



# **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 PASTOCALLE,  
CANTÓN LATACUNGA, PROVINCIA DE COTOPAXI”**

---

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

**Autora:**

Mena Tipán María José

**Tutor:**

Chasi Vizuete Paolo Wilman Ing. M.Sc.

**LATACUNGA - ECUADOR**

**Marzo - 2021**

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA

María José Mena Tipán, con cédula de ciudadanía No. 1719662601, 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 Pastocalle, Cantón Latacunga, Provincia de Cotopaxi”** 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, 10 de Marzo del 2021.

Mena Tipán María José

Estudiante

CC: 1719662601

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 **MENA TIPÁN MARÍA JOSÉ**, identificada con cédula de ciudadanía **1719662601**, de estado civil soltera a quien en lo sucesivo se denominará **LA CEDENTE**; y, de otra parte, el PhD. 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 Agronómica**, 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 Pastocalle, Cantón Latacunga, Provincia de Cotopaxi”** la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, 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 Vizueté

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

**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, **LA 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.
- e) 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 10 días del mes de Marzo del 2021.

María José María José

**LA CEDENTE**

PhD. 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 PASTOCALLE, CANTÓN LATACUNGA, PROVINCIA DE COTOPAXI”**, de Mena Tipán María José, 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, 10 de Marzo del 2020.

Ing. M.Sc. Wilman Paolo Chasi Vizuete

**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: Mena Tipán María José, 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 PASTOCALLE, CANTÓN LATACUNGA, PROVINCIA DE COTOPAXI”**, 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, 10 de Marzo del 2021

Lector 1 (Presidente/a)

Ing. Mg. Klever Quimbiulco Sánchez

CC: 1709561102

Lector 2

Ing. PhD. Carlos Torres Miño

CC: 0502329238

Lector 3

Ing. Mtr. Richard Molina Alvarez

CC: 1205974627

## **AGRADECIMIENTO**

En el presente trabajo quiero agradecer a mis padres por el apoyo que me han brindado durante toda mi formación académica, mi madre que con sus palabras a sabido guiarme para ser la persona que soy hoy y con la responsabilidad que me caracteriza, a mi padre por apoyarme incondicionalmente durante el transcurso de mi vida con su cariño característico, un agradecimiento especial para mi mamacita quien siempre me ha sabido alentar para no rendirme y seguir en mis estudios con su apoyo y comprensión eterna y a mis hermanos por las palabras de aliento y apoyo en momentos difíciles durante el transcurso de mi formación.

A mi novio por el apoyo que me ha sabido brindar en los momentos más duros sin dejar que me rinda y siendo mi fortaleza más grande durante mi vida universitaria y personal.

Además un agradecimiento especial a mi Tutor Ing. M.Sc. Wilman Paolo Chasi Vizueté por saber guiarme durante el trayecto de este Proyecto y apoyo durante todo el transcurso de mi carrera.

A mí querida institución “Universidad Técnica de Cotopaxi” que me permitió adquirir nuevos conocimientos y formarme académicamente durante este tiempo.

**María José Mena Tipán**

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mi padre Eduardo Mena y a mi madre Sandra Tipán quienes con grandes esfuerzos y sacrificios han sabido brindarme las facilidades para poder formarme y llegar a este punto académico, logrando encaminarme como una profesional a pesar de todo problema o inconveniente siempre han sabido estar a mi lado.

Además a todas aquellas personas que supieron estar conmigo brindando su apoyo constante Antonieta Rivera, Katherine Mena, Alexander Mena, Jonathan Paredes, por saber guiarme durante todo mi proceso Universitario.

Le quiero dedicar de manera especial este trabajo a mi novio Bryan Diego Albán García por estar y haber estado conmigo apoyándome y guiándome durante todo mi proceso estudiantil con su cariño, amor y carisma que lo caracteriza, sin importar las adversidades que tenga delante siendo él uno de los pilares más importantes para mi vida.

Finalmente dedico este trabajo a mis amigos y amigas que siempre supieron como mostrarme su apoyo en momentos difíciles y brindar su mano para poder seguir cumpliendo metas juntos muchas gracias, a mi querida Universidad Técnica de Cotopaxi que me supo abrir sus puertas para formarme en su aulas día tras día.

**María José**

# 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 PASTOCALLE, CANTÓN LATACUNGA, PROVINCIA DE COTOPAXI.

AUTORA: Mena Tipán María José

#### RESUMEN

El presente proyecto se realizó en la Parroquia Pastocalle, del Cantón Latacunga 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<sup>-1</sup> y conidios\*gr<sup>-1</sup>, para lo cual utilizamos medios de cultivos específicos para cada grupo y las observaciones se las realizó mediante disoluciones de 10<sup>-7</sup>. 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 2,57\*10<sup>8</sup> UFC\*gr<sup>-1</sup>, valores válidos para que un suelo pueda ser considerado sano y productivo. Las bacterias fijadoras de nitrógeno contabilizadas fueron de 3,28\*10<sup>8</sup> UFC\*gr<sup>-1</sup> y 1,89\*10<sup>8</sup> UFC\*gr<sup>-1</sup>, en siembra por fragmentos de raíz, y siembra por maceración respectivamente, y la presencia de hongos de 3,4\*10<sup>8</sup> UFC\*gr<sup>-1</sup> en siembra por fragmentos de raíz, siendo esta mayor en la siembra por maceración con 3\*10<sup>8</sup> UFC\*gr<sup>-1</sup>. En cuanto al conteo de Actinomicetos asociados a la rizosfera mediante la siembra por maceración fue de 4,87\*10<sup>8</sup> UFC\*gr<sup>-1</sup> y siembra por fragmentos de raíz 4,61\*10<sup>8</sup> UFC\*gr<sup>-1</sup>.

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

## AGRICULTURAL SCIENCES AND NATURAL RESOURCES

**THEME: "DETECTION OF FUNCTIONAL GROUPS ASSOCIATED WITH THE RHIZOSPHERE OF POTATO CROP (SOLANUM TUBEROSUM) IN THE LOCALITY OF PASTOCALLE, CANTÓN LATACUNGA, PROVINCE OF COTOPAXI."**

**AUTHOR:** Mena Tipán María José

### ABSTRACT

This research was carried out in the Pastocalle Parish, Cantón Latacunga, and aimed 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 through laboratory prospecting. In soil, in root maceration and root fragments in two repetitions, where CFU\*gr<sup>-1</sup> and conidia\*gr<sup>-1</sup> were determined, for which we used specific culture media for each group, and the observations were made employing solutions of 10<sup>-7</sup>. Moreover, the microorganisms present in the repetitions and the sowing methods were compared from the colonies' data in the culture media.

It was determined that there is the presence of 2.48\*10<sup>8</sup> CFU\*gr<sup>-1</sup> in the first repetition performed and 2.67\*10<sup>8</sup> CFU\*gr<sup>-1</sup> in the second repetition of microbiota full; Regarding the incidence of colonies in functional groups, 1.89\*10<sup>8</sup> CFU\*gr<sup>-1</sup> of nitrogen-fixing bacteria, 3\*10<sup>8</sup> CFU\*gr<sup>-1</sup> of fungi and 4.87\*10<sup>8</sup> CFU\*gr were obtained. -1 of actinomycetes from the sowing method by root maceration. Regarding the incidence of the same by the method of sowing by root fragments, 3.29\*10 was obtained 8 CFU\*gr<sup>-1</sup> of nitrogen-fixing bacteria, 3.4\*10<sup>8</sup> CFU\*gr<sup>-1</sup> of fungi, and 4.61\*10<sup>8</sup> CFU\*gr<sup>-1</sup> of actinomycetes. The conidia count of each of the functional groups and total microbiota was performed, of which 1.19\*10<sup>8</sup> conidia\*gr<sup>-1</sup> and 74.8\*10<sup>8</sup> conidia\*gr of total microbiota of the first were identified. and second repetition; Regarding the incidence of functional groups, it was found 1.46\*10<sup>8</sup> conidia\*gr<sup>-1</sup> of nitrogen-fixing bacteria, 2.75\*10<sup>8</sup> conidia\*gr<sup>-1</sup> of fungi and 2.14\*10<sup>8</sup> conidia\*gr<sup>-1</sup> of actinomycetes by the root maceration method and 1.12\*10<sup>10</sup> conidia\*gr<sup>-1</sup> of nitrogen-fixing bacteria, 1.29\*10<sup>10</sup> conidia\*gr<sup>-1</sup> of fungi and 1.81\*10<sup>10</sup> conidia\*gr of actinomycetes by root fragment method.

**Keywords:** Functional Groups, Soil, Rhizosphere, Microbiota, Potato.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE AUTORÍA.....	II
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
1. INFORMACIÓN GENERAL.....	17
1.1.1. Línea 1: Análisis, conservación y aprovechamiento de la biodiversidad local. 18	
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	19
3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO .....	20
4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....	22
5. OBJETIVOS .....	24
5.1. Objetivo General .....	24
5.2. Objetivos Específicos.....	24
6. TABLA DE ACTIVIDADES POR OBJETIVO .....	25
7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA .....	26
7.1. Microbiota total del suelo.....	26
7.2. Grupos funcionales.....	26
7.2.1. Bacterias Fijadoras de Nitrógeno .....	26
7.2.2. Hongos.....	27
7.2.3. Actinomicetos .....	27
7.3. Beneficios de bacterias en la rizosfera.....	27
7.4. Siembra .....	28
7.4.1. Método de siembra por disoluciones seriadas.....	28

7.4.2.	Método de siembra por fragmentos de raíz.....	28
7.5.	Técnica de tinción de Gram.....	28
7.6.	Medios de cultivo.....	28
7.6.1.	Agar nutritivo.....	29
7.6.2.	Potato dextrosa agar (PDA).....	29
7.6.3.	Tryptone Soya agar.....	30
7.7.	Papa.....	30
7.7.1.	Características generales.....	31
7.7.2.	Taxonomía.....	31
7.7.3.	Características del suelo.....	31
7.7.3.1.	Suelo.....	31
8.	<b>METODOLOGÍA</b> .....	32
	<b>Actividad 1. Delimitación del área de estudio.....</b>	32
	<b>Actividad 2. Muestreo de suelo del cultivo de papa.....</b>	33
	<b>Actividad 3. Preparación de medio de cultivo específico.....</b>	33
	<b>Actividad 1. Muestreo de raíz del cultivo de papa.....</b>	34
	<b>Actividad 3. Siembra en los medios de cultivo por dos métodos a utilizar.....</b>	36
	<b>Actividad 1. Conteo de colonias y conidios de microbiota total del suelo de papa. ....</b>	37
	<b>Actividad 2. Conteo de colonias y conidios de bacterias, hongos y actinomicetos de la raíz de papa.....</b>	38
	<b>Actividad 3. Comparaciones de la incidencia de los tres grupos funcionales encontrados en raíz de las dos repeticiones. ....</b>	39
9.	<b>ANÁLISIS Y RESULTADOS</b> .....	40
9.1.	Concentración de UFC*gr <sup>-1</sup> de Microbiota total de suelo.....	40
9.2.	Concentración de UFC*gr <sup>-1</sup> de los Grupos Funcionales. ....	41
9.3.	Concentración de Conidios*gr <sup>-1</sup> de la Microbiota total del suelo.....	43
10.	<b>PRESUPUESTO</b> .....	47

<b>11. CONCLUSIONES .....</b>	<b>49</b>
<b>12. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>50</b>
<b>13. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>51</b>
<b>14. ANEXOS.....</b>	<b>55</b>
<b>Anexo 1. Protocolo de diluciones seriadas para Microbiota total del suelo.....</b>	<b>55</b>
<b>Anexo 2. Protocolo de diluciones seriadas para raíz (maceración) para actinomicetos, bacterias y hongos.....</b>	<b>56</b>
<b>Anexo 3. Protocolo de siembra de fragmentos de raíz para actinomicetos, bacterias y hongos.....</b>	<b>57</b>
<b>Anexo 4. Protocolo de medio de cultivo PDA. ....</b>	<b>58</b>
<b>Anexo 5. Protocolo de medio de cultivo Tryptone soya Agar.....</b>	<b>59</b>
<b>Anexo 6. Protocolo de medio de cultivo de Agar nutritivo. ....</b>	<b>60</b>
<b>Anexo 7. Protocolo de Técnica de tinción.....</b>	<b>61</b>
<b>Anexo 8. Conteo de UFC*gr<sup>-1</sup> de Microbiota total del suelo (1ra repetición). ....</b>	<b>63</b>
<b>Anexo 9. Conteo de UFC*gr<sup>-1</sup> de Microbiota total del suelo (2da repetición). ....</b>	<b>63</b>
<b>Anexo 10. Conteo de UFC*gr<sup>-1</sup> de Grupos funcionales (método de siembra por maceración de raíz).....</b>	<b>64</b>
<b>Anexo 11. Conteo de UFC*gr<sup>-1</sup> de Grupos funcionales (método de siembra por fragmentos de raíz).....</b>	<b>64</b>
<b>Anexo 12. Conteo de conidios*gr de Microbiota total del suelo (1ra repetición). ....</b>	<b>65</b>
<b>Anexo 13. Conteo de conidios*gr de Microbiota total del suelo (2da repetición).....</b>	<b>65</b>
<b>Anexo 14. Conteo de conidios*gr de Grupos funcionales (método de siembra por maceración de raíz).....</b>	<b>66</b>
<b>Anexo 15. Conteo de conidios*gr de Grupos funcionales (método de siembra por fragmentos de raíz).....</b>	<b>66</b>
<b>Anexo 16. Recolección de muestras de rizosfera del cultivo de papa. ....</b>	<b>67</b>
<b>Anexo 17. Recolección de muestras de suelo para análisis. ....</b>	<b>67</b>
<b>Anexo 18. Tamización de raíces para soluciones en laboratorio. ....</b>	<b>68</b>

<b>Anexo 19. Soluciones de muestra de suelo para microbiota total.....</b>	<b>68</b>
<b>Anexo 20. Preparación de medios de cultivo para grupos funcionales y microbiota total.....</b>	<b>69</b>
<b>Anexo 21. Reposo en estufa para el crecimiento de bacterias y hongos. ....</b>	<b>69</b>
<b>Anexo 22. Verificación de aparición de hongos y bacterias.....</b>	<b>70</b>
<b>Anexo 23. Conteo de colonias y conidios en cámara de Neubauer. ....</b>	<b>71</b>
<b>Anexo 24. Colocación de medios de cultivo por fragmentos de partes vegetales de raíz. ....</b>	<b>71</b>
<b>Anexo 25. Observación de bacterias por técnica de Tinción en microscopio. ....</b>	<b>72</b>
<b>Anexo 26. Análisis de suelo.....</b>	<b>73</b>
<b>Anexo 27. Aval del traductor.....</b>	<b>74</b>

## **TABLA DE CONTENIDOS**

<b>Tabla 1. Cuadro de actividades por objetivo.....</b>	<b>24</b>
<b>Tabla 2. Presupuesto del proyecto.....</b>	<b>46</b>

## **TABLA DE FIGURAS**

<b>Figura 1. Ubicación geográfica del lugar de toma de muestras (Pastocalle – San Bartolomé).....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 2. Concentración de UFC*gr de Microbiota total del suelo.....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 3. Concentración de UFC*gr-1 de los grupos funcionales por siembra de maceración de raíz.....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 4. Concentración de UFC*gr-1 de los grupos funcionales por siembra de fragmentos de raíz.....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 5. Concentración de Conidios*gr-1 de Microbiota total del suelo.....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 6. Concentración de Conidios*gr-1 de Grupos funcionales por la método de siembra de maceración de raíz.....</b>	<b>43</b>

**Figura 7. Concentración de Conidios\*gr-1 de Grupos funcionales por la método de siembra de fragmentos de raíz..... 44**

## 1. INFORMACIÓN GENERAL

### **Título del Proyecto:**

“DETECCIÓN DE GRUPOS FUNCIONALES ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DEL CULTIVO DE PAPA (*Solanum tuberosum*), EN LA LOCALIDAD DE PASTOCALLE, CANTÓN LATACUNGA, PROVINCIA DE COTOPAXI.”

### **Fecha de inicio:**

Octubre del 2020.

### **Fecha de finalización:**

Marzo del 2021.

### **Lugar de ejecución:**

Localidad de Pastocalle - Cantón Latacunga – Provincia de Cotopaxi.

### **Facultad que auspicia:**

Facultad De Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales.

### **Carrera que auspicia:**

Ingeniería Agronómica.

### **Proyecto de investigación vinculado:**

Proyecto “DETECCIÓN DE GRUPOS FUNCIONALES ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DEL CULTIVO DE PAPA (*Solanum tuberosum*), EN LA LOCALIDAD DE PASTOCALLE, CANTÓN LATACUNGA, PROVINCIA DE COTOPAXI.”

### **Equipo de Trabajo:**

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

Tutor: Ing. M.Sc. Paolo Chasi

Lector 1: Ing. Mg. Klever Quimbiulco Sánchez

Lector 2: Ing. PhD. Carlos Torres Miño

Lector 3: Ing. Mtr. Richard Molina Álvarez

**Coordinador del Proyecto**

Nombre: María José Mena Tipán

Teléfonos: 0969063359

Correo electrónico: maria.mena2601@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 está 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 presente proyecto describe la presencia de la microbiota total y grupos funcionales como bacterias fijadoras de nitrógeno, hongos y actinomicetos asociados a la rizosfera del cultivo de papa, realizando el conteo de colonias y conidios en el laboratorio de la Universidad Técnica de Cotopaxi, utilizando medios de cultivo específicos para cada grupo funcional a identificar, siendo así; microbiota total, bacterias fijadoras de nitrógeno, hongos y actinomicetos.

Las muestras recolectadas fueron tomadas dentro de la Provincia de Cotopaxi, y pertenecen a la localidad de Pastocalle, resaltando que esta comunidad tiene como principal fuente de ingreso económico el cultivo de papa. En este sector se recolectaron tres muestras de raíz, cada una con tres submuestras 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 realizó en la Estación Experimental Santa Catalina (Iniap) - Departamento de Suelos, Plantas y Aguas; que posteriormente será utilizado para a llevar a cabo la discusión de los resultados.

En cuanto a los análisis de bacterias fijadoras de nitrógeno, hongos y actinomicetos, se utilizó medios de cultivo como lo es el PDA (Papa dextrosa agar), Medio Agar Nutritivo y Tryptitone Soya Agar; los cuales fueron ubicados con una población de suelo y raíz significativa enumerando 3 observaciones por muestra para poder obtener un mayor número de datos al momento de contabilizar UFC\*gr<sup>-1</sup> y conidios\*gr<sup>-1</sup>.

