



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS

NATURALES

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

ANÁLISIS DE CONSORCIOS BACTERIANOS Y GRUPOS FUNCIONALES ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DE LA PAPA (*Solanum tuberosum*), Var. SÚPER CHOLA EN EL PISO ALTITUDINAL DE 3400 msnm. COTOPAXI. 2021.

**Proyecto de investigación presentado previo a la obtención del Título de
Ingeniero Agrónomo**

Autor:

Cruz Almagro Francisco Javier

Director:

Chasi Vizuete Paolo Wilman Ing. M.Sc.

LATACUNGA - ECUADOR

Agosto 2021

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Francisco Javier Cruz Almagro, con cédula de ciudadanía No. 1727387985, declaro ser autor del presente proyecto de investigación: **“Análisis de consorcios bacterianos y grupos funcionales asociados a la rizosfera de la papa (*Solanum tuberosum*), Var. Súper chola en el piso altitudinal de 3400 msnm. Cotopaxi. 2021.”** 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, 16 de agosto del 2021.

Cruz Almagro Francisco Javier

Estudiante

CC: 1727387985

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 **CRUZ ALMAGRO FRANCISCO JAVIER**, identificado con cédula de ciudadanía **1727387985**, de estado civil soltero a quien en lo sucesivo se denominará **EL CEDENTE**; y, de otra parte, el Ingeniero Ph.D. Cristian Fabricio Tinajero Jiménez, 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.- EL CEDENTE es una persona natural estudiante de la carrera de **Ingeniería Agronómica**, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado “**Análisis de consorcios bacterianos y grupos funcionales asociados a la rizosfera de la papa (*Solanum tuberosum*), Var. Súper chola en el piso altitudinal de 3400 msnm. Cotopaxi. 2021.**” 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: Abril 2016 – Agosto 2016

Finalización de la carrera: Abril 2021 - Agosto 2021

Aprobación en Consejo Directivo: 20 de mayo del 2021

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

Tema: “**Análisis de consorcios bacterianos y grupos funcionales asociados a la rizosfera de la papa (*Solanum tuberosum*), Var. Súper chola en el piso altitudinal de 3400 msnm. Cotopaxi. 2021.**”

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

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

CLÁUSULA CUARTA.- OBJETO DEL CONTRATO: Por el presente contrato **EL 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 **EL 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 **EL 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 **EL CEDENTE** en forma escrita.

CLÁUSULA NOVENA.- El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la 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 16 días del mes de agosto del 2021.

Francisco Javier Cruz Almagro

EL CEDENTE

Ing Ph.D. Cristian Fabricio Tinajero Jiménez

LA CESIONARIA

AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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

“ANÁLISIS DE CONSORCIOS BACTERIANOS Y GRUPOS FUNCIONALES ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DE LA PAPA (*Solanum tuberosum*), Var. SÚPER CHOLA EN EL PISO ALTITUDINAL DE 3400 msnm. COTOPAXI. 2021.” de Cruz Almagro Francisco Javier, 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, 16 de agosto del 2021.

Ing. M.Sc. Wilman Paolo Chasi Vizquete

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, el postulante: Cruz Almagro Francisco Javier, con el título de Proyecto de Investigación: **“ANÁLISIS DE CONSORCIOS BACTERIANOS Y GRUPOS FUNCIONALES ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DE LA PAPA (*Solanum tuberosum*), Var. SÚPER CHOLA EN EL PISO ALTITUDINAL DE 3400 msnm. COTOPAXI. 2021.”** 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, 16 de agosto del 2021

Lector 1 (Presidente/a)

Ing. Mtr. Molina Álvarez Richard Alcides

CC: 1205974627

Lector 2

Ing. Mtr. Castillo De La Guerra Clever

Gilberto

CC: 0501715494

Lector 3

Ing.Mg. Chancusig Francisco Hernán

CC: 0501883920

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a mi madre que me hace llenar de orgullo, sin su educación, sacrificio, consejos y apoyo incondicional no hubiera alcanzado mis metas que desde niño me he propuesto, por ser mi fortaleza y mi apoyo incondicional en los momentos más difíciles, gracias por seguir confiando en mí a pesar de todo y demostrarme que todo lo que me proponga lo lograré.

A Ana Alvarado por haberme apoyado y guiado a lo largo de mi vida, quien, con su ejemplo y dedicación, apoyo y motivación ha logrado en mí, que pueda terminar mis estudios con éxito.

