

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA



PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

“Aislamiento de bacterias asociadas con la rizosfera de *Solanum tuberosum* L. var. Superchola en dos localidades de la provincia de Tungurahua”

DOCUMENTO FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN COMO
REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE INGENIERO
AGRÓNOMO

AUTOR.

ALTAMIRANO MAYORGA CHRISTIAN ALEJANDRO

TUTOR.

Ing. Michel Leiva Mora Dr.C.

AMBATO – ECUADOR

2022 - 2023

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“El suscrito, **CHRISTIAN ALEJANDRO ALTAMIRANO MAYORGA**, portador de la cédula de ciudadanía Nro. **1805161526**, libre y voluntariamente declaro que el informe final del proyecto de investigación titulado. “Aislamiento de bacterias asociadas con la rizosfera de *Solanum tuberosum* L. var. *Superchola* en dos localidades de la provincia de Tungurahua” es auténticamente original y personal. En virtud, declaro que el contenido de mi trabajo de investigación es de mi sola responsabilidad académica y legal, a excepción donde se indican las fuentes de información consultadas.”



Christian Alejandro Altamirano Mayorga

DERECHOS DE AUTOR

“Al presentar este informe final del Proyecto de Investigación titulado. “Aislamiento de bacterias asociadas con la rizosfera de *Solanum tuberosum* L. var. Superchola en dos localidades de la provincia de Tungurahua”, como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Ingeniero Agrónomo, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Facultad, para que este documento de investigación esté disponible para su lectura con fines de investigación de la comunidad universitaria, acorde con las normas establecidas por la Universidad Técnica de Ambato.

Estoy de acuerdo en que se realicen copias de este informe final, de acuerdo con las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando la reproducción de este informe final no implique una potencial ganancia económica.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este informe final.”



Christian Alejandro Altamirano Mayorga

**“Aislamiento de bacterias asociadas con la rizosfera de Solanum tuberosum L. var.
Superchola en dos localidades de la provincia de Tungurahua”**

REVISADO POR:

Ing. LEIVA MORA MICHEL. PhD.

TUTOR

APROBADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN

Ing. PhD. Oscar Patricio Núñez Torres.
PRESIDENTE TRIBUNAL.

FECHA

15/03/2023

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

FECHA

15/03/2023

Ing. Mg. Luis Alfredo Villacís Aldaz.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN.

FECHA

15/03/2023

DEDICATORIA

En primer lugar, a Dios quien me ha bendecido día a día otorgándome fortaleza, sabiduría e inteligencia en cada uno de los momentos de mi vida, así como para lograr culminar mi carrera universitaria.

A mis padres Hector y Edna que con su ejemplo de lucha, solidaridad, humildad y trabajo constante han sido y serán el pilar fundamental de mi vida ya que siempre me han apoyado en cada uno de mis sueños; y sé que papito de mi alma, tu desde el cielo con mi hermanita siempre me cuidas y proteges a cada instante, además de siempre con mi mama me corregían con amor y paciencia para que cada día sea una mejor persona, así como lograr culminar mi carrera universitaria.

A mis tíos, tías, primos y primas que siempre han estado ahí preocupándose de como estoy en la universidad así con brindándome sus consejos y apoyo con el afán de que cumpla mis propósitos. A mis abuelitos Humberto, Mercedes y Ángel que sé que desde lo alto del cielo siempre me protegen, y también a mi abuelita Rosa que siempre me ha demostrado aprecio.

A todos mis compañeros y amigos Christian, Freddy, Hugo, Pedro, Aldo, Solange, Catherine y Mayra por haberme brindado su amistad sincera y además de haber compartido muchas experiencias.

AGRADECIMIENTO

Mi eterno agradecimiento a Dios por brindarme su compañía en todo momento, así como por haberme puesto en mi camino a personas que siempre me han ayudado en mi crecimiento personal y profesional, además de haberme dado una excelente familia la cual siempre me ha brindado su inmenso esfuerzo y cariño para culminar mi carrera.

A la Universidad Técnica de Ambato, a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y a la Carrera de Ingeniería Agronómica por haberme abierto sus puertas para darme la oportunidad de una formación académica y brindarme las herramientas necesarias para llegar a obtener título de Ingeniero Agrónomo y ser una gran profesional.

Mi agradecimiento eterno a mi tutor de tesis Ing. Michel Leiva, quien siempre estuvo presto a resolver mis dudas, compartirme sus conocimientos y guiarme durante la presente investigación, de la misma manera a mis calificadores Ing. Rita Santana y Ing. Luis Villacís por sus recomendaciones y ayuda durante la elaboración de este proyecto de investigación, así también a la Ing. Nataly Solis por permitirme el uso tanto de equipos, así como de las instalaciones de los laboratorios.

A todos los docentes que en este tiempo de estudios me compartieron sus conocimientos académicos y que estuvieron prestos a ayudarme siempre.

A cada uno de mis compañeros y compañeras con quienes he tenido muchas experiencias y aprendizajes compartido en cada uno de los semestres.

¡Muchas gracias a todos ustedes!

CHRISTIAN ALEJANDRO ALTAMIRANO MAYORGA

Índice

CAPÍTULO I	1
MARCO TEÓRICO	1
1.1 Introducción	1
1.2 Antecedentes Investigativos	2
1.3. Categorías fundamentales	4
1.3.1. Poblaciones Microbianas de la Rizosfera	4
1.3.2. La rizosfera y los microorganismos del suelo	4
1.3.3. Cultivo de papa	5
1.4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
CAPITULO II	13
METODOLOGÍA	13
2.1. Ubicación del experimento	13
2.2. Características del lugar	13
2.3. Equipos y materiales	13
2.3.1. Material experimental	13
2.3.2. Equipos	14
2.3.3. Materiales	14
2.4. Factores de estudio	16
2.5. Tratamientos	16
2.6. Diseño experimental	17
2.7. Manejo del experimento	17
2.7.1. Fase 1: Implementación del experimento para la toma de muestras.	17
2.7.2. Fase 2: Determinación, Aislamiento y Caracterización de las bacterias cultivables.	19

2.7.2.1. Determinación de la cantidad y diversidad de bacterias cultivables a partir de muestras de suelo de dos localidades de la provincia de Tungurahua.....	20
2.7.2.2. Aislamiento de bacterias cultivables asociadas a fragmentos de raíces de <i>S. tuberosum</i> de la variedad Superchola.	24
2.7.2.3. Caracterización las colonias de los aislados bacterianos obtenidos.....	27
2.7.4. Identificación la morfología y la agrupación de los aislados bacterianos obtenidos.	28
2.8. Variables respuesta	30
2.9. Procesamiento de la información.....	31
CAPITULO III	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
3.1. Determinar la cantidad y diversidad de bacterias cultivables a partir de muestras de suelo de dos localidades de la provincia de Tungurahua.	32
3.1.1. Influencia de suelos de dos localidades sobre el número de unidades formadoras de colonias por gramo de raíz de plantas de <i>S. tuberosum</i> L.....	32
3.1.2. Influencia de diferentes profundidades sobre el número de unidades formadoras de colonias por gramo de raíz de plantas de <i>S. tuberosum</i> L en la localidad de Santa Rita, cantón Píllaro.	34
3.1.3. Influencia de diferentes profundidades sobre el número de unidades formadoras de colonias por gramo de raíz de plantas de <i>S. tuberosum</i> L en la localidad de Llangahua, cantón Ambato.....	36
3.1.4. Diversidad de bacterias cultivables a partir de muestras de suelo de dos localidades de la provincia de Tungurahua.....	38
3.2. Caracterización de colonias y la morfología de los aislados bacterianos obtenidos. .	40
3.2.1. Caracterización de colonias y la morfología de los aislados bacterianos obtenidos por el método de inclusión de raíces.	40
3.2.2. Caracterización de colonias y la morfología de los aislados bacterianos obtenidos por el método de lavado de raíces.	45

3.2.3. Caracterización de colonias y la morfología de los aislados bacterianos obtenidos por el método de maceración de raíces en buffer salino NaCl.	47
3.3. Cripreservación de los aislados bacterianos obtenidos de dos localidades de la provincia de Tungurahua.	53
CAPITULO IV	55
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	55
4.1. CONCLUSIONES	55
4.2. RECOMENDACIONES	55
BIBLIOGRAFÍA	56
ANEXOS	60

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica.....	6
Tabla 2. Principales plagas en el cultivo de papa	10
Tabla 3. Principales enfermedades en el cultivo de papa	10
Tabla 4. Factor 1.- Localidad.....	16
Tabla 5. Factor 2.- Profundidad de la toma de muestra de raíces.	16
Tabla 6. Factor 3.- Método de aislamiento.	17
Tabla 7. Composición del Agar Nutriente	19
Tabla 8. Influencia de suelos de dos localidades sobre el número de unidades formadoras de colonias por gramo de raíz de plantas de <i>S. tuberosum</i> L.	32
Tabla 9. Influencia de diferentes profundidades sobre el número de unidades formadoras de colonias por gramo de raíz de plantas de <i>S. tuberosum</i> L en la localidad de Santa Rita, cantón Píllaro.....	34
Tabla 10. Influencia de diferentes profundidades sobre el número de unidades formadoras de colonias por gramo de raíz de plantas de <i>S. tuberosum</i> L en la localidad de Llangahua, cantón Ambato.....	36
Tabla 11. Resultados del proceso de extracción de ADN, secuenciación masiva y análisis bioinformático.....	38
Tabla 12. Caracterización de los aislados bacterianos obtenidos por el método de inclusión de raíces limpiadas con pincel procedentes de la localidad de la localidad Santa Rita del cantón Píllaro en Agar nutritivo.	40
Tabla 13. Caracterización de los aislados bacterianos obtenidos por el método de inclusión de raíces lavadas con agua destilada procedentes de la localidad de la localidad Santa Rita del cantón Píllaro en Agar nutritivo.	41
Tabla 14. Caracterización de los aislados bacterianos obtenidos por el método de inclusión de raíces limpiadas con pincel procedentes de la localidad de la localidad Llangahua del cantón Ambato en Agar nutritivo.	43
Tabla 15. Caracterización de los aislados bacterianos obtenidos por el método de inclusión de raíces lavadas con agua destilada procedentes de la localidad de la localidad Llangahua del cantón Ambato en Agar nutritivo.	44

Tabla 16. Caracterización de los aislados bacterianos obtenidos por el método de lavado de raíces procedentes de la localidad de la localidad Santa Rita del cantón Píllaro en Agar nutritivo.	45
Tabla 17. Caracterización de los aislados bacterianos obtenidos por el método de lavado de raíces procedentes de la localidad de la localidad Llangahua del cantón Ambato en Agar nutritivo.	46
Tabla 18. Caracterización de los aislados bacterianos obtenidos por el método de maceración de raíces en buffer salino NaCl procedentes de la localidad de la localidad Santa Rita del cantón Píllaro en Agar nutritivo.	48
Tabla 19. Caracterización de los aislados bacterianos obtenidos por el método de maceración de raíces en buffer salino NaCl procedentes de la localidad de la localidad Llangahua del cantón Ambato en Agar nutritivo.	50

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama de la fase 1.	18
Figura 2. Diagrama de las actividades realizadas para determinar las unidades formadoras de colonia mediante el conteo en placa.	20
Figura 3. Diagrama del proceso del análisis Metagenómico	22
Figura 4. Diagrama del proceso de aislamiento de las bacterias presentes en las raíces, el cual fue realizado por 3 métodos.	24
Figura 5. Breve descripción de la caracterización de las colonias obtenidas.	27
Figura 6. Diagrama del proceso para la identificación de la morfología y agrupación de cada una de las bacterias.	28
Figura 7. Suelo procedente de Santa Rita, cantón Píllaro.	33
Figura 8. Suelo procedente de Llangahua, cantón Ambato.	33
Figura 9. 8 cm profundidad localidad de Santa Rita, cantón Píllaro.	35
Figura 10. 16 cm profundidad localidad de Santa Rita, cantón Píllaro.	35
Figura 11. 24 cm de profundidad localidad de Santa Rita, cantón Píllaro.	35
Figura 12. 8 cm de profundidad localidad Llangahua, cantón Ambato.	37
Figura 13. 16 cm de profundidad localidad Llangahua, cantón Ambato.	37
Figura 14. 24 cm de profundidad localidad Llangahua, cantón Ambato.	37
Figura 15. Resultado de perfil taxonómico de bacterias para la muestra L1 (localidad de Santa Rita, Cantón Píllaro).	39
Figura 16. Resultado de perfil taxonómico de bacterias para la muestra L2 (localidad de Llangahua, Cantón Ambato).	39
Figura 17. Caracterización cultural de las bacterias aisladas.	52
Figura 18. Caracterización morfológica de las bacterias aisladas.	53
Figura 19. Diagrama del proceso de criopreservación de los aislados bacterianos obtenidos.	54
Figura 20. Imágenes del muestreo de suelo en la localidad de Santa Rita, Cantón Píllaro.	60
Figura 21. Imágenes del muestreo de suelo en la localidad de Llangahua, Cantón Ambato.	60
Figura 22. Establecimiento de cada uno de los tratamientos con sus respectivas repeticiones con la muestra de suelo procedentes de la localidad de Santa Rita, Cantón Píllaro y la localidad de Llangahua, Cantón Ambato.	61
Figura 23. Etiquetas para la diferenciación de cada uno de los tratamientos.	62

Figura 24. Tabla de código de colores PANTONE.	62
Figura 25. Informe de resultados del Análisis Metagenómico.	64

RESUMEN

El propósito de esta investigación fue el aislar y caracterizar las bacterias cultivables presentes en las raíces (rizobacterias) de la papa de la variedad Superchola en dos localidades de la provincia de Tungurahua. En la primera fase se realizó el muestreo de suelos donde se cultiva papa, para luego colocarlos en botella plásticas con una capacidad de 6000 ml; donde se realizó la plantación de los tubérculos de la variedad Superchola. De este modo transcurrido uno 50 días se procedió a la toma de muestras de raíces en cada una de las profundidades (8, 16 y 24 cm) para realizar el aislamiento por 3 métodos (Inclusión de fragmentos de raíces de 10 mm de longitud, Lavado de raíces y siembra por diseminación, y Maceración de fragmentos de raíces en buffer salino NaCl y diseminación), para lo cual se utilizó el medio de cultivo Agar nutriente. Se logro obtener la cantidad de 82 aislados bacterianos obtenidos en su caracterización cultural predominaron en un 84% con forma circular, 85% con borde entero, 93% colonias con brillo, 67% con una elevación plana y un 88% con textura lisa. En relación a su caracterización morfológica predominaron en un 58% bacterias Gram (+), 97% los bacilos. Para determinar la cantidad de UFC/gr de raíz se realizaron disoluciones seriadas de cada localidad y profundidad dejándolas incubar por 48 horas a 28°C y así proceder al conteo. Para medir la diversidad de bacterias cultivables en el suelo, se tomó 250 g de la muestra de cada localidad, las cuales se enviaron al laboratorio IDgen, en el cual realizar el análisis metagenómico en cuyo informe menciona la prevalencia de 7856 bacterias cultivables en la localidad Santa Rita del cantón Píllaro y 1307 en la localidad del Llangahua del cantón Ambato. En base a los resultados obtenidos se podría decir que en la localidad Santa Rita del cantón Píllaro existe una mayor biodiversidad bacteriana. Sería muy interesante que cada uno de los aislados obtenidos sean utilizados para investigaciones que busquen la creación de bio insumos para este tipo de cultivo básico en la alimentación de la población.

Palabras clave: aislar, rizobacterias, análisis metagenómico.

