



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

**“DETECCIÓN DE GRUPOS FUNCIONALES ASOCIADOS A LA RIZOSFERA
DEL CULTIVO DE PAPA (*Solanum tuberosum*), EN LA LOCALIDAD DE
MACHACHI, CANTÓN MEJÍA, PROVINCIA DE PICHINCHA”**

Proyecto de investigación presentado previo a la obtención del título de
Ingeniera Agrónoma

Autora:

Simbaña Ramos Jessica Alexandra

Director:

Chasi Vizquete Wilman Paolo Ing. M.Sc.

LATACUNGA - ECUADOR

MARZO 2021

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Simbaña Ramos Jessica Alexandra, con cédula de ciudadanía No. 1725922288 declaro ser autora del presente proyecto de investigación: **“Detección de grupos funcionales asociados a la rizosfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*), en la localidad de Machachi, Cantón Mejía, Provincia de Pichincha”** siendo el Ing. M.Sc Wilman Paolo Chasi Vizuite, tutor del presente trabajo; y, eximo expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Latacunga, 5 de Marzo del 2021.



Simbaña Ramos Jessica Alexandra

Estudiante

CC: 1725922288



Ing. M.Sc. Wilman Paolo Chasi Vizuite

Docente Tutor

CC: 0502409725

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **SIMBAÑA RAMOS JESSICA ALEXANDRA**, identificada con cédula de ciudadanía 1725922288, de estado civil soltera a quien en lo sucesivo se denominará **LA CEDENTE**; y de otra parte, el Ph.D. Nelson Rodrigo Chiguano Umajinga, en calidad de Rector Encargado y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez, Barrio El Ejido, Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA.- LA CEDENTE es una persona natural estudiante de la carrera de **Ingeniería en Agronomía**, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado **“Detección de grupos funcionales asociados a la rizosfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*), en la localidad de Machachi, Cantón Mejía, Provincia de Pichincha”** la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad según las características que a continuación se detallan:

Historial académico.- Inicio de la carrera: Septiembre 2015 – Marzo 2016

Finalización: Octubre 2020 - Marzo 2021

Aprobación en Consejo Directivo.- 26 de Enero del 2021

Tutor.- Ing. M.Sc. Wilman Paolo Chasi Vizuete

Tema: **“Detección de grupos funcionales asociados a la rizosfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*), en la localidad de Machachi, Cantón Mejía, Provincia de Pichincha”**

CLÁUSULA SEGUNDA.- LA CESIONARIA es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

CLÁUSULA TERCERA.- Por el presente contrato, **EL CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

CLÁUSULA CUARTA.- OBJETO DEL CONTRATO: Por el presente contrato **LA CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- b) La publicación del trabajo de grado.
- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.
- d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
- f) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

CLÁUSULA QUINTA.- El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **LA CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

CLÁUSULA SEXTA.- El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

CLÁUSULA SÉPTIMA.- CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD.- Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **LA CEDENTE** podrá utilizarla.

CLÁUSULA OCTAVA.- LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS.- LA CESIONARIA podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **LA CEDENTE** en forma escrita.

CLÁUSULA NOVENA.- El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en las cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

CLÁUSULA DÉCIMA.- En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

CLÁUSULA UNDÉCIMA.- Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 05 días del mes de Marzo del 2021.



Simbaña Ramos Jessica Alexandra
LA CESIONARIA

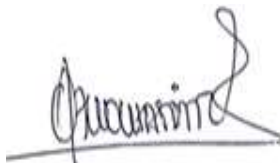
Ph.D. Nelson Rodrigo Chiguano Umajinga
EL CESIONARIO

AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tutor del Proyecto de Investigación con el título:

“DETECCIÓN DE GRUPOS FUNCIONALES ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DEL CULTIVO DE PAPA (*Solanum tuberosum*), EN LA LOCALIDAD DE MACHACHI, CANTÓN MEJÍA, PROVINCIA DE PICHINCHA” de Simbaña Ramos Jessica Alexandra, de la carrera de Ingeniería Agronómica, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también ha incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la Pre defensa.

Latacunga, 5 de Marzo del 2020.



Ing. M.Sc. Wilman Paolo Chasi Vizuite

DOCENTE TUTOR

CC: 0502409725

AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi; y, por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, la postulante: Simbaña Ramos Jessica Alexandra, con el título de Proyecto de Investigación: **“DETECCIÓN DE GRUPOS FUNCIONALES ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DEL CULTIVO DE PAPA (*Solanum tuberosum*), EN LA LOCALIDAD DE MACHACHI, CANTÓN MEJÍA, PROVINCIA DE PICHINCHA”** ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

Por lo antes expuesto, se autoriza los empastados correspondientes, según la normativa institucional.

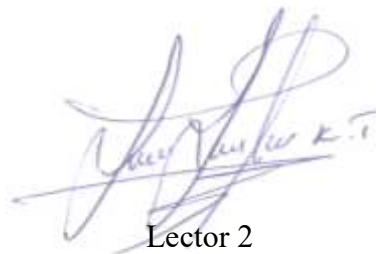
Latacunga, 5 de Marzo del 2021



Lector 1 (Presidente/a)

Ing. Mg. Klever Quimbiulco Sanchez

CC: 1709561102



Lector 2

Ing. PhD. Carlos Torres Miño

CC: 0502329238



Lector 3

Ing. Mtr. Richard Molina Alvarez

CC: 1205974627

AGRADECIMIENTO

La vida universitaria me dio la oportunidad de conocer personas incomparables que me han sabido brindar apoyo total dentro y fuera de la carrera doy gracias a Dios por haberlos puesto en esta etapa de mi vida, gracias a todos por ayudarme a cumplir un sueño, por todas las cosas buenas y malas que en su momento nos formaron como profesionales, sin duda fueron y serán siempre una bendición, a todo esto agradezco a la universidad por todos los conocimientos adquiridos y las grandes amistades que me llevo.

Simbaña Ramos Jessica Alexandra

DEDICATORIA

A Dios, a mis padres y a mis ángeles en el cielo, por haberme forjado una persona de bien que hoy está logrando su mayor sueño anhelado, a ustedes por imponerme reglas y brindarme libertad, pero que al terminar el día por más difícil que se haya puesto siempre me motivaron para cumplir este sueño.

Gracias a todos por formar parte de este éxito.

Jessica Alexandra

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TITULO: DETECCIÓN DE GRUPOS FUNCIONALES ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DEL CULTIVO DE PAPA (*Solanum tuberosum*), EN LA LOCALIDAD DE MACHACHI, CANTÓN MEJÍA, PROVINCIA DE PICHINCHA.

AUTOR: Simbaña Ramos Jessica Alexandra

RESUMEN

El presente proyecto se realizó en la Parroquia Machachi, del Cantón Mejía y tuvo como objetivo determinar la microbiota total y detectar la presencia de grupos funcionales como bacterias fijadoras de nitrógeno, hongos y actinomicetos asociados a la rizosfera de la papa, mediante la prospección en laboratorio en suelo, en macerado de raíz y fragmentos de raíz en dos repeticiones, donde se determinó UFC*gr⁻¹ y conidios*gr⁻¹, para lo cual utilizamos medios de cultivos específicos para cada grupo y las observaciones se las realizó mediante disoluciones de 10⁻⁷. Y se comparó la cantidad de microorganismos presentes en las repeticiones y en los métodos de siembra.

Los resultados obtenidos determinaron que la cantidad promedio de Microbiota total encontrada en el suelo asociado a la rizosfera, de entre las dos repeticiones fue de 2,68*10⁹ UFC*gr⁻¹, valores válidos para que un suelo pueda ser considerado sano y productivo. Las bacterias fijadoras de nitrógeno contabilizadas fueron de 1,41*10⁹ UFC*gr⁻¹ y 1,84*10⁹ UFC*gr⁻¹, en siembra por fragmentos de raíz, y siembra por maceración respectivamente, y la presencia de hongos de 9,57*10⁸ UFC*gr⁻¹ en siembra por fragmentos de raíz, siendo esta menor en la siembra por maceración con 2,5*10⁸ UFC*gr⁻¹. En cuanto al conteo de Actinomicetos asociados a la rizosfera mediante la siembra por maceración fue de 1,77*10⁹ UFC*gr⁻¹ y siembra por fragmentos de raíz 1,44*10⁹ UFC*gr⁻¹.

Esto demuestra que con la aplicación de la metodología planteada en la investigación se pudo detectar la presencia de microbiota total y grupos funcionales asociados a la rizosfera del cultivo en estudio.

Palabras clave: grupos funcionales, suelo, rizosfera, microbiota, papa

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI

FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCE AND NATURAL RESOURCES

THEME: DETECTION OF FUNGAL GROUPS ASSOCIATED WITH THE RHIZOSPHERE OF POTATO (*SOLANUM TUBEROSUM* L), IN THE LOCALITY OF MACHACHI, CANTON MEJÍA, PROVINCE OF PICHINCHA.

AUTHOR: Simbaña Ramos Jessica Alexandra

ABSTRACT

The present project was carried out in the Parish of Machachi, Canton Mejia and its objective was to determine the total microbiota and detect the presence of functional groups such as nitrogen-fixing bacteria, fungi and actinomycetes associated with the potato rhizosphere, by means of laboratory prospection in soil, root macerate and root fragments in two replicates, where CFU*gr⁻¹ and conidia*gr⁻¹, were determined, for which we used specific culture media for each group and the observations were made using 10⁻⁷ dilutions. The quantity of microorganisms present in the replicates and in the sowing methods was compared.

The results obtained determined that the average amount of total microbiota found in the soil associated with the rhizosphere, between the two replicates, was 2.68*10⁹ CFU*gr⁻¹, valid values for a soil to be considered healthy and productive. The nitrogen-fixing bacteria counted were 1.41*10⁹ CFU*gr⁻¹ and 1.84*10⁹ CFU*gr⁻¹, in sowing by root fragments and sowing by maceration respectively, and the presence of fungi was 9.57*10⁸ CFU*gr⁻¹ in sowing by root fragments, being lower in sowing by maceration with 2.5*10⁸ CFU*gr⁻¹. As for the count of Actinomycetes associated to the rhizosphere by maceration sowing was 1.77*10⁹ CFU*gr⁻¹ and sowing by root fragments 1.44*10⁹ CFU*gr⁻¹.

This shows that with the application of the methodology proposed in the research it was possible to detect the presence of total microbiota and functional groups associated with the rhizosphere of the crop under study.

Key words: functional groups, soil, rhizosphere, microbiota, potato.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	II
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR.....	III
AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	VI
AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	VII
AGRADECIMIENTO	VIII
DEDICATORIA.....	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	XII
INDICE DE TABLAS.....	XVI
INDICE DE FIGURAS	XVI
1. INFORMACIÓN GENERAL.....	1
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	3
3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	4
4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	6
5. OBJETIVOS.....	8
5.1. Objetivo General.....	8
5.2. Objetivos Específicos	8
6. TABLA DE ACTIVIDADES POR OBJETIVO	9
7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA	10
7.1. Microbiota total del suelo.....	10

7.2.	Grupos funcionales	10
7.3.	Actinomicetos	10
7.4.	Bacterias Fijadoras de Nitrógeno	10
7.5.	Hongos.....	11
7.6.	Beneficios de bacterias en la rizosfera	11
7.7.	Métodos de siembra.....	11
7.7.1.	<i>Método de diluciones seriadas</i>	11
7.7.2.	<i>Método de siembra de fragmentos de raíz</i>	12
7.7.3.	<i>Técnica de tinción</i>	12
7.8.	Papa	12
7.8.1.	<i>Características generales</i>	12
7.9.	Características del suelo	13
8.	METODOLOGÍA	14
9.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	22
9.1	<i>Poblaciones de los microorganismos totales (UFC/g de suelo) encontradas en el cultivo de papa establecidas para el estudio del suelo de la localidad de Machachi-2021.</i>	22
9.2.	<i>Poblaciones de los grupos funcionales (UFC/g de raíz) encontradas en el cultivo de papa establecidas para el estudio de raíz en la localidad de Machachi-2021.</i>	23
9.3.	<i>Concentración de conidios de los grupos funcionales (conidios/ g de suelo) encontrados en el cultivo de papa establecidas para el estudio del suelo en la localidad de Machachi-2021.</i>	25
10.	PRESUPUESTO.....	28
11.	CONCLUSIONES	30
12.	RECOMENDACIONES	30
13.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	31
	ANEXOS.....	34
	Anexo 1. Coordenadas de muestras tomadas	34
	Anexo 2. Protocolo de Técnica de tinción.....	35
	Anexo 3. Protocolo de diluciones seriadas para suelo (microbiota total)	36