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 tanto para maceración como de fragmentos vegetales de las muestras de raíz.

De igual manera se realizaron gráficos estadísticos para realizar una comparación de la cantidad de microbiota total encontrada en el suelo por ambos métodos de muestreo.

### 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 3900 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 mismo 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 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. (Velez, 2018)

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. (Velez, 2018)

El presente trabajo de investigación tiene por objetivo detectar la microbiota total del suelo y bacterias fijadoras de nitrógeno, hongos y actinomicetos presentes en la rizósfera del cultivo de papa en la localidad de Pastocalle de la ciudad de Latacunga.

#### 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, la erosión y degradación del suelo es visible, presente y creciente en todo el territorio provincial de Cotopaxi, del cual se distinguen dos zonas visiblemente más afectadas: la primera se encuentra en el valle interandino y la otra en los alrededores de la laguna del Quilotoa; dentro de las cuales a su vez se distinguen dos áreas, la primera que presenta un proceso más severo de erosión que incluso muestra señales de entrar en un proceso de desertización suma 45.245 ha. Lo cual representa el 7,4% de la superficie total provincial y la segunda sumando 48.587 ha. erosionadas que representa el 7,9%; ambas unidades sumarían casi el 15% de la Provincia Cotopaxense. (Gobierno Provincial de Cotopaxi, 2015)

A causa de problemas de desertificación el cultivo de papa se ha visto afectado debido a que por lo general este cultivo suelo 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 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 alfalfa. 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 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 los grupos funcionales asociados a la rizosfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*), en la localidad de Pastocalle.

### **5.2. Objetivos Específicos**

- Determinar la 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 relacionados a la rizosfera de la papa.

## 6. TABLA DE ACTIVIDADES POR OBJETIVO

Tabla 1. Cuadro de actividades por objetivo

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

Elaborado por: Mena, 2021

## **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.

### **7.2. Grupos funcionales**

Se define como grupos funcionales a aquellas poblaciones de microorganismos que cumplen una determinada función en el suelo. Y a su vez son indicadores de calidad del suelo, entre las que resaltan microorganismos cultivables relacionados con los ciclos de carbono y nitrógeno, actinomicetos y presencia microbiana de hongos, que participan sinérgicamente en el ciclado de nutrientes para la recuperación de suelos contaminados o en procesos de desertificación para mejorar las propiedades físico-químicas del mismo. (Reyes & Fontalvo, 2018)

#### **7.2.1. 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 nitrogenada. (García, 2011)

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

### **7.2.2. 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)

### **7.2.3. 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 ADN, 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)

## **7.3. Beneficios de bacterias en la rizosfera**

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.

## **7.4. Siembra**

Sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano. Para sembrar en microbiología es necesario mantener la habitación sin corrientes de aire y estar al lado de la llama de un mechero (no más de 15 cm. de distancia). También se puede trabajar bajo campana, o en flujo laminar, previa esterilización con luz UV. (WIX, 2020)

### **7.4.1. Método de siembra por disoluciones seriadas.**

El método de recuento en placa consiste en realizar disoluciones seriadas 1:10 y extender 1000ul de cada disolución n 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.

### **7.4.2. Método de siembra por fragmentos de raíz.**

El método de siembra directa consiste en realizar pequeños cortes de 1cm de la zona basal, zona intermedia y zona apical de la raíz del cultivo y colocarlos en el medio nutritivo de manera que una parte de la muestra quede introducida en el medio y la otra parte quede fuera de este. Este método tiene como ventaja el generar el desarrollo de la bacteria alrededor de la muestra con una delimitación más cerrada.

## **7.5. Técnica de tinción de Gram.**

Es definida como una tinción diferencial, ya que utiliza dos colorantes y clasifica a los microorganismos en dos grandes grupos: bacterias Gram negativas y Gram positivas. Fue desarrollada por el científico danés Hans Christian Gram en 1884, a quien debe su nombre. Los fundamentos de la tinción de Gram están basados en las características de la pared celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas, la cual le confiere propiedades determinantes a cada microorganismo y determina sus características tintorales. (Universidad Nacional de Córdoba, 2015)

## **7.6. Medios de cultivo**

Un medio de cultivo es una mezcla balanceada de los requerimientos nutritivos que tienen los microorganismos a concentraciones tales que permiten el buen crecimiento de los mismos. Los medios de cultivo deben proporcionar los ingredientes químicos (nutrientes) que las células requieren para sintetizar las moléculas que las componen, permitiendo así la supervivencia

multiplicación de los microorganismos. Los medios de cultivo están constituidos en general por: base mineral, fuente de carbono, fuente de energía, fuente de nitrógeno y factores de crecimiento si son necesarios. La combinación entre los diferentes componentes químicos varía de acuerdo a las características nutricionales de cada microorganismo a cultivar. No hay ningún medio o condiciones de cultivo que permita el crecimiento de todos los microorganismos que se encuentran en la naturaleza. No obstante, hay medios que permiten el desarrollo de un gran número de microorganismos y otros en los cuales se desarrollan sólo algunos de ellos. (Universidad Nacional de Córdoba, 2015)

Los requerimientos nutricionales varían entre microorganismos, dependiendo del tipo de metabolismo que presenten y de su capacidad biosintética. Algunos nutrientes se necesitan en grandes cantidades (macronutrientes) y otros en menor abundancia, incluso en cantidades muy pequeñas (micronutrientes). (Universidad Nacional de Córdoba, 2015)

#### **7.6.1. Agar nutritivo**

Medio de cultivo nutritivo no selectivo, en el cual la pluripeptona y el extracto de carne constituyen la fuente de carbono, nitrógeno y aportan nutrientes para el desarrollo bacteriano. El agregado de cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar es el agente solidificante.

Medio de cultivo utilizado para propósitos generales, para el aislamiento y recuento de microorganismos con escasos requerimientos nutricionales.

#### **Composición**

- Pluripeptona            5,0 g
- Extracto de carne      3,0 g
- Cloruro de sodio        8,0 g
- Agar                        15,0 g

#### **7.6.2. Papa dextrosa agar (PDA)**

Se utiliza para el aislamiento, enumeración y cultivo de levaduras y mohos a partir de muestras. También se puede utilizar en la identificación de hongos y levaduras en paralelo con su morfología celular o en métodos de micro cultivo en portaobjetos. La infusión de dextrosa y papa, promueve el crecimiento de levaduras y mohos mientras que el bajo valor del pH inhibe

parcialmente el crecimiento de la flora bacteriana acompañante. El agar es un agente solidificante.

### **Composición**

- Extracto de patata      4,0 g
- Dextrosa                      20,0 g
- Agar- agar                    15,0 g

### **7.6.3. Trypticase Soya agar**

Para el enriquecimiento y aislamiento de microorganismos fastidiosos con o sin sangre. Agar Trypticase Soya es un medio de uso general utilizado con o sin sangre para enriquecer y aislar microorganismos fastidiosos. Es un buen medio para el aislamiento de anaerobios.

### **Composición**

- Digerido pancreático de caseína      14.5 g
- Diferido papaico de harina de soja      5,0 g
- Cloruro sódico                              5.0 g
- Agar    14,0 g

### **7.7. 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. (PhD. Raffaele Vignola, 2017)

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. (PhD. Raffaele Vignola, 2017)

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. (PhD. Raffaele Vignola, 2017)

### **7.7.1. 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 semidecumbente, que puede medir hasta 1 m de altura. (PhD. Raffaele Vignola, 2017)

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. (PhD. Raffaele Vignola, 2017)

### **7.7.2. Taxonomía**

Reino : Plantae

División: Magnoliophyta

Clase : Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden : Solanales

Familia : Solanáceas

Género : *Solanum*

Especie : *Tuberosum*

### **7.7.3. Características del suelo**

#### **7.7.3.1. Suelo**

Los sectores más adecuados para el cultivo de la papa, se ubican desde los 2400 a 3900 metros sobre el nivel del mar, especialmente donde predominan los suelos negro 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: 5.0 - 7.0
- Precipitación Pluvial: 1.200 mm
- Altitud: 2400 a 3900 msnm
- Temperatura: 15°C - 28°C
- Humedad Relativa: 70 - 90%
- Pendiente: 25%

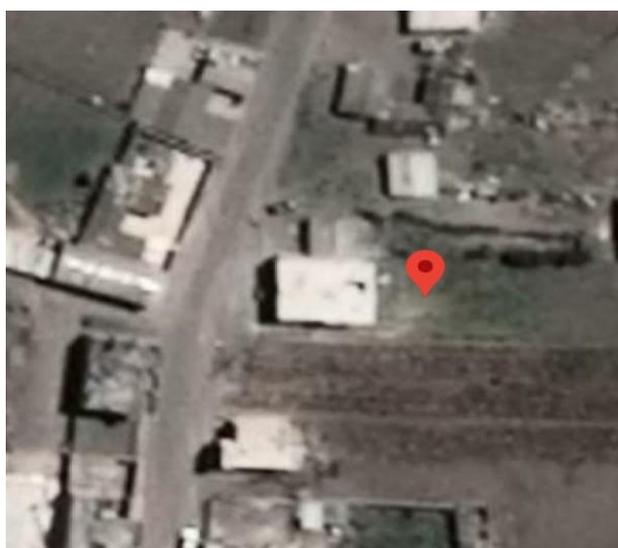
## 8. METODOLOGÍA

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

### Actividad 1. Delimitación del área de estudio.

Para conocer la ubicación de donde se tomaron las muestras tanto de suelo como raíz del cultivo de papa, se realizó el levantamiento geográfico con ayuda de Google mapas y Andy GPS que es un programa de descarga libre que permite conocer la ubicación geográfica con coordenadas más exactas, conociendo así la altitud a la que se encuentra el terreno y la comunidad de Pastocalle.

**Figura 1.** Ubicación geográfica del lugar de toma de muestras (Pastocalle – San Bartolomé)



COORDENADAS	
X	Y
763822	9921551
<b>ALTITUD:</b>	3159 m

**Fuente:** (Google Maps, 2014)

## **Actividad 2. Muestreo de suelo del cultivo de papa.**

### **1. Recolección**

La recolección de suelo se la hizo de acuerdo a Sosa (2012) donde nos dice que las muestras deben ser tomadas en zonas libres de cultivo, donde no afecte la fertilización inorgánica o surcado, por lo general la profundidad de estas muestras deben ir de 20 a 30cm.

Se tomaron tres muestras de alrededor de 1kg de todo el terreno con tres submuestras cada una, luego se procedió a librar de grumos o materiales que no fueran suelo para que pudiera ser más fácil preparar el medio de cultivo.

Las muestras se tomaron de manera Zigzag como modelo aleatorio, y cada una de las muestras cuenta con los puntos GPS de donde fueron tomadas, los cuales se encuentran detallados por muestra.

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

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 específico.**

### **1. Medio Agar nutritivo**

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 (**Anexo 6**).

## **2. Disolución de muestra de suelo.**

Se colocaron cuatro tubos de ensayo cada uno con 9ml de agua destilada para realizar las disoluciones de la muestra a los valores de -4, -5, -6, -7; siendo los tubos con menor concentración el tubo -7.

Se tomó 1gr de suelo y se colocaron en el primer tubo de precipitación, agitando vigorosamente hasta que la solución lograra homogenizarse totalmente, luego de esto con ayuda de una pipeta se tomó 1ml de la disolución y se la traslado al siguiente tubo (-5) para realizar el mismo procedimiento hasta llegar al tubo de precipitación marcado con -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 1ml de muestra que se encontraba en el tubo 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 parafilm 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 estufa de laboratorio a una temperatura de 37°C.

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

### **Actividad 1. Muestreo de raíz del cultivo de papa.**

#### **1. Recolección**

La recolección de muestras de raíz se la realizó 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.

De igual manera se tomaron tres muestras del terreno con tres submuestras cada una las cuales ya estuvieran en una etapa fenológica de floración es decir, a los 3 meses desde la siembra para que tuviera mayor desarrollo radicular.

## **2. Toma de partes vegetales (maceración y fragmentos).**

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 cuatro tubos de ensayo cada uno con 9ml de agua destilada para realizar las disoluciones de la muestra a los valores de -4, -5, -6, -7; siendo los tubos con menor concentración el tubo -7.

Se tomó 1ml de muestra y se procedió a colocar en el primer tubo (-4) con 9ml de agua destilada, se agito 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 (**Anexo 1**).

## **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:**

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 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\* muestra\* método de siembra) y se dejó reposar por 24 horas para que lograra condensarse en la Cámara de flujo laminar (**Anexo 4**).

#### **Agar Papa dextrosa + Tritón:**

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 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\* 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:**

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 (**Anexo 5**).

### **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 cajas 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 parafilm 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 estufa 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 parafilm sin dejar espacios abiertos durante 5 o 6 días hasta tener un desarrollo visible en la caja a temperatura de 37°C en la Estufa. (**Anexo 2**).

**Objetivo 3.** Analizar el comportamiento de las poblaciones de los grupos funcionales relacionados a la rizosfera de la 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 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.

#### **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 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) y finalmente por el cuadro del medio.

## **Actividad 2. Contero de colonias y conidios de bacterias, hongos y actinomicetos de la raíz de 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) y finalmente por el cuadro del medio.

### **Actividad 3. Comparaciones de la incidencia de los tres grupos funcionales encontrados en raíz de las dos repeticiones.**

#### **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 UFC\*gr<sup>-1</sup> y los conidios de estas se encuentran medios en conidios\*gr<sup>-1</sup>.

#### **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.

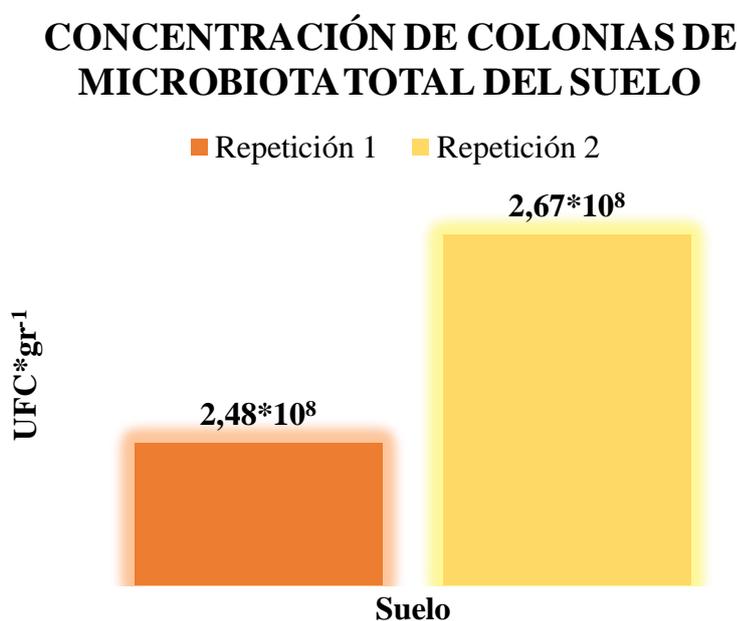
Se realizó una comparación entre las tres muestras tomadas para cada grupo funcional y conocer en cuál de ellas se vio mayor cantidad de colonias y conidios y finalmente se realiza una comparación entre los grupos funcionales de las dos repeticiones y una general entre de todos los grupos funcionales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

## 9. ANALISIS Y RESULTADOS

La interpretación de los resultados se los realizo de acuerdo a los datos obtenidos por el conteo de colonias mediante el Contador de colonias en UFC\*gr<sup>-1</sup> y del conteo de conidios mediante el uso de la Cámara de Neubauer en conidios\*gr<sup>-1</sup>. A continuación se realiza la descripción de las Figuras de barras tanto por método de siembra por maceración como de siembra por fragmentos de la raíz.

### 9.1. Concentración de UFC\*gr<sup>-1</sup> de Microbiota total de suelo.

Figura 2. Concentración de UFC\*gr<sup>-1</sup> de Microbiota total del suelo.



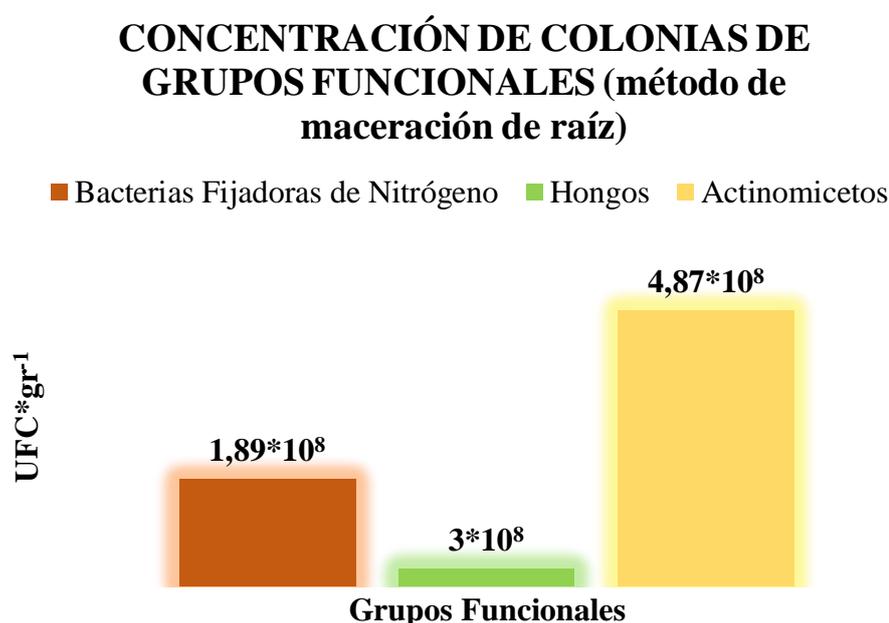
Como se puede observar en la (figura 2), encontramos 2,48\*10<sup>8</sup> UFC\*gr<sup>-1</sup> en la primera repetición y 2,6\*10<sup>8</sup> UFC\*gr<sup>-1</sup> en la segunda repetición lo que nos permite determinar que existe gran cantidad de microorganismos asociados a la rizosfera de la papa en cultivo tradicional.

Esto nos permite concluir que a pesar de tener un suelo pobre en materia orgánica existe una buena presencia de microbiota total, estos datos corroboran con lo realizado por (Linav Hernández Flores, 2013) en su estudio del efecto de las prácticas agrícolas sobre las poblaciones bacterianas del suelo en sistemas de cultivo de Chihuahua, demuestra que aquellos suelos pobres en materia orgánica pero ricos en fosforo suelen ser los más ricos en bacterias y organismos totales.