SUMMARY

The purpose of this research was to isolate and characterize the cultivable bacteria present in the roots (rhizobacteria) of the potato of the Superchola variety in two locations in the province of Tungurahua. In the first phase, the examination of soils where potatoes are grown was carried out, to later place them in plastic bottles with a capacity of 6000 ml; where the tubers of the Superchola variety were planted. In this way, 50 days elapsed, root samples were taken at each of the depths (8, 16 and 24 cm) to carry out the isolation by 3 methods (Inclusion of 10 mm long root fragments, Washing planting and by root dissemination, and Maceration of root fragments in NaCl saline buffer and dissemination), for which the nutrient agar culture medium was obtained. It was possible to obtain the number of 82 isolated bacteria obtained in their predominant cultural characterization in 84% with a circular shape, 85% with an entire border, 93% colonies with shine, 67% with a flat elevation and 88% with a smooth texture. In relation to its morphological characterization, Gram (+) bacteria predominated in 58%, bacilli 97%. To determine the amount of CFU/g of root, serial solutions of each location and depth were made, leaving them to incubate for 48 hours at 28°C and thus proceed to count. In order to measure the diversity of cultivable bacteria in the soil, 250 g of the sample from each location were taken, which were sent to the IDgen laboratory, where the metagenomic analysis was carried out, in which the report mentions the prevalence of 7856 cultivable bacteria in the soil. the town of Santa Rita in the canton of Píllaro and 1307 in the town of Llangahua in the canton of Ambato. Based on the results obtained, it could be said that in the Santa Rita locality of the Píllaro canton there is a greater bacterial biodiversity. It would be very interesting if each of the isolates obtained is used for research that seeks the creation of bio-inputs for this type of staple crop in the diet of the population.

Keywords: isolate, rhizobacteria, metagenomic analysis.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Introducción

La papa es considerada como uno de los cultivos más importantes a nivel mundial ocupando el cuarto lugar después del trigo, el arroz y el maíz. En América del Sur especialmente en la sierra ecuatoriana cumple un papel importante debido a su valor nutricional así también como fuente de ingresos económicos. El cultivo de papa tiene una amplia gama de variedades las cuales tienen diferentes usos y formas de consumo directo industrializado. En Ecuador, la papa conjuntamente con el arroz forma parte de los productos básicos con mayor consumo en las familias (Andrade *et al*, 2017).

En la provincia de Tungurahua este cultivar es de mucho interés en el aspecto socioeconómico, el cual es cultivado desde las zonas más frías teniendo un rendimiento por cantón de: 5.4 tn/ha en Ambato, Cevallos 18 tn/ha, Mocha 20 tn/ha, Patate 19.1 tn/ha y Tisaleo 17.6 tn/ha. Entre las variedades sembradas que predomina en los cantones de la provincia de Tungurahua son: superchola, cecilia y putza que son muy apetecidas por los consumidores ya sea su consumo de forma fresca o industrial (Mastrocola *et al*, 2016).

Se considera que el cultivo de papa es una de las principales fuentes de alimento con datos de consumo anual de 122 kg en Quito, 80 kg en Cuenca y 50 kg en Guayaquil, donde el 90% de la papa se consume en estado fresco y el 10 % es utilizada en la industria con productos variados como papas fritas en forma de “chips”, a la francesa, congeladas, pre fritas y enlatadas, de este modo se utiliza 50.000 t/año, de papa para la industria. (Andrade *et al*, 2017).

Este cultivo ha presentado desde siempre varios problemas como es el deterioro del suelo el cual afecta directamente a la microbiota del suelo, por lo que es fundamental mantener una relación microorganismo – planta en la que se asocia de manera adecuada la variedad de la planta y la microbiota cumpliendo así un papel fundamental en el mantenimiento del suelo y la planta cultivada entre los microorganismos más abundantes en el suelo se encuentran las bacterias que ocupan un

rango de 10^6 y 10^8 gramo de suelo teniendo un peso de suelo de alrededor de 10 000 kg/ha siendo un 5% del total de materia seca del suelo presente (Vélez *et al*, 2018).

Mediante la presente investigación se pretende aislar bacterias las mismas que están asociadas con la rizosfera de *Solanum tuberosum* L. var. Superchola con el propósito de reconocer e identificar la biodiversidad de dichos microorganismos presentes en dos localidades de la provincia de Tungurahua.

1.2 Antecedentes Investigativos

Calvo *et al*, (2008) en su investigación titulada “ESTUDIO DE LAS POBLACIONES MICROBIANAS DE LA RIZÓSFERA DEL CULTIVO DE PAPA (*Solanum tuberosum*) EN ZONAS ALTOANDINAS” mencionaron que la población de bacterias totales esta estrechamente relacionada a ciertos factores tales como el pH del suelo , temperatura, y sobre todo la fertilización inorgánica del mismo. Por otra parte señalaron que el tipo de variedad de la papa a utilizar influye sobre las poblaciones de los microorganismos rizosféricos debido a los exudados liberados por la planta.

Arango *et al*, (2012) mencionaron que las rizobacterias son consideradas como microorganismos promotores del crecimiento vegetal , ayudan en la asimilacion de nutrientes, incrementan la productividad agrícola y sobre todo influyen en el cuidado del medio ambiente. El uso eficaz de estos microorganismos son una pieza clave ya que son utilizados de diversas maneras por sus múltiples beneficios ya sea como biofertilizantes para el crecimiento, maduración y rendimiento del cultivo, así como biopesticidas ya que actúan en la reducción e infestación de enfermedades de las plantas.

Las rizobacterias conocidas también como bacterias del suelo se localizan en la rizosfera es decir en el área del suelo que se une a la raíz, debido a que en esta zona existe una interacción dinámica y única de los procesos químicos, físicos, geológicos y biológicos entre las raíces y los microorganismos, la misma que se extiende a pocos milímetros de la superficie radicular. Con el tiempo los microorganismos y las plantas han ido evolucionado notablemente lo cual ha permitido

el desarrollo de estrechas relaciones con ventajas de adaptabilidad en diversos hábitats terrestres (Velasco *et al*, 2020).

Soler *et al*, (2012) en su investigación obtuvieron una distribución diferencial de bacterias con un potencial elevado de control de patógenos aislados del interior de la raíz o rizosfera del cultivo de papa, además logro diseñar estrategias efectivas en cuanto a la búsqueda de biocontroladores de *Spongospora subterranea* u otros patógenos del suelo. Por otra parte mencionaron que la producción de fitohormonas producidas por bacterias son consideradas como uno de los principales mecanismos que favorecen al crecimiento vegetal debido a que estos compuestos de carácter orgánico son los encargados de regular el desarrollo y crecimiento en las plantas.

Castro *et al*, (2019) en su investigación señalaron que para el muestreo y aislamiento de bacterias se requiere de muestras de suelo que fueron tomadas de 10 a 20 cm desde la base del tallo sin presencia de raíces además del suelo rizosférico así como también de raíces ya sean finas o gruesas y por último de tubérculos de papa, por otra parte recomienda que para el aislamiento de dichos microorganismo se utilicen medios de cultivo tales como el agar nutritivo al 50% el PGA (papa glucosa agar) y el agar extracto de raíz los cuales fueron preparados bajo mucha asepsia con el propósito de evitar la contaminación de los mismos.

Tolosa (2014) señala que mediante el uso de nuevas técnicas para el control de patógenos tanto la productividad como la calidad del cultivo de papa no es afectado a gran escala, por lo que en su investigación da a conocer que el uso de microorganismos antagonistas los cuales fueron aislados de la comunidad microbiana presente en la rizósfera generan excelentes resultados, obteniendo un total de 49 cepas aisladas de actinomicetos evaluando así sus capacidades antagónicas ante los fitopatógenos que atacan a *Solanum tuberosum* siendo el 26,5% antagónico frente a *Pectobacterium carotovorum* , 69,4% para *Fusarium sp.* , 55,1 % para *Rhizoctonia solani* , 46,9 % a *Phytophthora infestans* y 44,9% a *Lasiodiplodia sp.*

En la rizosfera la mayor cantidad de microorganismos que habitan en él son bacterias debido a su rápido crecimiento y su adaptabilidad a un amplio rango de sustratos ricos en fuentes de carbono o nitrógeno. El tipo de suelo, pH, la vegetación, humedad y fertilización son algunos de los factores que influyen de manera directa a la hora de encontrar dichos microorganismos. Además, señala que la concentración de microorganismos por gramo de suelo que se halla junto al sistema radicular en la zona denominada rizosfera es mayor que en el resto del suelo (Leiva, Osorio, & Ramírez , 2020).

1.3. Categorías fundamentales

1.3.1. Poblaciones Microbianas de la Rizosfera

El término Rizosfera hace referencia a la zona que se encuentra entre el sistema radicular y el suelo, en cual existe una gran diversidad de microorganismos de gran importancia para la agricultura. Toloza (2014) señala que la rizósfera esta comprendida de 3 a 5 cm de la capa del suelo, en la cual habitan un sin número de microoeganismo entre los cuales se pueden mencionar hongos , bacterias, algas ; entre otros, los mismos que tienen una estrecha relación con las raíces ya sea de carácter fitopatógeno o benéfico ,ademas estima que entre un 30 -50% de las bacterias que se encuentran en la rizósfera ejercen un efecto benéfico en las plantas.

En la rizósfera existe una diversidad de microorganismos los cuales implantan relaciones de simbiosis con las plantas los mismos que intervienen en el ciclo de algunos elementos minerales tales es el caso del fósforo , nitrógeno, carbono, hierro y entre otros favoreciendo asi la nutrición de las plantas. (Torres, 2020)

Interés agronómico de la rizosfera

- Intervienen en la modificacion de la estructura del suelo
- Favorecen en la nutrición de las plantas
- Secreción de hormonas
- Control de infecciones patógenas

1.3.2. La rizosfera y los microorganismos del suelo

Bacterias Fijadoras de nitrógeno: este tipo de microorganismos se caracteriza por ser biofertilizantes ecológicos además se encuentran aquellas bacterias filamentosas las cuales viven en simbiosis con las plantas, pertenecen al género Frankia, los cuales no forman un micelio aéreo y sus esporas son inmóviles, por otra parte, se encuentran las bacterias móviles del suelo las mismas que son atraídas hacia la raíz por los compuestos que liberan (Torres, 2020).

Solubilizadores de fósforo: Este tipo de microorganismos se encargan de transformar el fósforo orgánico en formas inorgánicas para mayor asimilación de las plantas, este proceso involucra la transformación de fosfatos insolubles a otros compuestos disponibles para las plantas. La población aproximada de los microorganismos que solubilizan ocupa tan solo el 10 % de la población total que se encuentran en la rizosfera (Torres, 2020).

Captadores de fósforo: En este grupo de microorganismos se encuentran las micorrizas las cuales se encargan de penetrar hacia las raíces con el fin de obtener los nutrientes necesarios tales como carbohidratos los mismos que son fuente de energía para cumplir con su ciclo de vida, por otra parte, las micorrizas favorecen al sistema radicular de las plantas permitiendo una mejor absorción de nutrientes y agua. (Torres, 2020)

Promotores del crecimiento vegetal: conocidos también por sus siglas PGPR estos microorganismos favorecen al crecimiento de las plantas debido a los diversos mecanismos que desarrollan como por ejemplo la síntesis de fitohormonas que intervienen en el crecimiento de la raíz y en la proliferación de los pelos absorbentes por otra parte inhiben el desarrollo de los microorganismos fitopatógenos e intervienen en la producción de sustancias quelantes de Fe , son muy buenos fijadores de nitrógeno y fósforo aumentando así la absorción de agua y nutrientes. Los PGPR se encargan de controlar a los organismos fitopatógenos mediante la síntesis de ciertos compuestos químicos y la inducción de resistencia en la planta. (Torres, 2020)

1.3.3. Cultivo de papa

Origen

Se conoce que el creador de esta variedad fue Germán Bastidas considerado como un excelente investigador autodidacta dedicado al mejoramiento genético de varios cultivos como en este caso es la papa Super chola que proviene de los cruzamientos de (Curipamba negra x *Solanum demissum*) x (clon resistente con comida amarilla x chola seleccionada) la cual fue liberada en el año de 1984 en campos de productores (Andrade *et al*, 2002).

Generalidades

La variedad super chola se adapta a climas fríos con altitudes a partir de los 2800 a 3600 m como son la región Sierra norte y centro. Considerada una planta de crecimiento erecto con varios tallos verdes con pequeñas pigmentaciones púrpuras de excelente desarrollo y pubescentes, además posee un follaje muy frondoso con unas hojas de color verde intenso con tres pares de folíolos primarios y secundarios, sus flores son de color morado, alcanza un rendimiento de 30t/ha y necesita de 180 días para llegar a un estado perfecto de maduración con un periodo de reposo de 80 días (INIAP, 2011).

Tabla 1. Clasificación taxonómica

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	Solanum
Subgénero	Potatoe
Especie	<i>Solanum tuberosum</i> L., 1753

Elaborado por: Alejandro Altamirano

Fuente: (Andrade *et al*, 2002)

Descripción Botánica

▪ Brote

Se denomina brote al “ojo” del tubérculo su apariencia y tamaño se ven influenciados por las condiciones en las que fueron almacenados los tubérculos los cuales están compuestos por pelos, yema terminal y lateral, lenticelas, primordios radiculares y nudos (Egúsquiza,2000).

▪ Planta

Es una planta vigorosa de rápido desarrollo que cubre totalmente el terreno de tamaño medio, con diversos tallos verdes con algunas pigmentaciones moradas, con una presencia de entre nudos, alas dentadas y ramificación (INIAP, 2011).

▪ Raíz

La raíz es considerada como la estructura subterránea que absorbe agua y los nutrientes del suelo su origen está en los nudos de los tallos formando un sistema fibroso las raíces del cultivo de papa no son muy profundas, débiles y generalmente se pueden encontrar en capas superficiales (Huamán, 2016).

▪ Hojas

Sus hojas son de color verde intenso compuestas, imparipinadas, abiertas y con tricomas en el haz y envés de tamaño medio con folíolos primarios y secundarios fusionados por un peciolo, alternados por un par de hojuelas (Huamán, 2016).

▪ Flor

Las flores son de color púrpura con una inflorescencia cimosa y con pedúnculo su cáliz está formado por cinco sépalos púrpuras con algunas pigmentaciones verdes pubescentes y acuminados su corola está compuesta por cinco pétalos de tamaño medio de color morado con estambres largos y amarillos y un pistilo con un estigma largo más que las anteras de color verde con excelente índice de fertilidad (Huamán, 2016).

▪ Fruto y Semilla

Denominado fruto o baya de la papa se origina en el ovario debido a su desarrollo en cuanto a su semilla se la puede denominar semilla sexual en la que presenta un a ovulo fecundado, desarrollado y maduro, se estima que el número de semillas por fruto varia de 0 a 400 (Inostroza, Méndez & Sotomayor, 2009).

- **Tubérculo**

El tubérculo presenta una forma oblonga con una piel de color rosado intenso y de pulpa amarilla, presenta algunos ojos superficiales. Su formación es el resultado de la proliferación del tejido de reserva lo cual hace que se active y aumenten células hasta 64 veces, el tubérculo de papa se encuentra especializado para almacenar excedentes de energía o también denominado almidón (Inostroza, Méndez & Sotomayor, 2009).

Requerimientos del cultivo

- **Clima**

El cultivo de papa Super chola se cultiva en altitudes de 2800 a 3600 msnm, lo cual al realizar la plantación la temperatura del suelo debe ser superior a los 7 °C y en las noches temperaturas frescas, lo cual el frío excesivo ocasionará daños en la papa como quedar sus tubérculos pequeños lo cual también favorecerá a la proliferación de plagas y enfermedades (Pourrut, 2018).

- **Humedad**

Es necesario tener una humedad relativa moderada para que el cultivo de papa tenga éxito. Sin embargo, una humedad excesiva en la germinación de los tubérculos influye desde la aparición de las flores hasta la maduración del tubérculo lo cual una humedad ambiental favorecerá a un ataque de patógenos (Franco, 2002).

