



# UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

POSGRADO

## PROGRAMA DE MAESTRÍA EN AGRONOMÍA MENCIÓN NUTRICIÓN VEGETAL

### MODALIDAD DE TITULACIÓN

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

**Tema:** “Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias con capacidad fijadora de nitrógeno atmosférico asociadas con la rizosfera de *Solanum tuberosum* L. Var. Superchola.”

**Autor:** Ingeniero, Kevin Alexis Muñoz Muñoz

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

AMBATO – ECUADOR

2024

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

**INFORMACIÓN GENERAL**

**TEMA:** “Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias con capacidad fijadora de nitrógeno atmosférico asociadas con la rizosfera de *Solanum tuberosum* L. Var. Superchola.”

**AUTOR:** Kevin Alexis Muñoz Muñoz

*Grado académico:* Ingeniero Agrónomo

*Correo electrónico:* kevinalexism1996@gmail.com

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

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN.**

- Línea de investigación aprobada en el programa de posgrado Microbiología y Biotecnología.

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

El tribunal receptor del trabajo de Investigación, presidido por el Ing. Patricio Nuñez Phd, e integrado por los señores Ingeniero Olguer León y el Ingeniero Marco Pérez designados por la Unidad de Titulación de la Universidad Técnica de Ambato, para receptar el trabajo de titulación con el Tema: “Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias con capacidad fijadora de nitrógeno atmosférico asociadas con la rizosfera de *Solanum tuberosum* L. Var. Superchola.” Elaborado por el señor Ingeniero Kevin Alexis Muñoz Muñoz, para optar por el grado de Magister en Agronomía mención Nutrición Vegetal; una vez escuchada la defensa oral del trabajo de investigación el tribunal aprueba y remite para uso y custodia en las bibliotecas UTA.

---

Ing. Patricio Nuñez PhD.  
Presidente de Tribunal

---

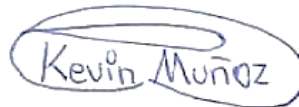
Ing. Olguer León  
Miembro de Tribunal

---

Ing. Marco Pérez  
Miembro de Tribunal

## AUTORÍA DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

La responsabilidad de las opiniones, comentarios y críticas emitidas en el Trabajo de Investigación, presentado con el tema: “Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias con capacidad fijadora de nitrógeno atmosférico asociadas con la rizosfera de *Solanum tuberosum* L. Var. Superchola”, le corresponde exclusivamente al: Ingeniero Kevin Alexis Muñoz Muñoz, Autor, bajo la Dirección del Ingeniero Michel Leiva Mora Doctor en Ciencias Agrícolas, Director del Trabajo de Investigación, y el patrimonio intelectual a la Universidad Técnica de Ambato.

A handwritten signature in blue ink that reads "Kevin Muñoz". The signature is enclosed within a hand-drawn oval shape.

---

Ing. Kevin Alexis Muñoz Muñoz  
C.C. 1805259718  
AUTOR

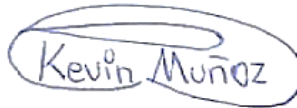
---

Ing. Michel Leiva PhD.  
DIRECTOR

## **DERECHOS DE AUTOR**

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

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

A handwritten signature in blue ink that reads "Kevin Muñoz". The signature is enclosed within a hand-drawn oval shape.

---

Ing. Kevin Alexis Muñoz Muñoz  
C.C. 1805259718  
AUTOR

## **DEDICATORIA**

Primeramente, dedico esta tesis a mi Dios, quien me brindo sabiduría, inspiración, salud, conocimiento y bendición para culminar este estudio; a mis padres Beatriz Muñoz y Jorge Muñoz a mis abuelos Juan y Asunción a mis hermanos Gina y Roberto a mi sobrino Winder y cuñada Gabriela quienes siempre me apoyaron incondicionalmente tanto económica y emocionalmente; a mis familiares quienes siempre confiaron y apoyaron en mi desarrollo profesional.

Gracias a todos.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradeciendo primeramente a Dios quien siempre me cuido y me guio en este camino tanto personal como profesional.

A mis padres Beatriz Muñoz y Jorge Muñoz, siempre estaré agradecido por su apoyo incondicional para alcanzar mis sueños. Todo mi esfuerzo y logros serán para ustedes mis queridos padres.

A mis hermanos Gina y Roberto, les agradezco por siempre estar a mi lado, en los buenos y malos momentos, siempre apoyando emocionalmente permitiendo sacar lo mejor de mi persona.

De igual manera estoy agradecido con los docentes de posgrado de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, especialmente con el Dr. Michel Leiva Mora, quien se caracteriza por ser un gran investigador y científico, a la vez una gran persona dando motivación y visión oportuna.

Por último, agradezco a todas las personas quienes formaron parte de mi desarrollo profesional e investigativo, sin ustedes no hubiera sido posible alcanzar mis sueños. Estoy motivado por lo que me depara el destino.

## ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I.....	3
EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	3
1.1. Introducción.....	3
1.2. Justificación.....	5
1.3. Objetivos.....	7
CAPÍTULO II.....	8
ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	8
2.1. Investigaciones referentes.....	8
2.2. Marco teórico.....	13
2.2.1. Bacterias.....	13
2.2.2. La papa.....	14
2.2.3. Requerimientos nutricionales.....	17
CAPÍTULO III.....	20
MARCO METODOLÓGICO.....	20
3.1. Ubicación.....	20
3.2. Equipos y materiales.....	20
3.2.1. Equipos.....	20
3.2.2. Materiales.....	21
3.3. Tipo de investigación.....	22
3.4. Prueba de Hipótesis.....	22
3.5. Metodología.....	23
3.5.1. Aislar bacterias rizosféricas de plantas de <i>S. tuberosum</i> con la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico.....	23
3.5.2. Caracterizar las colonias y la morfología de los aislados bacterianos rizosféricos.....	27
3.5.3. Determinar la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico <i>in vitro</i> de los aislados bacterianos rizosféricos.....	30



1.5.4. Identificar molecularmente los aislados bacterianos rizosféricos mediante la amplificación de los genes 16S rRNA con PCR y secuenciación.....	31
1.5.5. Evaluar el efecto de los aislados bacterianos rizosféricos con capacidad de fijar nitrógeno atmosférico sobre el crecimiento de vitroplantas de papa en invernadero.....	34
3.6. Población o muestra:.....	37
3.6.1. Tratamientos.....	37
3.7. Recolección de información:.....	40
3.8. Procesamiento de la información y análisis estadístico: .....	40
3.9. Variables respuesta o resultados alcanzados .....	40
CAPITULO IV .....	42
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	42
4.1. Aislamiento de bacterias rizosféricas de plantas de <i>S. tuberosum</i> con la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico.....	42
4.1.1. Influencia de muestras de suelo de cuatro localidades de la provincia de Tungurahua sobre la cantidad de UFC. g <sup>-1</sup> de suelo de la rizósfera de <i>S. tuberosum</i> .....	42
4.2. Caracterización de las colonias y morfología de los aislados bacterianos rizosféricos obtenidos. ....	43
4.2.1. Caracterización cultural de las colonias y morfología de los aislados bacterianos de diferentes localidades de la provincia de Tungurahua. ....	43
4.3. Evaluación de la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico <i>in vitro</i> de los aislados bacterianos rizosféricos. ....	49
4.4. Identificación molecular de los aislados bacterianos rizosféricos mediante la amplificación de los genes 16S rRNA con PCR y secuenciación.....	51
4.5. Determinación del efecto de los aislados bacterianos rizosféricos con capacidad de fijar nitrógeno atmosférico sobre el crecimiento de vitroplantas de papa en invernadero.....	53

4.5.1. Influencia de los aislados bacterianos sobre el área foliar de vitroplantas de <i>S. tuberosum</i> var. Superchola en invernadero.....	53
4.5.2. Influencia de los aislados bacterianos sobre la masa fresca de vitroplantas de <i>S. tuberosum</i> var. Superchola en invernadero.....	55
4.5.3. Efecto de los aislados bacterianos sobre la masa seca de vitroplantas de <i>S. tuberosum</i> var. Superchola en invernadero.....	56
4.5.4. Efecto de los aislados bacterianos sobre el índice de área foliar de vitroplantas de <i>S. tuberosum</i> var. Superchola en invernadero.....	57
<b>CAPÍTULO V.....</b>	<b>59</b>
<b>CONCLUSIONES, RECOMENDACIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS ..</b>	<b>59</b>
5.1. Conclusiones.....	59
5.2. Recomendaciones.....	59
5.4. ANEXOS .....	71

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica de la papa.....	15
<b>Tabla 2.</b> Puntos de muestreo de suelo de la provincia de Tungurahua para el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno. ....	24
<b>Tabla 3.</b> Características culturales de las colonias de aislados bacterianos. ....	27
<b>Tabla 4.</b> Agrupación de aislados bacterianos. ....	30
<b>Tabla 5.</b> Aislados bacterianos de cuatro localidades de la provincia de Tungurahua. ....	38
<b>Tabla 6.</b> Aislados bacterianos con mayor capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico.....	39
<b>Tabla 7.</b> Cepas bacterianas inoculadas en vitroplantas de papa var. Superchola.....	40
<b>Tabla 8.</b> Comparación de la cantidad de UFC por gramo de suelo de la rizósfera de <i>S. tuberosum</i> de diferentes localidades de la provincia de Tungurahua en medio Jensen libre de nitrógeno. ....	42
<b>Tabla 9.</b> Caracterización cultural de las colonias de los aislados bacterianos de diferentes localidades de la provincia de Tungurahua en medio Jensen libre de nitrógeno. ....	44
<b>Tabla 10.</b> Caracterización cultural de las colonias de los aislados bacterianos de diferentes localidades de la provincia de Tungurahua en medio Jensen libre de nitrógeno. ....	47
<b>Tabla 11.</b> Capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico <i>in vitro</i> de diferentes aislados bacterianos de la rizosfera de <i>S. tuberosum</i> var. Superchola en el medio Jensen modificado.....	49
<b>Tabla 12.</b> Identificación molecular de aislados bacterianos rizosféricos con capacidad de fijar nitrógeno atmosférico mediante la amplificación de los genes 16S rRNA con PCR y secuenciación.....	52
<b>Tabla 13.</b> Efecto de la inoculación de cepas bacterianas rizosféricas con capacidad de fijación de Nitrógeno atmosférico en sustrato de arena más perlita sobre el área foliar de vitroplantas de <i>S. tuberosum</i> var. Superchola establecidas en invernadero. ....	53
<b>Tabla 14.</b> Efecto de la inoculación de cepas bacterianas rizosféricas con capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico en sustrato de arena más perlita sobre la masa fresca de vitroplantas de <i>S. tuberosum</i> var. Superchola establecidas en invernadero. ....	55

<b>Tabla 15.</b> Efecto de la inoculación de cepas bacterianas rizosféricas con capacidad de fijación de Nitrógeno atmosférico en sustrato de arena más perlita sobre la masa seca de vitroplantas de <i>S. tuberosum</i> var. Superchola establecidas en invernadero. ....	56
<b>Tabla 16.</b> Efecto de la inoculación de cepas bacterianas rizosféricas con capacidad de fijación de Nitrógeno atmosférico en sustrato de arena más perlita sobre el índice de área foliar de vitroplantas de <i>S. tuberosum</i> var. Superchola establecidas en invernadero.....	57
<b>Tabla 17.</b> Absorbancia en espectrofotómetro ajustados a un nivel de 0,2 a 600 nanómetros. ....	72

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama de actividades para el muestreo de suelo de la rizósfera de <i>S. tuberosum</i> var. Superchola.....	23
<b>Figura 2.</b> Diagrama de actividades realizado para el aislamiento de bacterias fijadoras de N de la rizósfera de <i>S. tuberosum</i> var. Superchola.....	26
<b>Figura 3.</b> Diagrama de la cuantificación de UFC.g <sup>-1</sup> de suelo.....	26
<b>Figura 4.</b> Diagrama de actividades realizadas para la identificación de la morfología y agrupación bacteriana con Tinción de Gram. ....	29
<b>Figura 5.</b> Prueba preliminar para seleccionar bacterias capaces de fijar nitrógeno atmosférico <i>in vitro</i> . ....	31
<b>Figura 6.</b> Diagrama de actividades realizadas para la activación de cepas bacterianas en Agar nutriente.....	32
<b>Figura 7.</b> Diagrama de actividades realizadas para la identificación molecular mediante amplificación de los genes 16S rRNA con PCR y amplificación. ....	33
<b>Figura 8.</b> Diagrama de actividades realizadas para la plantación de vitroplantas de <i>S. tuberosum</i> en invernadero.....	34
<b>Figura 9.</b> Diagrama de actividades realizadas para la activación de cepas bacterianas en medio de cultivo BHI. ....	35
<b>Figura 10.</b> Diagrama de actividades realizado para la medición de la densidad bacteriana de cada cepa utilizando en espectrofotómetro (Biotek) e inoculación de cepas bacterianas en vitroplantas de papa.....	36
<b>Figura 11.</b> Caracterización cultural de las colonias de los aislados bacterianos.....	46
<b>Figura 12.</b> Caracterización morfológica de aislados bacterianos.....	48
<b>Figura 13.</b> Halos de actividad fijadora de Nitrógeno y diámetro de colonia de los aislados bacterianos.....	51
<b>Figura 14.</b> Vitroplantas inoculadas con cepas bacterianas con capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico: a) CC-FCAGP-BFN14, b) CC-FCAGP-BFN1, c) Control. .	54
<b>Figura 15.</b> Vitroplantas inoculadas con cepas bacterianas con capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico: a) CC-FCAGP-BFN1, b) Control. ....	58

## RESUMEN

La presente investigación se desarrolló con la finalidad de aislar, caracterizar e identificar bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico *in vitro* asociadas con la rizosfera de *S. tuberosum* var. Superchola; así como determinar su efecto sobre el crecimiento de vitroplantas de papa en invernadero. Se obtuvieron aislados de cuatro localidades de la provincia de Tungurahua, los cuales se caracterizaron cultural y morfológicamente. La capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico *in vitro* se realizó utilizando el medio de cultivo Jensen modificado, la identificación molecular se realizó mediante amplificación de los genes 16S rRNA con PCR. Finalmente se determinó el efecto de los aislados bacterianos sobre el crecimiento de vitroplantas de papa en invernadero. Los resultados mostraron que en el cantón Píllaro existió la mayor cantidad de UFC. g<sup>-1</sup> de suelo (9,08 x 10<sup>9</sup>), en la caracterización cultural el 87% tuvieron textura lisa, 42% superficie plana, 82% consistencia suave, 42% forma circular, 84% margen entero y el 95% mostraron brillo. En la caracterización morfológica de los aislados el 84% fueron bacterias Gram (-) y el 95% fueron bacilos. El aislado bacteriano con mayor potencial fijador de nitrógeno atmosférico fue el CC-FCAGP-BFN1 y el de menor potencial el CC-FCAGP-BFN15. Mediante la amplificación de los genes 16S rRNA con PCR se identificaron las cepas *Pseudomonas* sp. (CC-FCAGP-BFN1, CC-FCAGP-BFN16), CC-FCAGP-BFN14) y *Paraburkholderia dipogonis* (CC-FCAGP-BFN24), las cuales mostraron una alta capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico. Asimismo, la cepa bacteriana CC-FCAGP-BFN1 (*Pseudomonas* sp.) fue la que más incrementó el área foliar, masa fresca y seca e índice de área foliar de vitroplantas de *S. tuberosum*. En base a los resultados anteriores, se lograron identificar cuatro cepas bacterianas de la rizosfera de *S. tuberosum* donde una de ellas resultó la más promisoría para favorecer el crecimiento vegetativo debido a su alta capacidad para fijar nitrógeno atmosférico.

**Palabras Claves:** Aislados bacterianos, morfofisiológicas, papa, 16S rRNA, vitroplantas.

## ABSTRACT

The present research was developed with the purpose of isolating, characterizing and identifying *in vitro* atmospheric nitrogen-fixing bacteria associated with the rhizosphere of *S. tuberosum* var. Superchola; as well as to determine their effect on the growth of potato vitroplants in greenhouses. Isolates were obtained from four localities in the province of Tungurahua, which were culturally and morphologically characterized. The *in vitro* atmospheric nitrogen fixation capacity was determined using modified Jensen culture medium, and molecular identification was performed by PCR amplification of 16S rRNA genes. Finally, the effect of the bacterial isolates on the growth of potato vitroplants in greenhouses was determined. The results showed that in the canton of Píllaro there was the highest quantity of CFU. g<sup>-1</sup> of soil (9.08 x 10<sup>9</sup>), in the cultural characterization 87% had smooth texture, 42% flat surface, 82% smooth consistency, 42% circular shape, 84% entire margin and 95% showed brightness. In the morphological characterization of the isolates, 84% were Gram (-) bacteria and 95% were bacilli. The bacterial isolate with the highest atmospheric nitrogen-fixing potential was CC-FCAGP-BFN1 and the one with the lowest potential was CC-FCAGP-BFN15. PCR amplification of 16S rRNA genes identified the strains *Pseudomonas* sp. (CC-FCAGP-BFN1, CC-FCAGP-BFN16), CC-FCAGP-BFN14) and *Paraburkholderia dipogonis* (CC-FCAGP-BFN24), which showed a high capacity for atmospheric nitrogen fixation. Likewise, the bacterial strain CC-FCAGP-BFN1 (*Pseudomonas* sp.) was the only one that increased leaf area, fresh and dry mass and leaf area index of *S. tuberosum* vitroplants. Based on the above results, four bacterial strains were identified from the rhizosphere of *S. tuberosum*, one of which was the most promising for favoring vegetative growth due to its high capacity to fix atmospheric nitrogen.

**Key words:** Bacterial isolates, morpho-physiological, potato, 16S rRNA, vitroplants.

# CAPÍTULO I

## EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

### 1.1. Introducción

La papa *S. tuberosum* ostenta una destacada importancia económica al constituirse como uno de los cultivos más extendidos globalmente, contribuyendo significativamente a la economía agrícola (**Haan & Rodriguez, 2016**); (**Mwakidoshi et al., 2021**). Su versatilidad en la cocina y valor nutricional la convierten en una fuente esencial de carbohidratos y nutrientes, desempeñando así un papel fundamental en la seguridad alimentaria. En el ámbito cultural, este cultivo está arraigado en la herencia agrícola y son protagonistas de festivales y celebraciones que resaltan su importancia en la identidad local (**Reddy et al., 2018**).

Entre los nutrientes esenciales para la papa incluyen el nitrógeno, crucial para el desarrollo vegetativo y la tuberización; fósforo, vital para el establecimiento de raíces y la formación de tubérculos; y potasio, fundamental para el tamaño y peso de los tubérculos, así como la resistencia a enfermedades; el calcio y el magnesio desempeñan un papel esencial en el desarrollo celular y la prevención de trastornos como la pudrición apical (**Mokrani, 2018**). En cuanto a los micronutrientes, la papa requiere hierro, zinc, manganeso, cobre y molibdeno en pequeñas cantidades para diversas funciones específicas. La fertilización adecuada, con énfasis en las etapas de crecimiento vegetativo y tuberización, junto con el manejo adecuado del pH del suelo y el riego, es esencial para optimizar el rendimiento y la calidad del cultivo de papa (**Kumar et al., 2018**).

El nitrógeno desempeña un papel esencial en el desarrollo de *S. tuberosum*, este elemento es un componente crucial de las proteínas y clorofila, fundamentales para la fotosíntesis y la formación de aminoácidos (**Muleta y Aga, 2019**). La papa requiere niveles adecuados de nitrógeno para promover un crecimiento vegetativo robusto, la formación de hojas verdes y el desarrollo de tubérculos (**Blumenthal et al., 2008**). Además, el nitrógeno influye en la capacidad de las plantas para absorber otros nutrientes, mejorando la eficiencia en la toma de nutrientes y la asimilación de minerales esenciales. Sin embargo, un exceso de nitrógeno puede resultar en un crecimiento vegetativo exuberante a expensas de la formación de tubérculos, afectando negativamente el rendimiento y la calidad de las estos (**Jatav et al., 2017**).



El crecimiento y la productividad de las plantas normalmente están limitados por el nitrógeno fijado en todos los ambientes con clima adecuado y agua disponible para sustentar la vida. La fertilidad del suelo se ve directamente afectada por el uso prolongado de fertilizantes químicos, además de la generación de una pérdida de microorganismos benéficos del suelo (**Arsita et al., 2020**).

Aunque el nitrógeno es esencial para el crecimiento de las plantas, su aplicación excesiva puede llevar a problemas como la lixiviación de nitratos hacia los cuerpos de agua, ocasionando la contaminación del recurso hídrico (**Chen et al., 2018**). Asimismo, puede conducir a la acidificación del suelo, comprometiendo su estructura y nutrientes; este fenómeno también puede aumentar la emisión de gases de efecto invernadero, contribuyendo al cambio climático (**Kool et al., 2011**). La sobreutilización de fertilizantes nitrogenados en cultivos de papa puede resultar en un desequilibrio en el ecosistema, impactando la biodiversidad y generando problemas de salud pública relacionados con la presencia de nitratos en alimentos (**Wen et al., 2023**).

En los últimos años el uso de microorganismos benéficos en la agricultura ha ganado relevancia debido a sus numerosos beneficios para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Estos microorganismos, como bacterias y hongos, actúan de manera simbiótica con las plantas, estableciendo relaciones mutualistas que promueven la absorción de nutrientes y mejoran la resistencia a enfermedades. La aplicación de biofertilizantes y microorganismos promotores del crecimiento vegetal puede aumentar la disponibilidad de nutrientes esenciales en el suelo, como nitrógeno, fósforo y potasio (**van der Heijden et al., 2008**). Además, estos microorganismos pueden producir compuestos que activan respuestas de defensa en las plantas, fortaleciendo su inmunidad frente a patógenos. Este enfoque sostenible no solo mejora la salud de las plantas, sino que también reduce la dependencia de fertilizantes químicos, contribuyendo así a prácticas agrícolas más respetuosas con el medio ambiente (**Timm et al., 2015**).

La investigación propuesta se enfoca en el estudio de bacterias rizosféricas encontradas en las raíces de *S. tuberosum*, con énfasis en su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico, nutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas. El objetivo es identificar y caracterizar bacterias con esta capacidad, con posibles

aplicaciones en la mejora de la nutrición de las plantas, especialmente en el cultivo de papa.

El estudio se divide en varios procesos:

Aislamiento de bacterias de la rizosfera de *S. tuberosum* que pueden fijar nitrógeno atmosférico, mediante la obtención de muestras de suelo rizosférico y el cultivo selectivo de bacterias involucradas en este proceso.

Caracterización morfológica de las colonias obtenidas para identificar posibles variaciones entre los aislados bacterianos, incluyendo forma, tamaño, color y textura de las colonias.

Identificación molecular de los aislados mediante la amplificación de genes 16S rRNA a través de PCR, seguido de la secuenciación para obtener información detallada sobre la composición genética y una identificación precisa de las especies bacterianas presentes.

Realización de ensayos *in vitro* para cuantificar la capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico de las bacterias identificadas, proporcionando datos cuantitativos sobre su eficiencia en este proceso.

Aplicación de los aislados bacterianos más eficientes en la fijación de nitrógeno atmosférico a vitroplantas de papa en condiciones de invernadero. Se evaluará el impacto en el crecimiento de las plantas mediante parámetros como área foliar, masa seca y masa fresca.

## **1.2. Justificación**

Los fertilizantes nitrogenados inorgánicos permiten una liberación rápida y elevada de nutrientes (Zhao et al., 2016), lo cual mejora significativamente el desarrollo de los cultivos y el crecimiento de las comunidades microbianas (Li et al., 2019). Sin embargo, la aplicación de fertilizantes inorgánicos influye de manera más fuerte sobre la comunidad bacteriana del suelo a diferencia de la fertilización orgánica (Zhang et al., 2021); Jones et al. (2019) manifiestan que el uso de estos fertilizantes puede generar cambios en el pH y su exceso puede modificar el flujo de energía microbiano y la eficiencia en el uso del carbono.

Las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas pueden fijar nitrógeno atmosférico en el suelo, solubilizar fosfatos, producir y secretar sideróforos y pueden exhibir varios comportamientos diferentes simultáneamente (**Sánchez-García et al., 2012**). Lo ideal es crear en el suelo consorcios bacterianos e introducirlos en el suelo para aumentar la productividad de los cultivos en agroecosistemas (**Widdig et al., 2019**).

La presencia de comunidades microbianas en el suelo son indicadores fundamentales de la calidad de este (**Schlöter et al., 2018; García-Delgado et al., 2019**). Los microorganismos del suelo juegan un papel importante en el ciclo de los nutrientes y en el proceso de descomposición de la materia orgánica, lo cual repercutirá en el uso eficiente de los nutrientes (**Kallenbach et al., 2016; Cui et al., 2019**). Cabe mencionar que los microorganismos también tienen un efecto en el mantenimiento y recuperación de la productividad de los suelos, puesto que participan directa e indirectamente en el proceso energético del mismo (**Reinhart et al., 2016; George et al., 2019**).

A pesar del espectacular aumento de la cantidad de nitrógeno (N) sintético aplicado a los cultivos en los últimos 40 años, se ha producido una disminución significativa en el rendimiento con una persistencia considerable del círculo vicioso de pobreza a la mayoría de los agricultores, técnicas especializadas en el estudio de estos microorganismos permiten identificar especies de importancia agronómica y su posterior uso (**El-Fadaly et al., 2019**).

Los microorganismos del suelo, específicamente bacterias llamadas rizobacterias, pueden colonizar la rizosfera, infectar las raíces de las plantas y fijar biológicamente nitrógeno en el suelo mediante un proceso simbiótico (**Wang et al., 2019**). La fijación biológica de nitrógeno es un proceso de conversión de nitrógeno elemental en forma de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) disponibles para las plantas. Estos microorganismos pueden vivir en residuos de plantas (saprófitos) o completamente dentro de las plantas endófitas o rizobacterias, o en estrecha asociación con las raíces de las plantas (**Prasetya et al., 2023**). La eficacia de las poblaciones de rizobacterias en la fijación de nitrógeno se correlaciona con el estado de fertilidad del suelo.

La identificación molecular de bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) en el cultivo de papa es fundamental para seleccionar cepas eficientes que promuevan el crecimiento de las plantas y optimicen la fijación de nitrógeno en el suelo, reduciendo así la

dependencia de fertilizantes nitrogenados sintéticos y mejorando la sostenibilidad agrícola. Esta técnica permite una caracterización precisa de la diversidad de especies bacterianas, facilitando la selección de cepas más adecuadas para condiciones específicas del suelo y del cultivo de *S. tuberosum*. La identificación molecular también ayuda a identificar cepas resistentes a condiciones adversas del suelo, como salinidad o acidez, lo que amplía las posibilidades de aplicación en diversas áreas geográficas. Esta investigación busca proporcionar una base sólida para el desarrollo de nuevas estrategias de manejo agronómico y la promoción de prácticas agrícolas más sostenibles.

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. General**

Aislar, caracterizar e identificar bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico *in vitro* asociados con la rizosfera de *Solanum tuberosum* L. Variedad Superchola para determinar su efecto sobre el crecimiento de vitroplantas de papa en invernadero.

#### **1.3.2. Específicos**

- Aislar bacterias rizosféricas de plantas de *S. tuberosum* con la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico.
- Caracterizar las colonias y la morfología de los aislados bacterianos rizosféricos.
- Determinar la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico *in vitro* de los aislados bacterianos rizosféricos.
- Identificar molecularmente los aislados bacterianos rizosféricos mediante la amplificación de los genes 16S rRNA con PCR y secuenciación.
- Evaluar el efecto de los aislados bacterianos rizosféricos con capacidad de fijar nitrógeno atmosférico sobre el crecimiento de vitroplantas de papa en invernadero.

## CAPÍTULO II

### ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

#### 2.1. Investigaciones referentes

El nitrógeno es esencial en las células vegetales para la síntesis de enzimas, proteínas, clorofila, ADN y ARN, por lo que influye directamente en el crecimiento de las plantas y la producción de alimentos (**Pathak et al., 2019**). Al intervenir en procesos metabólicos de importancia su deficiencia provoca un crecimiento reducido, coloración amarillenta de hojas y baja productividad (**Ouyabe et al., 2019**).

El aislamiento y caracterización de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico es un recurso biológico valioso para maximizar la producción agrícola. Las bacterias son fenotípica y numéricamente diversas, de los cuales muchos permanecen sin identificar (**Simon, 2014**).

**Tamas et al. (2010)** en su investigación sobre el aislamiento y caracterización de bacterias fijadoras de nitrógeno, obtuvieron 12 aislados puros de una primera muestra (cuenca Ciuc) y 14 aislados puros de una segunda muestra (cuenca Gheorgheni) mediante aislamientos en un medio selectivo. Después de 2 días de incubación a 28°C en un medio selectivo, se lograron colonias separadas, como se ilustra en la figura 1. La pigmentación de estas colonias varió entre transparente, crema y amarilla. Las colonias presentaron una forma redonda con márgenes y superficie suaves, adoptando una forma convexa. Su textura fue mucosa, atribuida a la producción extracelular de polisacáridos (EPS). En cuanto al análisis morfológico celular, se determinó que los aislados eran bacterias Gram (-).

**El-Fadaly et al. (2019)** en su investigación para caracterizar bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas, llevaron a cabo tinciones de Gram y esporas, tinción de la cápsula y la observación de la motilidad fueron estudiadas mediante microscopía. Respecto a las características fisiológicas de los aislados bacterianos, se llevaron a cabo pruebas de catalasa, hidrólisis de almidón y licuefacción de caseína. En el medio de agar nutritivo todos los aislados bacterianos obtenidos mostraron una forma de cocos y se dispusieron en diplococos, fueron Gram (-), carecían de formadores de esporas, presentaban cápsulas positivas y ninguno de ellos era móvil. Todos los aislados

produjeron un pigmento marrón no soluble y dieron resultados positivos en las pruebas de catalasa, hidrólisis de almidón e hidrólisis de caseína.

**Zhan et al. (2022)** en su investigación determinaron la actividad nitrogenasa, para lo cual realizaron el método de reducción de acetileno, una cepa única se utilizó para inocular medio líquido LB y luego se transfirió a medio líquido libre de nitrógeno Döbereiner. El control no fue inoculado, y la suspensión bacteriana alcanzó una DO 600 de 0,6 a 30 °C y 160 r/min. Tras la inyección de acetileno, la producción de etileno se determinó mediante cromatografía de gases. La actividad nitrogenasa de la cepa A02 mostró un incremento proporcional al aumento del contenido de nitrógeno en el rango de 0 a 0,04 g/L, en consecuencia, se observó una fuerte correlación entre el nitrógeno y la actividad nitrogenasa de la cepa A02. Asimismo, se destacó que la actividad nitrogenasa alcanzó su punto máximo cuando el contenido de nitrógeno en el medio era de 0,05 g/L.

**Ma et al. (2020)** manifestaron que la actividad nitrogenasa de los rizobios de soja fue registrada en 23,000 nmol ml<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, la actividad nitrogenasa de las bacterias fijadoras de nitrógeno vinculadas a la caña de azúcar fluctuó entre 65 y 3,187.8 nmol ml<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Para el maíz y el arroz, la actividad nitrogenasa fue aproximadamente de 100 a 200 nmol ml<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, mientras que para las plantas leñosas fue de 2.5 nmol ml<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

**Xu et al. (2018)** en su estudio para aislar y caracterizar bacterias fijadoras de N<sub>2</sub> de caña gigante y pasto varilla y evaluar su potencial de promoción del crecimiento vegetal y absorción de nutrientes para su uso como biofertilizantes, obtuvieron un total de 190 bacterias del suelo de la rizosfera y del interior de tallos y raíces de caña gigante y pasto varilla. Confirmaron que todos los aislados tenían actividad nitrogenasa, el 96,9% produjo auxinas y el 85% produjo sideróforos. Luego, se clasificaron las seis cepas principales, incluidas *Sphingomonas trueperi* Kampf NNA-14, *S. trueperi* NNA-19, *S. trueperi* NNA-17, *S. trueperi* NNA-20, *Psychrobacillus psychrodurans* Krishnamurthi NP-3 y *Enterobacter oryzae* Peng NXU-38, siendo *S. trueperi* la que tenía mayor actividad nitrogenasa (350 nmol ml<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>).

**Liu et al. (2018)** aislaron una cepa L201 T, bacteria fijadora de nitrógeno y formadora de endosporas, de las hojas de *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken en la Universidad Agrícola del Sur de China. El análisis filogenético del gen 16S rRNA la clasifica dentro del género *Paenibacillus*, mostrando similitud con especies como *Paenibacillus*

*albidus* Zhuang y *Paenibacillus odorifer* Berge. Los ácidos grasos dominantes incluyeron anteiso-C 15:0, y la quinona isoprenoide principal fue la MK-7. La cepa L201 T presenta una propuesta de nueva especie, *Paenibacillus bryophyllum* Liu sp. nov., distinguida mediante pruebas biológicas, bioquímicas, patrones proteicos y huellas genómicas, con una relación ADN-ADN del 29,8% y mostró una actividad nitrogenasa de 2.98 nmol ml<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

En un estudio se aislaron bacterias endofíticas fijadoras de nitrógeno de hojas, tallos y raíces de plantas de caña de azúcar, un total de ochenta y nueve aislados de bacterias endofíticas fueron obtenidos en agar sin N, y todos mostraron actividad nitrogenasa según un ensayo de reducción de acetileno (ARA). Se procedió a caracterizar tres aislados de caña de azúcar masticable (C2HL2, C7HL1 y C34MR1) y un aislado de caña de azúcar industrial (UT3R1). Se observaron tres respuestas distintas en la actividad de la nitrogenasa: C2HL2 y C7HL1 mostraron aumentos significativos con la adición de un 0,005 % de extracto de levadura, C34MR1 no mostró respuesta, mientras que UT3R1 exhibió una disminución significativa en la actividad de la nitrogenasa con un 0,005 % de extracto de levadura. En todos los aislados, la actividad nitrogenasa disminuyó al aumentar la concentración de extracto de levadura al 0,05 %. Los aislados C2HL2 y C7HL1, con las secuencias del gen 16S rRNA estrechamente relacionadas con *Novosphingobium sediminicola* Baek y *Ochrobactrum intermedium* Velasco respectivamente, mostraron la actividad de la nitrogenasa más alta (Muangthong et al., 2015).

En un estudio para la caracterización de los aislados bacterianos Zahran et al. (2018), aislaron 68 especies de rizobacterias en Egipto que, según se informó, eran buenos candidatos para establecer simbiosis en diversos entornos egipcios. Durante el estudio para el aislamiento y caracterización de especies de *Rhizobium* y determinación de su potencia para la producción de factores de crecimiento, se aislaron 260 bacterias en placa de agar, de las cuales 53 eran rizobacterias fijadoras de nitrógeno y se encontraron 43 tipos de morfologías con 5 cepas de rizobacterias efectivas en plantas. El continuo aislamiento y caracterización de nuevas cepas de diversos entornos es de suma importancia.

La fijación biológica de nitrógeno aporta alrededor de 100 millones de toneladas de nitrógeno para los ecosistemas terrestres, de 30 a 300 millones de toneladas para los

ecosistemas marinos y 20 millones de toneladas de la fijación química debida a fenómenos atmosféricos (**Tak et al., 2020**).

Se ha visto un incremento en el uso de fertilizantes químicos nitrogenados para la producción de los cultivos agrícolas desde la Segunda Guerra Mundial. El aumento ha tenido diversas consecuencias, como la contaminación del agua y la eutrofización debido a la lixiviación de nitrógeno en el suelo por la lluvia y el riego (**Kuswinanti et al., 2021**). Para minimizar las consecuencias, el uso de bacterias fijadoras de nitrógeno puede desempeñar un papel importante en la vida de la planta huésped porque asegura su suministro de nitrógeno, la defensa contra patógenos y plagas, así como la adaptación a diversos tipos de estrés ambiental (**Wafula et al., 2020**); (**Sánchez-García et al., 2010**).

**Zhang et al. (2022)** examinaron 10 bacterias endofíticas utilizando el método de cultivo libre de nitrógeno de las raíces de siete cultivares de yuca, y la actividad de la nitrógenoasa de la cepa A02 fue la más alta, 95,81 nmol ml<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Se confirmó que la cepa A02 era *Microbacteriaceae*, *Curtobacterium* mediante alineación de secuencia de ARNr 16S. Se analizaron más a fondo las características biológicas y morfológicas de la cepa A02.

**Mbega et al. (2021)** investigaron la diversidad de rizobacterias cultivables asociadas con la papa (*S. tuberosum*) en Tanzania y evaluaron su actividad *in vitro* del crecimiento vegetal (PGP) para deducir su potencial como biofertilizantes. Se recolectaron muestras de suelo y tubérculos de la rizosfera de papa (54 muestras en total) de 9 aldeas en tres regiones agroecológicas diferentes de Tanzania. Se obtuvieron un total de 145 aislados de rizobacterias, 52 de los cuales fueron seleccionados e identificados mediante secuencias parciales del gen 16S rRNA y examinados para detectar diversos rasgos de PGP *in vitro*, incluida la solubilización cualitativa y cuantitativa de fósforo (P), fijación de nitrógeno (N<sub>2</sub>) y producción de amoníaco (NH<sub>3</sub>) en medio libre de nitrógeno, y producción de ácido indol-3-acético (AIA), ácidos giberélicos (GA) y sideróforos. Los resultados mostraron que los aislados fueron todos *Gammaproteobacteria*, pertenecientes a 4 familias (*Enterobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Pseudomonadaceae* y *Morganellaceae*) y 9 géneros (*Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Morganella*, *Buttiauxella*, *Pantoea* y *Cedecea*).



**Reinhardt et al. (2008)** en su investigación obtuvieron catorce cepas de bacterias fijadoras de nitrógeno provenientes de diversas especies de plantas, como la mandioca, el maíz y la caña de azúcar, empleando condiciones selectivas que excluyen el nitrógeno. La capacidad de fijación de nitrógeno fue confirmada mediante una prueba de reducción de acetileno. Todas las cepas analizadas que mostraron capacidad de fijación de nitrógeno presentaron una hibridación positiva con la sonda del gen *nifH* derivada de *Azospirillum brasilense*. La caracterización de las cepas se llevó a cabo mediante la secuenciación de los genes RAPD, ARDRA y 16S rDNA. Los análisis RAPD revelaron la existencia de 8 genotipos, mientras que los 6 linajes restantes se agruparon en 3 conjuntos RAPD, indicando un posible origen clonal. Las secuencias obtenidas de ARDRA y 16S rDNA se asignaron a 13 grupos conocidos de bacterias fijadoras de nitrógeno, incluyendo organismos de los géneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas* y *Enterobacteriaceae*. Además, dos cepas fueron clasificadas como *Stenotrophomonas* ssp. La identificación molecular basada en las secuencias de ADNr 16S respaldó los datos obtenidos en las pruebas morfológicas y bioquímicas.

**Ding et al. (2005)** en su estudio seleccionaron un total de 29 aislados de las rizosferas de trigo, maíz, raigrás y sauce en base a su crecimiento en un medio sin nitrógeno y su resistencia a 100 °C durante 10 minutos. De estos 29 aislados, siete mostraron la presencia del gen *nifH*, confirmado mediante amplificación por PCR. Tras la caracterización fenotípica, la secuencia de ADNr 16S, el contenido de G+C y la hibridación ADN-ADN, se determinó que los siete aislados pertenecen a los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus*. En detalle, los aislados T1 y W5 se identificaron como *Bacillus cereus* y *Bacillus marisflavi*, respectivamente. Los aislados G1, C4 y C5 fueron reconocidos como *Bacillus megaterium*. Por otro lado, el aislado G2 se identificó como *Paenibacillus polymyxa*, mientras que el aislado T7 fue clasificado como *Paenibacillus massiliensis*.

Al investigar sobre las principales bacterias fijadoras de nitrógeno presentes en las rizosferas de *Juniperus* sp., *Aster gymnocephalus*, *Gringelia* sp., *Lygodesmia* sp. y *Haplopappus* sp. se identificaron miembros del género *Paenibacillus*. No obstante, también se aislaron *Azospirillum lipoferum* Beijerinck y *Bradyrhizobium japonicum* de las rizosferas de *Haplopappus* sp. y *Viguiera linearis*. Desde el punto de vista

funcional, se observó que *Paenibacillus durus* BR\_30 exhibió las mayores actividades PGP (Promoción del Crecimiento Vegetal) (Navarro-Noya et al., 2012).

Ha et al. (2018) en su investigación para aislar y caracterizar bacterias fijadoras de nitrógeno, tomaron muestras de suelo de diversas áreas y se utilizaron medios de Burk sin suplemento mineral de nitrógeno. La producción de amoníaco ( $\text{NH}_4^+$ ) por las cepas se evaluó mediante el reactivo de Nessler después de la generación de biomasa. De veinticinco aislados, las cepas 6.2 y 8.2, que mostraron una alta concentración de  $\text{NH}_4^+$ , fueron seleccionadas como las más eficientes en fijación de nitrógeno. Las condiciones óptimas para su crecimiento y fijación de nitrógeno fueron un pH de 7,0 y una temperatura de 30°C, con sacarosa favoreciendo el crecimiento. El análisis del gen 16S rRNA reveló que las cepas 6.2 y 8.2 compartieron similitud del 99% y 100% con *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp., respectivamente, según la búsqueda BLAST en GenBank.

## 2.2. Marco teórico

### 2.2.1. Bacterias

#### 2.2.1.1. Generalidades

Las bacterias son pequeños organismos unicelulares que se encuentran en casi todas partes de la Tierra y son indispensables para los ecosistemas del planeta. Algunas especies pueden vivir en condiciones extremas de temperatura y presión (Dirpan et al., 2019). Las bacterias son procariotas que carecen de envoltura nuclear, por lo que el ADN se encuentra suspendido en el citoplasma. Las bacterias se clasifican por su forma y por cómo reaccionan cuando se tratan con la tinción de Gram en el laboratorio. Las bacterias pueden considerarse Gram negativas o Gram positivas (Kou et al., 2020).

Todas las bacterias tienen una membrana plasmática y algunas bacterias tienen proyecciones, como flagelos o cilios, en el exterior de sus cuerpos. Estos pueden ayudar con su locomoción, según la estructura y el tipo de bacteria. Al igual que las células vegetales, la mayoría de las bacterias tienen paredes celulares. Las paredes celulares dan soporte a la célula y contribuyen a su estructura y forma (Zhang et al., 2019).

## **2.2.2. La papa**

### **2.2.2.1. Generalidades**

La papa *S. tuberosum* es un tubérculo reconocido como uno de los cultivos globales que proporciona energía a más de 100 millones de personas en todo el mundo. El consumo de papa siempre ha estado aliado con la buena salud y ha impulsado la nutrición humana ya que aporta calorías, proteínas, vitaminas y minerales (**Koch et al., 2020**). Hoy en día la papa cultivada es uno de los principales cultivos alimentarios humanos. El contenido de potasio, vitamina C y vitamina B6 de la papa, favorecen la salud del corazón. Las papas contienen cantidades importantes de fibra, esta ayuda a reducir la cantidad total de colesterol en la sangre, disminuyendo así el riesgo de enfermedades cardíacas (**Devaux et al., 2021**)

La importancia de la papa para el suministro de alimentos humanos ha sido reconocida por las Naciones Unidas y declararon 2008 Año Internacional de la Papa. Casi el 80% de las exportaciones de tubérculos de semilla está en manos de empresas holandesas y ocupando más del 20% de la tierra cultivable en los Países Bajos, la papa también es un cultivo comercial muy importante en los Países Bajos (**Dourado et al., 2019**). En Ecuador se considera como el tercer cultivo transitorio más importante, se producen alrededor de 421 000 toneladas al año, es un cultivo tradicional de nuestro territorio y existen cerca de 82 000 productores a nivel nacional (**Flores et al., 2022**).