Quiero también agradecer a Kharell Olaya que con su paciencia, tenacidad y apoyo incondicional me inspiro a culminar esta mi meta.

A mis amigos que los conocí en mi trayectoria del colegio y a los que me acompañaron en mi etapa universitaria.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida estudiantil a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de todo este proyecto académico.

DEDICATORIA

Dedico este proyecto de investigación a mi madre como principal motor para poder avanzar durante toda mi vida quien con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más.

A mi familia por su apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo con sus, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas. Finalmente quiero dedicar esta investigación a los docentes con vocación que a través de sus enseñanzas pude lograr la realización de este proyecto.

Francisco Cruz A.

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TÍTULO: “ANÁLISIS DE CONSORCIOS BACTERIANOS Y GRUPOS FUNCIONALES ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DE LA PAPA (*Solanum tuberosum*), Var. SÚPER CHOLA EN EL PISO ALTITUDINAL DE 3400 msnm. COTOPAXI. 2021.”

AUTOR: Cruz Almagro Francisco Javier

RESUMEN

La presente investigación se realizó en la rizosfera de la papa, variedad súper chola en el piso altitudinal de 3400 msnm en la comunidad de Cuturuví Chico de la provincia de Cotopaxi, tuvo como objetivo identificar consorcios bacterianos y determinar los grupos funcionales asociados a la rizosfera del cultivo de la papa.

La identificación bacteriana se la realizó a través del método de secuenciación en nanoporos con dispositivo MinION, con amplificación de los genes 16s de la muestra y preparación de librerías de ADN, para secuenciar utilizando el kit de código de barras para posterior análisis de las lecturas resultantes en el flujo bioinformático online 16S en EPI2ME. Para el análisis de los diferentes grupos funcionales se tomó de referencia metodológica la metodología de (Bernal, Gustavo, 2005) misma que se utilizó para la determinación de bacterias fijadoras de nitrógeno, bacterias solubilizadoras de nitrógeno, hongos, actinomiceto, bacterias celulolíticas, pseudomonas. De los grupos funcionales antes mencionados se realizó cinco repeticiones en suelo y raíz más un testigo ciego donde obtuvimos el número de colonias gr^{-1} y las (Unidades formadoras de colonias) UFC gr^{-1} de cada uno. Adicional para conocer el estado de composición del suelo se realizó un análisis físico-químico que se envió al laboratorio del INIAP.

De los datos obtenidos en la investigación se puede decir que se identificó como las familias dominantes en la muestra de suelo la Enterobacteriaceae con 34,238 lecturas acumuladas, caracterizan por ser solubilizadoras de fósforo y fijadoras de nitrógeno Seguido de Xanthomonadaceae con 2,009 lecturas acumuladas mismas que se caracteriza por poseer bacterias celulolíticas y fijadoras de nitrógeno. El género más dominante es *Raoultella* con 1,949 lecturas acumuladas, mismas que son bacterias patógenas causantes de enfermedades. Seguido de *Arenimonas* con 1,002 lecturas acumuladas, caracterizadas por poseer bacterias solubilizadoras de fósforo. la especie más dominante la *Raoultella ornithinolytica* con 1,097 lecturas acumuladas, especie que se caracteriza por causar patologías en el cultivo. Seguido de *Arenimonas daechungensis* con 949 lecturas acumuladas, esta familia se caracteriza por poseer bacterias solubilizadoras de fósforo, esto podría incidir en el alto contenido de nitrógeno y fósforo obtenido en el análisis de suelo con 43 ppm de N y 79 ppm de fósforo (P) respectivamente

El grupo funcional de mayor numero de colonias en este tipo de suelo y piso altitudinal antes descrito fueron *Pseudomonas* donde encontramos $3,56 \cdot 10^7$ Colonias gr^{-1} en la muestra de suelo y $3,41 \cdot 10^7$ Colonias gr^{-1} en la muestra de raíz lo que nos permite determinar que existe una cantidad superior de *Pseudomonas* en relación al resto de grupos funcionales en estudio. En Unidades formadoras de colonias por gramo de suelo (UFC gr^{-1}), encontramos $3,04 \cdot 10^7$ UFC gr^{-1} y $2,41 \cdot 10^{12}$ en la muestra de suelo de y $2,96 \cdot 10^7$ UFC gr^{-1} en la muestra de raíz lo que nos permite determinar que existe mayor cantidad de microorganismos asociados a la rizosfera de la papa en la muestra de suelo.