Anexo 4. Protocolo de diluciones seriadas para raíz (maceración) para actinomicetos, bacterias y hongos	37
Anexo 5. Protocolo de siembra de fragmentos de raíz para actinomicetos, bacterias y hongos	38
Anexo 6. Protocolo de medio de cultivo PDA	39
Anexo 7. Protocolo de medio de cultivo Agar Nutritivo.....	40
Anexo 8. Protocolo de medio de cultivo Tryptone soya agar	41
Anexo 9. Determinación de la concentración de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de suelo (microbiota total).....	42
Anexo 10. Determinación de la concentración de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de maceración de raíz (actinomicetos, bacterias fijadoras de nitrógeno y hongos)	43
Anexo 11. Determinación de la concentración de conidios*g de suelo (cuantificación en el hematocitómetro o cámara de Neubauer).....	44
Anexo 12. Determinación de la concentración de conidios*g (cuantificación en el hematocitómetro o cámara de Neubauer) en maceración de raíz.....	45
Anexo 13. Determinación de la concentración de conidios*g (cuantificación en el hematocitómetro o cámara de Neubauer) en fragmentación de raíz	45
Anexo 14. Recolección de muestras.....	45
Anexo 15. Preparación de medios cultivo y rotulado de cajas Petri	46
Anexo 16. Dispercion de medios.....	46
Anexo 17. Limpieza de muestras de raíz.....	47
Anexo 18. Macerado y siembra de diluciones de las muestras de raíz	47
Anexo 19. Pesado de suelo, desinfección y siembra de muestras de suelo.....	48
Anexo 20. Incubado de muestras por 7 días, a 37°	48
Anexo 21. Presencia de colonias de los diferentes grupos funcionales.....	48
Anexo 22. Conteo de colonias y conidios	49
Anexo 23. Técnica de tincion	50
Anexo 24. Siembra de fragmentos de raiz.....	50
Anexo 25. Aval del traductor	51

Anexo 26. Análisis de propiedades fisico-químicas del suelo (Iniap) 52

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Cuadro de actividades por objetivo.....	9
--	---

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Levantamiento topográfico del lote	14
Figura 2. Promedios generales de la concentración de unidades formadoras de colonias (ufc/g) de suelo	22
Figura 3. Promedios de la concentración de unidades formadoras de colonias (ufc/g) de macerado de raíz.....	23
Figura 4. Promedios de la concentración de unidades formadoras de colonias (ufc/g) de siembra por fragmentos de raíz	24
Figura 5. Promedios generales de concentración de conidios/g de suelo.....	25
Figura 6. Promedios generales de concentración de conidios/g de macerado de raíz....	26
Figura 7. Promedios generales de concentración de conidios/g de fragmentos de raíz .	26

1. INFORMACIÓN GENERAL

Título del Proyecto:

“RECONOCIMIENTO DE GRUPOS FUNCIONALES ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DEL CULTIVO DE PAPA (*Solanum tuberosum*), EN LA LOCALIDAD DE MACHACHI, CANTÓN MEJÍA, PROVINCIA DE PICHINCHA”

Fecha de inicio:

Octubre del 2020.

Fecha de finalización:

Marzo del 2021.

Lugar de ejecución:

Localidad de Machachi - Cantón Mejía – Provincia de Pichincha.

Facultad que auspicia:

Facultad De Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales.

Carrera que auspicia:

Ingeniería Agronómica.

Proyecto de investigación vinculado:

Proyecto “RECONOCIMIENTO DE GRUPOS FUNCIONALES ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DEL CULTIVO DE PAPA (*Solanum tuberosum*), EN LA LOCALIDAD DE MACHACHI, CANTÓN MEJÍA, PROVINCIA DE PICHINCHA”

Equipo de Trabajo:

Responsable del Proyecto Ing. M.Sc. Wilman Paolo Chasi Vizúete

Tutor: Ing. M.Sc. Paolo Chasi

Lector 1: Ing. Quimbiulco Klever

Lector 2: Ing. Carlos Torres

Lector 3: Ing. Richard Molina

Coordinador del Proyecto

Nombre: Jessica Alexandra Simbaña Ramos

Teléfonos: 0998663069

Correo electrónico: jessica.simbana2288@utc.edu.ec

Área de Conocimiento:

1.1. Línea de investigación:

1.1.1. Línea 1: Análisis, conservación y aprovechamiento de la biodiversidad local

La biodiversidad forma parte intangible del patrimonio nacional: en la agricultura, en la medicina, en actividades pecuarias, incluso en ritos, costumbres y tradiciones culturales. Esta línea esta enfocada en la generación de conocimiento para un mejor aprovechamiento de la biodiversidad local, basado en la caracterización agronómica, morfológica, genómica, física, bioquímica y usos ancestrales de los recursos naturales locales. Esta información será fundamental para establecer planes de manejo, de producción y de conservación del patrimonio natural.

Sub líneas de investigación de la Carrera:

- a) Caracterización de la biodiversidad

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

El siguiente proyecto describe la presencia de microorganismos existentes en la rizosfera del cultivo de papa, realizando el conteo de colonias en el laboratorio de la Universidad Técnica de Cotopaxi, utilizando medios de cultivo específicos para cada grupo funcional a identificar, siendo así; microbiota total, actinomicetos, bacterias fijadoras de nitrógeno y hongos.

Las muestras recolectadas fueron en diferentes sectores dentro de la Provincia de Pichincha, es por ello que la muestra tomada pertenece a la localidad de Machachi, resaltando que esta comunidad tiene como principal fuente de ingreso económico el cultivo de papa. En este sector se recolecto tres muestras de raíz y una general de suelo para el posterior análisis en laboratorio de la universidad, por otro lado se tomó una segunda muestra significativa de suelo para caracterizar las propiedades físico-químicas del mismo, este análisis se lo realizo en la Estación Experimental Santa Catalina (Iniap) - Departamento de Suelos, Plantas y Aguas, que posteriormente será utilizado para la discusión de los resultados.

En cuanto a los análisis de grupos funcionales se utilizó medios de cultivo como lo es el PDA (Papa dextrosa agar), Medio Agar Nutritivo y Tryptone Soya Agar; los cuales fueron ubicados con una población de suelo y raíz significativa enumerando 3 repeticiones por muestra para poder obtener un mayor número de datos al momento de contabilizar las colonias y conidios*gr.

Los datos se contabilizaron con ayuda del contador de colonias y la cámara de Neubauer, al obtener datos significativos se realizó el ingreso de los mismos al programa de Excel para comparar cuál de estas colonias tuvo mayor concentración en los medios de cultivo que se utilizó.

3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

En el Ecuador la papa es el principal producto de consumo alimenticio seguido del arroz, cebada, maíz entre otros, por lo cual incide en la economía del país involucrando a varias provincias y dando trabajo a decenas de agricultores. Estas localidades se encuentran ubicadas desde el nivel del mar hasta los 3700 msnm donde este cultivo por lo general se enfrenta a muchos problemas, uno de esos el deterioro del suelo lo cual afecta a la microbiota del suelo y se ve afectado en la productividad. Por ello es importante un estudio de la relación que existe entre microorganismos-planta permitiendo reconocer la relación entre el tipo de suelo, variedad de papa y la microbiota asociada. (Velez, 2018)

Los microorganismos, bacterias, hongos y actinomicetos son los más abundantes que podemos encontrar en el suelo en un rango aproximado 10^6 y 10^8 células por gramo de suelo pesando aproximadamente 10 000 kg/ha, que representa el 5 % del total de material orgánica seca presente en el suelo, en cuanto a hongos representando un 10 a 20% de la microbiota total, esto es aproximadamente 10^5 a 10^6 organismos / gramo de suelo. Un factor abiótico importante para la supervivencia de la microbiota es el pH, que actúa sobre la disponibilidad o la fijación de minerales nutritivos. En suelos con pH de 5.6 la mayoría de microorganismos son benéficos para los cultivos, en cuanto a bacterias necesitan nutrientes exudados que no son capaces de utilizar la materia orgánica como fuente de energía ya que esta es utilizada por los hongos, por esta razón es importante la aplicación de nutrientes para el desarrollo de microorganismos. Sin embargo la existencia de bacterias en la rizosfera en comparación con los microorganismos aumenta su crecimiento al utilizar sustratos con fuentes de carbono y nitrógeno, la cantidad de bacterias a encontrar depende de la temporada, vegetación, tipo de suelo, humedad, tipo de labranza y fertilización. El hábitad adecuado para bacterias es que las podemos encontrar adheridas a las partículas de suelo o a la raíz de la planta, la concentración de bacterias por gramo de suelo que se halla alrededor de las raíces de las plantas en la llamada rizosfera es mucho mayor que en el resto del suelo. Esto se debe a los altos niveles de nutrientes que se encuentra en la zona que rodea las raíces y permite el desarrollo de poblaciones microbianas.

Según Hilter (1904) en la rizósfera la interacción entre las bacterias y las raíces de las plantas puede ser beneficiosa, en este caso se puede considerar la rizósfera como una zona de amortiguación microbiológica en donde la microbiota sirve de protección a la planta frente al ataque de patógenos.

En cuanto al componente microbiano del suelo es muy importante para la salud de los ecosistemas. Los procesos agrícolas, así como el manejo de los recursos vegetales inciden sobre este componente afectando tanto a su biodiversidad como a la densidad de las poblaciones microbianas implicadas; los resultados a mediano y largo plazo pueden ser la pérdida de fertilidad de los suelos y su progresiva desertificación.

El presente trabajo de investigación tiene por objeto detectar actinomicetos, bacterias fijadoras de nitrógeno y hongos asociados a la rizosfera del cultivo de papa en la localidad de Machachi.

4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Hoy en día, el 33 por ciento de los suelos terrestres se hallan moderada o altamente degradados. Una mayor degradación de los suelos agrícolas, por ejemplo, podría tener consecuencias graves sobre la producción de alimentos y la seguridad alimentaria, incrementaría la volatilidad de los precios de alimentos, y potencialmente sumiría a millones de personas en el hambre y la pobreza. (Barcelona, 2018)

Ecuador no se escapa de esta realidad. En el país, alrededor del 49% de las tierras está degradado y un 22% se encuentra en proceso de desertificación. (Alarcón, 2018).

A nivel provincial se estima que un 50% de suelo agrícola está siendo afectado por la degradación hídrica o de labranza dentro de Pichincha, el 15% pertenece al Cantón Mejía donde el sector agrícola prevalece constantemente ya que es un sector de alta producción en papa, con al menos 15 ha de este cultivo, lo que abarca al 50.8% de población dedicada al trabajo agrícola.

A causa de problemas de desertificación el cultivo de papa se ha visto afectado debido a que por lo general este cultivo trastorna intensamente el suelo, lo degrada, erosiona y satura de nitratos. Durante la preparación del suelo, se afloja toda la capa superior y, sobre todo en los suelos pegajosos, se pulveriza para evitar que se formen grumos en los camellones donde se siembran las papas. La eliminación mecánica de la maleza y la cosecha mecanizada también remueven mucho el suelo. (FAO, 2008)

La papa se cultiva en más de 100 países, en clima templado, subtropical y tropical. Es esencialmente un "cultivo de clima templado", para cuya producción la temperatura representa el límite principal: las temperaturas inferiores a 10° C y superiores a 30° inhiben decididamente el desarrollo del tubérculo, mientras que la mejor producción ocurre donde la temperatura diaria se mantiene en promedio de 18° a 20° C. (FAO, 2008)

La papa es una planta que tiene una gran capacidad de adaptación y se da bien sin que el suelo ni las condiciones de cultivo sean ideales. Sin embargo, también es víctima de una serie de plagas y enfermedades. Para prevenir la acumulación de patógenos en el suelo los agricultores evitan cultivar papas en las mismas tierras todos los años. En cambio, rotan los cultivos en ciclos de tres o más años, alternando por ejemplo con maíz, frijoles y alfafa. Se evita producir otros cultivos vulnerables a los mismos patógenos de la papa –como el tomate– a fin de interrumpir el ciclo de desarrollo de las plagas. (FAO, 2008)

Con buenas prácticas agrícolas, incluida la irrigación cuando sea necesaria, una hectárea de papas en las regiones templadas del norte de Europa y de América del Norte, puede producir más de 40 toneladas de tubérculos frescos a cuatro meses de la siembra. Sin embargo, casi en todos los países desarrollados la producción promedio es mucho más baja, desde escasas 5 hasta 25 toneladas, debido a la falta de semillas de buena calidad y de cultivares mejorados, a un uso inferior de fertilizantes e irrigación, y a problemas de plagas y enfermedades. (FAO, 2008)

La papa (*Solanum tuberosum L.*) es uno de los cultivos alimenticios más importantes a nivel mundial, ocupa el cuarto lugar en importancia como alimento, después del maíz, el trigo y el arroz (Devaux, 2010). El rendimiento promedio del cultivo a nivel nacional fue de 7.3 t/ha, que esconde una gran variabilidad entre provincias, con una tendencia de gradiente de mayor a menor desde el norte (Carchi con 15.5 t/ha) hasta el sur (Loja con 1.9 t/ha) (ESPAC, 2015)

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Detectar de grupos funcionales asociados a la rizosfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*), en la localidad de Machachi.

5.2. Objetivos Específicos

- Determinar poblaciones de microbiota total asociadas a la rizosfera del cultivo de papa.
- Determinar poblaciones de bacterias, hongos y actinomicetos asociadas a la rizosfera del cultivo de papa.
- Analizar el comportamiento de las poblaciones de los grupos funcionales asociados a la rizosfera del cultivo de papa.

6. TABLA DE ACTIVIDADES POR OBJETIVO

Tabla I. Cuadro de actividades por objetivo

Objetivos específicos	Actividad (tareas)	Resultado de la actividad	Medio de verificación
Determinar poblaciones de microbiota total asociadas a la rizosfera del cultivo de papa.	<ul style="list-style-type: none"> • Delimitación del área de estudio. • Muestreo de suelo de cultivo de la papa. • Preparación de medio de cultivo 	<ul style="list-style-type: none"> • Área de investigación delimitada • Obtención de muestras de suelo del cultivo de papa. • Agar Nutritivo para microbiota total. 	<ul style="list-style-type: none"> • Mapa de la zona de muestra. • Registro y fichas de muestreo. • Concentración de colonias en el medio
Determinar poblaciones de bacterias, hongos y actinomicetos asociadas a la rizosfera del cultivo de papa.	<ul style="list-style-type: none"> • Muestreo de raíz del cultivo de papa • Preparación de medios de cultivos específicos • Siembra en los medios de cultivo por dos métodos a utilizar. 	<ul style="list-style-type: none"> • Obtención de muestras de raíz. • Cultivos de microorganismos en medios específicos (Tryptone soya agar y PDA) • Formación de colonias en los medios de cultivo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Registro y fichas de muestreo. • Protocolo de laboratorio y registro de siembras. • Concentración de colonias en los medios.
Analizar el comportamiento de las poblaciones de los grupos funcionales asociados a la rizosfera del cultivo de papa.	<ul style="list-style-type: none"> • Conteo de colonias y conidios de microbiota total del suelo de papa. • Conteo de colonias y conidios de actinomicetos, bacterias y hongos de la raíz de la papa. • Comparación de la incidencia entre los tres grupos funcionales encontrados en raíz. 	<ul style="list-style-type: none"> • Datos arrojados del contador de colonias • Datos arrojados de la cámara de Neubauer para conidios. • Incidencia de los tres grupos funcionales presentes en la raíz. 	<ul style="list-style-type: none"> • Tabla de colonias en Excel. • Tablas de conidios en Excel. • Barras comparativas de los tres grupos funcionales en Excel.

7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

7.1. Microbiota total del suelo

La microbiota del suelo tiene una gran variedad de microorganismos, que se encuentra formada por mezclas microscópicas de miles de millones de bacterias, actinomicetos, hongos, protozoos, etc. Esto por cada gramo de suelo, que cumplen un rol especial en procesos biogeoquímicos de la materia que se encuentra en este.

La población microbiana en la rizosfera es considerablemente mayor que en los suelos que carecen de ella y fisiológicamente más activa. La rizosfera puede considerarse como una zona amortiguadora microbiológica en donde la microflora sirve como protección a la planta ante un ataque de algún patógeno. (Olalde y Aguilera, 1998)

7.2. Grupos funcionales

Se define como grupos funcionales aquellas poblaciones microbianas que cumplen una determinada función y a su vez son indicadores de calidad del suelo, entre las que resaltan microorganismos cultivables relacionados con el ciclo del carbono y nitrógeno, actinomicetos y hongos, que participan sinérgicamente en el ciclado de nutrientes para la recuperación de suelos contaminados o en proceso de degradación para mejorar las propiedades físico-químicas del mismo. (Jorge Andrés & Jorge Alberto, 2019)

7.3. Actinomicetos

Los actinomicetos son bacterias filamentosas, Gram positivas, que se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente, son microorganismos con propiedades quitinolíticas, alto contenido de guanina y citosina en su DNA, característica que los hace morfológicamente diversos entre sí y ayuda a diferenciarlos de otras bacterias Gram positivas. (El-Tarabily KA, 2008)

Debido a su amplia distribución, se pueden encontrar en superficies rocosas y en suelo rizosférico, ricos en humus, hojarasca y estiércol, sedimentos marinos. La mayoría de las especies son heterótrofas, aerobios, mesófilas, crecen en un rango de temperatura entre 25°C y 30°C y son poco tolerantes a la acidez, razón por la cual requieren pH neutro para su óptimo crecimiento, aunque crecen en un rango de pH entre 5.0 y 9.0. (El-Tarabily KA, 2008)

7.4. Bacterias Fijadoras de Nitrógeno

El nitrógeno que respiran los organismos no es utilizable directamente y solo algunas plantas en simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno pueden originar compuestos absorbibles y susceptibles de incorporarse al suelo o a los seres vivos, es decir, que son aprovechables. Es

aquí donde se evidencia el papel vital que tienen dichas plantas para la vida y los seres vivos. (Symborg, 2020)

La simbiosis que establecen las plantas con las bacterias fijadoras de nitrógeno proporciona beneficios durante la vida en común a ambos simbioses. Las bacterias pueden aprovechar directamente el nitrógeno del aire, originando los compuestos absorbibles. Dicha fijación de nitrógeno se realiza en los nódulos radiculares, gracias a la catálisis del complejo enzimático nitrogenado. (García, 2011)

Dentro de las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno encontramos dos grupos de organismos. Al primer grupo pertenecen bacterias móviles del suelo, que son atraídas hacia la raíz por compuestos que ésta libera. (García, 2011)

7.5. Hongos

Los hongos del suelo juegan un papel clave en los procesos de descomposición que mineralizan y reciclan nutrientes de plantas. En el suelo, los hongos interactúan con una compleja comunidad microbiana que incluye: bacterias, actinomicetos (actinobacterias) y pequeños invertebrados.

Los hongos son una parte importante de la cadena alimenticia en el suelo, principalmente para la mesofauna que habita en el suelo (Bonkowski, 2000). En los ecosistemas agrícolas, los patógenos de plantas actúan en el suelo y en la rizósfera, causando una notable reducción en las cosechas y afectando su calidad. (Wainwright, 2015)

7.6. Beneficios de bacterias en la rizósfera

Las bacterias de la rizósfera son capaces de generar una amplia variedad de metabolitos secundarios, que pueden tener una influencia positiva (STURZ & CHRISTIE, 2003), sobre:

- El crecimiento y desarrollo de las plantas.
- Mejoran la disponibilidad de minerales y nutrientes en el suelo.

7.7. Métodos de siembra

7.7.1. Método de diluciones seriadas

La metodología de recuento en placa consiste en realizar diluciones seriadas 1:10 y extender 1000µl de cada dilución en cajas Petri, estas placas se incuban hasta que las colonias son apreciables para su recuento. Esta metodología tiene la ventaja de tener un buen límite de detección de colonias de microorganismos.

7.7.2. Método de siembra de fragmentos de raíz

La metodología de siembra directa consiste en cortar fragmentos de 1cm de zona basal, zona intermedia y zona apical de la raíz del cultivo.

7.7.3. Técnica de tinción

La tinción consiste en la coloración de células de los microorganismos Gram positivas de color azul, rojo o violeta y las Gram negativas no se tiñen, tras ser suspendidas a diversos colorantes como: azul de metileno, cristal violeta, safranina. (Vázquez, Ana Martín, & Serrano, 2010)

7.8. Papa

La papa, es uno de los cultivos más importantes de la región interandina, constituyendo una de las fuentes vegetales más nutritivas, debido a que su contenido en carbohidratos y proteínas es mucho más alto que el que se encuentra en los cereales, raíces y otros tubérculos, motivo por el cual en el Ecuador, hace parte de los productos que constituyen la canasta básica popular.

El Instituto de Estadísticas y Censos (INEN), manifiesta que el cultivo de la papa en el Ecuador, ocupa una superficie de 66 000 hectáreas, con una producción promedio de 480 000 toneladas métricas anuales.

Según el mismo INEN, a este cultivo se dedican en el país alrededor de 42 000 familias, tanto por su importancia nutricional, como por el aporte económico que representa a sus economías.

7.8.1. Características generales

Solanum tuberosum es una planta herbácea, tuberosa, perenne a través de sus tubérculos, caducifolia (ya que pierde sus hojas y tallos aéreos en la estación fría), de tallo erecto o semi-decumbente, que puede medir hasta 1 m de altura.

Sus tallos son llenos, con hojas muy hendidas, flores variando del blanco al violeta, según la variedad existiendo algunas variedades que no florecen y otras que sus flores no forman semillas. La papa es un tubérculo que se forma en las puntas de una ramificación subterránea del tallo, llamada estolón o rizoma; ocasionalmente se forman a lo largo de los propios tallos subterráneos. De acuerdo con la variedad toman diferentes formas, tamaño u color. La formación de los tubérculos se inicia generalmente cuando las plantas alcanzan 25 cm. de altura o de 5 o 6 semanas después de la siembra y están listos para cosecharse a los 120 días.

7.8.2. Taxonomía

Reino : Plantae

División: Magoliophyta

Clase : Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden : Solanales

Familia : Solanáceas

Género : Solanum

Especie : Teberosum

7.9. Características del suelo

Los sectores más adecuados para el cultivo de la papa, se ubican desde los 2400 a 3700 metros sobre el nivel del mar, especialmente donde predominan los suelos negros andinos. Los tubérculos de carne ligera y suave prefieren los suelos francos, arenosos y ricos; mientras que los suelos húmedos y pesados dan lugar a tubérculos de carne más firme. (Cuesta, y otros, 2014)

- PH: 5.5 - 7.0
- Precipitación Pluvial: 1.200 mm
- Altitud: 2400 a 3700 msnm
- Temperatura: 15°C - 28°C
- Humedad Relativa: 70 - 90%
- Pendiente: 25%

8. METODOLOGÍA

Objetivo 1. Determinar poblaciones de microbiota total asociadas al suelo de cultivo de papa.

Actividad 1. Delimitación del área de estudio.

Una de las zonas más productoras de papa dentro de la Provincia de Pichincha es el Cantón Mejía, por lo cual las muestras recolectadas son de la Parroquia de Machachi-Barrio San Miguel, una vez identificada la zona se tomó puntos GPS con ayuda del programa Andy GPS, que es un programa de descarga libre y precisión, el cual nos ayuda a identificar de donde se obtuvieron las diferentes muestras recolectadas y a su vez con la ayuda de Google Maps tomar una referencia puntual de donde se encuentra el lote.

Figura 1. Levantamiento topográfico del lote



Altitud	3530 msnm
Coordenadas	X 778668 Y 9944964

Fuente: (Google Maps, 2014)

Actividad 2. Muestreo de suelo de cultivo de la papa.

1. Recolección

Según Sosa (2012) La muestra para suelo debe tener al menos 1kg y esta debe ser tomada en forma de zigzag en zonas libres del cultivo, donde no afecte la fertilización inorgánica o surcado, por lo general la profundidad de estas muestras deben ir de 20 a 30 cm.

2. **Empaquetado y etiquetado de muestras tomadas.**

Las muestras fueron colocadas en fundas con cierre impermeable para que no hubiera pérdidas de tierra en el traslado y fueron enumeradas con las siglas F1, F2, F3; para conocer que parte del suelo se tomaron cada una de ellas.

Actividad 3. Preparación de medio de cultivo

1. **Medio Agar nutritivo** (*Anexo 6*)

Se pesó 2,76gr de Agar con ayuda de la balanza, el cual se disolvió en 120ml de agua destilada y se agito por 1 minuto hasta que el agar se encontrar disuelto en su totalidad.

Una vez lista la mezcla se colocó en el autoclave durante 15 minutos a 121°C, para que la mezcla se lograra homogenizar totalmente; una vez transcurrido el tiempo se dejó enfriar por unos minutos los vasos de precipitación para que la mezcla no se encontrara aun en un estado de cocción elevado.

Finalmente colocamos 20ml de medio en cada una de las cajas Petri (3 observaciones* repetición) y se dejó reposar por 24 horas para que lograra condensarse en la Cámara de flujo laminar.

2. **Disolución de muestra de suelo** (*Anexo 3*)

Se colocaron siete tubos de ensayo cada uno con 9ml de agua destilada para realizar las diluciones de la muestra a los valores de -1 hasta la -7; siendo los tubos con dilución -6 y -7 escogidos para la posterior siembra en cajas Petri.

Se tomó 10gr de suelo y se colocaron en un matraz que contenia 90ml de agua destilada, después se agito vigorosamente hasta que la solución lograra homogenizarse totalmente, luego de esto con ayuda de una micropipeta se tomó 1ml de la disolución y se la traslado al primer tubo (-1) para realizar el mismo procedimiento hasta llegar al tubo de dilución -7.

3. **Colocación de muestra de suelo en medio de cultivo**

Una vez condensando el medio de cultivo en las caja Petri en la cámara de Flujo Laminar se procedió a la toma de 100 µl (0,1ml) de muestra que se encontraba en los tubos de ensayo (-6 y -7) y colocarlo en el medio de cultivo sin levantar a una mayor altura la tapa de la caja para evitar el ingreso de patógenos ajenos al medio, se distribuye la disolución equitativamente por toda la caja Petri con la ayuda de una aza de Drigalsky.

Finalmente se sella con cinta para film sin dejar espacios abiertos en la caja y se deja reposar durante 5 a 6 días para que se desarrolle el medio con total libertad colocando cada una de las cajas en la incubadora de laboratorio a una temperatura de 37°C.

Objetivo 2. Determinar poblaciones de actinomicetos, bacterias fijadoras de nitrógeno y hongos asociadas a la rizosfera del cultivo de papa.

Actividad 1. Muestreo de la raíz del cultivo de papa

1. Recolección

La recolección de muestras de raíz se la realiza de acuerdo a Sosa (2012) donde indica que las muestras deben ser tomadas preferentemente alrededor de las zonas de crecimiento radicular, en general entre 10 a 30cm. de profundidad, y deben incluir suelo y raíces. El suelo no debe estar muy húmedo ni muy seco.

Se tomaron tres muestras del terreno con tres submuestras cada una, el cultivo estuvo dentro de los 3 meses de etapa fenológica donde se puede evidenciar mayor crecimiento radicular pero sin que haya crecimiento de tubérculos.

2. Toma de partes vegetales (maceración y fragmentos) (Anexo 4 y Anexo 5)

Las raíces se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0.5% por dos minutos, esto se realiza para la muerte superficial de patógenos que pueden contaminar al medio de cultivo. Posteriormente se dejaron secar completamente en papel con el fin de que no quede rastro de agua en ellas.

Luego de que esto suceda se procedió a macerar las raíces tomadas con ayuda de un recipiente hasta quedar totalmente maceradas para proceder a la toma de muestras.

3. Disoluciones de las partes vegetales en agua destilada (maceración)

Se colocaron siete tubos cada uno con 9ml de agua destilada para realizar las disoluciones de la muestra a los valores de -1 hasta -7; siendo los tubos con dilución -6 y -7 escogidos para la posterior siembra en cajas Petri.

Se tomó 1ml de muestra y se procedió a colocar en el primer tubo (-1) con 9ml de agua destilada, se agitó vigorosamente hasta que toda muestra logre mezclarse, acabado este proceso se procedió a la toma de 1ml del tubo para pasarlo por los otros tubos de ensayo y así dejar lo mayormente limpia la muestra hasta llegar a la disolución -7.

4. Toma de partes vegetales (fragmentos de raíz)

De las tres muestras obtenidas del terreno previamente lavadas se tomaron raíces lo mayormente desarrolladas, cada una de estas se dejó secar sobre papel para posteriormente ser cortadas de más o menos 1cm de largo con ayuda de un estilete y separando de la muestra general.

5. Preparación de medios de cultivo específicos.

Agar Papa dextrosa (*Anexo 6*)

Se pesó 14,04gr de Agar con ayuda de la balanza, el cual se disolvió en 360ml de agua destilada y se agito por 1 minuto hasta que el agar se encontrar disuelto en su totalidad.

Una vez lista la mezcla se colocó en la autoclave durante 15 minutos a 121°C, para que la mezcla se lograra homogenizar totalmente; una vez transcurrido el tiempo se dejó enfriar por unos minutos los vasos de precipitación para que la mezcla no se encontrara aun en un estado de cocción elevado.

Finalmente colocamos 20ml de medio en cada una de las cajas Petri (3 observaciones* muestra* método de siembra) y se dejó reposar por 24 horas para que lograra condensarse en la Cámara de flujo laminar.

Agar Papa dextrosa + Tritón (*Anexo 5*)

Se pesó 14,04gr de Agar papa dextrosa con ayuda de la balanza, el cual se disolvió en 360ml de agua destilada y se agito por 1 minuto hasta que el agar se encontrar disuelto en su totalidad.

Una vez lista la mezcla se colocó en la autoclave durante 15 minutos a 121°C, para que la mezcla se lograra homogenizar totalmente; una vez transcurrido el tiempo se dejó enfriar por unos minutos los vasos de precipitación para que la mezcla no se encontrara aun en un estado de cocción elevado.

Finalmente colocamos 20ml de medio en cada una de las cajas Petri (3 observaciones* muestra* método de siembra) y se dejó reposar por 24 horas para que lograra condensarse en la Cámara de flujo laminar, una vez listo el medio nutritivo se coloca con ayuda de un gotero 15 gotas de Tritón por caja y se lo distribuye sobre todo el medio esto hace que el desarrollo en la caja Petri sea exclusivo para Hongos.

Tryptone Soya Agar (Anexo 8)

Se pesó 14.4gr de medio con ayuda de la balanza, el cual se disolvió en 360ml de agua destilada y se agito por 1 minuto hasta que el agar se encontrar disuelto en su totalidad.

Una vez lista la mezcla se colocó en la autoclave durante 15 minutos a 121°C, para que la mezcla se lograra homogenizar totalmente; una vez transcurrido el tiempo se dejó enfriar por unos minutos los vasos de precipitación para que la mezcla no se encontrara aun en un estado de cocción elevado.

Finalmente colocamos 20ml de medio en cada una de las cajas Petri (3 observaciones* muestra* método de siembra) y se dejó reposar por 24 horas para que lograra condensarse en la Cámara de flujo laminar.

Actividad 3. Siembra en los medios de cultivo por dos métodos a utilizar

1. Colocación de muestra de raíz en medio de cultivo (maceración)

Una vez condensando el medio de cultivo en las caja Petri en la cámara de Flujo Laminar se procedió a la toma de 1ml de muestra que se encontraba en los tubos de ensayo (-7) y colocarlo en el medio de cultivo sin levantar a una mayor altura la tapa de la caja para evitar el ingreso de patógenos ajenos al medio, se distribuye la disolución equitativamente por toda la caja Petri.

Finalmente se sella con cinta para film sin dejar espacios sin sellar en la caja y se deja reposar durante 5 a 6 días para que se desarrolle el medio con total libertad colocando cada una de las cajas en la incubadora de laboratorio a una temperatura de 37°C.

2. Colocación de muestra de raíz en medio de cultivo (fragmentos)

Una vez listos los medios de cultivo se proceden a tomar los fragmentos de raíz previamente cortados con ayuda de pinzas desinfectadas, vamos colocando partes de la raíz separadas entre sí para permitir que las bacterias se logren desarrollar sin impedir el paso a las otras y tener una mayor visibilidad de las mismas.

Colocamos las muestras de raíz dentro del medio de cultivo, pero dejando una parte de la misma por fuera para que pueda adquirir un mayor desarrollo y finalmente se sella con cinta para film sin dejar espacios abiertos durante 5 o 6 días hasta tener un desarrollo visible en la caja a temperatura de 37°C en la incubadora.

Objetivo 3. Analizar el comportamiento de las poblaciones de los grupos funcionales asociados a la rizosfera del cultivo de papa.

Actividad 1. Conteo de colonias y conidios de microbiota total del suelo de papa

1. Conteo de colonias de Microbiota total del suelo

Una vez listas las cajas Petri con la muestra desarrollada en ella se procede a contar la cantidad de colonias que se puede observar con ayuda de la Cámara de conteo de colonias en el laboratorio. Esta nos permite contabilizar la cantidad de colonias más visiblemente ya que cuenta con una lupa para aumentar la visión de las mismas.

La función de esta cámara es la de llevar un registro por cada punto de presión que se realice en ella y se va sumando en su marcador, es decir, que nosotros con ayuda de un lápiz con punta de goma vamos realizando pequeños toques en cada colonia que veamos y el marcador de la cámara lo va registrando hasta finalmente acabar de contar todas las colonias.

2. Conteo de conidios de Microbiota total del suelo

Una vez realizado el conteo de colonias procedemos a utilizar la Cámara de Neubauer que es una caja pequeña que cuenta con dos cuadrantes diminutos visibles solo al lente del microscopio y este nos sirve para obtener la cantidad promedio de conidios que se encuentra dentro de una muestra de colonias.

Con ayuda de tubos de precipitación y agua destilada tomamos muestras significativas y superficiales de colonias desarrolladas en el medio nutritivo y lo disolvemos en los tubos para después agitarlos hasta obtener una mezcla homogénea.

Una vez realizada la mezcla procedemos a tomar una pequeña muestra de no más de 0.5ml de la disolución del tubo y la colocamos en las dos rendijas que tiene la cámara de Neubauer para después colocarla debajo del lente del microscopio y observar los conidios.

Se realiza observaciones y conteo de conidios tanto del primer cuadrante como del segundo; sabiendo que los cuadros exteriores son por donde se inicia el conteo (20 datos en total por cuadrante).

Actividad 2. Conteo de colonias y conidios de actinomicetos, bacterias fijadoras de nitrógeno y hongos de la raíz de la papa.

1. Conteo de colonias de bacterias, hongos y actinomicetos (maceración y fragmentos)

Una vez listas las cajas Petri con las muestras desarrolladas en ellas se procede a contar la cantidad de colonias que se observan con ayuda de la Cámara de conteo de colonias en el laboratorio. Esta nos permite contabilizar la cantidad de colonias más visiblemente ya que cuenta con una lupa para aumentar la visión de las mismas.

La función de esta cámara es la de llevar un registro por cada punto de presión que se realice en ella y se va sumando en su marcador, es decir, que nosotros con ayuda de un lápiz con punta de goma vamos realizando pequeños toques en cada colonia que veamos y el marcador de la cámara lo va registrando hasta finalmente acabar de contar todas las colonias de cada uno de los grupos funcionales.

2. Conteo de conidios de bacterias, hongos y actinomicetos (maceración y fragmentos)

Una vez realizado el conteo de colonias procedemos a utilizar la Cámara de Neubauer que es una caja pequeña que cuenta con dos cuadrantes diminutos visibles solo al lente del microscopio y este nos sirve para obtener la cantidad promedio de conidios que se encuentra dentro de una muestra de colonias.

Con ayuda de tubos de ensayo y agua destilada tomamos muestras significativas y superficiales de colonias desarrolladas en el medio nutritivo y lo disolvemos en los tubos para después agitarlos hasta obtener una mezcla homogénea.

Una vez realizada la mezcla procedemos a tomar una pequeña muestra de no más de 0.5ml de la disolución del tubo y la colocamos en las dos rendijas que tiene la cámara de Neubauer para después colocarla debajo del lente del microscopio y observar los conidios.

Se realiza observaciones y conteo de conidios tanto del primer cuadrante como del segundo; sabiendo que los cuadros exteriores son por donde se inicia el conteo (20 datos en total por cuadrante).

Actividad 3. Comparación de la incidencia entre los tres grupos funcionales encontrados en raíz.

1. Incidencia de microbiota en la muestra de suelo

Una vez obtenidos los datos finales del conteo de colonias y conidios de la microbiota total del suelo se lleva a cabo el ingreso de los mismos al programa de Excel para realizar una comparación entre las dos repeticiones que se realizaron de la misma técnica y así conocer en que repetición de encontró mayor incidencia de colonias y conidios.

Con ayuda de tablas estadísticas logramos diferenciar la presencia de colonias tanto en la primera repetición como en la segunda y lograr obtener una conclusión más específica, recordando que las unidades en las que se encuentran medidas las colonias son $\text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ y los conidios de estas se encuentran medios en conidios $\cdot \text{g}^{-1}$.

2. Incidencia de bacterias, hongos y grupos funcionales en la raíz del cultivo de papa

Se contabilizaron tanto colonias como conidios de estos tres grupos funcionales y se procedió a su registro en el programa de Excel para conocer mediante el uso de barras que grupo funcional se encontró en mayor cantidad en las muestras de raíz tanto de la técnica de siembra por maceración como la de fragmentos de raíz.

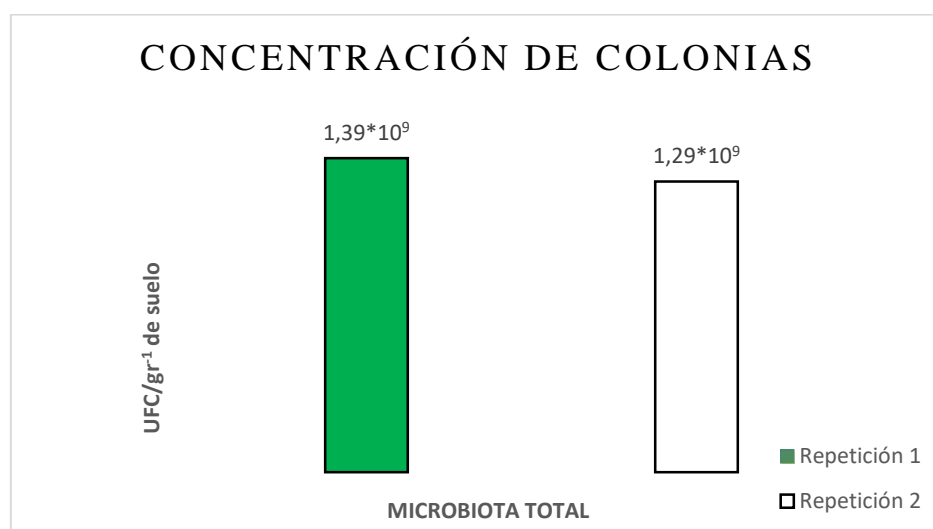
Se realizó una comparación entre las tres muestras tomadas para cada grupo funcional y conocer en cuál de ellas se vio mayor cantidad de colonias y conidios y finalmente se realiza una comparación entre los grupos funcionales de las dos repeticiones y una general entre de todos los grupos funcionales de ambas técnicas.

9. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Las muestras para la presente investigación fueron tomadas cuando el cultivo de papa se encontraba en los tres primeros meses de etapa fenológica, donde se realizó el conteo de colonias y conidios formados en los tres grupos funcionales (actinomicetos, bacterias fijadoras de nitrógeno y hongos), con más incidencia dentro de la rizosfera del cultivo; en 3 muestras diferentes de raíz y 1 muestra de suelo.

9.1 Poblaciones de los microorganismos totales (UFC/g de suelo) encontradas en el cultivo de papa establecidas para el estudio del suelo de la localidad de Machachi-2021.

Figura 2. Concentración de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/g) de suelo



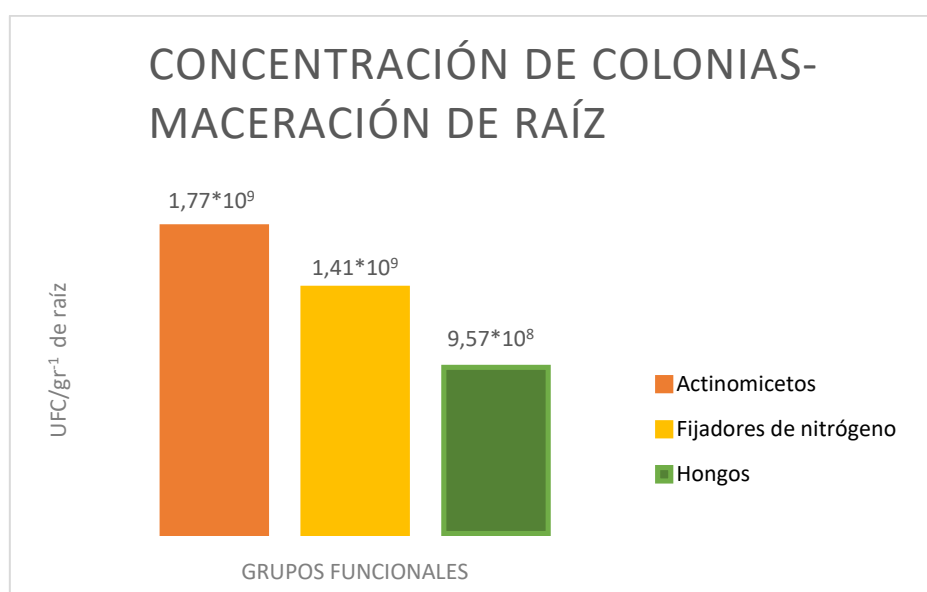
En cuanto a microbiota total se realizó con el método de diluciones seriadas a partir de una porción de suelo, donde se utilizaron dos repeticiones de muestras de suelo para obtener promedios de microorganismos totales que sean significativos, debido a que la concentración de colonias debe ir de 10 a 300 por gramo de suelo; siendo así en la repetición (1), 417 colonias formadas lo que equivale a $1,39 \cdot 10^9$ UFC/g⁻¹, mientras que en la repetición (2), 386 colonias formadas lo que equivale a $1,28 \cdot 10^9$ UFC/g⁻¹.

Se puede evidenciar en la Figura (2) que no existe gran varianza en los resultados de colonias formadas, ya que el suelo de donde se tomó las muestras contiene propiedades físico-químicas que son excelentes para la supervivencia de microorganismos con cantidades que se encuentran dentro de los límites para que el suelo de esta área sea considerado de calidad (sano y fértil), según Moratto (2005) la presencia de microorganismos depende de la disponibilidad de los

principales nutrientes como es: nitrógeno, fósforo, potasio y materia orgánica, debido a que lo utilizan como fuente de alimento, degradación y reciclado para los procesos bioquímicos donde existe la relación microorganismo-suelo-planta.

9.2. Poblaciones de los grupos funcionales (UFC/g de raíz) encontradas en el cultivo de papa establecidas para el estudio de raíz en la localidad de Machachi-2021.

Figura 3. Concentración de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/g) de macerado de raíz

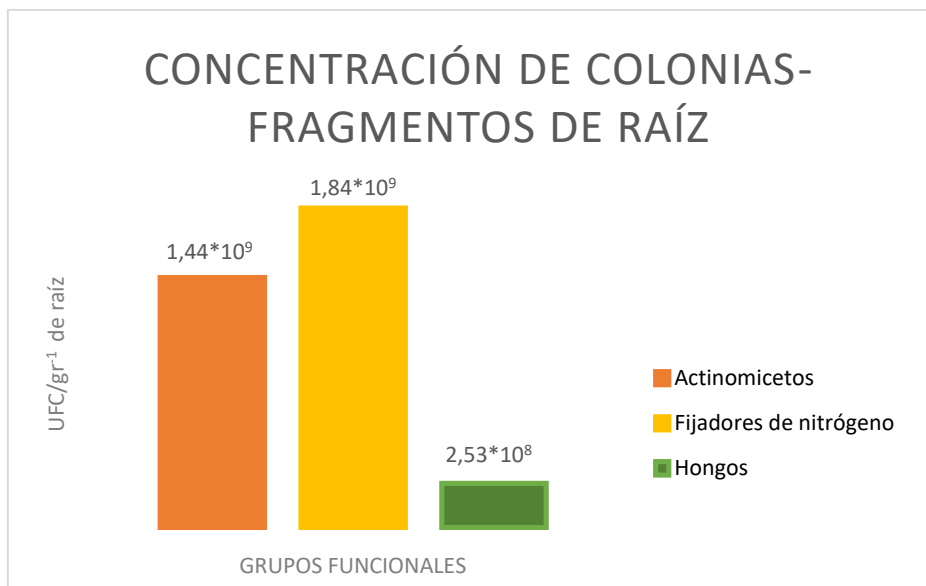


Para raíz utilizamos dos métodos de siembra uno por macerado (diluciones) y por fragmentación de raíz de papa, obteniendo resultado: actinomicetos 530, fijadoras de nitrógeno 424 y hongos 287 colonias en maceración de raíz, mientras que en fragmentación: actinomicetos 432, fijadoras de nitrógeno 552 y hongos 76 colonias.

Se observa en la figura (3) el alto contenido de colonias de actinomicetos por gramo de suelo, esto puede darse a que el suelo donde se hizo la recolección es la primera vez que se cultiva papa por ende no se encuentra deteriorado y cuenta con un alto contenido de materia orgánica. Tomando en cuenta que el gran contenido de materia orgánica presente en el suelo provoca cantidades de actinomicetos superiores a los de bacterias y hongos. Según Silva (2004) la población de actinomicetos es de gran interés para determinar la calidad del suelo, porque su presencia demuestran que el suelo es sano y que mantiene los niveles de nutrientes elevados para ser productivo. Sin embargo las bacterias y hongos no se quedan atrás con la incidencia encontrada ya que el pH y los diferentes nutrientes son aptos para el crecimiento de los mismos

dentro de la rizosfera, de tal manera que estos dos grupos funcionales ayudan a la captación de agua y nutrientes del suelo y no hay mucha competencia con los actinomicetos.

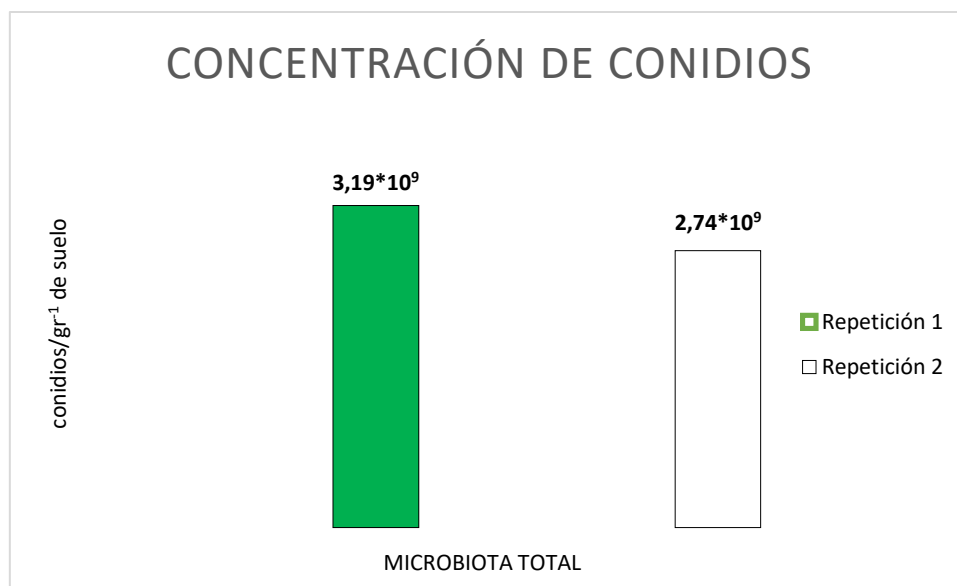
Figura 4. Concentración de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/g) de siembra por fragmentos de raíz



Se determinó en la figura (4) más presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno debido a que la fijación del mismo en la rizósfera es de manera biológica donde realizan algunas bacterias diazotróficas especialmente las del género *Azobacter* y *Azospirillum*, tomando en cuenta el análisis de suelo se puede evidenciar que las características físicas y químicas incluyendo contenido de materia orgánica, humedad, relación carbono nitrógeno y pH, las condiciones climáticas y exudados de las raíces de las plantas sirven de nutrientes para la presencia de estas poblaciones bacterianas, según Lara (2007) la fijación biológica del nitrógeno (fbn) por bacterias diazotróficas han contribuido a incrementar el rendimiento en las cosechas, reduciendo la necesidad de fertilizantes nitrogenados y la emisión de gases tóxicos como el N₂O, obteniendo beneficios económicos y ambientales.

9.3. Concentración de conidios de los grupos funcionales (conidios/ g de suelo) encontrados en el cultivo de papa establecidas para el estudio del suelo en la localidad de Machachi-2021. .

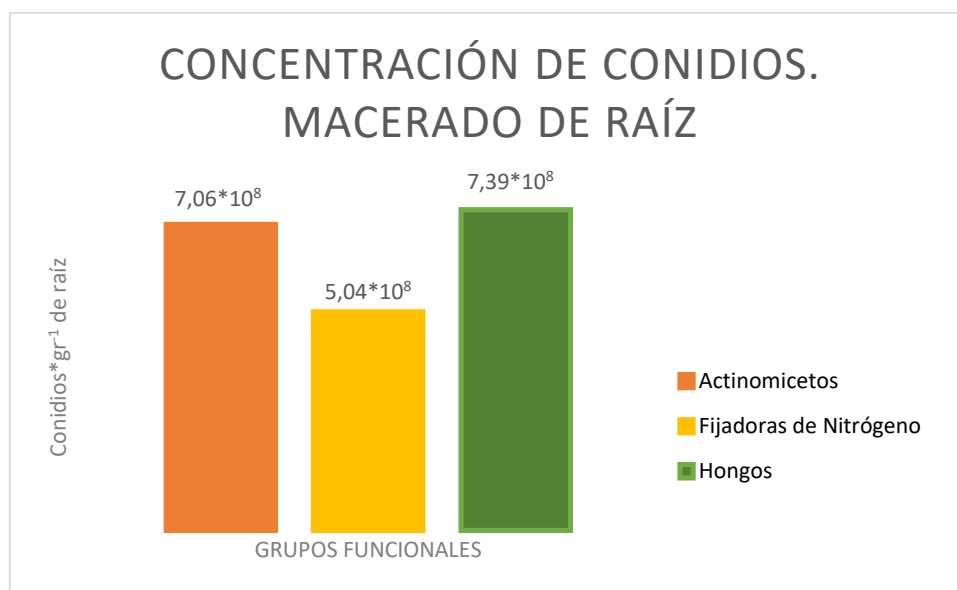
Figura 5. Promedios generales de concentración de conidios/g de suelo



La concentración de conidios se calcula con el promedio de las 20 lecturas de la cámara de Neubauer, para considerar la calidad del suelo

Se puede identificar en la figura (5) que la repetición 1 existe más concentración de conidios esto debido a la pureza del medio de cultivo y por la cantidad de colonias formadas de los grupos funcionales encontrados, tomando en cuenta las estructuras de cada microorganismo. Según Charnely (2007) para determinar la estructura de conidios se puede apreciar en conidios y blastosporas (formación de cadenas o racimos).

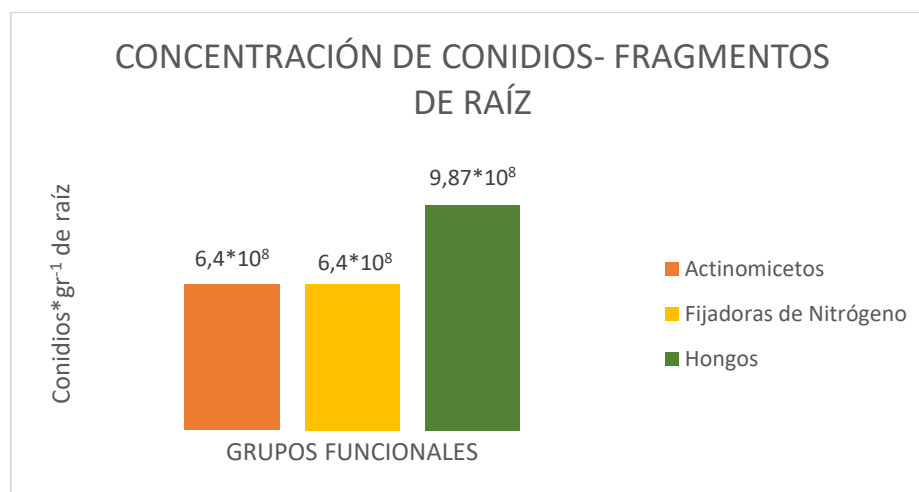
Figura 6. **Concentración de conidios/g de macerado de raíz**



Se determinó que en la figura (6) que en hongos la concentración de conidios es más precisa porque es evidente observar a través del microscopio conidios redondos, una estructura propia de los mismos. Según Charnely (2007) para determinar la estructura de conidios se puede apreciar en conidios y blastosporas (formación de cadenas o racimos).

Según Nagahashi (2005) los hongos que viven dentro de las células de las raíces de las Solanáceas, promueven el crecimiento de la planta, sin embargo necesitan materia orgánica abundante para la supervivencia de los mismos. Actualmente, investigadores no pueden cultivar el hongo sin un huésped porque el hongo no puede completar su ciclo de vida sin los nutrientes orgánicos u otros estímulos que recibe de las raíces.

Figura 7. **Concentración de conidios/g de fragmentos de raíz**



Evidentemente en la figura (7) la mayor concentración de conidios tiene hongos porque esta estructura es una sola de manera redonda y en cada cuadrante puede haber más de 10 dependiendo la concentración de colonias. Según Charnely (2007) para determinar la estructura de conidios se puede apreciar en conidios y blastosporas (formación de cadenas o racimos).

Así también Solano (2016) nos indica que los hongos benéficos asociados a la rizosfera pueden sintetizar sustancias que promueven el crecimiento de la planta fijando N atmosférico, solubilizando hierro (Fe) o P inorgánico o mejorando la tolerancia al estrés por sequía, salinidad, metales tóxicos o exceso de pesticidas.

10.PRESUPUESTO

Recursos	Cantidad	V. Unitario	Valor Total
Equipos			
GPS	1	\$174,00	\$174,00
Cámara de flujo laminar	1	\$5 980,00	\$5 980,00
Cámara de Neubauer	1	\$67,00	\$67,00
Contador de colonias	1	\$338,00	\$338,00
Estufa	1	\$807,00	\$807,00
Autoclave	1	\$489,00	\$489,00
Microscopio óptico	1	\$469,80	\$469,80
Transporte y salida de campo			
Camionetas	7	\$2,50	\$17,50
Bus interprovincial	12	\$7,00	\$84,00
Bus	12	\$0,30	\$3,60
Materiales y suministros			
Pipeta	4	\$0,09	\$0,36
Portaobjetos	15	\$4,00	\$60,00
Vasos de precipitación	3	\$1,50	\$4,50
Tubos de ensayo	21	\$0,15	\$3,15
Cinta adhesiva	1	\$0,80	\$0,80
Fundas con cierre hermético	11	\$0,45	\$4,95
Marcador	1	\$0,85	\$0,85
Papel para film	1	\$71,00	\$71,00
Cajas Petri	120	\$0,35	\$42,00
Pinzas	1	\$1,00	\$1,00
Azas	3	\$0,45	\$1,35
Agares y soluciones			
Agar nutritivo	1	\$51,99	\$51,99
Potato dextrosa Agar	1	\$62,50	\$62,50
Tryptone Soya Agar	1	\$59,99	\$59,99
Tritón	1	\$25,75	\$25,75

Tintura de valeriana	1	\$4,95	\$4,95
Tintura de Yodo	1	\$1,98	\$1,98
Alcohol	1	\$8,98	\$8,98
Agua destilada	5	\$2,35	\$11,75
Safranina	1	\$15,00	15,00
Material Bibliográfico y fotocopias.			
Internet	20	\$0,60	\$12,00
Impresiones	240	\$0,10	\$24,00
Copias	1	\$6,50	\$6,50
TOTAL			\$ 8'971,45

11. CONCLUSIONES

Se demuestra que mediante la aplicación de la metodología planteada en la investigación se pudo detectar la presencia de microbiota total y grupos funcionales asociados a la rizosfera de la papa

Se determinó que la cantidad promedio de Microbiota total encontrada en el suelo asociado a la rizosfera de la papa en la Parroquia de Machachi, de entre las dos repeticiones fue de $2,68 \cdot 10^9$ UFC*gr⁻¹ que nos indica que la presencia de microorganismos es considerada dentro de los rangos valido para que un suelo pueda ser sano y productivo

En cuanto a la contabilización de Actinomicetos asociados a la rizosfera de la papa mediante la siembra por maceración y siembra por fragmentos de raíz fue $1,77 \cdot 10^9$ UFC*gr⁻¹ y $1,44 \cdot 10^9$ UFC*gr⁻¹ respectivamente.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno contabilizadas asociados a la rizosfera de la papa fue $1,41 \cdot 10^9$ UFC*gr⁻¹ y $1,84 \cdot 10^9$ UFC*gr⁻¹, en siembra por fragmentos de raíz, y siembra por maceración respectivamente

Los hongos contabilizados en la rizosfera de la papa fueron $9,57 \cdot 10^8$ UFC*gr⁻¹ en siembra por fragmentos de raíz, siendo esta mayor a los contabilizados en siembra por maceración con $2,5 \cdot 10^8$ UFC*gr⁻¹

12. RECOMENDACIONES

Utilizar medios de cultivos específicos para grupos funcionales de suelo como solubilizadoras de fósforo, celulíticos y pseudomonas

Realizar la determinación de los consorcios bacterianos mediante análisis genómicos; para la jerarquización y asociación por familias de bacterias y hongos

Es recomendable identificar las características y función de cada grupo de microorganismos y su posterior cultivo con fines de regeneración de suelos de cultivo y recuperación de la microbiología existente

Finalmente se debe tener en cuenta que para la toma de suelos es necesario realizar un análisis del mismo previo al estudio o desarrollo de cualquier actividad en relación a este, debido a que si se conoce la carencia del suelo en estudio se podrá conocer el porqué de los datos obtenidos atreves de la investigación realizada.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alarcón, I. (24 de Junio de 2018). La mitad de las Tierras en Ecuador muestran signos de degradación. *EL COMERCIO*.
- Barcelona, C. U. (10 de Mayo de 2018). Estado actual del recurso suelo. *UNIBA*. Obtenido de <https://www.unibarcelona.com/int/actualidad/noticias/estado-actual-del-recurso-suelo>
- Bernal, G. (14 de Abril de 2005). Determinación de la calidad microbiológica del compost para la producción ecológica de cultivos en la región Interandina. *MIPE*, 1-9. Obtenido de <https://repositorio.iniap.gob.ec>
- Bonkowski, M. G. (2000). Food preference of earthworms for soil fungi. *Pedobiologia*, 44, 666 – 676. doi:S0031405604700803
- Charleny, S. (2007). Environmental and Microbial relationships. *IO*, 159-187.
- Cuesta, X., Rivadeneira, J., Pumisacho, M., Montesdeoca, F., Velazques, J., Reinoso, I., & Monteros, C. (2014). Manual de cultivo de papa para pequeños productores. *INIAP*, 4-102. doi:41000/3033/1/iniapscm78
- El-Tarabily KA, N. ., (2008). Promotion of growth of bean (*Phaseolus vulgaris* s L.) in a calcareous soil by a phosphate-solubilizing, rhizosphere-competent isolate of *Micromonospora endolithica*. *Applied Soil Ecology*, 39, 161 - 171.
- FAO. (2008). *Tesoro Enterrado*. Obtenido de <http://www.fao.org/potato-2008/es/lapapa/suelo.html>
- Feijoo, M. A. (2016). Microorganismos eficientes y sus beneficios para los agricultores. *Científica Agroecosistemas*, 4(2), 31-40. doi:5785201900020009300008
- García, S. C. (2011). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. *Dialnet*, 3, 173 - 186. doi:3761553
- Garzon, L. E. (18 de Mayo de 2020). *EMBAJADA DEL ECUADOR*. Obtenido de Provincia de Cotopaxi: <https://lahora.com.ec/noticia/411710/cotopaxi-una-tierra-productiva>
- Gobierno Provincial de Cotopaxi. (11 de Mayo de 2015). *SNI*. Obtenido de http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdiagnostico/0560000110001_FINA_L-DIAGNOSTICO-COTOPAXI_14-05-2015_19-14-32.pdf?fbclid=IwAR0JiD-Bst87kISP9LEdRvG91WHNcDRapcG0ck6ZrPGyCKQ77O3vYwwNsNg
- Hoyos, D. A. (2008). Utilidad de los microorganismos eficaces (EM®) en una explotación avícola de Córdoba: parámetros productivos y control ambiental. *Revista MVZ Córdoba*, 13(2), 1369-1379. doi:5785201900020009300014
- InfoAgro. (2014). El cultivo de la Rosa. *Jardinería, diseño y mantenimiento de jardines*, 16 - 19. Obtenido de https://www.infoagro.com/documentos/el_cultivo_rosa.asp
- Islas García A., P. R. (2016). Biorremediación por bioestimulación y bioaumentación con microorganismos nativos de un suelo agrícola contaminado con hidrocarburos. *Researchgate*.

- Jorge Andrés, G., & Jorge Alberto, L. (04 de Julio de 2019). Grupos funcionales microbianos en suelos contaminados con toxafeno en el departamento del Cesar, Colombia. *Luna Azul*, 47(6), 97-103. doi:10.17151/luaz.2019.47.6
- Mantilla, C. L. (2007). Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9, 6-14. Obtenido de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/711>
- Ministerio de Agricultura. (1997). Erosión del suelo. *EcuRed*, 167 - 216. Obtenido de https://www.ecured.cu/Erosi%C3%B3n_del_suelo
- Moratto, C., L. Martínez, H., & Sánche, V. y. (2005). Efecto del uso del suelo sobre hongos solubilizadores de fosfato y bacterias diazotróficas en el páramo de. *Agronomía Colombiana*, 299-309. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/491/49142418008.pdf>
- Mulet, R. A. (2010). Manual de Protocolos Microbiológicos. Bonaventuriana. doi:978-958-8436-46-3
- Nagahashi, G. (29 de Diciembre de 2005). *fHalmeria*. Obtenido de <https://www.fhalmeria.com/noticia-7864/los-hongos-del-suelo-benefician-el-crecimiento-de-las-plantas-y-podrian-usarse-facilmente-por-agricultores#:~:text=Los%20hongos%2C%20llamados%20micorriza%2C%20viven,los%20hongos%20necesitan%20para%20sobrevivir.>
- Olalde y Aguilera. (1998). Microorganismos y biodiversidad. *Terra Latinoamericana*, 16(003), 289-292.
- Olvera, D. J., Garcí, D. F., & Martínez, D. A. (Septiembre de 2011). Factibilidad del empleo de un consorcio microbiano en el tratamiento de Vinazas. *Tecnología Química*, 31(3), 339 - 351. doi:61852011000300008
- Sentís, I. P. (01 de Junio de 2015). *Secsuelo*. Obtenido de <http://www.secsuelo.org/wp-content/uploads/2015/06/1.-Problemas-de-Degradacion.pdf>
- Silva, J. M. (2004). *Recuperación de nutrientes en fase sólida*. Obtenido de EIDENAR: <https://www.semanticscholar.org/paper/RECUPERACION%CC%81N-DE-NUTRIENTES-EN-FASE-SO%CC%81LIDA-A-DEL-Silva/74afe4b36fae12a094a71e760aae413f0810ddab>
- Simbaña, J. (2014). *Google Maps*. Obtenido de <https://www.google.com/maps/search/778668+++9944964/@-0.5513332,-78.8438867,10z>
- Solano, J. (2016). Micorrización en el cultivo de papa añadiendo biofertilizante. *SciELO*, 34, 39-45. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292016000100005>
- Sosa, D. A. (15 de Marzo de 2012). *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*. Obtenido de <https://inta.gob.ar/documentos/muestreo-de-suelos>
- Sosa, D. A. (15 de Marzo de 2012). *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*. Obtenido de <https://inta.gob.ar/documentos/muestreo-de-suelos>

- STURZ, A., & CHRISTIE, B. (2003). Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria. *Soil & Tillage Res.*, 72, 107-123. doi:10.1016/S0167-1987(03)00082-5
- Symborg. (2020). Bacterias Fijadoras de Nitrogeno. *Symborg*. Obtenido de <https://symborg.com/es/bacterias-fijadoras-de-nitrogeno/>
- Tello, C., & Báez, F. (Octubre de 2019). Manual de protocolos de siembra de partes vegetales y diluciones seriadas. *INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS*, 112. doi:978-9942-22-472-9
- Vázquez, C., Ana Martín, M. I., & Serrano, S. (14 de Mayo de 2010). Técnicas y métodos de microbiología. *Revista educa*, 3. doi:819-989-1-PB
- Velez, P. C. (01 de 12 de 2018). *Estudio de las poblaciones microbianas presentes en el cultivo de papa* . Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v7n1-2/a17v7n1-2.pdf>
- Wainwright, M. (2015). Metabolic diversity of fungi in relation to growth and mineral cycling in soil. *Transactions of the British Mycological Society*, 90, 159 – 170. doi:S0007153688800846

ANEXOS**Anexo 1.** Coordenadas de muestras tomadas**Muestra 1**

	X	Y
F1	778597	9944948
F2	778599	9944955
F3	778604	9944956

Muestra 2

	X	Y
F1	778615	9944955
F2	778610	9944969
F3	778621	9944966

Muestra 3

	X	Y
F1	778603	9944981
F2	778608	9944996
F3	778618	9944997

Muestra 4 (suelo)

	X	Y
F1	778626	9945000
F2	778615	9944987
F3	778668	9944964

Anexo 2. Protocolo de Técnica de tinción

Introducción

La Técnica de tinción consiste en la coloración de células de los microorganismos Gram positivas de color azul, rojo o violeta y las Gram negativas no se tiñen, tras ser suspendidas a diversos colorantes como: azul de metileno, cristal violeta, safranina.

Esta técnica está basada en el Manual de Protocolos Microbiológicos propuesto por Mulet (2010) y fue replicada en los laboratorios de la Universidad Técnica de Cotopaxi por Chasi Paolo, Arequipa Patricia, Mena Maria José y Simbaña Jessica. En la determinación de microorganismos Gram positivos y Gram negativos pertenecientes a la rizosfera del cultivo de papa.

Materiales y métodos

- Mechero de bunsen o de alcohol
- Asa de siembra o aguja
- Pinza
- Portaobjetos
- Palillos
- Microorganismos
- Aceite de inmersión
- Microscopio
- Colorante para la tinción: solución de cristal violeta, lugol, safranina y etanol 95%

Procedimiento

- Primero prendemos el mechero y esterilizamos el asa hasta que tome un color rojo vivo.
- Ya esterilizada el asa procedemos a extraer la muestra en las cajas de Petri y/o colocamos en el porta objetos estirándola sobre toda la superficie.
- Le agregamos una gota de agua luego extendimos suavemente la muestra y lo dejamos secar por unos momentos en el mechero.
- Posteriormente lo llevamos la tinta y le agregamos a la muestra cristal violeta, y posteriormente a lavarlo con agua le agregamos lugol por un minuto, nuevamente lavamos con agua y entonces le agregamos gotas de alcohol al 95% hasta que las gotas

que salían se quedarán sin color. Al quedar sin color le añadimos una gota de agua y le agregamos 2 gotas de safranina y esperamos dos minutos.

- Ya realizada estos pasos secamos la muestra con calor pero no tan pegada al mechero para que no se quemara la muestra.

Anexo 3. Protocolo de diluciones seriadas para suelo (microbiota total)

Introducción

La metodología de recuento en placa consiste en realizar diluciones seriadas 1:10 y extender 1000 μ l de cada dilución en cajas Petri, estas placas se incuban hasta que las colonias son apreciables para su recuento. Esta metodología tiene la ventaja de tener un buen límite de detección de colonias de microorganismos en el suelo.

Esta técnica está basada en los Protocolos de siembra de partes vegetales en diferentes medios de cultivo propuesto por Tello y Báez (2019), autores investigativos que pertenecen al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), esta técnica fue replicada en los laboratorios de la Universidad Técnica de Cotopaxi por Chasi Paolo, Arequipa Patricia, Mena Maria José y Simbaña Jessica. Para el reconocimiento de microorganismos utilizando diluciones seriadas para suelo.

Materiales y métodos

- Micropipetas 1000 μ l y 100 μ l
- Vórtex
- Balanza electrónica
- Cajas Petri
- Asas de Drigalsky
- Mechero de alcohol
- Matraz
- Incubadora
- Tubos de ensayo

Procedimiento

- Se debe pesar 10g de suelo, introducimos en un matraz con 90ml de agua destilada y un imán, mezclamos el suelo junto al mechero, agitamos durante 30 minutos en un agitador para que los microorganismos queden suspendidos en el agua.

- Tras la suspensión tomamos un mililitro y lo añadimos en un tubo con 9ml de agua destilada, llevamos al vórtex por dos minutos.
- A partir de esta dilución tomaríamos 1ml de solución que pasaríamos a otro tubo con 9ml de agua destilada y así repetiríamos la operación hasta conseguir las diluciones esperadas.
- Una vez realizadas las diluciones hacemos la siembra de la dilución seleccionada en una caja Petri con medio de cultivo, para ello tomamos 100 μ l, lo añadimos en la superficie de la placa y extendemos con la aza de Drigalsky flameada, este proceso lo repetimos con cada diluciones a sembrar, rotulamos cada caja Petri.
- Posteriormente introducimos las cajas a la incubadora y esperamos 5 días hasta observar crecimiento de colonias de microorganismos.
- Para que este conteo sea significativo debe haber de 10 a 300 colonias.

Anexo 4. Protocolo de diluciones seriadas para raíz (maceración) para actinomicetos, bacterias y hongos

Introducción

La metodología de recuento en placa consiste en realizar diluciones seriadas 1:10 y extender 1000 μ l de cada dilución en cajas Petri, estas placas se incuban hasta que las colonias son apreciables para su recuento. Esta metodología tiene la ventaja de tener un buen límite de detección de colonias de microorganismos en raíz.

Esta técnica está basada en los Protocolos de siembra de partes vegetales en diferentes medios de cultivo propuesto por Tello y Báez (2019), autores investigativos que pertenecen al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), esta técnica fue replicada en los laboratorios de la Universidad Técnica de Cotopaxi por Chasi Paolo, Arequipa Patricia, Mena Maria José y Simbaña Jessica. Para el reconocimiento de microorganismos utilizando diferentes métodos de siembra en medio de cultivo.

Materiales y métodos

- Micropipetas 1000 μ l y 100 μ l
- Vórtex
- Balanza electrónica
- Cajas Petri
- Asas de Drigalsky

- Mechero de alcohol
- Incubadora
- Tubos de ensayo
- Vasos de precipitación
- Papel para film

Procedimiento

- Se debe desinfectar las muestras de raíz con hipoclorito de sodio por dos minutos, introducimos en un recipiente para proceder a la maceración hasta obtener una mezcla homogénea.
- Tras la maceración tomamos un mililitro de suspensión y lo añadimos en un tubo con 9ml de agua destilada, llevamos al vórtex por dos minutos.
- A partir de esta dilución tomaríamos 1ml de solución que pasaríamos a otro tubo con 9ml de agua destilada y así repetiríamos la operación hasta conseguir las diluciones esperadas.
- Una vez realizadas las diluciones hacemos la siembra de la dilución seleccionada en una caja Petri con medio de cultivo, para ello tomamos 100 μ l, lo añadimos en la superficie de la placa y extendemos con la aza de Drigalsky flameada, este proceso lo repetimos con cada diluciones a sembrar, rotulamos cada caja Petri.
- Posteriormente introducimos las cajas a la incubadora y esperamos 5 días hasta observar crecimiento de colonias de microorganismos.
- Para que este conteo sea significativo debe haber de 10 a 300 colonias.

Anexo 5. Protocolo de siembra de fragmentos de raíz para actinomicetos, bacterias y hongos

Introducción

La metodología de siembra directa consiste en cortar fragmentos de 1cm de zona basal, zona intermedia y zona apical de la raíz del cultivo.

Esta técnica está basada en los Protocolos de siembra de partes vegetales en diferentes medios de cultivo propuesto por Tello y Báez (2019), autores investigativos que pertenecen al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), esta técnica fue replicada en los laboratorios de la Universidad Técnica de Cotopaxi por Chasi Paolo, Arequipa Patricia, Mena

Maria José y Simbaña Jessica. Para el reconocimiento de microorganismos utilizando diferentes métodos de siembra en medio de cultivo.

Materiales y métodos

- Hipoclorito de sodio 0,5%
- Bisturí
- Pinzas de laboratorio
- Cajas Petri
- Mechero de alcohol
- Incubadora
- Vasos de precipitación
- Papel para film

Procedimiento

- Se debe desinfectar las muestras de raíz con hipoclorito de sodio por dos minutos, dejamos secar en toallas absorbentes.
- Tras el secado procedemos a cortar partes de las diferentes zonas de la raíz aproximadamente de 1cm.
- A tener listos los cortes de raíz con ayuda de una pinza de laboratorio, colocamos de manera inclinada la raíz en el medio de cultivo verificando que en medio no se rompa.
- Una vez realizadas las siembras de fragmentos de raíz, sellamos con papel para film.
- Posteriormente introducimos las cajas a la incubadora y esperamos 5 días hasta observar crecimiento de colonias de microorganismos.
- Para que este conteo sea significativo debe haber de 10 a 300 colonias.

Anexo 6. Protocolo de medio de cultivo PDA

Introducción

El agar de patata dextrosa es el medio más utilizado para el crecimiento de hongos, bacterias y levaduras que estas presentes en plantas o suelo como agentes benéficos o infecciosos.

Esta técnica está basada en el Manual de Protocolos Microbiológicos propuesto por Mulet (2010) y fue replicada en los laboratorios de la Universidad Técnica de Cotopaxi por Chasi Paolo, Arequipa Patricia, Mena Maria José y Simbaña Jessica. En la preparación de medios de

cultivo para la concentración de unidades formadoras de colonias de microorganismos del suelo.

Materiales y métodos

- PDA de 500g
- Cajas Petri
- Autoclave
- Cámara de flujo
- Alcohol al 95%
- Frascos de precipitación de 400ml
- Agua destilada
- Balanza electrónica

Procedimiento

- Primero debemos proceder a esterilizar y rotular las cajas Petri en la cámara de flujo.
- Luego pesar el agar para la cantidad de cajas Petri (20ml * caja), en este caso serán 18 lo que equivale a 14,04g de PDA en 180ml de agua destilada.
- Agitar por 5 minutos para homogenizar el caldo.
- Meter a la autoclave por 15 minutos a 121°C.
- Dejar enfriar a baño María por 2 minutos.
- Posteriormente se procede a la dispersión de medio de cultivo en cada caja hasta que cubra la superficie, siempre y cuando no pase de la mitad de la caja Petri.
- Por último paso se deja reposar el medio de cultivo por aproximadamente 24 horas para que no se disuelva al momento de la siembra.

Anexo 7. Protocolo de medio de cultivo Agar Nutritivo

Introducción

El agar de nutritivo es el medio más utilizado para el crecimiento de microorganismos totales que estas presentes en plantas o suelo como agentes benéficos o infecciosos.

Esta técnica está basada en el Manual de Protocolos Microbiológicos propuesto por Mulet (2010) y fue replicada en los laboratorios de la Universidad Técnica de Cotopaxi por Chasi Paolo, Arequipa Patricia, Mena Maria José y Simbaña Jessica. En la preparación de medios de

cultivo para la concentración de unidades formadoras de colonias de microorganismos del suelo.

Materiales y métodos

- Agar nutritivo de 500g
- Cajas Petri
- Autoclave
- Cámara de flujo
- Alcohol al 95%
- Frascos de precipitación de 400ml
- Agua destilada
- Balanza electrónica

Procedimiento

- Primero debemos proceder a esterilizar y rotular las cajas Petri en la cámara de flujo.
- Luego pesar el agar para la cantidad de cajas Petri (20ml * caja), en este caso serán 3 lo que equivale a 4,14g de Agar nutritivo en 60ml de agua destilada.
- Agitar por 5 minutos para homogenizar el caldo.
- Meter a la autoclave por 15 minutos a 121°C.
- Dejar enfriar a baño María por 2 minutos.
- Posteriormente se procede a la dispersión de medio de cultivo en cada caja hasta que cubra la superficie, siempre y cuando no pase de la mitad de la caja Petri.
- Por último paso se deja reposar el medio de cultivo por aproximadamente 24 horas para que no se disuelva al momento de la siembra.

Anexo 8. Protocolo de medio de cultivo Tryptone soya agar

Introducción

El Tryptone soya agar es el medio más utilizado para el crecimiento de actinomicetos que están presentes en plantas o suelo como agentes benéficos o infecciosos.

Esta técnica está basada en el Manual de Protocolos Microbiológicos propuesto por Mulet (2010) y fue replicada en los laboratorios de la Universidad Técnica de Cotopaxi por Chasi Paolo, Arequipa Patricia, Mena Maria José y Simbaña Jessica. En la preparación de medios de

cultivo para la concentración de unidades formadoras de colonias de microorganismos del suelo.

Materiales y métodos

- Tryptone soya agar de 500g
- Cajas Petri
- Autoclave
- Cámara de flujo
- Alcohol al 95%
- Frascos de precipitación de 400ml
- Agua destilada
- Balanza electrónica

Procedimiento

- Primero debemos proceder a esterilizar y rotular las cajas Petri en la cámara de flujo.
- Luego pesar el agar para la cantidad de cajas Petri (20ml * caja), en este caso serán 18 lo que equivale a 14,04g de Tryptone soya agar en 180ml de agua destilada.
- Agitar por 5 minutos para homogenizar el caldo.
- Meter a la autoclave por 15 minutos a 121°C.
- Dejar enfriar a baño María por 2 minutos.
- Posteriormente se procede a la dispersión de medio de cultivo en cada caja hasta que cubra la superficie, siempre y cuando no pase de la mitad de la caja Petri.
- Por último paso se deja reposar el medio de cultivo por aproximadamente 24 horas para que no se disuelva al momento de la siembra.

Anexo 9. Determinación de la concentración de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de suelo (microbiota total)

CONCENTRACIÓN DE COLONIAS (UFC*g) POR MUESTRA		
MICROBIOTA TOTAL		
MUESTRA 1 (R1)		
Promedio	139	1,39E+09
CONCENTRACIÓN DE COLONIAS (UFC*g) POR MUESTRA		
MICROBIOTA TOTAL		

MUESTRA 1 (R2)		
Promedio	128,67	1,29E+09

Concentración de colonias (UFC/g) = **P X FD**

Donde:

P = Promedio de colonias en las tres cajas de dilución

FD = Factor de la dilución de la caja rotulada

Anexo 10. Determinación de la concentración de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de maceración de raíz (actinomicetos, bacterias fijadoras de nitrógeno y hongos)

CONCENTRACIÓN DE COLONIAS
(UFC*g) POR MUESTRA

ACTINOMYCETOS		
R1		
	176,666667	1,77E+09
FIJADORES DE NITRÓGENO		
R1		
	141,333333	1,41E+09
HONGOS		
R1		
	95,66666667	9,57E+08

Concentración de colonias (UFC/g) = **P X FD**

Donde:

P = Promedio de colonias en las tres cajas de dilución

FD = Factor de la dilución de la caja rotulada

Anexo X. Determinación de la concentración de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de fragmentos de raíz (actinomicetos, bacterias fijadoras de nitrógeno y hongos)

CONCENTRACIÓN DE COLONIAS (UFC*g) POR MUESTRA	
ACTINOMYCETOS	
R2	
144	1,44E+09
FIJADORES DE NITRÓGENO	
R2	
184	1,84E+09
HONGOS	
R2	
25,33333333	2,53E+08

Concentración de colonias (UFC/g) = **P X FD**

Donde:

P = Promedio de colonias en las tres cajas de dilución

FD = Factor de la dilución de la caja rotulada

Anexo 11. Determinación de la concentración de conidios*g de suelo (cuantificación en el hematocitómetro o cámara de Neubauer)

PROMEDIOS GENERALES (conidios*g)	
(R1 y R2)	
MICROBIOTA TOTAL	
19,95	17,15
3,19E+09	2,74E+09

Concentración de conidios (conidios/g) = **X*10000*16*FD**

Donde:

X = Promedio de las 20 lecturas por área

FD = factor de dilución

16 y 10000 = constantes para cuadrantes

Anexo 12. Determinación de la concentración de conidios*g (cuantificación en el hematocitómetro o cámara de Neubauer) en maceración de raíz

PROMEDIOS GENERALES (conidios*g)		
R1		
ACTINOMYCETOS	FIJADORAS DE NITROGENO	HONGOS
4,41	3,15	4,62
7,06E+08	5,04E+08	7,39E+08

Concentración de conidios (conidios/g) = $X*10000*16*FD$

Donde:

X = Promedio de las 20 lecturas por área

FD = factor de dilución

16 y 10000 = constantes para cuadrantes

Anexo 13. Determinación de la concentración de conidios*g (cuantificación en el hematocitómetro o cámara de Neubauer) en fragmentación de raíz

PROMEDIOS GENERALES (conidios*g)		
R2		
ACTINOMYCETOS	FIJADORAS DE NITROGENO	HONGOS
4	4,02	6,17
6,40E+08	6,43E+08	9,87E+08

Concentración de conidios (conidios/g) = $X*10000*16*FD$

Donde:

X = Promedio de las 20 lecturas por área

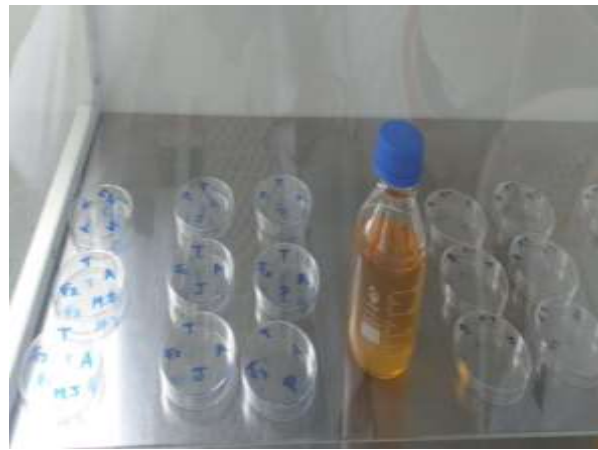
FD = factor de dilución

16 y 10000 = constantes para cuadrantes

Anexo 14. Recolección de muestras



Anexo 15. Preparación de medios cultivo y rotulado de cajas Petri



Anexo 16. Dispercion de medios



Anexo 17. Limpieza de muestras de raíz



Anexo 18. Macerado y siembra de diluciones de las muestras de raíz



Anexo 19. Pesado de suelo, desinfección y siembra de muestras de suelo



Anexo 20. Incubado de muestras por 7 días, a 37°



Anexo 21. Presencia de colonias de los diferentes grupos funcionales



Anexo 22. Conteo de colonias y conidios



Anexo 23. Técnica de tincion



Anexo 24. Siembra de fragmentos de raiz



Anexo 25. Aval del traductor



Universidad
Técnica de
Cotopaxi

CENTRO DE IDIOMAS

AVAL DE TRADUCCIÓN

En calidad de Docente del Idioma Inglés del Centro de Idiomas de la Universidad Técnica de Cotopaxi; en forma legal **CERTIFICO** que: La traducción del resumen del proyecto de investigación al Idioma Inglés presentado por la señorita egresada de la **CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES: SIMBAÑA RAMOS JESSICA ALEXANDRA**, cuyo título versa "DETECCIÓN DE GRUPOS FUNCIONALES ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DEL CULTIVO DE PAPA (*Solanum tuberosum*) EN LA LOCALIDAD DE MACHACHI, CANTON MEJÍA, PROVINCIA DE PICHINCHA", lo realizó bajo mi supervisión y cumple con una correcta estructura gramatical del idioma.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad y autorizo a la peticionaria uso del presente certificado de la manera ética que estimare conveniente.

Latacunga, Marzo del 2021

Atentamente,

Mg. Lidia Rebeca Yugla Lema
DOCENTE CENTRO DE IDIOMAS
C.C. 050265234-0

Firmado
1803027935 digitalmente por
VICTOR HUGO ROMERO GARCIA
ROMERO GARCIA
Fecha: 2021.03.17
12:10:01 -05'00'

Anexo 26. Análisis de propiedades fisico-químicas del suelo (Iniap)

MC-LASPA-2201-01

	INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS ESTACION EXPERIMENTAL SANTA CATALINA LABORATORIO DE ANÁLISIS DE SUELOS PLANTAS Y AGUAS Panamericana Sur Km. 1. S/N Cutuglagua. Tlfs. (02) 3007284 / (02)2504240 Mail: laboratorio.dsa@iniap.gob.ec	
---	--	---

INFORME DE ENSAYO No: 21-0124

NOMBRE DEL CLIENTE: JESSICA SIMBAÑA
PETICIONARIO: JESSICA SIMBAÑA
EMPRESA/INSTITUCIÓN: JESSICA SIMBAÑA
DIRECCIÓN: MACHACHI

FECHA DE RECEPCIÓN DE MUESTRA: 17/02/2021
HORA DE RECEPCIÓN DE MUESTRA: 10:50
FECHA DE ANÁLISIS: 22/02/2021
FECHA DE EMISIÓN: 26/02/2021
ANÁLISIS SOLICITADO: SUELO 3

Análisis	PH	N		P		S		B		K		Ca		Mg		Zn		Cu		Fe		Mn		Ca/Mg		Mg/K		Ca+Mg/K		Σ Bases		MO		CO.*		Textura (%)*				IDENTIFICACIÓN
		ppm	A	ppm	A	ppm	B	ppm	A	ppm	A	ppm	A	ppm	A	ppm	A	ppm	A	ppm	A	ppm	A	ppm	A	ppm	A	ppm	A	meq/100g	%	%	Arena	Limo	Arcilla	Clase Textural				
21-0470	5,54	Ac	77	A	22	A	9,1	B	0,42	B	0,56	A	4,88	A	1,19	A	8,0	A	7,9	A	345	A	13,9	M	4,11	2,11	10,78	6,62	17,1	A									Muestra 1	

Análisis	Al+H*	Al*	Na*	C.E.*	N. Total	N-NO3*	K H2O*	P H2O*
Unidad	meq/100g			dS/m	%	ppm	ppm	ppm

OBSERVACIONES:

* Ensayos no solicitados por el cliente

METODOLOGIA USADA	
pH = Suelo: Agua (1-2.3)	P K Ca Mg = Olen Modificado
S,B = Fosfato de Calcio	Cu Fe Mn Zn = Olen Modificado
	B = Curcumina

INTERPRETACION		
pH		Elemento
Ac = Acido	N = Neutro	B = Bajo
LAc = Liger. Acido	LAI = Lige. Alcalino	M = Medio
PN = Piac. Neutro	AI = Alcalino	A = Alto
RC = Regularen Cal		T = Tóxico (Boro)

ABREVIATURAS	
C.E. =	Conductividad Eléctrica
M.O. =	Materia Orgánica

METODOLOGIA USADA	
C.E. =	Pasta Saturada
M.O. =	Oclonato de Potasio
Al+H =	Titulación NaOH

INTERPRETACION		
Al+H, Al y Na	C.E.	M.O y Cl
B = Bajo	NS = No Salino	S = Salino
M = Medio	LS = Lij. Salino	MS = Muy Salino
T = Tóxico		M = Medio
		A = Alto