Así como también se observó que el cultivo al ser manejado con fertilizantes químicos y pesticidas aún conserva microbiología en sus suelos, esto es igual a lo expuesto por (Lima, Santos, Espinosa, & Cerrato, 2000) donde nos dice que la papa es el segundo producto agrícola producido en el país, pero consume casi 20% del total de fungicidas agrícolas, por lo que ocupa el primer lugar en el uso de insumos agroquímicos que ocasionan problemas ambientales.

## 9.2. Concentración de UFC\*gr<sup>-1</sup> de los Grupos Funcionales.

**Figura 3. Concentración de UFC\*gr<sup>-1</sup> de los grupos funcionales por siembra de maceración de raíz.**

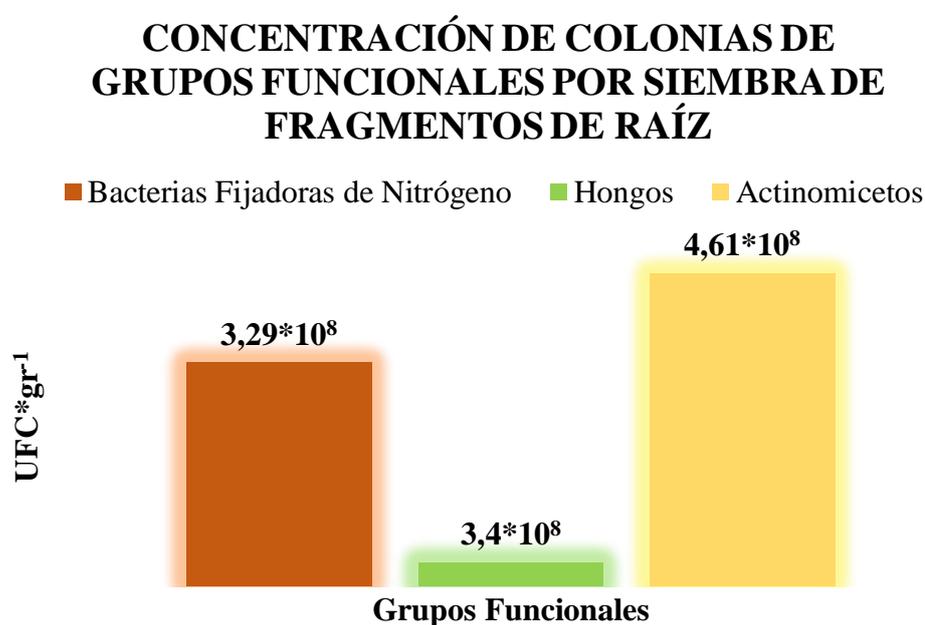


Como se puede observar en la (figura 3), encontramos 4,87\*10<sup>8</sup> UFC\*gr<sup>-1</sup> de actinomicetos, 1,98\*10<sup>8</sup> UFC\*gr<sup>-1</sup> de bacterias fijadoras de nitrógeno y 3\*10<sup>8</sup> UFC\*gr<sup>-1</sup> de hongos, lo que nos permite determinar que existe mayor cantidad de actinomicetos asociados a la rizosfera de la papa en cultivo tradicional.

Esto nos permite concluir que la presencia de actinomicetos como grupo funcional predominante en el suelo es resultado de que exista materia orgánica estable y pH neutro, teniendo en cuenta que esto sirve de fuente para el desarrollo de actinomicetos; lo que corrobora con lo expuesto por (Sivila de Cary, 2006) donde nos dice que el gran contenido en materia orgánica presente en el suelo provoca cantidades de actinomicetos superiores a los de bacterias y hongos.

También se logra observar colonias formadoras de bacterias fijadoras de nitrógeno y hongos en la muestra de rizosfera debido a que la presencia de nutrientes como lo es el nitrógeno y calcio se encuentra en niveles aceptables para el desarrollo de esto como lo determina (Reis, Silva, Teixeira, & Urquiaga, 2004) explicando que las bacterias fijadoras de nitrógeno pueden desarrollarse aun cuando las condiciones de nitrógeno es limitante o completamente deficiente aunque las prácticas de cultivo tiene efectos negativos sobre estas poblaciones evitando la interacción microorganismos-planta.

**Figura 4. Concentración de UFC\*gr<sup>-1</sup> de los grupos funcionales por siembra de fragmentos de raíz.**



En la (figura 4), encontramos 4,61\*10<sup>8</sup> UFC\*gr<sup>-1</sup> de actinomicetos, 3,29\*10<sup>8</sup> UFC\*gr<sup>-1</sup> de bacterias fijadoras de nitrógeno y 3,4\*10<sup>8</sup> UFC\*gr<sup>-1</sup> de hongos, lo que nos permite determinar que existe mayor cantidad de actinomicetos asociados a la rizosfera de la papa en cultivo tradicional.

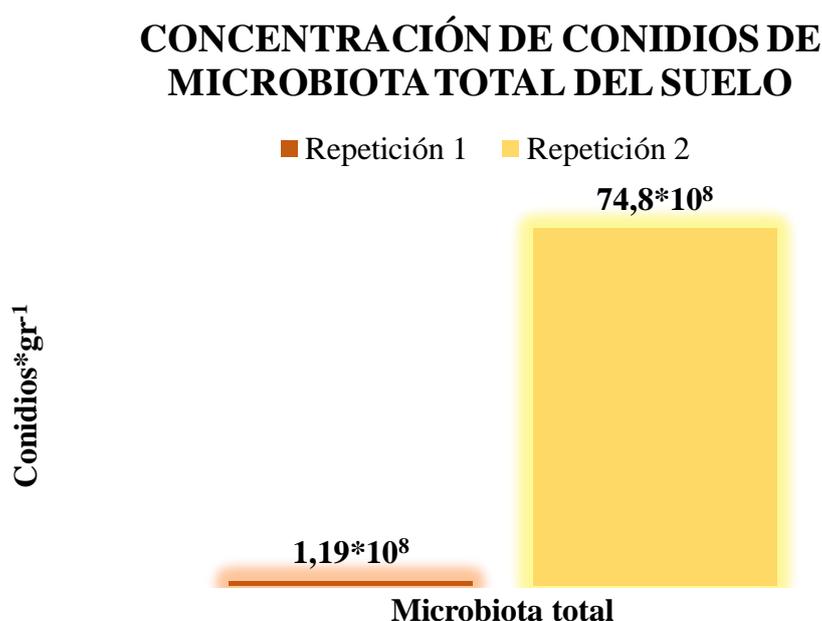
El grupo funcional de actinomicetos fue el que tuvo mayor predominancia en los medios de cultivo, dejando en claro que el suelo de donde se obtuvieron las muestras de rizosfera eran suelos con labranza mínima, aun cuando la aplicación de pesticidas y fertilizantes químicos es alta por la presencia de punta morada en los terrenos aledaños al sector, esto no presenta mayor afectación ante la incidencia de grupos funcionales, corroborando lo dicho por (Sivila de Cary, 2006) donde nos dice que 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.

Los grupos funcionales como bacterias fijadoras de nitrógeno y hongos presentaron una incidencia menor a la actinomicetos lo que se puede deducir que el suelo de muestra no es el más adecuado para su desarrollo por lo niveles bajos de nitrógeno y el pH neutro no es el adecuado para el desarrollo de hongos de acuerdo con (Alexander, 1999) donde nos indican que las colonias de hongos son predominantes en suelos ácidos, ya que con esta clase de pH las colonias de los hongos favorecen a la captación de agua y nutrimentos para el suelo, además no presentan competencia con bacterias y actinomicetos.

### 9.3. Concentración de Conidios\*gr<sup>-1</sup> de la Microbiota total del suelo.

**Figura 5. Concentración de Conidios\*gr<sup>-1</sup> de Microbiota total del suelo**



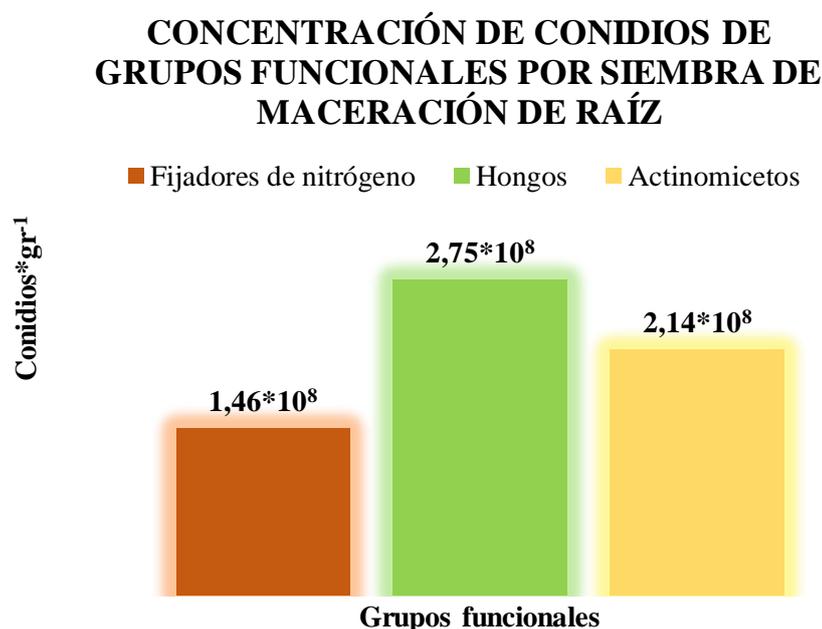
En la (figura 5), encontramos  $1,19 \cdot 10^8$  conidios\*gr<sup>-1</sup> en la primera repetición y  $74,8 \cdot 10^8$  conidios\*gr<sup>-1</sup> en la segunda repetición de microbiota total del suelo, lo que nos permite determinar que existe gran cantidad de microorganismos asociados a la rizosfera de la papa en cultivo tradicional.

El desarrollo de microbiota total en los medios de cultivo se presentó favorecedor por las condiciones a las que se expusieron dentro de laboratorio, y debido a que se tomaron de suelo cercano a la zona rizosférica la cual tiene mayor presencia de microorganismos en ella como lo expresa (Ronald M. Atlas, 2002) y nos dice que las raíces de las plantas tienen una influencia

directa en la composición y en la densidad de la microbiota del suelo; este efecto se conoce como efecto rizosférico y puede verse como la relación del número de organismos en el suelo de la rizosfera sobre el número de microorganismos en el suelo alejado de las raíces, es decir, las poblaciones microbianas son hasta 100 veces mayores en la rizosfera

#### 9.4. Concentración de Conidios\*gr<sup>-1</sup> de los Grupos funcionales.

**Figura 6. Concentración de Conidios\*gr<sup>-1</sup> de Grupos funcionales por la método de siembra de maceración de raíz.**

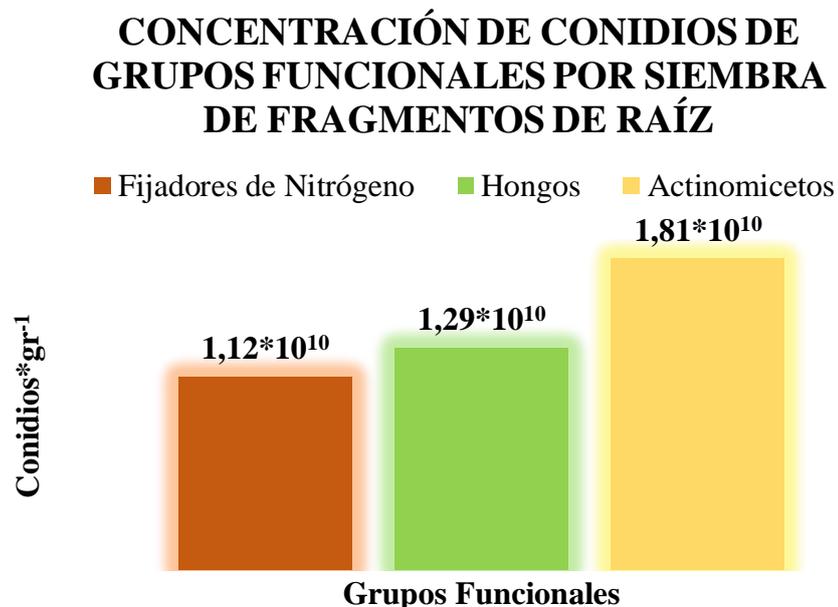


En la (figura 6), encontramos 2,75\*10<sup>8</sup> conidios\*gr<sup>-1</sup> de hongos, 2,14\*10<sup>8</sup> conidios\*gr<sup>-1</sup> de actinomicetos y 1,46\*10<sup>8</sup> conidios\*gr<sup>-1</sup> de bacterias fijadoras de nitrógeno, lo que nos permite determinar que existe mayor cantidad de hongos asociados a la rizosfera de la papa en cultivo tradicional.

La presencia de hongos se presentó en mayor cantidad en la cantidad de conidios\*gr<sup>-1</sup> lo que nos indica que aun con la falta de un suelo con pH ácido puede desarrollarse este grupo funcional debido a que necesita de varios nutrientes en el suelo como lo es el Ca, el cual es uno de los elementos en mayor cantidad en el suelo de donde se tomaron las muestras, lo cual corrobora lo expresado por (Coyne, 2000) donde nos dice que los hongos constituyen la segunda porción más elevada de la biomasa microbiana del suelo y se presentan generalmente como finos filamentos. La distribución de los hongos en el suelo está determinada por la disponibilidad de carbono orgánico. Son considerados como saprofitos, es decir que crecen en

tejidos muertos y realizan la descomposición de la materia orgánica y generalmente se encuentran en la capa superior del suelo.

**Figura 7. Concentración de Conidios\*gr<sup>-1</sup> de Grupos funcionales por la método de siembra de fragmentos de raíz.**



En la (figura 4), encontramos 1,81\*10<sup>10</sup> conidios\*gr<sup>-1</sup> de actinomicetos, 1,29\*10<sup>10</sup> conidios\*gr<sup>-1</sup> de hongos y 1,12\*10<sup>10</sup> conidios\*gr<sup>-1</sup> de bacterias fijadoras de nitrógeno, lo que nos permite determinar que existe mayor cantidad de actinomicetos asociados a la rizosfera de la papa en cultivo tradicional.

El grupo funcional de actinomicetos fue el que tuvo mayor predominancia en los medios de cultivo, dejando en claro que el suelo de donde se obtuvieron las muestras de rizosfera eran suelos con labranza mínima, pero con aplicación de pesticidas y fertilizantes químicos alta por la presencia de punta morada en los terrenos aledaños al sector, esto no presentó mayor afectación ante la incidencia de grupos funcionales, corroborando lo dicho por (Sivila de Cary, 2006) donde nos dice que la población de actinomicetos es de gran interés para determinar la calidad del suelo, porque su presencia demuestra que el suelo es sano y que mantiene los niveles de nutrientes elevados para ser productivo.

Los grupos funcionales como bacterias fijadoras de nitrógeno y hongos presentaron una incidencia menor a la actinomicetos lo que se puede deducir que el suelo de muestra no es el más adecuado para su desarrollo por los niveles bajos de nitrógeno y el pH neutro no es el adecuado

para el desarrollo de hongos de acuerdo con (Alexander, 1999) donde nos indican que las colonias de hongos son predominantes en suelos ácidos, ya que con esta clase de pH las colonias de los hongos favorecen a la captación de agua y nutrimentos para el suelo, además no presentan competencia con bacterias y actinomicetos.

## 10. PRESUPUESTO

Tabla 2. Presupuesto del proyecto.

<b>Recursos</b>	<b>Cantidad</b>	<b>V. Unitario</b>	<b>Valor Total</b>
<b>Equipos</b>			
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
<b>Transporte y salida de campo</b>			
Camionetas	7	\$2,50	\$17,50
Bus interprovincial	12	\$7,00	\$84,00
Bus	12	\$0,30	\$3,60
<b>Materiales y suministros</b>			
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 parafilm	1	\$71,00	\$71,00
Cajas Petri	120	\$0,35	\$42,00
Pinzas	1	\$1,00	\$1,00
Azas	3	\$0,45	\$1,35
<b>Agares y soluciones</b>			
Agar nutritivo	1	\$51,99	\$51,99
Papa dextrosa Agar	1	\$62,50	\$62,50

Trypticasa 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
<b>Material Bibliográfico y fotocopias.</b>			
Internet	20	\$0,60	\$12,00
Impresiones	240	\$0,10	\$24,00
Copias	1	\$6,50	\$6,50
<b>TOTAL</b>			<b>\$ 8'971,45</b>

**Elaborado por:** Mena, 2021.

## 11. CONCLUSIONES

Se demuestra que con la ayuda de 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 de la papa.

Se determinó que la cantidad promedio de Microbiota total encontrada en el suelo asociado a la rizosfera del cultivo de la papa en la Parroquia de Pastocalle, de entre las dos repeticiones fue de  $2,57 \cdot 10^8$  UFC\*gr<sup>-1</sup> que nos indica que la presencia de microorganismos es considerada dentro de los rangos valido para que un suelo pueda ser considerado sano y productivo.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno contabilizadas asociados a la rizosfera del cultivo de la papa fue  $3,28 \cdot 10^8$  UFC\*gr<sup>-1</sup> y  $1,89 \cdot 10^8$  UFC\*gr<sup>-1</sup>, en siembra por fragmentos de raíz, y siembra por maceración respectivamente.

Los hongos contabilizados en la rizosfera de la papa fueron  $3,4 \cdot 10^8$  UFC\*gr<sup>-1</sup> en siembra por fragmentos de raíz, siendo esta mayor a los contabilizados en siembra por maceración con  $3 \cdot 10^8$  UFC\*gr<sup>-1</sup>. 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  $4,87 \cdot 10^8$  UFC\*gr<sup>-1</sup> y  $4,61 \cdot 10^8$  UFC\*gr<sup>-1</sup> respectivamente.

## **12. RECOMENDACIONES**

Se recomienda utilizar medios de cultivos específicos para grupos funcionales de suelo como solubilizadoras de fósforo, bacterias, celulíticos y pseudomonas.

Además 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 funciones 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 a través de la investigación realizada del mismo.