Palabras clave: Microorganismos, grupos funcionales, metagenomicos.

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI
FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND NATURAL RESOURCES

THEME: "ANALYSIS OF BACTERIAL CONSORTIUM AND FUNCTIONAL GROUPS ASSOCIATED WITH THE POTATO RHIZOSPHERE (*Solanum tuberosum*), Var. SUPER CHOLA ON THE ALTITUDINAL FLOOR AT 3400 masl. COTOPAXI. 2021. "

AUTHOR: Cruz Almagro Francisco Javier

ABSTRACT

The present research was carried out in the rhizosphere of the potato, a super chola variety in the altitude floor of 3400 meters above sea level in the community of Cuturuví Chico in the province of Cotopaxi, aimed at identifying bacterial consortia and determining the functional groups associated with the rhizosphere of the potato cultivation.

Bacterial identification was carried out through the method of sequencing in nanopores with the MinION device, with amplification of the 16s genes of the sample and preparation of DNA libraries, for sequencing using the barcode kit for subsequent analysis of the resulting readings. in the 16S online bioinformatics flow at EPI2ME. For the analysis of the different functional groups, the methodology of (Bernal, Gustavo, 2005) was taken as a methodological reference, which was used for the determination of nitrogen-fixing bacteria, nitrogen-solubilizing bacteria, fungi, actinomycete, cellulolytic bacteria, pseudomonas. Of the aforementioned functional groups, five repetitions were carried out in soil and root plus a blind control where we obtained the number of colonies * gr-1 and the (Colony-forming units) CFU * gr -1 of each one. Additionally, to know the state of composition of the soil, a physical-chemical analysis was carried out and sent to the INIAP laboratory.

From the data obtained in the research, it can be said that Enterobacteriaceae was identified as the dominant families in the soil sample with 34,238 accumulated readings, characterized by being phosphorus solubilizers and nitrogen fixers Followed by Xanthomonadaceae with 2,009 accumulated readings, which are characterized for possessing cellulolytic and nitrogen fixing bacteria. The most dominant genus is Raoultella with 1,949 cumulative readings, which are pathogenic disease-causing bacteria. Followed by Arenimonas with 1,002 accumulated readings, characterized by having phosphorus solubilizing bacteria. the most dominant species is Raoultella ornithinolytica with 1,097 accumulated readings, a species that is characterized by causing pathologies in cultivation. Followed by Arenimonas daechungensis with 949 accumulated readings, this family is characterized by having phosphorus solubilizing bacteria, this could influence the high nitrogen and phosphorus content obtained in the soil analysis with 43 ppm of N and 79 ppm of phosphorus (P) respectively

The functional group with the highest number of colonies in this type of soil and altitudinal floor described above were Pseudomonas, where we found $3.56 * 10^7$ Colonies * gr-1 in the soil sample and $3.41 * 10^7$ Colonies * gr-1 in the Root sample which allows us to determine that there is a higher quantity of Pseudomonas in relation to the rest of the functional groups under study. In Colony Forming Units per gram of soil (CFU * gr-1), we find $3.04 * 10^7$ CFU * gr-1 and $2.41 * 10^{12}$ in the soil sample of and $2.96 * 10^7$ CFU * gr-1 in the root sample, which allows us to determine that there is a greater quantity of microorganisms associated with the potato rhizosphere in the soil sample.

Keywords: Microorganisms, functional groups, metagenomics.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	vi
AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	vii
AGRADECIMIENTOS	viii
.....	viii
DEDICATORIA.....	ix
RESUMEN	x
1. INFORMACIÓN GENERAL	1
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	3
3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	4
4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	6
5. OBJETIVOS	7
5.1. Objetivo General.....	7
5.1.1. Objetivos Específicos	7
6. TABLA DE ACTIVIDADES POR OBJETIVO.....	8
7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA.....	9
7.1. Rizosfera	9
7.1.1. Características de la rizosfera.....	9
7.2. ¿Qué son las bacterias?	9
7.2.1. Consorcios bacterianos	9
7.3. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal	10
7.4. Microbiota del suelo interface raíz suelo	10
7.5. Grupos funcionales	11
7.5.1. Los hongos.....	11
7.5.2. Bacterias solubilizadoras de fósforo y captadores de fósforo	11
7.5.3. