad Superchola, tras 60 días se extrajeron muestras de suelo rizosférico (zona cercana a las raíces). Para el aislamiento se empleó el método de vertido en placa en medio de cultivo Jensen libre de fuentes de nitrógeno. Para cuantificar bacterias viables por gramo de suelo de cada localidad se prepararon diluciones seriadas donde se depositaron 100 µl en medio sólido, se incubaron durante 72 horas a 30 °C en posición invertida y se realizó el recuento en placa. La localidad de Santa Rita del cantón Pillaro tuvo mayor cantidad de UFC/g de suelo. Un total de 72 aislados se obtuvieron de la rizosfera de papa, de los cuales solo 38 aislados produjeron una reacción positiva con el cambio de color del medio modificado con azul de bromotimol de verde a azul, estos se sometieron a caracterización morfológica y cultural. En relación a la morfología predominaron en un 84% las bacterias Gram (-), bacilos (95%) y su agrupación mayormente fue en forma de diplobacilos (37%). En la caracterización cultural predominaron las formas: circular (42%), margen entero (84%), textura lisa (87%), superficie plana (42%), consistencia suave (82%) y el 95% presentaron brillo. El aislado bacteriano con mayor capacidad de fijar nitrógeno atmosférico fue el (T1-FCAGP-BFN1) de el sector El Placer del cantón Quero que no tuvo diferencia estadísticamente significativa respecto a los aislados T3-FCAGP-BFN14, T3-FCAGP-BFN16 y T4-FCAGP-BFN24. Los aislados purificados se depositaron en tubos eppendorf con glicerol al 15% y medio líquido BHI + glicerol al 20% que fueron conservados a -20 °C. Los aislados bacterianos con mayor capacidad de fijación de nitrógeno obtenidos se podrían utilizar para determinar su actividad promotora del crecimiento vegetal en invernadero previo a su posible utilización como biofertilizantes en condiciones de campo.

**Palabras clave:** Aislamiento, fijación de nitrógeno, rizobacterias, *Solanum tuberosum*.

## ABSTRACT

The present study was developed with the purpose of isolating, quantifying, characterizing, evaluating and conserving free-living bacteria associated with the potato rhizosphere with atmospheric nitrogen fixation capacity, from soil samples from four localities in the province of Tungurahua. First, soil samples were collected from the potato crop and placed in plastic containers of 6 L capacity, where tubers of the Superchola variety were planted. After 60 days, samples of rhizospheric soil (area near the roots) were extracted. For isolation, the pour plate method was used in Jensen culture medium free of nitrogen sources. To quantify viable bacteria per gram of soil from each locality, serial solutions were prepared where 100 µl were deposited in solid medium, incubated for 72 hours at 30 °C in inverted position and the plate count was performed. The locality of Santa Rita in the canton of Pillaro had the highest number of CFU/g of soil. A total of 72 isolates were obtained from the potato rhizosphere, of which only 38 isolates produced a positive reaction with the color change of the medium modified with bromothymol blue from green to blue, these were subjected to morphological and cultural characterization. In relation to morphology, 84% were predominantly Gram (-) bacteria, bacilli (95%) and their grouping was mostly in the form of diplobacilli (37%). In the cultural characterization, the following shapes predominated: circular (42%), entire margin (84%), smooth texture (87%), flat surface (42%), smooth consistency (82%) and 95% showed brightness. The bacterial isolate with the greatest capacity to fix atmospheric nitrogen was (T1-FCAGP-BFN1) from the El Placer sector of the Quero canton, which had no statistically significant difference with respect to isolates T3-FCAGP-BFN14, T3-FCAGP-BFN16 and T4-FCAGP-BFN24. The purified isolates were deposited in eppendorf tubes with 15% glycerol and BHI liquid medium + 20% glycerol and stored at -20 °C. The bacterial isolates with the highest nitrogen-fixing capacity obtained could be used to determine their plant growth-promoting activity in greenhouses prior to their possible use as biofertilizers under field conditions.

**Keywords:** Isolation, nitrogen fixation, rhizobacteria, *Solanum tuberosum*.

# CAPÍTULO I

## MARCO TEÓRICO

### 1.1.Introducción

El nitrógeno es el nutriente más requerido y crítico para los cultivos, debido a que es considerado un componente primordial de múltiples organelas esenciales de las plantas y es básico durante el desarrollo de las plantas, por lo tanto, la falta de este limita la producción. Una fertilización eficiente y conveniente ayuda a que los sistemas de producción alcancen buenos rendimientos. Siendo el nitrógeno el elemento que más abunda en la atmósfera, las plantas no pueden hacer uso de este, pero ciertas bacterias pueden utilizarlo y asociarse con plantas aprovechando así de este nutriente. Es por esto por lo que surge la necesidad de optimizar el rendimiento del cultivo y evaluar la capacidad de fijación de nitrógeno de bacterias asociadas a la rizosfera, promoviendo una mayor fijación de nitrógeno. Las bacterias fijadoras de nitrógeno se conocen como bacterias fijadoras de nitrógeno de vida o flujo libre, es decir, el proceso de capturar nitrógeno gaseoso sin necesidad de una relación simbiótica, reduciéndolo a nitrógeno asimilable por las plantas, como  $\text{NH}_4^+$  (Rojas y Cordero, 2021).

En la actualidad la agricultura está orientada en la implementación de prácticas que puedan garantizar la conservación de los suelos, por lo que el uso de bacterias asociadas con la rizosfera de las plantas se presenta como una opción relacionada con la actividad microbiológica que ayuda a fijar nitrógeno atmosférico y reducir la degradación del suelo, según Acuario et al. (2020). El costo creciente de los fertilizantes nitrogenados sintéticos y la actual crisis energética ha vuelto a centrar la atención en la fijación biológica de nitrógeno (Sudamrao y Prabhakarrao, 2016).

Mayz (2004) mencionó que las bacterias fijadoras de nitrógeno son una parte importante del suelo y, si no realizan la fotosíntesis, necesitan una fuente de energía química, que a la vez hace uso de la energía de la luz solar. La relación que existe entre las bacterias y las plantas podría ser positiva, negativa o neutra. Una de las relaciones

beneficiosas es la asociación con bacterias fijadoras de nitrógeno. Las bacterias fijadoras de nitrógeno se pueden incluir dentro del grupo de las rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR), ya que tiene un efecto favorable sobre el crecimiento de las plantas. En la actualidad se conoce que las bacterias fijadoras de nitrógeno incrementan la capacidad radical de captación de nitrato, indirectamente como resultado de provocar del desarrollo radical y en forma directa por impulsar el sistema transportador del compuesto.

Estos microorganismos no simbióticos o de vida libre ofrecen al medio ambiente compuestos que contienen nitrógeno utilizados por las plantas, como el amonio. La tasa de fijación de nitrógeno por bacterias no simbióticas en la rizosfera es mayor que en suelos libre de raíces debido a la disponibilidad de compuestos orgánicos en las raíces (Ariza et al., 2020).

El costo en la producción de fertilizantes nitrogenados no solo es elevado, sino que también tiene efectos negativos para el medio ambiente. Entre los efectos nocivos encontramos la emisión de óxido nitroso, el aumento de los niveles de acidez del suelo, la eutrofización del agua, y problemas ambientales a nivel mundial. Por lo tanto, la fijación de nitrógeno es económica y ecológicamente beneficioso para la producción agrícola sostenible. Es necesario reducir el uso de fertilizantes químicos en la agricultura y se han ido realizando investigaciones para explorar la fijación biológica de nitrógeno y su potencial para una implementación más amplia en la agricultura. (Shomi et al., 2021).

Considerando lo anteriormente expuesto, el objetivo de la presente investigación es evaluar los aislados bacterianos asociados a la rizosfera de cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) de la variedad Superchola con capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y determinar su potencial en la fijación de nitrógeno en condiciones de cultivo sólido. La elección de fijadores libres o asimbióticos se basa fundamentalmente por su interacción con las plantas, para este proyecto se utilizará medio de cultivo de Jensen, libre de nitrógeno.

## 1.2. Antecedentes investigativos

Gothwal et al. (2008) en su investigación sobre la detección de fijadores de nitrógeno de aislados bacterianos rizosféricos asociados con importantes plantas del desierto, en donde los aislados asociados a la rizosfera de dos plantas importantes de la zona árida caliente que han sido exploradas en términos de capacidad de fijación de nitrógeno en medios de cultivo sólido y líquidos libres de nitrógeno. En donde en medio sólido que contenía BTB como indicador de color la zona de coloración máxima se desarrolló en 22 mm y mínima en 4 mm en aislados asociados con la rizosfera de *C. polygonoides*.

Mantilla et al. (2009) en su trabajo investigativo “Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonía colombiana”, en donde aislaron bacterias posiblemente fijadoras de nitrógeno de distintos suelos en medios libres de nitrógeno, evaluando su abundancia y diversidad en donde el bioma influye directamente con la afluencia de bacterias, mencionaron que la abundante vegetación evidencia la correlación de los aislamientos obtenidos en medios libres de nitrógeno de los distintos biomas destacando la de los bosques que a su vez coincide con descubrimientos previos de bacterias fijadoras de nitrógeno dentro y en la superficie de raíces como el género *Azospirillum* de ciertas especies vegetales.

Lara et al. (2007) mediante su artículo titulado “Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia” se obtuvieron las poblaciones bacterianas a partir de la rizosfera de varios cultivos en medio del departamento de Córdoba con la ayuda de pruebas bioquímicas y observación macroscópica y microscópica en distintos medios de cultivos entre ellos el más efectivo el medio de cultivo Jensen, logrando así comprobar la producción del ión amonio de los aislados; Se empleo el método colorimétrico de Berthelot para cuantificar el ión amonio con ayuda de un espectrofotómetro. Determinando así que la fijación biológica del nitrógeno por bacterias diazotróficas ha favorecido el rendimiento en las cosechas, reduciendo la necesidad de la aplicación de fertilizantes

nitrogenados y la emisión de gases tóxicos como el N<sub>2</sub>O, alcanzando beneficios económicos y ambientales.

Sulistiyani y Meliah (2017) en su artículo titulado “Isolation and characterization of nitrogen fixing endophytic bacteria associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor*)” realizaron el aislamiento primario y caracterizaron bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas con el sorgo o también conocida como zahína, a partir de muestras recolectadas de Cibinong, Indonesia. El sorgo se producía en cuatro tratamientos diferentes: compost e inoculantes, inoculantes, compost sin inoculantes de adición, sin compost e inoculantes. Para aislar bacterias se utilizó el método de placa de propagación. La caracterización de las bacterias fijadoras de nitrógeno se realizó en medio Jensen y se probó con cebadores específicos para amplificar el gen *nifH*. Obteniendo 89 aislados de los cuales 16 aislados pudieron crecer satisfactoriamente en los medio de Jensen. Basándose en la amplificación de PCR del gen *nifH*, se determinó el tamaño deseado de la región *nifH*.

Clavijo et al. (2012) a través de su investigación “Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias diazotróficas de la rizósfera del cultivo de olivo en Tacna Perú” en donde se aislaron e identificaron 104 aislados bacterianos fijadores de nitrógeno procedentes de la zona del suelo próxima a las raíces del olivo, notando relaciones recíprocas entre las poblaciones bacterianas con la materia orgánica, pH del suelo y profundidad la raíz. Los aislados se caracterizaban por su capacidad para promover el crecimiento mediante crecimiento en medios libres de nitrógeno, formación de ácido indol acético (AIA) y solubilización de fosfatos. Se observó una tasa máxima de crecimiento de  $6 \times 10^8$  UFC.ml<sup>-1</sup> en el ensayo de crecimiento en medio libre de nitrógeno. Luego se seleccionaron las mejores cepas para el análisis molecular del gen 16S rRNA logrando identificar las especies aisladas y los resultados apuntaron a que estas bacterias podrían usarse para realizar pruebas a nivel de invernadero y luego en el campo como potenciales promotores del crecimiento de las plantas.



Latt et al. (2018) en su investigación titulada “Isolation, evaluation and characterization of free living nitrogen fixing bacteria from agricultural soils in Myanmar for biofertilizer formulation”, se obtuvieron tres géneros bacterianos con mejor actividad de fijación de nitrógeno, de las cuales se determinó su capacidad de fijación de nitrógeno de las cepas con el kit de detección de amonio alfa de Viscolor. La concentración calculada de amoníaco era evidentemente superior a la de otros aislados. Esas cepas se seleccionaron y evaluaron por otros efectos beneficiosos. Más del 1 % de estas bacterias, no se desarrollaron favorablemente en medio libre de nitrógeno. Para desarrollar biofertilizantes a base de bacterias fijadoras de nitrógeno efectivos para su uso en suelos agrícolas, estas bacterias fijadoras de nitrógeno se propusieron como candidatos promisorios de biofertilizantes. Después de un mes de preparación del biofertilizante, se determinó el contenido mineral del biofertilizante preparado, y señalaron que un biofertilizante formulado con varias bacterias fijadoras de nitrógeno podría ser más efectivo para su uso en tierras agrícolas.

### **1.3.Objetivos**

#### **Objetivo General**

Evaluar la capacidad de fijación del nitrógeno atmosférico de las bacterias asociadas con la rizosfera de plantas de *S. tuberosum* L. Var. Superchola en la provincia de Tungurahua.

#### **Objetivos Específicos**

1. Aislar y cuantificar rizobacterias de *S. tuberosum* L. Var. Superchola cultivadas en distintas muestras de suelo.
2. Identificar la morfología y colonias de los aislados bacterianos obtenidos.
3. Determinar el potencial de fijación de nitrógeno atmosférico de estas bacterias.

## 1.4. Características fundamentales

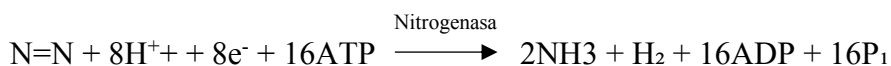
### 1.4.1. Generalidades del nitrógeno

El nitrógeno es un elemento abundantemente distribuido en la naturaleza, es necesario para el desarrollo de las plantas y un factor limitante para su crecimiento. No obstante, las plantas no tienen acceso directo al nitrógeno atmosférico, que constituye aproximadamente del 80% de la atmósfera. Las plantas asimilan el nitrógeno disponible del suelo en forma de amonio y nitrato a través de sus raíces. La escasa biodisponibilidad del nitrógeno y la dependencia del nitrógeno para el desarrollo de los cultivos ha generado una gran industria de fertilizantes nitrogenados en todo el mundo (Santi et al., 2013).

### 1.4.2. Proceso de fijación de N<sub>2</sub>

De acuerdo con Giller (2001), absolutamente todos los organismos necesitan de nitrógeno para subsistir. Gran parte de los organismos se limitan a usar "nitrógeno combinado", más bien, N que ya está complementado con otros átomos para formar un ion como el amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) o el nitrato (NO<sub>3</sub>). A pesar de ello, la concentración de N que está disponible en el planeta es gas dinitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>). Este gas es estable y un vasto suministro para organismos que sean capaces de aprovecharlo al máximo. El proceso de fijación de N<sub>2</sub> es la reducción de este a una forma biológicamente combinada útil de N-amoniaco. En vista de que N<sub>2</sub> es muy estable, la reacción es energéticamente costosa y es por esta razón que tal vez la capacidad de fijación de N<sub>2</sub> no es tan común.

La ecuación para la reacción es:



La reducción asociada de por lo menos dos protones a hidrógeno es algo que no se puede evitar de la reacción, y por esto la ecuación anterior es la precisa en lugar de la versión más simplificada que a veces se puede observar en la que seis protones y seis

electrones se fijan al dinitrógeno para crear dos moléculas de amoníaco, sin mencionar el desarrollo simultáneo del hidrógeno.

El proceso de fijación del  $N_2$ , en otras palabras, forzarlo a reaccionar con otros elementos, formando compuestos que lo contienen, se puede realizar tanto química como biológicamente (Torres, 2009).

Según Aguirre et al. (2009), un modo de proporcionar este elemento a las plantas es a través de procesos industriales que demandan el uso de combustibles fósiles no renovables, que presentan una exposición potencial de contaminación de aguas dulces y eutrofización por lixiviación de  $NO_3$ .

Morocho y Leiva (2019) destacaron los roles de las bacterias simbióticas y de vida libre en la conversión de nitrógeno atmosférico en formas que pueden ser utilizadas por las plantas e incorporadas en la biosfera.

### **1.4.3. Ciclo del nitrógeno**

El ciclo del nitrógeno es conocido como uno de los ciclos bioquímicos más importantes en el ecosistema terrestre. Está constituido por cuatro procesos microbiológicos; como la fijación de nitrógeno, mineralización (descomposición), nitrificación y desnitrificación. El aporte de cantidades colosales de fertilizantes nitrogenados a los campos agrícola interviene en estos procesos, sobre todo en la nitrificación y desnitrificación, incrementa la producción de  $N_2O$  y contamina el agua subterránea debido a la lixiviación de nitratos. Es por eso, el enfoque en la detección de microorganismos encargados de estos procesos en los ecosistemas del suelo (Hayatsu et al., 2008).

### **1.4.4. Diversidad microbiana de la rizosfera**

Las comunidades microbianas de la rizosfera impulsan del 80% al 90% de los procesos biológicos presentes en el suelo y están estrechamente vinculadas a la salud de este (Bajsa et al., 2013), conforme a sus numerosas propiedades funcionales entre los que

predominan la promoción del crecimiento vegetal, reciclaje ecológico, actividad de control biológico, moderación de cambios exógenos, degradación de compuestos tóxicos, producción de biomasa vegetal, fertilidad y estructura del suelo, etc. (Delgado et al., 2016).

La actividad microbiana del suelo, y sus beneficios para el mismo, están fuertemente influenciados por actividades agrícolas intensivas e insostenibles y el cambio climático, las propiedades del suelo a nivel químico, físico y biológico, es decir, temperatura, humedad, salinidad, aireación, potencial redox, composición y contenido de gas en el espacio poroso, biodisponibilidad de nutrientes, pH (Ibarra et al., 2021).

Stevenson et al. (2004) señalaron que la amplia distribución microbiana en la rizósfera dificulta identificar y estudiar las funciones que son beneficiosas para la salud de las plantas. El análisis a fondo de estas funciones es complejo debido a que gran parte de los microorganismos no puede crecer en medios de cultivo estándar.

Los microorganismos de la rizosfera son los máximos aliados para alcanzar un buen desarrollo y nutrición de las plantas, estableciendo una secuencia de asociaciones simbióticas y no simbióticas para un uso conveniente de los recursos del suelo. Entre estas asociaciones están los microorganismos que favorecen la degradación de la materia orgánica, la fijación de nitrógeno, producción y liberación de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, solubilización de elementos minerales y protección frente a fitopatógenos, entre otros. Es así como desde hace algún tiempo se ha desarrollado investigaciones sobre el uso de microorganismos que promuevan un mejor desarrollo de las plantas y en lo posible un efecto en contra de enfermedades (Main y Franco, 2011).

#### **1.4.5. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal**

La búsqueda de diversas bacterias que habitan la rizosfera y que afectan positivamente el desarrollo de las plantas también conocidas como rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) ha ido tomando impulso a medida que se realizan esfuerzos para explotarlas como biofertilizantes para cultivos económicamente importantes. Estas brindan efectos benéficos en las plantas por medio de mecanismos

directos e indirectos. Los mecanismos directos tienen lugar cuando las bacterias sintetizan metabolitos que proporcionan a las plantas o estas aumentan la disponibilidad de ciertos elementos, necesarios para su metabolismo y para procesos nutricionales. Entre los mecanismos directos se encuentra la fijación de nitrógeno (Moreno, 2018).

No obstante, no solo un género, especie bacteriana o un solo grupo funcional es lo que mejora la promoción del crecimiento vegetal, sino que es una comunidad bacteriana que poseen varias propiedades a la vez. (Dobbelaere, 2003).

Normalmente los microorganismos promotores de crecimiento vegetal a suelen obtenerse de un cultivo puro de los microorganismos aislados de la rizosfera de una planta de interés y se propaga en un medio de cultivo específico para ser trasladado a un sustrato y de esta manera ser aprovechados en la agricultura (Aguirre et al., 2009).

#### **1.4.6. Microorganismos fijadores de nitrógeno**

Algunos microorganismos son capaces de convertir el dinitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) a amonio ( $NH_4^+$ ) bajo la acción de la enzima nitrogenasa. Estas especies se denominan diazótrofas y requieren energía para llevar a cabo su metabolismo. Entre de los diazótrofos capaces de llevar a cabo este proceso están los fijadores de vida libre, que fijan  $N_2$  sin la intervención de otras formas de vida, siendo *Azotobacter* uno de los géneros más importantes empleados en la biofertilización de varios cultivos agrícolas. Este género es uno de los microorganismos biofertilizantes más estudiados y utilizados. Sus propiedades beneficiosas se encuentran en muchas hortalizas y cereales aunque se considera menos importante para la agricultura porque aporta menor cantidad de nitrógeno al suelo, pero bajo ciertas condiciones, sus efectos benéficos provienen no solo de la cantidad de nitrógeno atmosférico fijado, sino también de su capacidad para producir vitaminas y sustancias promotoras de crecimiento (ácido indol acético, ácido giberélico, citoquinina, vitaminas), que actúan directamente en el desarrollo de las plantas (Torres, 2009). Los microorganismos fijadores de nitrógeno no solo son objeto de investigaciones microbiológicas de suelos, sino además en desarrollar productos biológicos comerciales (Clavijo et al., 2012).

#### **1.4.7. Bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno atmosférico**

Las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre fertilizan de manera natural el suelo al aportar nitrógeno en una forma biodisponible que las plantas pueden aprovechar. La presencia estas bacterias en el suelo también permite que el suelo mantenga un intercambio constante de nutrientes y minerales, impidiendo las consecuencias de la erosión y la disminución de fertilidad del suelo (Philippot y Germon, 2005).

Según Gothwal et al. (2008) Los fijadores de nitrógeno de vida libre comprenden una variedad de microorganismos, incluidas las bacterias que viven en residuos de las plantas (saprófitos), las bacterias que viven dentro de las plantas (endófitos) y las bacterias que están asociadas con las raíces de las plantas (rizobacterias).

#### **1.4.8. Generalidades del cultivo de papa**

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es un alimento de consumo básico, considerado elemento clave de la economía. Es originaria de América del Sur, pero se cultiva alrededor del mundo gracias a sus tubérculos comestibles. Este cultivo forma parte de uno de los cultivos de mayor relevancia tanto social y económica en la región de los Andes. La producción es limitada a causa de los componentes bióticos y abióticos. El manejo de agroquímicos en la agricultura requiere de grandes inversiones de capital y a pesar de que no siempre están a disposición de los agricultores, su aplicación excesiva e inapropiada para adquirir efectos espontáneos, con el tiempo ha ocasionado lo opuesto al efecto esperado, pérdidas considerables al medio y el bienestar de sus habitantes (Main y Franco, 2011).

El cultivo de papa es uno de los más importantes a nivel mundial, es el cuarto cultivo alimentario más producido y el primer cultivo no cereal del mundo (Aksoy, 2021). Es un alimento básico en más de cincuenta países por su funcionalidad, versatilidad y bajos costos respecto a otros cultivos, también llega a mil millones de consumidores mundialmente y de estos el 50% corresponden a países subdesarrollados (Devaux et al., 2014).

A mitad del siglo XVI, se introdujo la papa a Europa por los españoles. Durante los siguientes dos siglos, la papa fue solo una novedad, se cultivó a pequeña escala y se conservaba especialmente con fines botánicos. El cultivo llegó a América del Norte en el siglo XVII, posiblemente a través de Europa. La región con mayor diversidad genética de papa cultivada y silvestre (*Solanum tuberosum* L.) es el altiplano andino de América del Sur. Hay aproximadamente 5.000 variedades de papa, de las cuales más de 500 se cultivan en los Andes. (Pumisacho y Sherwood, 2002).

El tubérculo es un órgano económicamente trascendental, es alto en carbohidratos y crece bajo tierra a lo largo de tallos modificados denominados estolones. Aun cuando las papas producen semillas verdaderas, los tubérculos se utilizan como forma principal de propágulo (Bradeen et al., 2011).

En 2022, el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. (INIAP) realizó un catálogo de variedades de papas cultivadas en el Ecuador. A pesar de ello, en el país habitualmente solo se producen no más de 30, en donde las variedades Superchola y INIAP Gabriela ocupan más de la mitad del área sembrada. La papa es uno de los principales productos en los sistemas productivos de la sierra ecuatoriana y es una fuente importante de alimentación e ingresos para las familias campesinas. La papa se cultiva en región interandina, siendo Carchi, Chimborazo y Tungurahua las provincias con mayor área cosechada lo cual representa el 66.3% de la superficie total (Cuesta et al., 2022).

#### **1.4.8.1. Clasificación taxonómica**

De acuerdo con Anjum et al. (2018) la clasificación taxonómica de la papa está descrita de la siguiente manera.

**Tabla 1**

*Clasificación botánica de la papa Solanum tuberosum.*

<b>TAXONOMÍA</b>	
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Subreino</b>	Viridiplantae
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Subdivisión</b>	Espermatofitas
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Subclase</b>	Asteridae
<b>Orden</b>	Solanales
<b>Familia</b>	Solanáceas
<b>Género</b>	<i>Solanum</i>
<b>Especie</b>	<i>Solanum tuberosum</i> L.

#### **1.4.8.2. Descripción botánica**

Huamán (1986) manifiesta que la papa es una planta anual, bienal o perenne no leñosa (herbácea) y el hábito de crecimiento varía entre las especies, que pierde sus hojas y tallos aéreos en la estación fría (caducifolia). Anjum et al. (2018) señalaron que la papa presenta las siguientes características:

**Tallo:** presenta un tallo erecto en etapas primarias y en el avance de las etapas prolifera, posee dos tipos de tallos subterráneos: los rizomas y los tubérculos, puede medir hasta 1 m de altura.



**Tubérculos:** es una parte ampliada de un tallo subterráneo a partir del cual se producen nuevos brotes.

**Sistema radicular:** es fibroso, ramificado que puede penetrar hasta 80 cm de profundidad.

**Hojas:** posee hojas compuestas, con 6 a 8 folíolos de forma lanceolada y folíolos intersticiales más pequeños y disímiles.

**Frutos:** son bayas esféricas no comestibles, su color dependerá la variedad, contienen en su interior semillas.

**Inflorescencia:** flores bisexuales donde se realizan dos tipos de polinización, la autopolinización y la polinización cruzada por insectos, abejas y pájaros. Las flores tienen diversos colores como amarillo, blanco, rojo, azul, rosa o violeta. Generalmente, las variedades de flores blancas producen tubérculos de piel clara y los tubérculos de piel rosada son producidos por variedades con flores de color.

#### **1.4.8.3. Condiciones edafoclimáticas**

Cahuana et al. (2020) mencionan que para la producción de papa es necesario las siguientes condiciones edáficas y climáticas.

##### **Suelo**

Para el cultivo de papa los mejores suelos son los francos, franco-arcillosos y franco-limosos, granulares, con alto contenido de materia orgánica, profundos y con buena capacidad de drenaje. El pH ideal es de 5,5 a 6.

##### **Clima**

El clima ideal para el cultivo de papa es templado y húmedo.

##### **Humedad Relativa**

Un rango apropiado de humedad relativa para el cultivo de papa debe ser mayor a 60%.

### **Temperatura**

La temperatura adecuada para el brotamiento entre 15 a 22 °C y para tuberización entre 14 a 18°C.

### **Iluminación**

El periodo óptimo de horas de luz por día para la tuberización es de 12 a 16 normalmente.

#### **1.4.8.4. Ciclo vegetativo**

Según Pumisacho y Velásquez (2009) señalaron que la fenología del cultivo de papa está comprendida por diferentes etapas, esta inicia con el almacenamiento de la semilla y termina con la cosecha. En el caso del cultivo de papa está compuesta por tres etapas.

**Tabla 2**

*Etapas fenológicas de la papa.*

<b>Etapas fenológicas</b>		
<b>Vegetativa</b>	<b>Reproductiva</b>	<b>Maduración</b>
Esta etapa inicia con la brotación de la semilla, seguido de la emergencia, el desarrollo de la planta, inicio de la floración y tuberización.	Esta etapa consta del fin de la floración y la tuberización, seguido del engrose de los tubérculos.	Esta etapa inicia con el proceso de maduración y la cosecha.