- **Suelo**

Se requiere para el cultivo de papa un suelo profundo generalmente franco o franco arenoso con excelente drenaje, fértil y muy rico en materia orgánica. Sin embargo, también puede cultivarse en suelos arcillosos con una adecuada preparación y excelente drenaje con un pH ideal de 4.5 y 7.5 (Villafuerte, 2008).

- **Temperatura**

Se estima que los requerimientos térmicos pueden variar según las variedades sin embargo se puede decir que una temperatura diurna óptima oscila entre los 20° y 25°C y una temperatura nocturna oscila entre 8° y 13°C los cuales ayudan a tener una excelente tuberización (Muñoz & Cruz, 2014).

- **Luminosidad**

Pourrut (2018) menciona que la producción y distribución de carbohidratos se encuentra influenciada por la luminosidad, la cual cumple un papel fundamental en la fotosíntesis, la más alta concentración se encuentra en los tubérculos teniendo una excelente asimilación a los 60 000 lux.

Labores del cultivo

Primero es necesario realizar una desinfección adecuada a los tubérculos con el objetivo de evitar que se pudran o lleguen a enfermarse por algún patógeno estos serán almacenados en sacos ralos o canastos y esperar que se hagan los ojos ,seguidamente los surcos se realizaran con la ayuda de la yunta o maquinaria especializada dependiendo de la topografía del terreno estos surcos tienen una dimensión de 0.90 a 1.50 m .En cuanto se refiere a la siembra su distancia es de un paso o 30 cm su profundidad dependerá del tamaño de la semilla y humedad del suelo y deberá taparse entre unos 5 a 12 cm, pasado los primeros meses se realizara el rascadillo que es aflojar superficialmente la tierra seguidamente se realizara el medio aporque mediante una fertilización lo cual favorecerá a la tuberización y facilitara tener una buena cosecha (Pumisacho y Sherwood, 2012).

Fertilización

La fertilización del cultivo de papa se encuentra influenciada por el cantón y la economía del productor ya que es diferente el suelo, origen y manejo por ello es necesario conocer la disponibilidad de nutrientes debido a que los requerimientos de este cultivo son altos, aproximadamente se necesita de 100-300 y 500 kg/ha de NP_2O_5 y K_2N teniendo un rendimiento de 56 t/ha sin embargo se conoce que la papa es un cultivo que demanda del uso de fertilizantes compuestos llegando aplicar un 50% de nitrógeno al momento de sembrar o el primer aporque con formulaciones como : 12-36-12,10-30-10,18-46-00,15-15-15,8-20-20 siendo las formulaciones más usadas dependiendo el estado fenológico de la planta (INIAP, 2011). Además, la extracción de los nutrientes se verá influenciada de acuerdo a cada variedad cultivada ya sea por el manejo, rendimiento, fertilidad del suelo y condiciones meteorológicas.

Plagas y enfermedades

Tabla 2. Principales plagas en el cultivo de papa

Plagas	Nombre científico	Afección
Polilla	<i>Phthorimaea operculella</i>	Atacan principalmente a los tubérculos recién sembrados y almacenados en lugares cálidos.
Gorgojo de los Andes	<i>Premnotrypes spp</i>	Ocasionan daños en el tubérculo formando agujeros en los que depositan sus excretas.
Mosca Minadora	<i>Liriomyza huidobrensis</i>	Provocan perforaciones en el follaje ocasionado galerías en las hojas llegando a defoliar la planta.
Gusano Blanco	<i>Premnotrypes vorax</i>	Ocasionan daños en las raíces provocando la muerte de la planta.
Pulguilla	<i>Epitrix spp</i>	Se alimenta principalmente de cogollos y follaje destruyendo gran parte del área foliar.
Trozador	<i>Spodoptera sp.</i>	Perdida del área foliar y en su estado de maduración.

Elaborado por: Alejandro Altamirano

Fuente: (Puma & Calderon, 2016)

Tabla 3. Principales enfermedades en el cultivo de papa

Enfermedades	Nombre científico	Afección
Tizón tardío	<i>Phytophthora infestans</i>	Atacan principalmente a las hojas y tallos con manchas de color café.
Roya	<i>Puccinia pittieriana</i>	Provocan daños principalmente en las hojas, tallos, flores y frutos

		formando pústulas de color rojizo.
Rizoctonia	<i>Rhizoctonia solani</i>	Aparecimiento de papas aéreas además de presentar en la cáscara de la papa costras negras o esclerocios.
Pudrición seca	<i>Fusarium spp</i>	Pudrición del tubérculo debido a heridas o mala ventilación.
Sarna polvorienta	<i>Spongospora subterranea</i>	Se presenta daños en los tubérculos como ampollas o mitzas de color ladrillo.
Carbón	<i>Thecaphora solani</i>	Ocasiona agallas en tuberculos, tallos y estolones de color negruzco.

Elaborado por: Alejandro Altamirano

Fuente: (Puma & Calderon, 2016)

1.4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.4.1. Hipótesis

El cultivo microbiológico mediante el método de infusión de raíces de *S. tuberosum* muestreada a una profundidad de 8 cm influye para el desarrollo de bacterias asociadas a la rizosfera.

1.4.2. Objetivos

Objetivo general

Aislar bacterias asociadas con la rizosfera de plantas de *Solanum tuberosum* var. Superchola crecidas en suelos procedentes de dos localidades de la provincia de Tungurahua.

Objetivos específicos

- 1- Determinar la cantidad y diversidad de bacterias cultivables a partir de muestras de suelo de dos localidades de la provincia de Tungurahua.
- 2- Aislar bacterias cultivables asociadas a fragmentos de raíces de *S. tuberosum* de la variedad Superchola.
- 3- Caracterizar las colonias de los aislados bacterianos obtenidos.
- 4- Identificar la morfología y la agrupación de los aislados bacterianos obtenidos.

CAPITULO II

METODOLOGÍA

2.1. Ubicación del experimento

La investigación se desarrolló en el laboratorio de Bioinsumos ubicado en la Granja Experimental Docente “Querochaca” de la Facultad de Ciencias Agropecuarias en el cantón Cevallos, provincia de Tungurahua. Se encuentra dentro de las coordenadas geográficas 1°22’11.20” S y 75°36’24.24” O, con una altitud de 2891 msnm.

2.2. Características del lugar

La presente investigación se llevó a cabo en la Facultad de Ciencias Agropecuarias que está ubicado en el barrio El Tambo la Universidad parroquia la matriz perteneciente al cantón Cevallos Provincia de Tungurahua, la cual se encuentra a 19.3 km al Sureste de Ambato.

2.3. Equipos y materiales

2.3.1. Material experimental

En cuanto tiene que ver a esta clase de material, el cual son fragmentos de raíces que fue obtenido principalmente a partir de la plantación de tubérculos (*S. tuberosum*) de la variedad Superchola (los cuales fueron adquiridos en la plaza primero de Mayo que encuentra ubicada en el ciudad de Ambato) en muestras de suelo recolectadas en 2 localidades de la provincia de Tungurahua donde

se dedican a este cultivo, las cuales fueron colocadas en botellas de Polietileno Tereftalato con la capacidad de 14 lb y permanecieron en un espacio de la terraza del segundo piso del Edificio de Laboratorios de Investigación bajo una pequeña cubierta plástica de 4 m², bajo condiciones controladas de humedad.

2.3.2. Equipos

- Autoclave (ALL AMERICAN 75X).
- Balanza de precisión (OHAUS NVT10001/1).
- Destilador de agua (ELGA PURELAB-R7).
- Agitador Magnético con Calentador (THERMO SCIENTIFIC SP88857100)
- Incubadora (memmert IN110)
- Mechero de alcohol
- Mechero de bunsen
- Refrigerador (INDURAMA (S50) VFV 520)
- Microscopio (Motic BA210LED)
- VORTEX (VWR 97043-564)
- Micropipetas (Walter Products)
- Puntas de micropipetas de 200µl, 1000µl y 10ml.

2.3.3. Materiales

- Raíces de papa.
- Cinta masking.
- Cucharillas metálicas.
- Vaso de precipitación (100 y 600ml).
- Bisturí.

- Hoja de bisturí (# 22).
- Pinzas metálicas.
- Tijera metálica.
- Alcohol al 70% y 96%.
- Papel de cocina.
- Gradilla metálica.
- Papel aluminio.
- Cajas Petri de 90*15 ml
- Medio de cultivo Agar nutriente (TM MEDIA, TM341).
- Tubos eppendorf de 2 mL.
- Probeta (500 ml)
- Tubos de ensayo
- Botellas de Polietileno Tereftalato de 6000ml
- Tubérculos de la variedad Superchola
- Muestras de suelo donde se cultive papa.
- Kit de Reactivos para Tinción de Gram
- Asa de inoculación de acero inoxidable
- Análisis metagenómico de suelo
- Detergente sólido y líquido.
- Agua esterilizada.
- Marcadores permanentes de punta fina y extrafina (Utileza).
- Toallas de papel.
- Cofia.
- Bata quirúrgica.
- Mascarillas.
- Glicerol
- Caldo de infusión de cerebro y corazón BHI (Oxoid)
- NaCl (Casa del químico).

2.4. Factores de estudio

- Factor 1. Localidad.
- Factor 2. Profundidad de la toma de muestra de raíces.
- Factor 3. Método de aislamiento.

2.5. Tratamientos

Tabla 4. Factor 1.- Localidad.

Tratamiento	Descripción
L1	Suelo procedente de la localidad Santa Rita del cantón Píllaro.
L2	Suelo procedente de la localidad Llangahua del cantón Ambato.

Elaborado por: Alejandro Altamirano

Tabla 5. Factor 2.- Profundidad de la toma de muestra de raíces.

Tratamiento	Descripción
1	8 cm de profundidad.
2	16 cm de profundidad.
3	24 cm de profundidad.

Elaborado por: Alejandro Altamirano

Tabla 6. Factor 3.- Método de aislamiento.

Tratamiento	Descripción
M1	Inclusión de fragmentos de raíces de 10 mm de longitud.
M2	Lavado de raíces y siembra por disseminación.
M3	Maceración de fragmentos de raíces en buffer salino NaCl y disseminación.

Elaborado por: Alejandro Altamirano

2.6. Diseño experimental

Para la determinar la cantidad de unidades formadoras de colonia asociadas a fragmentos de raíces de *S. tuberosum* de la variedad Superchola, se realizará un diseño completamente aleatorizado.

2.7. Manejo del experimento

Todo el experimento se puso en marcha en el laboratorio de Bioproductos el cual se encuentra en el edificio de investigación de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.

2.7.1. Fase 1: Implementación del experimento para la toma de muestras.

- 1) Se realizó la recolección de muestras a los 20cm de profundidad por el método de bandera inglesa de suelos procedentes de dos localidades donde se cultive la papa en la Provincia de Tungurahua como son Santa Rita en el cantón Píllaro y Llangahua en el cantón Ambato.

- 2) Se colocó en botellas de Polietileno Tereftalato (PET) las muestras de cada suelo recolectado, identificándolas con una etiqueta con la información de cada localidad.
- 3) Se plantaron los tubérculos en cada una de las botellas de PET, realizado 5 repeticiones de cada localidad.

Figura 1. Diagrama de la fase 1.



Elaborado por: Alejandro Altamirano


2.7.2. Fase 2: Determinación, Aislamiento y Caracterización de las bacterias cultivables.

Preparación y dispensación de medio de cultivo Agar nutriente.

Para el primer método de aislamiento se utilizó 60 cajas petri, en el segundo método 70 y en el tercer método 200. Para aquello de utilizo 28.0 gr de Agar nutriente (Tabla 7) disolviéndolos en 1000 ml de agua destilada dentro de un vaso de precipitación colocado sobre un agitador magnético con calentador, para lograr un calentamiento suave con una agitación constante hasta que este llegue a hervirse o su punto de ebullición y una disolución completa del medio. A continuación, se lo envaso en una botella de vidrio con tapa roscable de plástico, para así llevarlo al autoclave a que se esteriliza el llegar a los 121°C o 15 psi por 15 minutos. Para finalmente sacarlo del autoclave y dejarlo que se enfrié hasta que este descienda hasta una temperatura de entre 45 – 50°C y así poder dispensar 20 ml en cada caja petri dentro de una área aséptica, en la cual se las mantuvo hasta que el agar nutritivo de solidifique para poder las tapar y mantenerlas en refrigeración.

Tabla 7. Composición del Agar Nutriente

Ingrediente	gr/lt.
Agar	15
Peptona	5
Cloruro de sodio	5
Extracto de carne	1.5
Extracto de levadura	1.5



pH	7.4 ± 0.2 a 25°C	
----	--------------------------------------	--

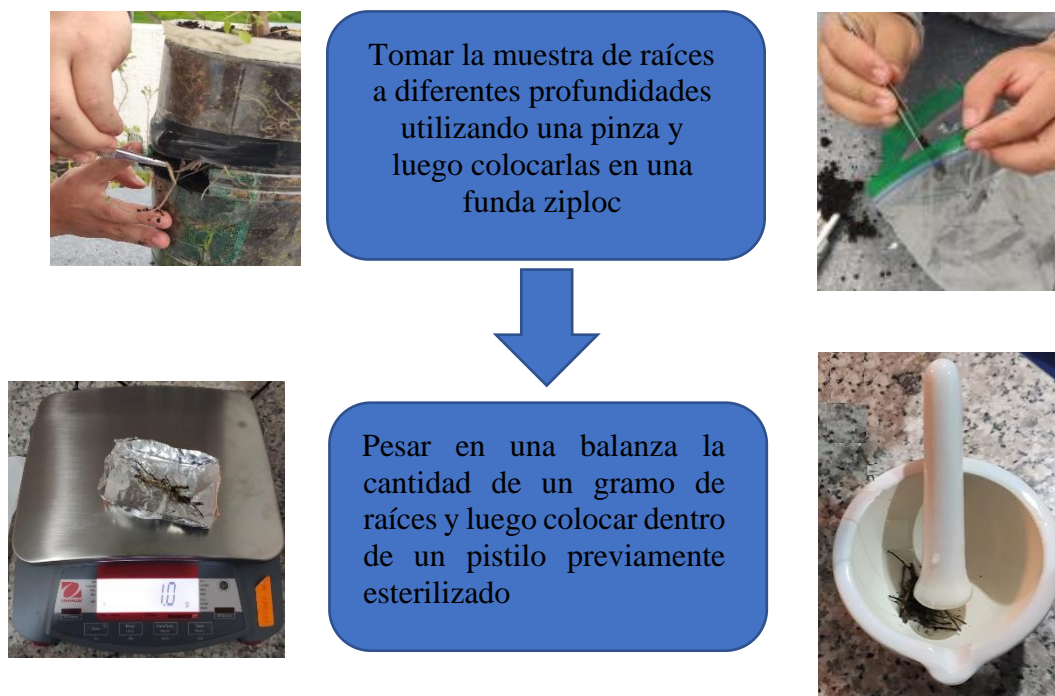
Elaborado por: Alejandro Altamirano

2.7.2.1. Determinación de la cantidad y diversidad de bacterias cultivables a partir de muestras de suelo de dos localidades de la provincia de Tungurahua.

2.7.2.1.1. Determinación de la cantidad de bacterias cultivables a partir de muestras de suelo de dos localidades de la provincia de Tungurahua.

Para la conocer la cantidad de bacterias cultivables se utilizó el siguiente procedimiento por el método de maceración de fragmentos de raíces en buffer salino NaCl y diseminación.

Figura 2. Diagrama de las actividades realizadas para determinar las unidades formadoras de colonia mediante el conteo en placa.





