



# UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

POSGRADO

## PROGRAMA DE MAESTRÍA EN AGRONOMÍA MENCIÓN NUTRICIÓN VEGETAL

### MODALIDAD DE TITULACIÓN

Trabajo de titulación previo a la obtención del grado académico de  
Magister en Agronomía Mención Nutrición Vegetal

**Tema:** “Aislamiento, caracterización e identificación de rizobacterias de  
*Solanum tuberosum* L. Var Superchola con capacidad de solubilizar  
fosfatos.”

**Autor:** Ingeniero, Juan David Ati Tamayo

**Director:** Ingeniero, Michel Leiva Mora, Doctor en Ciencias Agrícolas.

AMBATO – ECUADOR

2024

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS/ DIRECCIÓN DE**  
**POSGRADO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN AGRONOMÍA MENCIÓN NUTRICIÓN**  
**VEGETAL**

**INFORMACIÓN GENERAL**

**TEMA:** “Aislamiento, caracterización e identificación de rizobacterias de *Solanum tuberosum* L. Var Superchola con capacidad de solubilizar fosfatos.”

**AUTOR:** Juan David Ati Tamayo

*Grado académico:* Ingeniero Agrónomo

*Correo electrónico:* jati7445@uta.edu.ec

**DIRECTOR:** Ingeniero, Michel Leiva Mora, Doctor en Ciencias Agrícolas.

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN.**

- Línea de investigación aprobada en el programa de posgrado

Microbiología y Biotecnología.

A la Unidad Académica de Titulación de la Universidad Técnica de Ambato Facultad de Ciencias Agropecuarias.

El tribunal receptor del trabajo de Investigación, presidido por el Ing. Patricio Nuñez Phd, e integrado por los señores PhD Carlos Vásquez y el Ingeniero Jorge Enrique Dobronski, Mg. designados por la Unidad de Titulación de la Universidad Técnica de Ambato, para receptar el trabajo de titulación con el Tema: “Aislamiento, caracterización e identificación de rizobacterias de *Solanum tuberosum* L. Var Superchola con capacidad de solubilizar fosfatos.” Elaborado por el señor Ingeniero Juan David Ati Tamayo, para optar por el grado de Magister en Agronomía mención Nutrición Vegetal; una vez escuchada la defensa oral del trabajo de investigación el tribunal aprueba y remite para uso y custodia en las bibliotecas UTA.

---

Ing. Patricio Nuñez PhD.  
Presidente de Tribunal

---

Ing. Jorge E. Dobronski  
Miembro de Tribunal

---

Ing. Carlos Vásquez PhD.  
Miembro de Tribunal

## AUTORÍA DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

La responsabilidad de las opiniones, comentarios y críticas emitidas en el Trabajo de Investigación, presentado con el tema: “Aislamiento, caracterización e identificación de rizobacterias de *Solanum tuberosum* L. Var Superchola con capacidad de solubilizar fosfatos”, le corresponde exclusivamente al: Ingeniero Juan David Ati Tamayo, autor, bajo la Dirección del Ingeniero Michel Leiva Mora Doctor en Ciencias Agrícolas, Director del Trabajo de Investigación, y el patrimonio intelectual a la Universidad Técnica de Ambato.



---

Ing. Juan David Ati Tamayo  
C.C. 1805037445  
AUTOR

---

Ing. Michel Leiva PhD.  
DIRECTOR

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que el Trabajo de Investigación, sirva como un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos de mi trabajo, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad.



---

Ing. Juan David Ati Tamayo  
C.C. 1805037445  
AUTOR

## **DEDICATORIA**

A mis padres Víctor Ati y Zoila Tamayo quienes son las personas más importantes de mi vida, por ser mi fortaleza y quienes me inculcaron por el camino del bien. A mi hermano John Esteban, quien es mi inspiración y la persona en quien más confío, porque a pesar de ser un niño, trece años menor que yo, me ha demostrado que es un hombre con mucha inteligencia y sabiduría, con su nacimiento cambió mi vida por completo.

## **AGRADECIMIENTO**

Primeramente, quiero agradecer a Dios por regalarme la vida, desde que tengo uso y razón, he sabido que el principio de la sabiduría es el temor a Él. A la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato por abrirme sus puertas para adquirir conocimientos que me han servido en todo este camino en mi formación profesional.

Al Dr. Michel Leiva Mora quien fue mi tutor de tesis y me extendió su amistad. Al Ingeniero Luciano Valle quien siempre fue un apoyo fundamental en todo el proceso de posgrado. A todos los profesores que con su conocimiento. Supieron guiarme de la mejor manera mi camino en la formación profesional de cuarto nivel.

A mi novia, que es la mejor persona que he conocido en el mundo.

Lo último, pero no menos importante, quiero agradecerme, por creer en mí, por trabajar duro, por no tener días libres, por nunca darme por vencido, por siempre dar a los demás y tratar de dar más de lo que recibo y por intentar hacer más bien que mal.

## ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I.....	3
EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	3
1.1.  Introducción.....	3
1.2.  Justificación.....	3
1.3.  Objetivos.....	5
CAPÍTULO II.....	6
ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	6
2.1.  Investigaciones referentes.....	6
2.2.  Marco teórico.....	11
2.2.1.  Bacterias.....	11
2.2.2.  La papa <i>S. tuberosum</i> .....	12
2.2.3.  Requerimientos nutricionales.....	15
CAPÍTULO III.....	19
MARCO METODOLÓGICO.....	19
3.1.  Ubicación.....	19
3.2.  Equipos y materiales.....	19
3.2.1.  Equipos.....	19
3.2.2.  Materiales.....	19
3.3.  Tipo de investigación.....	20
3.4.  Prueba de Hipótesis.....	20
3.5.  Metodología.....	21
3.5.1.  Aislar bacterias rizosféricas con la capacidad de solubilizar fosfatos a partir de raíces de <i>S. tuberosum</i> .....	21
3.5.2.  Caracterizar las colonias y la morfología de los aislados bacterianos rizosféricos obtenidos.....	24
3.5.3.  Evaluar la capacidad de solubilización de fosfatos <i>in vitro</i> de los aislados bacterianos rizosféricos.....	32



1.5.4. Identificar molecularmente los 10 aislados bacterianos rizosféricos que mayor capacidad de solubilizar fosfatos tengan, mediante la amplificación de los genes 16S rRNA con PCR y secuenciación .....	34
1.5.5. Determinar el efecto de los aislados bacterianos rizosféricos con mayor capacidad de solubilización sobre el crecimiento de vitroplantas de papa en invernadero .....	35
3.6. Población o muestra .....	37
3.6.1. Tratamientos.....	37
3.7. Recolección de información .....	40
3.8. Procesamiento de la información y análisis estadístico .....	40
3.9. Variables respuesta o resultados alcanzados .....	40
CAPITULO IV .....	42
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	42
4.1. Aislamiento de bacterias rizosféricas con la capacidad de solubilizar fosfatos a partir de raíces de <i>S. tuberosum</i> .....	42
4.1.1. Cantidad de UFC por gramo de suelo de las cuatro localidades de la provincia de Tungurahua (El Placer – cantón Quero, Pingulí – cantón Mocha, Llangahua – Ambato y la localidad de Santa Rita – Píllaro).....	42
4.2. Caracterización de las colonias y la morfología de los aislados bacterianos rizosféricos obtenidos .....	44
4.2.1. Caracterización cultural de las colonias y morfología de los aislados bacterianos de diferentes localidades (Quero, Mocha, Ambato, Píllaro) de la provincia de Tungurahua.....	44
4.3. Evaluación de la capacidad de solubilización de fosfatos <i>in vitro</i> de los aislados bacterianos rizosféricos .....	50
4.4. Identificación molecular de los 10 aislados bacterianos rizosféricos que mayor capacidad de solubilizar fosfatos tengan, mediante la amplificación de los genes 16S rRNA con PCR y secuenciación.....	54

<b>4.5. Determinación del efecto de los aislados bacterianos rizosféricos con mayor capacidad de solubilización sobre el crecimiento de vitroplantas de papa en invernadero .....</b>	<b>56</b>
<b>4.5.1. Efecto de los aislados bacterianos sobre el área foliar de vitroplantas de <i>S. tuberosum</i> var. Superchola en invernadero.....</b>	<b>56</b>
<b>4.5.2. Efecto de los aislados bacterianos sobre la masa fresca de vitroplantas de <i>S. tuberosum</i> var. Superchola en invernadero.....</b>	<b>58</b>
<b>4.5.3. Efecto de los aislados bacterianos sobre la masa seca de vitroplantas de <i>S. tuberosum</i> var. Superchola en invernadero.....</b>	<b>60</b>
<b>4.5.4. Efecto de los aislados bacterianos sobre el índice de área foliar de vitroplantas de <i>S. tuberosum</i> var. Superchola en invernadero.....</b>	<b>61</b>
<b>CAPÍTULO V.....</b>	<b>64</b>
<b>CONCLUSIONES, RECOMENDACIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS ..</b>	<b>64</b>
<b>5.1. Conclusiones.....</b>	<b>64</b>
<b>5.2. Recomendaciones.....</b>	<b>65</b>
<b>5.3. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>65</b>
<b>5.4. ANEXOS .....</b>	<b>76</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica de la papa.....	14
<b>Tabla 2.</b> Caracterización cultural de las colonias de los aislados bacterianos. ....	25
<b>Tabla 3.</b> Componentes para la diferenciación de bacterias Gram (+) o Gram (-) con Tinción de Gram. ....	30
<b>Tabla 4.</b> Caracterización morfológica de las bacterias respecto a la forma de agrupación.....	31
<b>Tabla 5.</b> Aislados bacterianos de cuatro localidades de la provincia de Tungurahua. ....	38
<b>Tabla 6.</b> Aislados bacterianos con mayor capacidad de solubilización de fosfatos..	39
<b>Tabla 7.</b> Cepas bacterianas inoculadas en vitroplantas de papa.....	40
<b>Tabla 8.</b> Influencia de muestras de suelo de diferentes localidades (Quero, Mocha, Ambato, Píllaro) de la provincia de Tungurahua sobre el número de Unidades Formadoras de Colonias por gramo de suelo en medio de cultivo Agar Pikovskaya. ....	42
<b>Tabla 9.</b> Caracterización cultural de las colonias de los aislados bacterianos de diferentes localidades (Quero, Mocha, Ambato, Píllaro) de la provincia de Tungurahua en medio de cultivo Agar Pikovskaya.....	45
<b>Tabla 10.</b> Caracterización morfológica de los aislados bacterianos de diferentes localidades (Quero, Mocha, Ambato, Píllaro) de la provincia de Tungurahua en medio de cultivo Agar Pikovskaya. ....	48
<b>Tabla 11.</b> Halos de solubilización e índice de solubilización de fosfato de aislados bacterianos de diferentes localidades (Quero, Mocha, Ambato, Píllaro) de la provincia de Tungurahua en medio de cultivo Agar Pikoskaya.....	50
<b>Tabla 12.</b> Tamaño de halos de solubilización e índice de solubilización de fosfatos de aislados bacterianos procedentes de cuatro localidades de la provincia de Tungurahua en medio de cultivo Agar Pikovskaya.....	51
<b>Tabla 13.</b> Identificación molecular de aislados bacterianos rizosféricos con capacidad de solubilizar fosfatos mediante la amplificación de los genes 16S rRNA con PCR y secuenciación. ....	54
<b>Tabla 14.</b> Efecto de la inoculación de cepas bacterianas rizosféricas con capacidad de solubilización de fosfatos sobre el área foliar de vitroplantas de <i>S. tuberosum</i> var. Superchola establecidas en invernadero.....	56

<b>Tabla 15.</b> Efecto de la inoculación de cepas bacterianas rizosféricas con capacidad de solubilización de fosfatos sobre la masa fresca de vitroplantas de <i>S. tuberosum</i> var. Superchola establecidas en invernadero.....	59
<b>Tabla 16.</b> Efecto de la inoculación de cepas bacterianas rizosféricas con capacidad de solubilización de fosfatos sobre la masa seca de vitroplantas de <i>S. tuberosum</i> var Superchola establecidas en invernadero.....	60
<b>Tabla 17.</b> Efecto de la inoculación de cepas bacterianas rizosféricas con capacidad de solubilización de fosfatos sobre el índice de área foliar de vitroplantas de <i>S. tuberosum</i> var. Superchola establecidas en invernadero. ....	62
<b>Tabla 18.</b> Absorbancia en espectrofotómetro ajustados a un nivel de 0,1 a 600 nanómetros.....	76

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama de actividades realizadas para el muestreo de suelo e implementación de tratamientos para el aislamiento de bacterias rizosféricas de <i>S. tuberosum</i> var. Superchola.....	21
<b>Figura 2.</b> Diagrama de actividades realizadas para la preparación de medios de cultivo y plaqueado. ....	22
<b>Figura 3.</b> Diagrama de actividades realizadas para el aislamiento de bacterias rizosféricas de <i>S. tuberosum</i> var. Superchola.....	23
<b>Figura 4.</b> Diagrama del conteo de UFC.g <sup>-1</sup> de suelo.....	24
<b>Figura 5.</b> Diagrama de actividades realizadas para la determinación morfológica bacteriana con Tinción de Gram. ....	30
<b>Figura 6.</b> Diagrama de actividades realizadas para la evaluación cuantitativa de la capacidad de solubilización de fosfatos de las BSF. ....	33
<b>Figura 7.</b> Diagrama de actividades realizadas para la extracción de ADN y secuenciación. ....	34
<b>Figura 8.</b> Diagrama de actividades realizadas para la activación de cepas bacterianas en medio de cultivo BHI. ....	35
<b>Figura 9.</b> Diagrama de actividades realizadas para la medición en espectrofotómetro e inoculación de cepas bacterianas en vitroplantas de <i>S. tuberosum</i> en invernadero.....	36
<b>Figura 10.</b> Caracterización cultural de las colonias de los aislados bacterianos. ....	47
<b>Figura 11.</b> Morfología de los aislados bacterianos. ....	49
<b>Figura 12.</b> Halos e índices de solubilización de fosfato de aislados bacterianos.....	53
<b>Figura 13.</b> Vitroplantas inoculadas con cepas bacterianas con capacidad de solubilizar fosfatos: a) CC-FCAGP-BSF20, b) CC-FCAGP-BSF18, c) CC-FCAGP-BSF15, d) CC-FCAGP-BSF14, e) CC-FCAGP-BSF13, f) CC-FCAGP-BSF12, g) CC-FCAGP-BSF11 y h) CC-FCAGP-BSF10. ....	57
<b>Figura 14.</b> Vitroplantas inoculadas con cepas bacterianas con capacidad de solubilizar fosfatos: a) CC-FCAGP-BSF10, b) CC-FCAGP-BSF11 y c) CC-FCAGP-BSF12.....	59
<b>Figura 15.</b> Vitroplantas inoculadas con cepas bacterianas con capacidad de solubilizar fosfatos: a) CC-FCAGP-BSF10, b) CC-FCAGP-BSF11 y c) CC-FCAGP-BSF12.....	61

**Figura 16.** Vitroplantas inoculadas con cepas bacterianas con capacidad de solubilizar fosfatos: a) CC-FCAGP-BSF10, b) CC-FCAGP-BSF11, c) CC-FCAGP-BSF12, d) CC-FCAGP-BSF13, e) CC-FCAGP-BSF14, f) CC-FCAGP-BSF15..... 63

## RESUMEN

La presente investigación se desarrolló con la finalidad de aislar, caracterizar e identificar bacterias de rizosfera de *Solanum tuberosum* L. Var. Superchola con capacidad de solubilizar fosfatos. El aislamiento bacteriano se realizó mediante diluciones seriadas. La caracterización de las colonias se desarrolló en Agar Nutriente y la morfológica se determinó mediante la prueba de Gram. Para analizar la capacidad de solubilización de fosfato *in vitro* se utilizó el medio de cultivo Agar Pikovskaya, mientras que la identificación molecular se realizó mediante la amplificación de los genes 16S rRNA mediante PCR. Para determinar la actividad promotora del crecimiento vegetal se utilizaron vitroplantas de papa en condiciones de invernadero en donde se evaluó el área foliar, masa fresca, masa seca y el índice de área foliar. En el cantón Píllaro se determinó la mayor cantidad de UFC. g<sup>-1</sup> de suelo (9,72 x 10<sup>9</sup>). El 62% de los aislados bacterianos tuvo una forma circular, el 92% textura lisa y el 85% bordes enteros. El 83% fueron bacterias Gram (-) donde un 50% tuvo forma bacilar. Los aislados bacterianos con mayor capacidad de solubilización de fosfatos procedían del cantón Mocha. El aislado bacteriano CC-FCAGP-BSF10 tuvo la mayor capacidad de solubilización de fosfato. Mediante la amplificación de los genes 16S rRNA con PCR se identificaron las siguientes especies: *Bacillus* sp., *Pseudomonas vancouverensis*, *Pseudomonas zea*, *Pseudomonas yamanorum*, *Pseudomonas shunpengii* y *Lysinibacillus macroydes*, quienes mostraron una alta capacidad de solubilización de fosfato *in vitro* e incrementaron los valores del área foliar, masa fresca, masa seca e índice de área foliar de las vitroplantas de *S. tuberosum* var. Superchola. Basados en los resultados y las pruebas realizadas, se logró identificar seis nuevas especies bacterianas asociadas con la rizosfera de *S. tuberosum* en Ecuador que mostraron capacidad para solubilizar fosfato y promover el crecimiento vegetal de vitroplantas de papa.

**Palabras Claves:** biodiversidad microbiana, biofertilizantes, microbiota del suelo, nutrientes vegetales, propiedades funcionales.

## Abstract

The present research was developed with the purpose of isolating, characterizing and identifying rhizosphere bacteria of *Solanum tuberosum* L. Var. Superchola with the ability to solubilize phosphates. Bacterial isolation was performed by serial dilutions. Colony characterization was carried out on Nutrient Agar and morphological characterization was determined by Gram test. To analyze the *in vitro* phosphate solubilization capacity, Pikovskaya Agar culture medium was used, while molecular identification was performed by PCR amplification of 16S rRNA genes. To determine the plant growth promoting activity, potato vitroplants were used in greenhouse conditions where leaf area, fresh mass, dry mass and leaf area index were evaluated. The highest number of CFU. g<sup>-1</sup> of soil ( $9.72 \times 10^9$ ) was determined in Píllaro. Sixty-two percent of the bacterial isolates had a circular shape, 92% had a smooth texture and 85% had entire edges. Eighty-three percent were Gram (-) bacteria, with 50% having a bacillary form. The bacterial isolates with the highest phosphate solubilization capacity came from the Mocha canton. The bacterial isolate CC-FCAGP-BSF10 had the highest phosphate solubilization capacity. By PCR amplification of 16S rRNA genes, the following species were identified: *Bacillus* sp, *Pseudomonas vancouverensis*, *Pseudomonas zeae*, *Pseudomonas yamanorum*, *Pseudomonas shunpengii* and *Lysinibacillus macroydes*, which showed high phosphate solubilization capacity *in vitro* and increased the values of leaf area, fresh mass, dry mass and leaf area index of *S. tuberosum* var. Superchola vitroplants. Based on the results and the tests carried out, six new bacterial species associated with the rhizosphere of *S. tuberosum* in Ecuador were identified that showed the capacity to solubilize phosphate and promote plant growth of potato vitroplants.

**Keywords:** biofertilizers, functional properties, microbial biodiversity, plant nutrients, soil microbiota.



## CAPÍTULO I

### EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

#### 1.1. Introducción

El fósforo (P) es el segundo elemento necesario para el crecimiento y desarrollo de las plantas, absorción de nutrientes, metabolismo energético y oxidación biológica (Nesme et al., 2018). En el suelo representa un porcentaje aproximado de 0,04 - 0,1% (p/p), pero de esto sólo una proporción muy pequeña puede ser asimilado directamente por las plantas, debido a que la mayoría se encuentra en forma insoluble (Neal et al., 2017). Principalmente los aportes de P para los cultivos se realizan a través de fertilizantes fosfatados o residuos orgánicos (Fraser et al., 2015); sin embargo, una alta cantidad de P suele convertirse en sales y se unen a elementos como Ca, Al, Mg, Mn y Fe volviéndose insoluble; otro de los inconvenientes generado con la aplicación de fertilizantes es que gran parte de la forma soluble de fosfato inorgánico incorporado al suelo se inmoviliza rápidamente y deja de estar disponible para las plantas (Reddy et al., 2015; Liu et al., 2015).

Las bacterias solubilizadoras de fosfatos tienen la capacidad de liberar fósforo inorgánico del suelo, convirtiéndolo en formas disponibles para las plantas. El fósforo es un nutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, y su disponibilidad puede ser limitante en muchos suelos. El análisis molecular permite identificar y caracterizar estas bacterias, lo que ayuda a entender su papel en la mejora de la disponibilidad de fósforo (Leal – Almanza et al., 2018).

La investigación propuesta se centra en el estudio de bacterias rizosféricas aisladas de las raíces de *S. tuberosum*, con especial énfasis en su capacidad para solubilizar fosfatos. Este proceso es de gran relevancia agrícola, ya que los fosfatos son nutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas, y su disponibilidad puede ser limitada en el suelo. Por lo tanto, identificar y caracterizar bacterias con la capacidad de solubilizar fosfatos podría tener aplicaciones prácticas en la mejora de la nutrición de las plantas y, en particular, en el cultivo de papa.

#### 1.2. Justificación

Los microorganismos desempeñan un papel activo en diversos procesos biogeoquímicos, entre los que se incluyen la descomposición, la solubilización y la alteración del fósforo en el suelo. Existen bacterias que se encuentran en el suelo

asociadas con las raíces de las plantas y tienen un efecto positivo en su crecimiento: mejoran el rendimiento y el contenido nutricional, la tolerancia a diversos tipos de estrés (bióticos y abióticos), la producción de metabolitos secundarios beneficiosos y la resistencia sistémica inducida (**van der Heijden et al., 2016**).

La promoción de la actividad de bacterias solubilizadoras de fosfatos puede reducir la dependencia de fertilizantes químicos fosfatados, que son costosos y pueden tener impactos ambientales negativos. Al comprender mejor la diversidad y función de estas bacterias a través del análisis molecular, se pueden desarrollar estrategias agrícolas más sostenibles y respetuosas con el medio ambiente. El análisis molecular permite identificar cepas específicas de bacterias solubilizadoras de fosfatos con características deseables, como una mayor eficiencia en la solubilización de fosfatos. Esto facilita la selección de cepas promisorias para su uso en inoculantes bacterianos personalizados, diseñados para mejorar la disponibilidad de fósforo en suelos específicos (**Glick, 2020**).

Las bacterias solubilizadoras de fosfatos no solo liberan fósforo, sino que también pueden tener efectos beneficiosos en la salud del suelo al mejorar su estructura y promover la disponibilidad de otros nutrientes. El análisis molecular proporciona información detallada sobre la diversidad genética de estas bacterias y su interacción con el entorno del suelo. Comprender la diversidad genética de las bacterias solubilizadoras de fosfatos a través del análisis molecular puede contribuir a optimizar las prácticas agrícolas, como la rotación de cultivos y el manejo de residuos, para fomentar la actividad beneficiosa de estas bacterias y mejorar la productividad agrícola de manera sostenible (**Richardson & Simpson, 2011**).

En la actualidad una alternativa de manejo biológico de los cultivos es la utilización de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, debido a que éstas mediante el empleo de uno o la combinación de diversos mecanismos mejoran la producción al permitir una mayor absorción de nutrientes y evitar el ataque de organismos patógenos (**Rizvi et al., 2017**). Las bacterias encargadas de la solubilización del fosfato inorgánico (iPSB) destacan por su eficacia al liberar fósforo de depósitos inorgánicos de este elemento. Además, estas iPSB tienen la capacidad de prevenir la re-fijación del fósforo liberado (**Richardson et al., 2009**).

El reconocimiento de los diversos géneros y especies de bacterias es de gran utilidad para el investigador, los métodos tradicionales de reconocimiento de bacterias utilizan generalmente técnicas biológicas como la Tinción de Gram y la identificación a partir del metabolismo específico de las bacterias. Este reconocimiento clásico consiste en la realización de un análisis comparativo de las muestras obtenidas con muestras de referencia (**Treebupachatsakul & Poomrittigul, 2019**).

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. General**

Aislar, caracterizar e identificar bacterias rizosfera de *Solanum tuberosum* L Var Superchola con capacidad de solubilizar fosfatos.