### **1.5. Biofertilizantes**

Los biofertilizantes deben ser analizados en relación al problema a tratar, su capacidad para colonizar suelos y plantas, la síntesis de compuestos bioactivos de interés y la interacción de la comunidad microbiana nativa. La disponibilidad de nutrientes, el pH y salinidad influyen en la supervivencia de los microorganismos en el suelo, y la falta o exceso de ciertos compuestos minerales puede reducir gradualmente la cantidad de microorganismos inoculados (Chávez et al., 2020).

Actualmente diversos microorganismos con funciones concretas se emplean en la agricultura para optimizar el rendimiento de los cultivos. Estas son fuentes que favorecen el manejo de nutrientes, tienen un efecto benéfico en el manejo de los cultivos y forman parte de tecnologías que prometen una mejor productividad biológica, económica y ecológica sin contaminar el medio ambiente y de inocuidad avalada para el ser humano. Los biofertilizantes son biotecnologías “apropiables”, una expresión acuñada para las herramientas biotecnológicas que aportan al desarrollo sostenible de una nación, brindando beneficios tangibles a sus destinatarios, ya que son ambientalmente positivas, culturalmente admisibles y socioeconómicamente rentable (Aguirre et al., 2009).

## **CAPÍTULO II**

### **METODOLOGÍA**

#### **2.1. Ubicación del experimento**

El ensayo se realizó en el laboratorio de Bioinsumos ubicado en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, Campus Querochada (FCAGP) ubicada en el sector El Tambo del cantón Cevallos de la provincia de Tungurahua. Según el GPS está ubicado a una altitud sobre el nivel del mar de 2852 m, con coordenadas geográficas 01°22'08.8" S y 78°36'23.8" W.

#### **2.2. Características del lugar**

La presente investigación y fase de plantación de tubérculos de papa Superchola en muestras de suelo de cuatro cantones de la provincia de Tungurahua se llevó a cabo en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, campus Querochaca en el Cantón Cevallos de la provincia de Tungurahua. GAD Municipal de Cevallos (2011) mencionó que, Cevallos posee un clima templado que se encuentra entre los 13 y 16 grados centígrados en casi todo el cantón. Se considera un territorio óptimo para la agricultura por su favorecido clima.

#### **2.3. Equipos y materiales**

##### **2.3.1. Material experimental**

El material experimental está constituido por muestras de suelo rizosférico, se consideraron cuatro puntos productores papa en la provincia de Tungurahua (El Placer - Quero, San Martín - Mocha, El Salado - Ambato y Santa Rita - Píllaro), donde se plantaron tubérculos de papa de la variedad Superchola durante 60 días a partir de la brotación, en etapa de floración.

### 2.3.2. Equipos

- Computadora.
- Autoclave calor húmedo (ALL AMERICAN 75X).
- pH METRO (P-510 Peak Instruments).
- Balanza analítica (EUROTECH –JF2204).
- Cabina de flujo laminar (INDELAB. Modelo IDL R48V Labolan).
- Contador de colonias (American Optical).
- Destilador de agua (DIRECT-Q®3/MILLOPONE).
- Micropipetas dispensadoras de volumen variable (JP SELECTA).
- Agitador Vortex (VWR®).
- Incubadora (MEMMERT).
- Microscopio Trinocular con cámara (MOTIC).
- Plancha de agitación con Calentamiento (THERMO SCIENTIFIC™).
- Refrigerador vitrina (INDURAMA).
- Dispensador (VITREA 40 L).
- Calibrador vernier digital (STAINLESS HARDENED 200mm).

### 2.3.3. Materiales

- Placas de Petri de poliestireno estéril (BIOLOGIX 90 mm de diámetro).
- Medio de cultivo Jensen - Agar (HIMEDIA 500 g).
- Agua peptonada tamponada (Neogen® Culture Media).
- Caldo de infusión de cerebro corazón BHI (TM MEDIA®).
- Botella Autoclavable Tapa azul (BOECO 500 ml).
- Solución ndicadora de color Azul de Bromotimol (Casa del Quimico 100 ml).
- Vaso de precipitado (BOECO 500 ml).
- Probetas (Lab Glass 1000 ml).
- Tubos de ensayo con tapón de rosca (PYREX® Longitud 180 mm).
- Matraz aforado (100 ml).
- Matraz erlenmeyer (BOECO 250 ml).
- Alcohol potable 95% (Genersa).
- Bolsas PROTEK (2 kg de capacidad).
- Toalla en Rollo de Papel Kraft (BIOSOLUTIONS 300 m).

- Bolsas autoclavables transparentes en polipropileno.
- Tubérculos de papa de la variedad Superchola.
- Equipo de protección.
- Muestras de suelo rizosférico de cultivo de papa variedad superchola de distintas zonas de la provincia de Tungurahua.
- Reactivos para Tinción de Gram (safranina, alcohol-acetona, lugol, cristal violeta Merck).
- Aceite de inmersión (TM MEDIA®).
- Portaobjetos (EUROPA LABWARE).
- Asas de inoculación de alambre de nicromio (Microspec™).
- Mango de Kolle (JP Selecta 200 mm).
- Asa de de Drigalski de vidrio (BOECO).
- Gradilla de acero inoxidable para tubos de ensayo.
- Gradilla para microtubos de 2 ml.
- Mechero Bunsen.
- Lámpara de alcohol de vidrio.
- Cinta indicadora de esterilización (SIGMA 19 mm\*50 m).
- Piseta (ISOLAB).
- Glicerol.
- Tubos Eppendorf 2,0 ml (BRAND®).
- Cajas criogénicas de policarbonato (BIOLOGIX).
- Bandejas de pesaje de poliestireno cuadrados (Cole Parmer™).
- Fundas herméticas (Zipper/Ziploc).
- Etiquetas autoadhesivas (LANCER).
- Caja dispensadora de papel aluminio (GOLDERY 61 mts x 30cm).
- Mascarillas (DHISVE).
- Bata quirúrgica (MEDICA EC).
- Cofias quirúrgicas (MEDICA EC).
- Zapatones (MEDICA EC).
- Guantes de nitrilo (SP GLOVES).
- Jabón líquido antibacterial (Vifás 1000 cc).
- Alcohol Antibacterial 70% (FENIXLAB).
- Hipoclorito de sodio al 10% (Sparza).

- Desinfectante concentrado de amplio espectro (Pursept® AF).
- Detergente en polvo (Mucocit®-P 2,5 kg).
- Caja térmica (PLASTRO 4L).
- Puntas amarillas de pipeta 2 a 200 ul (BRAND® 732008).
- Puntas azules de pipeta de 50 a 1000 ul (BRAND® 732032).
- Puntas de micropipetas (10ml BRAND®).
- Barras agitadoras magnéticas (Cowie 41 x 8 mm).
- Espátula acero inoxidable 25 cm .
- Agua destilada.
- Cuaderno cuadriculado espiral pasta dura (NORMA).
- Marcador negro permanente (Pointer®).

## 2.4. Factores de Estudio

**2.4.1. Objetivo N° 1:** Aislar y cuantificar rizobacterias de *S. tuberosum* L. Var. Superchola cultivadas en distintas muestras de suelo.

- **Factor** Influencia de suelos de cuatro localidades de la provincia de Tungurahua sobre la cantidad de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo cultivables de plantas de *S. tuberosum* L.

**2.4.2. Objetivo N° 2:** Identificar la morfología y colonias de los aislados bacterianos obtenidos.

- **Factor.** Influencia de la procedencia de los aislados sobre las características morfológicas y culturales de las colonias de bacterias asociadas con las rizosfera de plantas de *S. tuberosum* L. Var. Superchola en medio de cultivo Jensen.

**2.4.3. Objetivo N° 3:** Determinar el potencial de fijación de nitrógeno atmosférico de estas bacterias.

- **Factor.** Influencia de bacterias nativas en la capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico.

## 2.5. Tratamientos.

**Tabla 3**

*Tratamientos que resultaron de la combinación de los factores.*

<b>TRATAMIENTOS</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
T1	Bacterias rizosféricas fijadoras de N <sub>2</sub> aisladas de muestra de suelo del cultivo de <i>S. tuberosum</i> L. Var. Superchola del cantón Quero.
T2	Bacterias rizosféricas fijadoras de N <sub>2</sub> aisladas de muestra de suelo del cultivo de <i>S. tuberosum</i> L. Var. Superchola del cantón Mocha.
T3	Bacterias rizosféricas fijadoras de N <sub>2</sub> aisladas de muestra de suelo del cultivo de <i>S. tuberosum</i> L. Var. Superchola del cantón Ambato
T4	Bacterias rizosféricas fijadoras de N <sub>2</sub> aisladas de muestra de suelo del cultivo de <i>S. tuberosum</i> L. Var. Superchola del cantón Pillaro.
T5	Control aislamiento de bacterias a partir de raíces de plantas de <i>S. tuberosum</i> L. Var. Superchola de un sistema que no emplea el suelo para su desarrollo.

## 2.6. Diseño Experimental

Para el aislamiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno a partir de distintas muestras representativas de suelo rizosférico del cultivo de *S. tuberosum* L. en la provincia de Tungurahua para el cultivo de papa Superchola se empleó un diseño completamente aleatorizado.



## 2.7. Hipótesis

Mediante el aislamiento de bacterias asociadas a partir de raíces de *S. tuberosum* L. Var. Superchola cultivadas en diferentes tipos de suelo se podrían seleccionar aislados con la capacidad de fijación del nitrógeno atmosférico.

## 2.8. Manejo del Experimento

El experimento se realizó en el laboratorio de Bioinsumos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.

### 2.8.1. Fase 1 del manejo del experimento: Implementación del experimento para la obtención de muestras.

- a) Se recogieron muestras de suelo rizosférico (suelo alrededor de la zona radicular) a una profundidad de 0-20 cm del cultivo de papa en cuatro cantones de la provincia de Tungurahua (Quero, Mocha, Ambato, Pillaro) para aislar potenciales bacterias fijadoras de nitrógeno con un muestreo de suelo en zig-zag. Estas cuatro cantones se caracterizan por ser representativas productoras de papa mientras mantienen distintas condiciones de suelo, altura y características de campo. Acorde con la **Tabla 4**.
- b) Se colocaron las muestras del suelo en recipientes plásticos de 6 lt, debidamente etiquetados e identificados por tratamiento de acuerdo a su origen.
- c) Se establecieron los tratamientos, por medio de la plantación de tubérculos de *S. tuberosum* L. Var. Superchola en recipientes de polietileno tereftalato con las muestras de suelo rizosférico recolectadas, con 5 repeticiones por tratamiento.

- d) Se implementó el tratamiento de control con la plantación de tubérculos *S. tuberosum* L. Var. Superchola con un sistema que no emplea el suelo para su desarrollo. Acorde con la **Figura 1**.

**Tabla 4**

*Localidades donde se encuentran ubicados los puntos de muestreos de suelo pertenecientes a los cantones de la provincia de Tungurahua.*

<b>Cantón</b>	<b>Sector</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Altitud</b>	<b>UTM</b>
<b>Quero</b>	El Placer	<i>S. tuberosum</i> L. Var. Superchola	3240 m s.n.m.	768445.394E 9842469.747N
<b>Mocha</b>	San Martín	<i>S. tuberosum</i> L. Var. Superchola	3080 m s.n.m.	763496.438E 9844945.116N
<b>Ambato</b>	El Salado	<i>S. tuberosum</i> L. Var. Superchola	3600 m s.n.m.	742100.098E 9858150.686N
<b>Pillaro</b>	Santa Rita	<i>S. tuberosum</i> L. Var. Superchola	3760 m s.n.m.	778047.874E 9875903.239N



**Figura 1**

*Diagrama de la fase 1 del manejo del experimento.*

## **2.8.2. Fase 2 del manejo del experimento**

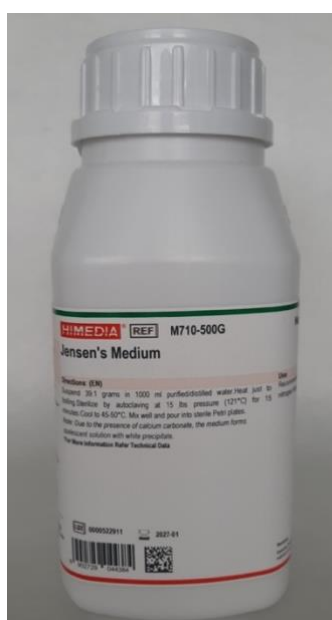
### **2.8.2.1. Preparación y plaqueo del medio selectivo libre de nitrógeno Jensen.**

Se adquirió el medio de cultivo Jensen, libre de nitrógeno para la detección y cultivo de bacterias diazotróficas de vida libre (Tabla 5). Se pesó 39,1 g del medio comercial disolviendolos en 1000 ml de agua en un vaso de precipitación que se colocó durante 30 minutos en una plancha de agitación magnética con calentador a 300 rpm elevando

la temperatura gradualmente hasta llegar a punto de ebullición, el medio se coloca en una botella autoclavable de tapa rosca azul y se llevó a esterilizar a una temperatura de 121°C. Se dejó enfriar hasta una temperatura mínima de 40 °C para evitar condensación en las tapas de las placas. Finalmente en condiciones asépticas se vació aproximadamente 20 ml del medio de cultivo en cajas de Petri estériles y se dejó solidificar.

**Tabla 5**

*Composición del medio Jensen.*



Componente	g/L
Sacarosa	20.00
Fosfato de hidrógeno dipotásico	1.00
Sulfato de magnesio	0.50
Cloruro de sodio	0.50
Sulfato ferroso	0.10
Molibdato de sodio	0.50
Carbonato de calcio	2.00
Agar	15.00

**Nota:** En Medio Jensen, la sacarosa funciona como fuente de energía, mientras que el molibdato de sodio incrementa la fijación de nitrógeno, el cloruro de sodio sirve para mantener el equilibrio osmótico de los medios y el calcio puede estimular la nodulación cuando se presenta como cloruro o sulfato. Adaptado de “Technical data: Jensen's Medium M710” por HiMedia Laboratories, 2021.

### 2.8.2.2. Aislamiento de bacterias y cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

Para el aislamiento de bacterias se preparó 15 cajas de Petri, cada tratamiento se realizó por triplicado dando un total de 45 cajas, a partir de estos se realizaron disoluciones seriadas de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ .

- a) Se obtuvo una cantidad aproximada de 1 kg de muestras de la rizosfera de *S. tuberosum* L. Var. Superchola a una profundidad aproximada de 15 cm de profundidad con la ayuda de una espátula larga de 25 cm de acero inoxidable. Las muestras se colocaron en bolsas selladas herméticamente, con su respectiva etiqueta de identificación acorde a su origen y posteriormente se transportaron en condiciones estériles al laboratorio para los análisis respectivos. Las muestras fueron tomadas en la época de floración y cada muestra se analizó por triplicado.
- b) En un matraz Erlenmeyer de 250 ml de volumen se añadió 10 g de suelo rizosférico y 90 ml de agua peptonada tamponada estéril.
- c) Se homogeneizó en el agitador magnético durante 30 minutos a 300 rpm.
- d) Además, se llevó a la técnica de dilución decimal seriada en la suspensión de suelo, un factor de dilución de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  tomando 1 ml de una suspensión de muestra, luego pipeteada y puesta en un tubo de ensayo que contenía 9 ml de agua destilada. Luego, la suspensión del factor primer factor de dilución se pipeteó 1 ml y la puso en un tubo de ensayo que contenía 9 ml de agua destilada que se agito durante 15 segundos en el vórtex y así sucesivamente hasta la llegar a la dilución de  $10^{-6}$ .
- e) A continuación, se tomó 100  $\mu$ l de cada uno de los factores de dilución para ser inoculado en el medio Jensen de 20 ml en una placa de Petri utilizando el método de vertido en placa incubado durante 72 horas a 30 °C y se realizó el conteo, los resultados se expresaron en UFC/g de suelo rizosférico.
- f) Las colonias desarrolladas en el medio se tomaron y purificaron mediante siembra por agotamiento en placas que contenían medio Jensen durante 8 días a 30 °C en posición invertida.
- g) Después de que las cepas purificadas crecieran, se identificaron las características culturales y morfológicas observadas de cada aislado después de los 8 días de incubación.

1. Tomar muestras de suelo rizosférico a los 15 cm de profundidad de las macetas.



2. Pesar 10 g de suelo rizosférico.



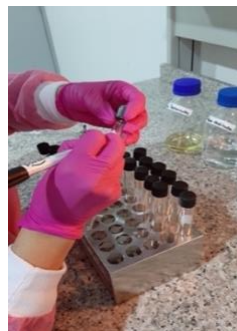
3. Preparar la solución madre. (90 ml agua peptonada-tamponada y 10 g de suelo rizosférico).



4. Llevar a agitación

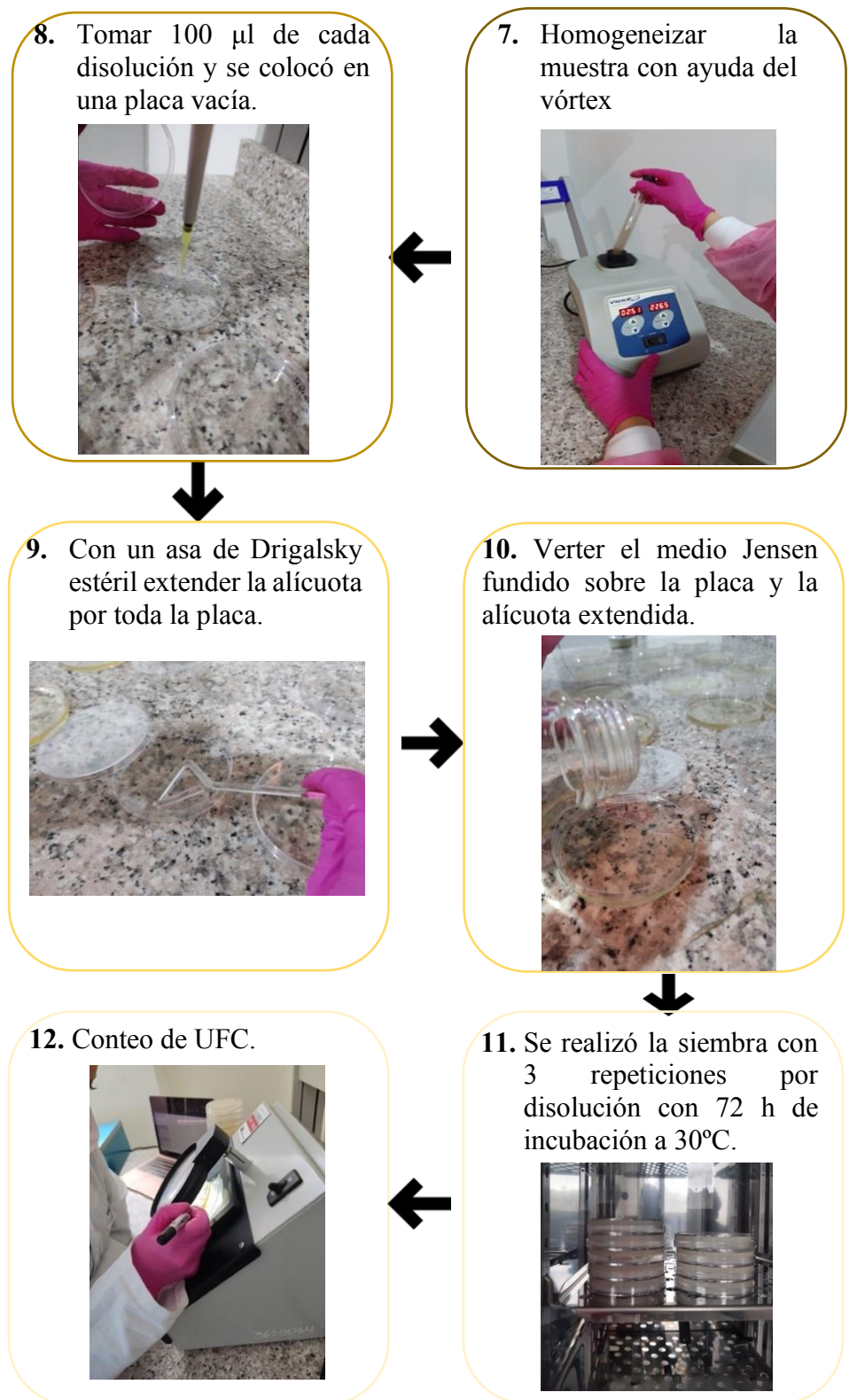


5. Rotular tubos para las disoluciones decimales seriadas.



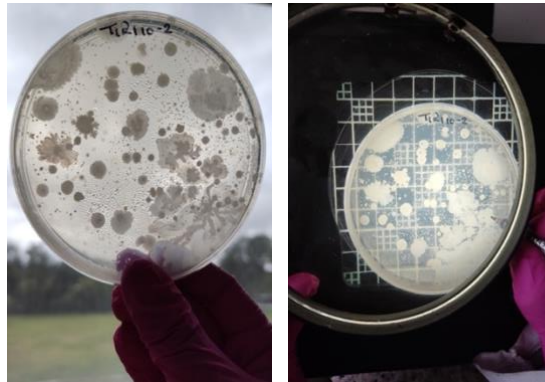
6. Realizar disoluciones seriadas. (9 ml agua destilada y 1ml de solución madre).





**Figura 2**

*Diagrama de actividades realizadas para el aislamiento y cuantificación de unidades formadoras de colonia por gramo de suelo.*



**Figura 3**

*Diagrama del conteo de las UFC. g<sup>-1</sup> de suelo.*









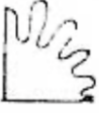

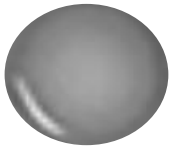
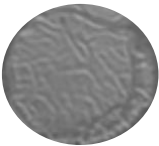



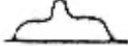
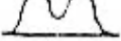

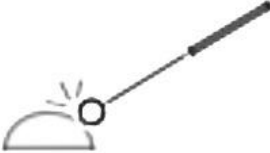
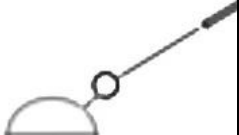
### **2.8.2.3. Identificación cultural de las colonias bacterianas fijadoras de nitrógeno.**




Conocer la morfología de una colonia que crece en la superficie de un cultivo sólido puede ser una herramienta elemental en la descripción e identificación de las bacterias. La caracterización cultural se determinó observando la forma, el margen, la textura, superficie, consistencia, brillo y color, siguiendo las pautas establecidas por Breakwell et al. (2007).



**Tabla 6**

*Características culturales las colonias.*

<b>FORMA</b>	<b>Circular</b>	<b>Fusiforme</b>	<b>Rizoide</b>	<b>Filamento sa</b>	<b>Irregular</b>
					
<b>MARGEN</b>	<b>Entero</b>	<b>Filamentos o</b>	<b>Ondulado</b>	<b>Lobulado</b>	<b>Rizado</b>
					
<b>TEXTURA</b>	<b>Lisa</b>			<b>Rugosa</b>	
					
<b>SUPERFICIE</b>	<b>Plana</b>	<b>Convexa</b>	<b>Elevada</b>	<b>Umbilifo rme</b>	<b>Umbilicada</b>
					
<b>CONSISTENCIA</b>	<b>Suave</b>		<b>Dura</b>		<b>Mucoide</b>
					

<b>BRILLO</b>	<b>Brillante</b>	<b>Sin brillo</b>
		
<b>COLOR</b>	Algunas bacterias producen pigmento cuando crecen en el medio. El color de la colonia se clasificó en base a un código de color HTML.	

#### 2.8.2.4. Identificación de la morfología de las bacterias fijadoras de nitrógeno.

La identificación morfológica y agrupación de las bacterias aisladas se determinó mediante una de las tinciones diferenciales más empleadas en bacteriología conocida como tinción de Gram, basada en la técnica aplicada por Saenz (1997). Mientras la reacción de Gram de la combinación de distintos colorantes, solución mordiente y un disolvente diferenciador sobre las bacterias dependerá de la composición química de sus paredes celulares. Las bacterias utilizadas para tinción de Gram deben ser de cultivos jóvenes en los que las células se encuentren en fase de crecimiento exponencial (12 a 24 horas de incubación).



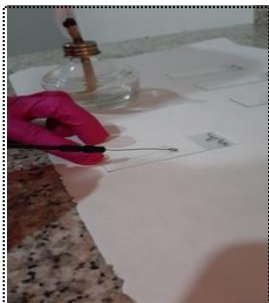
1. Rotular cada portaobjetos con el código del aislado bacteriano.



2. Colocar una gota de agua destilada en el portaobjetos.



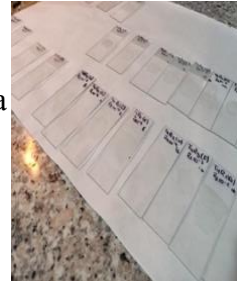
3. Con un asa previamente esterilizada tomar colonias de un cultivo puro.



4. Con movimientos en zigzag esparcir la bacteria en la placa con la gota de agua.



5. Secar la muestra con ayuda del calor del mechero.



6. Colocar una gota de cristal violeta durante 60 segundos y enjuagamos con abundante agua.



7. Aplicar lugol 60 segundos y enjuagamos nuevamente con agua destilada.

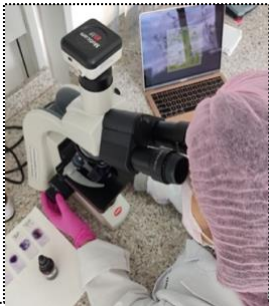


8. Colocar alcohol acetona durante 20 segundos y enjuagamos con agua.





9. Finalmente, colocar 60 segundos safranina, enjuagamos y dejamos secar.

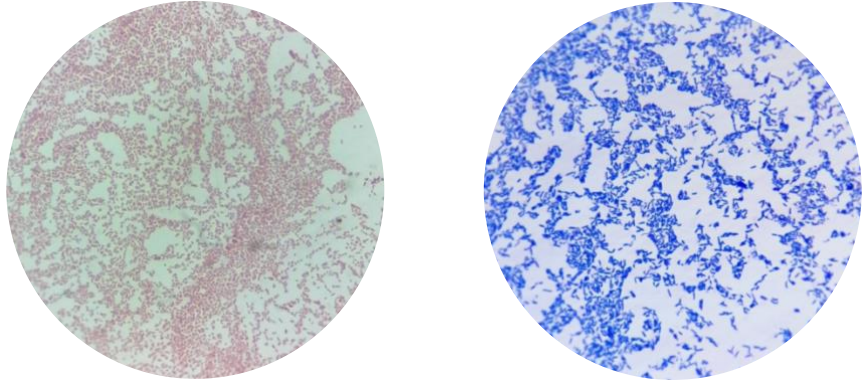



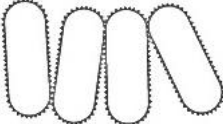


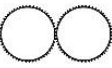
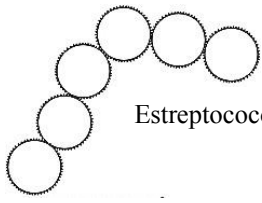
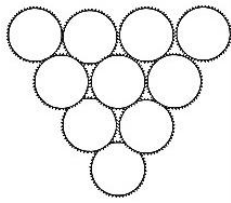




10. Observar el microscopio, colocando una gota de aceite de inmersión en el microscopio para observar al objetivo 100x.



#### Figura 4

*Diagrama de las actividades realizadas para la identificación morfológica y agrupación de los aislados bacterianos.*

REACCIÓN DE GRAM			
			
<p style="text-align: center;">Gram (-) <span style="margin-left: 200px;">Gram (+)</span></p>			
FORMA	AGRUPACIÓN		
<b>Bacilos</b>	 <p>Cocobacilo</p>	 <p>Bacilo</p>	 <p>Diplobacilo</p>
	 <p>Empalizada</p>	 <p>Estreptobacilo</p>	
<b>Cocos</b>	 <p>Coco</p>	 <p>Diplococo</p>	 <p>Estreptococo</p>
	 <p>Estafilococo</p>	 <p>Sarcina</p>	 <p>Tétrada</p>

**Figura 5**

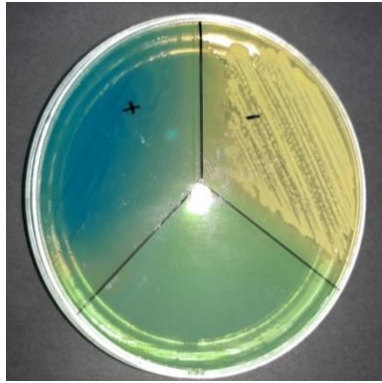
*Reacción de Gram, morfología y agrupación de los aislados bacterianos.*

#### **2.8.2.5. Evaluación del potencial de fijación de nitrógeno atmosférico**

La capacidad de fijación de nitrógeno de las cepas aisladas de la rizosfera de *Solanum tuberosum* L. Var. Superchola se determinó utilizando placas de Petri con medio selectivo libre de nitrógeno Jensen modificado con una solución indicadora de pH (composición: sacarosa 20,0 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,0 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0,5g/L , NaCl 0,5g/L, Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1g/L, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,005 g/L, CaCO<sub>3</sub> 2,0 g/L, agar 15,0 g/L) y se le agregó 5 ml/L de azul de Bromotimol como indicador de color.

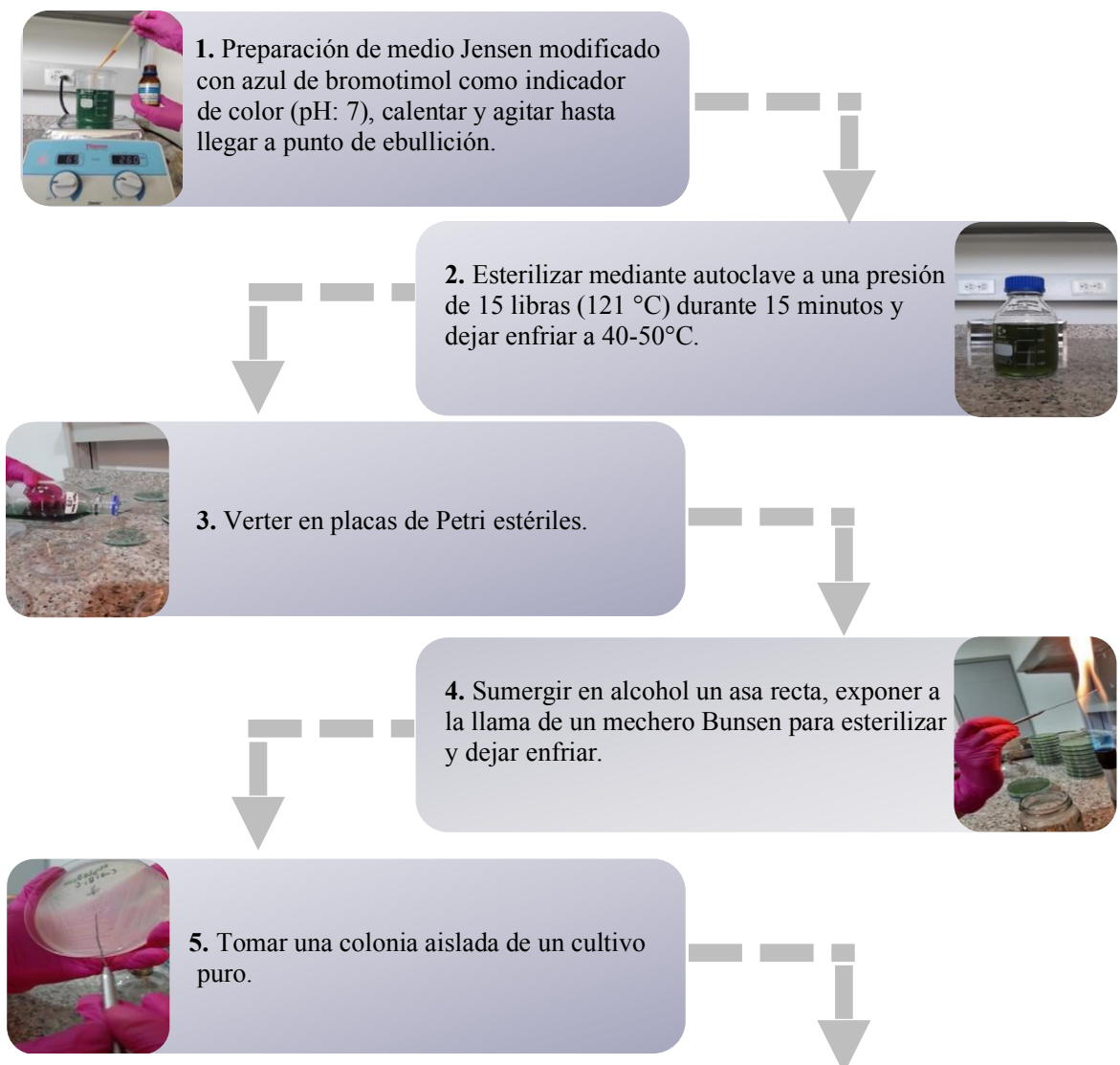
- a)** Como prueba preliminar cada uno de los aislados se sembró por agotamiento en estría en la superficie del medio y se incubaron durante 8 días a 30 °C (Figura 6).
- b)** Se seleccionó los morfotipos que fueron capaces de crecer en el medio, indicando la presencia de aquellas bacterias que poseen el sistema enzimático que les permite reducir el nitrógeno atmosférico y utilizarlo en su metabolismo con la finalidad de determinar si las cepas empleadas en este estudio eran capaces de crecer en medio libre de nitrógeno y fijar el nitrógeno atmosférico. Esta técnica desarrollada por Sulistiyani y Meliah (2017) permitirá determinar la capacidad fijadora de N<sub>2</sub>.
- c)** Una vez que la bacteria sea capaz de crecer en el medio su color cambió de azul verdoso (sin actividad de fijación de nitrógeno) a azul oscuro, indicando que el microorganismo es capaz de fijar el nitrógeno. Si el medio se vuelve amarillo es negativo. Los cambios se darán por la producción de amonio durante la fijación de nitrógeno. El amonio es una base débil que cambia el pH del medio. La alcalinización del medio de cultivo se observa al adicionar un indicador de azul de Bromotimol (Kaziūnienė et al., 2022).
- d)** Al obtener cepas puras y colonias separadas con un asa recta o en punta se tomó una colonia y se inoculó por medio de una ligera punción el medio modificado con azul de bromotimol, este proceso se realizó 5 veces en la misma placa. El crecimiento de un halo azul dentro del medio indicó el potencial la fijación de nitrógeno, según Habib et al. (2016). El diámetro de halo se determinará con ayuda del vernier o también conocido como pie de rey.



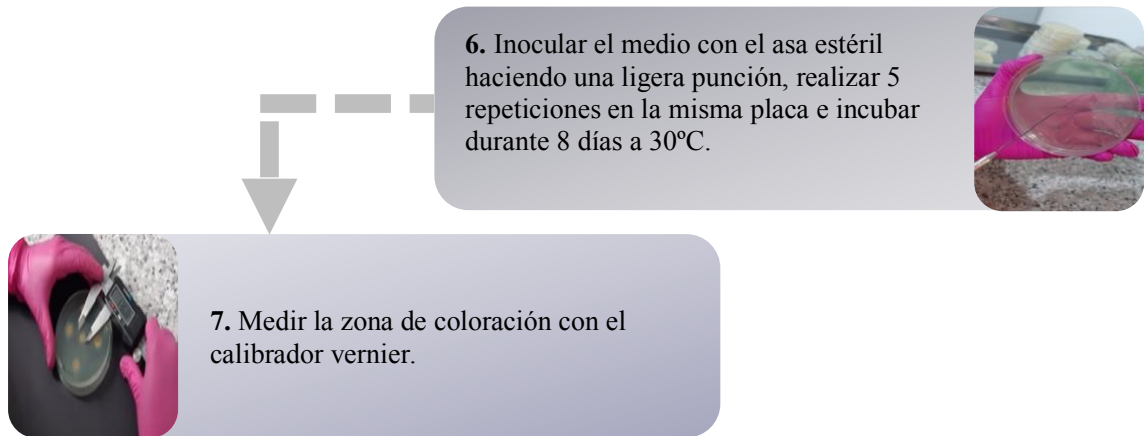
	(+) Coloración azul: positivo para fijación de nitrógeno
	(-) Coloración amarilla: negativo para fijación de nitrógeno
	Medio color verde sin inoculación

**Figura 6**

*Prueba preliminar para la selección de bacterias fijadoras de nitrógeno.*







**Figura 7**

*Diagrama de actividades realizadas para evaluar el potencial de fijación de nitrógeno atmosférico.*

#### **2.8.2.6. Criopreservación de los aislados bacterianos con capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico de los cuatro cantones de la provincia de Tungurahua.**

Para la criopreservación de los aislados bacterianos con capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico se emplea 2 metodologías de preservación por congelación. Este procedimiento nos permite mantener la viabilidad y estabilidad genética de los aislados, garantizando su disponibilidad en futuras investigaciones y que se puedan aplicar para desarrollar biofertilizantes a base de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico. La primera metodología reportada por García y Uruburu (2000), donde las cepas puras se depositan en un tubo eppendorf estéril utilizando como agente crioprotector el glicerol al 15%, este es un crioprotector penetrante no iónico de bajo peso molecular que permite el acceso a través de la membrana celular, disminuyendo así la cantidad de hielo producido e impidiendo el aumento de la concentración de iones.

La segunda metodología que se utilizó es la técnica estandarizada por Naranjo y Ortiz (2018) en donde se utilizó como medio nutritivo Caldo Cerebro Corazón (BHI) el cual se recomienda como medio base ya que en este se desarrollan una amplia gama de

microorganismos y se adicionó glicerol al 20%, con el fin de evitar que se formen cristales de hielo durante la congelación.



1. Dispensar 1ml de glicerol al 15% en los tubos eppendorf estériles de 2ml de capacidad.

2. Dispensar 1ml de BHI + glicerol al 20% en los tubos eppendorf estériles de 2ml de capacidad.



3. Etiquetar cada tubo con la cepa que se va a conservar.



4. Tomar todo el contenido de cada placa con la cepa pura con un asa estéril.



5. Depositar la cepa en el tubo con glicerol al 15% y BHI + glicerol al 20%.



6. Agitar en vortex.



7. Congelar el lote de tubos al interior de cajas criogénicas de policarbonato a  $-20^{\circ}\text{C}$ .



### Figura 8

*Diagrama de actividades realizadas para la conservación los aislados bacterianos con capacidad de fijación de nitrógeno en glicerol al 15% y BHI + glicerol al 20% a  $-20^{\circ}\text{C}$ .*

### 2.9. Variables Respuesta

**Caracterización de las colonias bacterianas: color, elevación, bordes de las colonias y pigmentación o brillo.**

Por medio de un estereoscopio se identificó las características culturales de las colonias bacterianas: forma, margen, textura, superficie, consistencia, brillo y color de las colonias con base en imágenes (Tabla 6).

### **Reacción de Gram (Gram+ o Gram-).**

Mediante tinción de Gram se determinó la Reacción de Gram (Gram+ o Gram-) de las bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico de los tratamientos.

### **Morfología de las bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico.**

Esta variable se determinó tras tinción de Gram, con ayuda de un microscopio se identificó la morfología de las bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico aisladas a partir de la rizosfera de plantas de papa.

### **Agrupación de las bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico aisladas a partir de las raíces de plantas de papa.**

Para determinar esta variable, tras la tinción de Gram se identificó la agrupación de las bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico de los tratamientos.

### **Capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico de bacterias asociadas a raíces de plantas de papa.**

Esta variable se determinó mediante la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>) in vitro de las bacterias por medio de un ensayo semicuantitativo de los aislados a partir de la rizosfera de las plantas de *Solanum tuberosum* L. Var. Superchola, una vez obtenidos los cultivos puros, se obtendrá una colonia y se sembrará en un medio selectivo libre de nitrógeno y azul de bromotimol (BTB) como indicador de color, de manera que los aislados que crezcan en ausencia de nitrógeno poseen la capacidad para fijar nitrógeno ya que remplazan la metabolización de nitrógeno por N<sub>2</sub> que se encierre en el microambiente de la placa de Petri. Mientras que los aislados con un crecimiento nulo o se tornen de color amarillo demuestran que metabólicamente no poseen la capacidad de fijar N<sub>2</sub> y serán descartadas como posibles fijadores de Nitrógeno. La zona de coloración alrededor de las colonias indica el potencial de fijación de nitrógeno de los aislados. El potencial de fijación se calculó restando el diámetro de la colonia del diámetro de la zona de coloración.

### **2.10. Procesamiento de la información**

Los datos registrados fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS versión 26.0. Por lo tanto, se analizaron los criterios de distribución normal mediante la prueba de Shapiro-Wilk y para determinar la homogeneidad de varianza se utilizó la prueba de Levene. Para aquellas variables cuyos datos cumplieron con ambos requerimientos se realizó un ANOVA de clasificación simple. Para separar las medias se utilizó la prueba de Scheffe. Para las variables cuyos datos no cumplieron con los requerimientos de normalidad y homogeneidad de varianza, se utilizó la prueba de Kruskal Wallis completada con la prueba de U Mann Whitney. Para un nivel de significación de un 95 %.

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### **3.1. Aislamiento y cuantificación de rizobacterias de *S. tuberosum* L. Var. Superchola cultivadas en distintas muestras de suelo**

##### **3.1.1. Influencia de suelos de cuatro localidades de la provincia de Tungurahua sobre la cantidad de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo cultivables de plantas de *S. tuberosum* L.**

De acuerdo al factor influencia de suelos de distintas localidades sobre el número de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo rizosférico en un período de incubación de 72 horas en medio Jensen. La localidad Santa Rita del cantón Pillaro es significativamente diferente al resto de localidades puesto que, se encontró una mayor densidad poblacional de bacterias en la muestra de suelo a comparación de la muestra que tuvo menor densidad poblacional correspondiente al tratamiento control que no tuvo diferencia estadísticamente significativa a las localidades de los cantones Quero, Ambato y Mocha.