Dispensar 10ml de cloruro de sodio al 0.9% en el pistilo para luego con la ayuda del mortero aplastar las raíces para realizar la maceración



Dejar reposar la maceración para que se sedimente para luego tomar la cantidad de 1ml y dispensar en tubo de ensayo el cual previamente ya tiene 9ml de agua estéril



Llevar el tubo de ensayo al vortex para agitarlo por unos 60 segundos a unas 2500rpm, y luego tomar 1ml de esta sustancia (este proceso es repetitivo hasta llegar a n disolución deseada)

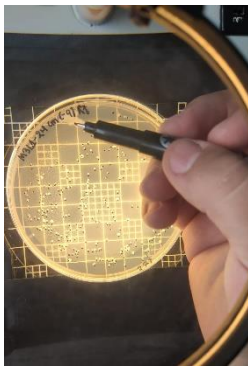


Con la ayuda de una micropipeta tomar la cantidad de 100µl del líquido de cada disolución y dispensar en la caja petri con agar nutriente (repetir el proceso 2 veces más)





Luego de realizar el proceso de 3 repeticiones por disolución con la ayuda de un asa de debranski esparcir por toda la placa para luego llevarla a incubar por 48 horas a una temperatura de 28°C



Sacar de la incubadora las placas y con la ayuda de un contador de colonias un marcador contar la cantidad de colonias que se han formado dentro de cada caja petri (la cantidad debe estar en el rango de 30 - 300 colonias)



Elaborado por: Alejandro Altamirano

2.7.2.1.2. Determinación de la diversidad de bacterias cultivables a partir de muestras de suelo de dos localidades de la provincia de Tungurahua.

Para la determinación de la diversidad bacteriana existente en las muestras de suelo se realizó el siguiente procedimiento

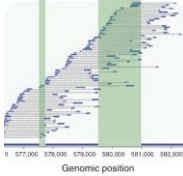
Figura 3. Diagrama del proceso del análisis Metagenómico



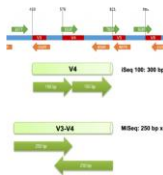
Se tomaron aproximadamente 500mg de muestra desde donde se extrajo ADN por métodos convencionales



Se verificó la calidad del ADN obtenido mediante lectura espectrofotométrica en nanodrop.

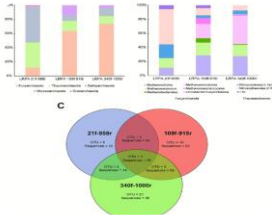


Se realizó el análisis de calidad y creación de librerías para la plataforma Miseq NGS, realizando lecturas pair end de 300 bp en cada lado forward y reverse.

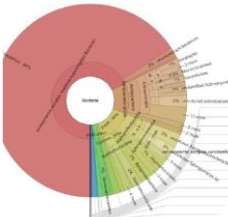


Se utilizaron los primers 16S V3-V4 (341F CCTACGGGNGGCWGCAG; 805R GACTACHVGGGTATCTAATCC) con extremos cohesivos P5-P7 (P5 TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG; P7 GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG) para la adición de primers y códigos de barras de Nextera.

Las lecturas obtenidas fueron limpiadas, ensambladas, contabilizadas utilizando software bioinformático. Las secuencias quiméricas fueron eliminadas.



Las secuencias finales fueron identificadas mediante BLAST con un índice de identidad del 99% para bacterias (Base de datos 16S SILVA).



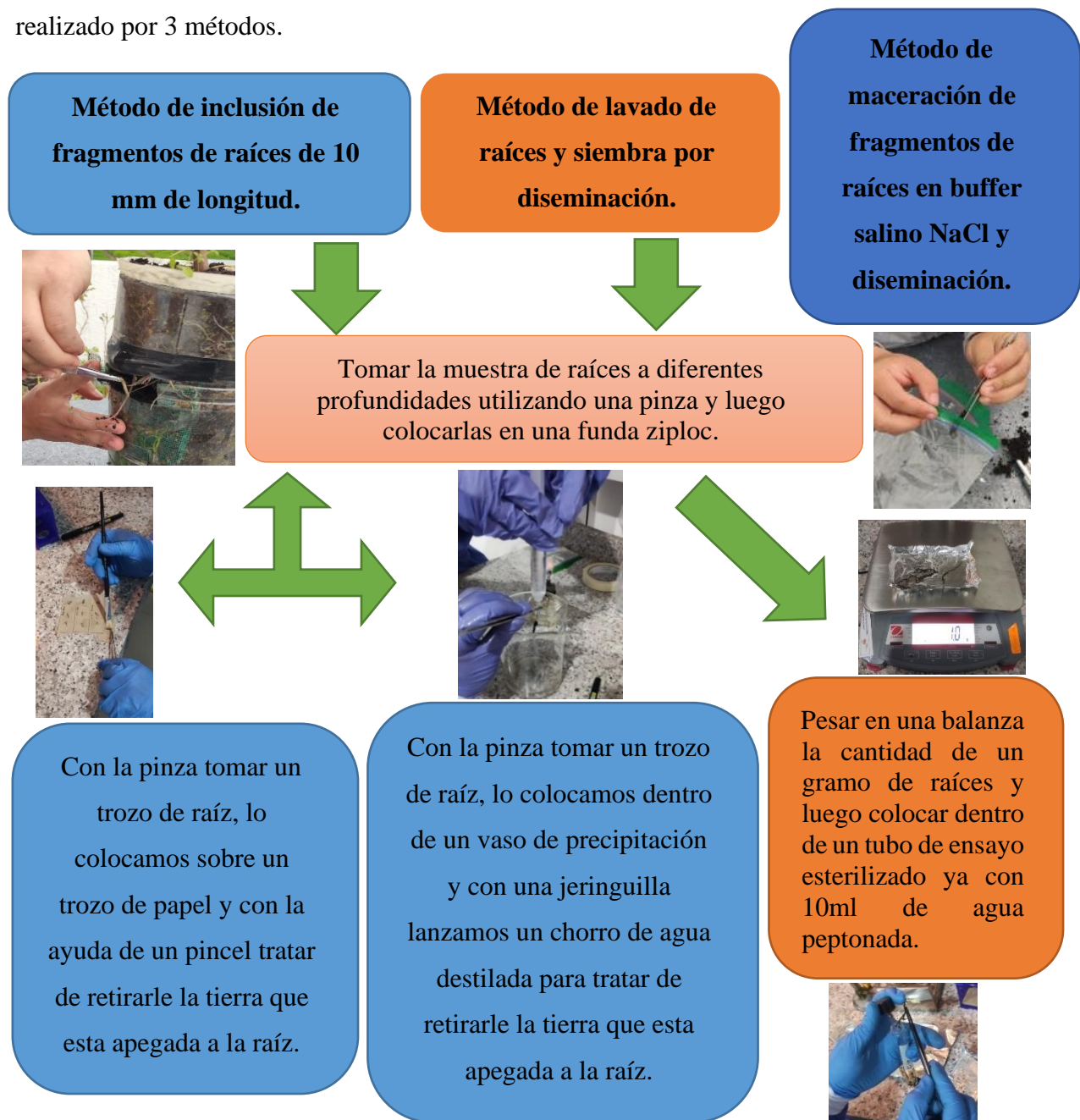
Los resultados se visualizaron con discos de Krona y tablas de unidades taxonómicas operacionales.

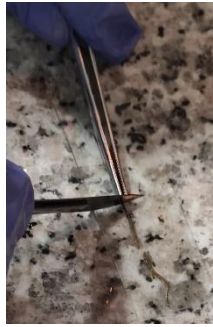
Elaborado por: Alejandro Altamirano

2.7.2.2. Aislamiento de bacterias cultivables asociadas a fragmentos de raíces de *S. tuberosum* de la variedad Superchola.

Este se realizó por 3 métodos diferentes que a continuación, se describe el proceso completo de cada uno a excepción de uno el cual su proceso inicial se encuentra descrito en el apartado 2.6.1.1.

Figura 4. Diagrama del proceso de aislamiento de las bacterias presentes en las raíces, el cual fue realizado por 3 métodos.





Colocar sobre un portaobjetos la raíz sostenida con la pinza y con la ayuda de un bisturí realizar los cortes en la raíz para que esta tenga 10mm de longitud.

Llevar el tubo de ensayo al vortex para agitarlo por unos 3 minutos a unas 2500rpm, Con la ayuda de una micropipeta tomar la cantidad de 100µl del líquido resultante de este lavado.



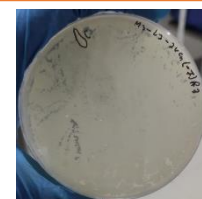
Con el bisturí realizamos un pequeño corte en el agar nutriente para luego introducir los fragmentos de raíz con 3 repeticiones, para luego llevar a que se incube por 24 horas a una temperatura de 28°C.

Dispensar en la caja petri con agar nutriente con el asa de debranski se lo esparce por toda la placa con 3 repeticiones para luego llevar a que se incube por 24 horas a una temperatura de 28°C.



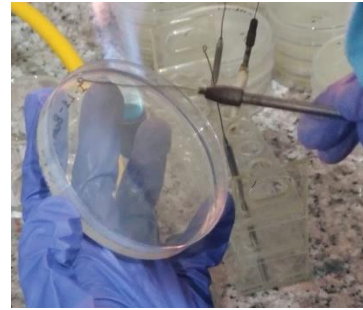
Sacar de la incubadora y observar las colonias que han crecido alrededor de cada fragmento de raíz.

Sacar de la incubadora para observar las colonias que han crecido en cada placa e identificar las que sean diferentes.





Con un asa de inoculación redonda tomar una pequeña porción de la colonia identificada, pasarla a una nueva placa con agar nutriente y allí realizar la siembra por desgaste, para luego dejar en la incubadora por 24 horas.



Observar los resultados obtenidos luego del primer aislamiento y de ser necesario seguir tomando una porción de la colonia resultante y sembrando por desgaste hasta lograr obtener una colonia pura.

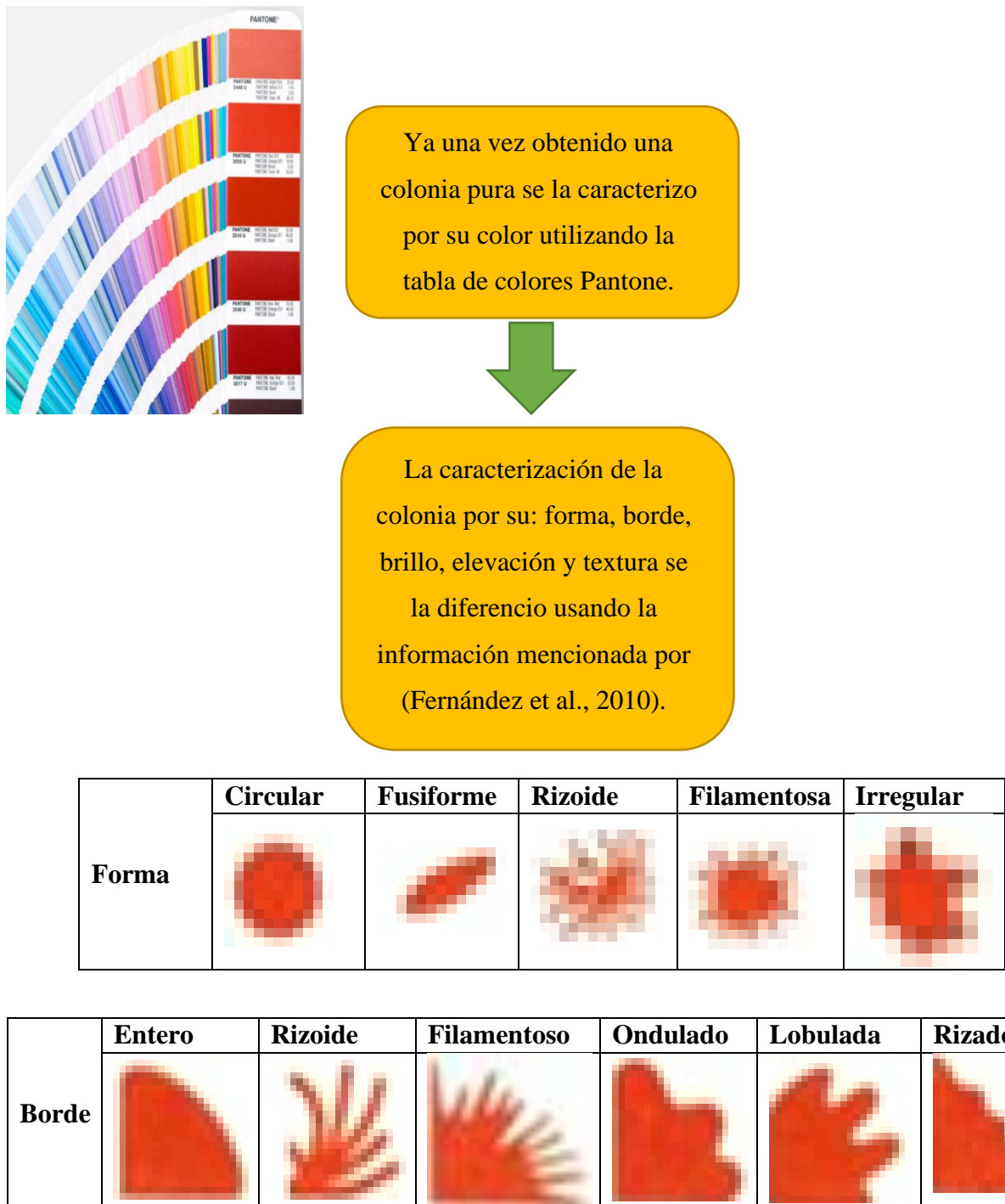


Elaborado por: Alejandro Altamirano






2.7.2.3. Caracterización las colonias de los aislados bacterianos obtenidos.


Esto se realizó observando cada una de las características que presenta cada una de las colonias.

Figura 5. Breve descripción de la caracterización de las colonias obtenidas.



	Sin brillo	Brillante
Brillo		

	Plana	Elevada	Convexa	Pulvinada	Umbilicada
Elevación					

	Lisa	Rugosa
Textura		

Elaborado por: Alejandro Altamirano

2.7.4. Identificación la morfología y la agrupación de los aislados bacterianos obtenidos.

Par lograr la identificación se realizó la reacción tinción gram usando el siguiente proceso.

Figura 6. Diagrama del proceso para la identificación de la morfología y agrupación de cada una de las bacterias.



Colocar una gota de agua destilada en el centro del portaobjetos y luego con un asa de inoculación recta tomar una porción de la colonia aislada.



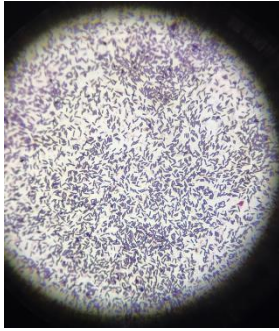


Esparcir la porción de colonia dentro de la gota de agua y dejar que se seque cerca del mechero.



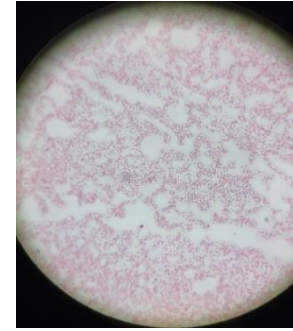
Ya están seca la placa colocar los siguientes reactivos: violeta de genciana por 1 minuto y enjuagar usando una piseta con agua destilada para colocar por 1 minuto Lugol y volver a enjuagar con agua destilada para colocar una gota de alcohol acetona por 6 segundos y volver a enjuagar para por un minuto colocar una gota de safranina y volverla a enjuagar por última vez con el agua destilada para finalmente ponerla a que se seque.





Gram (+)

Ya cuando esté completamente seca la placa le colocamos una gota de aceite de inmersión y utilizamos el microscopio usando el objetivo de 100x, para así observar las características microscópicas como la agrupación, forma y si es Gram (+) o Gram (-) en base a (Santambrosio et al., 2009).



Gram (-)

Forma	Cocos	Bacilos
Agrupación		

Elaborado por: Alejandro Altamirano

2.8. Variables respuesta

- Número de unidades formadoras de colonias (UFC * gr raíz).
- Tabla de diversidad.
- Número de aislados bacterianos obtenidos.