#### **1.3.2. Específicos**

- Aislar bacterias rizosféricas con la capacidad de solubilizar fosfatos a partir de raíces de *Solanum tuberosum*.
- Caracterizar las colonias y la morfología de los aislados bacterianos rizosféricos obtenidos.
- Identificar molecularmente los 10 aislados bacterianos rizosféricos que mayor capacidad de solubilizar fosfatos tengan, mediante la amplificación de los genes 16S rRNA con PCR y secuenciación.
- Evaluar la capacidad de solubilización de fosfatos *in vitro* de los aislados bacterianos rizosféricos.
- Determinar el efecto de los aislados bacterianos rizosféricos con mayor capacidad de solubilización sobre el crecimiento de vitroplantas de papa en invernadero.

## CAPÍTULO II

### ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

#### 2.1. Investigaciones referentes

**Amri et al. (2023)** en su investigación realizada para aislar bacterias solubilizadoras de fosfato, como paso inicial mezclaron 10 g de una muestra de suelo con 140 ml de un medio selectivo de fosfato, compuesto por 90 ml de agua estéril y 50 ml de caldo nutritivo que contenía fuentes insolubles de fósforo ( $\text{AlPO}_4$ ,  $\text{FePO}_4$  y fitato). La mezcla fue agitada a 130 rpm en un agitador orbital a una temperatura de 30°C. A partir de esta suspensión, se realizaron diluciones en una serie que abarcaban desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-5}$ . Posteriormente, se extendió un volumen de 1 ml de cada dilución en una placa con medio de agar PCA mediante la técnica de siembra en superficie y se incubaron a 30°C por 24 horas. Como resultado identificaron 28 comunidades bacterianas y se describieron sus culturales y morfológicas, mayormente exhibían tonalidades que iban desde el rosa hasta el amarillo, todas las bacterias presentaban una estructura con forma de tallo y fueron Gram (-), eran móviles y carecían de esporas.

**Shen et al. (2021)** en su investigación sobre los metabolitos producidos por las bacterias solubilizadoras de fosfatos, tomaron muestras de suelo de la rizosfera de una plantación de maíz sin labranza. Se utilizaron tres matraces cónicos esterilizados y se añadieron 3 g de suelo y 27 ml de solución salina (NaCl al 0,85%) esterilizada. Los matraces se agitaron a 150 rpm durante 20 minutos a 28 °C, se dejaron reposar sin perturbaciones durante 5 minutos y luego se realizaron diluciones en serie ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ ). Se transfirieron 100  $\mu\text{l}$  en total y se sembraron en placas de caldo de lisogenia (LB), posteriormente, las placas se incubaron a 28 °C durante 48 horas. Se empleó el medio de crecimiento de fosfato del Instituto Nacional de Investigación Botánica (NBRIP) para seleccionar inicialmente a las bacterias solubilizadoras de fosfato (PSB) basándose en la formación de un halo. Posteriormente, se llevó a cabo la prueba cuantitativa de la capacidad de solubilización de fosfato utilizando caldo NBRIP. Se eligieron las cepas con una alta capacidad de solubilización de fosfato (M16 y M44), mediante secuenciación del ARNr 16S, M16 se identificó como *Citrobacter amalonaticus* mientras que M44 correspondió a *Bacillus safensis*.

**Awais et al. (2019)** en su investigación sobre el aislamiento, caracterización y asociación entre bacterias solubilizadoras de fosfato de la rizosfera de la caña de

azúcar, encontraron que las 12 cepas aisladas de rizobacterias presentaban características comunes, siendo inodoras y exhibiendo colonias redondas, de tono cremoso, con una superficie lisa y brillante y una elevación elevada. La mayoría de ellas mostraban márgenes enteros o lisos, a excepción de S1, S13, S17, S19 y S22, que presentaban márgenes ondulados. En cuanto al color, S3 y S20 eran de tono piel; S22, de color amarillento, mientras que S1, S5, S7, S8, S9, S13, S15, S17 y S19 tuvieron color beige. Todas las cepas fueron Gram (-), con forma mayoritariamente redonda, aunque S13 y S20 presentaban forma de bastón. Mediante análisis molecular identificaron 12 géneros de bacterias solubilizadoras de fosfato (PSB): *Burkholderia cepacia* (S1), *Proteus vulgaris* (S3), *Pasteurella multocida* (S5), *Stenotrophomonas maltophilia* (S7), *Burkholderia mallei* (S8), *Burkholderia pseudomallei* (S9), *Citrobacter freundii* (S13), *Acinetobacter lwoffii* (S15), *Pseudomonas fluorescens* (S17), *Enterobacter cloacae* (S19), *Klebsiella pneumoniae* (S20) y *Klebsiella oxytoca* (S22).

En un estudio se aislaron 11 cepas de PSB, que incluyen cinco bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico (PSB) y seis bacterias solubilizadoras de fosfato orgánico (OPSB), de la rizosfera de tres plantas (*Scirpus planiculmis*, *Zizania latifolia* y *Phragmites australis*). Estas cepas fueron identificadas *Enterobacter asburiae*, *Acinetobacter* sp., cepa de *Bacillus cereus*, entre otras. La cepa IPSB más eficiente pudo convertir más de 430 mg L<sup>-1</sup> de ortofosfato, mientras que la cepa OPSB equivalente solo liberó menos de 4 mg L<sup>-1</sup> en cultivo líquido (Teng et al., 2019).

En una investigación se encontraron cepas bacterianas como (*Pseudomonas* y bacilos) y cepas de hongos (*Aspergillus* y *Penicillium*), las cuales mostraron una alta capacidad de solubilización de fosfatos (Ingle & Padole, 2017).

Zheng et al. (2018) en su investigación, aislaron bacterias rizosféricas, utilizaron el medio de cultivo Agar Pikovskaya para determinar el índice de solubilización de fosfatos y mediante la identificación molecular determinaron la identidad de las bacterias y encontraron que observaron que la concentración de P soluble fue más alta para *B. megaterium* Y99 (159,48 µg mL<sup>-1</sup>), seguida de *B. megaterium* Y1412 (138,68 µg mL<sup>-1</sup>), *B. megaterium* Y924 (136,83 µg mL<sup>-1</sup>) y *B. megaterium* Y95 (134,49 µg mL<sup>-1</sup>); además destacan que el pH del medio de cultivo sufrió un descenso.

**Surapat et al. (2013)** en su investigación aislaron y caracterizaron bacterias solubilizadoras de fosfato (PSB) en *Capsicum frutescens* L. cv. Hua Rua y encontraron que la mayor cantidad de PSB (más del 68%) se encontraba en suelos cultivados de manera orgánica. Diez aislados de PSB se seleccionaron basándose en su habilidad para solubilizar fosfato tricálcico. Los PSB seleccionados mostraron una capacidad de solubilización de fosfato que variaba entre 126,36 y 488,55 µg/ml. Además, el análisis filogenético basado en el gen 16S rRNA reveló similitud máxima con *Burkholderia ambifaria* y *Burkholderia tropica*.

En una investigación se determinó la habilidad de las bacterias endofíticas para generar ácido glucónico (GA), disolver fosfato insoluble y fomentar el crecimiento de plantas de *Pisum sativum* L. Los resultados revelaron que varias de las cepas endofíticas producían ácido giberélico (AG) en cantidades que oscilaban entre 14 y 169 mM, y mostraban capacidades de solubilización de fosfato que iban desde moderadas hasta altas (400 a 1300 mg L<sup>-1</sup>). Las cinco cepas identificadas eran de *Pseudomonas* sp., mientras que la sexta cepa, con una capacidad limitada de solubilización de fosfato, pertenecía a la especie *Bacillus* (**Oteino et al., 2015**).

En un este estudio, se aislaron y caracterizaron tres cepas: *Penicillium oxalicum* FJG21, *Penicillium oxalicum* FJQ5 y *Bacillus subtilis* BPM12, las cuales exhibieron una actividad destacada en la solubilización de fosfato. Se exploraron diversas fuentes de fosfato, identificando Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> como la fuente más eficaz. Se lograron concentraciones elevadas de fósforo soluble, alcanzando 529,0 µg. mL<sup>-1</sup>, 514,0 µg. mL<sup>-1</sup> y 330,7 µg. mL<sup>-1</sup> para *P. oxalicum* FJG21, *P. oxalicum* FJQ5 y *B. subtilis* BPM12, respectivamente. Se observó una relación inversa entre la cantidad de fósforo soluble y el valor de pH del medio (**Wang et al., 2020**).

**Thomas et al. (2018)** en su estudio determinaron las propiedades de las bacterias solubilizadoras de fosfato (PSB) obtenidas de suelos agrícolas en Cochin, Kerala, India. De entre diecisiete aislamientos bacterianos, se identificó que UBPSB-07 era un solubilizador de fosfato eficaz. Este aislado bacteriano fue caracterizado mediante fenotipo y secuenciación del ADNr 16S, revelando su identificación como *Bacillus licheniformis*. Este aislado exhibió el índice de solubilización más alto en 72 horas en agar Pikovskaya, con una actividad fosfatasa de 0,4 U/ml/min a una temperatura de 45°C y a un pH de 7.

En una investigación se evaluó el impacto del uso individual y combinado de bacterias solubilizadoras de fosfato (PSB) en la solubilización y mineralización de roca fosfórica (RP), se aislaron cincuenta y siete bacterias de la rizosfera de *Zea mays* L. Después del cribado, se evaluó cuantitativamente la capacidad de once aislados para solubilizar fosfato mineral utilizando  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  insoluble como sustrato, a lo largo del tiempo, mediante espectroscopía. El índice de solubilización de P varió entre 1,94 y 3,69, con una eficiencia de solubilización que osciló entre 94,1% y 269,0%. Los aislados MRS18 y MRS27 mostraron los valores más altos. La solubilización de P en el medio líquido fue máxima a los 6 y 9 días de incubación, variando entre 9,91 y 44,04  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , siendo los aislados MRS27 y MRS34 los más efectivos (**Manzoor et al., 2016**).

**Adnán et al. (2020)** manifestaron en su investigación el potencial de las bacterias solubilizadoras de fosfato (PSB) para mejorar el crecimiento y la absorción de P en el maíz bajo diferentes niveles de cal (4,8%, 10%, 15% y 20%) y suplementos adicionales de P (de corral). estiércol, estiércol de aves, superfosfato simple y fosfato de roca) añadidos a razón de 45 mg  $\text{P}_2\text{O}_5$   $\text{kg}^{-1}$ . Y determinaron efectos favorables en el crecimiento de las plantas, especialmente en la concentración de P.

**Wahid et al. (2020)** en su investigación realizaron dos experimentos de campo sucesivos para evaluar el potencial de inoculación interactiva de las cepas *Bacillus* sp. sobre el rendimiento y la absorción de P de cultivos de *Z. mays* y *Triticum aestivum* L. en suelos alcalinos calcáreos. Los resultados de ambos ensayos indicaron que existió un aumento en el rendimiento de grano de las plantas y la absorción de P hasta la segunda temporada después de la inoculación, en comparación con los controles. Además, la colonización de las raíces de maíz y trigo, la densidad de población de PSB y las propiedades del suelo poscosecha también mejoraron mediante la inoculación.

**Thunshirn et al. (2022)** evaluaron el potencial de las cepas de PSB y el uso de biocarbon, y encontraron que las plantas tratadas con *Lysinibacillus fusiformis* aumentaron la inoculación de N (32,8%), P (72,5%) y K (42,1%) frente al control. Adicionalmente de eso la inoculación de la cepa de *L. fusiformis* mejoró el N (23,1%) y el P (61,5%) que el control.

Se llevó a cabo un estudio para aislar y caracterizar la población de PSB rizosférica de los arrozales de humedales de India, para la detección del PSB potencial, se determinó la eficiencia de solubilización de P utilizando medio Pikovskaya, tras el cribado y la

identificación molecular utilizando el gen 16SrRNA, se encontró que los 15 aislados bacterianos pertenecen a los géneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Paenibacillus* (Lalrampani et al., 2020).

En una investigación se aislaron bacterias del suelo del campo agrícola de secano de Garhwal Himalaya y se analizó la capacidad de solubilización de fosfato inorgánico, mediante análisis de secuencia de ARNr 16S se determinó que pertenecen a las especies *Pseudomonas koreensis*, *Arthrobacter nitroguajacolicus* y *Klebsiella oxytoca* (Gusain et al., 2015).

En un estudio realizado para aislar bacterias solubilizadoras de fosfato de la rizosfera de plantas de algodón, se obtuvieron 15 aislados bacterianos, uno de ellos que solubilizó la cantidad máxima de fósforo (0,129¼g/ml). El aislado se caracterizó morfológica, bioquímicamente y sobre la base de la secuenciación del ADNr 16s y se encontró que pertenecía al género *Bacillus* (Narveer et al., 2014).

Baliah et al. (2016) también identificaron las cepas *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescence* en diferentes cultivos.

Liu et al. (2015) aislaron veinte bacterias solubilizadoras de fosfato (PSB) de suelos de rizosfera calcárea, se identificaron mediante análisis de secuencia de genes de ARNr 16S como especies bacterianas de *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhizobium* sp., *Acinetobacter* sp. y *Pseudomonas oryzihabitans*.

Teng et al. (2018) en su investigación mediante la secuenciación del gen 16srRNA identificaron cepas de bacterias solubilizadoras de fosfato (PSB) pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Bacillus* y *Providencia* de la región rizosférica de plantas del Humedal Yeyahu, las cuales mostraron una alta capacidad de solubilización.

Paul & Sinha (2017) en su investigación evaluaron el potencial de una bacteria solubilizadora de fosfato aislada del río Ganges, Bengala Occidental, India. Experimentalmente la cepa KUPSB12 mostró un índice de solubilización de fosfato de 2,85 en placas de agar de Pikovskaya y una producción muy alta de fosfato soluble de  $219,64 \pm 0,330 \mu\text{g mL}^{-1}$  en medio líquido. Esta bacteria se identificó mediante características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, así como mediante la



secuenciación del gen 16S rRNA y fue identificada como una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

Los microorganismos solubilizadores de fosfato convierten el fósforo insoluble en fosfatos asimilables mediante diversos mecanismos, como acidificación, quelación, reacciones de intercambio y formación de sustancias poliméricas, y lo ponen a disposición de las plantas (**Zaidi et al., 2017**).

La capacidad de solubilizar fosfatos por parte de estos PSM puede atribuirse a la secreción de ácidos orgánicos. **Mardad, et al. (2013)** determinaron la presencia de estos ácidos en el sobrenadante de los cultivos mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa y demostraron que todas las cepas generaron en mayor cantidad ácido glucónico, seguido de los ácidos succínico, acético, oxaloacético, pirúvico, glutámico, málico y fumárico y un ácido orgánico recientemente detectado e identificado fue el ácido alfacetoglutárico. De la misma manera **Chawngthu et al. (2020)** mediante análisis del filtrado del cultivo de PSB se observó la presencia de múltiples ácidos orgánicos: ácido glucónico, acético, succínico, fórmico, tartárico, cítrico, málico y oxálico.

El uso de microorganismos solubilizadores de fosfato eficientes (PSM), juega un papel importante en la nutrición de las plantas a través del aumento en la absorción del fósforo (**Sharma et al., 2013**); (**Crowther et al., 2019**).

**Li et al. (2021)** mencionaron que los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Penicillium* y *Aspergillus* poseen individualmente alrededor de 100 cepas de PSM identificadas y, por lo tanto, pueden considerarse como los PSM con más importancia agronómica.

## **2.2. Marco teórico**

### **2.2.1. Bacterias**

#### **2.2.1.1. Generalidades**

Las bacterias son microorganismos procarióticos, miden entre 0.5 a 5 micrómetros, son los microorganismos más abundantes del planeta, se calcula que existen alrededor de 40 millones de bacterias por gramo de suelo y cerca de 1 millón de bacterias en 1 ml de agua dulce (**Castillo, 2016**). Tienen formas variables, no poseen núcleo y su material genético lo almacenan en un único cromosoma bacteriano circular que se

encuentra en el citoplasma en una estructura denominada nucleoide (**Cowan y Bunn, 2016**).

Se reproducen por fisión binaria (replican el ADN al mismo tiempo), de tal manera que la célula hija tendrá la misma información genética; poseen membrana celular y ribosoma similar a las células eucariotas que permiten la expresión de la información genética. Debido a estas características son clasificadas en dos tipos, las Archeobacterias: no poseen peptidoglicano (se desarrollan en entornos ácidos y alcalinos) y las Eubacterias: poseen peptidoglucano en su pared celular (**Vargas & Kuno, 2014**).

## **2.2.2. La papa *S. tuberosum***

### **2.2.2.1. Generalidades**

La papa *S. tuberosum* pertenece a la familia Solanaceae y al género *Solanum* y posee un conjunto básico de 12 cromosomas ( $x=12$ ) (**Watanabe, 2015**). Es el cuarto cultivo alimentario más importante a nivel mundial después del arroz, trigo y maíz; la parte comestible es el tubérculo y es el más consumido por su alto valor nutricional (**Haan & Rodriguez, 2016**), además de ser empleado en la industria alimentaria, se utiliza en la producción de almidón y de bebidas alcohólicas (**Reddy et al., 2018**).

Fue descrita desde el año de 1538 por Pedro Cieza de León como un cultivo silvestre que los indígenas de los Andes de América del Sur denominaban papa. No obstante, hallazgos arqueológicos han demostrado que las culturas Inca y Tiahuanaco cultivaban este tubérculo; la domesticación de este cultivo se origina en el altiplano andino hace 7 000 y 10 000 años aproximadamente (**Maddela et al., 2015**).

Su propagación por el continente europeo inició en el año 1554, desde el país andino Perú hacia España, distribuyéndose más tarde en Inglaterra y en 1610 se consideraba como planta de ornato en los Países Bajos. En un principio se manifestaba que la papa ocasionaba problemas nutricionales y de salud humana, pero mediante estudios Antoine Parmentier y Henry Doyle demostraron su alto contenido nutricional (**Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, 2021**).

En Ecuador el INIAP reporta la existencia de más de 550 variedades nativas y más de 20 variedades mejoradas de papa, nuestro país ha impulsado varios programas de producción de semilla lo cual asegura el abastecimiento de este producto. Entre las variedades más producidas se pueden mencionar Super chola, INIAP-Victoria, INIAP-

Cecilia, Única, INIAP-Fripapa, INIAP-Gabriela, la producción se reparte en la zona Norte: provincias de Carchi y Pichincha, zona Centro: provincias de Cotopaxi, Tungurahua, Bolívar y Chimborazo y en la zona Sur: provincias de Cañar y Azuay (**Mastrocola et al., 2016**).

#### **2.2.2.2. Importancia**

La papa es uno de los cinco productos más importantes en la alimentación humana a nivel mundial, por su alto valor nutricional (**Ngobese y Workneh, 2018**), su elevado aporte de carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales lo convierte en un alimento necesario para la dieta humana, provocando que exista una demanda muy significativa durante todo el año (**Cerón-Lasso et al., 2018**); (**Dereje y Chibuzo, 2021**).

Considerado como el cuarto alimento más importante y producido detrás del arroz, el trigo y el maíz. Anualmente se producen aproximadamente 377 millones de toneladas a nivel mundial, abarcando una extensión de 19 millones de hectáreas con un rendimiento de 19.5 toneladas por hectárea y cerca de 200.000 a 300.000 toneladas al año (**Márquez et al., 2020**).

Entre los países con mayor producción de papa se encuentra China con 3.5 millones de hectáreas al año, Rusia con 3.4 millones de hectáreas al año y Ucrania con 1.6 millones de hectáreas al año. Por otro parte, Ecuador es un país en el que se producen de 66.000 hectáreas al año aproximadamente con un rendimiento estimado de 14 toneladas por hectárea, siendo un rubro económico importante que genera en promedio 60 millones de dólares al año; además, es una fuente de alimento para alrededor de 42.000 familias ubicadas principalmente en la zona andina, presentando un consumo per cápita aproximado de entre 122 y 50 kilogramos al año (**Basantes et al., 2020**).

#### **2.2.2.3. Clasificación taxonómica**

La papa *S. tuberosum* pertenece a la familia Solanaceae, es una planta dicotiledónea, herbácea y anual (**Reddy et al., 2018**), su rendimiento se ve afectado principalmente por factores abióticos (condiciones climáticas, calidad de agua, etc.) y bióticos (plagas, enfermedades), la variedad y su manejo agronómico (labores culturales, fertilización, etc.) (**Sahair et al., 2018**).

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de la papa

TAXONOMÍA	
<b>Reino</b>	Plantae
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Solanales
<b>Familia</b>	Solanaceae
<b>Género</b>	Solanum
<b>Especie</b>	tuberosum

**Fuente:** (Jerez y Martín, 2012)

#### 2.2.2.4. Descripción botánica

La papa *S. tuberosum* pertenece a la familia Solanaceae, es una planta herbácea, dicotiledónea y anual, sus raíces son fibrosas y se originan en los primordios radicales, los tallos aéreos se forman en el tubérculo madre, tienen una coloración verde pardo y pueden alcanzar 0.6 a 1 metro de longitud, mientras que los tallos de almacenamiento o tubérculos son subterráneos y se originan de los estolones, los cuales se forman de las yemas axilares de los tallos subterráneos principales; sus hojas son compuestas, alternas y están dispuestas a manera de espiral, las flores son bisexuales y están conformadas por cáliz, corola, androceo y gineceo, y forman inflorescencias cimosas, los frutos son bayas que contienen numerosas semillas (Rodríguez, 2010) y (Veitía et al., 2008).

#### 2.2.2.5. Micropropagación *in vitro* de *S. tuberosum*

El avance de las ciencias agrícolas ha contribuido positivamente y en la actualidad es una herramienta imprescindible para el fortalecimiento de una agricultura moderna (Sánchez-García et al., 2010). Hoy en día las técnicas de cultivo de tejidos vegetales se han convertido en métodos alternativos de propagación vegetativa, dado que presentan un impacto favorable para la agricultura y la industria al proveer de una mayor cantidad de plantas, las cuales son necesarias para una mayor producción y para cumplir con la creciente demanda mundial (Cruz-Martín et al., 2007); (Priyadarshani y Batra, 2017).

La micropropagación *in vitro* es un método en el cual el material vegetal se replica a través de explantes para producir una gran cantidad de clones, permitiendo tener la

posibilidad de seleccionar características deseables, eliminar las enfermedades (debido a la selección minuciosa del material y métodos de saneamiento), además de lograr una tasa de multiplicación más alta en un periodo de tiempo más corto, otra de las ventajas de este método de propagación es que para la ejecución de las pruebas de campo se requiere poco espacio (**Hajare et al., 2021**); (**Khadiga et al., 2009**).

#### **2.2.2.5.1. Importancia**

La papa ha sido uno de los primeros cultivos en beneficiarse de los avances biotecnológicos, lo cual ha permitido solucionar diversos problemas relacionados con su manejo y mejoramiento (**Hajare et al., 2021**). El cultivo de meristemas podría ser el primer enfoque biotecnológico usado para la eliminación de virus en plantas de papa, no obstante, a lo largo de los años este método se ha combinado exitosamente con la micropropagación para la producción de semilla de papa libres de patógenos. (**Sunil et al., 2021**).

La rápida multiplicación de clones libres de enfermedades mediante estas técnicas y en conjunto con métodos de propagación convencionales son un factor indispensable para la producción de semilla en varios países del mundo y (**Kosky et al., 2010**). Es así como los métodos de propagación *in vitro* permiten obtener una regeneración exitosa de plantas de *S. tuberosum* a partir de explantes de diferentes órganos y tejidos (**Nasiruddin et al., 2018**) y (**Khalafalla et al., 2010**).

#### **2.2.3. Requerimientos nutricionales**

La papa *S. tuberosum* es un cultivo que presenta una alta eficiencia productiva, así como también una alta demanda de nutrientes, esta demanda varía acorde al movimiento de los nutrientes en el suelo y de su capacidad de absorción (**Fernandes et al., 2015**).

##### **2.2.3.1. Fósforo**

El fósforo es uno de los macronutrientes más importantes para las plantas, constituye alrededor del 0,2% del peso seco de una planta (**Jiménez-Terry et al., 2013**). Es el componente esencial de los ácidos nucleicos, trifosfato de adenosina y fosfolípidos en las células vivas, desempeña un papel vital en procesos metabólicos como la adsorción de energía, su deficiencia limita el desarrollo y crecimiento de las plantas por ello, es necesario disponer de P en las cantidades adecuadas desde las etapas iniciales de los cultivos (**Hu et al., 2010**) y (**Sánchez-García et al., 2012**).