**Tabla 7**

*Comparación de la cantidad de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo rizosférico de distintas localidades de la provincia de Tungurahua utilizando medio Jensen libre de nitrógeno.*

<b>Localidades</b>	<b>UFC.g<sup>-1</sup> de suelo</b>	<b>Rango</b>
Muestra de suelo proveniente de El Placer, cantón Quero.	5,46 x 10 <sup>6</sup>	B
Muestra de suelo proveniente de San Martín, cantón Mocha.	1,99 x 10 <sup>6</sup>	B
Muestra de suelo proveniente de El Salado, cantón Ambato.	4,92 x 10 <sup>6</sup>	B
Muestra de suelo proveniente de Santa Rita, cantón Píllaro.	9,08 x 10 <sup>9</sup>	A
Muestra de raíces sin presencia de suelo.	9,52 x 10 <sup>5</sup>	B

**Nota:** Tratamientos con letras no comunes en una misma columna, difieren estadísticamente según la prueba de Scheffé para  $p > 0.05$ .

Calvo et al. (2008) manifestaron que el número de unidades formadoras de colonias viables en suelos rizosféricos de papa es influenciado por varios factores, entre ellos; la vegetación, pH del suelo, la textura del suelo, contenido de humedad del suelo, tipo de laboreo, fertilización edáfica, temperatura y altitud. Por su parte Rasche et al. (2006) consideran que la densidad poblacional de bacterias de la rizosfera de la papa está condicionada principalmente por distintos factores bióticos y abióticos, tales como la fase fenológica de la planta, la variedad de la planta y las condiciones ambientales de la zona.

### **3.2. Identificación de la morfología y colonias de los aislados bacterianos obtenidos.**

#### **3.2.1. Identificación morfológica y cultural de colonias de los aislados bacterianos obtenidos del sector El Placer, cantón Quero.**

En la presente investigación se logró identificar un total de 5 aislados de la rizosfera de *S. tuberosum* L. Var. Superchola con capacidad de fijar nitrógeno en el sector El Placer del cantón Quero en medio de cultivo Jensen. Las características morfológicas y culturales se observaron después de la incubación a 30 °C durante 8 días. Las colonias presentaron diferentes características las cuales se detallan en la Tabla 8.

De los 5 aislados bacterianos con capacidad de fijación de N, en las características culturales por su forma el 60% fueron irregulares, 20% circulares y el 20% fusiformes. Por su margen el 40% fueron enteros, 40% rizados y el 20% lobulados. Por su textura el 60% fueron lisas y el 40% rugosas. Por su superficie el 20% fueron planas, 20% convexas, 20% elevadas, 20% umbiliformes y el 20% umbilicadas. Por su consistencia el 60% fueron suaves y el 40% mucoides. Por su brillo el 80% fueron brillantes y el 20% sin brillo.

Con respecto a las características morfológicas por la reacción de Gram el 80% fueron Gram (-) y el 20% Gram (+). Por morfología bacteriana el 80% fueron bacilos y el 20% cocos. Por su agrupación el 40% fueron diplobacilos, 20% cocobacilos y el 20% empalizadas.



**Tabla 8**

*Caracterización de los aislados bacterianos del sector el Placer del cantón Quero en medio Jensen.*

Aislados de BFN	Características culturales							Características morfológicas		
	Forma	Margen	Textura	Superficie	Consistencia	Brillo	Código de color HTML	Reacción de Gram	Morfología bacteriana	Agrupación
<b>T1-FCAGP-BFN1</b>	IRR	LB	LS	PL	SV	Br	#e6ee9c	(-)	B	DB
<b>T1-FCAGP-BFN2</b>	IRR	RI	RG	EL	SV	Br	#d4e157	(-)	B	CB
<b>T1-FCAGP-BFN3</b>	IRR	RI	LS	CN	MC	Br	#cddc39	(+)	C	SRC
<b>T1-FCAGP-BFN4</b>	CR	EN	RG	UMF	MC	Sb	#c5e1a5	(-)	B	DB
<b>T1-FCAGP-BFN5</b>	FS	EN	LS	UMC	SV	Br	#f0f4c3	(-)	B	EMP

**Descripción:** Forma: Circular (CR), Fusiforme (FS), Rizoide (RZ), Filamentosa (FL), Irregular (IRR). Margen: Entero (EN), Filamentoso (FM), Ondulado (ON), Lobulado (LB), Rizado (RI). Textura: Lisa (LS), Rugosa (RG). Superficie: Plano (PL), Convexa (CN), Elevada (EL), Umbiliforme (UMF), Umbilicada (UMC). Consistencia: Suave (SV), Duro (DR), Mucoide (MC), Brillo: con brillo (Br), sin brillo (Sb). Morfología bacteriana: Bacilos (B), Cocos (C). Agrupación: Cocobacilo (CB), Bacilo (b), Empalizada (EMP), Estreptobacilo (ES), Diplobacilo (DB), Coco (c), Diplococo (DC), Estreptococo (ESC), Sarcina (SRC), Tetrada (TTR).

### **3.2.2. Identificación morfológica y cultural de las colonias de los aislados bacterianos obtenidos del sector San Martín, cantón Mocha.**

En la presente investigación se logró identificar un total de 6 aislados de la rizosfera de *S. tuberosum* L. Var. Superchola con capacidad de fijar nitrógeno en el sector San Martín del cantón Mocha en medio de cultivo Jensen. Las características morfológicas y culturales se observaron después de la incubación a 30 °C durante 8 días. Las colonias presentaron diferentes características las cuales se detallan en la Tabla 9.

De los 6 aislados bacterianos con capacidad de fijación de N, en las características culturales por su forma el 50% fusiformes, 33% irregulares y el 17% circulares. Por su margen el 67% fueron enteros y el 33% lobulados. Por su textura el 100% fueron lisas. Por su superficie el 33% fueron planas, 33% convexas, 17% elevadas y el 17%

umbilicadas. Por su consistencia el 83% fueron suaves y el 17% mucoides. Por su brillo el 100% fueron brillantes.

Con respecto a las características morfológicas por la reacción de Gram el 100% fueron Gram (-). Por morfología bacteriana el 100% fueron bacilos. Por su agrupación el 50% fueron diplobacilos, 33% empalizadas, y el 17% sin agrupación.

**Tabla 9**

*Caracterización de los aislados bacterianos del sector San Martín del cantón Mocha en medio Jensen.*

Aislados de BFN	Características culturales							Características morfológicas		
	Forma	Margen	Textura	Superficie	Consistencia	Brillo	Código de color HTML	Reacción de Gram	Morfología bacteriana	Agrupación
<b>T2-FCAGP-BFN6</b>	FS	EN	LS	CN	MC	Br	#c5e1a5	(-)	B	DB
<b>T2-FCAGP-BFN7</b>	FS	EN	LS	CN	SV	Br	#f5f5f5	(-)	B	DB
<b>T2-FCAGP-BFN8</b>	IRR	LB	LS	EL	SV	Br	#f0f4c3	(-)	B	EMP
<b>T2-FCAGP-BFN9</b>	FS	EN	LS	UMC	SV	Br	#f9fbe7	(-)	B	DB
<b>T2-FCAGP-BFN10</b>	IRR	LB	LS	PL	SV	Br	#f9fbe7	(-)	B	b
<b>T2-FCAGP-BFN11</b>	CR	EN	LS	PL	SV	Br	#c5e1a5	(-)	B	EMP

**Descripción:** Forma: Circular (CR), Fusiforme (FS), Rizoide (RZ), Filamentosa (FL), Irregular (IRR). Margen: Entero (EN), Filamentoso (FM), Ondulado (ON), Lobulado (LB), Rizado (RI). Textura: Lisa (LS), Rugosa (RG). Superficie: Plano (PL), Convexa (CN), Elevada (EL), Umbiliforme (UMF), Umbilicada (UMC). Consistencia: Suave (SV), Duro (DR), Mucoides (MC), Brillo: con brillo (Br), sin brillo (Sb). Morfología bacteriana: Bacilos (B), Cocos (C). Agrupación: Cocobacilo (CB), Bacilo (b), Empalizada (EMP), Estreptobacilo (ES), Diplobacilo (DB), Coco (c), Diplococo (DC), Estreptococo (ESC), Sarcina (SRC), Tetrada (TTR).

### **3.2.3. Identificación morfológica y cultural de las colonias de los aislados bacterianos obtenidos del sector El Salado, cantón Ambato.**

En la presente investigación se logró identificar un total de 11 aislados de la rizosfera de *S. tuberosum* L. Var. Superchola con capacidad de fijar nitrógeno en el sector El Salado del cantón Ambato en medio de cultivo Jensen. Las características morfológicas y culturales se observaron después de la incubación a 30 °C durante 8 días. Las colonias presentaron diferentes características las cuales se detallan en la Tabla 10.

De los 11 aislados bacterianos con capacidad de fijación de N, en las características culturales por su forma el 55% fueron circulares, 36% fusiformes y el 9% irregulares. Por su margen el 91% fueron enteros y el 9% lobulados. Por su textura el 100% fueron lisas. Por su superficie el 64% fueron planas, 27% convexas, 9% elevadas y el 9% umbilicadas. Por su consistencia el 82% fueron suaves y el 18% duras. Por su brillo el 100% fueron brillantes.

Con respecto a las características morfológicas por la reacción de Gram el 82% fueron Gram (-) y el 18% Gram (+). Por morfología bacteriana el 100% fueron bacilos. Por su agrupación el 55% fueron estreptobacilos, 27% diplobacilos, 9% empalizadas y el 9% sin agrupación.

**Tabla 10**

*Caracterización de los aislados bacterianos del sector El Salado del cantón Ambato en medio Jensen.*

Aislados de BFN	Características culturales							Características morfológicas		
	Forma	Margen	Textura	Superficie	Consistencia	Brillo	Código de color HTML	Reacción de Gram	Morfología bacteriana	Agrupación
<b>T3-FCAGP-BFN12</b>	FS	EN	LS	CN	DR	Br	#afb42b	(-)	B	EMP
<b>T3-FCAGP-BFN13</b>	CR	EN	LS	PL	SV	Br	#d4e157	(-)	B	ES
<b>T3-FCAGP-BFN14</b>	CR	EN	LS	PL	SV	Br	#a5d6a7	(-)	B	DB
<b>T3-FCAGP-BFN15</b>	FS	EN	LS	CN	SV	Br	#fff8e1	(-)	B	ES
<b>T3-FCAGP-BFN16</b>	CR	EN	LS	PL	SV	Br	#f9fbe7	(-)	B	ES
<b>T3-FCAGP-BFN17</b>	FS	EN	LS	PL	SV	Br	#9ccc65	(-)	B	ES
<b>T3-FCAGP-BFN18</b>	CR	EN	LS	PL	SV	Br	#efebe9	(-)	B	ES
<b>T3-FCAGP-BFN19</b>	CR	EN	LS	UMC	SV	Br	#a5d6a7	(-)	B	DB
<b>T3-FCAGP-BFN20</b>	CR	EN	LS	PL	SV	Br	#fff8E1	(-)	B	b
<b>T3-FCAGP-BFN21</b>	FS	EN	LS	PL	DR	Br	#fafafa	(+)	B	ES
<b>T3-FCAGP-BFN22</b>	IRR	LB	LS	EL	SV	Br	#bcaaa4	(+)	B	DB

**Descripción:** Forma: Circular (CR), Fusiforme (FS), Rizoide (RZ), Filamentosa (FL), Irregular (IRR). Margen: Entero (EN), Filamentoso (FM), Ondulado (ON), Lobulado (LB), Rizado (RI). Textura: Lisa (LS), Rugosa (RG). Superficie: Plano (PL), Convexa (CN), Elevada (EL), Umbiliforme (UMF), Umbilicada (UMC). Consistencia: Suave (SV), Duro (DR), Mucoide (MC), Brillo: con brillo (Br), sin brillo (Sb). Morfología bacteriana: Bacilos (B), Cocos (C). Agrupación: Cocobacilo (CB), Bacilo (b), Empalizada (EMP), Estreptobacilo (ES), Diplobacilo (DB), Coco (c), Diplococo (DC), Estreptococo (ESC), Sarcina (SRC), Tetrada (TTR).

### **3.2.4. Identificación morfológica y cultural de las colonias de los aislados bacterianos obtenidos del sector Santa Rita, cantón Pillaro.**

En la presente investigación se logró identificar un total de 13 aislados de la rizosfera de *S. tuberosum* L. Var. Superchola con capacidad de fijar nitrógeno en el sector Santa Rita del cantón Pillaro en medio de cultivo Jensen. Las características morfológicas y

culturales se observaron después de la incubación a 30 °C durante 8 días. Las colonias presentaron diferentes características las cuales se detallan en la Tabla 11.

De los 13 aislados bacterianos con capacidad de fijación de N, en las características culturales por su forma el 54% fueron fusiformes, y el 46% circulares. Por su margen el 100% fueron enteros. Por su textura el 77% fueron lisas y el 23% rugosas. Por su superficie el 38% fueron planas, 31% convexas, 23% elevadas, y el 8% umbilicadas. Por su consistencia el 85% fueron suaves, 8% duras y el 8% mucoides. Por su brillo el 92% fueron brillantes y el 8% sin brillo.

Con respecto a las características morfológicas por la reacción de Gram el 77% fueron Gram (-) y el 23% Gram (+). Por morfología bacteriana el 92% fueron bacilos y el 8% cocos. Por su agrupación el 38% fueron diplobacilos, 31% estreptobacilos, 8% empalizadas, 8% diplococos y el 15% sin agrupación.