Caracterización del aislamiento de rizobacterias

- Color de las colonias.
- Forma de las colonias.
- Borde de las colonias.
- Brillo de las colonias.

- Elevación de las colonias.
- Textura de las colonias.
- Reacción a tinción de Gram.
- Forma bacteriana
- Agrupación.

2.9. Procesamiento de la información

Los datos registrados fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS versión 26.0. Para esto 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 los 2 requerimientos se desarrolló 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 y homogeneidad de varianza se utilizó para la prueba de Kruskal Wallis completado con una prueba de U Man Whitney. Para obtener un nivel de significación de un 95%.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Determinar la cantidad y diversidad de bacterias cultivables a partir de muestras de suelo de dos localidades de la provincia de Tungurahua.

3.1.1. Influencia de suelos de dos localidades sobre el número de unidades formadoras de colonias por gramo de raíz de plantas de *S. tuberosum* L.

De acuerdo al análisis estadístico de la variable influencia de los suelos de dos localidades sobre el número de unidades formadoras de colonias se pudo identificar que los suelos procedentes de la localidad de Llangahua en el cantón Ambato existe mayor cantidad de unidades formadoras de colonia con un rango promedio de 14,58 (UFC/gr raíz) de plantas de *S. tuberosum* L. a comparación de los suelos procedentes de Santa Rita del cantón Píllaro con un rango promedio de 10,42 (UFC/gr raíz) de *S. tuberosum* L. (Tabla 8).

Para Calvo *et al.*, (2008) en su investigación señala que en las localidades estudiadas de Huancavelica y Puno el número de unidades formadoras de colonias varía de acuerdo a la nutrición, pH, fertilización, estructura del suelo además menciona que la altitud es uno de los factores principales que influyen sobre el número de (UFC/gr raíz) concordando con los resultados obtenidos de la presente investigación.

Tabla 8. Influencia de suelos de dos localidades sobre el número de unidades formadoras de colonias por gramo de raíz de plantas de *S. tuberosum* L.

Localidades	UFC. g de raíz de plantas de <i>S. tuberosum</i>	
	\bar{X}	Rango promedio
Suelo procedente de Santa Rita, cantón Píllaro	46,79 x 10 ⁶	10,42 b
Suelo procedente de Llangahua, cantón Ambato	74,66 x 10 ¹⁰	14,58 a

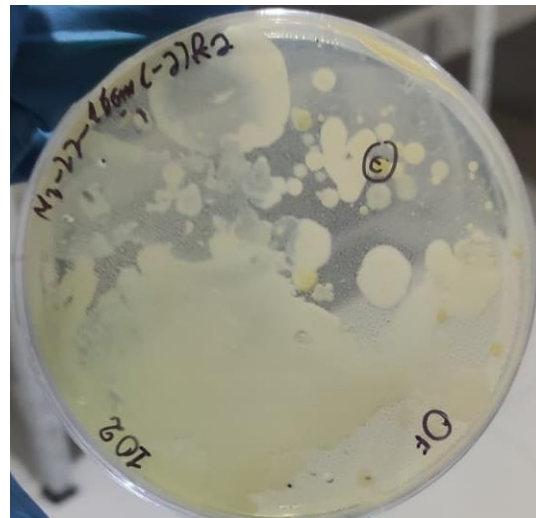
Elaborado por: Alejandro Altamirano

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=5$.

Figura 7. Suelo procedente de Santa Rita, cantón Píllaro.



Figura 8. Suelo procedente de Llangahua, cantón Ambato.



3.1.2. Influencia de diferentes profundidades sobre el número de unidades formadoras de colonias por gramo de raíz de plantas de *S. tuberosum* L en la localidad de Santa Rita, cantón Píllaro.

En relación al factor influencia de diferentes profundidades sobre el número de unidades formadoras de colonias en la localidad de Santa Rita del cantón Píllaro se observa que existen diferencias significativas entre los tratamientos obteniendo los mejores resultados de las muestras tomados a una profundidad de 24 cm con un rango promedio de 15,50 (UFC/gr raíz) a comparación de las muestras tomadas de 16 y 8 cm de profundidad presentando rangos promedios de 9,33 (UFC/gr raíz) y 3,67 (UFC/gr raíz) respectivamente (Tabla 9).

De igual manera Altamirano (2015) en su investigación sobre la profundidad de la toma de muestras de varias localidades de Bolivia menciona que obtuvo mejores resultados a una profundidad de 21cm con un rango promedio de 11,65 (UFC/gr) debido a que se encuentran influenciados por factores como la humedad y la geotemperatura.

Además, Magallón (2016) menciona que los suelos con mayor capacidad de absorción poseen una estructura de agregados que ayuda a la propagación y difusión de las unidades formadoras de colonias.

Tabla 9. Influencia de diferentes profundidades sobre el número de unidades formadoras de colonias por gramo de raíz de plantas de *S. tuberosum* L en la localidad de Santa Rita, cantón Píllaro

Profundidades (cm)	UFC. g de raíz de plantas de <i>S. tuberosum</i>	
	\bar{X}	Rango promedio
8 cm	49x 10 ⁴	3,67 c
16 cm	20,27x 10 ⁵	9,33 b

24 cm	$11,12 \times 10^7$	15,50 a
-------	---------------------	---------

Elaborado por: Alejandro Altamirano

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=5$.

Figura 9. 8 cm profundidad localidad de Santa Rita, cantón Píllaro.

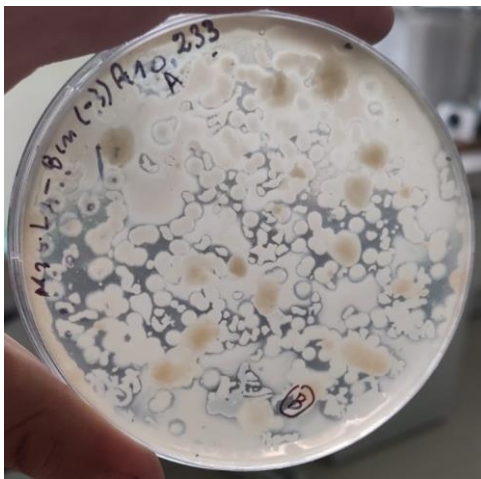
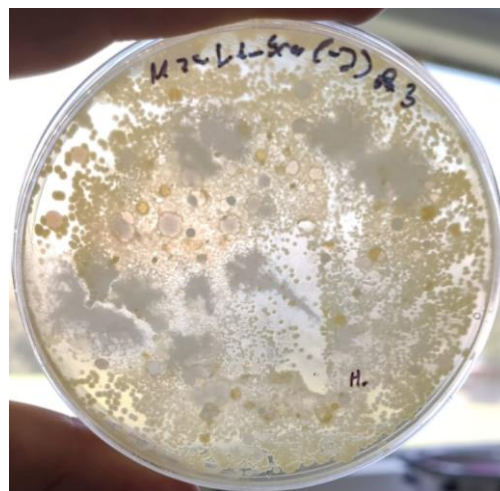


Figura 10. 16 cm profundidad localidad de Santa Rita, cantón Píllaro.



Figura 11. 24 cm de profundidad localidad de Santa Rita, cantón Píllaro.



3.1.3. Influencia de diferentes profundidades sobre el número de unidades formadoras de colonias por gramo de raíz de plantas de *S. tuberosum* L en la localidad de Llangahua, cantón Ambato

De acuerdo al factor influencia de diferentes profundidades sobre el número de unidades formadoras de colonias en la localidad de Llangahua del cantón Ambato se observa que existen diferencias significativas entre los tratamientos obteniendo los mejores resultados de las muestras tomadas a una profundidad de 24 cm con un rango promedio de 12,75 (UFC/gr raíz) a comparación de las muestras tomadas de 16 y 8 cm de profundidad presentando rangos promedios de 4,83 (UFC/gr raíz) y 9,50 (UFC/gr raíz) respectivamente (Tabla 10).

Con respecto a la variable profundidad de (UFC/gr raíz) Arias *et al.*, (2018) identifica que la profundidad recomendada para la toma de muestras se encuentra en una escala de 20 a 30 cm con un rango promedio de 16,36 (UFC/gr raíz), lo cual concuerdan con nuestros resultados obtenidos acotando que el equipo de muestreo debe ser esterilizado con el propósito de evitar una contaminación cruzada de la muestra en estudio de las unidades formadoras de colonias de las diferentes localidades.

Tabla 10. Influencia de diferentes profundidades sobre el número de unidades formadoras de colonias por gramo de raíz de plantas de *S. tuberosum* L en la localidad de Llangahua, cantón Ambato

Profundidades (cm)	UFC. g de raíz de plantas de <i>S. tuberosum</i>	
	\bar{X}	Rango promedio
8 cm	$16,48 \times 10^6$	9,50 b
16 cm	$30,68 \times 10^5$	4,83 c
24 cm	$19,32 \times 10^{10}$	12,75 a

Elaborado por: Alejandro Altamirano

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=5$.

Figura 12. 8 cm de profundidad localidad Llangahua, cantón Ambato.

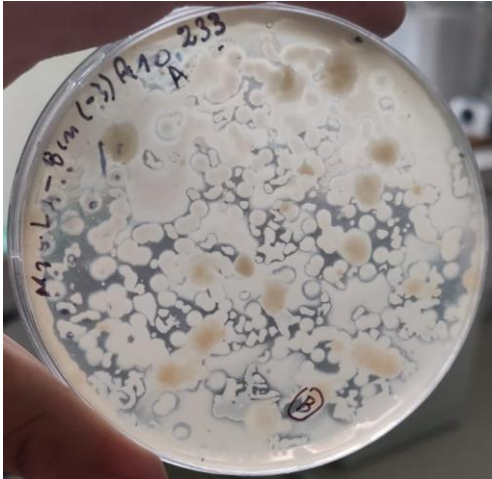


Figura 13. 16 cm de profundidad localidad Llangahua, cantón Ambato.

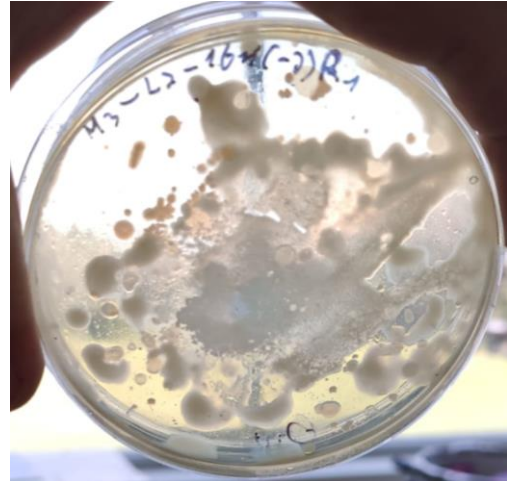
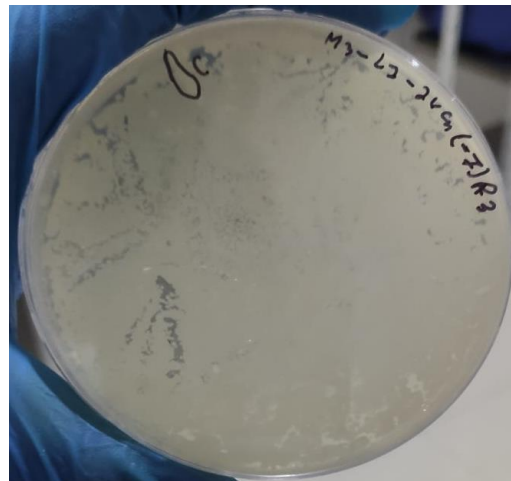


Figura 14. 24 cm de profundidad localidad Llangahua, cantón Ambato.



3.1.4. Diversidad de bacterias cultivables a partir de muestras de suelo de dos localidades de la provincia de Tungurahua

De acuerdo con los resultados descritos en el informe del análisis de perfil taxonómico mediante secuenciación masiva paralela en donde menciona que el ADN obtenido de las muestras presentó en general una concentración, muestra L1 [206.6ng/uL] y muestra L2 [108.1 ng/uL], y purezas apropiadas para la secuenciación de acuerdo con las lecturas de absorbancia en nanodrop. Tanto la concentración del ADN extraído como de las librerías fueron adecuadas para la generación de lecturas (Tabla 11).

Con respecto al ADN obtenido de las muestras Hernández et al., (2010) menciona que es utilizado para crear clonaciones en vectores y así poder realizar una codificación nueva con el fin de mejorar las actividades metabólicas, para lograr de la misma forma hacer una secuenciación a nivel masivo para ver los genomas completos de cada uno de los organismos que no son cultivables. El suelo es el ambiente más estudiado a través de la genómica en donde se encuentran una infinidad de biomoléculas, genes y enzimas (Ospino et al., 2018).

Tabla 11. Resultados del proceso de extracción de ADN, secuenciación masiva y análisis bioinformático.

Muestra	Código IDgen	Con. muestra (ng/μl)	Total de Lecturas	OTUs*	Número de secuencias
Muestra L1	M445	206.6	151153	7856	76970
Muestra L2	M446	108.1	173313	1307	62124

Conc.: Concentración

pb: pares de bases

*Unidades Taxonómicas Operativas: Cantidad de especies diferentes encontradas en la muestra.

El número final de secuencias corresponde a las secuencias ensambladas, limpias y libres de quimeras.

3.2. Caracterización de colonias y la morfología de los aislados bacterianos obtenidos.

3.2.1. Caracterización de colonias y la morfología de los aislados bacterianos obtenidos por el método de inclusión de raíces.

3.2.1.1. Caracterización de los aislados bacterianos obtenidos por el método de inclusión de raíces limpiadas con pincel procedentes de la localidad de la localidad Santa Rita del cantón Píllaro.

La caracterización de las bacterias se realizó en medio Agar nutriente luego de que haya transcurrido el tiempo 48 horas de incubación, en donde se observaron diferentes características de cada una de las colonias las cuales se detallan en la Tabla 12. Se obtuvo 6 aislados que por sus características culturales el 100% mostraron una forma circular. Borde el 100% fueron entero. Brillo el 100% fueron brillante. Por su elevación el 67% plana y el 34% convexa. Textura el 100% fueron lisa. En el caso de las características morfológicas por reacción de tinción Gram el 50% fueron Gram (+) y 50% Gram (-). Por morfología bacteria el 100% Bacilos con una agrupación del 52% Bacilo corto, 16% Bacilo largo, 16% Estreptobacilo y 16% fueron Bacilo.

Tabla 12. Caracterización de los aislados bacterianos obtenidos por el método de inclusión de raíces limpiadas con pincel procedentes de la localidad Santa Rita del cantón Píllaro en Agar nutritivo.

Aislado bacteriano	Características culturales						Características morfológicas		
	Código de Color Pantone	Forma	Borde	Brillo	Elevación	Textura	Reacción de tinción Gram	Morfología bacteriana	Agrupación
M1 – L1 – 8cm – P (A)	5807	c	E	B	P	l	(-)	mb	abl
M1 – L1 – 8cm – P (C)	5797	c	E	B	C	l	(+)	mb	abc
M1 – L1 – 16cm – P (B)	607	c	E	B	P	l	(+)	mb	abc

M1 – L1 – 24cm – P (A)	488	c	E	B	P	l	(-)	mb	abc
M1 – L1 – 24cm – P (B)	614	c	E	B	C	l	(-)	mb	aeb
M1 – L1 – 24cm – P (C)	804	c	E	B	P	l	(+)	mb	ab

Descripción: FORMA: Circular (c), Irregular (i), Fusiforme (f), Rizoide (r). BORDE: Entero (E), Lobulado (L), Ondulado (O), Rizoide (R). BRILLO: Sin brillo (b), Brillante (B). ELEVACION: Plana (P), Convexa (C), Umbilicada (U). TEXTURA: Lisa (l), Rugosa (rr). MORFOLOGIA: Bacilos (mb), Cocos (mc). AGRUPACION: Bacilo (ab), Bacilo corto (abc), Estreptobacilo (aeb), Diplobacilo (adb), Cocobacilo (acb), Bacilo largo (abl), Empalizada (ae), Coco (ac), Estreptococo (aec).