### **2.2.2.2. Importancia**

La papa es un cultivo muy atractivo en los sistemas de producción agrícola ya que combina un potencial de rendimiento extraordinariamente alto con un alto valor nutricional (**Charkowski et al., 2020**). Sin embargo, mientras que los países con una agricultura de altos insumos, como Estados Unidos, Francia y Alemania, pueden alcanzar rendimientos promedio de papa de más de 45 toneladas por hectárea, los rendimientos promedio de la mayoría de los demás países son considerablemente más bajos, lo que lleva a rendimientos promedio de papa de 20 toneladas por hectárea en todo el mundo (**Naumann et al., 2020**).

Las papas son una buena fuente nutricional pero además de ser una fuente importante de alimento también sirven cada vez más como materia prima para productos industriales. El almidón de papa y sus derivados desempeñan un papel importante en una variedad de aplicaciones industriales como la fabricación de papel, textiles y

procesamiento de alimentos (**Gao et al., 2019**). Por lo tanto, a diferencia de la mayoría de los otros cultivos, la papa tiene un rango inusualmente alto de posibilidades de utilización, lo que hace que su producción sea aún más atractiva.

### 2.2.2.3. Clasificación taxonómica

*S. tuberosum* comúnmente conocida como papa pertenece a la familia de las solanáceas. Es una planta angiosperma y se clasifica dentro del Reino Vegetal o Plantae, filo de plantas con flores Magnoliophyta, es una dicotiledónea, orden Solanales (**Naeem et al., 2023**).

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

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

**Fuente:** (Jerez y Martín, 2012)

### 2.2.2.4. Descripción botánica

*S. tuberosum* es una planta herbácea que crece hasta 1 m de altura con tallos vellosos y hojas divididas en alrededor de cuatro pares de folíolos. Las flores pueden ser blancas, rosadas, moradas o azules con centros amarillos. Los frutos de la papa son una baya esférica de color amarillo verdoso, succulenta pero no comestible, de hasta 4 cm de ancho. Bajo tierra, la raíz comestible forma un tubérculo de forma esférica a ovoide que puede tener una variedad de colores, tamaños y formas, dependiendo de la variedad cultivada (**Kacheyo et al., 2021**).

### 2.2.2.5. Requerimientos edafoclimáticos

La papa se puede cultivar casi en cualquier tipo de suelo excepto en suelos salinos y alcalinos. Se prefieren los suelos que son naturalmente sueltos y ofrecen la menor resistencia al agrandamiento de los tubérculos. Los suelos francos y franco arenosos,

ricos en materia orgánica con buen drenaje y aireación, son los más adecuados para el cultivo de papas. El suelo con un rango de pH de 5,2 a 6,4 se considera ideal (**Yanza et al., 2020**).

La papa es un cultivo de clima templado, sin embargo, crece en una amplia gama de condiciones climáticas. Se cultiva sólo en condiciones en las que la temperatura durante las temporadas de crecimiento es moderadamente fresca. El crecimiento vegetativo de la planta es mejor a una temperatura de 24°C mientras que el desarrollo de los tubérculos se favorece a 20°C. El cultivo se puede dar hasta en una altitud de 3000 m sobre el nivel del mar (**Cóndor et al., 2021**).

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

La micropropagación es la alternativa a la propagación convencional de papas. Métodos de propagación *in vitro* utilizando esquejes nodales, puntas de meristemas y los microtubérculos son más confiables para mantener la integridad genética de los clones multiplicados desde la diferenciación y la posterior organogénesis o los cambios morfogénéticos que lo acompañan (**Gixhari, 2018**)

Las papas pueden micropropagarse rápidamente a gran escala mediante cultivos de meristemas y puntas de brotes, proliferación mediante brotes axilares desarrollados a partir de esquejes nodales cultivados *in vitro* y producción de brotes adventicios directamente sobre explantes o indirectamente a través de una fase de callo (**Jiménez-Terry et al., 2013**). Los avances actuales se consideran el comienzo de la segunda agricultura “verde” y se espera que hagan que la agricultura sea más eficiente, rentable y ambientalmente segura (**Hajare et al., 2021**).

Esta técnica nos permite aprovechar el valor potencial del cultivo de tejidos en la producción de papas. La técnica de producción de semilla de papa puede diseñarse con multiplicación *in vitro* a través de regeneración de plántulas o producción de microtubérculos (**Koleva et al., 2019**).

##### **2.2.2.6.1. Importancia**

La importante ventaja que ofrece la micropropagación sobre los métodos convencionales es que, en un tiempo y espacio relativamente cortos, se puede producir un gran número de plantas a partir de un solo individuo independientemente de las estaciones o épocas del año. La micropropagación es esencial para que especies

altamente heterocigotas como la papa produzcan plantas uniformes (**Hajare et al., 2021**).

### **2.2.3. Requerimientos nutricionales**

El manejo eficaz de los nutrientes es fundamental para la producción de papa, ya que el rendimiento y la calidad de los tubérculos se ven directamente afectados por la cantidad y el momento de las aplicaciones de nutrientes (**Xu et al., 2019**). Las papas tienen altas demandas de nutrientes, su absorción es mayor durante el crecimiento del tubérculo (**Coulibali et al., 2020**).

Los requerimientos de nutrientes de la papa varían según la etapa de crecimiento del cultivo. Durante la primera etapa se requiere de elementos como nitrógeno y potasio, mientras que fosfato y magnesio para su crecimiento (**Dadrasi et al., 2020**). El mayor requerimiento de potasio se produce durante la etapa de crecimiento de los tubérculos. La floración de las plantas de papa es un indicativo de cuándo comienza esta etapa morfológica, y zinc, manganeso, calcio para el correcto desarrollo del tubérculo (**Torabian et al., 2021**).

#### **2.2.3.1. Nitrógeno**

Según **Monteza (2020)** el nitrógeno es un elemento limitante para el crecimiento y la producción de las plantas. Es un componente importante de la clorofila, el pigmento más necesario para la fotosíntesis, así como de los aminoácidos, los componentes clave de las proteínas. Se encuentra también en otras biomoléculas indispensables, como el ATP y ácidos nucleicos. Aunque es uno de los elementos más abundantes que predominan en forma de gas nitrógeno ( $N_2$ ) en la atmósfera terrestre (**Zavala, 2022**).

Las plantas sólo pueden utilizar formas reducidas de este elemento y adquieren estas formas de nitrógeno “combinado” mediante la adición de fertilizante de amoníaco o nitrato, adición de estiércol al suelo, la liberación de estos compuestos durante la descomposición de la materia orgánica, la conversión de nitrógeno atmosférico en compuestos mediante procesos naturales como rayos, y fijación biológica de nitrógeno (**García, 2022**). Sin embargo, el nitrógeno es uno de los insumos más importantes y costosos. Desafortunadamente, las fuentes convencionales de N son altamente susceptibles a la lixiviación, desnitrificación y volatilización (**Guerrero, 2020**).

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

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) pertenecen a un grupo heterogéneo y beneficioso de microorganismos que pueden encontrarse en la rizosfera, en la superficie de la raíz o asociados a ella, y son capaces de potenciar el crecimiento de las plantas y protegerlas de enfermedades y estrés abiótico **(Olanrewaju et al., 2017); (Veitía et al., 2008)**. Los mecanismos por los cuales PGPB estimula el crecimiento de las plantas involucran la disponibilidad de nutrientes provenientes de procesos genéticos, como la fijación biológica de nitrógeno y la solubilización de fosfato y la producción de fitohormonas y sideróforos, entre varios otros **(Poria et al., 2022)**.

Las interacciones entre plantas y bacterias ocurren a través de procesos simbióticos, endofíticos o asociativos con distintos grados de proximidad con las raíces y el suelo. **(Torres et al., 2013)**. Los PGPB endofíticos son buenos candidatos a inoculantes porque colonizan las raíces y crean un ambiente favorable para su desarrollo y función **(Ruiu, 2020)**. Las relaciones endofíticas no simbióticas ocurren dentro de los espacios intercelulares de los tejidos vegetales, que contienen altos niveles de carbohidratos, aminoácidos y nutrientes inorgánicos **(Ramakrishna y Yadav, 2019)**.

### **2.2.3.3. Bacterias rizosféricas**

Las rizobacterias residen en la rizosfera del suelo, cerca de las raíces de las plantas y aquellas que tienen efectos beneficiosos sobre las plantas se denominan rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal **(Imade et al., 2021)**. Estas rizobacterias están equipadas con una serie de mecanismos ya sea tanto directos como indirectos a través de los cuales mejoran el crecimiento de las plantas en diversos entornos agrícolas **(Saeed et al., 2021)**.

Varios estudios previos han informado sobre la mejora natural del crecimiento de las plantas en cultivos extensivos mediante la aplicación de rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas **(Cruz-Martín et al., 2013)**. Los mecanismos para la promoción del crecimiento de las plantas utilizados por las rizobacterias, que habitan la rizosfera, incluyen ajustes metabólicos, ajustes en los niveles de fitohormonas, producción de exopolisacáridos, colonización de raíces y mejora de la disponibilidad de nutrientes **(Vieira et al., 2020)**. Estas rizobacterias también mejoran indirectamente

el crecimiento de las plantas al inducir su resistencia a diverso estrés biótico y abiótico, como el ataque de patógenos y la contaminación por metales pesados, utilizando mecanismos como la producción de antibióticos, la inducción de resistencia sistémica inducida, la competencia de la rizosfera y la producción de sustancias antagonistas para biocontrol (**Xiang et al., 2022**).

#### **2.2.3.4. Bacterias fijadoras de nitrógeno**

Las bacterias fijadoras de nitrógeno son microorganismos capaces de transformar el nitrógeno atmosférico en nitrógeno fijado, es decir, en compuestos inorgánicos aprovechables por las plantas (**Harindintwali et al., 2020**).

Según **Kawaka (2022)** la fijación biológica de nitrógeno (BNF) es realizada por un grupo especializado de procariotas. Estos organismos utilizan la enzima nitrogenasa para catalizar la conversión del nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) en amoníaco ( $NH_3$ ). Las plantas pueden asimilar fácilmente  $NH_3$  para producir las biomoléculas nitrogenadas antes mencionadas. Se reconocen dos tipos de bacterias fijadoras de nitrógeno. El primer tipo, las bacterias de vida libre o también conocidas como no simbióticas, incluye las cianobacterias como *Anabaena* y *Nostoc* y géneros como *Azotobacter*, *Beijerinckia* y *Clostridium*. El segundo tipo comprende las bacterias mutualistas (simbióticas); los ejemplos incluyen *Rhizobium*, asociado con plantas leguminosas (**Dicenzo et al., 2020**).

La reducción del nitrógeno atmosférico es un complejo proceso que requiere una gran cantidad de energía. La molécula de nitrógeno se compone de dos átomos de nitrógeno unidos por un triple enlace covalente, esto hace que la molécula no sea reactiva. La nitrogenasa cataliza la ruptura de este enlace y la adición de tres átomos de hidrógeno a cada átomo de nitrógeno (**Devi et al., 2022**).

Los microorganismos que fijan nitrógeno necesitan 16 moles de adenosin trifosfato (ATP) para reducir un mol de nitrógeno. Estos organismos obtienen esta energía oxidando moléculas orgánicas (**Abadi et al., 2021**). Los microorganismos de vida libre no fotosintéticos deben obtener estas moléculas de otros organismos, mientras que los microorganismos fotosintéticos, como las cianobacterias, utilizan azúcares producidos por la fotosíntesis. Los microorganismos fijadores de nitrógeno asociativos y simbióticos obtienen estos compuestos de las rizosferas de sus plantas hospedantes (**Vasar et al., 2023**); (**Nuñez et al., 2017**).



## **CAPÍTULO III**

### **MARCO METODOLÓGICO**

#### **3.1. Ubicación**

El ensayo se realizó en el laboratorio de Bioinsumos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, ubicada en el sector de Querochaca, perteneciente al cantón Cevallos, provincia de Tungurahua. Sus coordenadas geográficas son 1°22'10.13" S y 78°36'22.81" O, con una altitud de 2890 msnm (**Google Earth, 2022**).

El clima del sector de Querochaca es frío ya que normalmente se encuentra en una temperatura 15°C, con lluvias frecuentes, sin embargo, para este ensayo se realizará en el laboratorio de microbiología agrícola (**Tenesaca, 2015**).

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

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

- Computadora.
- Equipo de protección.
- Autoclave (M11 ultra clave).
- pHmetro (AB150).
- Balanza analítica (EUROTECH –JF2204).
- Cabina de flujo laminar (INDELAB. Modelo IDL R48V Labolan).
- Destilador de Agua (DIRECT – Q / MILLOPONE).
- Cámaras de crecimiento (MEMMERT).
- Vortex.
- Microscopio óptico de luz translúcida (LEICA DM1000 LED).
- Microondas (PANASONYC).
- Micropipetas (Volumen 1-5ml MICROLIT RBO-5).
- Balanza de precisión electrónica semianalítica (ADAM).
- Incubadora (BINDER).
- Espectrofotómetro (EPOCH 2NS).
- Nanodrop.
- Termociclador.

### 3.2.2. Materiales

- Agar (en polvo para cultivo de tejidos vegetales - Agar Powder for tissue culture SRL).
- Agua desionizada estéril.
- Alcohol (90% y 70%).
- Asa de inoculación de acero inoxidable.
- Bata quirúrgica.
- Bisturí (STAINLESS N°4).
- Bolsas PROTEK (2 kg de capacidad).
- Cajas de Petri (90 mm de diámetro).
- Cucharillas medidoras metálicas.
- Cooler.
- Estantes metálicos y de vidrio.
- Etiquetas adhesivas.
- Fundas plásticas.
- Gorros quirúrgicos.
- Hojas de bisturí N° 23.
- Jabón líquido (Recamier).
- Mascarillas.
- Matraz Erlenmeyer (1000 ml, 500 ml, 250 ml, 100 ml).
- Mechero Bunsen.
- Mecheros de alcohol.
- Medio de cultivo Jensen – Agar (HIMEDIA)
- Medio de cultivo MS (PhytoTech).
- Muestras de suelo de cultivo de papa de distintas zonas de la provincia de Tungurahua.
- Papel aluminio (DIAMOND).
- Papel de filtro (Whatman ®)
- Pinzas metálicas (MEDITEC 20 cm).
- Placas metálicas.
- Probetas (1000 ml y 50 ml).

- Reactivos para Tinción de Gram (Lugol, alcohol-acetona, safranina, aceite de inmersión, cristal violeta).
- Rociador plástico (250 ml, 1000 ml).
- Sacarosa (Azúcar blanca Valdez).
- Tubérculos de papa de la variedad Superchola.
- Tubos de ensayo (Longitud 180 mm).
- Varilla de agitación.
- Vaso de precipitado (100 ml, 500 ml y 50 ml).
- Zapatones.
- Medio de cultivo (Brain Heart Infusion broth).
- Medios de cultivo (Nutrient agar).
- Caja con tapa ISO 4 (Thermopack).
- Arena.
- Substraaat perlite.
- Vitroplantas variedad superchola.
- Vasos plásticos transparentes.

### **3.3. Tipo de investigación**

La investigación es de tipo experimental, las variables independientes influyen en el comportamiento de las variables dependientes; a través de la manipulación de las variables independientes se establece el impacto negativo o positivo de la variable dependiente.

### **3.4. Prueba de Hipótesis**

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

H1: Mediante el aislamiento, caracterización e identificación de bacterias rizosféricas del cultivo de papa, no se obtendrán aislados que tengan capacidad de fijar nitrógeno atmosférico *in vitro* y que promuevan el crecimiento de vitroplantas de papa *Solanum tuberosum* L. var. Superchola.

### 3.5. Metodología

#### 3.5.1. Aislar bacterias rizosféricas de plantas de *S. tuberosum* con la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico.

##### 3.5.1.1. Implementación del experimento para la obtención de muestras para el aislamiento de bacterias fijadoras de N atmosférico.

Para el muestreo de suelo de zonas productoras de papa de la provincia de Tungurahua se recolectaron muestras de la rizósfera a 20 cm de profundidad, el muestreo se realizó en zigzag. Luego se colocaron las muestras del suelo en recipientes plásticos de 6 litros y se plantaron los tubérculos de *S. tuberosum* (5 repeticiones por tratamiento), adicionalmente se tuvo un testigo sin suelo (**Figura 1**).



Elaborado por: (Kevin Muñoz, 2024).

**Figura 1.** Diagrama de actividades para el muestreo de suelo de la rizósfera de *S. tuberosum* var. Superchola.

En la **Tabla 2** se detallan las zonas muestreadas para el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico.

**Tabla 2.** Puntos de muestreo de suelo de la provincia de Tungurahua para el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno.

<b>Cantón</b>	<b>Zona</b>	<b>Altitud</b>	<b>UTM</b>
Cantón Quero	Caserío El	3240 m s.n.m	768445.394E
	Placer		9842469.747N
Cantón Mocha	Caserío San	3080 m s.n.m	763496.438E
	Martín		9844945.116N
Cantón Ambato	Sector El	3600 m s.n.m.	742100.098E
	Salado		9858150.686N
Cantón Píllaro	Barrio Santa	3760 m s.n.m.	778047.874E
	Rita		9875903.239N

**Elaborado por:** (Kevin Muñoz, 2024).

### **3.5.1.2. Preparación y plaqueado del medio de cultivo selectivo Jensen.**

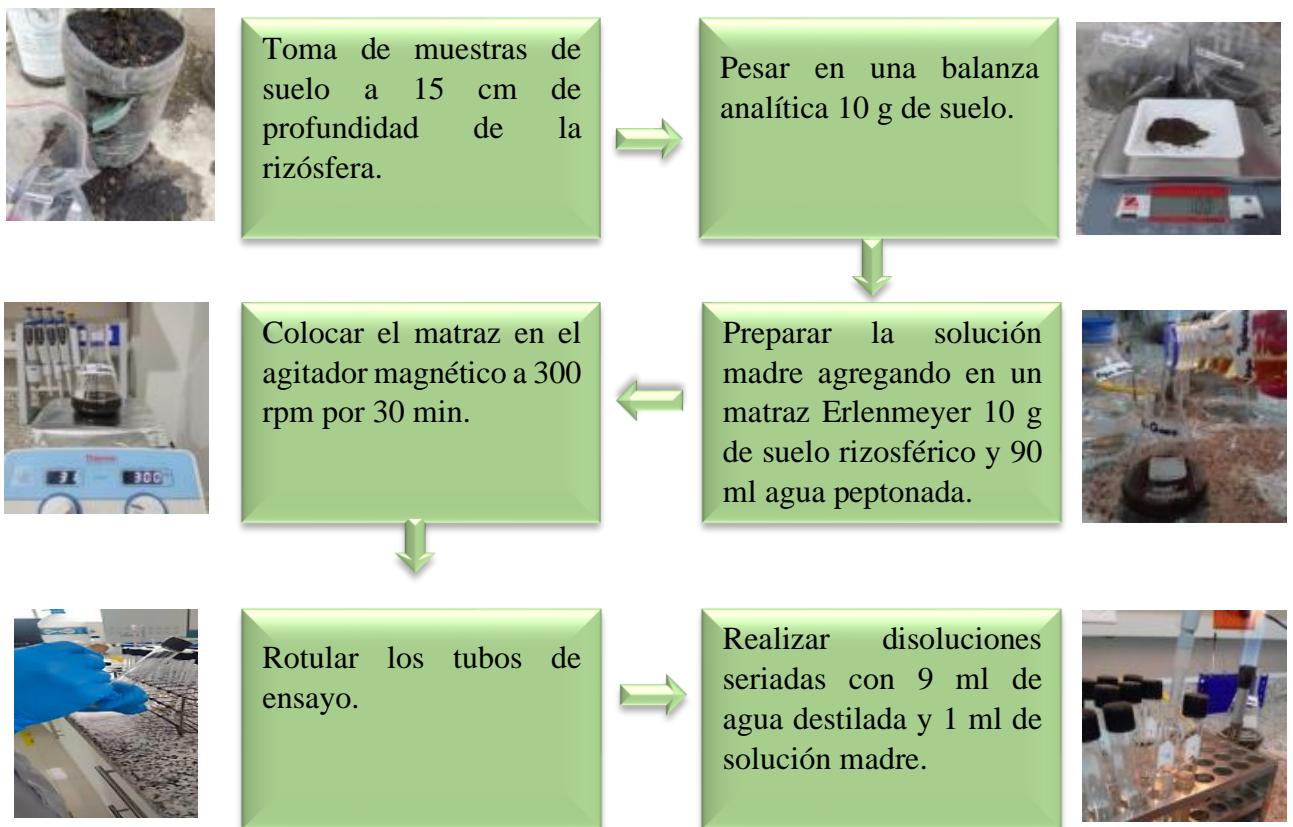
1. Colocar 1000 ml de agua destilada en un vaso de precipitación.
2. Pesar 39,1 g del medio de cultivo Jensen (medio selectivo libre de N).
3. Colocar durante 30 minutos en la plancha de calentamiento a 300 revoluciones por minuto (rpm) elevando de manera gradual la temperatura hasta llegar al punto de ebullición.
4. Colocar el medio en un frasco de vidrio BOECO tapa azul y esterilizar en autoclave.
5. Enfriar y mantener a temperatura de 40 ° C.

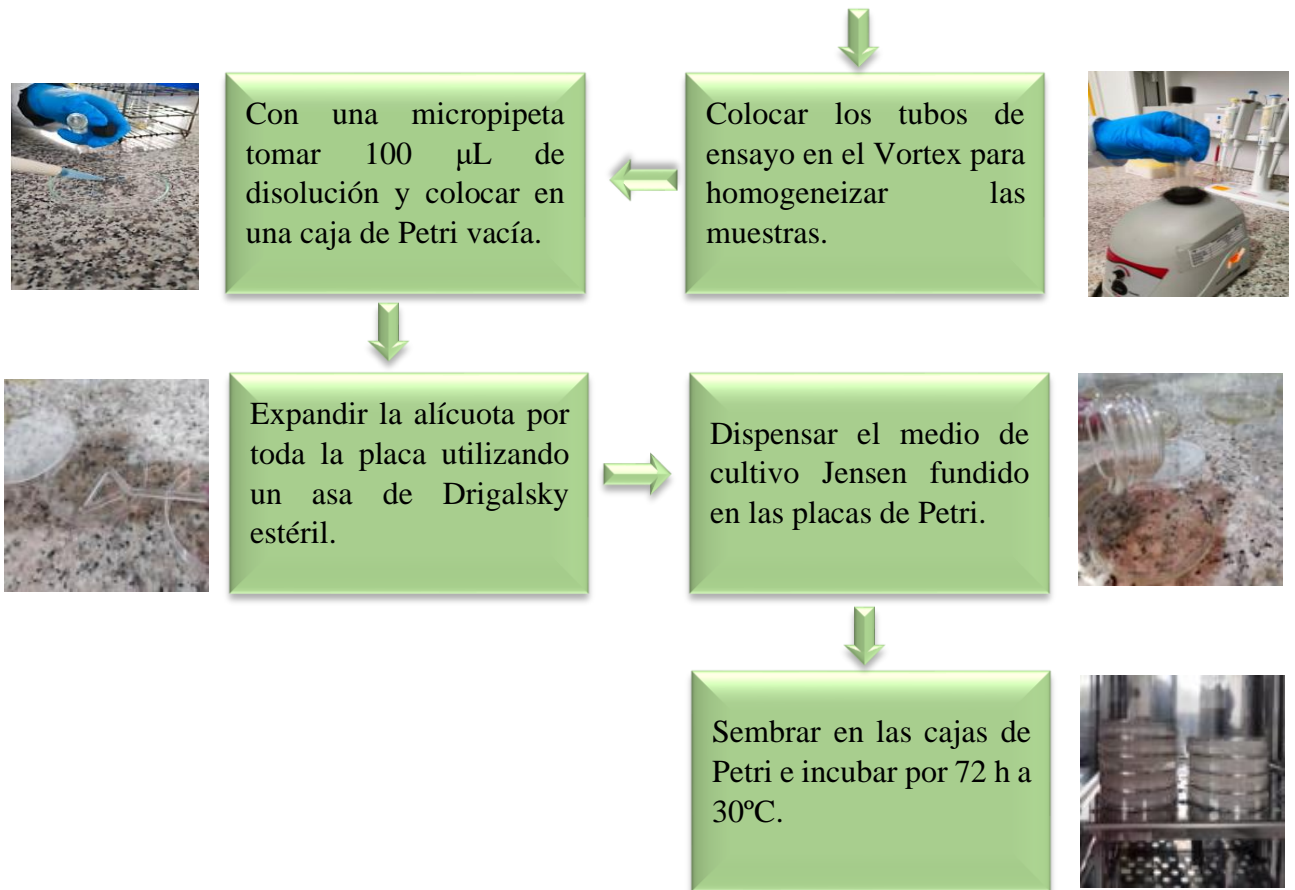
### **3.5.1.3. Aislamiento de bacterias fijadoras de Nitrógeno.**

Se prepararon 45 cajas de Petri, para cada tratamiento se repitió 3 veces y se realizaron disoluciones seriadas de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ , siguiendo el procedimiento:

1. Se recolectaron aproximadamente 1 kg de muestras de la rizosfera de *S. tuberosum* var. Superchola a una profundidad de 15 cm con una espátula de acero inoxidable. Las muestras se colocaron en bolsas selladas herméticamente, etiquetadas y se transportaron al laboratorio en condiciones estériles. El muestreo se realizó durante la época de floración y fueron analizadas por triplicado.

2. En el laboratorio, se utilizó un matraz Erlenmeyer de 250 ml, donde se añadieron 10 g de suelo de la rizósfera y 90 ml de agua peptonada tamponada estéril. Se homogeneizó en un agitador magnético a 300 rpm por 30 min.
3. Se realizó una dilución decimal seriada del suelo, con factores de dilución de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ . Se tomó 1 ml de la suspensión de muestra y se pipeteó en un tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada, repitiendo el proceso hasta llegar a una dilución de  $10^{-6}$ .
4. Se tomaron 100  $\mu$ l de cada factor de dilución y se inoculó en medio Jensen de 20 ml en placas de Petri, utilizando el método de vertido en placa. Las placas se incubaron por 72 h a 30 °C, posteriormente se procedió al conteo de UFC.g<sup>-1</sup> de suelo.
5. Las colonias cultivadas fueron recogidas y purificadas mediante la técnica de siembra por agotamiento en placas que contenían medio Jensen, realizándose durante 8 días a una temperatura de 30 °C con las placas dispuestas en posición invertida. Tras el crecimiento y la purificación de las cepas, se llevaron a cabo la identificación de las características culturales y morfológicas de las colonias de cada aislado después del periodo de incubación de 8 días.



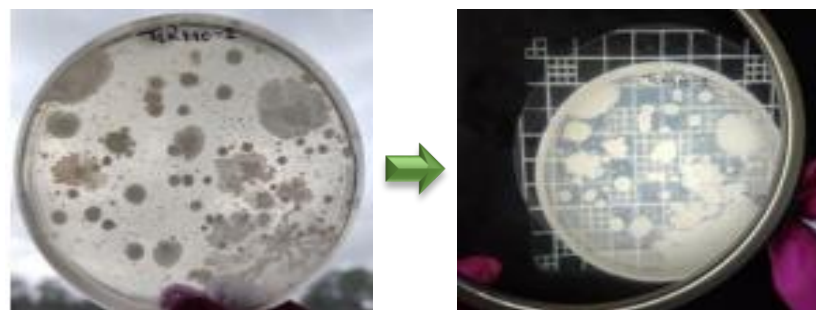


Elaborado por: (Kevin Muñoz, 2024).

**Figura 2.** Diagrama de actividades realizado para el aislamiento de bacterias fijadoras de N de la rizósfera de *S. tuberosum* var. Superchola.

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

Al cabo de 72 horas se realizó el conteo de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) (Figura 3).



Elaborado por: (Kevin Muñoz, 2024).



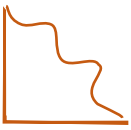







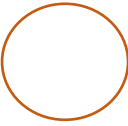


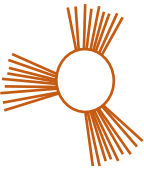

**Figura 3.** Diagrama de la cuantificación de UFC.g<sup>-1</sup> de suelo.

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

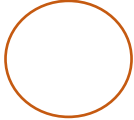


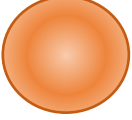




**1.5.2.1. Caracterización cultural de los aislados bacterianos con capacidad de fijar nitrógeno.**

La caracterización cultural de las colonias de los aislados bacterianos se realizó en base a lo establecido por **Breakwell et al. (2007)**, tomando en cuenta el margen, superficie, forma, textura, brillo, consistencia y color (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Características culturales de las colonias de aislados bacterianos.

<b>MARGEN</b>	<b>Entero</b>		<b>Filamentoso</b>		<b>Ondulado</b>	
	<b>Rizado</b>		<b>Lobulado</b>			
<b>SUPERFICIE</b>	<b>Plana</b>		<b>Convexa</b>		<b>Elevada</b>	
	<b>Umbeliforme</b>		<b>Umbilicada</b>			
<b>FORMA</b>	<b>Circular</b>		<b>Rizoide</b>		<b>Fusifforme</b>	
	<b>Filamentosa</b>		<b>Irregular</b>			

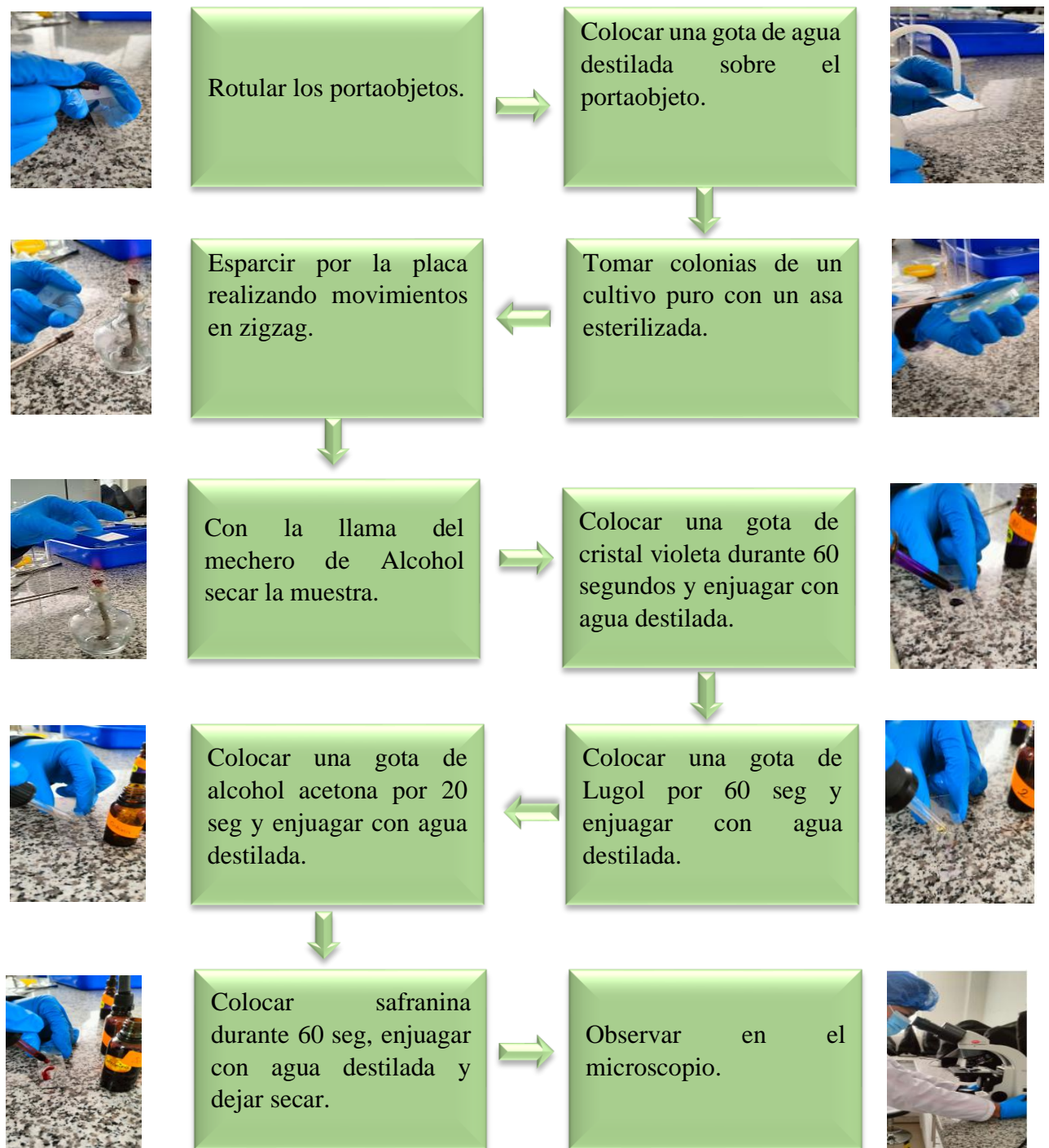


<b>TEXTURA</b>	<b>Lisa</b>		<b>Rugosa</b>			
<b>BRILLO</b>	<b>Sin brillo</b>		<b>Con brillo</b>			
<b>CONSISTENCIA</b>	<b>Suave</b>		<b>Dura</b>		<b>Mucoides</b>	
<b>COLOR</b>	Para identificar el color de las colonias se utilizó un código de color PANTONE.					

**Elaborado por:** (Kevin Muñoz, 2024).

#### 1.5.2.2. Identificación morfológica de las bacterias mediante tinción de Gram.



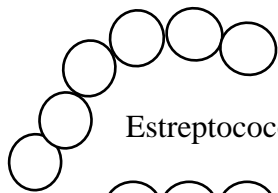
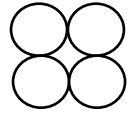
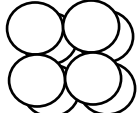
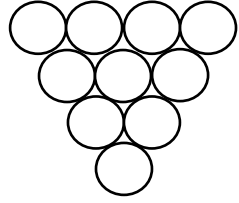




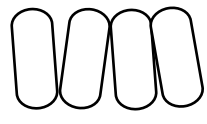
La determinación de la identificación morfológica y agrupación de los aislados bacterianos se llevó a cabo mediante una técnica común en bacteriología, conocida como tinción de Gram, en esta técnica, la reacción de Gram de las bacterias se determina mediante la aplicación de distintos colorantes, una solución mordiente y un disolvente diferenciador, y este proceso está influenciado por la composición química de las paredes celulares de las bacterias. Es importante que las bacterias utilizadas para la tinción de Gram provengan de cultivos jóvenes, donde las células se encuentren en fase de crecimiento exponencial, que generalmente corresponde a un período de incubación de 12 a 24 horas. Para ello se siguió el procedimiento expuesto por **Sáenz (1997)**, el cual se describe en la **Figura 4**.



**Elaborado por:** (Kevin Muñoz, 2024).

**Figura 4.** Diagrama de actividades realizadas para la identificación de la morfología y agrupación bacteriana con Tinción de Gram.

**Tabla 4.** Agrupación de aislados bacterianos.

<b>COCOS</b>	 <p>Coco</p>  <p>Diplococo</p>  <p>Estreptococo</p>  <p>Tétrada</p>  <p>Sarcina</p>  <p>Estafilococo</p>
<b>BACILOS</b>	 <p>Cocobacilo</p>  <p>Bacilo</p>  <p>Diplobacilo</p>  <p>Empalizada</p>  <p>Estreptobacilo</p>

Elaborado por: (Kevin Muñoz, 2024).

### 1.5.3. Determinar la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico *in vitro* de los aislados bacterianos rizosféricos.

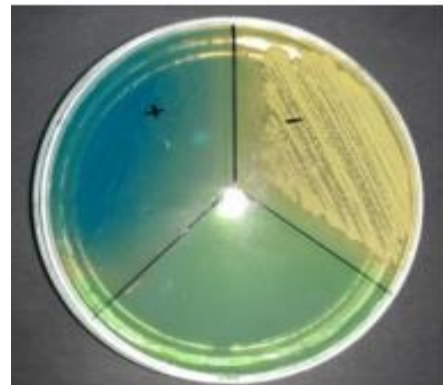
#### 1.5.3.1. Evaluación del potencial de fijación de N atmosférico.

La capacidad de fijación de nitrógeno de las cepas aisladas de la rizosfera de *S. tuberosum* var. Superchola se evaluó utilizando un medio selectivo sin nitrógeno, modificado con un indicador de pH (composición: sacarosa 20,0 g/L,  $K_2HPO_4$  1,0 g/L,  $MgSO_4$  0,5g/L, NaCl 0,5g/L,  $Fe_2SO_4$  0,1g/L,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  0,005 g/L,  $CaCO_3$  2,0 g/L, agar 15,0 g/L), al que se le añadió 5 ml/L de azul de Bromotimol como indicador de color.

1. Como prueba preliminar, cada aislado se sembró por agotamiento en estría en la superficie del medio y se incubó durante 8 días a 30 °C. Se seleccionaron los morfotipos capaces de crecer en el medio, indicando la presencia de bacterias con capacidad para reducir el nitrógeno atmosférico.

2. El cambio de color en el medio, de azul verdoso a azul oscuro, indicó la capacidad de las bacterias para fijar nitrógeno, mientras que el amarillo indicó resultado negativo. Los cambios de color se debieron a la producción de amonio durante la fijación de nitrógeno, observándose mediante el indicador azul de Bromotimol.
3. Las cepas purificadas se inocularon en el medio modificado con azul de bromotimol, y el crecimiento de un halo azul en el medio indicó el potencial de fijación de nitrógeno, según **Habib et al. (2016)**. La medición del diámetro del halo se realizó con un calibrador Vernier.

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



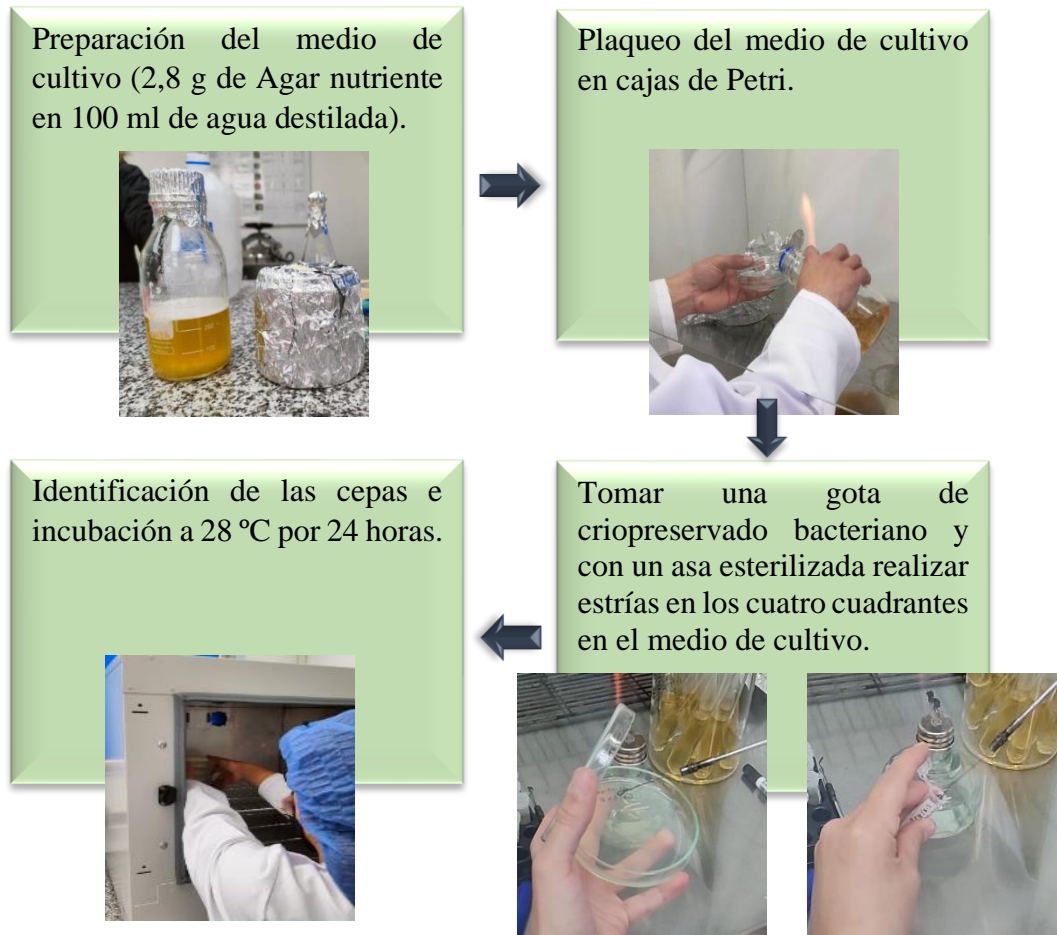
**Elaborado por:** (Kevin Muñoz, 2024).

**Figura 5.** Prueba preliminar para seleccionar bacterias capaces de fijar nitrógeno atmosférico *in vitro*.

#### **1.5.4. Identificar molecularmente los aislados bacterianos rizosféricos mediante la amplificación de los genes 16S rRNA con PCR y secuenciación.**

##### **1.5.4.1. Activación de cepas bacterianas.**

Para la activación de los aislados bacterianos con mayor capacidad de fijación de nitrógeno, se preparó Agar Nutriente en cajas de Petri, en donde se colocó una gota de aislado bacteriano con un asa esterilizada y se procedió a sembrar en estrías, la incubación se realizó por 24 horas a 28 °C (**Figura 6**).



**Elaborado por:** (Kevin Muñoz, 2024).

**Figura 6.** Diagrama de actividades realizadas para la activación de cepas bacterianas en Agar nutriente.

#### 1.5.4.2. Identificación molecular mediante amplificación de los genes 16S rRNA con PCR y amplificación.

- Se realizó la extracción de ADN por métodos convencionales, utilizando aproximadamente 100 mg de muestra.
- Se evaluó la integridad y calidad del ADN mediante espectrofotometría de microvolúmenes y visualización en gel de agarosa.
- Se diluyó el ADN hasta una concentración de aproximadamente 20 ng/uL para su amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los primers 16S: 27F/1492R para bacterias.
- Los productos de PCR fueron purificados previo a la secuenciación por el método SANGER

- Las secuencias obtenidas fueron limpiadas y ensambladas usando el programa bioinformático Geneious.
- Se compararon las secuencias ensambladas de las muestras con la base de datos de nucleótidos de GenBank del NCBI para su identificación taxonómica.