**Tabla 11**

*Caracterización de los aislados bacterianos del sector Santa Rita del cantón Pillaro en medio Jensen.*

Aislados de BFN	Características culturales							Características morfológicas		
	Forma	Margen	Textura	Superficie	Consistencia	Brillo	Código de color HTML	Reacción de Gram	Morfología bacteriana	Agrupación
T4-FCAGP-BFN23	CR	EN	LS	CN	SV	Br	#f5f5f5	(-)	B	DB
T4-FCAGP-BFN24	FS	EN	RG	PL	SV	Br	#e8f5e9	(-)	B	DB
T4-FCAGP-BFN25	FS	EN	RG	EL	SV	Br	#fff8e1	(-)	B	b
T4-FCAGP-BFN26	FS	EN	LS	PL	SV	Br	#fff9c4	(-)	B	DB
T4-FCAGP-BFN27	CR	EN	LS	CN	MC	Br	#f5f5f5	(+)	B	DB
T4-FCAGP-BFN28	CR	EN	LS	PL	SV	Sb	#dbc2a9	(+)	C	c
T4-FCAGP-BFN29	CR	EN	LS	EL	SV	Br	#cddc39	(-)	B	ES
T4-FCAGP-BFN30	FS	EN	RG	CN	SV	Br	#dcedc8	(+)	B	ES
T4-FCAGP-BFN31	FS	EN	LS	CN	SV	Br	#dce775	(-)	B	ES
T4-FCAGP-BFN32	CR	EN	LS	UMC	SV	Br	#dbd069	(-)	B	EMP
T4-FCAGP-BFN33	FS	EN	LS	EL	SV	Br	#e0e0e0	(-)	B	ES
T4-FCAGP-BFN34	CR	EN	LS	PL	SV	Br	#d4e157	(-)	B	DB
T4-FCAGP-BFN35	FS	EN	LS	PL	SV	Br	#917234	(-)	B	b

**Descripción:** Forma: Circular (CR), Fusiforme (FS), Rizoide (RZ), Filamentosa (FL), Irregular (IRR). Margen: Entero (EN), Filamentoso (FM), Ondulado (ON), Lobulado (LB), Rizado (RI). Textura: Lisa (LS), Rugosa (RG). Superficie: Plano (PL), Convexa (CN), Elevada (EL), Umbiliforme (UMF), Umbilicada (UMC). Consistencia: Suave (SV), Duro (DR), Mucoide (MC), Brillo: con brillo (Br), sin brillo (Sb). Morfología bacteriana: Bacilos (B), Cocos (C). Agrupación: Cocobacilo (CB), Bacilo (b), Empalizada (EMP), Estreptobacilo (ES), Diplobacilo (DB), Coco (c), Diplococo (DC), Estreptococo (ESC), Sarcina (SRC), Tetrada (TTR).

#### **3.2.4. Identificación de la morfología y de las colonias de los aislados bacterianos obtenidos del tratamiento control.**

En la presente investigación se logró identificar un total de 3 aislados de la rizosfera de *S. tuberosum* L. Var. Superchola con capacidad de fijar nitrógeno del tratamiento control sin presencia de suelo desarrollado en el Centro de Investigaciones Agropecuarias UTA en medio de cultivo Jensen. Las características morfológicas y culturales se observaron después de la incubación a 30 °C durante 8 días. Las colonias presentaron diferentes características las cuales se detallan en la Tabla 12.

De los 3 aislados bacterianos con capacidad de fijación de N, en las características culturales por su forma el 67% circulares y el 33% fusiformes. Por su margen, el 100% fueron enteros. Por su textura el 100% fueron lisas. Por su superficie el 33% fueron planas, 33% convexas y el 33% umbilicadas. Por su consistencia el 100% fueron suaves. Por su brillo el 100% fueron brillantes.

Con respecto a las características morfológicas por la reacción de Gram el 100% fueron Gram (-). Por morfología bacteriana el 100% fueron bacilos. Por su agrupación el 33% fueron diplobacilos, 33% estreptobacilos y el 33% empalizadas.

**Tabla 12**

*Caracterización de los aislados bacterianos del tratamiento control con un sistema que no emplea el suelo para su desarrollo.*

Aislados de BFN	Características culturales							Características morfológicas		
	Forma	Margen	Textura	Superficie	Consistencia	Brillo	Código de color HTML	Reacción de Gram	Morfología bacteriana	Agrupación
<b>T5-FCAGP-BFN36</b>	CR	EN	LS	CN	SV	Br	#f9fbe7	(-)	B	DB
<b>T5-FCAGP-BFN37</b>	CR	EN	LS	PL	SV	Br	#64dd17	(-)	B	ES
<b>T5-FCAGP-BFN38</b>	FS	EN	LS	UMC	SV	Br	#e6ee9c	(-)	B	EMP

**Descripción:** Forma: Circular (CR), Fusiforme (FS), Rizoide (RZ), Filamentosa (FL), Irregular (IRR). Margen: Entero (EN), Rizoide (RZ), Filamentoso (FM), Ondulado (ON), Lobulado (LB), Rizado (RI). Textura: Lisa (LS), Rugosa (RG). Superficie: Plano (PL), Convexa, Elevada (EL), Umbiliforme (UMF), Umbilicada (UMC). Consistencia: Suave (SV), Duro (DR), Mucoide (MC), Brillo: con brillo (b), sin brillo (sb). Morfología bacteriana: Bacilos (B), Cocos (C). Agrupación: Cocobacilo (CB), Bacilo (b), Empalizada (EMP), Estreptobacilo (ES), Diplobacilo (DB), Coco (c), Diplococo (DC), Estreptococo (ESC), Sarcina (SRC), Tetrada (TTR).


Del total de 38 bacterias aisladas con capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico se obtuvo de la localidad del Placer en el cantón Quero (Tabla 8) cinco aislados de los cuales 4 son bacilos Gram (-) y 1 coco Gram (+). De la localidad de San Martín del cantón Mocha (Tabla 9) se obtuvieron seis aislados bacilos Gram (-). De la localidad de El Salado cantón Ambato (Tabla 10) se obtuvieron once aislados de los cuales 9 son bacilos Gram (-) y 2 bacilos Gram (+). De la localidad de Santa Rita del cantón Pillaro (Tabla 11) se obtuvieron trece aislados de los cuales 10 son bacilos Gram (-), 2 bacilos Gram (+) y 1 coco Gram (-). En el tratamiento control (Tabla 12) se obtuvieron tres aislados bacilos Gram (-).

De acuerdo con lo antes expuesto Silhavy et al. (2010) señalaron que existe una gran diferencia entre las paredes celulares bacterianas Gram (+) y Gram (-). Las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa como capa externa envuelta por capas de peptidoglicano, que conservan el color violeta cristalino y se tiñen de púrpura. Por el contrario las bacterias Gram negativas poseen una capa delgada de pared celular de peptidoglicano, pero lo envuelve una membrana externa que posee lipopolisacárido,



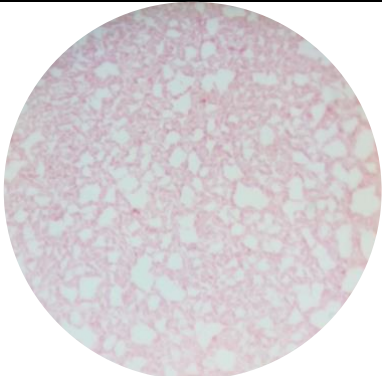
que pierde el cristal violeta y se tiñen de rojo. Por otro lado, Kennedy y de Luna (2005) indican que las bacterias que predomina en la rizosfera son las gramnegativas, coincidiendo con nuestro estudio.

En nuestro caso se puede mencionar que los aislados bacterianos de la rizosfera de la papa exhibió un amplia variedad de características culturales y morfológicas en términos de sus formas y agrupación lo que demuestra su diversidad relativa.

<b>Forma:</b>	Fusiforme	
<b>Margen:</b>	Entero	
<b>Textura:</b>	Lisa	
<b>Superficie:</b>	Umbilicada	
<b>Consistencia:</b>	Suave	
<b>Brillo:</b>	Brillante	
<b>Código de color HTML:</b>	#f0f4c3	

**Figura 9**

*Caracterización cultural de las bacterias aisladas.*

<b>Reacción de Gram:</b>	Gram (-).	
<b>Morfología bacteriana:</b>	Bacilos.	
<b>Agrupación:</b>	Estreptobacilos.	

**Figura 10**

*Caracterización morfológica de las bacterias aisladas.*

### 3.3. Determinación del potencial de fijación de nitrógeno atmosférico de estas bacterias

En la evaluación del diámetro de halo azul de los aislados bacterianos de los cuatro cantones productores de *S. tuberosum* L. Var. Superchola de la provincia de Tungurahua, de los 38 aislados bacterianos el de mayor capacidad fue el (CC-FCAGP-BFN1) del sector El Placer del cantón Quero que no tuvo diferencia estadísticamente significativa respecto a los aislados T3-FCAGP-BFN14, T3-FCAGP-BFN16 y T4-FCAGP-BFN24.

Mientras que el aislado de menor capacidad de fijación de nitrógeno fue el (T3-FCAGP-BFN15) del sector El Salado del cantón Ambato, el cual no tuvo diferencia estadísticamente significativa respecto a la cepa T4-FCAGP-BFN33, T4-FCAGP-BFN35, T1-FCAGP-BFN3, T3-FCAGP-BFN32, T2-FCAGP-BFN8 (Tabla 13).

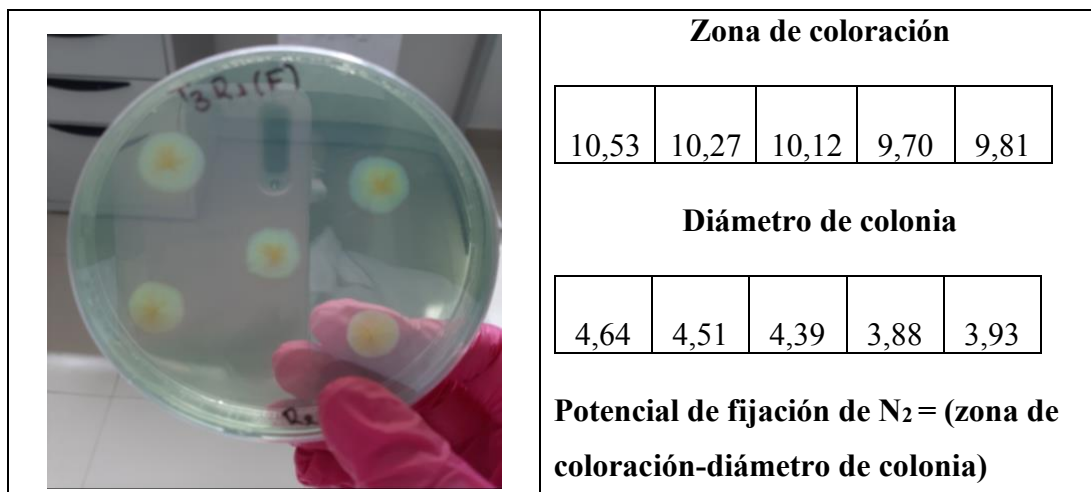
**Tabla 13**

*Comparación entre aislados bacterianos de la rizosfera de Solanum tuberosum L. Var. Superchola respecto a la capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico en el medio de cultivo Jensen modificado.*

<b>Aislados</b>	<b>Zona de coloración (mm)</b>	<b>Letras</b>
T1-FCAGP-BFN1	10,10	a
T3-FCAGP-BFN16	9,19	ab
T3-FCAGP-BFN14	9,44	ab
T4-FCAGP-BFN24	8,62	abc
T3-FCAGP-BFN21	8,10	bcd
T1-FCAGP-BFN2	7,57	bcde
T4-FCAGP-BFN23	7,70	bcde
T4-FCAGP-BFN27	6,92	cdef
TC-FCAGP-BFN36	7,02	cdef
T4-FCAGP-BFN31	7,06	cdef
T4-FCAGP-BFN25	7,11	cdef

TC-FCAGP-BFN38	6,76	cdefg
T4-FCAGP-BFN28	6,77	cdefg
TC-FCAGP-BFN37	6,72	defg
T4-FCAGP-BFN30	6,36	defgh
T2-FCAGP-BFN9	5,87	efghi
T1-FCAGP-BFN5	5,88	efghi
T2-FCAGP-BFN6	5,90	efghi
T3-FCAGP-BFN20	5,82	efghij
T3-FCAGP-BFN22	5,42	fghijk
T4-FCAGP-BFN29	5,61	ghijk
T4-FCAGP-BFN34	4,89	ghijkl
T3-FCAGP-BFN18	4,97	ghijkl
T3-FCAGP-BFN19	4,73	hijklm
T4-FCAGP-BFN26	4,74	hijklm
T2-FCAGP-BFN7	4,40	ijklm
T2-FCAGP-BFN11	3,96	jklmn
T1-FCAGP-BFN4	3,96	jklmn
T3-FCAGP-BFN12	3,79	klmn
T3-FCAGP-BFN17	3,85	klmn
T3-FCAGP-BFN13	3,47	lmn
T2-FCAGP-BFN10	3,34	lmnñ
T2-FCAGP-BFN8	3,14	lmnño
T4-FCAGP-BFN32	2,91	mnño
T4-FCAGP-BFN35	2,36	nño
T1-FCAGP-BFN3	2,47	nño
T4-FCAGP-BFN33	1,51	ño
T3-FCAGP-BFN15	1,44	o

**Nota:** Tratamientos con letras no comunes en una misma columna, difieren estadísticamente según la prueba de Scheffe para  $p > 0.05$ .



**Figura 11**

*Zona de coloración de aislados bacterianos.*

Sulistiyani y Meliah (2017) indicaron que las bacterias que lograron crecer en el medio de Jensen poseen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y el cambio de color del medio modificado con azul de bromotimol de verde a azul o la aparición de una zona de coloración alrededor de las colonias por la producción de amonio (alcalinización del medio), medida del potencial nitro fijador que poseen los aislados. En su investigación Gothwal et al. (2008) evaluaron aislados bacterianos rizosféricos con capacidad de fijación de nitrógeno en medio de malato libre de nitrógeno con azul de bromotimol, donde el halo de color azul evidencia el potencial nitro fijador de las bacterias el aislado con mayor diámetro fue de aproximadamente 22 mm y el de menor diámetro fue de 4 mm. Este estudio es probablemente el único estudio que informó de los diámetros de las zonas de coloración azul. Por el contrario, en este estudio se obtuvieron aislados rizosféricos con un tamaño no mayor a 10,10 mm en un medio de cultivo con una composición diferente, cuya fuente de energía fue la sacarosa.

Por otro lado, Cakmakci et al. (2006) manifestaron que las bacterias asociadas a la rizosfera son cruciales para la asimilación de nutrientes y la reducción del uso de fertilizantes en la agricultura intensiva, ya que el nitrógeno es vital para el crecimiento y desarrollo de las plantas.

## CAPÍTULO IV

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1. Conclusiones

1. Al término de la presente investigación se obtuvieron 38 aislados bacterianos fijadores de nitrógeno de vida libre a partir de la rizosfera de *S. tuberosum* L. Var. Superchola de cuatro localidades pertenecientes a la provincia de Tungurahua.
2. En la caracterización morfológica de los aislados obtenidos predominaron en un 84% las bacterias Gram (-) y 95% fueron bacilos.
3. La colonias de los aislados bacterianos, mostraron características culturales en donde predominaron en un 42% la forma circular, 84% margen entero, 87% textura lisa, 42% superficie plana, 82% consistencia suave y el 95% presentaron brillo.
4. De los 38 aislados bacterianos con capacidad de fijación de nitrógeno obtenidos el que mayor potencial nitro fijador tuvo fue el T1-FCAGP-BFN1 y el de menor potencial fue el aislado T3- FCAGP-BFN15.

## 4.2. Recomendaciones

1. Desarrollar un protocolo estandarizado que describa detalladamente las actividades realizadas en el laboratorio durante la investigación de manera que se pueda ejecutar de forma eficaz en procesos futuros.
2. Identificar molecularmente las rizobacterias aisladas mediante el análisis de secuenciación del ADNr 16S y llevar a cabo una mayor amplificación de PCR del gen *NifH* para confirmar el potencial de fijación nitrógeno de los aislados bacterianos.
3. Realizar el ensayo de reducción de acetileno (ARA) para cuantificar la fijación de nitrógeno debido a que es un métodos sencillo, rápido y altamente sensible a pesar de su alto costo.
4. Evaluar muestras de la rizosfera de otros cultivos de importancia agrícola para la obtención de aislados bacterianos fijadores de nitrógeno atmosférico.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acurio, R., Mamarandi, J., Ojeda, A., Tenorio, E., Chiluisa, V., y Vaca, I. (2020). Evaluación de *Bacillus* spp. como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) en brocoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) y lechuga (*Lactuca sativa*). *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 21(3), e1465. <https://revistacta.agrosavia.co/index.php/revista/article/view/1465/721>
- Aguirre, J., Irizar, M., Durán, A., Grajeda, O., Peña, M., Loredo, C., y Gutiérrez, B. (2009). Los biofertilizantes microbianos: alternativa para la agricultura en México. INIFAP. Campo Experimental Rosario Izapa, Tuxtla Chico. Chiapas, México. Folleto técnico (5). <https://www.compucampo.com/tecnicos/biofertilizantesmicrobianos-mex.pdf>
- Aksoy, E., Demirel, U., Bakhsh, A., Zia, M., Naeem, M., Saeed, F., y Çalışkan, M. E. (2021). Recent Advances in Potato (*Solanum tuberosum* L.) Breeding. In: Al Khayri, J., Jain, S., Johnson, D. (eds) *Advances in Plant Breeding Strategies: Vegetable Crops*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-66965-2\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-66965-2_10)
- Anjum, R., Sneha, S., Raghu, N., Gopenath, T., Murugesan, K., Ashok, G., Chandrashekrappa, G., y Kanthesh, M. (2018). *Solanum tuberosum* L: Botanical, Phytochemical, Pharmacological and Nutritional Significance. *International journal of phytomedicine*, 10(3), 115. <https://core.ac.uk/reader/275977930>
- Ariza Rodríguez, S., González Murillo, O., y López Sánchez, J. (2020). Evaluación de fijadores biológicos de nitrógeno libres sobre el crecimiento de gramíneas en suelo degradado. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 22(1). <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/78019/pdf>
- Bajsa, N., Morel, M., Braña, V., y Castro, S. (2013). The effect of agricultural practices on resident soil microbial communities: focus on biocontrol and biofertilization. *Molecular microbial ecology of the rhizosphere*, 1, 687-700. <https://doi.org/10.1002/9781118297674.ch65>
- Bradeen, J., y Kole, C. (2011) Introduction to potato. In: Bradeen JM, Kole C (eds) *Genetics, genomics and breeding of potato*. CRC Press, Boca Raton.

- Breakwell, D., Woolverton, C., MacDonald, B., Woolverton, C., Smith, K., y Robison, R. (2007). Colony morphology protocol. American Society for Microbiology. <https://asm.org/ASM/media/Protocol-Images/Colony-Morphology-Protocol.pdf?ext=.pdf>
- Cahuana, R., Barreda, W. L., Roldán, A., y Holguín, V. (2020). Manual de producción de tubérculos semilla de buena calidad de papa. <https://hdl.handle.net/20.500.12955/1121>
- Cakmakci, R., Dönmez, F., Aydın, A., y Sahin, F. 2006. Growth promotion of plants by plantgrowth promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. Soil Biol. And Bioch. J. 38. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S003807170500338X?via%3Dihub>
- Calvo, P., Reymundo, L., y Zúñiga, D. (2008). Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. Ecología Aplicada, 7. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-22162008000100017&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-22162008000100017&lng=es&tlng=es).
- Chávez, I. F., Zelaya, L. X., Cruz, C. I., Rojas, E., Ruíz, S. y Santos, S. 2020. Consideraciones sobre el uso de biofertilizantes como alternativa agro-biotecnológica sostenible para la seguridad alimentaria en México. Rev. Mex. Cienc. Agríc. 11(6) <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i6.2492>
- Clavijo, C., Chipana, V., Centeno, J., Zúñiga, D., y Guillén, C. (2012). Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias diazotróficas de la rizósfera del cultivo de Olea europea" olivo" en Tacna Perú. Ecología Aplicada, 11(2). <https://revistas.lamolina.edu.pe/index.php/eau/article/view/429/421>
- Cuesta, H., Monteros, J., Racines, M., y Rivadeneira, J. (2022). Catálogo de variedades de papa del Ecuador. 2da. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5850>



- Delgado, M., Maestre, F., Reich, P., Jeffries, T., Gaitan, J., Encinar, D., y Singh, B. (2016). Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. *Nature communications*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms10541>
- Devaux, A., Kromann, P., y Ortiz, O. (2014). Potatoes for sustainable global food security. *Potato Research*, 57. <https://doi.org/10.1007/s11540-014-9265-1>
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., y Okon, Y. (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical reviews in plant sciences*, 22(2). <https://doi.org/10.1080/713610853>
- GAD Municipal de Cevallos, (2011). Plan de desarrollo y ordenamiento territorial. <https://www.cevallos.gob.ec/index.php/municipio/informacion-municipal/base-legal/category/170-plan-de-ordenamiento-y-desarrollo-territorial-pdot?download=609:pd-y-ot-cevallos>
- García, M., y Uruburu, F. (2000). La conservación de cepas microbianas. *SEM@ foro*, (30). [https://www.uv.es/cect2/87\\_Consewacion\\_cepas\\_microbianas](https://www.uv.es/cect2/87_Consewacion_cepas_microbianas)
- Giller, K. (2001). Nitrogen fixation in tropical cropping systems. CABI.
- Gothwal, R., Nigam, V., Mohan, M., Sasmal, D., y Ghosh, P. (2008) Screening of Nitrogen Fixers from Rhizospheric Bacterial Isolates Associated with Important Desert Plants. *Applied Ecology and Environmental Research*, 6. [http://dx.doi.org/10.15666/aeer/0602\\_101109](http://dx.doi.org/10.15666/aeer/0602_101109)
- Habib, S., Kausar, H., Saud, H., Ismail, M., y Othman, R. (2016). Molecular characterization of stress tolerant plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for growth enhancement of rice. *Int. J. Agric. Biol.* <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/6284547/>
- Hartmann, A., Rothballer, M., y Schmid, M. (2008). Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and soil*, 312(1). <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-007-9514-z>

- Hayatsu, M., Tago, K., y Saito, M. (2008). Various players in the nitrogen cycle: diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54(1). <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2007.00195.x>
- HiMedia Laboratories (2021). Technical data: Jensen's Medium M710. <https://www.himedialabs.com/media/TD/M710.pdf>
- Huamán, Z. (1986). Systematic botany and morphology of the potato (Vol. 6). International Potato Center
- Ibarra, A., Gándara, A., Godoy, A., Herrera, A., Díaz, A., Parra, F. y de los Santos, S. 2021. Salt-tolerant bacillus species as a promising strategy to mitigate the salinity stress in wheat (*Triticum turgidum* subsp. durum). *J. Arid Environ.* 186:104399. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2020.104399>
- Kaziūnienė, J., Mažylytė, R., Krasauskas, A., Toleikienė, M., y Gegeckas, A. (2022). Optimizing the growth conditions of the selected plant growth promoting Rhizobacteria *Paenibacillus* sp. MVY-024 for industrial scale production. *Biology*, 11(5). <https://www.mdpi.com/2079-7737/11/5/745>
- Kennedy, A., y de Luna, L. (2005). RHIZOSPHERE. *Encyclopedia of Soils in the Environment*. <https://doi.org/10.1016/B0-12-348530-4/00163-6>
- Latt, Z., Yu, S., Kyaw, E., Lynn, T., New, M., y Mon, W. (2018) Isolation, Evaluation and Characterization of Free Living Nitrogen Fixing Bacteria from Agricultural Soils in Myanmar for Biofertilizer Formulation. *Int J Plant Biol Res* 6(3). <https://www.jscimedcentral.com/public/assets/articles/plantbiology-6-1092.pdf>
- Main, G., y Franco, J. (2011). Efecto de la bacteria *Bacillus subtilis* y el hongo Micorrizico *Arbuscular Glomus fasciculatum* en la fertilización fosfórica en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* ssp. andigena). *Revista Latinoamericana de la papa*, 16(2). <http://35.196.170.157/index.php/rev-alap/article/view/181/184>

- Mayz, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista Científica UDO Agrícola*, 4(1).  
<https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/2221548.pdf>
- Moreno, A., Carda Mendoza, V., Reyes Carrillo, J. L., Vásquez Arroyo, J., y Cano Ríos, P. (2018). Plant growth promoting rhizobacteria: a biofertilization alternative for sustainable agriculture. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1).  
<http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v20n1/0123-3475-biote-20-01-68.pdf>
- Morocho, M., y Leiva, M. (2019). Microorganismos eficientes, propiedades funcionales y aplicaciones agrícolas. *Centro agrícola*, 46(2).  
<http://scielo.sld.cu/pdf/cag/v46n2/0253-5785-cag-46-02-93.pdf>
- Naranjo, J., y Ortiz, S. (2018). Estandarización de un método para la conservación de cepas del laboratorio de microbiología de la Escuela de Química de la Universidad Tecnológica de Pereira.  
<https://repositorio.utp.edu.co/server/api/core/bitstreams/3976f31b-6d92-437f-990f-dda109f4fdb9/content>
- Philippot, L., y Germon, J. (2005). Contribution of bacteria to initial input and cycling of nitrogen in soils. In F. Buscot y A. Varma (Eds.). *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. Springer. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/3-540-26609-7\\_8](https://link.springer.com/chapter/10.1007/3-540-26609-7_8)
- Pumisacho, M., y Sherwood, S. (2002). *El cultivo de la papa en Ecuador*. Editorial Abya Yala.  
[https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=QJciG\\_CWNqgC&oi=fnd&pg=PA13&dq=El+cultivo+de+la+papa+en+el+Ecuador&ots=y5G2mwwmy4j&sig=9THZfo-batr3By\\_O2PbBkoIn6M&redir\\_esc=y](https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=QJciG_CWNqgC&oi=fnd&pg=PA13&dq=El+cultivo+de+la+papa+en+el+Ecuador&ots=y5G2mwwmy4j&sig=9THZfo-batr3By_O2PbBkoIn6M&redir_esc=y)
- Pumisacho, M., y Velásquez, J. (2009). *Manual del cultivo de papa para pequeños productores*. INIAP-COSUDE.  
<https://repositorio.iniap.gob.ec/jspui/bitstream/41000/840/4/iniapscm78.pdf>

- Rasche, F., Hödl, V., Poll, C., Kandeler, E., Gerzabek, M. H., Van Elsas, J. D., y Sessitsch, A. (2006). Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared with the effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. *FEMS microbiology ecology*, 56(2). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2005.00027.x>
- Rojas, P., Cordero, J., y Cordero, W. (2021). Efecto de la fertilización nitrogenada sobre la nodulación de arveja en un suelo andisol de La Angelina, Cartago. *Repertorio Científico*, 24(2). <https://revistas.uned.ac.cr/index.php/repertorio/article/view/3888>
- Saenz, S. (1997). *Prácticas de microbiología*. Universidad de la Rioja. Servicio de publicaciones. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=100835>
- Santi, C., Bogusz, D., y Franche, C. (2013). Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of botany*, 111(5). <https://doi.org/10.1093/aob/mct048>
- Shomi, F., Uddin, M., y Zerín, T. (2021). Isolation and characterization of nitrogen fixing bacteria from soil sample in Dhaka, Bangladesh. *Stamford Journal of Microbiology*, 11(1). <https://doi.org/10.3329/sjm.v11i1.57145>
- Silhavy, T., Kahne, D., y Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>
- Stevenson, B., Eichorst, S., Wertz, J., Schmidt, T., y Breznak, J. (2004). New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Applied and environmental microbiology*, 70(8). <https://doi.org/10.1128/AEM.70.8.4748-4755.2004>

Sudamrao, S., y Prabhakarao, A. (2016). Isolation of halotolerant Plant growth promoting *Klebsiella pneumoniae* from Tuppa, Nanded, Maharashtra. *Int. J. Innov. Biol. Res.*, 5(6).

[https://www.researchgate.net/publication/303862939\\_P\\_UB\\_L\\_I\\_C\\_A\\_T\\_I\\_O\\_N\\_s\\_D\\_Sci-Edit\\_Publications\\_Isolation\\_of\\_halotolerant\\_Plant\\_growth\\_promoting\\_Klebsiella\\_pneumoniae\\_from\\_Tuppa\\_Nanded\\_Maharashtra](https://www.researchgate.net/publication/303862939_P_UB_L_I_C_A_T_I_O_N_s_D_Sci-Edit_Publications_Isolation_of_halotolerant_Plant_growth_promoting_Klebsiella_pneumoniae_from_Tuppa_Nanded_Maharashtra)

Sulistiyani, T., y Meliah, S. (2017). Isolation and characterization of nitrogen fixing endophytic bacteria associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor*). In *Proceedings The Satreps Conference* (Vol. 1, No. 1). <https://publikasikr.lipi.go.id/index.php/satreps/article/view/203/194>

Torres, R. (2009). *Incrementos de la fijación biológica del nitrógeno*. El Cid Editor.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Muestreo de suelo de la localidad de El Salado del cantón Ambato.



**Anexo 2.** Establecimiento de de los tratamientos y sus repeticiones con muestras de suelo procedentes de la localidades de El Placer del Cantón Quero, San Martín del cantón Mocha, El Salado del cantón Ambato y Santa Rita del cantón Píllaro).