3.2.1.2. Caracterización de los aislados bacterianos obtenidos por el método de inclusión de raíces lavadas con agua destilada procedentes de la localidad de la localidad Santa Rita del cantón Píllaro.

La caracterización de las bacterias se realizó en medio Agar nutriente luego de que haya transcurrido el tiempo 48 horas de incubación, en donde se observaron diferentes características de cada una de las colonias las cuales se detallan en la Tabla 13. Se obtuvo 8 aislados que por sus características culturales en su forma mostraron el 75% fueron circular, 12.5% fusiforme y 12.5% irregular. Por el borde 88% fueron entero, 12% lobulado. Respecto al brillo 50% fueron sin brillo y 50% brillante. Por su elevación el 75% planas, 12.5% convexa y 12.5% umbilicada. Por textura 63% fueron lisa y 37% rugosa. En el caso de las características morfológicas por reacción de tinción Gram el 88% fueron Gram (+) y 12% Gram (-). Por morfología bacteria el 100% Bacilos con una agrupación del 50% Bacilo corto, 25% Bacilo, 12.5% Diplobacilo y 12.5% Bacilo largo.

Tabla 13. Caracterización de los aislados bacterianos obtenidos por el método de inclusión de raíces lavadas con agua destilada procedentes de la localidad Santa Rita del cantón Píllaro en Agar nutritivo.

Aislado bacteriano	Características culturales						Características morfológicas		
	Código de Color Pantone	Forma	Borde	Brillo	Elevación	Textura	Reacción de tinción Gram	Morfología bacteriana	Agrupación
M1 – L1 – 8cm – L (A)	577	i	L	b	P	rr	(+)	mb	abl
M1 – L1 – 8cm – L (B)1	5787	f	E	B	P	l	(+)	mb	ab
M1 – L1 – 8cm – L (B)2	5803	c	E	b	P	rr	(+)	mb	ab
M1 – L1 – 16cm – L (A)	614	c	E	B	C	l	(-)	mb	abc
M1 – L1 – 16cm – L (B)	5787	c	E	b	P	rr	(+)	mb	adb
M1 – L1 – 24cm – L (A)	4535	c	E	b	U	l	(+)	mb	abc
M1 – L1 – 24cm – L (B)	4545	c	E	B	P	l	(+)	mb	abc
M1 – L1 – 24cm – L (C)	365	c	E	B	P	l	(+)	mb	abc

Descripción: FORMA: Circular (c), Irregular (i), Fusiforme (f), Rizoide (r). BORDE: Entero (E), Lobulado (L), Ondulado (O), Rizoide (R). BRILLO: Sin brillo (b), Brillante (B). ELEVACION: Plana (P), Convexa (C), Umbilicada (U). TEXTURA: Lisa (l), Rugosa (rr). MORFOLOGIA: Bacilos (mb), Cocos (mc). AGRUPACION: Bacilo (ab), Bacilo corto (abc), Estreptobacilo (aeb), Diplobacilo (adb), Cocobacilo (acb), Bacilo largo (abl), Empalizada (ae), Coco (ac), Estreptococo (aec).

3.2.1.3. Caracterización de los aislados bacterianos obtenidos por el método de inclusión de raíces limpiadas con pincel procedentes de la localidad de la localidad Llangahua del cantón Ambato.

La caracterización de las bacterias se realizó en medio Agar nutriente luego de que haya transcurrido el tiempo 48 horas de incubación, en donde se observaron diferentes características de cada una de las colonias las cuales se detallan en la Tabla 14. Se obtuvo 7 aislados que por sus características culturales el 100% mostraron una forma circular. Borde el 100% fueron entero. Brillo el 100%

fueron brillante. Por su elevación el 71% plana y el 29% convexa. Textura el 100% fueron lisa. En el caso de las características morfológicas por reacción de tinción Gram el 71% fueron Gram (+) y 29% Gram (-). Por morfología bacteria el 100% Bacilos con una agrupación del 71% Bacilo y 29% Bacilo corto.

Tabla 14. Caracterización de los aislados bacterianos obtenidos por el método de inclusión de raíces limpiadas con pincel procedentes de la localidad Llangahua del cantón Ambato en Agar nutritivo.

Aislado bacteriano	Características culturales						Características morfológicas		
	Código de Color Pantone	Forma	Borde	Brillo	Elevación	Textura	Reacción de tinción Gram	Morfología bacteriana	Agrupación
M1 – L2 – 8cm – P (A)	5787	c	E	B	P	l	(+)	mb	ab
M1 – L2 – 8cm – P (B)	365	c	E	B	P	l	(-)	mb	ab
M1 – L2 – 8cm – P (C)	475	c	E	B	P	l	(+)	mb	abc
M1 – L2 – 16cm – P (A)	3935	c	E	B	C	l	(+)	mb	ab
M1 – L2 – 16cm – P (B)	366	c	E	B	C	l	(+)	mb	ab
M1 – L2 – 24cm – P (A)	475	c	E	B	P	l	(+)	mb	abc
M1 – L2 – 24cm – P (B)	365	c	E	B	P	l	(-)	mb	ab

Descripción: FORMA: Circular (c), Irregular (i), Fusiforme (f), Rizoide (r). BORDE: Entero (E), Lobulado (L), Ondulado (O), Rizoide (R). BRILLO: Sin brillo (b), Brillante (B). ELEVACION: Plana (P), Convexa (C), Umbilicada (U). TEXTURA: Lisa (l), Rugosa (rr). MORFOLOGIA: Bacilos (mb), Cocos (mc). AGRUPACION: Bacilo (ab), Bacilo corto (abc), Estreptobacilo (aeb), Diplobacilo (adb), Cocobacilo (acb), Bacilo largo (abl), Empalizada (ae), Coco (ac), Estreptococo (aec).

3.2.1.4. Caracterización de los aislados bacterianos obtenidos por el método de inclusión de raíces lavadas con agua destilada procedentes de la localidad de la localidad Llangahua del cantón Ambato

La caracterización de las bacterias se realizó en medio Agar nutriente luego de que haya transcurrido el tiempo 48 horas de incubación, en donde se observaron diferentes características de cada una de las colonias las cuales se detallan en la Tabla 15. Se obtuvo 9 aislados que por sus características culturales en su forma mostraron el 100% fueron circular. Por el borde 100% fueron entero. Respecto al brillo 22% fueron sin brillo y 88% brillante. Por su elevación el 55% fueron convexa y 45% planas. Por textura 77% fueron lisa y 23% rugosa. En el caso de las características morfológicas por reacción de tinción Gram el 55% fueron Gram (+) y 45% Gram (-). Por morfología bacteria el 100% Bacilos con una agrupación del 100% fueron Bacilo.

Tabla 15. Caracterización de los aislados bacterianos obtenidos por el método de inclusión de raíces lavadas con agua destilada procedentes de la localidad Llangahua del cantón Ambato en Agar nutritivo.

Aislado bacteriano	Características culturales						Características morfológicas		
	Código de Color Pantone	Forma	Borde	Brillo	Elevación	Textura	Reacción de tinción Gram	Morfología bacteriana	Agrupación
M1 – L2 – 8cm – L (A)	365	c	E	B	P	l	(+)	mb	ab
M1 – L2 – 8cm – L (B)	1625	c	E	B	C	l	(-)	mb	ab
M1 – L2 – 16cm – L (A)	365	c	E	b	P	rr	(+)	mb	ab
M1 – L2 – 16cm – L (B)	365	c	E	b	C	l	(-)	mb	ab
M1 – L2 – 16cm – L (C)	365	c	E	B	P	rr	(+)	mb	ab
M1 – L2 – 24cm – L (A)1	1625	c	E	B	C	l	(-)	mb	ab
M1 – L2 – 24cm – L (A)2	123	c	E	B	C	l	(+)	mb	ab
M1 – L2 – 24cm – L (B)	1215	c	E	B	P	l	(+)	mb	ab
M1 – L2 – 24cm – L (C)	1205	c	E	B	C	l	(-)	mb	ab

Descripción: FORMA: Circular (c), Irregular (i), Fusiforme (f), Rizoide (r). BORDE: Entero (E), Lobulado (L), Ondulado (O), Rizoide (R). BRILLO: Sin brillo (b), Brillante (B). ELEVACION: Plana (P), Convexa (C), Umbilicada (U). TEXTURA: Lisa (l), Rugosa (rr). MORFOLOGIA: Bacilos (mb), Cocos (mc).

AGRUPACION: Bacilo (ab), Bacilo corto (abc), Estreptobacilo (aeb), Diplobacilo (adb), Cocobacilo (acb), Bacilo largo (abl), Empalizada (ae), Coco (ac), Estreptococo (aec).

3.2.2. Caracterización de colonias y la morfología de los aislados bacterianos obtenidos por el método de lavado de raíces.

3.2.2.1. Caracterización de los aislados bacterianos obtenidos por el método de lavado de raíces procedentes de la localidad de la localidad Santa Rita del cantón Píllaro.

La caracterización de las bacterias se realizó en medio Agar nutriente luego de que haya transcurrido el tiempo 48 horas de incubación, en donde se observaron diferentes características de cada una de las colonias las cuales se detallan en la Tabla 16. Se obtuvo 8 aislados que por sus características culturales en su forma el 75% fueron circular y 25% irregular. En el Borde el 75% fueron entero y 25% lobulado. Brillo el 100% fueron brillante. Por su elevación el 63% plana y el 37% convexa. Textura el 100% fueron lisa. En el caso de las características morfológicas por reacción de tinción Gram el 50% fueron Gram (+) y 50% Gram (-). Por morfología bacteria el 100% Bacilos con una agrupación del 63% Bacilo, 13% Bacilo corto, 12% Estreptobacilo y 12% fueron Diplobacilo.

Tabla 16. Caracterización de los aislados bacterianos obtenidos por el método de lavado de raíces procedentes de la localidad Santa Rita del cantón Píllaro en Agar nutritivo.

Aislado bacteriano	Características culturales						Características morfológicas		
	Código de Color Pantone	Forma	Borde	Brillo	Elevación	Textura	Reacción de tinción Gram	Morfología bacteriana	Agrupación
M2 – L1 – 8cm (B) 1	365	i	L	B	P	l	(+)	mb	ab
M2 – L1 – 8cm (B) 2	475	c	E	B	C	l	(+)	mb	abc

M2 – L1 – 8cm (C) 3	473	c	E	B	P	l	(-)	mb	ab
M2 – L1 – 16cm (A) 1	607	c	E	B	P	l	(-)	mb	ab
M2 – L1 – 16cm (B) 2	489	c	E	B	P	l	(-)	mb	ae
M2 – L1 – 24cm (A) 1	607	c	E	B	C	l	(+)	mb	ab
M2 – L1 – 24cm (B) 2	475	c	E	B	C	l	(-)	mb	adb
M2 – L1 – 24cm (B) 3	365	i	L	B	P	l	(+)	mb	ab

Descripción: FORMA: Circular (c), Irregular (i), Fusiforme (f), Rizoide (r). BORDE: Entero (E), Lobulado (L), Ondulado (O), Rizoide (R). BRILLO: Sin brillo (b), Brillante (B). ELEVACION: Plana (P), Convexa (C), Umbilicada (U). TEXTURA: Lisa (l), Rugosa (rr). MORFOLOGIA: Bacilos (mb), Cocos (mc). AGRUPACION: Bacilo (ab), Bacilo corto (abc), Estreptobacilo (aeb), Diplobacilo (adb), Cocobacilo (acb), Bacilo largo (abl), Empalizada (ae), Coco (ac), Estreptococo (aec).

3.2.2.2. Caracterización de los aislados bacterianos obtenidos por el método de lavado de raíces procedentes de la localidad de la localidad Llangahua del cantón Ambato.

La caracterización de las bacterias se realizó en medio Agar nutriente luego de que haya transcurrido el tiempo 48 horas de incubación, en donde se observaron diferentes características de cada una de las colonias las cuales se detallan en la Tabla 17. Se obtuvo 8 aislados que por sus características culturales en su forma el 88% fueron circular y 12% irregular. Borde el 88% fueron entero y 12% irregular. En el Brillo el 100% fueron brillante. Por su elevación el 63% plana, 25% convexa y el 12% umbilicada. Textura el 75% fueron lisa y 25% rugosa. En el caso de las características morfológicas por reacción de tinción Gram el 50% fueron Gram (+) y 50% Gram (-). Por morfología bacteria el 88% fueron Bacilos y 12% Cocos. En la agrupación el 50% Bacilo, 25% Bacilo corto, 12.5% Estreptobacilo y 12.5% Estreptococo.

Tabla 17. Caracterización de los aislados bacterianos obtenidos por el método de lavado de raíces procedentes de la localidad Llangahua del cantón Ambato en Agar nutritivo.

Aislado bacteriano	Características culturales						Características morfológicas		
	Código de Color Pantone	Forma	Borde	Brillo	Elevación	Textura	Reacción de tinción Gram	Morfología bacteriana	Agrupación
M2 – L2 – 8cm (B) 1	382	c	E	B	P	l	(-)	mb	ab
M2 – L2 – 8cm (C) 2	475	c	E	B	P	l	(-)	mb	abc
M2 – L2 – 8cm (C) 3	489	i	L	B	P	rr	(+)	mb	aeb
M2 – L2 – 16cm (A) 1	475	c	E	B	C	l	(+)	mc	aec
M2 – L2 – 16cm (C) 2	365	c	E	B	P	rr	(+)	mb	ab
M2 – L2 – 16cm (C) 3	475	c	E	B	P	l	(-)	mb	ab
M2 – L2 – 24cm (C) 1	607	c	E	B	C	l	(-)	mb	abc
M2 – L2 – 24cm (C) 2	4535	c	E	B	U	l	(+)	mb	ab

Descripción: FORMA: Circular (c), Irregular (i), Fusiforme (f), Rizoide (r). BORDE: Entero (E), Lobulado (L), Ondulado (O), Rizoide (R). BRILLO: Sin brillo (b), Brillante (B). ELEVACION: Plana (P), Convexa (C), Umbilicada (U). TEXTURA: Lisa (l), Rugosa (rr). MORFOLOGIA: Bacilos (mb), Cocos (mc). AGRUPACION: Bacilo (ab), Bacilo corto (abc), Estreptobacilo (aeb), Diplobacilo (adb), Cocobacilo (acb), Bacilo largo (abl), Empalizada (ae), Coco (ac), Estreptococo (aec).

3.2.3. Caracterización de colonias y la morfología de los aislados bacterianos obtenidos por el método de maceración de raíces en buffer salino NaCl.

3.2.3.1. Caracterización de los aislados bacterianos obtenidos por el método de maceración de raíces en buffer salino NaCl procedentes de la localidad de la localidad Santa Rita del cantón Píllaro.

La caracterización de las bacterias se realizó en medio Agar nutriente luego de que haya transcurrido el tiempo 48 horas de incubación, en donde se observaron diferentes características de cada una de

las colonias las cuales se detallan en la Tabla 18. Se obtuvo 22 aislados que por sus características culturales en su forma el 73% fueron circular, 23% irregular y 4% rizoide. En el Borde el 73% fueron entero, 14% lobulado, 9% ondulado y 4% rizoide. Brillo el 100% fueron brillante. Por su elevación el 64% fueron plana y el 36% convexa. Textura el 96% fueron lisa y 4% rugosa. En el caso de las características morfológicas por reacción de tinción Gram el 50% fueron Gram (+) y 50% Gram (-). Por morfología bacteria el 100% Bacilos con una agrupación del 41% fueron Bacilo, 32% Bacilo corto, 9% Bacilo largo, 9% Empalizada, 4% Estreptobacilo y 4% fueron Diplobacilo.