En el cultivo de papa el fósforo es uno de los nutrientes más difíciles de absorber, sin embargo, es un nutriente esencial para su desarrollo y producción, específicamente el P es traslocado a los tubérculos, siendo así que las cantidades de P traslocadas a los tubérculos son similares a las absorbidas; cuando existe una deficiencia de este elemento el tamaño de los tubérculos y el rendimiento se reducen significativamente **(Fernandes et al., 2016)** y **(Torres et al., 2013)**.

Las características del suelo influyen directamente en la disponibilidad del fósforo; por ejemplo, en suelos que son ricos en óxidos de hierro y aluminio, el P sufre reacciones de precipitación, adsorción y difusión **(Machado y Souza, 2012)** y **(Cruz-Martín et al., 2013)**. Por otra parte, los suelos con textura arenosa al ser muy sueltos y frágiles dificultan la adsorción de fósforo, mientras que, los suelos arcillosos presentan una alta capacidad de adsorción por el contenido de arcilla **(Machado et al., 2011)**. La fertilización con fósforo incrementa considerablemente el crecimiento de las plantas, **Martins et al., (2018)** en su investigación mencionaron que, al aplicar fertilizantes fosfatados en diferentes tipos de suelo, existe una mayor acumulación de P en brotes y un mayor rendimiento de tubérculos en papa cultivada en suelos arcillosos a comparación de las plantas cultivadas en suelos arenosos.

**Wiel et al. (2016)** manifestó que, para mejorar la eficiencia del uso del fósforo, la arquitectura radicular de las plantas de papa (número y morfología de las raíces laterales), así como su localización juegan un papel importante. Conforme existe una mayor densidad y longitud de los pelos radiculares la absorción del P en el suelo aumenta; además, dependerá de la variedad el uso eficiente del P, dado que las variedades altamente productivas utilizan el P que absorbieron para producir tubérculos y no en otros órganos de la planta **(Hailu et al., 2017)** y **(Nuñez et al 2017)**.

#### **2.2.3.2. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal**

Las bacterias son los organismos más abundantes del planeta, sin embargo, no se distribuyen uniformemente. La concentración de bacterias alrededor de las raíces de las plantas es por lo general mayor a comparación del suelo descubierto, debido a los exudados radiculares (azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos), los cuales son utilizados principalmente como fuente de alimento **(Carvalhais et al., 2015)**.

Diversas bacterias presentes alrededor de las raíces de las plantas son capaces de mejorar el crecimiento de las plantas y se denominan bacterias promotoras del

crecimiento vegetal (PGPB). Estos microorganismos además de mejorar la productividad de los cultivos tienen también la capacidad de controlar agentes fitopatógenos de las plantas (**Olanrewaju et al., 2017**). Adicionalmente, las PGPB incluyen varias cepas de rizobios, los cuales forman nódulos en las raíces (específicamente en leguminosas) y endófitos que se encuentran en el interior de los tejidos de la planta (**Santoyo et al., 2016**).

#### **2.2.3.3. Bacterias rizosféricas**

Las rizobacterias son una clase de bacterias que se encuentran alrededor de las raíces de las plantas, tienen la capacidad de actuar sobre el crecimiento, salud y productividad de las plantas utilizando diversos mecanismos como la asimilación de nutrientes, producción de bacteriófagos, inducción de resistencia sistémica, entre otros (**Olanrewaju et al., 2017**).

Al colonizar los espacios intercelulares de los tejidos de la raíz también tienen un efecto en la biosíntesis de hormonas vegetales, producción de sideróforos (permiten la absorción de hierro), promueven la tolerancia a la salinidad y sequía y evitan la intoxicación por metales pesados. Además, pueden producir la enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) desaminasa que tiene la capacidad de reducir la producción de etileno (**González y Fuentes, 2017**) y (**Marquina et al., 2018**).

Mediante los procesos de interacción entre las plantas y bacterias, se estima que éstas proporcionan alrededor de un 20% de fuentes de carbono a los microorganismos de la rizósfera. Los exudados radiculares están compuestos por diversas sustancias de alto peso molecular (mucílago) y las de bajo peso molecular (ácidos orgánicos, azúcares, etc.) las cuales cumplen un papel fundamental en la señalización y reconocimiento entre bacterias y plantas (**Velasco et al., 2020**).

*Bacillus cereus* Frankland y Frankland, *B. megatherium* Bary, *B. subtilis* (Ehnberg) Cohn, *Azotobacter beijerinckii* Lipman, *Azotobacter chroococcum* Beijerinck, *Pseudomonas putida* Trevisan, *Azospirillum brasilense* Tarrand, *Krieg y Doberiner* y *A. lipoferum* (Beijerinck) Tarrand son algunas de las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal más conocidas y varios estudios han demostrado que tienen efecto sobre la germinación de semillas, crecimiento y desarrollo de las plantas incluso en condiciones de estrés (**Arcos y Zúñiga, 2016**).

#### **2.2.3.4. Bacterias solubilizadoras de fosfato**

Las bacterias que tienen la capacidad de solubilizar fósforo se denominan bacterias solubilizadoras de fosfato, éstas proporcionan fosfato de forma más aceptable para las plantas y no ocasionan daños al ambiente (Alori et al., 2017). Transforman el fosfato orgánico e inorgánico insoluble a una forma más accesible y aceptable para las plantas, pero existen factores como las condiciones de las plantas y suelo, condiciones ambientales y cepas bacterianas que pueden afectar la acción de las bacterias solubilizadoras de fosfato (Gupta et al., 2016).

La solubilización de fosfatos puede ser ejecutada por diversas bacterias utilizando enzimas como fosfatasas, C-P liasas y fitasas, las cuales tienen la capacidad de romper los enlaces carbono – fósforo, por ejemplo, las enzimas C-P liasas a través de la reacción basada en el co-sustrato S-adenosil metionina convierte el fosfanato en fosfato aprovechable. Además, el carbono presente en la rizósfera es importante, ya que para el proceso de solubilización de fosfatos son necesarios el ácido glucónico o el 2 – cetoglucónico (ácidos orgánicos), los cuales dependen directamente de la cantidad de C.

Según Corrales et al. (2014) y Banerjee et al. (2005) entre los géneros de bacterias solubilizadoras de fosfato más potentes se encuentran *Bacillus*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* y *Streptomyces*.



## **CAPÍTULO III**

### **MARCO METODOLÓGICO**

#### **3.1. Ubicación**

El ensayo se realizó en el laboratorio de Bioinsumos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, ubicada en el sector de Querochaca, perteneciente al cantón Cevallos, provincia de Tungurahua. Sus coordenadas geográficas son 1°22'10.13" S y 78°36'22.81" O, con una altitud de 2890 msnm (**Google Earth, 2022**). El clima del sector es frío, normalmente se encuentra en una temperatura 15°C, con lluvias frecuentes, sin embargo, este ensayo se realizó en el laboratorio de Microbiología (**Tenesaca, 2015**).

#### **3.2. Equipos y materiales**

##### **3.2.1. Equipos**

- Autoclave (M11 ultra clave).
- pH metro de mesa (AB150).
- Balanza analítica (EUROTECH –JF2204).
- Cabina de flujo laminar (INDELAB. Modelo IDL R48V Labolan).
- Destilador de agua (CWS-4 3.5 LIT SIN TANQUE – Baltalab).
- Cámaras de crecimiento.
- Pie de REY (Universal Digital Serie 799).
- Vortex.
- Micropipetas (Volumen variable 1-5 ml MICROLIT RBO-5).
- Espectrofotómetro (EPOCH 2NS).
- Balanza de precisión electrónica semi analítica (ADAM).
- Incubadora (BINDER).
- NanoDrop One.
- Termociclador.

##### **3.2.2. Materiales**

- Cajas de Petri (90 mm de diámetro).
- Papel de filtro (Whatman ®).
- Medio de cultivo Pikovskaya–Agar modificado.
- Beaker (100 ml).
- Probetas (1000 ml).

- Tubos de ensayo (Longitud 180 mm).
- Matraz aforado (100 ml, 250 ml).
- Alcohol (90 %).
- Bolsas PROTEK (polietileno de baja densidad, Polietileno recuperado R1: 6 – 8 meses), capacidad 2 kg.
- Tubérculos de la variedad Superchola.
- Muestras de suelo de cultivo de papa de cuatros cantones de Tungurahua.
- Reactivos para Tinción de Gram (Lugol, alcohol-acetona, safranina, aceite de inmersión, cristal violeta).
- Asa de inoculación de acero inoxidable.
- Mechero Bunsen.
- Medio de cultivo (Brain Heart Infusion broth).
- Medios de cultivo (Nutrient agar).
- Caja con tapa ISO 4 (Thermopack).
- Sustrato a base de perlita y turba (KLASMANN).
- Vitroplantas de papa variedad superchola.
- Pinzas y bisturí.
- Cooler.
- Placa metálica.
- Vasos plásticos transparentes (8 onzas).

### **3.3. Tipo de investigación**

La investigación es de tipo experimental, en donde las variables independientes interfieren en el comportamiento de las variables dependientes, mediante la manipulación de estas variables se establece el impacto positivo o negativo en la variable dependiente.

### **3.4. Prueba de Hipótesis**

H0: Mediante el aislamiento, caracterización e identificación de bacterias de la rizosfera del cultivo de papa, se obtendrán aislados que tengan capacidad de solubilizar fosfatos *in vitro* y que promuevan el crecimiento de vitroplantas de papa *Solanum tuberosum* L. var Superchola.

H1: Mediante el aislamiento, caracterización e identificación de bacterias de la rizosfera del cultivo de papa, no se obtendrán aislados que tengan capacidad de

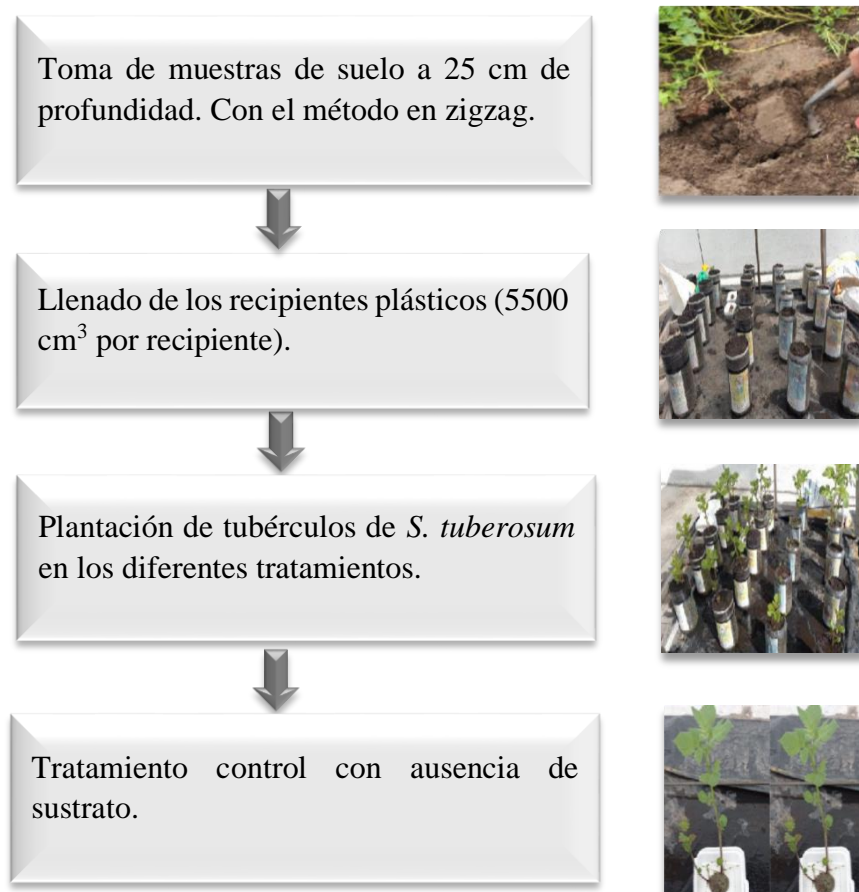
solubilizar fosfatos *in vitro* y que promuevan el crecimiento de vitroplantas de papa *Solanum tuberosum* L. var Superchola.

### 3.5. Metodología

#### 3.5.1. Aislar bacterias rizosféricas con la capacidad de solubilizar fosfatos a partir de raíces de *S. tuberosum*

##### 3.5.1.1. Muestreo de suelo para el aislamiento de bacterias rizosféricas de *S. tuberosum*

La toma de muestras de suelo se realizó en zigzag a una profundidad de 25 cm, en zonas productoras de papa en la provincia de Tungurahua. El suelo recolectado fue colocado en recipientes plásticos, donde posteriormente se plantaron tubérculos de papa, además, se adicionó un testigo sin la presencia de suelo (**Figura 1**).

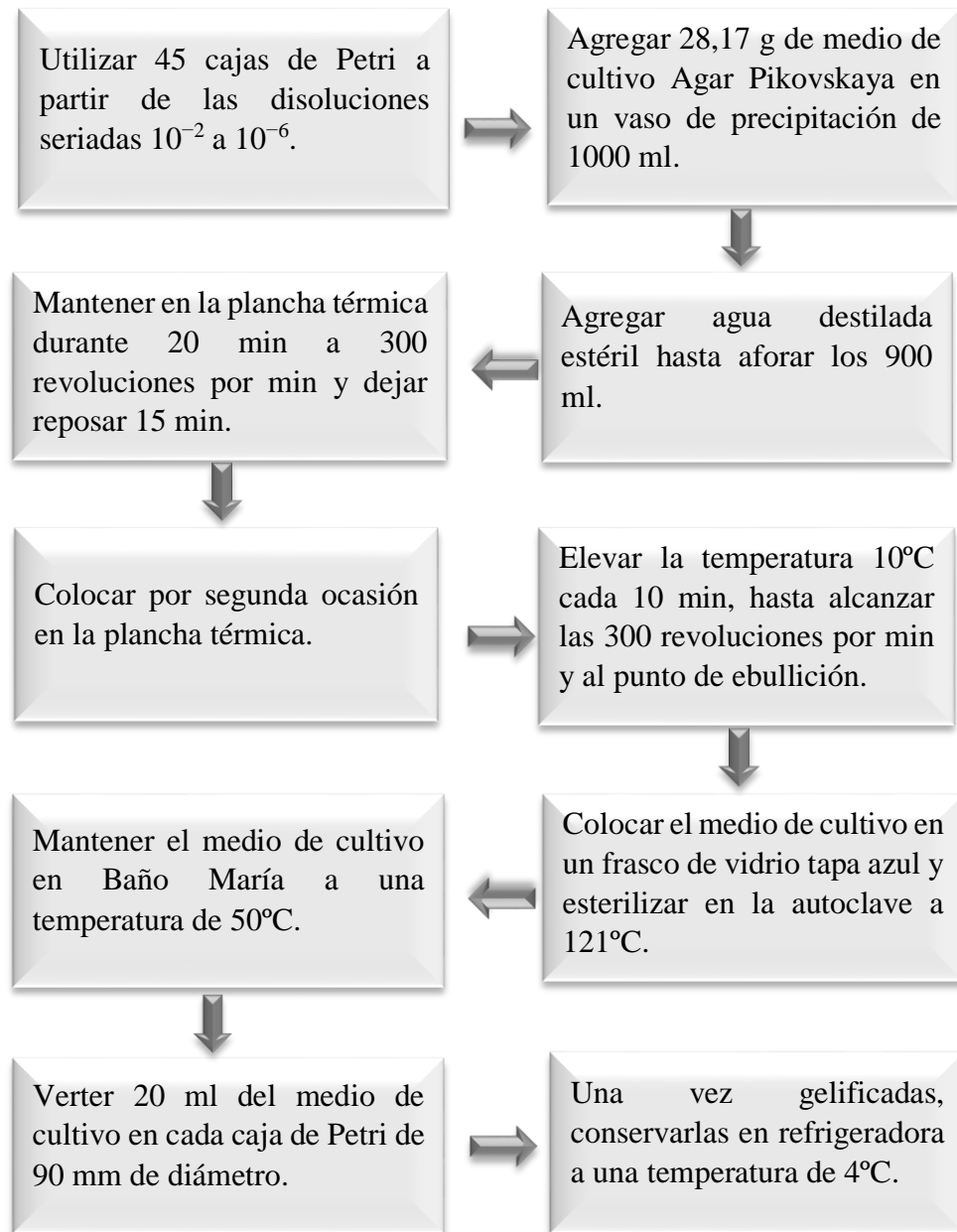


**Elaborado por:** David Ati, 2024.

**Figura 1.** Diagrama de actividades realizadas para el muestreo de suelo e implementación de tratamientos para el aislamiento de bacterias rizosféricas de *S. tuberosum* var. Superchola.

### 3.5.1.2. Preparación y plaqueado del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo se utilizaron 45 cajas de Petri a partir de las disoluciones seriadas ( $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ ), el medio de cultivo utilizado fue Agar Pikovskaya y se disolvieron 28,17 g en 900 ml de agua destilada. El vaso de precipitación con el medio de cultivo se colocó en la plancha de calentamiento a 300 revoluciones por minuto por dos ocasiones y se esterilizó en autoclave, posteriormente se dispensó en cajas de Petri y se conservaron en refrigeración (**Figura 2**).

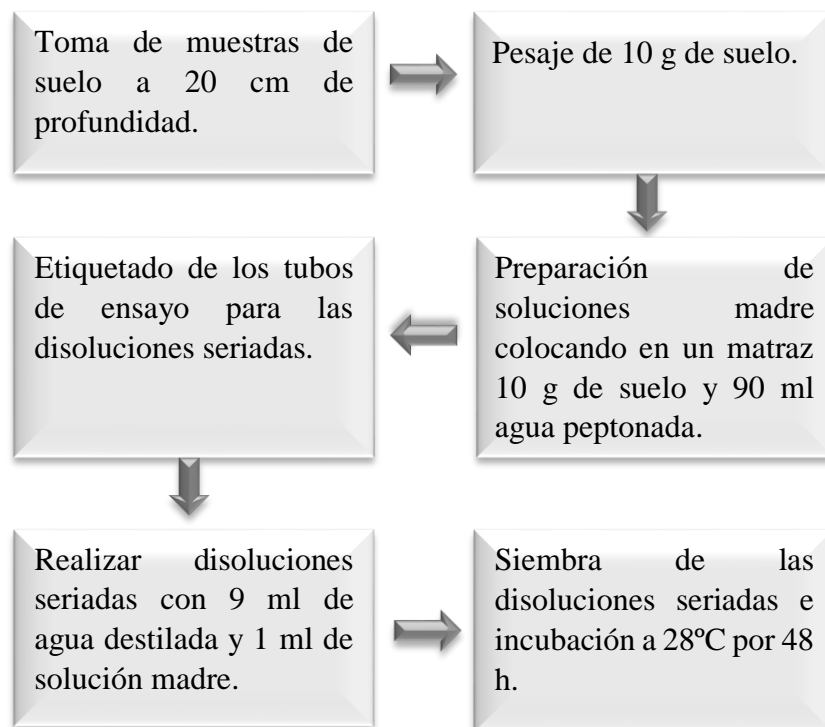


**Elaborado por:** David Ati, 2024.

**Figura 2.** Diagrama de actividades realizadas para la preparación de medios de cultivo y plaqueado.

### 3.5.1.3. Aislamiento de bacterias rizosféricas de *S. tuberosum* var. *Superchola*

1. Tomar muestras de suelo de los recipientes plásticos a 20 cm de profundidad, realizando 3 repeticiones por tratamiento.
2. Preparar las soluciones madre: en un matraz esterilizado de 250 ml colocar 10 g de suelo y 90 ml de agua peptonada y dejar durante 30 min en el agitar magnético a 300 revoluciones por min.
3. De la solución madre se realizaron disoluciones seriadas con la metodología descrita por **Hernández et al. (2020)**: las disoluciones seriadas se realizan utilizando un vórtex y una micropipeta, obteniendo disoluciones desde  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  con 9 ml de agua destilada y 1 ml de solución madre.
4. Sembrar las disoluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  con 3 repeticiones en las cajas Petri con el medio de cultivo Agar Pikovskaya, usando la técnica de vertido en placa: con una micropipeta se adicionó 100  $\mu$ l de la disolución y con una espátula de Drigalsky esterilizada se dispersó los 100  $\mu$ l de la solución por toda la caja de Petri.
5. Posteriormente las cajas de Petri fueron incubadas a 28°C durante 48 horas (**Figura 3**).

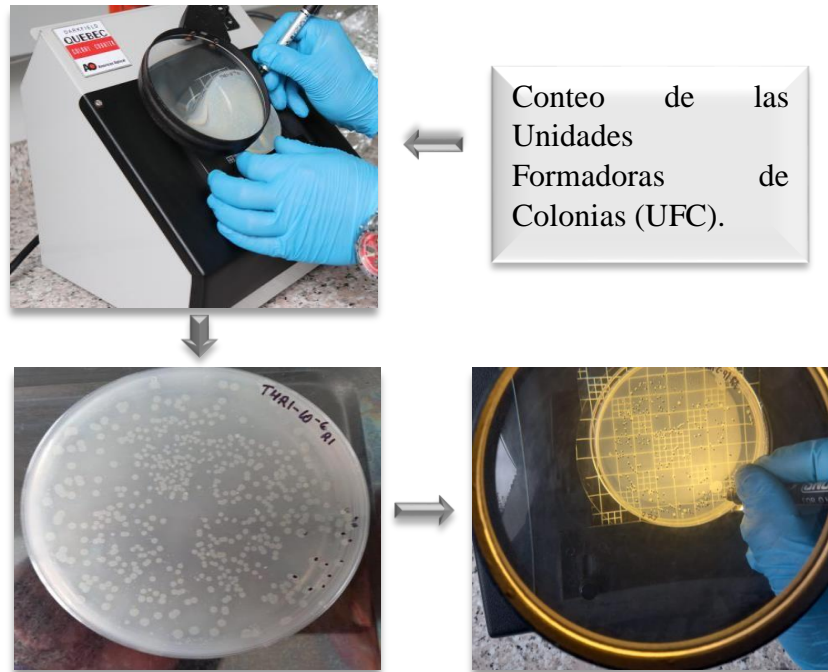


**Elaborado por:** David Ati, 2024.

**Figura 3.** Diagrama de actividades realizadas para el aislamiento de bacterias rizosféricas de *S. tuberosum* var. *Superchola*.

#### 3.5.1.4. Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

Transcurrido el periodo de incubación de 48 horas se realizó el conteo de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC), se observaron diversas colonias, pero se seleccionaron solo las que cumplieron con las normas empleadas por **Cuadrado et al. (2015)**, quienes manifestaron que al utilizar cajas Petri de 90 mm de diámetro el rango de colonia por placa debe estar entre 30 y 300 UFC para el caso de conteo de colonias bacterianas (**Figura 4**).



Elaborado por: David Ati, 2024.






**Figura 4.** Diagrama del conteo de UFC.g<sup>-1</sup> de suelo.

#### 1.5.2. Caracterizar las colonias y la morfología de los aislados bacterianos rizosféricos obtenidos

##### 1.5.2.1. Caracterización cultural de las colonias de los aislados bacterianos con capacidad solubilizadora de fosfatos

Para la caracterización cultural de los aislados bacterianos se tomaron en cuenta: forma, elevación, color, bordes, consistencia y textura y se realizó según lo establecido por **Vargas & Kuno (2014)** y se detalla en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Caracterización cultural de las colonias de los aislados bacterianos.

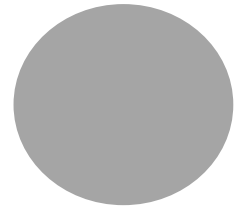
CARACTERÍSTICA	DESCRIPCIÓN	GRÁFICO	
Plana	A simple vista o con el estereoscopio se observa una elevación plana en la caja de Petri con medio de cultivo.		
Convexa	A simple vista o con el estereoscopio se observa una elevación que tiende a elevarse, denominada convexa en la caja de Petri con medio de cultivo.		
ELEVACIÓN	Elevada	A simple vista o con el estereoscopio se observa una elevación muy alta que sobresale en la colonia, en la caja de Petri con medio de cultivo.	
	Umbeliforme	A simple vista o con el estereoscopio se observa una elevación similar a una umbela o sombrilla, en la caja de Petri con medio de cultivo.	
	Umbilicada	A simple vista o con el estereoscopio se observa una elevación con la forma de ombligo hacía adentro, en la caja de Petri con medio de cultivo.	

---

**FORMA**

Circular

A simple vista o con el estereoscopio se observa en forma de circunferencia en la caja de Petri con medio de cultivo.



Filamentosa

A simple vista o con el estereoscopio se observa en forma de filamentos, en la caja de Petri con medio de cultivo.



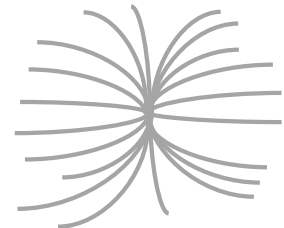
Irregular

A simple vista o con el estereoscopio se observa en forma irregular con bordes no definidos, en la caja de Petri con medio de cultivo.



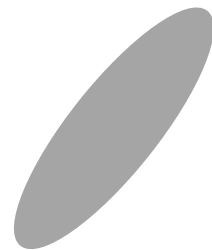
Rizoide

A simple vista o con el estereoscopio se observa una forma similar a una raíz, en la caja de Petri con medio de cultivo.



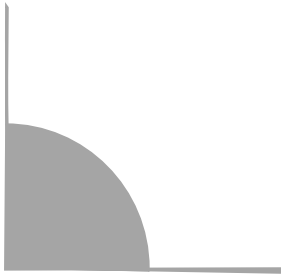
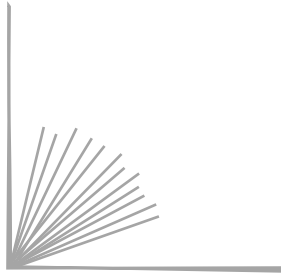
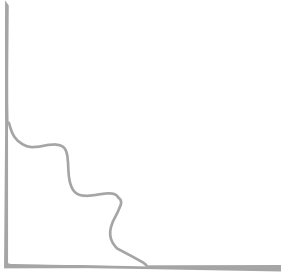
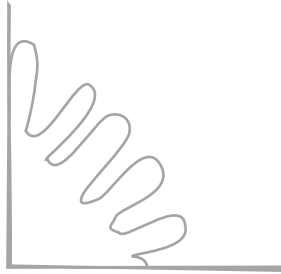
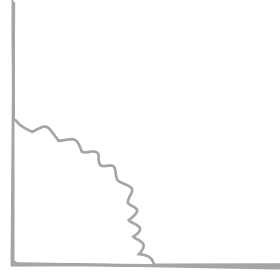
Fusiforme

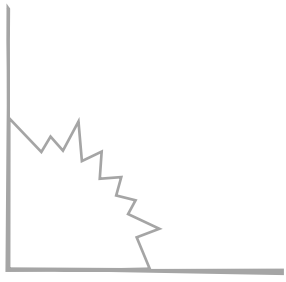
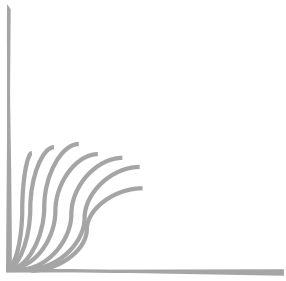
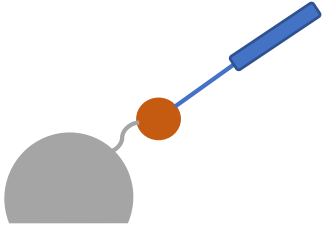
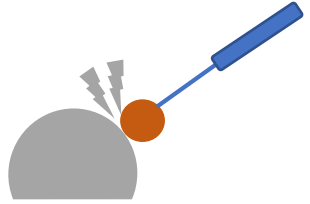
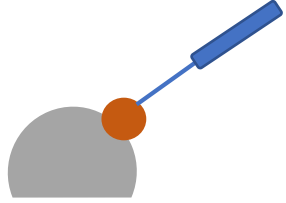

A simple vista o con el estereoscopio se observa una forma de huso (forma alargada, elipsoide), en la caja de Petri con medio de cultivo.


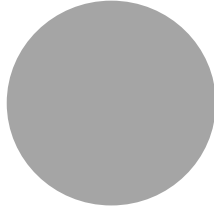




**BORDES**

Entero	A simple vista o con el estereoscopio se observa con bordes enteros (homogéneos en su recorrido), en la caja de Petri con medio de cultivo.	
Filamentoso	A simple vista o con el estereoscopio se observan finos filamentos en los alrededores de las colonias, en la caja de Petri con medio de cultivo.	
Ondulado	A simple vista o con el estereoscopio se observa con bordes curvados irregulares, en la caja de Petri con medio de cultivo.	
Lobulado	A simple vista o con el estereoscopio se observa con bordes lobulados parecidos a los ondulados, en la caja de Petri con medio de cultivo.	
Rizado	A simple vista o con el estereoscopio se observa con bordes en forma de rizos alrededor de la colonia, en la caja de Petri con medio de cultivo.	

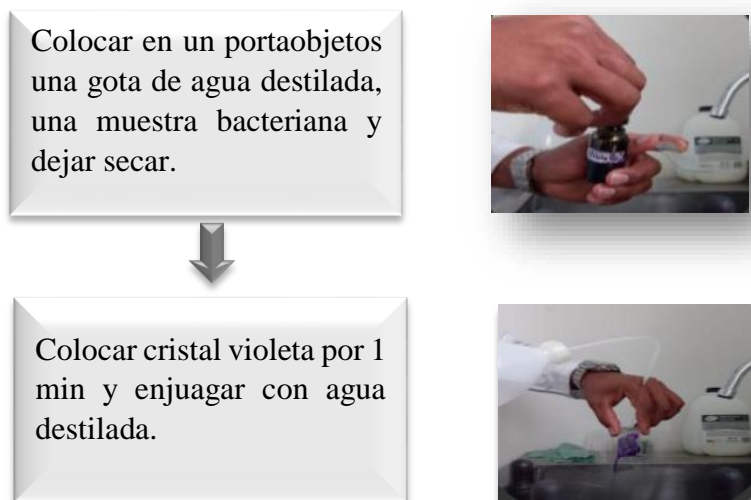
<b>BORDES</b>	Aserrado	A simple vista o con el estereoscopio se observa con márgenes con forma de dientes agudos, en la caja de Petri con medio de cultivo.	
	Rizoide	A simple vista o con el estereoscopio se observa con márgenes con forma de raíces interceptadas desde la colonia, en la caja de Petri con medio de cultivo	
<b>CONSISTENCIA</b>	Mucoide	Al emplear el asa bacteriana, muestra una consistencia viscosa en forma de moco.	
	Dura	Al emplear el asa bacteriana, muestra una consistencia compacta y dura.	
	Suave	Al emplear el asa bacteriana, muestra una consistencia suave.	
<b>COLOR</b>	Clave de colores Pantone	Utilización de la tabla de colores Pantone, para clasificarlos por color.	

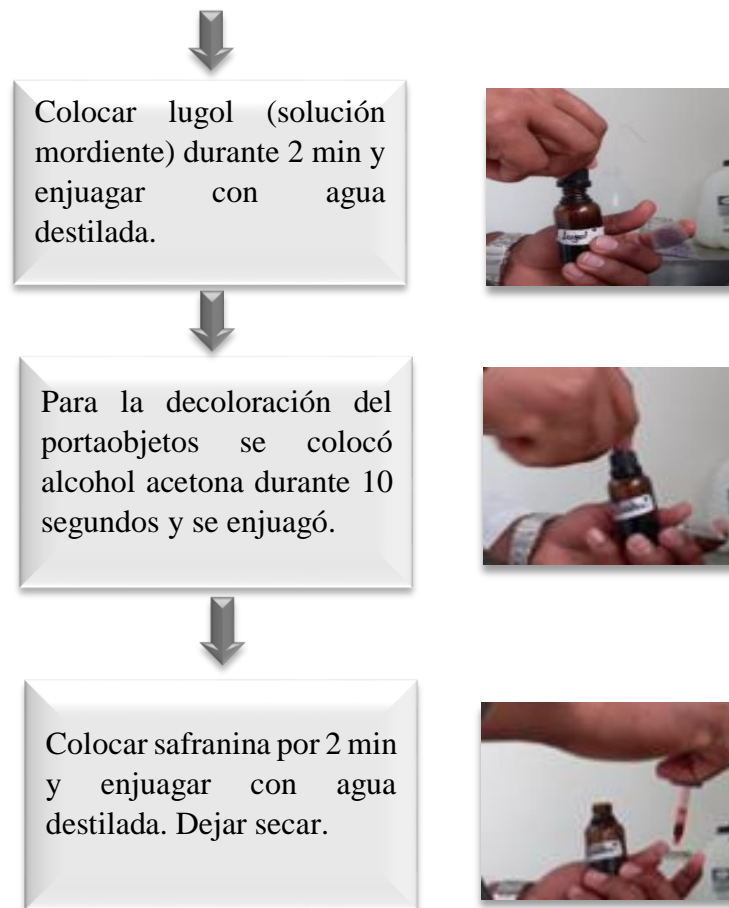
<b>TEXTURA</b>	Rugosa	La superficie de la colonia presenta a simple vista o con estereoscopio asperezas, pliegues o arrugas.	
	Lisa	La superficie de la colonia presenta a simple vista o con estereoscopio no presenta ningún tipo de arruga.	

**Elaborado por:** David Ati, 2024.

**1.5.2.2. Determinación morfológica bacteriana mediante Tinción de Gram**

La metodología utilizada para determinar la morfología bacteriana con Tinción de Gram fue la descrita por **Khan et al. (2018)**, inicialmente en un portaobjetos se colocó una muestra del aislado bacteriano, se añadió agua destilada y se dejó secar, luego se colocó una gota de cristal violeta por 1 minuto y se enjuagó con agua destilada, posteriormente se colocó Lugol (mordiente) por 2 minutos y se lavó, para la decoloración se utilizó alcohol acetona por 10 segundos y se decontó, finalmente se añadió safranina por 2 minutos, se enjuagó y se dejó secar (**Figura 5**).





**Elaborado por:** David Ati, 2024.

**Figura 5.** Diagrama de actividades realizadas para la determinación morfológica bacteriana con Tinción de Gram.

La denominación de bacterias Gram (+) o Gram (-) se realizó de acuerdo con las características descritas en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Componentes para la diferenciación de bacterias Gram (+) o Gram (-) con Tinción de Gram.



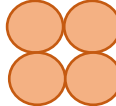

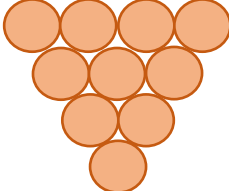
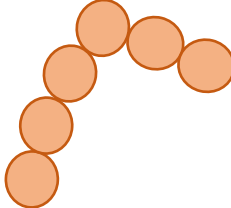
<b>Componentes</b>	<b>Gram (-)</b>	<b>Gram (+)</b>
Coloración con la tinción de Gram	Rojo – rosado	Violeta
Pared celular	Fina	Gruesa
Presencia de lipopolisacáridos en la pared celular	Si	No
Presencia de ácidos lipoteicoicos y teicoicos en la pared celular	No	Si

**Fuente:** Rodríguez y Arenas, 2018.

**1.5.2.3. Caracterización morfológica de las bacterias solubilizadoras de fosfatos**

Después de realizar la Tinción de Gram, en cada portaobjeto seco se colocaron gotas de aceite de inmersión para observar la morfología y agrupación bacteriana con ayuda del microscopio utilizando el lente objetivo 100X, para su clasificación se utilizaron los principios descritos por **Ruiz (2006)** detallados en la **Tabla 4**.

**Tabla 4.** Caracterización morfológica de las bacterias respecto a la forma de agrupación.

<b>FORMAS BÁSICAS DE LAS BACTERIAS Y SU CLASIFICACIÓN</b>	
<b>Cocos:</b> bacterias esféricas	
<b>Diplococos:</b> permanecen en pares después de su división.	
<b>Tétradas:</b> forma una agrupación de cocos en una disposición cuadrada (división en 2 direcciones).	
<b>Sarcinas:</b> Estas se las caracterizara por la división de los cocos en 3 direcciones perpendiculares, mostrando una agrupación de cocos en una disposición cúbica	
<b>Estafilococos:</b> se forman por agrupaciones desiguales de cuatro o más cocos, semejante a un racimo de uva	
<b>Streptococos:</b> Se caracterizarán por tener una división en un solo plano, formando secuencias de cuatro o más células en forma de cadena	

**BACILOS**

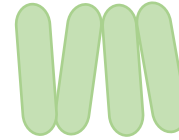
**Diplobacilos:** se refiere a dos bacilos agrupados en pares.



**Streptobacilos:** agrupación similar a una cadena se encuentran 4 o más bacilos.



**Empalizada:** Bacilos que se encuentran agrupados de lado a lado como palillos de fósforo.



**Cocobacilos:** con forma semicircular una semejante combina entre la forma de cocos y bacilos

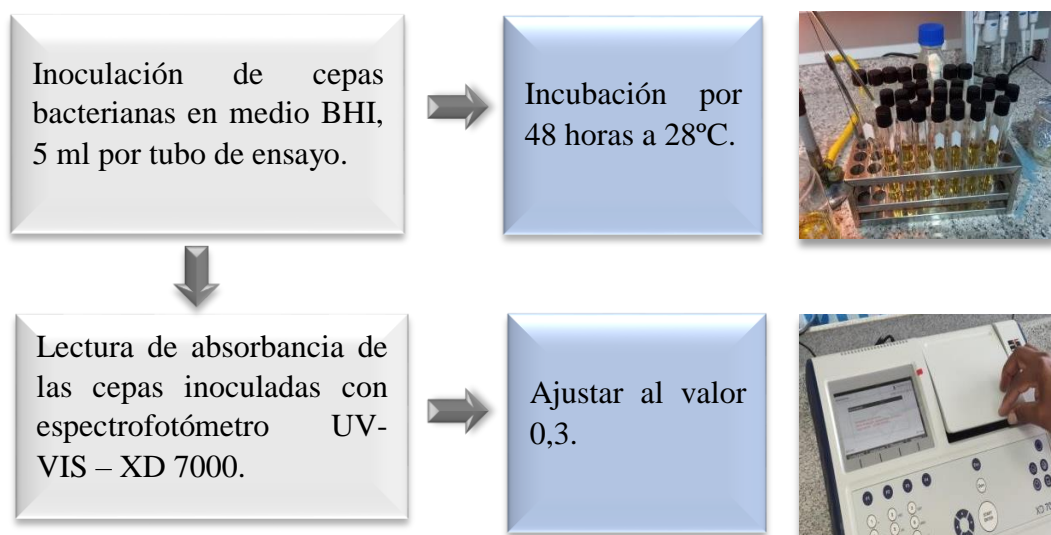


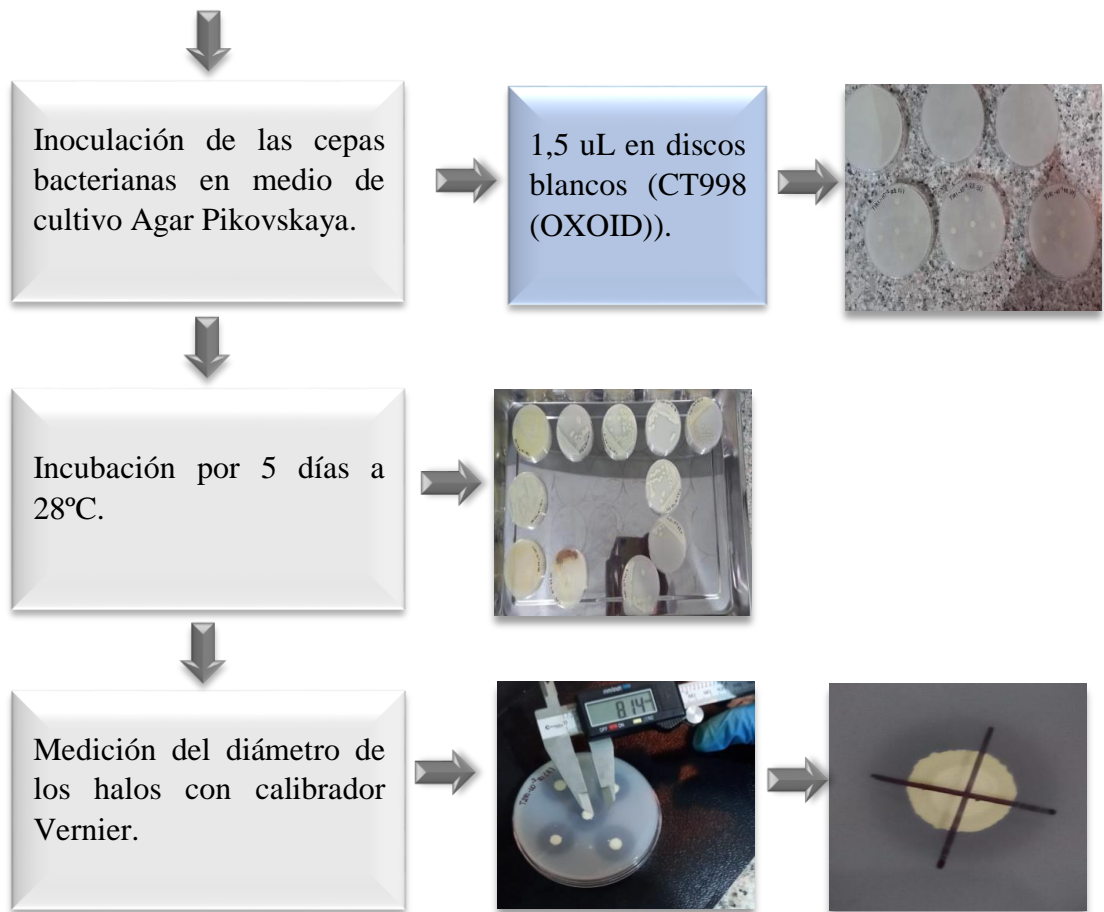
**Elaborado por:** David Ati, 2024.

**1.5.3. Evaluar la capacidad de solubilización de fosfatos *in vitro* de los aislados bacterianos rizosféricos**

**1.5.3.1. Evaluación cuantitativa de la solubilización de fosfatos**

Para la evaluación cuantitativa de la capacidad de solubilización de fosfatos se midió el Índice de Solubilización de Fosfatos (ISF) según lo descrito por **Gayosso et al. (2017)**: los aislados bacterianos se reaislaron en Agar Pikovskaya y se inocularon en tubos de ensayo que contenían 5 ml de BHI (Infusión Cerebro Corazón), se incubó por 48 horas a 28°C, posteriormente con el espectrofotómetro se tomó la absorbancia y se ajustó a 0.3. Las cepas bacterianas se aislaron en discos blancos (BLANK DISCS CT998 (OXOID)) con 1.5 uL (se realizaron 5 repeticiones por caja de Petri) y se incubaron a 28°C por 5 días (**Figura 6**).





**Elaborado por:** David Ati, 2024.

**Figura 6.** Diagrama de actividades realizadas para la evaluación cuantitativa de la capacidad de solubilización de fosfatos de las BSF.

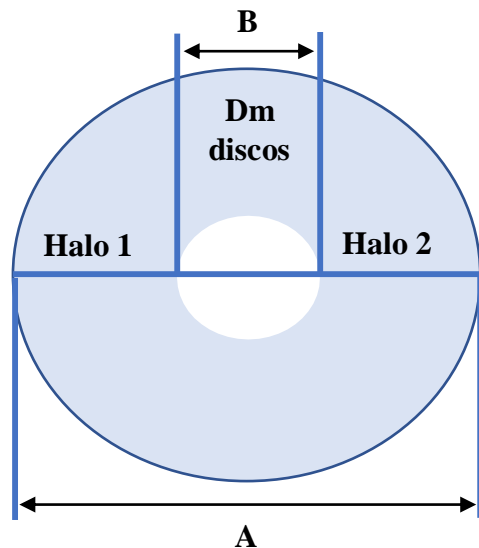
Para calcular el índice de solubilización de fosfatos (ISF) se utilizó la fórmula empleada por **Lara et al. (2011)**, esta fue modificada debido a que se utilizaron discos blancos de 6 mm de diámetro y se estableció de la siguiente manera:

$$\text{ISF} = \frac{A}{B}$$

En donde:

**A** = ((halo 1 + halo 2) + Diámetro discos)

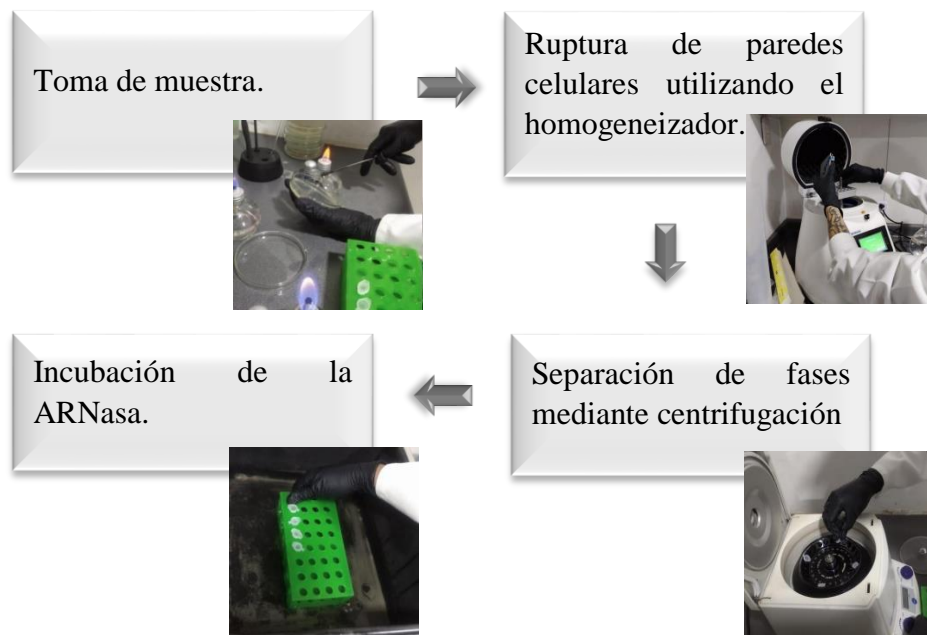
**B** = Diámetro discos (Dm discos).



#### 1.5.4. Identificar molecularmente los 10 aislados bacterianos rizosféricos que mayor capacidad de solubilizar fosfatos tengan, mediante la amplificación de los genes 16S rRNA con PCR y secuenciación

Para la identificación molecular de los aislados bacterianos se realizó el siguiente procedimiento:

1. Se realizó la extracción de ADN por métodos convencionales, utilizando aproximadamente 100 mg de muestra.
2. Se evaluó la integridad y calidad del ADN mediante espectrofotometría de micro volúmenes y visualización en gel de agarosa.
3. Se diluyó el ADN hasta una concentración de aproximadamente 20 ng/uL para su amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los primers 16S: 27F/1492R.
4. Los productos de PCR fueron purificados previo a la secuenciación por el método SANGER.
5. Las secuencias obtenidas fueron limpiadas y ensambladas usando programas bioinformáticos.
6. Se compararon las secuencias ensambladas de las muestras con la base de datos de nucleótidos de GenBank del NCBI para su identificación taxonómica (**Figura 7**).



**Elaborado por:** David Ati, 2024.

**Figura 7.** Diagrama de actividades realizadas para la extracción de ADN y secuenciación.



### 1.5.5. Determinar el efecto de los aislados bacterianos rizosféricos con mayor capacidad de solubilización sobre el crecimiento de vitroplantas de papa en invernadero

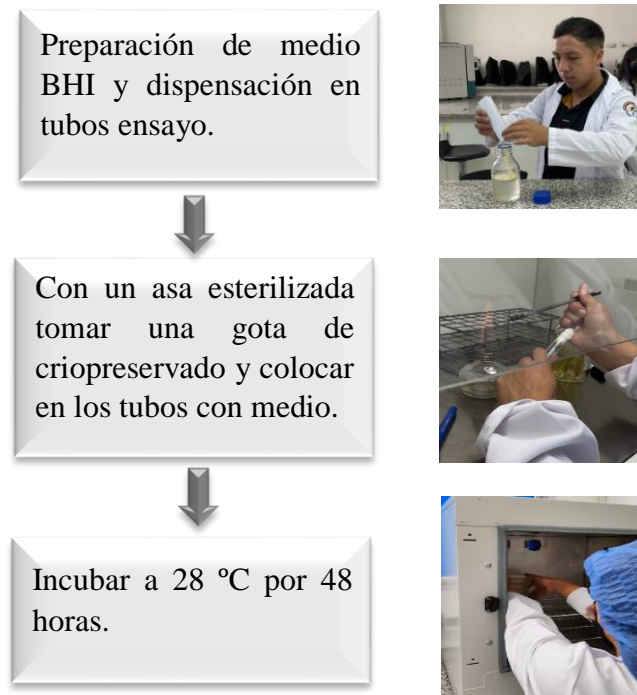
#### 1.5.5.1. Plantas *in vitro* de papa en invernadero

Para la plantación de vitroplantas de *S. tuberosum* en sustrato se realizó el siguiente procedimiento:

- Seleccionar plantas *in vitro* de papa de 10 cm de altura, vigorosas, con presencia de hojas y yemas activas.
- Eliminación de medio de cultivo mediante lavado en agua corriente.
- Realización de cortes para extraer segmentos nodales (o yemas) de 1 cm de longitud.
- Plantar los explantes en vasos de 8 onzas con sustrato libre de fósforo a base de turba rubia y perlita previamente esterilizado en autoclave.

#### 1.5.5.2. Activación de cepas bacterianas

Para activar las cepas bacterianas se preparó medio de cultivo BHI, se esterilizó en autoclave y se dispensó en tubos de ensayo. En cámara de flujo laminar, con un asa esterilizada tomar una gota de criopreservado e inocularlo en el medio contenido en los tubos de ensayo. Incubar por 48 horas a 28°C (**Figura 8**).



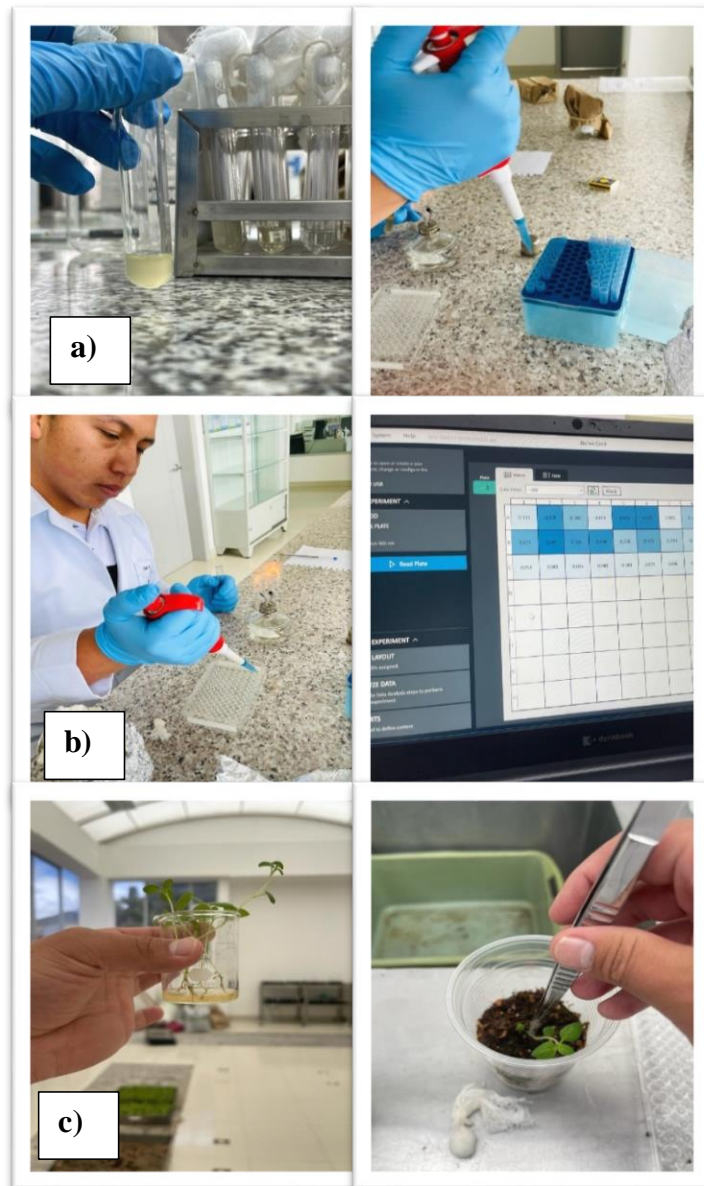
**Elaborado por:** David Ati, 2024.

**Figura 8.** Diagrama de actividades realizadas para la activación de cepas bacterianas en medio de cultivo BHI.

### 1.5.5.3. Medición en espectrofotómetro e inoculación de cepas bacterianas en vitroplantas de *S. tuberosum*

La medición de la absorbancia e inoculación de cepas bacterianas en vitroplantas de papa se realizó de la siguiente manera:

- Colocar en una cubeta plástica para espectrofotómetro y llevar a una absorbancia de 0,1 a 600 nm.
- A partir de estas suspensiones tomar 10 ml.
- Sumergir la raíz de las vitroplantas en cada tratamiento por 30 minutos y plantarlas en los vasos con sustrato a base de turba. Acorde con la **Figura 9**.



**Elaborado por:** David Ati, 2024.

**Figura 9.** Diagrama de actividades realizadas para la medición en espectrofotómetro e inoculación de cepas bacterianas en vitroplantas de *S. tuberosum* en invernadero.

### 3.6. Población o muestra

Se realizaron 4 tratamientos en relación con las muestras de suelo tomadas en los cantones Quero (caserío El Placer), Mocha (Caserío Pinguilí), Ambato (comunidad Llangahua) y Píllaro (barrio Santa Rita) con 5 repeticiones (1 tubérculo de papa sembrado por repetición) = 20 plantas de papas más un testigo sin presencia de sustrato.

De cada tratamiento se tomó el 10% para evaluar las variables respuesta.

#### 3.6.1. Tratamientos

**3.6.1.1. Objetivo N° 1:** Aislar bacterias rizosféricas con la capacidad de solubilizar fosfatos a partir de raíces de *S. tuberosum*.

**Factor N° 1:** Influencia de muestras de suelo de diferentes localidades en el aislamiento de bacterias rizosféricas con capacidad de solubilizar fosfatos a partir de raíces de *S. tuberosum*.

- T1: Muestra de suelo del cantón Quero (caserío El Placer).
- T2: Muestra de suelo del cantón Mocha (caserío Pinguilí).
- T3: Muestra de suelo del cantón Ambato (comunidad Llangahua).
- T4 Muestra de suelo del cantón Píllaro (barrio Santa Rita).
- C: Control (Sin sustrato).

**3.6.1.2. Objetivo N° 2:** Caracterizar las colonias y la morfología de los aislados bacterianos rizosféricos obtenidos.

**Factor N° 1:** Influencia de muestras de suelo de diferentes localidades en las características culturales de aislados bacterianos con capacidad solubilizadora de fosfatos.

- T1: 7 aislados bacterianos del cantón Quero (caserío El Placer).
- T2: 9 aislados bacterianos del cantón Mocha (caserío Pinguilí).
- T3: 10 aislados bacterianos del cantón Ambato (comunidad Llangahua).
- T4: 10 aislados bacterianos del cantón Píllaro (barrio Santa Rita).
- C: 4 aislados bacterianos del control (Sin sustrato). (**Tabla 5**).

**Factor N° 2:** Influencia de muestras de suelo de diferentes localidades en las características morfológicas de aislados bacterianos con capacidad solubilizadora de fosfatos.

- T1: 7 aislados bacterianos del cantón Quero (caserío El Placer).
- T2: 9 aislados bacterianos del cantón Mocha (caserío Pinguilí).
- T3: 10 aislados bacterianos del cantón Ambato (comunidad Llangahua).
- T4: 10 aislados bacterianos del cantón Píllaro (barrio Santa Rita).
- C: 4 aislados bacterianos del control (Sin sustrato). (**Tabla 5**).

**Tabla 5.** Aislados bacterianos de cuatro localidades de la provincia de Tungurahua.

<b>AISLADOS BACTERIANOS DE CUATRO LOCALIDADES DE LA PROVINCIA DE TUNGURAHUA</b>	
Cantón Quero (caserío El Placer).	CC-FCAGP-BSF1, CC-FCAGP-BSF2, CC-FCAGP-BSF3, CC-FCAGP-BSF4, CC-FCAGP-BSF5, CC-FCAGP-BSF6, CC-FCAGP-BSF7, CC-FCAGP-BSF8
Cantón Mocha (caserío Pinguilí).	CC-FCAGP-BSF9, CC-FCAGP-BSF10, CC-FCAGP-BSF11 CC-FCAGP-BSF12, CC-FCAGP-BSF13, CC-FCAGP-BSF14 CC-FCAGP-BSF15, CC-FCAGP-BSF16
Cantón Ambato (comunidad Llangahua).	CC-FCAGP-BSF17, CC-FCAGP-BSF18, CC-FCAGP-BSF19, CC-FCAGP-BSF20, CC-FCAGP-BSF21, CC-FCAGP-BSF22, CC-FCAGP-BSF23, CC-FCAGP-BSF24, CC-FCAGP-BSF25, CC-FCAGP-BSF26
Cantón Píllaro (barrio Santa Rita).	CC-FCAGP-BSF27, CC-FCAGP-BSF28, CC-FCAGP-BSF29, CC-FCAGP-BSF30, CC-FCAGP-BSF31, CC-FCAGP-BSF32, CC-FCAGP-BSF33, CC-FCAGP-BSF34, CC-FCAGP-BSF35, CC-FCAGP-BSF36
Control (Sin sustrato).	CC-FCAGP-BSF37, CC-FCAGP-BSF38, CC-FCAGP-BSF39, CC-FCAGP-BSF40

**Elaborado por:** David Ati, 2024.

**3.6.1.3. Objetivo N° 3:** Evaluar la capacidad de solubilización de fosfatos *in vitro* de los aislados bacterianos rizosféricos.

**Factor N° 1:** Influencia de muestras de suelo de diferentes localidades en el tamaño de los halos de solubilización e índice de solubilización de fosfatos de aislados bacterianos con capacidad solubilizadora de fosfatos.

- T1: Aislados bacterianos del cantón Quero (caserío El Placer).
- T2: Aislados bacterianos del cantón Mocha (caserío Pinguilí).
- T3: Aislados bacterianos del cantón Ambato (comunidad Llangahua).
- T4: Aislados bacterianos del cantón Píllaro (barrio Santa Rita).
- C: Aislados bacterianos del control (Sin sustrato). (**Tabla 5**).

**3.6.1.4. Objetivo N° 4:** Identificar molecularmente los 10 aislados bacterianos rizosféricos que mayor capacidad de solubilizar fosfatos tengan, mediante la amplificación de los genes 16S rRNA con PCR y secuenciación.

**Factor N° 1:** Identificación molecular de aislados bacterianos.

Los tratamientos se detallan en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Aislados bacterianos con mayor capacidad de solubilización de fosfatos.

<b>AISLADOS BACTERIANOS CON MAYOR CAPACIDAD DE SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS</b>	
CC-FCAGP-BSF10	CC-FCAGP-BSF11
CC-FCAGP-BSF12	CC-FCAGP-BSF13
CC-FCAGP-BSF14	CC-FCAGP-BSF15
CC-FCAGP-BSF18	CC-FCAGP-BSF20
CC-FCAGP-BSF26	CC-FCAGP-BSF31

**Elaborado por:** David Ati, 2024.

**3.6.1.5. Objetivo N° 5:** Determinar el efecto de los aislados bacterianos rizosféricos con mayor capacidad de solubilización sobre el crecimiento de vitroplantas de papa en invernadero.

**Factor N° 1:** Influencia de la inoculación de cepas bacterianas rizosféricas con capacidad de solubilizar fosfatos sobre el área foliar de vitroplantas de *S. tuberosum* var. Superchola establecidas en invernadero.

Los tratamientos se detallan en la **Tabla 7**.

**Factor N° 2:** Influencia de la inoculación de cepas bacterianas rizosféricas con capacidad de solubilizar fosfatos sobre la masa fresca de vitroplantas de *S. tuberosum* var. Superchola en invernadero.

Los tratamientos se detallan en la **Tabla 7**.

**Factor N° 3:** Influencia de la inoculación de cepas bacterianas rizosféricas con capacidad de solubilizar fosfatos sobre la masa seca de vitroplantas de *S. tuberosum* var. Superchola en invernadero.

Los tratamientos se detallan en la **Tabla 7**.

**Factor N° 4:** Influencia de la inoculación de cepas bacterianas rizosféricas con capacidad de solubilizar fosfatos sobre el índice de área foliar de vitroplantas de *S. tuberosum* var. Superchola en invernadero.

Los tratamientos se detallan en la **Tabla 7**.

**Tabla 7.** Cepas bacterianas inoculadas en vitroplantas de papa.

<b>CEPAS BACTERIANAS INOCULADAS EN VITROPLANTAS DE <i>S. tuberosum</i> var Superchola.</b>
CC-FCAGP-BSF31
CC-FCAGP-BSF26
CC-FCAGP-BSF20
CC-FCAGP-BSF18
CC-FCAGP-BSF15
CC-FCAGP-BSF14
CC-FCAGP-BSF13
CC-FCAGP-BSF12
CC-FCAGP-BSF11
CC-FCAGP-BSF10
Control

**Elaborado por:** David Ati, 2024.

### **3.7. Recolección de información**

Los datos obtenidos de las evaluaciones de cada experimento fueron registrados en un cuaderno de apuntes y en hojas de cálculo de Excel.

### **3.8. Procesamiento de la información y análisis estadístico**

Los datos registrados fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS versión 26.0. Para ello se evaluaron los criterios de distribución normal mediante la prueba de Kolmogorov Smirnov 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 Tuckey. Para las variables cuyos datos no cumplieron con los requerimientos de normalidad ni homogeneidad de varianza se utilizó la prueba de Kruskal Wallis completada con la prueba U de Mann Whitney. Para un nivel de significación de un 95%.

### **3.9. Variables respuesta o resultados alcanzados**

#### **Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfatos**

- Cantidad de Unidades Formadoras de Colonia por gramo de suelo (UFC.g<sup>-1</sup> de suelo).

#### **Características culturales de las colonias de los aislados bacterianos**

- Elevación, forma, bordes, brillo, color y textura de las colonias.

### **Características morfológicas de los aislados bacterianos**

- Morfología, agrupación y reacción de Gram.

### **Capacidad solubilizadora de fosfatos de rizobacterias**

- Tamaño de halos de solubilización e índice de solubilización de fosfatos.

### **Géneros y especies de las bacterias con mayor capacidad de solubilización de fosfatos**

- Especies de los 10 aislados bacterianos con mayor capacidad de solubilización de fosfatos.

### **Características morfofisiológicas de vitroplantas de papa en invernadero**

- Área foliar (dm<sup>2</sup>).
- Masa fresca (g).
- Masa seca (g).
- Índice de área foliar.

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Aislamiento de bacterias rizosféricas con la capacidad de solubilizar fosfatos a partir de raíces de *S. tuberosum*

##### 4.1.1. Cantidad de UFC por gramo de suelo de las cuatro localidades de la provincia de Tungurahua (El Placer – cantón Quero, Pinguilí – cantón Mocha, Llangahua – Ambato y la localidad de Santa Rita – Píllaro)

A las 48 horas de incubación de los tratamientos, se observó que la muestra del barrio Santa Rita del cantón Píllaro fue la que obtuvo la mayor cantidad de Unidades Formadoras de Colonias por gramo de suelo ( $9,72 \times 10^9$  UFC.  $g^{-1}$  de suelo) a comparación con el control con un valor de  $1,58 \times 10^5$  (Tabla 8).

**Tabla 8.** Influencia de muestras de suelo de diferentes localidades (Quero, Mocha, Ambato, Píllaro) de la provincia de Tungurahua sobre el número de Unidades Formadoras de Colonias por gramo de suelo en medio de cultivo Agar Pikovskaya.

TRATAMIENTOS	UFC. $g^{-1}$ de suelo	
	$\bar{x}$	Rango promedio
Cantón Píllaro (barrio Santa Rita)	$9,72 \times 10^9$	41,00 a
Cantón Quero (caserío El Placer)	$5,66 \times 10^6$	27,44 b
Cantón Ambato (comunidad Llangahua)	$4,21 \times 10^6$	21,56 bc
Cantón Mocha (caserío Pinguilí)	$2,057 \times 10^6$	17,17 c
Control (Sin sustrato).	$1,58 \times 10^5$	7,83 c

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras diferentes, difieren según la prueba H de Kruskal Wallis complementada con la prueba U de Mann Whitney para  $p < 0,05$ .

**Elaborado por:** David Ati, 2024.

El crecimiento poblacional de los microorganismos está influenciado por diversos factores como la cantidad de materia orgánica, temperatura, pH, humedad, etc. (Mendoza-Hernández et al., 2019). Paco-Pérez et al. (2019) en su estudio evidencian que los grupos microbianos incrementan sus poblaciones a medida que las condiciones de humedad de suelo y temperatura mejoran.



Los exudados de las raíces actúan como sustancias químicas atrayentes y repelentes, lo cual regula el crecimiento de las comunidades microbianas en el suelo (**Torres-Guerrero et al., 2013**). Se considera que el alto contenido bacteriológico principalmente en el suelo del cantón Píllaro (barrio Santa Rita) se podría deber a las características de este, como por ejemplo la cantidad de materia orgánica presente (valores entre el 2 – 3% según **CES – GFA (2011)**). **Hernández et al. (2013)** mencionaron que las prácticas agrícolas también influyen en las poblaciones bacterianas del suelo, varios tipos de labranzas y la utilización de productos químicos reducen significativamente la población bacteriana.

Los grupos microbianos, su actividad metabólica y el conteo de las poblaciones de microorganismos más importantes en un suelo, son factores importantes para conocer la calidad del suelo y el efecto de las prácticas agrícolas (**Cañón-Cortázar et al., 2012**).

En la investigación realizada por **Logroño et al. (2015)** se evaluó la cantidad de UFC.g<sup>-1</sup> de suelo de microorganismos de la región amazónica y de la región altoandina, y encontraron que en existen  $7,0 \times 10^7$  UFC.g<sup>-1</sup> suelo en la región amazónica, mientras que en la región andina  $1,2 \times 10^8$  UFC.g<sup>-1</sup> suelo. **Paucar et al. (2012)** al evaluar la población microbiana de los suelos de la región Sierra ecuatoriana (provincias de Tungurahua, Cotopaxi, Pichincha y Cañar) encontraron que existen  $2,30 \times 10^6$  UFC.g<sup>-1</sup> suelo seco, la provincia de Tungurahua obtuvo un valor de  $1,24 \times 10^5$  UFC.g<sup>-1</sup> suelo seco en zonas productoras de mora. Sin embargo, en la presente investigación se obtuvieron  $9,72 \times 10^9$  UFC.g<sup>-1</sup> de suelo en la zona productora de papa del barrio Santa Rita del cantón Píllaro provincia de Tungurahua, lo que permite afirmar que superan a los suelos de las regiones amazónicas y alto andina.

## **4.2. Caracterización de las colonias y la morfología de los aislados bacterianos rizoféricos obtenidos**

### **4.2.1. Caracterización cultural de las colonias y morfología de los aislados bacterianos de diferentes localidades (Quero, Mocha, Ambato, Píllaro) de la provincia de Tungurahua**

A las 48 horas de incubación de los aislados bacterianos se presentaron las siguientes características culturales en las colonias:

En el caserío El Placer – cantón Quero, por la elevación, el 14% fueron planas, 14% convexas, 29% umbilicadas y 43% umbeliforme; por su forma, el 29% fueron irregulares y el 71% circulares; por sus bordes, el 14% presentaron bordes lobulados, 14% rizados y el 72% tuvobordes enteros; por su consistencia, el 43% fueron mucoides y el 57% fueron suaves; por su textura, el 15% fueron rugosas y el 85% lisas; por su brillo, el 43 % no presentaron brillo y el 57% presentaron brillo al ser expuestas a la luz.

En el caserío Pinguilí – cantón Mocha, por la elevación, el 22% fueron umbilicadas, 34% convexas y el 44% umbeliformes; por su forma, el 11% fueron irregulares, 33% circulares y el 56% fusiformes; por sus bordes, el 11% presentaron bordes rizados y el 89% enteros; por su consistencia, el 44% fueron suaves y el 56% mucoides; por su textura, el 100% fueron lisas; por su brillo, el 100% presentaron brillo al ser expuestas a la luz.

En la comunidad Llangahua – cantón Ambato, por la elevación, el 10% fueron umbilicadas, 10% umbiliformes, 40% convexas y el 40% fueron planas; por su forma, el 10% fueron fusiformes y el 90% circulares; por sus bordes, el 100% presentaron bordes enteros; por su consistencia, el 100% fueron suaves; por su textura, el 100% fueron lisas; por su brillo, el 100% presentaron brillo al ser expuestas a la luz.

En el barrio Santa Rita – cantón Píllaro, por la elevación, el 10% fue umbeliforme, 10% umbilicadas, 20% convexas y el 60% planas; por su forma, el 10% fue irregular, 10% fusiforme y el 80% circular; por sus bordes, el 30% presentaron bordes irregulares y el 70% bordes enteros; por su consistencia, el 100% fueron suaves; por su textura, el 20% fueron rugosas y el 80% lisas; por su brillo, el 100% presentaron brillo al ser expuestas a la luz.

En el tratamiento control sin sustrato, por la elevación, el 25% fueron planas, 25% convexas y 50% umbeliformes; por su forma, el 25% fueron fusiformes y el 75% circulares; por sus bordes, el 100% presentaron bordes enteros; por su consistencia, el 100% fueron suaves; por su textura, el 100% fueron lisas; por su brillo, el 100% presentaron brillo al ser expuestas a la luz.

Acorde con la **Tabla 9** y **Figura 10**.

**Tabla 9.** Caracterización cultural de las colonias de los aislados bacterianos de diferentes localidades (Quero, Mocha, Ambato, Píllaro) de la provincia de Tungurahua en medio de cultivo Agar Pikovskaya.

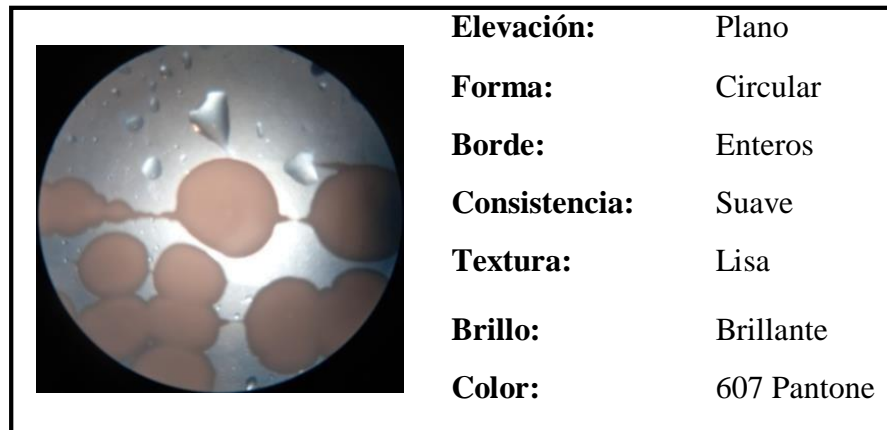
AISLADOS BACTERIANOS		CARACTERÍSTICAS CULTURALES						
		Elevación	Forma	Borde	Consistencia	Textura	Brillo	Código Pantone
Cantón Quero - caserío El Placer	CC-FCAGP-BSF1	#	+++	*****	S	L	b	374
	CC-FCAGP-BSF2	#####	+	*	S	L	s	607
	CC-FCAGP-BSF3	#####	+	*	M	L	b	4525
	CC-FCAGP-BSF4	#####	+	*	M	R	b	4525
	CC-FCAGP-BSF5	##	+++	R*	M	L	b	4525
	CC-FCAGP-BSF6	###	+	*	S	L	s	607
	CC-FCAGP-BSF7	###	+	*	S	L	s	607
	CC-FCAGP-BSF8	###	+++	R*	M	L	b	698
Cantón Mocha - caserío Pinguilí	CC-FCAGP-BSF9	#####	+	*	M	L	b	607
	CC-FCAGP-BSF10	##	f+	*	M	L	b	4525
	CC-FCAGP-BSF11	###	f+	*	S	L	b	698
	CC-FCAGP-BSF12	##	f+	*	S	L	b	374
	CC-FCAGP-BSF13	###	f+	*	S	L	b	4525
	CC-FCAGP-BSF14	###	f+	*	M	L	b	4525
	CC-FCAGP-BSF15	#####	+	*	S	L	b	374
	CC-FCAGP-BSF16	##	+	*	M	L	b	698

Cantón Ambato – comunidad Llangahua	CC-FCAGP-BSF17	###	+	*	S	L	b	374
	CC-FCAGP-BSF18	#	f+	*	S	L	b	102
	CC-FCAGP-BSF19	####	+	*	S	L	b	110
	CC-FCAGP-BSF20	#	+	*	S	L	b	374
	CC-FCAGP-BSF21	##	+	*	S	L	b	607
	CC-FCAGP-BSF22	##	+	*	S	L	b	698
	CC-FCAGP-BSF23	#	+	*	S	L	b	401
	CC-FCAGP-BSF24	##	+	*	S	L	b	600
	CC-FCAGP-BSF25	##	+	*	S	L	b	607
	CC-FCAGP-BSF26	#	+	*	S	L	b	698
Cantón Píllaro - barrio Santa Rita	CC-FCAGP-BSF27	#	+	*	S	L	b	401
	CC-FCAGP-BSF28	#	+	*	S	L	b	607
	CC-FCAGP-BSF29	###	+	*	S	L	b	401
	CC-FCAGP-BSF30	#	+	L*	S	R	b	401
	CC-FCAGP-BSF31	##	+	*	S	L	b	600
	CC-FCAGP-BSF32	####	f+	*	S	L	b	401
	CC-FCAGP-BSF33	##	+	*	S	L	b	600
	CC-FCAGP-BSF34	#	+	L*	S	R	b	374
	CC-FCAGP-BSF35	#	+	*	S	L	b	401
	CC-FCAGP-BSF36	#	+++	L*	S	L	b	401
Control (Sin suelo)	CC-FCAGP-BSF37	##	+	*	S	L	b	401
	CC-FCAGP-BSF38	####	f+	*	S	L	b	401
	CC-FCAGP-BSF39	###	+	*	S	L	b	352
	CC-FCAGP-BSF40	#	+	*	S	L	b	374

**Descripción:** Elevación: plano (#), Convexo (##), umbeliforme (###), umbilicado (####). Forma: circular (+), filamentosa (++), irregular (+++), rizoide (++++), fusiforme (f+). Borde: entero (\*), filamentoso (\*\*), ondulado (\*\*\*), aserrado (\*\*\*\*), lobulado (L\*), rizado (R\*). Consistencia: suave (S), mucoide (M). Textura: lisa (L), rugosa (R). Brillo: sin brillo (s), con brillo (b). Color: clave Pantone.

**Elaborado por:** David Ati, 2024.

En las características culturales de las colonias de los aislados bacterianos se consideraron: elevación, forma, bordes, consistencia, textura, brillo y color como se observa en la **Figura 10**.



**Elaborado por:** David Ati, 2024.

**Figura 10.** Caracterización cultural de las colonias de los aislados bacterianos.

En cuanto a la morfología de los aislados bacterianos, se presentó lo siguiente:

En el caserío El Placer – cantón Quero, el 29% fueron cocos, 29% bacilos cortos y 42% bacilos largos; por su agrupación el 14% fueron en sarcinas, 14% estreptobacilos, 14% bacilos en empalizada, 29% diplococos y el 29% diplobacilos; y respecto a la Reacción de Gram el 43% fueron bacterias Gram (+) y el 57% bacterias Gram (-).

En el caserío Pinguili – cantón Mocha, el 11% fueron bacilos largos y 89% bacilos cortos; por su agrupación, el 44% fueron bacilos en empalizada y el 56% diplobacilos; y respecto a la Reacción de Gram el 100% fueron bacterias Gram (-).

En la comunidad Llangahua – cantón Ambato, el 10% fueron bacilos cortos, 40% cocos y 50% bacilos; por su agrupación, el 10% fueron diplococos, 10% sarcinas, 20% estreptobacilos, 30% diplobacilos y 30% bacilos en empalizada; y respecto a la Reacción de Gram el 10% fueron bacterias Gram (+) y el 90% bacterias Gram (-).

En el barrio Santa Rita – cantón Píllaro, el 10% fueron cocos, 30% bacilos y 60% bacilos cortos; por su agrupación el 10% fueron diplococos, 20% bacilos en empalizada y 70% diplobacilos; y respecto a la Reacción de Gram el 20% fueron bacterias Gram (-) y el 80% bacterias Gram (+).

En el tratamiento control sin sustrato, el 50% fueron bacilos cortos y el 50% bacilos; por su agrupación, el 25% fueron diplobacilos y el 75% bacilos en empalizada; y respecto a la Reacción de Gram, el 25% fueron bacterias Gram (+) y el 75% bacterias Gram (-). Acorde a la detallado en la **Tabla 10**.

**Tabla 10.** Caracterización morfológica de los aislados bacterianos de diferentes localidades (Quero, Mocha, Ambato, Píllaro) de la provincia de Tungurahua en medio de cultivo Agar Pikovskaya.

AISLADOS BACTERIANOS		CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
		Morfología	Agrupación	Reacción de Gram
Cantón Quero - caserío El Placer	CC-FCAGP-BSF1	B	DB	(-)
	CC-FCAGP-BSF2	BL	EB	(-)
	CC-FCAGP-BSF3	BL	EMP	(-)
	CC-FCAGP-BSF4	B	DB	(-)
	CC-FCAGP-BSF5	C	SAR	(+)
	CC-FCAGP-BSF6	BL	DC	(+)
	CC-FCAGP-BSF7	C	DC	(+)
	CC-FCAGP-BSF8	B	EMP	(-)
Cantón Mocha -caserío Pinguilí	CC-FCAGP-BSF9	B	DB	(-)
	CC-FCAGP-BSF10	B	DB	(-)
	CC-FCAGP-BSF11	BL	DB	(-)
	CC-FCAGP-BSF12	B	EMP	(-)
	CC-FCAGP-BSF13	B	DB	(-)
	CC-FCAGP-BSF14	B	EMP	(-)
	CC-FCAGP-BSF15	B	EMP	(-)
	CC-FCAGP-BSF16	B	DB	(-)
Cantón Ambato – comunidad Llangahua	CC-FCAGP-BSF17	B	EB	(-)
	CC-FCAGP-BSF18	B	EB	(-)
	CC-FCAGP-BSF19	B	EMP	(-)
	CC-FCAGP-BSF20	C	EMP	(-)
	CC-FCAGP-BSF21	C	DC	(-)
	CC-FCAGP-BSF22	B	DB	(-)
	CC-FCAGP-BSF23	BC	DB	(-)
	CC-FCAGP-BSF24	C	SAR	(+)
	CC-FCAGP-BSF25	B	DB	(-)
	CC-FCAGP-BSF26	C	EMP	(-)

Cantón Pillaro - barrio Santa Rita	CC-FCAGP-BSF27	B	DB	(-)
	CC-FCAGP-BSF28	BC	DB	(-)
	CC-FCAGP-BSF29	B	EMP	(+)
	CC-FCAGP-BSF30	B	DB	(-)
	CC-FCAGP-BSF31	BC	EMP	(-)
	CC-FCAGP-BSF32	C	DC	(+)
	CC-FCAGP-BSF33	BC	DB	(-)
	CC-FCAGP-BSF34	BC	DB	(-)
	CC-FCAGP-BSF35	BC	DB	(-)
CC-FCAGP-BSF36	BC	DB	(-)	
Control (Sin suelo)	CC-FCAGP-BSF37	BL	DB	(-)
	CC-FCAGP-BSF38	B	EMP	(+)
	CC-FCAGP-BSF39	BL	EMP	(-)
	CC-FCAGP-BSF40	B	EMP	(-)

**Descripción:** Morfología: bacilos (B), bacilos cortos (BC), bacilos largos (BL), cocos (C), coco bacilos (CB). Agrupación: diplococo (DC), diplobacilos (DB), sarcina (SAR), estreptobacilo (EB), bacilos en empalizada (EMP).

**Elaborado por:** David Ati, 2024.

En la caracterización morfológica de los aislados bacterianos se tomaron en cuenta: morfología, agrupación y reacción de Gram, como se observa en la **Figura 11**.



**Elaborado por:** David Ati, 2024.

**Figura 11.** Morfología de los aislados bacterianos.

**Mosier-Boss (2017)** manifestó que la tinción de Gram diferencia las bacterias por sus propiedades físicas y químicas al detectar el peptidoglicano de las paredes celulares, las bacterias Gram (+) poseen una capa gruesa de peptidoglicano, aproximadamente un 90%, mientras que las bacterias Gram (-) tienen una capa delgada, alrededor de un

10 al 20%. Como resultado, las bacterias Gram (+) durante la tinción de Gram se tiñen de violeta debido a la retención del tinte cristal violeta, por el contrario, las bacterias Gram (-) no pueden retenerlo y se tiñen de rosado.

**Jorquera et al. (2010)** mencionaron que las enzimas fitasas tienen una tasa alta de solubilización de fosfatos, las bacterias Gram (+) de los géneros *Paenibacillus* y *Bacillus* son resistentes a diversos factores como pH muy ácidos, en donde se desarrollan elevadas cantidades de fitatos, los cuales a su vez resultan benéficos al ser la principal fuente de fósforo para estas bacterias.

#### 4.3. Evaluación de la capacidad de solubilización de fosfatos *in vitro* de los aislados bacterianos rizosféricos

Los aislados bacterianos obtenidos del suelo del cantón Mocha - caserío Pinguilí fueron los que presentaron una mayor cantidad de halos de solubilización y también un mayor índice de solubilización de fosfato a comparación de los demás tratamientos (**Tabla 11**).

**Tabla 11.** Halos de solubilización e índice de solubilización de fosfato de aislados bacterianos de diferentes localidades (Quero, Mocha, Ambato, Píllaro) de la provincia de Tungurahua en medio de cultivo Agar Pikoskaya.

TRATAMIENTOS	Halos de solubilización de fosfato		Índice de solubilización de fosfato	
	$\bar{x}$	Rango promedio	$\bar{x}$	Rango promedio
Aislados bacterianos de suelo del cantón Mocha (caserío Pinguilí)	6,70	147,38 a	3,23	147,40 a
Aislados bacterianos de suelo del cantón Ambato (comunidad Llangahua)	5,23	115,85 b	2,74	115,96 b
Aislados bacterianos del control (Sin sustrato)	4,85	107,88 bc	2,61	107,63 bc
Aislados bacterianos de suelo del cantón Píllaro (barrio Santa Rita)	4,20	86,81 c	2,40	86,79 c
Aislados bacterianos de suelo del cantón Quero (caserío El Placer)	2,18	33,64 d	1,73	33,63 d

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras diferentes, difieren según la prueba H de Kruskal Wallis complementada con la prueba U de Mann Whitney para  $p < 0,05$ .  $n=35$ .

**Elaborado por:** David Ati, 2024.



Al evaluar el tamaño de los halos de solubilización e índice de solubilización de fosfatos de los aislados bacterianos se puede mencionar que, los aislados CC-FCAGP-BSF10 y CC-FCAGP-BSF12 del cantón Mocha (caserío Pinguilí), CC-FCAGP-BSF20 del cantón Ambato (comunidad Llangahua), CC-FCAGP-BSF13, CC-FCAGP-BSF15 y CC-FCAGP-BSF14 del cantón Mocha (caserío Pinguilí) y CC-FCAGP-BSF31 del cantón Píllaro (barrio Santa Rita) presentaron los valores más altos para estas variables (**Tabla 12 y Figura 12**).

**Tabla 12.** Tamaño de halos de solubilización e índice de solubilización de fosfatos de aislados bacterianos procedentes de cuatro localidades de la provincia de Tungurahua en medio de cultivo Agar Pikovskaya.

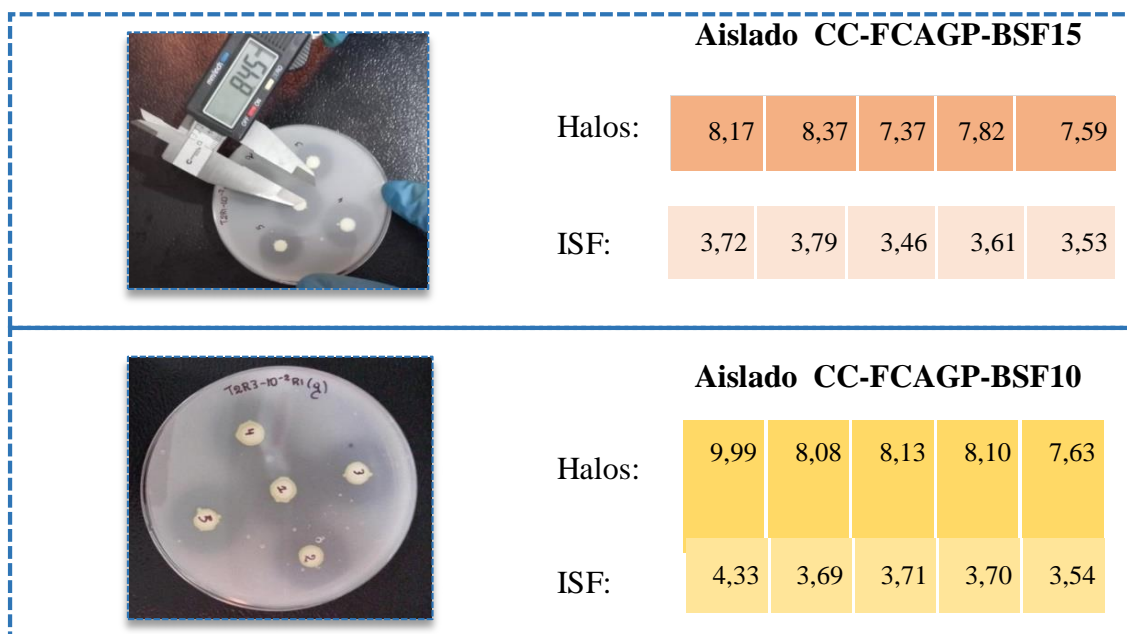
AISLADOS BACTERIANOS	Tamaño de halos de solubilización de fosfato (mm)		Índice de solubilización de fosfato	
	$\bar{x}$	Rango promedio	$\bar{x}$	Rango promedio
CC-FCAGP-BSF10	8,39	188,90 a	3,79	188,90 a
CC-FCAGP-BSF12	8,36	186,40 ab	3,79	186,10 ab
CC-FCAGP-BSF20	8,30	185,60 ab	3,77	185,70 ab
CC-FCAGP-BSF13	8,09	185,10 ab	3,70	185,00 ab
CC-FCAGP-BSF15	7,86	178,00 abc	3,62	177,80 abc
CC-FCAGP-BSF14	7,55	168,20 abc	3,52	168,30 abc
CC-FCAGP-BSF31	7,41	167,80 abc	3,47	168,00 abc
CC-FCAGP-BSF18	7,35	165,60 bc	3,45	166,20 bc
CC-FCAGP-BSF11	7,45	164,30 c	3,47	164,10 c
CC-FCAGP-BSF26	7,25	162,70 c	3,42	162,50 c
CC-FCAGP-BSF28	6,01	142,80 d	3,00	142,80 d
CC-FCAGP-BSF37	5,89	140,60 d	2,96	140,30 d
CC-FCAGP-BSF35	5,73	132,30 d	2,91	132,40 d
CC-FCAGP-BSF19	5,60	130,40 d	2,87	130,60 d
CC-FCAGP-BSF39	5,39	126,10 e	2,79	125,90 e
CC-FCAGP-BSF29	5,52	122,70 e	2,84	122,90 e
CC-FCAGP-BSF23	5,21	119,00 e	2,74	118,90 e
CC-FCAGP-BSF25	5,05	110,80 e	2,68	110,80 e
CC-FCAGP-BSF33	4,99	108,70 e	2,66	108,30 e

CC-FCAGP-BSF16	4,79	101,90 e	2,60	102,40 e
CC-FCAGP-BSF38	4,77	99,60 e	2,59	99,40 e
CC-FCAGP-BSF21	4,52	98,50 ef	2,51	99,40 e
CC-FCAGP-BSF17	4,06	82,20 fg	2,35	82,30 fg
CC-FCAGP-BSF9	4,04	82,10 fg	2,35	82,10 fg
CC-FCAGP-BSF24	3,86	78,80 fg	2,29	78,80 fg
CC-FCAGP-BSF32	3,77	75,60 fg	2,25	75,60 fg
CC-FCAGP-BSF8	3,75	74,80 fg	2,25	75,10 fg
CC-FCAGP-BSF40	3,32	65,20 fg	2,10	64,90 fg
CC-FCAGP-BSF4	3,11	58,20 fg	2,04	58,20 fg
CC-FCAGP-BSF6	2,69	49,30 gh	1,90	49,10 gh
CC-FCAGP-BSF34	2,39	42,20 h	1,80	42,20 h
CC-FCAGP-BSF22	2,33	41,50 h	1,78	41,60 h
CC-FCAGP-BSF27	2,28	39,40 h	1,76	39,30 h
CC-FCAGP-BSF7	2,16	36,80 h	1,72	36,70 h
CC-FCAGP-BSF3	2,15	31,70 hi	1,71	31,40 hi
CC-FCAGP-BSF2	1,87	25,10 hi	1,62	25,50 hi
CC-FCAGP-BSF1	1,91	25,00 i	1,64	25,20 i
CC-FCAGP-BSF36	1,52	13,10 jk	1,51	13,20 jk
CC-FCAGP-BSF5	1,35	9,40 kl	1,45	9,30 kl
CC-FCAGP-BSF30	1,11	3,60 l	1,37	3,50 l

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras diferentes, difieren según la prueba H de Kruskal Wallis complementada con la prueba U de Mann Whitney para  $p < 0,05$ .

**Elaborado por:** David Ati, 2024.

El tamaño de los halos de solubilización de fosfatos de cada aislado bacteriano se midió con calibrador Vernier y posteriormente se calculó el Índice de Solubilización de fosfatos como se detalla en la **Figura 12**.



**Elaborado por:** David Ati, 2024.

**Figura 12.** Halos e índices de solubilización de fosfato de aislados bacterianos.

**Cruz et al. (2007)** al realizar pruebas de susceptibilidad, utilizaron 5 uL en discos de papel filtro por caja de Petri con el objetivo de medir los halos de inhibición de antibióticos en mm. Por ello en esta investigación se emplearon discos blancos de 6 mm para la inoculación de los aislados bacterianos, cabe destacar que esta metodología no ha sido utilizada antes para evaluar el índice de solubilización de fosfatos de bacterias rizosféricas.

**AGBOOLA et al. (2018)** en su investigación evaluaron la actividad solubilizadora de fosfatos de aislados de rizobacterias mediante solubilización de fosfato tricálcico y detección de fosfatasa en un medio Pikovskaya y determinaron que la cantidad de fosfato solubilizado fue menor en el tratamiento control, mientras que, bacterias como *Bacillus cereus* y *B. subtilis* presentaron valores de  $515,78 \pm 0,06 \text{ g.l}^{-1}$  y  $377,69 \pm 0,63 \text{ g.l}^{-1}$  de fósforo solubilizado respectivamente. **Susilowoti & Syekhfani (2014)** en su investigación obtuvieron índices de solubilización de fosfatos en las rizobacterias *Pseudomona* sp, *Bacillus* y *Actinomycetes* sp. de 2.87, 2.43 y 1.98 respectivamente. Por otra parte, **Gayosso et al. (2017)** informaron índices de solubilización de fosfatos de 2.25, 2.22 y 2.27 a los 4 días de incubación de rizobacterias aisladas de plantas de *S. rostratum*.

Sin embargo, en la presente investigación se obtuvieron índices de solubilización de fosfato con valores de 3.47, 3.52, 3.62, 3.70, 3.77 y 3.79 para las bacterias aisladas de

la rizósfera de *S. tuberosum*. También se hace énfasis en que los aislados bacterianos obtenidos del cantón Quero presentaron una menor capacidad de solubilización de fosfatos debido quizá a las prácticas agrícolas que se realizan y por el uso excesivo de agroquímicos, **Chaves et al. (2013)** demostraron el efecto del uso de agroquímicos como Azoxistrobin en la biomasa bacteriana, en donde al contabilizar las Unidades Formadoras de Colonia por gramo de suelo (UFC.g<sup>-1</sup>) estas eran menores para bacterias Gram (+) y Gram (-).

#### **4.4. Identificación molecular de los 10 aislados bacterianos rizosféricos que mayor capacidad de solubilizar fosfatos tengan, mediante la amplificación de los genes 16S rRNA con PCR y secuenciación**

Se obtuvo ADN de alta calidad para el proceso de amplificación, visualizándose bandas de aproximadamente 1,5 kb correspondientes al marcador 16S. A partir de las lecturas resultantes de la secuenciación SANGER se obtuvo las secuencias ensambladas que permitieron determinar la identidad de los aislados, los cuales se describen en la **Tabla 13**.

**Tabla 13.** Identificación molecular de aislados bacterianos rizosféricos con capacidad de solubilizar fosfatos mediante la amplificación de los genes 16S rRNA con PCR y secuenciación.

Muestra	Longitud	Calidad	Organismo	Fragmento	% identidad	Nº Accesoión
CC-FCAGP-BSF10	1346	96.0	<i>Bacillus</i> sp.	16S	100	OR091488.1
CC-FCAGP-BSF11	964	97.2	<i>Bacillus</i> sp.	16S	100	OR091488.1
CC-FCAGP-BSF12	521	96.5	<i>Bacillus</i> sp.	16S	99.81	OR091488.1
CC-FCAGP-BSF13	1213	96.6	<i>Pseudomonas vancouverensis</i>	16S	99.75	NR_041953.1
CC-FCAGP-BSF14	1257	99.8	<i>Pseudomonas zea</i>	16S	99.84	CP077090.1
CC-FCAGP-BSF15	1058	98.1	<i>Pseudomonas yamanorum</i>	16S	100	LT629793.1

CC-FCAGP-BSF18	980	97.6	<i>Paenibacillus shunpengii</i>	16S	100	MT225643.1
CC-FCAGP-BSF20	1289	96.7	<i>Lysinibacillus macroydes</i>	16S	99.92	KY643638.1
CC-FCAGP-BSF26	1272	99.4	<i>Pseudomonas zeae</i>	16S	99.92	CP077090.1
CC-FCAGP-BSF31	1188	99.1	<i>Lysinibacillus macroydes</i>	16S	100	KY643638.1

**Elaborado por:** David Ati, 2024.

Se han identificado diversos marcadores moleculares los cuales permiten identificar los taxones microbianos específicos y su clasificación filogenética. Entre estos marcadores moleculares, el ARNr 16S es el más utilizado para identificar bacterias y determinar su relación filogenética (**Srinivasan et al., 2015**). En esta investigación se empleó el marcador ARNr 16S para la identificación molecular de los aislados bacterianos con capacidad de solubilización de fosfatos, los cuales obtuvieron un porcentaje de identidad superior al 99.75%.

**Chaturvedi et al. (2016)** manifestaron que entre los géneros bacterianos más comúnmente aislados se encuentran *Bacillus*, *Pantoea*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Micrococcus* y *Stenotrophomonas*, en donde los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* son los más predominantes; de la misma manera **Lyngwi et al. (2013)** mencionaron que estos dos géneros bacterianos son los predominantes en suelos de alta montaña. Coincidiendo con los autores ya que en esta investigación de los 10 aislados bacterianos, 3 pertenecen al género *Bacillus* y 4 al género *Pseudomonas*.

**Hernández y Lizarazo (2015)** en su investigación para conocer la microflora bacteria de los suelos de zonas conservadas e intervenidas del Páramo de la Cortadera, Boyacá, Colombia, encontraron que *Pseudomonas* fue el género más abundante 86.1%, los otros géneros: *Acinetobacter* 3.2%, *Lactobacillus* 1.9%, *Bacillus* 1.6%, *Klebsiella* 1.6% y *Corynebacterium* 0,06%. En esta investigación *Pseudomonas* tuvo un porcentaje de predominancia del 40%, seguido de *Bacillus* 30%, *Lysinibacillus* 20% y *Paenibacillus* 10%.

**Calvo et al. (2010)** en su investigación al estudiar la rizósfera de *S. tuberosum* en zonas andinas de Perú, encontraron una presencia significativa de *Bacillus* spp., esta bacteria presentó un buen crecimiento, fue resistente a bajas temperaturas y pH ácidos; además,

presentan sinergia favorable con el cultivo de papa. Entre otra de las bacterias importantes del género *Bacillus* se encuentra *B. subtilis*, Wang et al. (2018) mencionaron que esta bacteria posee una excelente habilidad de colonización radicular, produce lisis celular, antibiosis y también genera competencia por nutrientes y espacio con otras bacterias rizosféricas.

Silva et al. (2019) en su investigación mencionaron que los aislados 383H *Lysinibacillus macroides*, 6 V y 16 V *L. xylanilyticus* y 116 V y 125 V *C. taiwanense* no solubilizaron ninguna de las fuentes de fosfato que analizaron. Sin embargo, en esta investigación *Lysinibacillus macroides* presentó un índice de solubilización de fosfato de 3,47.