### 13. BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón, I. (24 de Junio de 2018). La mitad de las Tierras en Ecuador muestran signos de degradación. *EL COMERCIO*.
- Alexander, M. (1999). Biodegrading and Bioremediation. *Science Direct*, 100 - 109.
- 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, P. G. (14 de Abril de 2005). Determinación de la calidad microbiologica del compost para la producción ecologica 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
- Corrales, R. B., & Espinoza, A. (Agosto de 2017). *Universidad Nacional Agraria y Catholic Relief Services (CRS)*. Obtenido de [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjcl\\_eB-5HvAhWkz4UKHQHqDoIQFjAFegQIGBAD&url=https%3A%2F%2Frepositorio.una.edu.ni%2F3613%2F1%2FP33M539.pdf&usg=AOvVaw0FOSMDTcW0t02EHbOR0wkY](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjcl_eB-5HvAhWkz4UKHQHqDoIQFjAFegQIGBAD&url=https%3A%2F%2Frepositorio.una.edu.ni%2F3613%2F1%2FP33M539.pdf&usg=AOvVaw0FOSMDTcW0t02EHbOR0wkY)
- Coyne, M. (2000). *Microbiología del Suelo: un enfoque exploratorio*. España: Editorial Parafino. doi:<https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=116161>
- Cuesta, X., Rivadeneira, J., Pumisacho, M., Montesdeoca, F., Velasquez, J., Reinoso, I., & Monteros, C. (2014). Manual del cultivo de papa para pequeños productores. *INIAP*, 4 - 102. doi:41000/3033/1/iniapscm78
- Devaux. (2010).
- 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.
- ESPAC. (2015).

- 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\\_FINAL-DIAGNOSTICO-COTOPAXI\\_14-05-2015\\_19-14-32.pdf?fbclid=IwAR0JiD-Bst87kISP9LEdRvG91WHNcDRapcG0ck6ZrPGyCKQ77O3vYwwNsNg](http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdiagnostico/0560000110001_FINAL-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](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*.
- Lima, M. R., Santos, A. T., Espinosa, R. G., & Cerrato, R. F. (2000). Producción de papa y biomasa microbiana en suelo con abonos orgánicos y minerales. *Agrociencia*, 34(3), 261 - 269. doi:7041488
- Linav Hernández Flores, A. M. (2013). Efecto de las prácticas agrícolas sobre las poblaciones bacterianas del suelo en sistemas de cultivo en Chihuahua, México. *Revista Mexican de Ciencias Agrícolas*, 4(3), 353 . 365. doi:S2007-09342013000300002
- Mena, M. J. (2014). *Google Maps*. Obtenido de <https://www.google.com/maps/place/0%C2%B042'33.2%22S+78%C2%B037'60.0%2>

2W/@-0.7091638,-78.6334028,93m/data=!3m1!1e3!4m5!3m4!1s0x0:0x0!8m2!3d-  
0.7092201!4d-78.6333264?hl=es

Ministerio de Agricultura. (1997). Erosión del suelo. *EcuRed*, 167 - 216. Obtenido de [https://www.ecured.cu/Erosi%C3%B3n\\_del\\_suelo](https://www.ecured.cu/Erosi%C3%B3n_del_suelo)

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

PhD. Raffaele Vignola, M. W. (Enero de 2017). PRÁCTICAS EFECTIVAS PARA LA REDUCCIÓN DE IMPACTOS POR EVENTOS CLIMÁTICOS EN EL CULTIVO DE PAPA EN COSTA RICA. *MAG*.

Reis, F., Silva, M., Teixeira, K., & Urquiag, L. (Febrero de 2004). Identificación de aislamientos de *Azospirillum amazonense* asociado con *Brachiarias* en diferentes momentos y condiciones de cultivo y producción de fitohormonas por bacteria. *Revista Brasileña de Ciencia*, 28(1). doi:S0100-06832004000100011

Reyes, J. A., & Fontalvo, J. A. (04 de Julio de 2018). GVrupos funcionales microbianos en suelos contaminados con toxafeno en el Dedpartamento del CESAR. *LunAzul*, 46(6), 98 - 113. doi:10.17151/luaz.2019.47.6

Ronald M. Atlas, R. B. (2002). Ecología microbiana y microbiología ambiental, 4ed. *Pearson Educación S.A.* doi:9788478290390

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>

Sivila de Cary, R. &. (2006). Efecto del descanso agrícola sobre la microbiota del suelo en el Altiplano Central boliviano. *Ecología en Bolivia*, 41(3). doi:S1605-25282006001200008

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/>
- Universidad Nacional de Córdoba. (2015). *GUIA DE ACTIVIDADES PRÁCTICAS MICROBIOLOGÍA AGRÍCOLA*. Córdoba. Obtenido de <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwiYscCghKLvAhWjp1kKHXXMAYwQFjACegQIFxAD&url=http%3A%2F%2Fagro.unc.edu.ar%2F~microbiologia%2Fwp-content%2Fuploads%2F2014%2F04%2FGuia-de-Trabajos-Practicos.pdf&usg=AOvVaw33A6MALy7US8Kq>
- 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
- WIX. (2020). *Laboratorio de microbiología*. Obtenido de Técnicas y tipos de sembrado en placa y tubo : <https://labdemicrobiologia.wixsite.com/scientist-site/t-cnicas-y-tipos-de-sembrado>

## **14. ANEXOS**

### **Anexo 1. Protocolo de diluciones seriadas para Microbiota total del suelo.**

#### **Introducción**

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 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 µl y 100 µl
- 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 µl, 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 2. 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 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 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 µl y 100 µl
- 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  $\mu$ 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 3. 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 4. 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 5. Protocolo de medio de cultivo Trypticosa soya Agar.**

### **Introducción**

El Trypticosa 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 6. Protocolo de medio de cultivo de 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 7. 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 aza 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 quedaran 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 8. Conteo de UFC\*gr<sup>-1</sup> de Microbiota total del suelo (1ra repetición).**

<b>CONCENTRACIÓN DE UFC*gr<sup>-1</sup> 1ra REPETICIÓN</b>	
<b>MICROBIOTA TOTAL</b>	
<b>Muestra 1</b>	
	<b>248</b>
<b>10<sup>8</sup></b>	<b>2,48*10<sup>8</sup></b>

**FÓRMULA:**

$$\text{UFC*gr}^{-1} = P * \text{FD}$$

**SIGLAS:**

**UFC:** unidades formadoras de colonias

**gr<sup>-1</sup>:** gramos

**FD:** factor de dilución

**P:** promedio muestras

**Anexo 9. Conteo de UFC\*gr<sup>-1</sup> de Microbiota total del suelo (2da repetición).**

<b>CONCENTRACIÓN DE UFC*gr 2da REPETICIÓN</b>	
<b>MICROBIOTA TOTAL</b>	
<b>Muestra 1</b>	
	<b>267</b>
<b>10<sup>8</sup></b>	<b>2,67*10<sup>8</sup></b>

**FÓRMULA:**

$$\text{UFC*gr}^{-1} = P * \text{FD}$$

**SIGLAS:**

**UFC:** unidades formadoras de colonias

**gr<sup>-1</sup>:** gramos

**FD:** factor de dilución

**P:** promedio muestras

**Anexo 10. Conteo de UFC\*gr<sup>-1</sup> de Grupos funcionales (método de siembra por maceración de raíz).**

**CONCENTRACIÓN DE UFC\*gr<sup>-1</sup> DE LOS GRUPOS FUNCIONALES MÉTODO DE SIEMBRA POR MACERACIÓN DE RAÍZ**

<b>Bacterias Fijadoras de Nitrógeno</b>	<b>Hongos</b>	<b>Actinomicetos</b>
189	30	487
<b>1,89*10<sup>8</sup></b>	<b>3*10<sup>8</sup></b>	<b>4,87*10<sup>8</sup></b>

**FÓRMULA:**

$$\text{UFC*gr}^{-1} = P * \text{FD}$$

**SIGLAS:**

**UFC:** unidades formadoras de colonias

**gr<sup>-1</sup>:** gramos

**FD:** factor de dilución

**P:** promedio muestras

**Anexo 11. Conteo de UFC\*gr<sup>-1</sup> de Grupos funcionales (método de siembra por fragmentos de raíz).**

**CONCENTRACIÓN DE UFC\*gr<sup>-1</sup> DE LOS GRUPOS FUNCIONALES MÉTODO DE SIEMBRA POR FRAGMENTO DE RAÍZ**

<b>Bacterias Fijadoras de Nitrógeno</b>	<b>Hongos</b>	<b>Actinomicetos</b>
329	34	461
<b>3,29*10<sup>8</sup></b>	<b>3,4*10<sup>8</sup></b>	<b>4,61*10<sup>8</sup></b>

**FÓRMULA:**

$$\text{UFC*gr}^{-1} = P * \text{FD}$$

**SIGLAS:**

**UFC:** unidades formadoras de colonias

**gr<sup>-1</sup>:** gramos

**FD:** factor de dilución

**P:** promedio muestras

**Anexo 12. Conteo de conidios\*gr<sup>-1</sup> de Microbiota total del suelo (1ra repetición).****CONCENTRACIÓN DE Conidios\*gr<sup>-1</sup> DE MICROBIOTA TOTAL**

<b>MICROBIOTA TOTAL</b>	
	11,95
<b>10<sup>8</sup></b>	<b>1,19*10<sup>8</sup></b>

**FORMULA:**

$$\text{Conidios*gr}^{-1} = \text{Promedio} * 10000 * 16 * 100$$

**NOTA:**

10000\*16 (constante)

**Anexo 13. Conteo de conidios\*gr<sup>-1</sup> de Microbiota total del suelo (2da repetición).****CONCENTRACIÓN DE CONIDIOS (conidios\*gr<sup>-1</sup>) DE FRAGMENTOS DE RAÍZ**