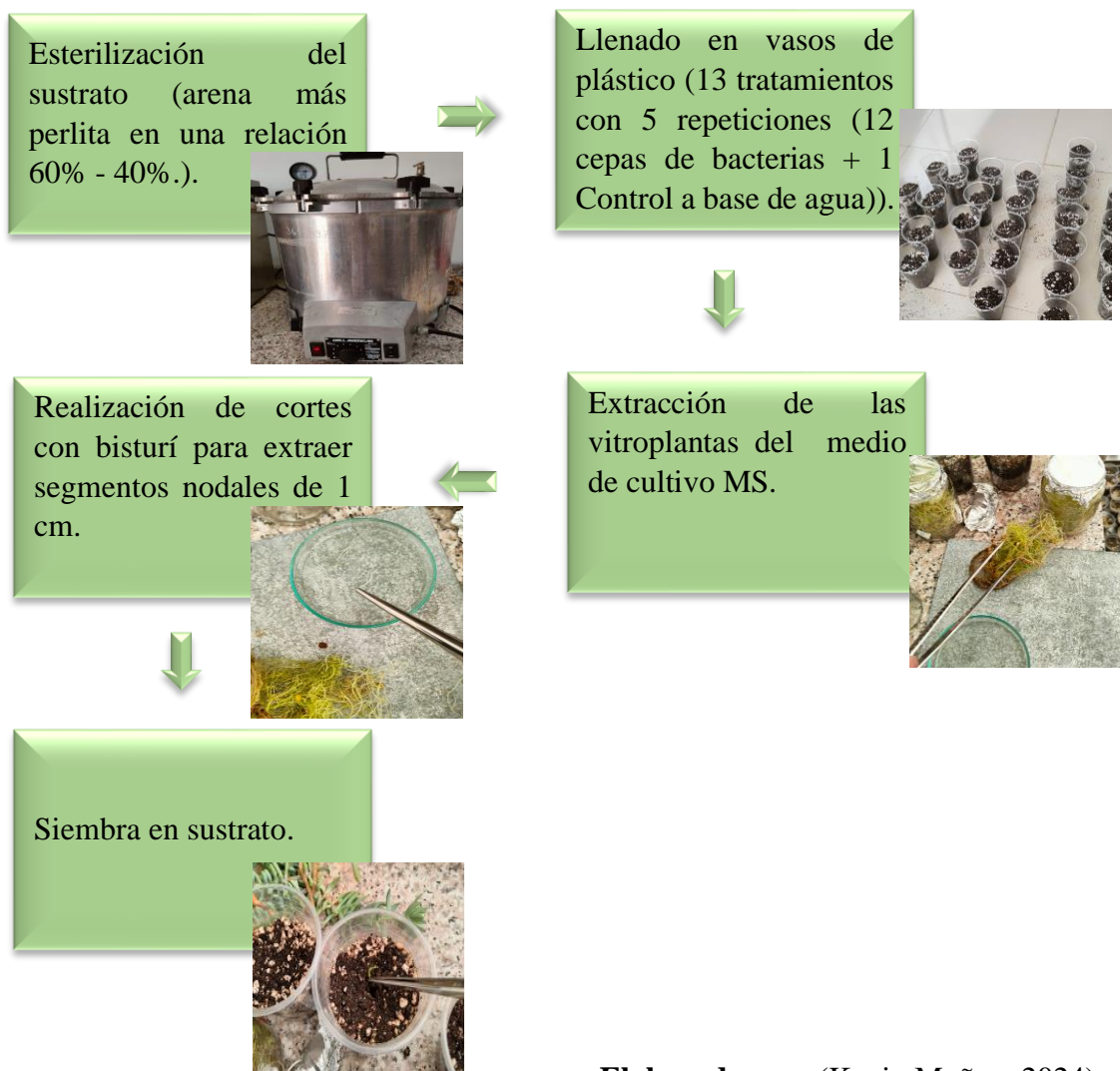
**Elaborado por:** (Kevin Muñoz, 2024).

**Figura 7.** Diagrama de actividades realizadas para la identificación molecular mediante amplificación de los genes 16S rRNA con PCR y amplificación.

**1.5.5. Evaluar el efecto de los aislados bacterianos rizosféricos con capacidad de fijar nitrógeno atmosférico sobre el crecimiento de vitroplantas de papa en invernadero.**

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

Para realizar la plantación de vitroplantas de *S. tuberosum* var. Superchola, se inició esterilizando el sustrato el cual estaba conformado por 60% arena y 40% perlita, se colocó en vasos plásticos de 8 onzas y se humedeció con agua destiladas estéril. Las vitroplantas seleccionadas tenían 2 meses de edad y 10 cm de altura, contenían hojas y yemas activas, fueron extraídas del medio de cultivo y se realizaron cortes de segmentos nodales de 1 cm y se plantaron en el sustrato, acorde a lo detallado en la **Figura 8**.



**Figura 8.** Diagrama de actividades realizadas para la plantación de vitroplantas de *S. tuberosum* en invernadero.

### 1.5.5.2. Activación de cepas bacterianas.

Con el propósito de activar las cepas bacterianas, se elaboró un medio de cultivo BHI (Caldo de Infusión Cerebro Corazón), el cual fue esterilizado mediante autoclave y luego distribuido en tubos de ensayo (10 ml). En una cámara de flujo laminar, utilizando un asa esterilizada, se tomó una gota del aislado bacteriano criopreservado y se inoculó en el medio presente en los tubos de ensayo. Posteriormente, se incubó a 28 °C durante un periodo de 48 horas (**Figura 9**).



Elaborado por: (Kevin Muñoz, 2024).

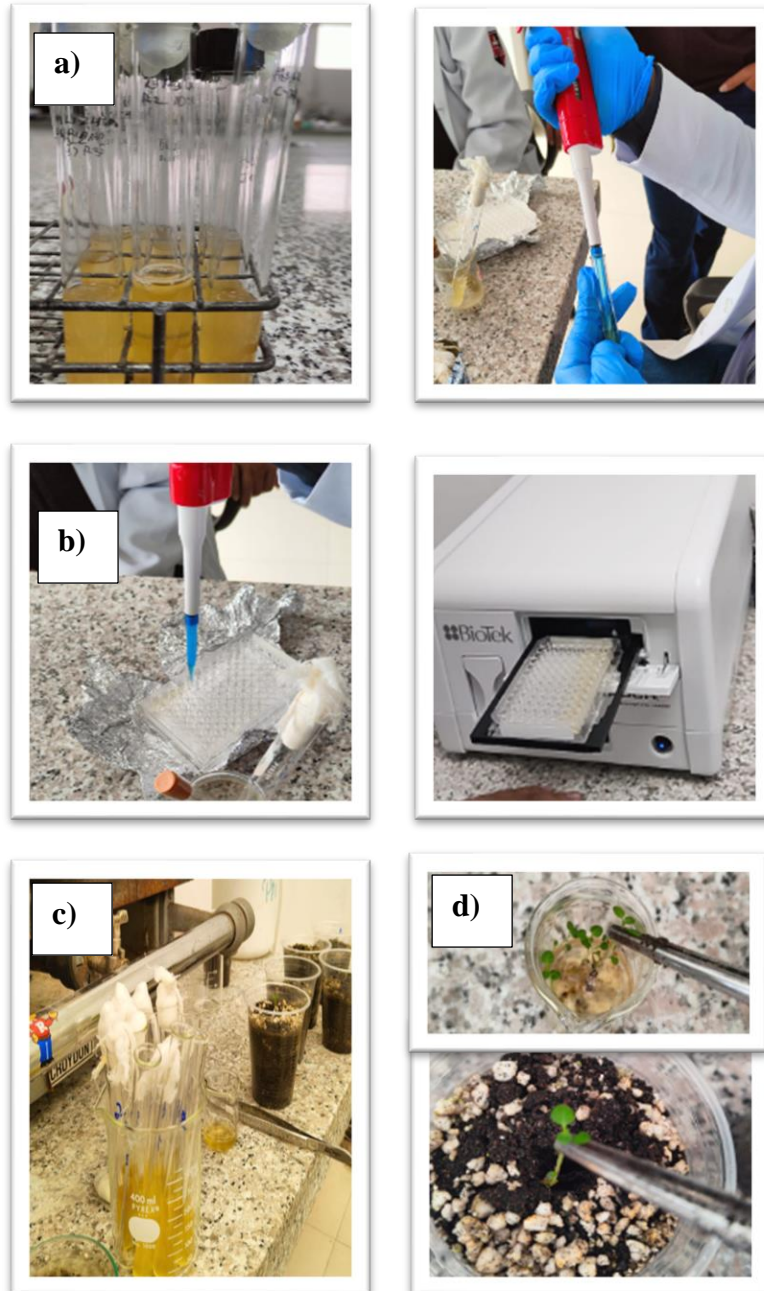
**Figura 9.** Diagrama de actividades realizadas para la activación de cepas bacterianas en medio de cultivo BHI.

### 1.5.5.3. Medición en espectrofotómetro e inoculación de cepas bacterianas en vitroplantas de papa.

- A partir de las cepas bacterianas reconstituidas en medio BHI, e incubadas por 48 horas a una temperatura de 28°C, tomar 100 microlitros de los diferentes tubos de ensayo.



- b) Colocar en una cubeta plástica para espectrofotómetro y llevar a una absorbancia de 0.2 a 600 nm.
- c) A partir de estas suspensiones tomar 10 ml.
- d) Sumergir la raíz de las vitroplantas en cada tratamiento por 30 minutos y plantarlas en los vasos con sustrato.



**Elaborado por:** (Kevin Muñoz, 2024).

**Figura 10.** Diagrama de actividades realizado para la medición de la densidad bacteriana de cada cepa utilizando en espectrofotómetro (Biotek) e inoculación de cepas bacterianas en vitroplantas de papa.

### 3.6. Población o muestra:

Se realizaron 4 tratamientos con relación a las muestras de suelo tomadas en los cantones de la provincia de Tungurahua: Quero (caserío El Placer), Mocha (Caserío San Martín), Ambato (sector El Salado) y Píllaro (barrio Santa Rita) con 5 repeticiones (1 tubérculo de papa sembrado por repetición) = 20 plantas de papas más un testigo sin presencia de Suelo.

De cada tratamiento se tomó el 10% para realizar la evaluación de las variables respuesta.

#### 3.6.1. Tratamientos

**3.6.1.1. Objetivo N° 1:** Aislar bacterias rizosféricas de plantas de *S. tuberosum* con la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico

**Factor N° 1:** Influencia de muestras de suelos de diferentes localidades de la provincia de Tungurahua en el aislamiento de bacterias rizosféricas con la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico de plantas de *S. tuberosum*.

- T1: Muestra de suelo del cantón Quero (caserío El Placer).
- T2: Muestra de suelo del cantón Mocha (caserío San Martín).
- T3: Muestra de suelo del cantón Ambato (sector El Salado).
- T4: Muestra de suelo del cantón Píllaro (barrio Santa Rita).
- C: Control (Sin suelo).

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

**Factor N° 1:** Influencia de muestras de suelo de diferentes localidades de la provincia de Tungurahua en las características culturales de aislados bacterianos con capacidad de fijar nitrógeno atmosférico.

- T1: Aislados bacterianos del cantón Quero (caserío El Placer)
- T2: Aislados bacterianos del cantón Mocha (caserío San Martín).
- T3: Aislados bacterianos del cantón Ambato (sector El Salado).
- T4: Aislados bacterianos del cantón Píllaro (barrio Santa Rita).
- C: Aislados bacterianos del control (Sin suelo) (**Tabla 5**).

**Factor N° 2:** Influencia de muestras de suelo de diferentes localidades de la provincia de Tungurahua en las características morfológicas de aislados bacterianos con capacidad de fijar nitrógeno atmosférico

- T1: Aislados bacterianos del cantón Quero (caserío El Placer)
- T2: Aislados bacterianos del cantón Mocha (caserío San Martín).
- T3: Aislados bacterianos del cantón Ambato (sector El Salado).
- T4: Aislados bacterianos del cantón Píllaro (barrio Santa Rita).
- C: Aislados bacterianos del control (Sin suelo) (**Tabla 5**).

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

<b>AISLADOS BACTERIANOS DE CUATRO LOCALIDADES DE LA PROVINCIA DE TUNGURAHUA</b>	
Cantón Quero (caserío El Placer).	CC-FCAGP-BFN1, CC-FCAGP-BFN2, CC-FCAGP-BFN3, CC-FCAGP-BFN4, CC-FCAGP-BFN5
Cantón Mocha (caserío San Martín).	CC-FCAGP-BFN6, CC-FCAGP-BFN7, CC-FCAGP-BFN8, CC-FCAGP-BFN9, CC-FCAGP-BFN10, CC-FCAGP-BFN11
Cantón Ambato (sector El Salado).	CC-FCAGP-BFN12, CC-FCAGP-BFN13, CC-FCAGP-BFN14, CC-FCAGP-BFN15, CC-FCAGP-BFN16, CC-FCAGP-BFN17, CC-FCAGP-BFN18, CC-FCAGP-BFN19, CC-FCAGP-BFN20, CC-FCAGP-BFN21, CC-FCAGP-BFN22.
Cantón Píllaro (barrio Santa Rita).	CC-FCAGP-BFN23, CC-FCAGP-BFN24, CC-FCAGP-BFN25, CC-FCAGP-BFN26, CC-FCAGP-BFN27, CC-FCAGP-BFN28, CC-FCAGP-BFN29, CC-FCAGP-BFN30, CC-FCAGP-BFN31, CC-FCAGP-BFN32, CC-FCAGP-BFN33, CC-FCAGP-BFN34, CC-FCAGP-BFN35.
Control (Sin suelo).	CC-FCAGP-BFN36, CC-FCAGP-BFN37, CC-FCAGP-BFN38.

**Elaborado por:** (Kevin Muñoz, 2024).

**3.6.1.3. Objetivo N° 3:** Determinar la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico *in vitro* de los aislados bacterianos rizosféricos.

**Factor N° 1:** Influencia de muestras de suelo de diferentes localidades de la provincia de Tungurahua en el tamaño de los halos de solubilización e índice de fijación de nitrógeno atmosférico de aislados bacterianos con capacidad de fijar nitrógeno atmosférico.

- T1: Aislados bacterianos del cantón Quero (caserío El Placer).
- T2: Aislados bacterianos del cantón Mocha (caserío San Martín).

- T3: Aislados bacterianos del cantón Ambato (sector El Salado).
- T4: Aislados bacterianos del cantón Píllaro (barrio Santa Rita).
- C: Aislados bacterianos del control (Sin suelo) (**Tabla 5**).

**3.6.1.4. Objetivo N° 4:** Identificar molecularmente los aislados bacterianos rizosféricos mediante la amplificación de los genes 16S rRNA con PCR y secuenciación.

**Factor N° 1:** Identificación molecular de los aislados bacterianos con mayor capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico mediante amplificación 16S rRNA.

**Tabla 6.** Aislados bacterianos con mayor capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico.

<b> AISLADOS BACTERIANOS CON MAYOR CAPACIDAD DE FIJACIÓN DE NITRÓGENO ATMOSFÉRICO </b>
CC-FCAGP-BFN1
CC-FCAGP-BFN16
CC-FCAGP-BFN14
CC-FCAGP-BFN24

**Elaborado por:** (Kevin Muñoz, 2024).

**3.6.1.5. Objetivo N° 5:** Evaluar el efecto de los aislados bacterianos rizosféricos con capacidad de fijar nitrógeno atmosférico sobre el crecimiento de vitroplantas de papa en invernadero.

**Factor N° 1:** Efecto de la inoculación de cepas bacterianas rizosféricas con capacidad de fijación de N<sub>2</sub> en sustrato de arena más perlita sobre el área foliar de vitroplantas de *S. tuberosum* var. Superchola establecidas en invernadero (**Tabla 7**).

**Factor N° 2:** Efecto de la inoculación de cepas bacterianas rizosféricas con capacidad de fijación de N<sub>2</sub> en sustrato de arena más perlita sobre la masa fresca de vitroplantas de *S. tuberosum* var. Superchola en invernadero (**Tabla 7**).

**Factor N° 3:** Efecto de la inoculación de cepas bacterianas rizosféricas con capacidad de fijación de N<sub>2</sub> en sustrato de arena más perlita sobre la masa seca de vitroplantas de *S. tuberosum* var. Superchola en invernadero (**Tabla 7**).

**Factor N° 4:** Efecto de la inoculación de cepas bacterianas rizosféricas con capacidad de fijación de N<sub>2</sub> en sustrato de arena más perlita sobre el índice de área foliar de vitroplantas de *S. tuberosum* var. Superchola en invernadero (**Tabla 7**).

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

<b>CEPAS BACTERIANAS INOCULADAS EN VITROPLANTAS DE papa var. Superchola.</b>
CC-FCAGP-BFN15
CC-FCAGP-BFN33
CC-FCAGP-BFN35
CC-FCAGP-BFN3
CC-FCAGP-BFN22
CC-FCAGP-BFN29
CC-FCAGP-BFN20
CC-FCAGP-BFN9
CC-FCAGP-BFN24
CC-FCAGP-BFN16
CC-FCAGP-BFN14
CC-FCAGP-BFN1
Control

**Elaborado por:** (Kevin Muñoz, 2024).

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

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

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

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

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

#### **Aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico.**

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

**Características culturales de las colonias de los aislados bacterianos con capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico.**

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

**Características morfológicas de los aislados bacterianos con capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico.**

- Morfología, agrupación y Reacción de Gram.

**Capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico de rizobacterias.**

- Tamaño zona de coloración y de colonia.

**Géneros y especies de las bacterias con mayor capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico.**

- Especies de los 4 aislados bacterianos.

**Características morfofisiológicas de vitroplantas de papa.**

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

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Aislamiento de bacterias rizosféricas de plantas de *S. tuberosum* con la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico.

##### 4.1.1. Influencia de muestras de suelo de cuatro localidades de la provincia de Tungurahua sobre la cantidad de UFC. g<sup>-1</sup> de suelo de la rizósfera de *S. tuberosum*.

A las 72 horas de incubación de los tratamientos en medio Jensen libre de nitrógeno, se observó que la muestra del barrio Santa Rita del Cantón Píllaro fue la que obtuvo la mayor cantidad de Unidades Formadoras de Colonias por gramo de suelo ( $9,08 \times 10^9$  UFC. g<sup>-1</sup> de suelo) a comparación con las muestras de las otras localidades (**Tabla 8**).

**Tabla 8.** Comparación de la cantidad de UFC por gramo de suelo de la rizósfera de *S. tuberosum* de diferentes localidades de la provincia de Tungurahua en medio Jensen libre de nitrógeno.

TRATAMIENTOS	UFC. g <sup>-1</sup>	Rango
Cantón Píllaro (barrio Santa Rita)	$9,08 \times 10^9$	A
Cantón Quero (caserío El Placer)	$5,46 \times 10^6$	B
Cantón Ambato (sector El Salado)	$4,92 \times 10^6$	B
Cantón Mocha (caserío San Martín)	$1,99 \times 10^6$	B
Control (Sin suelo).	$9,52 \times 10^5$	B

**Elaborado por:** (Kevin Muñoz, 2024).

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

Los microorganismos del suelo son abundantes y son responsables de impulsar el ciclo de nutrientes y materia orgánica, la fertilidad y restauración del suelo, la salud de las plantas y la producción primaria del ecosistema (**Marciano et al., 2017**). Según **Widdig et al. (2019)**, existen varios factores tanto físicos, químicos o mecánicos que determinan el contenido de UFC/g entre ellos están el contenido de materia orgánica, el tipo de labranza, si existe o no rotación de cultivos, el pH, la temperatura, el contenido de sal, disponibilidad de carbono y los metales pesados, entre otros.

**Paucar et al. (2016)** tomaron muestras de suelos de los Andisoles del Departamento de Antioquia, Colombia y observaron que los suelos vírgenes contenían mayor cantidad de población bacteriana, 9 (UFC/g<sup>-1</sup> de suelo) a comparación de los suelos con labranza de 10 y 20 años con 3 UFC/g<sup>-1</sup> de suelo.

En Manabí, Ecuador en los suelos de origen Aluvial y Vertic se encontró mayor población en los arrozales con 8.11 x 10<sup>4</sup> UFC/g<sup>-1</sup> de suelo y una menor población en los sistemas agroforestales de café con 1,97 x 10<sup>4</sup> UFC/g<sup>-1</sup> de suelo (**Barrezueta et al., 2020**). Mientras que **Díaz (2017)**, encontró bacterias en los suelos de la sierra ecuatoriana (2,30 x 10<sup>6</sup> UFC/g<sup>-1</sup> de suelo) y hongos con 2,71 x 10<sup>4</sup> UFC.g<sup>-1</sup> de suelo. Sin embargo, en la presente investigación se obtuvieron 9,08 x 10<sup>9</sup> UFC.g<sup>-1</sup> de suelo en una de las zonas más productoras de papa del Cantón Píllaro provincia de Tungurahua.

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

##### **4.2.1. Caracterización cultural de las colonias y morfología de los aislados bacterianos de diferentes localidades de la provincia de Tungurahua.**

A los 8 días de incubación de los aislados bacterianos se presentaron las siguientes características culturales en las colonias:

En el caserío El Placer – Cantón Quero, por la superficie, el 20% fueron planas, 20% convexas, 20% elevadas, 20% umbiliformes y 20% umbilicadas; por su forma, el 60% fueron irregulares, 20% circulares y el 20% fusiformes; por su margen, el 40% fueron enteros, 20% lobulados y el 40% tuvo márgenes rizados; por su consistencia, el 40% fueron mucoides y el 60% suaves; por su textura, el 40% fueron rugosas y el 60% lisas; por su brillo, el 20% no presentaron brillo y el 80% fueron brillantes.

En el caserío San Martín – Cantón Mocha, por la superficie, el 33% fueron planas, 33% convexas, 17% umbilicadas y 17% elevadas; por su forma, el 17% fueron circulares, 33% irregulares y el 50% fusiformes; por su margen, el 33% fueron lobulados y el 67% márgenes enteros; por su consistencia, el 17% fueron mucoides y el 83% suaves; por su textura, el 100% fueron lisas; por su brillo, 100% presentaron brillo.