Una de las bacterias que actualmente se comercializa como producto es *B. megaterium* y representa una reducción considerable de fertilizantes fosfatados en los cultivos de hasta un 75% (Mehnaz, 2016).

#### 4.5. Determinación del efecto de los aislados bacterianos rizosféricos con mayor capacidad de solubilización sobre el crecimiento de vitroplantas de papa en invernadero

##### 4.5.1. Efecto de los aislados bacterianos sobre el área foliar de vitroplantas de *S. tuberosum* var. Superchola en invernadero

Los mayores valores de área foliar se alcanzaron cuando se inocularon las vitroplantas de *S. tuberosum* var. Superchola con las cepas bacterianas siguientes: CC-FCAGP-BSF10, CC-FCAGP-BSF11, CC-FCAGP-BSF12, CC-FCAGP-BSF13, CC-FCAGP-BSF14, CC-FCAGP-BSF15, CC-FCAGP-BSF18 y CC-FCAGP-BSF20. Por otra parte, las inoculaciones de las cepas bacterianas en las vitroplantas de papa incrementaron el área foliar de las vitroplantas de papa en relación con las plantas no inoculadas (control) (Tabla 14 y Figura 13).

**Tabla 14.** Efecto de la inoculación de cepas bacterianas rizosféricas con capacidad de solubilización de fosfatos sobre el área foliar de vitroplantas de *S. tuberosum* var. Superchola establecidas en invernadero.

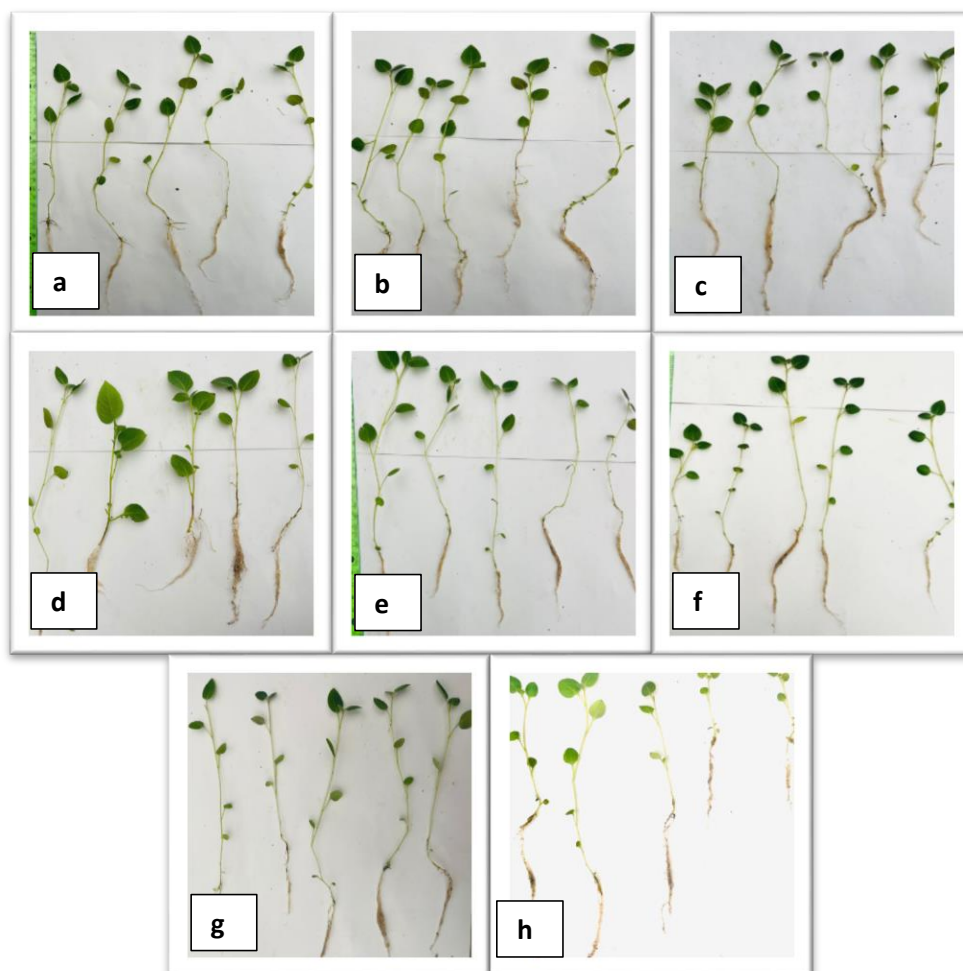
TRATAMIENTOS	Área foliar (dcm <sup>2</sup> )	
	$\bar{X}$	Rango promedio
CC-FCAGP-BSF31	0.099	10,70 c
CC-FCAGP-BSF26	0.172	17,70 bc

CC-FCAGP-BSF20	0.210	21,20 abc
CC-FCAGP-BSF18	0.262	30,10 ab
CC-FCAGP-BSF15	0.281	32,70 a
CC-FCAGP-BSF14	0.283	31,60 a
CC-FCAGP-BSF13	0.322	36,20 a
CC-FCAGP-BSF12	0.364	39,50 a
CC-FCAGP-BSF11	0.427	40,10 a
CC-FCAGP-BSF10	0.492	45,10 a
Control	0.029	3,10 d

Rangos promedios que no comparten letras comunes son diferentes según la prueba de Kruskal Wallis complementada con la prueba U de Mann Whitney.

**Elaborado por:** David Ati, 2024.

En la **Figura 13** se observan vitroplantas de papa en invernadero que presentaron una mayor área foliar, al ser inoculadas con aislados bacterianos con capacidad de solubilización de fosfatos.



**Figura 13.** Vitroplantas inoculadas con cepas bacterianas con capacidad de solubilizar fosfatos: a) CC-FCAGP-BSF20, b) CC-FCAGP-BSF18, c) CC-FCAGP-BSF15, d) CC-FCAGP-BSF14, e) CC-FCAGP-BSF13, f) CC-FCAGP-BSF12, g) CC-FCAGP-BSF11, h) CC-FCAGP-BSF10.

CC-FCAGP-BSF14, e) CC-FCAGP-BSF13, f) CC-FCAGP-BSF12, g) CC-FCAGP-BSF11 y h) CC-FCAGP-BSF10.

**Elaborado por:** David Ati, 2024.

**Saeed et al. (2020).** En su investigación evaluaron el efecto de las bacterias solubilizadoras de fósforo y fosfato en el cultivo de tomate, utilizaron diferentes niveles de fósforo (0, 50, 75, 100 y 125 kg ha<sup>-1</sup>) con y sin bacterias solubilizadoras de fosfato (PSB). La aplicación de fósforo (P) y bacterias solubilizadoras de fosfato (PSB) influyó significativamente en todos los parámetros estudiados. La aplicación de bacterias solubilizadoras de fosfato requirió días mínimos de floración (31), número máximo de ramas de la planta<sup>-1</sup> (6,9), diámetro más ancho del tallo (1,2 cm), mayor altura de la planta (76,34 cm), diámetro más ancho del fruto (13,62 cm), número máximo de frutos planta<sup>-1</sup> (63.56), mayor rendimiento de frutos (24.6 toneladas ha<sup>-1</sup>), longitud máxima de raíces (14.27 cm) y peso máximo de raíces frescas (87.94 gm), excepto área foliar planta<sup>-1</sup> (1911 cm<sup>2</sup>). En esta investigación la inoculación de las cepas bacterianas CC-FCAGP-BSF20, CC-FCAGP-BSF18, CC-FCAGP-BSF15, CC-FCAGP-BSF14, CC-FCAGP-BSF13, CC-FCAGP-BSF12, CC-FCAGP-BSF11 y CC-FCAGP-BSF10 en plantas de *S. tuberosum* mostraron efectos positivos al incrementar los valores para la variable área foliar.

#### **4.5.2. Efecto de los aislados bacterianos sobre la masa fresca de vitroplantas de *S. tuberosum* var. Superchola en invernadero**

Al inocular las cepas correspondientes a los tratamientos CC-FCAGP-BSF12, CC-FCAGP-BSF11 y CC-FCAGP-BSF10 se incrementó la masa fresca de las vitroplantas de *S. tuberosum* var. Superchola. Todas las cepas bacterianas al ser inoculadas favorecieron los valores de masa fresca en las vitroplantas de *S. tuberosum* var. Superchola al ser comparadas con las plantas sin inocular (Control) (**Tabla 15 y Figura 14**).



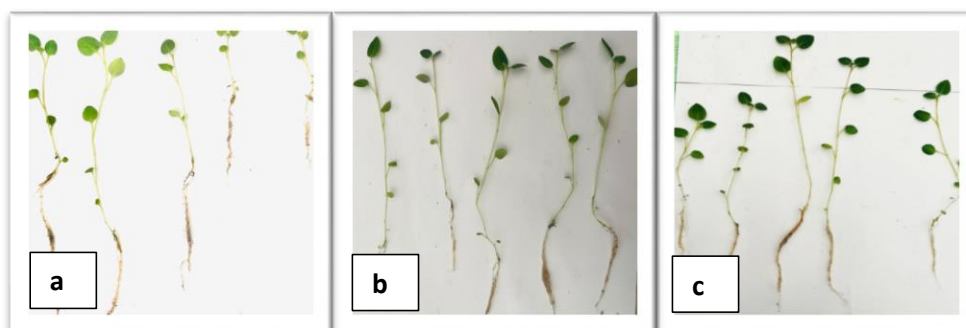
**Tabla 15.** Efecto de la inoculación de cepas bacterianas rizosféricas con capacidad de solubilización de fosfatos sobre la masa fresca de vitroplantas de *S. tuberosum* var. Superchola establecidas en invernadero.

TRATAMIENTOS	Masa fresca	
	$\bar{X}$	Rango promedio
CC-FCAGP-BSF31	0,16	9,60 e
CC-FCAGP-BSF26	0,16	11,90 e
CC-FCAGP-BSF20	0,20	18,80 d
CC-FCAGP-BSF18	0,23	23,70 cd
CC-FCAGP-BSF15	0,27	28,30 c
CC-FCAGP-BSF14	0,32	32,40 bc
CC-FCAGP-BSF13	0,36	36,30 b
CC-FCAGP-BSF12	0,46	45,30 a
CC-FCAGP-BSF11	0,66	47,90 a
CC-FCAGP-BSF10	0,87	50,80 a
Control	0,09	3,00 f

Rangos promedios que no compartes letras comunes son diferentes según la prueba de Kruskal Wallis complementada con la prueba U de Mann Whitney.

**Elaborado por:** David Ati, 2024.

En la **Figura 14** se observan vitroplantas de papa en invernadero que presentaron los valores más altos para la variable masa foliar, al ser inoculadas con aislados bacterianos con capacidad de solubilización de fosfatos.



**Elaborado por:** David Ati, 2024.

**Figura 14.** Vitroplantas inoculadas con cepas bacterianas con capacidad de solubilizar fosfatos: a) CC-FCAGP-BSF10, b) CC-FCAGP-BSF11 y c) CC-FCAGP-BSF12.

**Delgado-Ramirez et al. (2021)** en su investigación llevaron a cabo un experimento *in vivo* en un invernadero utilizando las cepas *Bacillus* sp. rbES015 y rbES182, *Pseudomonas* sp. rbES061, rbES087 y rbES090, así como *Paenibacillus* sp. rbES075 en plantas de *Solanum lycopersicum* L. Y encontraron que las siete cepas generaron un impacto positivo y significativo en el crecimiento de *S. lycopersicum*. En cuanto a la parte aérea, las plantas inoculadas exhibieron aumentos de hasta un 160%, 290%, 380% y 420% en peso fresco, peso seco, longitud del tallo y grosor, respectivamente, en comparación con el grupo de control. En la presente investigación la inoculación de las cepas bacterianas CC-FCAGP-BSF10, CC-FCAGP-BSF11 y CC-FCAGP-BSF12 en plantas de *S. tuberosum* incrementaron los valores para la variable masa fresca.

#### **4.5.3. Efecto de los aislados bacterianos sobre la masa seca de vitroplantas de *S. tuberosum* var. Superchola en invernadero**

Las bacterias correspondientes a los tratamientos CC-FCAGP-BSF11 y CC-FCAGP-BSF10 al ser inoculado en vitroplantas de *S. tuberosum* var. Superchola aumentaron la masa seca. La inoculación con las cepas bacterianas incrementó el contenido de masa seca en las plantas de *S. tuberosum* var. Superchola en relación con las plantas que no fueron inoculadas (Control) a excepción de la cepa CC-FCAGP-BSF31, CC-FCAGP-BSF26 y CC-FCAGP-BSF20 (**Tabla 16 y Figura 15**).

**Tabla 16.** Efecto de la inoculación de cepas bacterianas rizosféricas con capacidad de solubilización de fosfatos sobre la masa seca de vitroplantas de *S. tuberosum* var Superchola establecidas en invernadero.

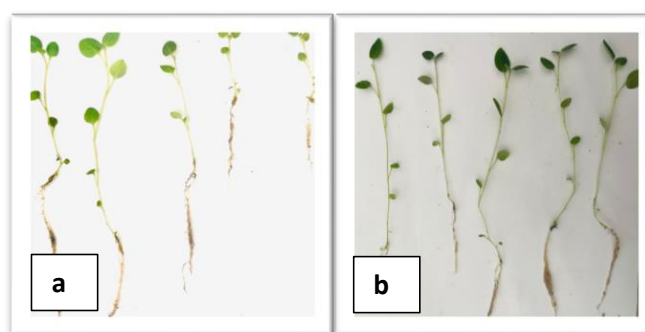
TRATAMIENTOS	Masa seca	
	$\bar{X}$	Rango promedio
CC-FCAGP-BSF31	0,023	7,00 g
CC-FCAGP-BSF26	0,033	12,30 g
CC-FCAGP-BSF20	0,033	16,70 f
CC-FCAGP-BSF18	0,036	23,50 e
CC-FCAGP-BSF15	0,037	25,50 e
CC-FCAGP-BSF14	0,041	32,00 d
CC-FCAGP-BSF13	0,056	37,00 c
CC-FCAGP-BSF12	0,063	42,00 b

CC-FCAGP-BSF11	0,092	48,20 a
CC-FCAGP-BSF10	0,096	51,00 a
Control	0,037	12,80 fg

Rangos promedios que no compartes letras comunes son diferentes según la prueba de Kruskal Wallis complementada con la prueba U de Mann Whitney.

**Elaborado por:** (David Ati, 2024).

En la **Figura 15** se observan vitroplantas de papa en invernadero que presentaron los valores más altos para la variable masa seca, al ser inoculadas con aislados bacterianos con capacidad de solubilización de fosfatos.



**Elaborado por:** (David Ati, 2024).

**Figura 15.** Vitroplantas inoculadas con cepas bacterianas con capacidad de solubilizar fosfatos: a) CC-FCAGP-BSF10, b) CC-FCAGP-BSF11 y c) CC-FCAGP-BSF12.

**Walpola y Yoon (2013)** evaluaron el efecto dos bacterias solubilizadoras de fosfato *Pantoea agglomerans* y *Burkholderia anthina* sobre el crecimiento y la absorción de fósforo en plantas de tomate (*S. lycopersicum*) y determinaron que ambas cepas bacterianas mejoraron notablemente la altura de la planta, la longitud de la raíz, el peso seco de brotes y raíces, la absorción de fósforo y el contenido de fósforo disponible en el suelo en comparación con el control. En la presente investigación también se obtuvieron valores favorables para la variable masa seca, al inocular las cepas bacterianas CC-FCAGP-BSF10, CC-FCAGP-BSF11 y CC-FCAGP-BSF12.

#### **4.5.4. Efecto de los aislados bacterianos sobre el índice de área foliar de vitroplantas de *S. tuberosum* var. Superchola en invernadero**

Al inocular las cepas correspondientes a los tratamientos CC-FCAGP-BSF20, CC-FCAGP-BSF18, CC-FCAGP-BSF15, CC-FCAGP-BSF14, CC-FCAGP-BSF13, CC-FCAGP-BSF12, CC-FCAGP-BSF11 y CC-FCAGP-BSF10 en vitroplantas de *S.*

*tuberosum* var. Superchola se observó un aumento del índice de área foliar. Asimismo, al inocular la cepa bacteriana en las vitroplantas de papa se incrementó el índice de área foliar en relación con las plantas no inoculadas (Control) (**Tabla 17 y Figura 16**).

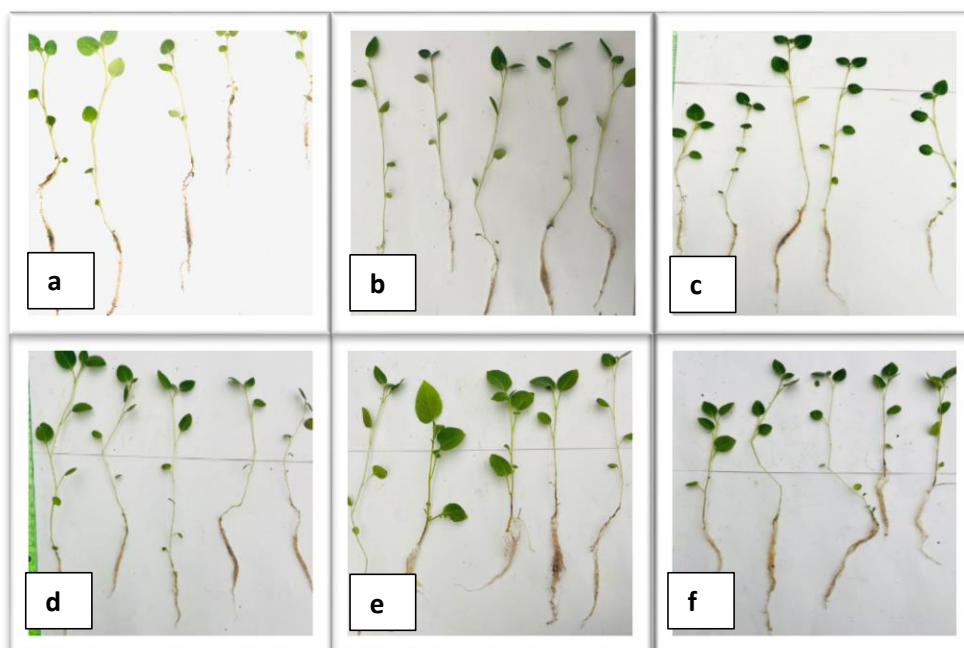
**Tabla 17.** Efecto de la inoculación de cepas bacterianas rizosféricas con capacidad de solubilización de fosfatos sobre el índice de área foliar de vitroplantas de *S. tuberosum* var. Superchola establecidas en invernadero.

TRATAMIENTOS	Índice de área foliar	
	$\bar{X}$	Rango promedio
CC-FCAGP-BSF31	0,066	10,70 c
CC-FCAGP-BSF26	0,120	17,70 bc
CC-FCAGP-BSF20	0,140	21,00 abc
CC-FCAGP-BSF18	0,170	29,60 ab
CC-FCAGP-BSF15	0,190	32,10 a
CC-FCAGP-BSF14	0,190	31,80 a
CC-FCAGP-BSF13	0,210	36,30 a
CC-FCAGP-BSF12	0,240	40,00 a
CC-FCAGP-BSF11	0,280	40,10 a
CC-FCAGP-BSF10	0,330	45,50 a
Control	0,020	3,20 d

Rangos promedios que no comparten letras comunes son diferentes según la prueba de Kruskal Wallis complementada con la prueba U de Mann Whitney.

**Elaborado por:** David Ati, 2024.

En la **Figura 16** se observan vitroplantas de papa en invernadero que presentaron los valores más altos para la variable índice de área foliar, al ser inoculadas con aislados bacterianos con capacidad de solubilización de fosfatos.



**Elaborado por:** David Ati, 2024.

**Figura 16.** Vitroplantas inoculadas con cepas bacterianas con capacidad de solubilizar fosfatos: a) CC-FCAGP-BSF10, b) CC-FCAGP-BSF11, c) CC-FCAGP-BSF12, d) CC-FCAGP-BSF13, e) CC-FCAGP-BSF14, f) CC-FCAGP-BSF15.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES, RECOMENDACIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS

#### 5.1. Conclusiones

1. Se obtuvieron 40 aislados bacterianos rizosféricos de *S. tuberosum* var. Superchola de cuatro localidades de la provincia de Tungurahua (El Placer – Quero, Pinguilí – Mocha, Llangahua – Ambato y Santa Rita – Píllaro), 8 de ellos presentaron una alta capacidad de solubilización de fosfatos.
2. Entre las características culturales de los 40 aislados bacterianos, el 62% tuvieron una forma circular, 92% textura lisa y el 85% bordes enteros mientras que, en las características morfológicas, el 83% fueron bacterias Gram (-) y un 50% tuvieron forma bacilar.
3. Los aislados bacterianos que tuvieron el mayor índice de solubilización de fosfatos *in vitro* fueron procedentes del caserío Pinguilí - cantón Mocha y los aislados bacterianos del caserío El Placer - cantón Quero presentaron los valores más bajos, siendo el aislado CC-FCAGP-BSF10 el que mayor capacidad de solubilización de fosfato mostró.
4. Mediante la amplificación de los genes 16S rRNA con PCR y secuenciación se identificaron las especies *Bacillus* sp. (3 aislados), *Pseudomonas vancouverensis* (1 aislado), *Pseudomonas zea* (2 aislados), *Pseudomonas yamanorum* (1 aislado), *Pseudomonas shunpengii* (1 aislado) y *Lysinibacillus macroydes* (2 aislados), quienes mostraron una alta capacidad de solubilización de fosfato *in vitro*.
5. Con la inoculación de las cepas bacterianas CC-FCAGP-BSF15 (*Pseudomonas yamanorum*), CC-FCAGP-BSF14 (*Pseudomonas zea*), CC-FCAGP-BSF13 (*Pseudomonas vancouverensis*), CC-FCAGP-BSF12 (*Bacillus* sp.), CC-FCAGP-BSF11 (*Bacillus* sp) y CC-FCAGP-BSF10 (*Bacillus* sp.), se incrementaron los valores de área foliar, masa fresca, masa seca e índice de área foliar de las vitroplantas de *S. tuberosum*.

## 5.2. Recomendaciones

1. Realizar mediciones cuantitativas mediante espectrofotometría en medio de cultivo Pikovskaya líquido en lector multiplaca espectrofotométrico.
2. Utilizar el medio de cultivo NBRIP para obtener valores más precisos del fosfato solubilizado por los aislados bacterianos.
3. Determinar el efecto de la inoculación de las cepas CC-FCAGP-BSF15 (*Pseudomonas yamanorum*), CC-FCAGP-BSF14 (*Pseudomonas zeae*), CC-FCAGP-BSF13 (*Pseudomonas vancouverensis*), CC-FCAGP-BSF12 (*Bacillus* sp), CC-FCAGP-BSF11 (*Bacillus* sp.) y CC-FCAGP-BSF10 (*Bacillus* sp.) sobre el crecimiento vegetativo y el rendimiento agrícola de *S. tuberosum* en condiciones de campo.

## 5.3. BIBLIOGRAFÍA

- Adnan, M., Fahad, S., Zamin, M., Shah, S., Mian, I., Danish, S., Zafar-ul-Hye, M., Battaglia, M., Naz, R. & Saeed, B. (2020). Coupling Phosphate-Solubilizing Bacteria with Phosphorus Supplements Improve Maize Phosphorus Acquisition and Growth under Lime Induced Salinity Stress. *Plants* 2020, 9, 900. <https://doi.org/10.3390/plants9070900>
- Agboola, A. A., Ekundayo, F. O., Ekundayo, E. A., Fasoro, A. A., Ayantola, K. H. J., & Kayode, A. J. (2018). Influence of glyphosate on rhizosphere microorganisms and their ability to solubilize phosphate. *Journal Of Microbiology and Antimicrobial Agents*, 1-7.
- Alori, E. T., Glick, B. R. & Babalola, O. O. (2017) Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Front Microbiol*, 8, 971.
- Amri, M., Rjeibi, M. R., Gatrouni, M., Mateus, D. M., Asses, N., Pinho, H. J., & Abbes, C. (2023). Isolation, Identification, and Characterization of Phosphate-Solubilizing Bacteria from Tunisian Soils. *Microorganisms*, 11(3), 783.
- Awais, M., Tariq, M., Ali, Q., Khan, A., Ali, A., Nasir, I. A., & Husnain, T. (2019). Isolation, characterization and association among phosphate solubilizing bacteria from sugarcane rhizosphere. *Cytology and Genetics*, 53, 86-95.