Tabla 18. Caracterización de los aislados bacterianos obtenidos por el método de maceración de raíces en buffer salino NaCl procedentes de la localidad Santa Rita del cantón Píllaro en Agar nutritivo.

Aislado bacteriano	Características culturales						Características morfológicas		
	Código de Color Pantone	Forma	Borde	Brillo	Elevación	Textura	Reacción de tinción Gram	Morfología bacteriana	Agrupación
M3 - L1 - 8cm (-6) R2 A	148	c	E	B	C	l	(-)	mb	abc
M3 - L1 - 8cm (-4) R1 B	1205	i	O	B	P	l	(+)	mb	ab
M3 - L1 - 8cm (-5) R2 C	1625	c	E	B	C	l	(-)	mb	ab
M3 - L1 - 8cm (-3) R1 D	163	c	E	B	P	l	(+)	mb	ab
M3 - L1 - 8cm (-4) R3 E	125	c	E	B	C	l	(+)	mb	abl
M3 - L1 - 8cm (-3) R3 F	1555	c	E	B	C	l	(-)	mb	abc
M3 - L1 - 8cm (-2) R1 G	155	c	E	B	P	l	(+)	mb	ab
M3 - L1 - 8cm (-2) R3 H	137	c	E	B	C	l	(+)	mb	abc
M3 - L1 - 8cm (-4) R1 I	473	c	E	B	C	l	(-)	mb	ab
M3 - L1 - 16cm (-2) R1 A	473	c	E	B	C	l	(-)	mb	ab
M3 - L1 - 16cm (-3) R1 B	374	c	E	B	P	l	(+)	mb	abc
M3 - L1 - 16cm (-3) R1 C	473	c	E	B	P	l	(-)	mb	ab

M3 - L1 - 16cm (-3) R2 D	473	i	L	B	P	l	(-)	mb	abc
M3 - L1 - 16cm (-4) R1 E	465	c	E	B	P	rr	(+)	mb	aeb
M3 - L1 - 16cm (-2) R2 F	365	c	E	B	C	l	(-)	mb	abc
M3 - L1 - 16cm (-2) R3 G	458	c	E	B	P	l	(-)	mb	ae
M3 - L1 - 24cm (-9) R1 A	429	r	R	B	P	l	(+)	mb	ab
M3 - L1 - 24cm (-4) R1 B	454	i	O	B	P	l	(+)	mb	ab
M3 - L1 - 24cm (-5) R2 C	481	c	E	B	P	l	(-)	mb	adb
M3 - L1 - 24cm (-7) R2 D	365	i	L	B	P	l	(+)	mb	ae
M3 - L1 - 24cm (-8) R3 E	465	c	E	B	P	l	(-)	mb	abc
M3 - L1 - 24cm (-8) R1 F	434	i	L	B	P	l	(+)	mb	abl

Descripción: FORMA: Circular (c), Irregular (i), Fusiforme (f), Rizoide (r). BORDE: Entero (E), Lobulado (L), Ondulado (O), Rizoide (R). BRILLO: Sin brillo (b), Brillante (B). ELEVACION: Plana (P), Convexa (C), Umbilicada (U). TEXTURA: Lisa (l), Rugosa (rr). MORFOLOGIA: Bacilos (mb), Cocos (mc). AGRUPACION: Bacilo (ab), Bacilo corto (abc), Estreptobacilo (aeb), Diplobacilo (adb), Cocobacilo (acb), Bacilo largo (abl), Empalizada (ae), Coco (ac), Estreptococo (aec).

3.2.3.2. Caracterización de los aislados bacterianos obtenidos por el método de maceración de raíces en buffer salino NaCl procedentes de la localidad de la localidad Llangahua del cantón Ambato.

La caracterización de las bacterias se realizó en medio Agar nutriente luego de que haya transcurrido el tiempo 48 horas de incubación, en donde se observaron diferentes características de cada una de las colonias las cuales se detallan en la Tabla 17. Se obtuvo 14 aislados que por sus características culturales en su forma el 86% fueron circular, 7% irregular y 7% rizoide. Borde el 86% fueron entero, 7% irregular y 7% rizoide. En el Brillo el 100% fueron brillante. Por su elevación el 86% fueron plana y 14% convexa. Por la Textura el 86% fueron lisa y 14% rugosa. En el caso de las características morfológicas por reacción de tinción Gram el 64% fueron Gram (+) y 36% Gram (-)

). Por morfología bacteria el 93% fueron Bacilos y 7% Cocos. En la agrupación el 43% fueron Bacilo, 14% Bacilo corto, 14% Estreptobacilo, 7% Diplobacilo, 7% Bacilo largo, 7% Cocobacilo y 7% Coco.

Tabla 19. Caracterización de los aislados bacterianos obtenidos por el método de maceración de raíces en buffer salino NaCl procedentes de la localidad Llangahua del cantón Ambato en Agar nutritivo.

Aislado bacteriano	Características culturales						Características morfológicas		
	Código de Color Pantone	Forma	Borde	Brillo	Elevación	Textura	Reacción de función Gram	Morfología bacteriana	Agrupación
M3 - L2 - 8cm (-3) R1 A	488	c	E	B	P	l	(+)	mb	adb
M3 - L2 - 8cm (-3) R1 B	473	c	E	B	P	rr	(+)	mb	aeb
M3 - L2 - 8cm (-7) R1 C	475	c	E	B	P	l	(+)	mb	ab
M3 - L2 - 8cm (-7) R2 D	4535	c	E	B	P	l	(-)	mb	abc
M3 - L2 - 8cm (-6) R1 E	358	c	E	B	C	l	(+)	mb	aeb
M3 - L2 - 16cm (-4) R1 A	424	r	R	B	P	l	(-)	mb	abc
M3 - L2 - 16cm (-4) R2 B	466	c	E	B	P	l	(-)	mb	ab
M3 - L2 - 16cm (-4) R3 C	358	c	E	B	P	l	(+)	mb	acb
M3 - L2 - 16cm (-2) R1 D	480	c	E	B	P	l	(+)	mb	abl
M3 - L2 - 16cm (-2) R2 E	382	c	E	B	C	l	(-)	mb	ab
M3 - L2 - 16cm (-2) R2 F	481	c	E	B	P	l	(-)	mb	ab
M3 - L2 - 16cm (-6) R3 G	488	c	E	B	P	l	(+)	mc	ac
M3 - L2 - 24cm (-7) R1 A	480	i	L	B	P	l	(+)	mb	ab
M3 - L2 - 24cm (-7) R1 B	481	c	E	B	P	rr	(+)	mb	ab

Descripción: FORMA: Circular (c), Irregular (i), Fusiforme (f), Rizoide (r). BORDE: Entero (E), Lobulado (L), Ondulado (O), Rizoide (R). BRILLO: Sin brillo (b), Brillante (B). ELEVACION: Plana (P), Convexa (C), Umbilicada (U). TEXTURA: Lisa (l), Rugosa (rr). MORFOLOGIA: Bacilos (mb), Cocos (mc).

AGRUPACION: Bacilo (ab), Bacilo corto (abc), Estreptobacilo (aeb), Diplobacilo (adb), Cocobacilo (acb), Bacilo largo (abl), Empalizada (ae), Coco (ac), Estreptococo (aec).

Del total de 82 bacterias aisladas por el método de inclusión de raíces limpiadas con pincel procedentes de la localidad de la localidad Santa Rita del cantón Píllaro (Tabla 12) se obtuvo 6 aislados de los cuales 3 son bacilos Gram (+) y 3 bacilos Gram (-). Por el método de inclusión de raíces lavadas con agua destilada procedentes de la localidad de la localidad Santa Rita del cantón Píllaro (Tabla 13) se obtuvo 8 aislados de los cuales 7 son bacilos Gram (+) y 1 bacilos Gram (-). Por el método de inclusión de raíces limpiadas con pincel procedentes de la localidad de la localidad Llangahua del cantón Ambato (Tabla 14) se obtuvo 7 aislados de los cuales 5 son bacilos Gram (+) y 2 bacilos Gram (-). Por el método de inclusión de raíces lavadas con agua destilada procedentes de la localidad de la localidad Llangahua del cantón Ambato (Tabla 15) se obtuvo 9 aislados de los cuales 5 son bacilos Gram (+) y 4 bacilos Gram (-). Por el método de lavado de raíces procedentes de la localidad de la localidad Santa Rita del cantón Píllaro (Tabla 16) se obtuvo 8 aislados de los cuales 4 son bacilos Gram (+) y 4 bacilos Gram (-). Por el método de lavado de raíces procedentes de la localidad de la localidad Llangahua del cantón Ambato (Tabla 17) se obtuvo 8 aislados de los cuales 4 son bacilos Gram (-), 3 bacilos Gram (+) y 1 cocos Gram (-). Por el método de maceración de raíces en buffer salino NaCl procedentes de la localidad de la localidad Santa Rita del cantón Píllaro (Tabla 18) se obtuvo 22 aislados de los cuales 11 son bacilos Gram (+) y 11 bacilos Gram (-). Y por el método de maceración de raíces en buffer salino NaCl procedentes de la localidad de la localidad Llangahua del cantón Ambato (Tabla 19) se obtuvo 14 aislados de los cuales 8 son bacilos Gram (+), 5 bacilos Gram (-) y 1 cocos Gram (+).

Con base a lo mencionado por Santambrosio et al. (2009) debido a las diferencias en la estructura fundamental de sus paredes celulares, las bacterias Gram (+) y Gram (-) se comportan de formas claramente diferentes, por lo que la pared celular bacteriana sirve para dar al organismo su tamaño y forma, así como para prevenir la lisis osmótica, el peptidoglicano componente de la pared celular bacteriana que proporciona rigidez, a pared celular arenosa de las bacterias Gram (+) se compone de varias cubiertas interconectadas que contienen peptidoglicano y ácido teicoico; que por lo general, el peptidoglicano constituye entre el 80 y el 90 por ciento de la pared celular de las bacterias Gram (+); la superficie de la célula Gram (-), por otro lado tiene una cubierta significativamente más gruesa hecha enteramente de peptidoglicano y está rodeada por una membrana externa hecha de lipopolisacáridos, fosfolípidos y lipoproteínas, por lo que tan solo del 10 al 20% de la pared celular Gram (-) está constituida por peptidoglicano. Con esta caracterización tanto cultural y morfológica de cada una de las bacterias se evidencia las diferencias de una cepa a otra en cada profundidad y métodos de aislamiento implementados en 2 localidades de la provincia de Tungurahua.

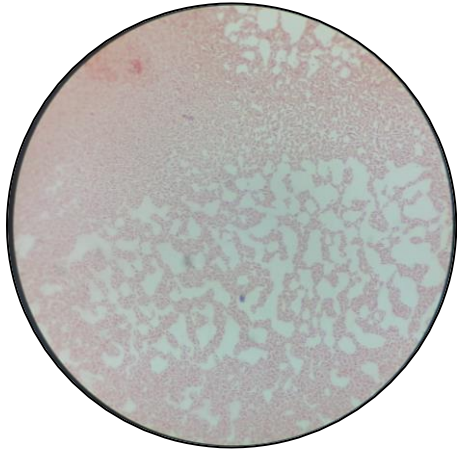
Figura 17. Caracterización cultural de las bacterias aisladas.



Color:	Pantone 5807
Forma:	Circular
Borde:	Entero
Brillo:	Brillante
Elevación:	Plana
Textura:	Lisa

Elaborado por: Alejandro Altamirano

Figura 18. Caracterización morfológica de las bacterias aisladas.



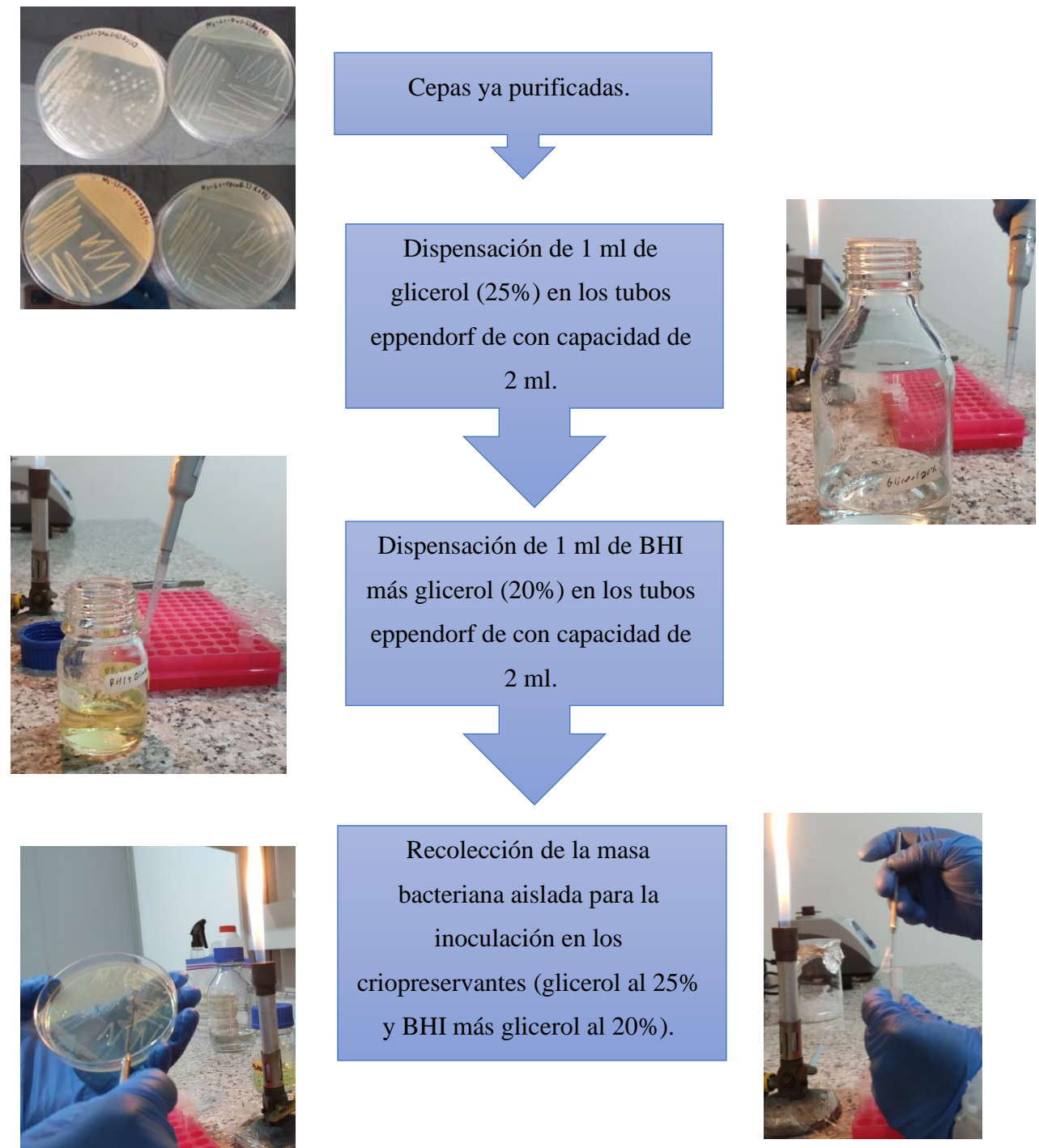
Reacción a tinción de Gram:	(-)
Morfología bacteriana:	Bacilos
Agrupación:	Bacilo largo

Elaborado por: Alejandro Altamirano

3.3. Criopreservación de los aislados bacterianos obtenidos de dos localidades de la provincia de Tungurahua.

Para la criopreservación de cada bacteria aislada se puso en práctica lo que menciona Ávila et al., (2006) donde mencionan que el glicerol (crioprotector o crioconservante) que entre sus efectos tiene la capacidad de evitar la creación de cristales de hielo que podrían llegar a romper la estructura de la membrana, además de la agrupación desproporcionada de electrolitos y de otros elementos durante el transcurso de congelamiento. Para este trabajo se lo realizó con 2 crioconservantes: uno con glicerol a la concentración del 25% y otro con Caldo Nutritivo BHI (Brain Heart Infusion) acompañado de glicerol a la concentración del 20%.