En el sector El Salado – Cantón Ambato, por la superficie, el 9% fueron umbilicadas, 9% elevadas, 27% convexas y 64% planas; por su forma, el 9% fueron irregulares, 36% fusiformes y el 55% circulares; por su margen, el 9% fueron lobulados y el 91% presentó márgenes enteros; por su consistencia, el 18% fueron duras y el 82% suaves; por su textura, el 100% fueron lisas; por su brillo, el 100% mostraron brillo.

En el barrio Santa Rita – Cantón Píllaro, por la superficie, el 8% fueron umbilicadas, 23% elevadas, 31% convexas y 38% planas; por su forma, el 46% fueron circulares y el 54% fusiformes; por su margen, el 100% presentó márgenes enteros; por su consistencia, el 8% fueron duras, el 8% duras y el 85% suaves; por su textura, el 23% fueron rugosas y el 77% fueron lisas; por su brillo, 8% no tuvieron brillo y el 92% fueron brillantes.

En el tratamiento Control (sin suelo), por la superficie, el 33% fueron umbilicadas, 33% planas y 33% convexas; por su forma, el 33% fueron fusiformes y el 67% circulares; por su margen, el 100% presentó márgenes enteros; por su consistencia, el 100% fueron suaves; por su textura, el 100% fueron lisas; por su brillo, el 100% mostraron brillo.

Acorde con la **Tabla 9** y **Figura 11**.

**Tabla 9.** Caracterización cultural de las colonias de los aislados bacterianos de diferentes localidades de la provincia de Tungurahua en medio Jensen libre de nitrógeno.

AISLADOS BACTERIANOS		CARACTERÍSTICAS CULTURALES						
		Superficie	Forma	Margen	Consistencia	Textura	Brillo	Código Pantone
Cantón Quero - caserío El Placer	CC-FCAGP-BFN1	PL	IRR	LB	SV	LS	Br	#e6ee9c
	CC-FCAGP-BFN2	EL	IRR	RI	SV	RG	Br	#d4e157
	CC-FCAGP-BFN3	CN	IRR	RI	MC	LS	Br	#cddc39
	CC-FCAGP-BFN4	UMF	CR	EN	MC	RG	Sb	#c5e1a5
	CC-FCAGP-BFN5	UMC	FS	EN	SV	LS	Br	#f0f4c3

<b>Cantón Mocha - caserío San Martín</b>	<b>CC-FCAGP-BFN6</b>	CN	FS	EN	MC	LS	Br	#c5e1a5
	<b>CC-FCAGP-BFN7</b>	CN	FS	EN	SV	LS	Br	#f5f5f5
	<b>CC-FCAGP-BFN8</b>	EL	IRR	LB	SV	LS	Br	#f0f4c3
	<b>CC-FCAGP-BFN9</b>	UMC	FS	EN	SV	LS	Br	#f9fbe7
	<b>CC-FCAGP-BFN10</b>	PL	IRR	LB	SV	LS	Br	#f9fbe7
	<b>CC-FCAGP-BFN11</b>	PL	CR	EN	SV	LS	Br	#c5e1a5
<b>Cantón Ambato – sector El Salado</b>	<b>CC-FCAGP-BFN12</b>	CN	FS	EN	DR	LS	Br	#afb42b
	<b>CC-FCAGP-BFN13</b>	PL	CR	EN	SV	LS	Br	#d4e157
	<b>CC-FCAGP-BFN14</b>	PL	CR	EN	SV	LS	Br	#a5d6a7
	<b>CC-FCAGP-BFN15</b>	CN	FS	EN	SV	LS	Br	#fff8e1
	<b>CC-FCAGP-BFN16</b>	PL	CR	EN	SV	LS	Br	#f9fbe7
	<b>CC-FCAGP-BFN17</b>	PL	FS	EN	SV	LS	Br	#9ccc65
	<b>CC-FCAGP-BFN18</b>	PL	CR	EN	SV	LS	Br	#efebe9
	<b>CC-FCAGP-BFN19</b>	UMC	CR	EN	SV	LS	Br	#a5d6a7
	<b>CC-FCAGP-BFN20</b>	PL	CR	EN	SV	LS	Br	#ffeE1
	<b>CC-FCAGP-BFN21</b>	PL	FS	EN	DR	LS	Br	#fafafa
	<b>CC-FCAGP-BFN22</b>	EL	IRR	LB	SV	LS	Br	#bcaaa4
<b>Cantón Píllaro - barrio Santa Rita</b>	<b>CC-FCAGP-BFN23</b>	CN	CR	EN	SV	LS	Br	#f5f5f5
	<b>CC-FCAGP-BFN24</b>	PL	FS	EN	SV	RG	Br	#e8f5e9
	<b>CC-FCAGP-BFN25</b>	EL	FS	EN	SV	RG	Br	#fff8e1
	<b>CC-FCAGP-BFN26</b>	PL	FS	EN	SV	LS	Br	#fff9c4
	<b>CC-FCAGP-BFN27</b>	CN	CR	EN	MC	LS	Br	#f5f5f5
	<b>CC-FCAGP-BFN28</b>	PL	CR	EN	SV	LS	Sb	#dbc2a9
	<b>CC-FCAGP-BFN29</b>	EL	CR	EN	SV	LS	Br	#cddc39
	<b>CC-FCAGP-BFN30</b>	CN	FS	EN	SV	RG	Br	#dcedc8
	<b>CC-FCAGP-BFN31</b>	CN	FS	EN	SV	LS	Br	#dce775
	<b>CC-FCAGP-BFN32</b>	UMC	CR	EN	SV	LS	Br	#dbd069
	<b>CC-FCAGP-BFN33</b>	EL	FS	EN	SV	LS	Br	#e0e0e0
	<b>CC-FCAGP-BFN34</b>	PL	CR	EN	SV	LS	Br	#d4e157
	<b>CC-FCAGP-BFN35</b>	PL	FS	EN	SV	LS	Br	#917234
<b>Control (Sin suelo)</b>	<b>CC-FCAGP-BFN36</b>	CN	CR	EN	SV	LS	Br	#f9fbe7
	<b>CC-FCAGP-BFN37</b>	PL	CR	EN	SV	LS	Br	#64dd17
	<b>CC-FCAGP-BFN38</b>	UMC	FS	EN	SV	LS	Br	#e6ee9c

**Elaborado por:** (Kevin Muñoz, 2024).

Descripción: Superficie: Plano (PL), Convexa (CN), Elevada (EL), Umbiliforme (UMF), Umbilicada (UMC). Forma: Circular (CR), Fusiforme (FS), Rizoide (RZ), Filamentosa (FL), Irregular (IRR). Margen: Entero (EN), Rizoide (RZ), Filamentoso

(FM), Ondulado (ON), Lobulado (LB), Rizado (RI). Consistencia: Suave (SV), Duro (DR), Mucoide (MC). Textura: Lisa (LS), Rugosa (RG). Brillo: con brillo (Br), sin brillo (Sb).

Para la caracterización cultural de las colonias de los aislados bacterianos se consideraron: superficie, forma, margen, consistencia, textura, brillo y color como se observa en la **Figura 11**.



**Elaborado por:** (Kevin Muñoz, 2024).

**Figura 11.** Caracterización cultural de las colonias de los aislados bacterianos.

Respecto a la morfología de los aislados bacterianos, se presentaron las siguientes características:

En el caserío El Placer – Cantón Quero, respecto a la reacción de Gram, el 20% fueron bacterias Gram (+) y el 80% bacterias Gram (-); por la morfología, el 20% fueron cocos y el 80% bacilos; por su agrupación, el 20% fueron empalizadas, 20% cocobacilos y el 40% diplobacilos.

En el caserío San Martín – Cantón Mocha, respecto a la reacción de Gram, el 100% fueron bacterias Gram (-); por la morfología, el 100% fueron bacilos; por su agrupación, el 17% sin agrupación, 33% empalizadas y el 50% diplobacilos.

En el sector El Salado – Cantón Ambato, respecto a la reacción de Gram, el 18% fueron bacterias Gram (+) y el 82% bacterias Gram (-); por la morfología, el 100% fueron bacilos; por su agrupación, el 9% sin agrupación, 9% empalizadas, 27% diplobacilos y el 55% estreptobacilos.

En el barrio Santa Rita – Cantón Píllaro, respecto a la reacción de Gram, el 23% fueron bacterias Gram (+) y el 77% bacterias Gram (-); por la morfología, el 8% fueron cocos

y el 92% bacilos; por su agrupación, el 8% fueron diplococos, 8% empalizadas, 15% sin agrupación, 31% estreptobacilos y el 38% diplobacilos.

En el tratamiento Control (sin suelo), respecto a la reacción de Gram, el 100% fueron bacterias Gram (-); por la morfología, el 100% fueron bacilos; por su agrupación, el 33% fueron estreptobacilos, 33% diplobacilos y el 33% empalizadas.

Acorde con lo detallado en la **Tabla 10** y **Figura 12**.

**Tabla 10.** Caracterización cultural de las colonias de los aislados bacterianos de diferentes localidades de la provincia de Tungurahua en medio Jensen libre de nitrógeno.

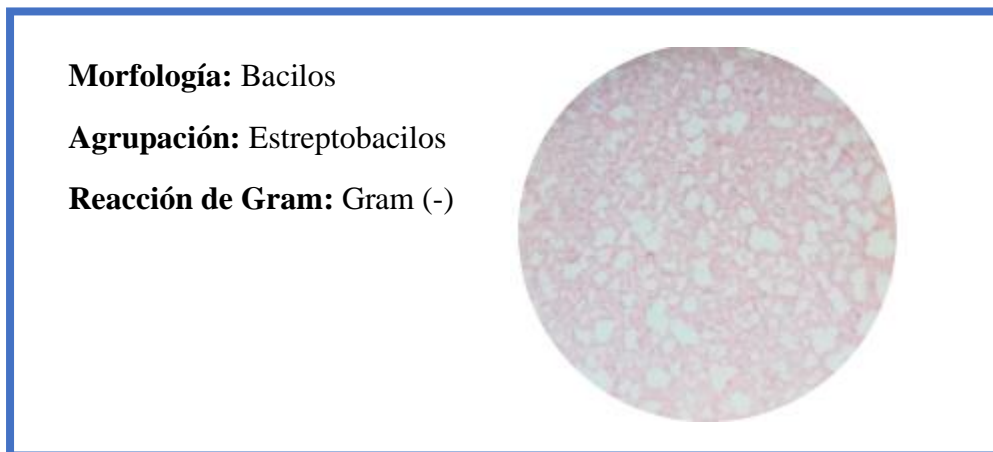
AISLADOS BACTERIANOS		CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
		Morfología	Agrupación	Reacción de Gram
Cantón Quero - caserío El Placer	CC-FCAGP-BFN1	B	DB	(-)
	CC-FCAGP-BFN2	B	CB	(-)
	CC-FCAGP-BFN3	C	SRC	(+)
	CC-FCAGP-BFN4	B	DB	(-)
	CC-FCAGP-BFN5	B	EMP	(-)
Cantón Mocha - caserío San Martín	CC-FCAGP-BFN6	B	DB	(-)
	CC-FCAGP-BFN7	B	DB	(-)
	CC-FCAGP-BFN8	B	EMP	(-)
	CC-FCAGP-BFN9	B	DB	(-)
	CC-FCAGP-BFN10	B	b	(-)
	CC-FCAGP-BFN11	B	EMP	(-)
Cantón Ambato – sector El Salado	CC-FCAGP-BFN12	B	EMP	(-)
	CC-FCAGP-BFN13	B	ES	(-)
	CC-FCAGP-BFN14	B	DB	(-)
	CC-FCAGP-BFN15	B	ES	(-)
	CC-FCAGP-BFN16	B	ES	(-)
	CC-FCAGP-BFN17	B	ES	(-)
	CC-FCAGP-BFN18	B	ES	(-)
	CC-FCAGP-BFN19	B	DB	(-)
	CC-FCAGP-BFN20	B	b	(-)

Cantón Píllaro - barrio Santa Rita	CC-FCAGP-BFN21	B	ES	(+)
	CC-FCAGP-BFN22	B	DB	(+)
	CC-FCAGP-BFN23	B	DB	(-)
	CC-FCAGP-BFN24	B	DB	(-)
	CC-FCAGP-BFN25	B	b	(-)
	CC-FCAGP-BFN26	B	DB	(-)
	CC-FCAGP-BFN27	B	DB	(+)
	CC-FCAGP-BFN28	C	c	(+)
	CC-FCAGP-BFN29	B	ES	(-)
	CC-FCAGP-BFN30	B	ES	(+)
	CC-FCAGP-BFN31	B	ES	(-)
	CC-FCAGP-BFN32	B	EMP	(-)
	CC-FCAGP-BFN33	B	ES	(-)
	CC-FCAGP-BFN34	B	DB	(-)
	CC-FCAGP-BFN35	B	b	(-)
Control (Sin suelo)	CC-FCAGP-BFN36	B	DB	(-)
	CC-FCAGP-BFN37	B	ES	(-)
	CC-FCAGP-BFN38	B	EMP	(-)

**Elaborado por:** (Kevin Muñoz, 2024).

**Descripción:** Morfología: Bacilos (B), Cocos (C). Agrupación: Cocobacilo (CB), Bacilo (b), Empalizada (EMP), Estreptobacilo (ES), Diplobacilo (DB), Coco (c), Diplococo (DC), Estreptococo (ESC), Sarcina (SRC), Tetrada (TTR).

Para la caracterización morfológica de los aislados bacterianos se tomaron en cuenta: morfología, agrupación y reacción de Gram, como se observa en la **Figura 12**.



**Elaborado por:** (Kevin Muñoz, 2024).

**Figura 12.** Caracterización morfológica de aislados bacterianos.

Muchas de las especies bacterianas tienen un alto potencial biotecnológico. Su biodiversidad se utiliza para muchos fines, especialmente en el sector agrícola, como el control biológico de plagas y vectores de enfermedades, promoción del crecimiento de las plantas y producción de sustancias químicas (Pérez et al., 2019). Debido a la multiplicidad funcional de estas bacterias, en los últimos años se ha incrementado el interés en el crecimiento y producción de especies bacterianas de este género, principalmente para aplicación directa en cultivos (Sánchez et al., 2018).

Métodos de identificación considerados dependientes del cultivo, que incluyen los análisis morfológicos de las colonias, tinción de Gram y observaciones microscópicas, para verificar la producción de endosporas e inclusiones proteicas, así como el uso de pruebas bioquímicas y fisiológicas, se convirtieron en herramientas eficaces, que pueden ser realizadas de manera fácil y accesible por los agricultores, las cuales pueden ayudarlos a establecer un plan de control de calidad eficiente (Rocha et al., 2023).

#### 4.3. Evaluación de la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico *in vitro* de los aislados bacterianos rizosféricos.

Al evaluar el diámetro de halo azul de los aislados bacterianos de la rizosfera de *S. tuberosum* var. Superchola, el aislado perteneciente al caserío El Placer – Cantón Quero CC-FCAGP-BFN1 presentó el mayor valor para esta variable y no tuvo diferencia estadísticamente significativa con los aislados CC-FCAGP-BFN14, CC-FCAGP-BFN16 del cantón Ambato (sector El Salado) y CC-FCAGP-BFN24 del cantón Píllaro (barrio Santa Rita), a comparación con el aislado CC-FCAGP-BFN15 del cantón Ambato (sector El Salado) el cual tuvo la menor capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico (Tabla 11 y Figura 13).

**Tabla 11.** Capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico *in vitro* de diferentes aislados bacterianos de la rizosfera de *S. tuberosum* var. Superchola en el medio Jensen modificado.

AISLADOS BACTERIANOS	Zona de coloración (mm)	Rango promedio
CC-FCAGP-BFN1	10,1020	10,10 a
CC-FCAGP-BFN16	9,1860	9,19 ab
CC-FCAGP-BFN14	9,4380	9,44 ab

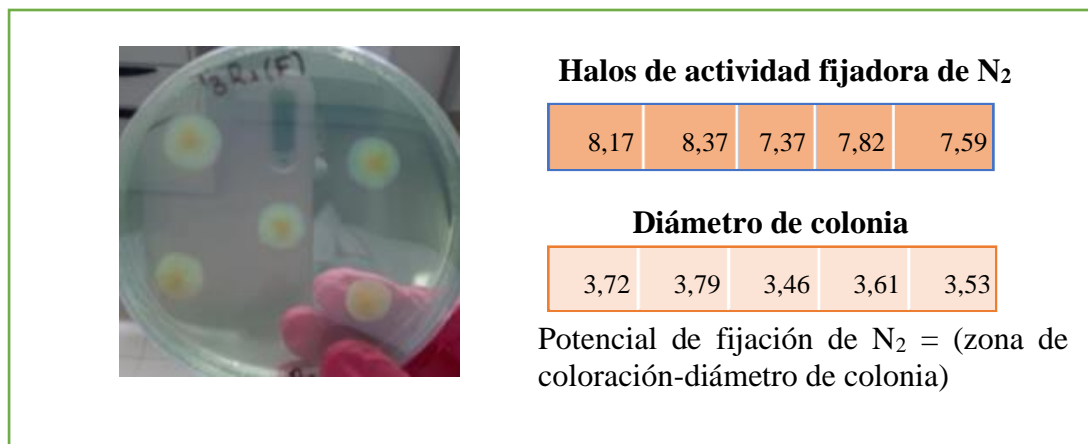
CC-FCAGP-BFN24	8,6220	8,62 abc
CC-FCAGP-BFN21	8,0980	8,10 bcd
CC-FCAGP-BFN2	7,5680	7,57 bcde
CC-FCAGP-BFN23	7,7040	7,70 bcde
CC-FCAGP-BFN27	6,9200	6,92 cdef
CC-FCAGP-BFN36	7,0240	7,02 cdef
CC-FCAGP-BFN31	7,0620	7,06 cdef
CC-FCAGP-BFN25	7,1120	7,11 cdef
CC-FCAGP-BFN38	6,7580	6,76 cdefg
CC-FCAGP-BFN28	6,7720	6,77 cdefg
CC-FCAGP-BFN37	6,7160	6,72 defg
CC-FCAGP-BFN30	6,3600	6,36 defgh
CC-FCAGP-BFN9	5,8740	5,87 efghi
CC-FCAGP-BFN5	5,8800	5,88 efghi
CC-FCAGP-BFN6	5,9000	5,90 efghi
CC-FCAGP-BFN20	5,8160	5,82 efghij
CC-FCAGP-BFN22	5,4160	5,42 fghijk
CC-FCAGP-BFN29	5,6080	5,61 fghijk
CC-FCAGP-BFN34	4,8880	4,89 ghijkl
CC-FCAGP-BFN18	4,9660	4,97 ghijkl
CC-FCAGP-BFN19	4,7260	4,73 hijklm
CC-FCAGP-BFN26	4,7380	4,74 hijklm
CC-FCAGP-BFN7	4,4020	4,40 ijklm
CC-FCAGP-BFN11	3,9600	3,96 jklmn
CC-FCAGP-BFN4	3,9640	3,96 jklmn
CC-FCAGP-BFN12	3,7880	3,79 klmn
CC-FCAGP-BFN17	3,8500	3,85 klmn
CC-FCAGP-BFN13	3,4720	3,47 lmn
CC-FCAGP-BFN10	3,3380	3,34 lmnñ
CC-FCAGP-BFN8	3,1400	3,14 lmnño
CC-FCAGP-BFN32	2,9120	2,91 mnño
CC-FCAGP-BFN35	2,3600	2,36 ño
CC-FCAGP-BFN3	2,4680	2,47 ño

CC-FCAGP-BFN33	1,5080	1,51 ño
CC-FCAGP-BFN15	1,4400	1,44 o

**Elaborado por:** (Kevin Muñoz, 2024).

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

El tamaño de los halos de actividad fijadora de nitrógeno atmosférico y diámetro de colonia de cada aislado bacteriano se detalla en la **Figura 13**.



**Elaborado por:** (Kevin Muñoz, 2024).

**Figura 13.** Halos de actividad fijadora de Nitrógeno y diámetro de colonia de los aislados bacterianos.

**Sulistiyani y Meliah (2017)** identificaron bacterias que se desarrollaron en el medio Jensen, estas poseen capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico y observaron el cambio de color del medio que fue modificado con el azul de bromotimol de verde a azul o a su vez la aparición de una coloración alrededor de las colonias, esto debido a la producción de amonio, y es la medida del potencial nitro fijador que poseen los aislados bacterianos. Por otro lado, **Gothwal et al. (2008)** detectaron aislados bacterianos de la rizosfera del suelo con potencial de fijación de nitrógeno usaron el medio de cultivo de malato libre de nitrógeno con azul de bromotimol, pudieron observar el halo de color azul que evidencia el potencial nitro fijador de las bacterias.

#### **4.4. Identificación molecular de los aislados bacterianos rizosféricos mediante la amplificación de los genes 16S rRNA con PCR y secuenciación.**

Se obtuvo ADN de alta calidad para el proceso de amplificación, visualizándose bandas de aproximadamente 1500 pb correspondientes al marcador 16S. A partir de



las lecturas resultantes de la secuenciación SANGER se obtuvo las secuencias ensambladas que permitieron determinar la identidad de los aislados. El aislado CC-FCAGP-BFN1 pertenece a: *Pseudomonas* sp., el aislado CC-FCAGP-BFN16 a *Pseudomonas* sp., el aislado CC-FCAGP-BFN14 a *Pseudomonas* sp. y el aislado bacteriano CC-FCAGP-BFN24 a *Paraburkholderia dipogonis* (**Tabla 12**).

**Tabla 12.** Identificación molecular de aislados bacterianos rizosféricos con capacidad de fijar nitrógeno atmosférico mediante la amplificación de los genes 16S rRNA con PCR y secuenciación

Muestra	Longitud	Calidad	Organismo	Fragmento	% identidad	Nº Accesoión
CC-FCAGP-BFN1	1150	96.50	<i>Pseudomonas</i> sp.	16S	99.91	-
CC-FCAGP-BFN16	1228	99.80	<i>Pseudomonas</i> sp.	16S	99.92	-
CC-FCAGP-BFN14	1217	99.80	<i>Pseudomonas</i> sp.	16S	99.84	-
CC-FCAGP-BFN24	1217	99.60	<i>Paraburkholderia dipogonis</i>	16S	99.82	NR 145902.1

**Elaborado por:** (Kevin Muñoz, 2024).

Para identificar el género y especie de las cepas, comúnmente se utiliza la secuenciación del gen 16S rRNA (**Mbega et al., 2021**). Esta región genética se utiliza debido a características específicas como el tamaño, la ubicuidad entre las bacterias y la baja tasa de evolución. Se aísla el ADN genómico bacteriano. La reconstrucción filogenética de máxima probabilidad de los genes de ARNr 16S permite la clasificación de cepas a nivel de género o especie (**Zahran et al., 2018**).

Las bacterias formadoras de esporas se agrupan actualmente en 40 géneros y siete familias, con *Bacillaceae*, *Alicyclobacillaceae*, *Paenibacillaceae*, *Planococcaceae*, *Pasteuriaceae*, *Sporolactobacillaceae* y *Thermoactinomycetaceae*, todas pertenecientes al orden Bacillales, clase Bacilli. *Bacillus* es el género que integra el mayor número de especies formadoras de endosporas, con 318 especies catalogadas (**Mora et al., 2020**).

**Doncel et al. (2016)** evaluaron la actividad fijadora de nitrógeno y solubilizadora de fosfato *in vitro* de bacterias endófitas de *Bothriochloa pertusa*. Se recolectó diferentes partes de planta como la raíz, tallos y hojas del pasto en zonas agroecológicas de Sucre, Colombia. Se aislaron las bacterias endófitas en el medio de cultivo Agar Irradiada (R<sub>2</sub>A), y a partir de estos tejidos se obtuvo la densidad poblacional (UFC/g<sup>-1</sup> de tejido),

la separación de los morfotipos se la hizo mediante la forma, color, tamaño y apariencia. Los resultados de la identificación con kit API20E confirmaron la presencia de las bacterias endófitas *Aeromonas salmonicida* y *Pasteurella pneumotropica* con capacidad simultánea de solubilizar fosfatos y fijar nitrógeno atmosférico. En la presente investigación se identificaron las cepas *Pseudomonas* sp. y *Paraburkholderia dipogonis* las cuales mostraron una alta capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico.

#### **4.5. Determinación del efecto de los aislados bacterianos rizosféricos con capacidad de fijar nitrógeno atmosférico sobre el crecimiento de vitroplantas de papa en invernadero.**

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

Con la inoculación de las cepas bacterianas CC-FCAGP-BFN14 y CC-FCAGP-BFN1 se incrementó el área foliar respecto al resto de los aislados bacterianos y al control sin inocular. Por otra parte, las plantas inoculadas con bacterias rizosféricas estimularon el desarrollo del área foliar en relación con las plantas sin inocular (control) (**Tabla 13 y Figura 14**).

**Tabla 13.** Efecto de la inoculación de cepas bacterianas rizosféricas con capacidad de fijación de Nitrógeno atmosférico en sustrato de arena más perlita sobre el área foliar de vitroplantas de *S. tuberosum* var. Superchola establecidas en invernadero.

TRATAMIENTOS	Área foliar (dm <sup>2</sup> )	
	$\bar{X}$	Rango promedio
CC-FCAGP-BFN15	0,024	8,20 d
CC-FCAGP-BFN33	0,040	16,80 c
CC-FCAGP-BFN35	0,043	19,80 c
CC-FCAGP-BFN3	0,050	26,30 c
CC-FCAGP-BFN22	0,052	27,70 c
CC-FCAGP-BFN29	0,059	36,10 bc
CC-FCAGP-BFN20	0,059	36,20 bc
CC-FCAGP-BFN9	0,061	36,40 bc
CC-FCAGP-BFN24	0,069	46,90 b
CC-FCAGP-BFN16	0,072	51,20 b

CC-FCAGP-BFN14	0,085	57,40 a
CC-FCAGP-BFN1	0,098	63,00 a
Control	0,013	3,00 e

**Elaborado por:** (Kevin Muñoz, 2024).

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

En la **Figura 14** se observan vitroplantas de *S. tuberosum* en invernadero que presentaron una mayor área foliar comparadas con el control, al ser inoculadas con aislados bacterianos con capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico.



**Elaborado por:** (Kevin Muñoz, 2024).

**Figura 14.** Vitroplantas inoculadas con cepas bacterianas con capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico: a) CC-FCAGP-BFN14, b) CC-FCAGP-BFN1, c) Control.

**García et al. (2004)** investigaron los efectos de la inoculación con una cepa de *Bacillus licheniformis* en el crecimiento de pimiento y tomate en tres experimentos, en el primero la bacteria aumentó significativamente la altura de las plantas y el área foliar en ambas especies y en ambos cultivares. En el segundo se observó que el número y el diámetro de los frutos de tomate producidos en arena y en medio hidropónico aumentaron significativamente con la inoculación. Adicionalmente, las plantas tratadas presentaban menos enfermedades que las no inoculadas. En la presente investigación también se observó un incremento en el área foliar al inocular las cepas bacterianas en vitroplantas de *S. tuberosum*.

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

Al inocular la cepa CC-FCAGP-BFN1 se incrementó la materia fresca de las vitroplantas de *S. tuberosum* var. Superchola inoculadas en condiciones de invernadero. Todas las cepas bacterianas inoculadas a excepción de la cepa CC-FCAGP-BFN15, mostraron un incremento de la masa fresca en vitroplantas de *S. tuberosum* a comparación con el tratamiento control (sin inoculación) (Tabla 14).

**Tabla 14.** Efecto de la inoculación de cepas bacterianas rizosféricas con capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico en sustrato de arena más perlita sobre la masa fresca de vitroplantas de *S. tuberosum* var. Superchola establecidas en invernadero.

TRATAMIENTOS	Masa fresca	
	$\bar{X}$	Rango promedio
CC-FCAGP-BFN15	0,059	7,20 f
CC-FCAGP-BFN33	0,162	16,10 e
CC-FCAGP-BFN35	0,198	20,80 de
CC-FCAGP-BFN3	0,267	29,20 d
CC-FCAGP-BFN22	0,287	31,70 d
CC-FCAGP-BFN29	0,313	33,80 d
CC-FCAGP-BFN20	0,321	35,00 d
CC-FCAGP-BFN9	0,360	36,30 d
CC-FCAGP-BFN24	0,534	48,10 c
CC-FCAGP-BFN16	0,634	52,50 c
CC-FCAGP-BFN14	0,879	58,20 b
CC-FCAGP-BFN1	0,993	68,80 a
Control	0,039	5,40 f

**Elaborado por:** (Kevin Muñoz, 2024).

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

**Ke et al. (2019)** al inocular la bacteria fijadora de nitrógeno *Pseudomonas stutzeri* en plantas de maíz demostraron que las plantas inoculadas tuvieron un mayor crecimiento (peso y número de brotes, peso y número de raíces). Se estimó que la contribución del inoculante a la planta oscilaba entre 0,30 y 0,82 g N/planta, además se volvió dominante en la rizosfera e incrementó la población de diazotrofos autóctonos y

oxidantes de amoníaco y transcripciones de genes funcionales. Otras investigaciones en cebolla en donde se inocularon bacterias oxidantes (SoxB) y bacterias fijadoras de N (NFxB), demostraron que la inoculación con SoxB y NFxB aumentó el rendimiento en un 221%, la altura de la planta en un 62% y la absorción de N en un 629%, en comparación con las plantas cultivadas sin inoculación (Awad et al. 2011).

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

Al inocular la cepa bacteriana CC-FCAGP-BFN1 se incrementó la masa fresca de vitroplantas de *S. tuberosum* var. Superchola. La inoculación con las cepas bacterianas favoreció el aumento del contenido de masa seca en las vitroplantas de *S. tuberosum* var. Superchola a comparación con las vitroplantas del tratamiento control (sin inoculación) (Tabla 15).

**Tabla 15.** Efecto de la inoculación de cepas bacterianas rizosféricas con capacidad de fijación de Nitrógeno atmosférico en sustrato de arena más perlita sobre la masa seca de vitroplantas de *S. tuberosum* var. Superchola establecidas en invernadero.

TRATAMIENTOS	Masa seca	
	$\bar{X}$	Rango promedio
CC-FCAGP-BFN15	0,014	8,00 j
CC-FCAGP-BFN33	0,024	14,10 j
CC-FCAGP-BFN35	0,024	16,90 j
CC-FCAGP-BFN3	0,031	23,00 i
CC-FCAGP-BFN22	0,035	28,30 h
CC-FCAGP-BFN29	0,036	32,70 g
CC-FCAGP-BFN20	0,039	38,00 f
CC-FCAGP-BFN9	0,041	43,00 e
CC-FCAGP-BFN24	0,054	48,00 d
CC-FCAGP-BFN16	0,060	53,00 c
CC-FCAGP-BFN14	0,090	58,00 b
CC-FCAGP-BFN1	0,117	63,00 a
Control	0,010	3,00 k

**Elaborado por:** (Kevin Muñoz, 2024).

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

**Del Amor y Porras (2008)** al estudiar la influencia de las PGB *Azospirillum brasilense* y *Pantoea dispersa* en plantas de *Capsicum annuum* L. determinaron que la masa seca total de la planta no se vio afectado al ser inoculadas con estas cepas, además no afectó el rendimiento de frutos comercializables ni los contenidos de pigmentos y carbohidratos en los frutos; sin embargo, los flavonoides y antocianinas aumentaron significativamente con la adición de bacterias. En la presente investigación al inocular la cepa CC-FCAGP-BFN1 se incrementó el valor de la masa seca.

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

Al inocular la cepa bacteriana que corresponde al tratamiento CC-FCAGP-BFN1 en vitroplantas de *S. tuberosum* var. Superchola se incrementó el índice de área foliar. La inoculación de todas las cepas bacterianas en las vitroplantas de *S. tuberosum* favoreció el aumento del índice de área foliar en relación con las vitroplantas del tratamiento control (sin inoculación) (**Tabla 16 y Figura 15**).

**Tabla 16.** Efecto de la inoculación de cepas bacterianas rizosféricas con capacidad de fijación de Nitrógeno atmosférico en sustrato de arena más perlita sobre el índice de área foliar de vitroplantas de *S. tuberosum* var. Superchola establecidas en invernadero.

TRATAMIENTOS	Índice de área foliar (dm <sup>2</sup> )	
	$\bar{X}$	Rango promedio
CC-FCAGP-BFN15	0,082	8,10 k
CC-FCAGP-BFN33	0,136	16,70 j
CC-FCAGP-BFN35	0,149	19,50 j
CC-FCAGP-BFN3	0,172	26,20 i
CC-FCAGP-BFN22	0,180	28,90 h
CC-FCAGP-BFN29	0,203	35,70 g
CC-FCAGP-BFN20	0,205	36,10 f
CC-FCAGP-BFN9	0,209	37,10 e
CC-FCAGP-BFN24	0,239	46,10 d
CC-FCAGP-BFN16	0,261	51,20 c
CC-FCAGP-BFN14	0,295	57,40 b

CC-FCAGP-BFN1	0,337	63,00 a
Control	0,044	3,00 l

**Elaborado por:** (Kevin Muñoz, 2024).

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

En la **Figura 15** se observa vitroplantas de *S. tuberosum* en invernadero que presentó un mayor índice de área foliar comparada con el control, al ser inoculada con aislados bacterianos con capacidad fijación de nitrógeno atmosférico.



**Elaborado por:** (Kevin Muñoz, 2024).

**Figura 15.** Vitroplantas inoculadas con cepas bacterianas con capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico: a) CC-FCAGP-BFN1, b) Control.

La microflora, las bacterias y los hongos constituyen entre el 75 y el 90% de la biomasa viva del suelo y son los principales descomponedores de la materia orgánica. Estos microorganismos transforman moléculas orgánicas en nutrientes minerales (por ejemplo, nitrato, amonio, fosfato) que luego están disponibles para ser absorbidos por las plantas (Marciano et al., 2017). Se ha demostrado que la aplicación de bacterias de la rizosfera, que son capaces de fijar nitrógeno incrementa la fertilidad del suelo y el rendimiento de los cultivos. La combinación de bacterias promotoras del crecimiento de las plantas con fertilizantes minerales es una tendencia crucial que permite reducir el uso de fertilizantes y es beneficiosa para la producción de cultivos (Kou et al., 2020).

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES, RECOMENDACIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS

#### 5.1. Conclusiones

1. Se obtuvieron 38 aislados bacterianos fijadores de nitrógeno de vida libre a partir de la rizosfera de *S. tuberosum* var. Superchola de cuatro localidades de la provincia de Tungurahua.
2. En la caracterización morfológica de los aislados bacterianos el 84% fueron bacterias Gram (-) y el 95% fueron bacilos. En la caracterización cultural de las colonias de los aislados bacterianos, mostraron el 87% tuvieron textura lisa, 42% superficie plana, 82% consistencia suave, 42% fueron de forma circular, 84% margen entero y el 95% fueron brillantes.
3. El aislado bacteriano con mayor potencial fijador de nitrógeno atmosférico fue el CC-FCAGP-BFN1 y el de menor potencial fue el aislado CC- FCAGP-BFN15.
4. Mediante la amplificación de los genes 16S rRNA con PCR y secuenciación se identificaron las especies *Pseudomonas* sp. y *Paraburkholderia dipogonis* las cuales mostraron una alta capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico.
5. Con la inoculación de la cepa bacterianas CC-FCAGP-BFN1 (*Pseudomonas* sp.) se incrementó el área foliar, masa fresca, masa seca e índice de área foliar de vitroplantas de *S. tuberosum* var. Superchola.

#### 5.2. Recomendaciones

1. Realizar el ensayo de reducción de acetileno (ARA) para cuantificar la fijación de nitrógeno en condiciones de laboratorio debido a que es un métodos sencillo, rápido y altamente sensible a pesar de su alto costo.
2. Realizar ensayos de campo en diferentes tipos de suelo para determinar el efecto del aislado bacteriano CC-FCAGP-BFN1 (*Pseudomonas* sp.) sobre el crecimiento vegetativo y componentes del rendimiento en plantas de *S. tuberosum* var. Superchola.



### 5.3. BIBLIOGRAFÍA

- Abadi, V. A. J. M., Sepehri, M., Rahmani, H. A., Dolatabad, H. K., Shamshiripour, M. & Khatabi, B. (2021). Diversity and abundance of culturable nitrogen-fixing bacteria in the phyllosphere of maize. *Journal of Applied Microbiology*, 131(2), 898-912.
- Arsita, R., Karim, H., Hala, Y., Iriany, N. & Jumadi, O. (2020). Isolation and identification of nitrogen-fixing bacteria in the corn rhizosphere (*Zea mays* L.) originating from Jenepono Regency, South Sulawesi. In IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science*, 484(1), p. 012051.
- Awad, N. M., El-Kader, A., Attia, M. K. A. A. & Alva, A. K. (2011). Effects of nitrogen fertilization and soil inoculation of sulfur-oxidizing or nitrogen-fixing bacteria on onion plant growth and yield. *International Journal of Agronomy*, 2011.
- Barrezueta-Unda, S., Velepucha-Cuenca, K., Solano, M. y Hurtado-Flores, L. (2020). Secuestro de carbono orgánico del suelo en pastizales de la provincia El Oro, Ecuador. *Ciencia Unemi*, 13(32), 14-26.
- Blumenthal J., Baltensperger D., Cassman K. G., Mason S. & Pavlista A. (2008). Importance and Effect of Nitrogen on Crop Quality and Health. *Agronomy Faculty Publications*, 62. <http://digitalcommons.unl.edu/agronomyfacpub/200>.
- Breakwell, D., Woolverton, C., MacDonald, B., Woolverton, C., Smith, K. & Robison, R. (2007). Colony morphology protocol. American Society for Microbiology. <https://asm.org/ASM/media/Protocol-Images/Colony-MorphologyProtocol.pdf?ext=.pdf>
- Charkowski, A., Sharma, K., Parker, M. L., Secor, G. A. & Elphinstone, J. (2020). Bacterial diseases of potato. The potato crop: its agricultural, nutritional and social contribution to humankind, 351-388.
- Chen, J., Lü, S., Zhang, Z., Zhao, X., Li, X., Ning, P. & Liu, M. (2018). Environmentally friendly fertilizers: A review of materials used and their effects on the environment. *Science of the total environment*, 613, 829-839.

- Cóndor Zarchi, M. L. (2021). *Determinación de zonas aptitudinales para los cultivos de maíz (Zea mays) y papa (Solanum tuberosum) mediante un modelo geográfico en la parroquia Guaytacama provincia de Cotopaxi 2020-2021* (Bachelor's thesis, Ecuador: Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC)).
- Coulibali, Z., Cambouris, A. N. & Parent, S. É. (2020). Cultivar-specific nutritional status of potato (*Solanum tuberosum* L.) crops. *Plos One*, 15(3).
- Cruz-Martín, M., Acosta-Suárez, M., Mena, E., Roque, B., Leiva-Mora, M., Pichardo, T., Castro, R. y Alvarado-Capó, Y. (2013). Cuantificación del crecimiento *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis* mediante lecturas de absorbancia. *Biotecnología Vegetal*, 13 (4), 8.
- Cui, Y., Fang, L., Guo, X., Han, F., Ju, W., Ye, L., Wang, X., Tan, W. & Zhang, X. (2019). Natural grassland as the optimal pattern of vegetation restoration in arid and semi-arid regions: evidence from nutrient limitation of soil microbes. *Sci. Total Environ.* (2019).
- Dadrasi, A., Torabi, B., Rahimi, A., Soltani, A., & Zeinali, E. (2020). Parameterization and evaluation of a Simple Simulation Model (SSM-iCrop2) for potato (*Solanum tuberosum* L.) growth and yield in Iran. *Potato Research*, 63, 545-563.
- Devaux, A., Goffart, J. P., Kromann, P., Andrade-Piedra, J., Polar, V. & Hareau, G. (2021). The potato of the future: opportunities and challenges in sustainable agri-food systems. *Potato Research*, 64(4), 681-720.
- Devi, R., Kaur, T., Kour, D. & Yadav, A. N. (2022). Microbial consortium of mineral solubilizing and nitrogen fixing bacteria for plant growth promotion of amaranth (*Amaranthus hypochondrius* L.). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 43, 102404.
- Díaz, N. (2017). Caracterización microbiológica de los suelos del Ecuador con diferentes cultivos y manejo agronómico.
- Dicenzo, G. C., Tesi, M., Pfau, T., Mengoni, A. & Fondi, M. (2020). Genome-scale metabolic reconstruction of the symbiosis between a leguminous plant and a nitrogen-fixing bacterium. *Nature Communications*, 11(1), 2574.

- Ding, Y., Wang, J., Liu, Y. & Chen, S. (2005). Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. *Journal of applied microbiology*, 99(5), 1271-1281.
- Dirpan, A., Kamaruddin, I., Syarifuddin, A., Rahman, A. N. F., Latief, R. & Prahesti, K. I. (2019). Characteristics of bacterial cellulose derived from two nitrogen sources: Ammonium sulphate and yeast extract as an indicator of smart packaging on fresh meat. In IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science*, 355(1), 012040.
- Doncel, A., Chamorro, L. & Pérez, A. (2016). Actividad *in vitro* de bacterias endófitas promotoras de crecimiento asociadas con pasto colosoana en el municipio de Corozal, Sucre. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 8, 351-360.
- Dourado, C., Pinto, C., Barba, F. J., Lorenzo, J. M., Delgadillo, I. & Saraiva, J. A. (2019). Innovative non-thermal technologies affecting potato tuber and fried potato quality. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 274-289.
- El-Fadaly, H., El Kadi, S. & El-Rian, M. (2019). Isolation, Characterization and Identification of Salt Tolerant Nitrogen Fixing Bacteria. *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 10(4), 73-78.
- Flores, C. G., Ulcuango, O. M. R., Antosz, M. S. y Navas, J. U. (2022). El consumo de los tubérculos en el Ecuador y su decisión de compra. *593 Digital Publisher CEIT*, 7(5), 44-57.
- Gao, Z., Han, M., Hu, Y., Li, Z., Liu, C., Wang, X., Tian, Q., Jiao, W. Hu, J., Liu, L., Guan, Z. & Ma, Z. (2019). Effects of continuous cropping of sweet potato on the fungal community structure in rhizospheric soil. *Frontiers in microbiology*, 10, 2269.
- García-Espinoza, C. M. (2022). Efecto de dosis de nitrógeno y fósforo en el rendimiento y eficiencia agronómica del cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.). Apata-Jauja.
- García, J., Probanza, A., Ramos, B., Palomino, M. & Mañero, F. (2004). Effect of inoculation of *Bacillus licheniformis* on tomato and pepper. *Agronomia*, 2004, 24 (4), pp.169-176.

- García-Delgado, C., Barba-Vicente, V., Marín-Benito, J. M., Igual, J. M., Sánchez-Martín, M. J. & Rodríguez-Cruz, M. S. (2019). Influence of different agricultural management practices on soil microbial community over dissipation time of two herbicides. *Sci. Total Environ.* (2019).
- Gixhari, B. (2018). *In vitro* micropropagation of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars. *Poljoprivreda i Sumarstvo*, 64(4), 105.
- Gothwal, R., Nigam, V., Mohan, M., Sasmal, D. & Ghosh, P. (2008) Screening of Nitrogen Fixers from Rhizospheric Bacterial Isolates Associated with Important Desert Plants. *Applied Ecology and Environmental Research*, 6. [http://dx.doi.org/10.15666/aeer/0602\\_101109](http://dx.doi.org/10.15666/aeer/0602_101109)
- Guerrero-Villalobos, H. D. (2020). Efecto de niveles crecientes de nitrógeno en el rendimiento y calidad post cosecha de dos cultivares promisorios de papa (*Solanum tuberosum* L.) Zarcero, Alajuela, Costa Rica.
- Ha, T. T. T., Lam, T. T., Huyen, N. T. & Canh, N. X. (2018). Characterization and identification of nitrogenfixing bacteria isolated from agricultural soil. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, 60(3), 48-54.
- Haan, S. & Rodriguez, F. (2016). Potato origin and production. In J. Singh & L. Kaur (Eds.), *Advances in Potato Chemistry and Technology*, 1–32.
- Habib, S., Kausar, H., Saud, H., Ismail, M. & Othman, R. (2016). Molecular characterization of stress tolerant plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for growth enhancement of rice. *Int. J. Agric. Biol.* <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/6284547/>
- Hajare, S. T., Chauhan, N. M. & Kassa, G. (2021). Effect of growth regulators on *in vitro* micropropagation of potato (*Solanum tuberosum* L.) Gudiene and Belete varieties from Ethiopia. *The Scientific World Journal*, 2021.
- Harindintwali, J. D., Zhou, J. & Yu, X. (2020). Lignocellulosic crop residue composting by cellulolytic nitrogen-fixing bacteria: a novel tool for environmental sustainability. *Science of the total environment*, 715, 136912.

- Imade, E. E. & Babalola, O. O. (2021). Biotechnological utilization: the role of *Zea mays* rhizospheric bacteria in ecosystem sustainability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(11), 4487-4500.
- Jatav, A. S., Kushwah, S. & Naruka, I. S. (2017). Performance of Potato Varieties for Growth, Yield, Quality and Economics under Different Levels of Nitrogen. *Advances in Research* 9 (6): 1-9, 2017.
- Jiménez-Terry, F., Agramonte, D., Pérez, M., Pons, M., Rodríguez, M., La, M., ... y Leiva-Mora, M. (2013). Efecto del sustrato sobre la producción de minitubérculos de papa en casa de cultivo a partir de plantas *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*, 13(3). Q
- Jones, D. L., Cooledge, E. C., Hoyle, F. C., Griffiths, R. I., & Murphy, D. V. (2019). pH and exchangeable aluminum are major regulators of microbial energy flow and carbon use efficiency in soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 138, 107584.
- Kacheyo, O. C., van Dijk, L. C. M., de Vries, M. E., & Struik, P. C. (2021). Augmented descriptions of growth and development stages of potato (*Solanum tuberosum* L.) grown from different types of planting material. *Annals of Applied Biology*, 178(3), 549-566.
- Kawaka, F. (2022). Characterization of symbiotic and nitrogen fixing bacteria. *AMB Express*, 12(1), 99.
- Ke, X., Feng, S., Wang, J., Lu, W., Zhang, W., Chen, M., & Lin, M. (2018). Effect of inoculation with nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas stutzeri* A1501 on maize plant growth and the microbiome indigenous to the rhizosphere. *Syst. Appl. Microbiol.* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.10.010>
- Koch, M., Naumann, M., Pawelzik, E., Gransee, A., & Thiel, H. (2020). The importance of nutrient management for potato production Part I: Plant nutrition and yield. *Potato research*, 63, 97-119.
- Koleva Gudeva, L., Mitrev, S., Trajkova, F., & Ilievski, M. (2019). Micropropagation of Potato *Solanum tuberosum* L. *Electronic Journal of Biology*, 8(3), 45-49.

- Kool, D.M., Dolfing, J., Wrage, N., & Van Groenigen, J.W., (2011). Nitrifier denitrification as a distinct and significant source of nitrous oxide from soil. *Soil Biol. Biochem.* 43, 174–178.
- Kou, X., Li, J., Liu, H., Li, B., Yu, X., Cao, X., ... & Wang, L. (2020). Characteristics of bacterial biodiversity and community structure in non-rhizosphere soils along zonal distribution of plants within littoral wetlands in inner Mongolia, China. *Global Ecology and Conservation*, 24.
- Kumar, P., Dua, V. K., Sharma, J., Byju, G., Minhas, J. S. & Chakrabarti, S. K. (2018). Site-specific nutrient requirements of NPK for potato (*Solanum tuberosum* L.) in Western Indo-gangetic plains of India based on QUEFTS. *Journal of Plant Nutrition*, 41(15), 1988-2000.
- Kuswinanti, T., Jayadi, M., & Larekeng, S. H. (2021). Isolation, characterization and identification of nitrogen fixing bacteria with organic fertilizer applications in paddy soil. *In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 807 (2), 022024.
- Li, J., Cooper, J. M., Li, Y., Yang, X., & Zhao, B. (2015). Soil microbial community structure and function are significantly affected by long-term organic and mineral fertilization regimes in the North China Plain. *Applied Soil Ecology*, 96, 75-87.
- Li, Q., Xiang, P., Zhang, T., Wu, Q., Bao, Z., Tu, W., ... & Zhao, C. (2022). The effect of phosphate mining activities on rhizosphere bacterial communities of surrounding vegetables and crops. *Science of The Total Environment*, 821, 153479.
- Marciano Marra, L., Fonsêca Sousa Soares, C. R., de Oliveira, S. M., Avelar Ferreira, P. A., Lima Soares, B., de Fráguas Carvalho, R., ... & de Souza Moreira, F. M. (2017). Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. *Plant and soil*, 357, 289-307.
- Mbega, E. R., Makumba, B. A., Hertel, R., & Daniel, R. (2021). Molecular identification and in vitro plant growth-promoting activities of culturable Potato (*Solanum tuberosum* L.) rhizobacteria in Tanzania. *Potato Research*, 64, 67-95.

- Mokrani, K., Hamdi, K. & Tarchoun, N. (2018). Potato (*Solanum tuberosum* L.) response to nitrogen, phosphorus and potassium fertilization rates. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 49(11), 1314-1330.
- Monteza Carranza, U. (2020). Efecto de tres niveles de fósforo y tres fuentes de nitrógeno en el rendimiento de papa (*Solanum tuberosum* L.) variedad yungay en la provincia de Cutervo, región Cajamarca 2017-2018.
- Mora, K. I. G., Araujo-Abad, S., Collahuazo-Reinoso, Y., Salas, Y. L., Rigaud, X. J., Robles-Carrión, Á. & Urgiles-Gómez, N. (2020). Caracterización morfológica y fisiológica de microorganismos rizosféricos nativos de sistemas agroforestales de café. *Bosques Latitud Cero*, 10(2), 124-136.
- Muangthong, A., Youpensuk, S. & Rerkasem, B. (2015). Isolation and characterisation of endophytic nitrogen fixing bacteria in sugarcane. *Tropical life sciences research*, 26(1), 41.
- Muleta, H. D. & Aga, M. C. (2019). Role of nitrogen on potato production: a review. *Journal of Plant Sciences*, 7(2), 36-42.
- Mwakidoshi, E. R., Gitari, H. H., Maitra, S. & Muindi, E. M. (2021). Economic Importance, Ecological Requirements and Production Constraints of Potato (*Solanum tuberosum* L.) in Kenya.
- Naeem, M., Maqbool, A. & Aksoy, E. (2023). Potato taxonomy and wild relatives. *In Potato Production Worldwide*, 19-55.
- Naumann, M., Koch, M., Thiel, H., Gransee, A., & Pawelzik, E. (2020). The importance of nutrient management for potato production part II: Plant nutrition and tuber quality. *Potato Research*, 63, 121-137.
- Navarro-Noya, Y. E., Hernández-Mendoza, E., Morales-Jiménez, J., Jan-Roblero, J., Martínez-Romero, E. & Hernández-Rodríguez, C. (2012). Isolation and characterization of nitrogen fixing heterotrophic bacteria from the rhizosphere of pioneer plants growing on mine tailings. *Applied Soil Ecology*, 62, 52-60.
- Nuñez, J. E., Quiala, E., de Fera, M., Mestanza, S., Gómez-Kosky, R., Cuadrado, F. R., y Leiva-Mora, M. (2017). Establecimiento de un banco clonal de

*Caesalpinia spinosa* (Mol.) O. Kuntz mediante selección de árboles plus e injerto. *Bioteología vegetal*, 17(1).

- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33, 1-16.
- Ouyabe, M., Kikuno, H., Tanaka, N., Babil, P. & Shiwachi, H. (2019). Isolation and identification of nitrogen-fixing bacteria associated with *Dioscorea alata* L. and *Dioscorea esculenta* L. *Microb Resour Syst*, 35, 3-11.
- Pathak, D., Lone, R., Khan, S., & Koul, K. K. (2019). Isolation, screening and molecular characterization of free-living bacteria of potato (*Solanum tuberosum* L.) and their interplay impact on growth and production of potato plant under mycorrhizal association. *Scientia horticulturae*, 252, 388-397.
- Paucar, B., Díaz, N. y Alvarado Ochoa, S. P. (2016). Efecto del manejo de suelo sobre las poblaciones microbianas en suelos de la Sierra de Ecuador.
- Pérez, F. R., Santana, R. C., Capó, Y. A., Martín, B. D., & Gutiérrez, R. T. (2019). Aislamiento y caracterización morfológica de bacterias endófitas en sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Centro Agrícola*, 37(3), 61-66.
- Poria, V., Dębiec-Andrzejewska, K., Fiodor, A., Lyzohub, M., Ajijah, N., Singh, S., & Pranaw, K. (2022). Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) integrated phytotechnology: A sustainable approach for remediation of marginal lands. *Frontiers in Plant Science*, 13, 999866.
- Prasetya, R. D., Walida, H., Dalimunthe, B. A. & Rizal, K. (2023). Isolation And Characterization Of Nitrogen Fixing Fungi From Fruit And Vegetable Waste Compost. *International Journal of Science, Technology & Management*, 4(4), 948-953.
- Ramakrishna, W., Yadav, R. & Li, K. (2019). Plant growth promoting bacteria in agriculture: Two sides of a coin. *Applied Soil Ecology*, 138, 10-18.
- Reddy, B. J., Mandal, R., Chakroborty, M., Hijam, L. & Dutta, P. (2018). A review on potato (*Solanum tuberosum* L.) and its genetic diversity. *International Journal of Genetics*, ISSN, 0975-2862.



- Reinhardt, É., Ramos, P. L., Manfio, G. P., Barbosa, H. R., Pavan, C. & Moreira-Filho, C. A. (2008). Molecular characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from Brazilian agricultural plants at São Paulo state. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 414-422.
- Rocha, G. T., Montalvão, S. C. L., Queiroz, P. R. M., Berçot, M. R., Gomes, A. C. M. M. & Monnerat, R. G. (2023). Morphological and biochemical characterization of bacterial species of *Bacillus*, *Lysinibacillus* and *Brevibacillus*. *Revista Ceres*, 70, 91-104.
- Ruiu, L. (2020). Plant-growth-promoting bacteria (PGPB) against insects and other agricultural pests. *Agronomy*, 10(6), 861.
- Saeed, Q., Xiukang, W., Haider, F. U., Kučerik, J., Mumtaz, M. Z., Holatko, J., Naseem, M., Kintl, A., Ejaz, M., Naveed, M., Brtnicky, & Mustafa, A. (2021). Rhizosphere bacteria in plant growth promotion, biocontrol, and bioremediation of contaminated sites: A comprehensive review of effects and mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10529.
- Saenz, S. (1997). Prácticas de microbiología. Universidad de la Rioja. Servicio de publicaciones. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=100835>
- Sánchez, A. C., Santana, R. C., Sánchez, Y. G. & Gutiérrez, R. T. (2018). Caracterización e identificación genética de aislados de *Rhizobium* en el cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Centro Agrícola*, 36(4), 5-14.
- Sánchez-García, C., Alvarado-Capó, Y., Cruz-Martín, M., Acosta-Suárez, M... (2010). Detección de compuestos bioquímicos relacionados con la respuesta defensiva en plantas de *Musa spp.* inoculadas artificialmente con *Mycosphaerella fijiensis*. *Biotecnología vegetal*, 10 (2), 8.
- Sánchez-García, C., Cruz-Martín, M., Alvarado-Capó, Y., Rojas, L., Leiva-Mora, M., Acosta-Suarez, M., y Roque, B. (2012). Detección y cuantificación de quitinasa en hojas de banano (*Musa spp.*) inoculadas con *Mycosphaerella fijiensis*. *Biotecnología Vegetal*, 12(2).
- Simon, Z., Mtei, K., Gessesse, A., & Ndakidemi, P. (2014). Isolation and characterization of nitrogen fixing rhizobia from cultivated and uncultivated soils of northern Tanzania.

- Tak, N., Bissa, G. & Gehlot, H. S. (2020). Methods for isolation and characterization of nitrogen-fixing legume-nodulating bacteria. *Nitrogen Metabolism in Plants: Methods and Protocols*, 119-143.
- Tamas, E., Mara, G., Laslo, E., György, É., Mathe, I., Abraham, B., & Lanyi, S. (2010). Microbial products as natural alternative to fertilisers: isolation and characterisation of nitrogen fixing bacteria. *UPB Sci. Bull*, 72, 137-144.
- Timm, C. M., Campbell, A. G., Utturkar, S. M., Jun, S. R., Parales, R. E., Tan, W. A., Robeson, M., Lu, T., Jawdy, S., Brown, S., Ussery, D., Schadt, C., Tuskan, G., Dpkytcz, M., Weston, D. & Pelletier, D. A. (2015). Metabolic functions of *Pseudomonas fluorescens* strains from *Populus deltoides* depend on rhizosphere or endosphere isolation compartment. *Frontiers in microbiology*, 6, 1118.
- Torabian, S., Farhangi-Abriz, S., Qin, R., Noulas, C., Sathuvalli, V., Charlton, B. & Loka, D. A. (2021). Potassium: A vital macronutrient in potato production—A review. *Agronomy*, 11(3), 543.
- Torres, E. J. P., Virelles, P. M., Cabrera, A. B., Mora, M. L., Rivero, G. G., Caisa, L. P. L., ... & Reyes, O. M. C. (2013). Antagonismo “*in vitro*” de *Trichoderma harzianum* sobre aislados camagüeyanos de *Bipolaris oryzae* y *Sarocladium oryzae*. *Centro Agrícola*, 40(3), 29-36.
- Vasar, M., Davison, J., Oja, J., Anslan, S., Al-Quraishy, S., ... & Zobel, M. (2023). Global diversity and distribution of nitrogen-fixing bacteria in the soil. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1100235.
- Veitía, N., Alvarado-Capó, Y., García, L., Bermúdez-Carabaloso, I.... (2008). Aplicación de la selección *in vitro* en el mejoramiento genético de la papa para la resistencia al Tizón temprano. *Biotecnología vegetal*, 8 (1), 8
- Vieira, S., Sikorski, J., Dietz, S., Herz, K., Schrupf, M., Bruelheide, H., ... & Overmann, J. (2020). Drivers of the composition of active rhizosphere bacterial communities in temperate grasslands. *The ISME journal*, 14(2), 463-475.
- Wafula, E. N., Murunga, S. I., Nalianya Wafula, E., Murunga, S. I., & Wafula, E. N. (2020). Isolation and identification of phosphate solubilizing and nitrogen-

- fixing bacteria from lake Ol'Bolossat sediments, Kenya. *Mod. Appl. Sci*, 14, 37.
- Wang, W., Yang, S., & Yang, Z. (2019). Isolation and characterization of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria from potato rhizosphere of reclaimed cropland. *Journal of Northwest A & F University-Natural Science Edition*, 47(8), 127-143.
- Wen, S., Cui, N., Gong, D., Xing, L., Wu, Z., Zhang, Y., ... & Wang, J. (2023). Optimizing nitrogen fertilizer application for achieving high yield with low environmental risks in apple orchard. *Agricultural Water Management*, 289, 108501.
- Widdig, M., Schleuss, P. M., Weig, A. R., Guhr, A., Biederman, L. A., Borer, E. T., ... & Spohn, M. (2019). Nitrogen and phosphorus additions alter the abundance of phosphorus-solubilizing bacteria and phosphatase activity in grassland soils. *Frontiers in Environmental Science*, 7, 185.
- Xu, Y., He, P., Xu, X., Qiu, S., Ullah, S., Gao, Q., & Zhou, W. (2019). Estimating nutrient uptake requirements for potatoes based on QUEFTS analysis in China. *Agronomy Journal*, 111(5), 2387-2394.
- Yanza Calva, J. P. (2020). *Determinación del potencial agrícola del suelo para el cultivo de maíz, papa y frejol a través de datos edafoclimáticos en la parroquia Guaytacama* (Bachelor's thesis, Ecuador: Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC)).
- Zahran, H. H., Chahboune, R., Moreno, S., Bedmar, E. J., Abdel-Fattah, M., Yasser, M. M., & Mahmoud, A. M. (2018). Identification of rhizobial strains nodulating Egyptian grain legumes. *Int. Microbiol*, 16(3), 157-163.
- Zavala Rojas, R. B. (2022). Comportamiento agronómico del cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*) a la eficiencia de la fertilización nitrogenada en condiciones ambientales de Colpas.
- Zhang, M., Zhang, X., Zhang, L., Zeng, L., Liu, Y., Wang, X., ... Ai, C. (2021). The stronger impact of inorganic nitrogen fertilization on soil bacterial community than organic fertilization in short-term condition. *Geoderma*, 382, 114752.

Zhang, X., Tong, J., Dong, M., Akhtar, K., & He, B. (2022). Isolation, identification and characterization of nitrogen fixing endophytic bacteria and their effects on cassava production. *PeerJ*, 10, e12677.

Zhang, Y., Wu, N., Zhao, Z., Xu, W. A., Ma, Y., & Niu, Z. (2019). Colonization characteristics of bacterial communities on plastic debris influenced by environmental factors and polymer types in the Haihe Estuary of Bohai Bay, China. *Environmental science & technology*, 53(18), 10763-10773.

Zhao et al. (2016). Effects of organic–inorganic compound fertilizer with reduced chemical fertilizer application on crop yields, soil biological activity and bacterial community structure in a rice–wheat cropping system. *Appl. Soil Ecol.*

#### 5.4. ANEXOS

**Anexo 1.** Tabla de colores PANTONE para caracterización cultural de las colonias de los aislados bacterianos.

The image displays a 'Flat Design Color Chart' with 100 color swatches arranged in a 10x10 grid. Each swatch consists of a color patch, a Pantone code, and a hex code. The colors follow a sequential gradient: starting with reds and oranges in the top-left, moving through yellows and greens in the middle, and ending with blues and greys in the bottom-right.

Pantone Code	Hex Code	Pantone Code	Hex Code	Pantone Code	Hex Code	Pantone Code	Hex Code	Pantone Code	Hex Code
PANTONE 19-1238	#E67E22	PANTONE 19-1239	#D35400	PANTONE 19-1240	#C95832	PANTONE 19-1241	#B8603D	PANTONE 19-1242	#A0704D
PANTONE 19-1243	#8C8B4E	PANTONE 19-1244	#7C9A6E	PANTONE 19-1245	#66C2A4	PANTONE 19-1246	#4DC0B5	PANTONE 19-1247	#40C4FF
PANTONE 19-1248	#3498DB	PANTONE 19-1249	#2ECC71	PANTONE 19-1250	#27AE60	PANTONE 19-1251	#24A98F	PANTONE 19-1252	#1ABC9C
PANTONE 19-1253	#1F9E79	PANTONE 19-1254	#18A68D	PANTONE 19-1255	#14A088	PANTONE 19-1256	#109F84	PANTONE 19-1257	#0F9F80
PANTONE 19-1258	#0F9F80	PANTONE 19-1259	#0F9F80	PANTONE 19-1260	#0F9F80	PANTONE 19-1261	#0F9F80	PANTONE 19-1262	#0F9F80
PANTONE 19-1263	#0F9F80	PANTONE 19-1264	#0F9F80	PANTONE 19-1265	#0F9F80	PANTONE 19-1266	#0F9F80	PANTONE 19-1267	#0F9F80
PANTONE 19-1268	#0F9F80	PANTONE 19-1269	#0F9F80	PANTONE 19-1270	#0F9F80	PANTONE 19-1271	#0F9F80	PANTONE 19-1272	#0F9F80
PANTONE 19-1273	#0F9F80	PANTONE 19-1274	#0F9F80	PANTONE 19-1275	#0F9F80	PANTONE 19-1276	#0F9F80	PANTONE 19-1277	#0F9F80
PANTONE 19-1278	#0F9F80	PANTONE 19-1279	#0F9F80	PANTONE 19-1280	#0F9F80	PANTONE 19-1281	#0F9F80	PANTONE 19-1282	#0F9F80
PANTONE 19-1283	#0F9F80	PANTONE 19-1284	#0F9F80	PANTONE 19-1285	#0F9F80	PANTONE 19-1286	#0F9F80	PANTONE 19-1287	#0F9F80

**Anexo 2.** Selección preliminar aislados bacterianos con capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico.



**Anexo 3.** Absorbancia ajustada.

**Tabla 17.** Absorbancia en espectrofotómetro ajustados a un nivel de 0,2 a 600 nanómetros.

<b>TRATAMIENTOS</b>	<b>Nivel de absorbancia iniciales</b>
CC-FCAGP-BFN15	0,489
CC-FCAGP-BFN33	0,683
CC-FCAGP-BFN35	0,579
CC-FCAGP-BFN3	0,605
CC-FCAGP-BFN22	0,323
CC-FCAGP-BFN29	0,491
CC-FCAGP-BFN20	0,207
CC-FCAGP-BFN9	0,231
CC-FCAGP-BFN24	0,286
CC-FCAGP-BFN16	0,711
CC-FCAGP-BFN14	0,355
CC-FCAGP-BFN1	0,466
Control	

**Anexo 4.** Vitroplantas de *S. tuberosum* establecidas en invernadero.