- Arcos, J. y Zúñiga, D. (2016). Rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas con capacidad para mejorar la productividad en papa. *Revista Latinoamericana de la Papa*. 20(1), 18-31. <http://papaslatinas.org/index.php/rev-alap/article/view/241/246>
- Baliah, N. T., Pandiarajan, G. & Kumar, B. M. (2016). Isolation, identification and characterization of phosphate solubilizing bacteria from different crop soils of Srivilliputtur Taluk, Virudhunagar District, Tamil Nadu. *Trop Ecol* 57(3):465–474.
- Basantes, T., Aragón, J., Albuja, L. y Vázquez, L. (2020). Diagnóstico de los costos, rendimientos de producción y comercialización de papa (*Solanum tuberosum* L.) en la Zona 1 del Ecuador, año 2019. *Revista e-Agronegocios*, 6(2). <https://doi.org/10.18845/ea.v6i2.5103>
- Calvo, P., Ormeño-Orillo, E., Martínez-Romero, E., Zúñiga, D. (2010). Characterization of *Bacillus* isolates of potato rhizosphere from Andean soils of Peru and their potential PGPR characteristics. *Braz. J. Microbiol.* 41, 899-906.
- Cañón-Cortázar, R., Avellaneda-Torres, L. y Torres-Rojas, E. (2012). Microorganismos asociados al ciclo del nitrógeno en suelos bajo tres sistemas de uso: cultivo de papa, ganadería y páramo, en el Parque Los Nevados, Colombia. *Acta Agr.* 61(4):371-379.
- Carvalhais, L. C., Dennis, P. G., Badri, D.V., Kidd, B. N., Vivanco, J. M. & Schenk, P. M. (2015). Linking jasmonic acid signaling, root exudates, and rhizosphere microbiomes. *Mol Plant Microbe Interact* 28,1049–1058.
- Cerón-Lasso, M., Alzate-Arbeláez, A., Rojano, B., Ñuztez-Lopez, C. (2018). Composición Físicoquímica y Propiedades Antioxidantes de Genotipos Nativos de Papa Criolla (*Solanum tuberosum* Grupo Phureja). *Información tecnológica*, 29(3), 205-216.
- Chaturvedi, H., Singh, V. & Gupta, G. (2016). Potential of bacterial endophytes as plant growth promoting factors. *J Plant Pathol Microbiol*, 7(9), 1-6.
- Chawngthu, L., Hnamte, R. & Lalfakzuala, R. (2020). Isolation and Characterization of Rhizospheric Phosphate Solubilizing Bacteria from Wetland Paddy Field of



Mizoram, India. *Geomicrobiology Journal*, 1–10.  
doi:10.1080/01490451.2019.1709108

Cowan, M. K. & Bunn, J. (2016). *Microbiology Fundamentals: A Clinical Approach*, 2nd ed.; McGraw-Hill Education: New York, NY, USA.

Crowther, T. W., van den Hoogen, J., Wan, J., Mayes, M. A., Keiser, A. D., Mo, L., Averill, C. y Maynard, D. S. (2019). La comunidad mundial del suelo y su influencia en la biogeoquímica. *Ciencia* 365.

Cruz-Martín, M., García-Ramírez, Y., Sánchez-García, C., Alvarado-Capó, Y., Acosta-Suárez, M., Roque, B., Leiva-Mora, M. y Freire-Seijo, M. (2007). Identificación y control de *Bacillus* sp., contaminante del establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth. *Biotecnología vegetal*, 7(1), 9-13.  
<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/350/323>

Cruz-Martín, M., Acosta-Suárez, M., Mena, E., Roque, B., Leiva-Mora, M., Pichardo, T., Castro, R. y Alvarado – Capó, Y. (2013). Cuantificación del crecimiento *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis* mediante lecturas de absorbancia. *Biotecnología Vegetal*, 13 (4), 8.

Dereje, B. & Chibuzo, N. (2021). Nutritional composition and biochemical properties of *Solanum tuberosum*. In: *Solanum tuberosum: A Promising Crop for Starvation Problem*. 106-118.

Fernandes, A. M., Soratto, R. P. & Pilon, C. (2015). Soil phosphorus increases dry matter and nutrient accumulation and allocation in potato cultivars. *American Journal of Potato Research*, Orono, 92(1), 117-127.

Fraser, T. D., Lynch, D. H., Bent, E., Entz, M. H., & Dunfield, K. E. (2015). Soil bacterial phoD gene abundance and expression and long-term management. *Soil Biol. Biochem.* 88, 137–147. doi: 10.1016/j.soilbio.2015.04.014

Glick, B. R. (2020). Introduction to plant growth-promoting bacteria. In: *Beneficial interactions between plants and bacteria*. Springer, Cham.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-030-44368-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-44368-9_1)

- González, H. y Fuentes, N. (2017). Mecanismo de acción de cinco microorganismos de promotores de crecimiento vegetal. *Revista de Ciencias Agrícolas*. 34(1), 17-31. <http://dx.doi.org/10.22267/rcia.173401.61>
- Gupta, S., Seth, R. & Sharma, A. (2016) Plant growth-promoting rhizobacteria play a role as phytostimulators for sustainable agriculture. In: Choudhary DK, Varma A, Tuteja N (eds) Plant-microbe interaction: an approach to sustainable agriculture. *Springer, Singapore*, 475–493
- Gusain, Y. S., Kamal, R., Mehta, C. M., Singh, U. S. & Sharma, A. K. (2015). Phosphate solubilizing and indole-3-acetic acid producing bacteria from the soil of Garhwal Himalaya aimed to improve the growth of rice. *Journal of environmental biology*, 36(1), 301.
- Haan S. & Rodriguez F. (2016) *Potato origin and production*. In J. Singh & L. Kaur (Eds.), *Advances in Potato Chemistry and Technology* (2nd, pp. 1–32). London, UK: Academic Press, Elsevier.
- Hailu, G., Nigussie, D., Ali, M. et al. (2017). Nitrogen and Phosphorus Use Efficiency in Improved Potato (*Solanum tuberosum* L.) Cultivars in Southern Ethiopia. *Am. J. Potato Res.* 94, 617–631. <https://doi.org/10.1007/s12230-017-9600-6>
- Hajare, S. T., Chauhan, N. M. & Kassa, G. (2021). Effect of growth regulators on in vitro micropropagation of potato (*Solanum tuberosum* L.) Gudiene and Belete varieties from Ethiopia. *ScientificWorldJournal*, 1-9.
- Hernández, D. y Lizarazo, L. (2015). Bacterias heterótrofas y oligotróficas en zonas conservadas e intervenidas del páramo de la Cortadera, Boyacá, Colombia. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 18 (2), 475-483.
- Hu, Y., Ye, X., Shi, L., Duan, H. & Xu, F. (2010). Genotypic differences in root morphology and phosphorus uptake kinetics in Brassica napus under low phosphorus supply. *Journal of Plant Nutrition*, 33, 889–901.
- Ingle, K. P., & Padole, D. A. (2017). Phosphate solubilizing microbes: An overview. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(1), 844-852.

- INIAP. (2021). Manual del cultivo de papa para pequeños productores. Manual No. 78, 3ra. Edición. INIAP. Mejía-Ecuador. 120p.
- Jiménez-Terry, D Agramonte, M Pérez, M Pons, M Rodríguez, M La. (2013). Efecto del sustrato sobre la producción de minitubérculos de papa en casa de cultivo a partir de plantas in vitro. *Biotechnología Vegetal*, 13 (3), 9.
- Jorquera, M. A., Crowley, D. E., Marschner, P., Greiner, R., Fernández, M. T., Romero, D., Menezes-Blackburn, D. & De La Luz Mora, M. (2011). Identification of  $\beta$ -propeller phytase-encoding genes in culturable *Paenibacillus* and *Bacillus spp.* from the rhizosphere of pasture plants on volcanic soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 75(1), 163-172.
- Lalrampani Chawngthu, Remruattluanga Hnamte & R. Lalfakzuala (2020) Isolation and Characterization of Rhizospheric Phosphate Solubilizing Bacteria from Wetland Paddy Field of Mizoram, India. *Geomicrobiology Journal*, 37(4), 366-375. DOI: 10.1080/01490451.2019.1709108
- Leal-Almanza, José, Gutiérrez-Coronado, Marco A., Castro-Espinoza, Luciano, Lares-Villa, Fernando, Cortes-Jiménez, Juan M., & Santos-Villalobos, Sergio de los. (2018). Vegetable growth promoter microorganisms with agricultural plaster on potatoes (*Solanum tuberosum* L.) under shadow housing. *Agrociencia*, 52(8), 1149-1159.
- Li, J. T., Lu, J. L., Wang, H. Y., Fang, Z., Wang, X. J., Feng, S. W., ... & Liang, J. L. (2021). A comprehensive synthesis unveils the mysteries of phosphate-solubilizing microbes. *Biological Reviews*, 96(6), 2771-2793.
- Liu, Z., Li, Y. C., Zhang, S., Fu, Y., Fan, X., Patel, J. S., & Zhang, M. (2015). Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. *Applied Soil Ecology*, 96, 217-224.
- Logroño, Washington N, Echeverría, Magdy M, Recalde, Celso G, y Graziani, Pietro. (2015). Bioconversión de Residuos Sólidos Orgánicos con Suelos de la Región Amazónica y Alto Andina del Ecuador en Celdas de Combustible Microbianas de Cámara Simple. *Información tecnológica*, 26(2), 61-68. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642015000200008>

- Lyngwi, N., Koijam, K., Sharma, D. & Joshi, R. (2013). Cultivable bacterial diversity along the altitudinal zonation and vegetation range of tropical Eastern Himalaya. *Rev. Biol. Trop.* 61(1):467-490
- Machado, V. J., Souza, C., Andrade, B., Lana, R. y Korndorfer, G. (2011). Curvas de disponibilidad de fósforo em solos com diferentes texturas após aplicação de doses crescentes de fosfato monoamônico. *Bioscience Journal*, 27(1), 70-76.
- Machado, V. J. y Souza, C. H. E. (2012). Disponibilidade de fósforo em solos com diferentes texturas após aplicação de doses crescentes de fosfato monoamônico de liberação lenta. *Bioscience Journal*, 28(1), 1-7.
- Maddela, N., Masabanda, M., & Leiva-Mora, M. (2015). Novel diesel-oil-degrading bacteria and fungi from the Ecuadorian Amazon rainforest. *Water Science and Technology*, 71(10), 1554-1561. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.142>
- Manzoor, M., Abbasi, M. K., & Sultan, T. (2017). Isolation of phosphate solubilizing bacteria from maize rhizosphere and their potential for rock phosphate solubilization–mineralization and plant growth promotion. *Geomicrobiology journal*, 34(1), 81-95.
- Mardad, I., Serrano Delgado, A., & Soukri, A. (2013). Solubilization of inorganic phosphate and production of organic acids by bacteria isolated from a Moroccan mineral phosphate deposit. *African Journal of Microbiology Research*, 7, 626-635.
- Marquéz, Y., Salomón, J. y Acosta, R. (2020). Análisis de la interacción genotipo ambiente en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Cultivos tropicales*, 41(1). <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v41n1/1819-4087-ctr-41-01-e10.pdf>
- Marquina, E., Ramirez, Y. y Castro, Y. (2018). Efecto de las bacterias rizosféricas en la germinación y crecimiento del pimentón *Capsicum annuum* L. var. cacique gigante. *Bioagro*. 30(1), 3-16. <http://ve.scielo.org/pdf/ba/v30n1/art01.pdf>
- Martins, J. D. L., Soratto, R. P., Fernandes, A. M., & Dias, P. H. M. (2018). Phosphorus Fertilization and Soil Texture Affect Potato Yield. *Revista Caatinga*, 31(3), 541–550. <https://doi.org/10.1590/1983-21252018v31n302rc>

- Mastrocola, N., Pino, G., Mera, X., Rivadeneira, J., Monteros, C. y Cuesta, X. (2016). Catálogo de Variedades de Papa, FAO-INIAP. Quito, Ecuador.
- Mehnaz, S. (2016). An overview of globally available bioformulations. *Bioformulations: for sustainable agriculture*, 267-281.
- Mosier-Boss, P. A. (2017). Review on SERS of Bacteria, *Biosensors*, 7(4), 51. <https://doi.org/10.3390/bios7040051>
- Narveer, N., Vyas, A., Kumar, H., & Putatunda, C. (2014). *In vitro* phosphate solubilization by *Bacillus* sp. NPSBS 3.2. 2 obtained from the cotton plant rhizosphere. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 11(2), 401-406.
- Nasiruddin M & Islam AR. (2018). *In vitro* slow-growth conservation for two genotypes of *Solanum tuberosum* L. *Bangladesh J Bot*, 47(3): 369-380.
- Neal, A. L., Rossmann, M., Brearley, C., Akkari, E., Guyomar, C., Clark, I. M., et al. (2017). Land-use influences phosphatase gene microdiversity in soils. *Environ. Microbiol*, 19, 2740–2753. doi: 10.1111/1462-2920.13778
- Nesme, T., Metson, G. S., & Bennett, E. M. (2018). Global P flows through agricultural trade. *Glob. Environ. Change* 50, 133–141. doi: 10.1016/j.gloenvcha.2018.04.004
- Ngobese NZ, & Workneh TS. (2018). Potato (*Solanum tuberosum* L.) nutritional changes associated with French fry processing: Comparison of low-temperature long-time and high-temperature short-time blanching and frying treatments. *Lwt*, 97, 448-455.
- Nuñez, J. E., Quiala, E., de Feria, M., Mestanza, S., Gómez-Kosky, R., Cuadrado, F. R. y Leiva-Mora, M. (2017). Establecimiento de un banco clonal de *Caesalpinia spinosa* (Mol.) O. Kuntz mediante selección de árboles plus e injerto. *Bioteología vegetal*, 17 (1), 8.
- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11). doi:10.1007/s11274-017-2364-9
- Oteino, N., Lally, R. D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K. J. y Dowling, D. N. (2015). Promoción del crecimiento vegetal inducida por

aislados de *Pseudomonas* endofíticas solubilizantes de fosfato. *Fronteras en microbiología*, 6. doi:10.3389/fmicb.2015.00745

- Paco-Pérez, V. & Guzmán-Vega, G.-D. (2019). Effect of organic amendments on the microbial populations of the rhizosphere of quinoa cultivation (*Chenopodium quinoa* Willd.) in the South Altiplano of Bolivia. *J. Selva Andina Biosph.*, 7(1), 32-43.
- Paucar, B., Díaz, N. y Alvarado, S. (2011). Efecto del manejo de suelo sobre las poblaciones microbianas en suelos de la Sierra de Ecuador. Quito, EC: INIAP. Disponible en: <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/2504>
- Paul, D., & Sinha, S. N. (2017). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential from river Ganga, India. *Annals of Agrarian Science*, 15(1), 130–136. doi:10.1016/j.aasci.2016.10.001
- Priyadarshani, P. & Batra, V. (2017). Tissue Culture of Potato (*Solanum tuberosum* L.): A review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(4), 489-495. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.604.058>
- Reddy, B. J., Mandal, R., Chakroborty, M., Hijam, L., & Dutta, P. (2018). A review on potato (*Solanum tuberosum* L.) and its genetic diversity. *International Journal of Genetics*, ISSN, 0975-2862.
- Reddy, C. S., Achary, V. M., Manna, M., Singh, J., Kaul, T. & Reddy, M. K. (2015). Isolation and molecular characterization of thermostable phytase from *Bacillus subtilis* (BSphyARRMK33). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175, 3058–3067. doi: 10.1007/s12010-015-1487-4
- Richardson, A. E., Barea, J. M., McNeill, A. M. & Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil*, 321(1–2), 305–339.
- Richardson, A. E. & Simpson, R. J. (2011). Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. *Plant Physiol*, 156(3):989–996.

- Rizvi, A., Zaidi, A., Khan, M. S., Saif, S., Ahmed, B., & Shahid, M. (2017). Growth Improvement and Management of Vegetable Diseases by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Microbial Strategies for Vegetable Production*, 99–123. doi:10.1007/978-3-319-54401-4\_5
- Rodríguez, L. (2010). Ecofisiología del cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 4(1), 97–108. <https://doi.org/10.17584/rcch.2010v4i1.1229>
- Rodríguez, P. A. y Arenas R. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 16 (2):166-167.
- Saeed, U. L., Ayub, G., Saleem, S., Khan, A., Khan, N., & Zubair, S. (2020). Effect of phosphorus with and without phosphate solubilizing bacteria on growth and yield of tomato. *Pure and Applied Biology*, 9(3), 2111-2121.
- Sahair, A., Sneha, S., Raghu, N., Gopenath, T., Karthikeyan, M. & Gnanasekaran, A. (2018). *Solanum tuberosum* L.: Botanical, Phytochemical, pharma-cological and Nutritional significance. *Int J Phytomed*, 10(3): 115-124.
- Salcedo, L. D. P., Prieto, C. & Correa, M. F. (2014). Screening phosphate solubilizing actinobacteria isolated from the rhizosphere of wild plants from the Eastern Cordillera of the Colombian Andes. *African Journal of Microbiology Research*, 8(8), 734-742.
- Sánchez-García, C., Cruz-Martín, M., Alvarado-Capó, Y., Rojas, L., Leiva-Mora, M., Acosta-Suarez, M., y Roque, B. (2012). Detección y cuantificación de quitinasa en hojas de banano (*Musa spp.*) inoculadas con *Mycosphaerella fijiensis*. *Bioteología Vegetal*, 12 (2), 8.
- Sánchez-García, C., Alvarado-Capó, Y., Cruz-Martín, M., Acosta-Suárez, M., Leiva-Mora, M., y Roque, B. (2010). Detección de compuestos bioquímicos relacionados con la respuesta defensiva en plantas de *Musa spp.* inoculadas artificialmente con *Mycosphaerella fijiensis*. *Bioteología vegetal*, 10 (2), 8.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda, M. & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol Res*, 183, 92–99

- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2, 1-14.
- Shen, M., Li, J., Dong, Y., Liu, H., Peng, J., Hu, Y., & Sun, Y. (2021). Profiling of plant growth-promoting metabolites by phosphate-solubilizing bacteria in maize rhizosphere. *Plants*, 10(6), 1071.
- Silva, C. F., Vitorino, L. C., Mendonça, M. A. C., Araújo, W. L., Dourado, M. N., Albuquerque, L. C., Soares, M. & Souchie, E. L. (2019). Screening of plant growth-promoting endophytic bacteria from the roots of the medicinal plant *Aloe vera*. *South African Journal of Botany*. doi:10.1016/j.sajb.2019.09.019
- Srinivasan, R., Karaoz, U., Volegova, M., MacKichan, J., Kato-Maeda, M., Miller, S., Nadarajan, R., Brodie, E. & Lynch, S. V. (2015). Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. *PLoS one*, 10(2), e0117617.
- Surapat, W., Pukahuta, C., Rattanachaikunsopon, P., Aimi, T. & Boonlue, S. (2013). Characteristics of phosphate solubilization by phosphate-solubilizing bacteria isolated from agricultural chili soil and their efficiency on the growth of chili (*Capsicum frutescens* L. cv. Hua Rua). *Chiang Mai J Sci*, 40(1), 11-25.
- Sunil T, Nitin M, & Girum K. (2021). Effect of Growth Regulators on *In Vitro* Micropropagation of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Gudiene and Belete Varieties from Ethiopia. *ScientificWorldJournal*, 2021, 1-8.
- Teng, F., Darveekaran, S., Zhu, P., Li, S., Huang, S., Li, X., Xu, J. & Yang, F. (2018). Impact of DNA extraction method and targeted 16SrRNA hypervariable region on oral microbiota profiling. *Sci Rep* 8(1):16321
- Teng, Z., Chen, Z., Zhang, Q., Yao, Y., Song, M., & Li, M. (2019). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from rhizosphere soils of the Yeyahu Wetland in Beijing, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 33976-33987.
- Thomas, S., Mathew, L. & Rishad, K. (2018). Isolation and molecular identification of phosphate solubilizing bacteria, *Bacillus licheniformis* UBPSB-07 capable



of enhancing seed germination in *Vigna radiata* L. *Phytomorphology*, 68(1&2), 13-18.

Torres-Guerrero, C., J. D. Etchevers B., M. H. Fuentes-Ponce, B. Govaerts, F. de León-González y J. M. Herrera. (2013). Influencia de las raíces sobre la agregación del suelo. *Terra Latinoamericana*, 31, 71-84.

Torres, PM Virelles, AB Cabrera, ML Mora, GG Rivero, LPL Caisa, ... (2013). Antagonismo “*in vitro*” de *Trichoderma harzianum* sobre aislados camagüeyanos de *Bipolaris oryzae* y *Sarocladium oryzae*. *Centro Agrícola* 40 (3), 29-36, 8.

Treebupachatsakul, T. & Poomrittigul, S. (2019). Bacteria classification using image processing and deep learning. In 2019 34th international technical conference on circuits/systems, computers and communications (ITC-CSCC) (pp. 1-3). IEEE.

Thunshirn, P., Wenzel, W. & Pfeifer, C. (2022) Pore characteristics of hydrochars and their role as a vector for soil bacteria: A critical review of engineering options. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 52(23), 4147-4171.

Van de Wiel, CC, CG van der Linden y OE Scholten. (2016). Mejora de la eficiencia en el uso del fósforo en la agricultura: oportunidades para el mejoramiento. *Eufítica*, 207, 1–22.

Vargas-Flores, T. y Kuno-Vargas, A. (2014). Morfología bacteriana. *Revista de Actualización Clínica*, 49(2), 2594-2598

Veitía, Y Alvarado-Capó, LR García, I Bermúdez-Carabaloso, ... (2008). Aplicación de la selección *in vitro* en el mejoramiento genético de la papa para la resistencia al Tizón temprano. *Biotecnología vegetal*, 8 (1), 8.

Velasco, A., Castellanos, O., Acevedo, G., Clarene, R. y Rodriguez, E. (2020). Bacterias rizosféricas con beneficios potenciales en la agricultura. *Terra Latinoamericana*. 8(2). <http://www.scielo.org.mx/pdf/tl/v38n2/2395-8030-tl-38-02-333.pdf>

- Wahid, F., Fahad, S., Danish, S., Adnan, M., Yue, Z., Saud, S., Siddiqui, M. H., Brtnicky, M., Hammerschmidt, T. & Datta, R. (2020). Sustainable Management with Mycorrhizae and Phosphate Solubilizing Bacteria for Enhanced Phosphorus Uptake in Calcareous Soils. *Agriculture*, 10, 334. <https://doi.org/10.3390/agriculture10080334>
- Walpola, B. C. & Yoon, M. H. (2013). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria and their co-inoculation efficiency on tomato plant growth and phosphorous uptake.
- Wang, X. Q., Zhao, D. L., Shen, L. L., Jing, C. L. & Zhang, C. S. (2018). Application and mechanisms of *Bacillus subtilis* in biological control of plant disease. Role of rhizospheric microbes in soil: Volume 1: *Stress management and agricultural sustainability*, 225-250.
- Wang, Y. Y., Li, P. S., Zhang, B. X., Wang, Y. P., Meng, J., Gao, Y. F., He, X. & Hu, X. M. (2020). Identification of phosphate-solubilizing microorganisms and determination of their phosphate-solubilizing activity and growth-promoting capability. *BioResources*, 15(2), 2560-2578.
- Watanabe, K. (2015). Potato genetics, genomics, and applications. *Breed Sci.*, 65(1), 53–68.
- Zaidi, A., Khan, M. S., Rizvi, A., Saif, S., Ahmad, B. & Shahid, M. (2017). Role of phosphate-solubilizing bacteria in legume improvement. Springer International Publishing, 175-197
- Zheng, B. X., Ibrahim, M., Zhang, D. P., Bi, Q. F., Li, H. Z., Zhou, G. W., Ding, K., Peñuelas, J., Zhu, Y. & Yang, X. R. (2018). Identification and characterization of inorganic-phosphate-solubilizing bacteria from agricultural fields with a rapid isolation method. *AMB Expr*, 8 (47), 1-12.

#### 5.4. ANEXOS

**Tabla 18.** Absorbancia en espectrofotómetro ajustados a un nivel de 0,1 a 600 nanómetros.

TRATAMIENTOS	Nivel de absorbancia
--------------	----------------------

---

CC-FCAGP-BSF31	0.127
CC-FCAGP-BSF26	0.150
CC-FCAGP-BSF20	0.127
CC-FCAGP-BSF18	0.143
CC-FCAGP-BSF15	0.124
CC-FCAGP-BSF14	0.126
CC-FCAGP-BSF13	0.127
CC-FCAGP-BSF12	0.160
CC-FCAGP-BSF11	0.132
CC-FCAGP-BSF10	0.155
Control	

---