Figura 19. Diagrama del proceso de criopreservación de los aislados bacterianos obtenidos



Elaborado por: Alejandro Altamirano

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

1. La cantidad de unidades formadoras de colonia (UFC/g raíz) de la localidad de Santa Rita, Cantón Píllaro fue de: 46.79×10^6 .
2. La cantidad de unidades formadoras de colonia (UFC/g raíz) de la localidad de Llangahua, Cantón Ambato fue de: 74.66×10^{10} .
3. La diversidad de bacterias cultivables fue de 7856 en la localidad 1 y de 1307 en la localidad 2.
4. El número de aislados bacterianos obtenidos en total fue de 82.
5. La mayoría de los 82 aislados bacteriano obtenidos en su caracterización cultural predominaron en un 84% con forma circular, 85% con borde entero, 93% colonias con brillo, 67% con una elevación plana y un 88% con textura lisa.
6. De los 82 aislados bacteriano obtenidos en su caracterización morfológica predominaron en un 58% bacterias Gram (+), 97% los bacilos.

4.2. RECOMENDACIONES

1. Usar medio de cultivo Agar nutriente con nomas de 24 horas de preparación.
2. Mediante la ampliación de los genes 16S del ARN utilizando PCR y secuenciación se podía identificar molecularmente los aislados bacterianos obtenidos.
3. Utilizar los procedimientos ya detallados en el presente trabajo para el aislamiento de bacterias de otras localidades de la provincia de Tungurahua y así crear una mayor colección bacteriana.

BIBLIOGRAFÍA

- Altamirano, H. (2015). EFECTO DE LOS AGROQUÍMICOS SOBRE LA MICROBIOTA EDÁFICA EN DOS TIPOS DE TEXTURA EN MACETAS CON CULTIVO DE PAPA (*Solanum tuberosum*), EN AMBIENTE CONTROLADO EN VIACHA, PROVINCIA INGAVI, LA PAZ. UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS, 1-143.
- Andrade, L. et. al. 2002. La papa en el Ecuador In: El cultivo de la papa. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Centro Internacional de la Papa (CIP). 1 ed. Quito, 21 p.
- Arango, J., Posada, L., & Pérez, J. (2012). Distribución Diferencial de Bacterias con Potencial Biocontrolador de *Spongospora subterranea* en Plantas de Papa (*Solanum tuberosum* cv. Diacol Capiro). Scielo, 1-8.
- Arias, E., & Piñeros, P. (2018). Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los Páramos de Guasca y Cruz verde. Universidad Javeriana, 1- 204.
- Ávila, L., Madero, J., López, C., León, M., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L., Gómez, C., Lozano, J., & Reguero, M. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Gineco*, 57(4), 291-300.
<https://revista.fecolsog.org/index.php/rcog/article/view/468/513>
- Calvo, P., Meneses, L., & Zúñiga, D. (2008). ESTUDIO DE LAS POBLACIONES MICROBIANAS DE LA RIZÓSFERA DEL CULTIVO DE PAPA (*Solanum tuberosum*) EN ZONAS ALTOANDINAS. Scielo, 1-8.
- Castro, J., Tuesta, C., Cisneros, J., Galindo, N., & León, J. (2019). AISLAMIENTO Y

SELECCIÓN DE ACTINOMICETOS RIZOSFÉRICOS CON ACTIVIDAD ANTAGONISTA A FITOPATÓGENOS DE LA PAPA (*Solanum tuberosum* spp. andigena). *Ecología Aplicada*, 1-20.

Fernández, A., García de la Fuente, C., Saéz, A., & Valdezate, S. (2010). 37. Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. En E. Cercenado & R. Cantón (Eds.), *Procedimientos en Microbiología Clínica* (pp. 1-52). <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>

Franco, J. 2002. El cultivo de la papa en Guatemala. Ministerio de Agricultura. p.145.

Hernández, R., Velázquez, I., Orozco, M., & Santoyo, G. (2010). Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. *Phyton (Buenos Aires)*, 79(2), 133-139. <http://www.revistaphyton.fund-romuloraggio.org.ar/vol79/Hernandez-Leon.pdf>

Ospino, K., Castilla, M., & Sánchez, R. (2018). Resistencia microbiana desde una perspectiva metagenómica. *NOVA*, 16(29), 91-100. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v16n29/1794-2470-nova-16-29-00091.pdf>

INIAP (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Ec). 2011. Ficha técnica Superchola. Santa Catalina, Quito, Ecuador. 76 p.

Inostroza, J., Mendez, P., & Sotomayor, L. (2009). Botánica y Morfología de la Papa. *Boletín INIA-Instituto de Investigaciones Agropecuarias*.

Leiva, E., Osorio, M., & Ramírez, R. (2020). MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DEL CACAO (*Theobroma cacao* L) EN CONDICIONES DE BOSQUE

- HÚMEDO PREPONTADO (Bh-PM). Sociedad Colombiana de la Ciencia, 1-11.
- Magallón, F. (2016). Desarrollo y aplicación de una metodología, para evaluar la variabilidad de la capacidad de desarrollo de los microorganismos del suelo. Centro de Investigaciones del Suelo de la Universidad de La Habana, Cuba., 1-207.
- Mastrocola, N., Pino, G., Mera, X., Rojano, P., Haro, F., Rivadeneira Ruales, J. E., ... & Cuesta Subía, H. X. (2016). Catálogo de variedades de papa del Ecuador.
- Muñoz, F., & Cruz, L. (2014). Manual del cultivo de papa.
- Pourrut, L. (2018). Los climas del Ecuador: fundamentos explicativos. Documentos de Investigación N° 4. Centro ecuatoriano de Información Geográfica y ORSTOM.
- Puma, A., & Calderón, J. (2016). Manejo integrado de plagas y su incidencia en el gorgojo de los andes (plaga) y enfermedades en el cultivo de la papa. *Revista Ciencia, Tecnología e Innovación*, 12(13), 739-754.
- Pumisacho, M.; Sherwolds, H. (2012). El cultivo de papa en el Ecuador. Santa Catalina, Quito, Ecuador. Pp. 55,56.
- Santambrosio E., M. Ortega y P. Garibaldi. 2009. Tinción y observación de microorganismos. Ing. Química. Universidad Tecnológica Nacional. 2-3 p.
https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practico4.pdf
- Soler, J., Posada, L., & Pérez, J. (2012). Distribución Diferencial de Bacterias con Potencial Biocontrolador de *Spongospora* subterránea en Plantas de Papa (*Solanum tuberosum* cv. Diacol Capiro). Scielo, 1-10.
- Tolosa, M. (2014). Poblaciones microbianas asociadas a la rizósfera y filósfera de plantas de papa

(*Solanum tuberosum*). Scielo, 1-20.

Torres, L. (2020). Microorganismos del suelo y biofertilización. Obtenido de chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://cultivos-

tradicionales.com/upload/file/dossier-5_microorganismos-del-suelo-y-biofertilizacion-2.pdf

Velasco, A., Castellanos, O., Acevedo, G., Clarenc, R., & Rodríguez, A. (2020). Bacterias rizosféricas con beneficios potenciales en la agricultura. Scielo, 1-10.

Vélez, A. T. (2018). *producción y comercialización de la papa variedad súper chola (Solanum tuberosum) en el cantón tulcán, provincia del carchi, año 2017* (Bachelor's thesis).

Villafuerte, O. 2008. Requerimientos edafoclimáticos de la papa. En línea. Disponible en http://www.agroancash.gob.pe/public/articulos/aip2008/temas/req_edafoclimaticos.htm.

ANEXOS

Figura 20. Imágenes del muestreo de suelo en la localidad de Santa Rita, Cantón Píllaro.



Figura 21. Imágenes del muestreo de suelo en la localidad de Llangahua, Cantón Ambato.

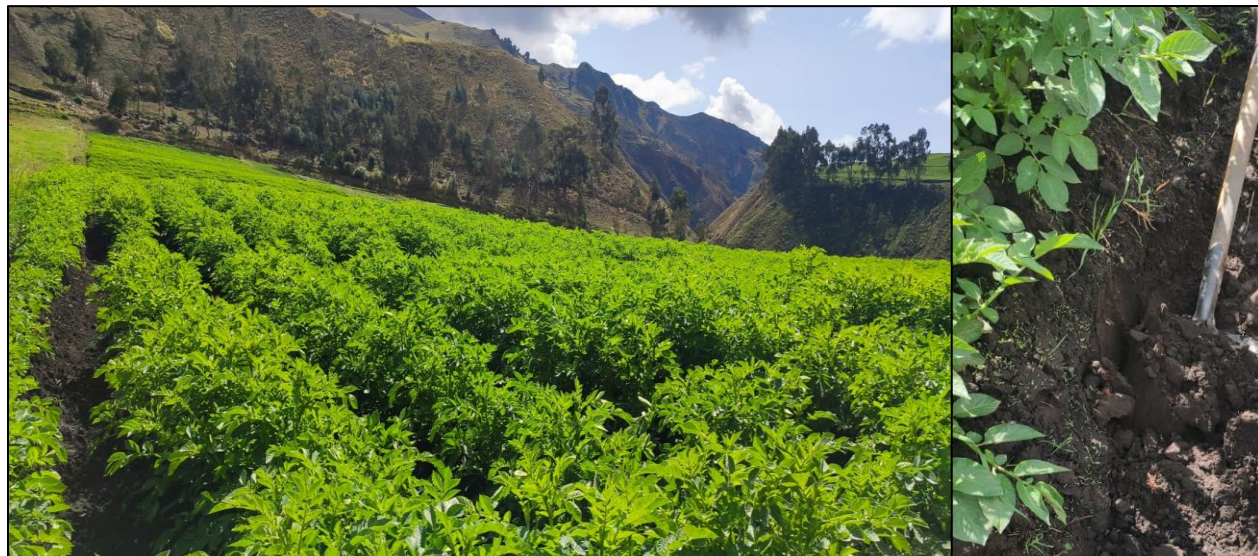


Figura 22. Establecimiento de cada uno de los tratamientos con sus respectivas repeticiones con la muestra de suelo procedentes de la localidad de Santa Rita, Cantón Píllaro y la localidad de Llangahua, Cantón Ambato.



Figura 23. Etiquetas para la diferenciación de cada uno de los tratamientos.

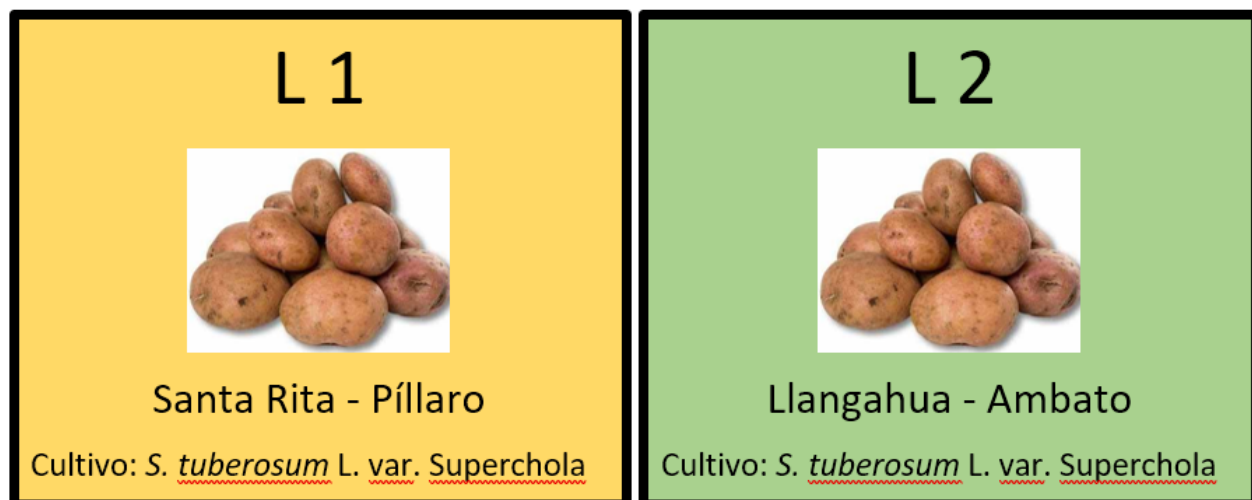


Figura 24. Tabla de código de colores PANTONE.

PANTONE 100	PANTONE 101	PANTONE 109	PANTONE 115	PANTONE 118	PANTONE 119	PANTONE 120	PANTONE 1205	PANTONE 121	PANTONE 123	PANTONE 134	PANTONE 136
PANTONE 137	PANTONE 139	PANTONE 141	PANTONE 148	PANTONE 151	PANTONE 154	PANTONE 155	PANTONE 157	PANTONE 162	PANTONE 1625	PANTONE 163	PANTONE 165
PANTONE 168	PANTONE 169	PANTONE 170	PANTONE 172	PANTONE 174	PANTONE 176	PANTONE 177	PANTONE 178	PANTONE 1797	PANTONE 180	PANTONE 182	PANTONE 183
PANTONE 184	PANTONE 185	PANTONE 191	PANTONE 192	PANTONE 1925	PANTONE 195	PANTONE 199	PANTONE 200	PANTONE 202	PANTONE 206	PANTONE 207	PANTONE 208
PANTONE 211	PANTONE 212	PANTONE 213	PANTONE 214	PANTONE 217	PANTONE 220	PANTONE 221	PANTONE 228	PANTONE 231	PANTONE 2375	PANTONE 244	PANTONE 246
PANTONE 250	PANTONE 2582	PANTONE 259	PANTONE 2607	PANTONE 263	PANTONE 264	PANTONE 265	PANTONE 266	PANTONE 2665	PANTONE 2706	PANTONE 2707	PANTONE 2716
PANTONE 2717	PANTONE 2718	PANTONE 2728	PANTONE 2727	PANTONE 277	PANTONE 279	PANTONE 283	PANTONE 284	PANTONE 285	PANTONE 286	PANTONE 290	PANTONE 292
PANTONE 293	PANTONE 294	PANTONE 297	PANTONE 298	PANTONE 2985	PANTONE 299	PANTONE 300	PANTONE 301	PANTONE 304	PANTONE 306	PANTONE 310	PANTONE 3105
PANTONE 312	PANTONE 3125	PANTONE 313	PANTONE 3145	PANTONE 3165	PANTONE 317	PANTONE 319	PANTONE 320	PANTONE 324	PANTONE 327	PANTONE 3285	PANTONE 3292
PANTONE 331	PANTONE 333	PANTONE 335	PANTONE 337	PANTONE 339	PANTONE 340	PANTONE 3405	PANTONE 3415	PANTONE 346	PANTONE 347	PANTONE 348	PANTONE 351

Figura 25. Informe de resultados del Análisis Metagenómico.



Av. De los Granados E14-285 y Eloy Alfaro
Teléfono: 0998982450
e-mail: idgen.ecuador@gmail.com
R.U.C. 1713443479001

Informe de Resultados

Nombre del Proyecto: Perfiles taxonómicos muestras sustrato – Alejandro Altamirano.

Informe No.: A-320

Técnico Responsable: Francisco Garrido, Ing.

Fecha: 30 de Agosto del 2022

Resumen de Resultados.

Muestra	Código IDgen	Con. muestra (ng/μl)	Total de Lecturas	OTUs*	Número de secuencias
Muestra L1	M445	206.6	151153	7856	76970
Muestra L2	M446	108.1	173313	1307	62124

Conc.: Concentración

pb: pares de bases

*Unidades Taxonómicas Operativas: Cantidad de especies diferentes encontradas en la muestra.

El número final de secuencias corresponde a las secuencias ensambladas, limpias y libres de quimeras.

Firma autorizada

Francisco Javier Flores, PhD.

Propietario IDgen.