<b>MICROBIOTA TOTAL</b>	
	748,45
<b>10<sup>8</sup></b>	<b>74,8*10<sup>8</sup></b>

**FORMULA:**

$$\text{Conidios*gr}^{-1} = \text{Promedio} * 10000 * 16 * 100$$

**NOTA:**

10000\*16 (constante)

**Anexo 14. Cuento de conidios\*gr<sup>-1</sup> de Grupos funcionales (método de siembra por maceración de raíz).**

**CONCENTRACIÓN DE Conidios\*gr<sup>-1</sup> DE GRUPOS FUNCIONALES POR MÉTODO DE MACERACIÓN DE RAÍZ**

<b>Fijadores de Nitrógeno</b>	<b>Hongos</b>	<b>Actinomicetos</b>
9,10	17,20	13,40
<b>1,46E+08</b>	<b>2,75E+08</b>	<b>2,14E+08</b>

**FORMULA:**

$$\text{Conidios*gr}^{-1} = \text{Promedio} * 10000 * 16 * 100$$

**NOTA:**

10000\*16 (constante)

**Anexo 15. Cuento de conidios\*gr<sup>-1</sup> de Grupos funcionales (método de siembra por fragmentos de raíz).**

**CONCENTRACIÓN DE CONIDIOS (conidios\*gr<sup>-1</sup>) DE GRUPOS FUNCIONALES TÉCNICA DE FRAGMENTOS DE RAÍZ**

<b>Fijadores de Nitrógeno</b>	<b>Hongos</b>	<b>Actinomicetos</b>
701,35	807,75	1132,20
<b>1,12E+10</b>	<b>1,29E+10</b>	<b>1,81E+10</b>

**FORMULA:**

$$\text{Conidios*gr}^{-1} = \text{Promedio} * 10000 * 16 * 100$$

**NOTA:**

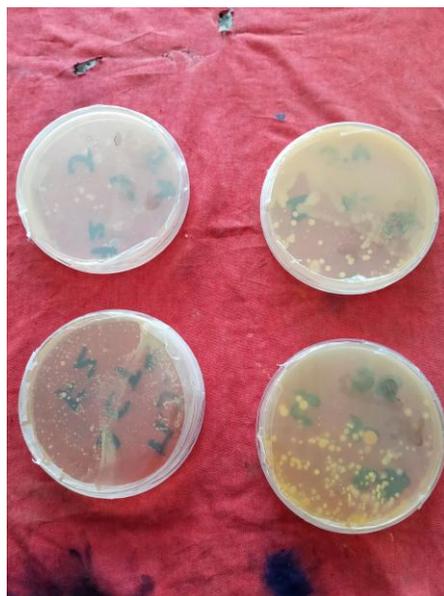
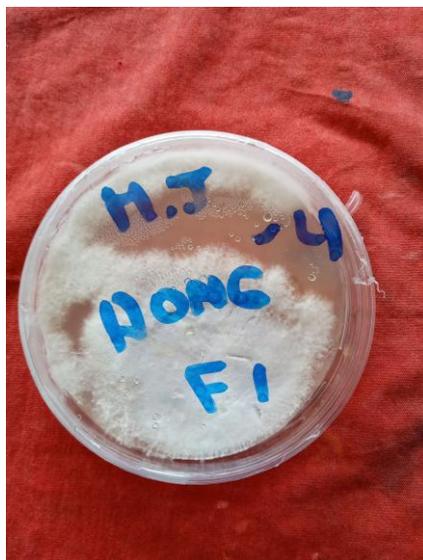
10000\*16 (constante)

**Anexo 16. Recolección de muestras de rizosfera del cultivo de papa.****Anexo 17. Recolección de muestras de suelo para análisis.**

**Anexo 18. Tamización de raíces para soluciones en laboratorio.****Anexo 19. Soluciones de muestra de suelo para microbiota total.**

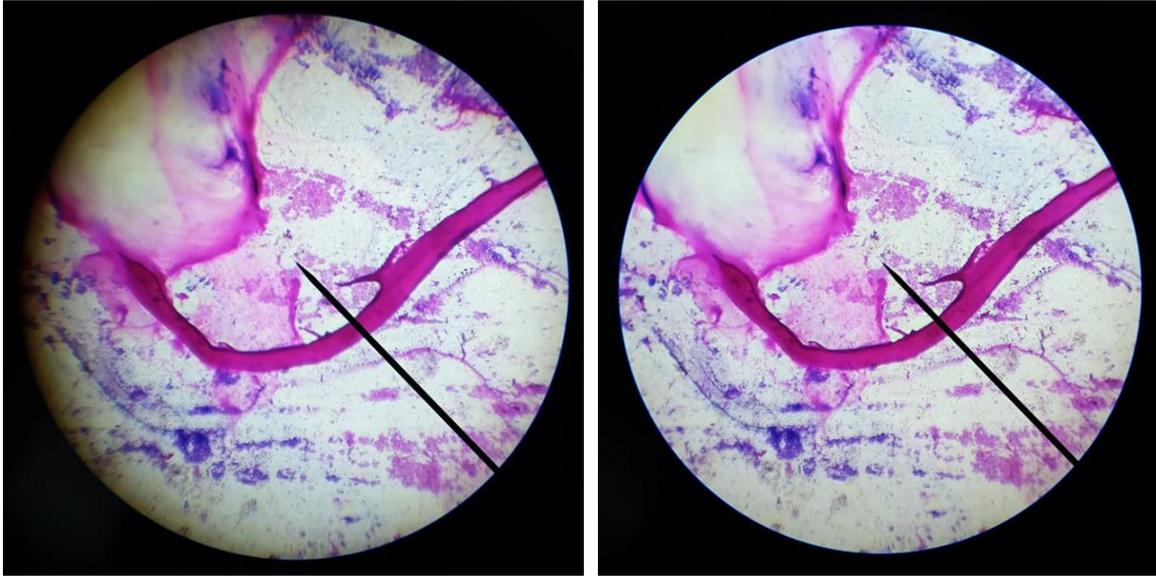
**Anexo 20. Preparación de medios de cultivo para grupos funcionales y microbiota total.****Anexo 21. Reposo en estufa para el crecimiento de bacterias y hongos.**

Anexo 22. Verificación de aparición de hongos y bacterias.



**Anexo 23. Conteo de colonias y conidios en cámara de Neubauer.****Anexo 24. Colocación de medios de cultivo por fragmentos de partes vegetales de raíz.**

**Anexo 25. Observación de bacterias por técnica de Tinción en microscopio.**



## Anexo 26. Análisis de suelo.

MC-LASPA-2201-01

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

INFORME DE ENSAYO No: 21-0123

**NOMBRE DEL CLIENTE:** MARÍA JOSÉ MENA  
**PETICIONARIO:** MARÍA JOSÉ MENA  
**EMPRESA/INSTITUCIÓN:** MARÍA JOSÉ MENA  
**DIRECCIÓN:** SAN BARTOLOMÉ

**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	B	ppm	A	ppm	B	ppm	A	ppm	B	ppm	A	ppm	A	ppm	M	ppm	A	ppm	B	ppm	meq/100g	%	%	Arena	Limo	Arcilla	Clase Textural							
21-0469	7,02	PN	15	B	78	A	7,8	B	0,44	B	0,75	A	7,20	A	1,24	A	3,7	M	4,4	A	77	A	3,4	B	5,80	1,65	11,20	9,19	1,7	M						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:

METODOLOGIA USADA	
pH =	Suelo: Agua (1:2,5) P K Ca Mg = Oliva Modificado
S,B =	Fosfato de Calcio Cu Fe Mn Zn = Oliva Modificado
	B = Curcumina

\* Ensayos no solicitados por el cliente

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

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

METODOLOGIA USADA	
C.E. =	Pasta Saturada
M.O. =	Dicromato 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 = Lig. Salino	MS = Muy Salino
T = Tóxico		M. = Medio
		A = Alto



Firmado electrónicamente por:  
**JOSE ALONSO**  
**LUCERO**  
**MALATAY**



Firmado electrónicamente por:  
**IVAN RODRIGO**  
**SAMANIEGO**  
**MAIGUA**

## Anexo 27. Aval del traductor.



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**; **MENA TIPÁN MARÍA JOSÉ**, cuyo título versa **“DETECCIÓN DE GRUPOS FUNCIONALES ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DEL CULTIVO DE PAPA (SOLANUM TUBEROSUM) EN LA LOCALIDAD DE PASTOCALLE, CANTÓN LATACUNGA, PROVINCIA DE COTOPAXI”**, 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 hacer uso del presente certificado de la manera ética que estimare conveniente.

Latacunga, marzo del 2021

Atentamente,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'B. Cevallos Galarza'.

**Mg. BOLÍVAR MAXIMILIANO CEVALLOS GALARZA**  
**DOCENTE CENTRO DE IDIOMAS**  
**C.C. 0910821669**

1803027935 Firmado digitalmente por  
 VICTOR HUGO ROMERO GARCIA  
 1803027935  
 CENTRO DE IDIOMAS  
 Fecha: 2021.03.16  
 09:41:11 -05'00'

 A circular digital signature stamp with a purple border, containing the text 'CENTRO DE IDIOMAS' and 'UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI'. The stamp is overlaid on the printed name and ID number.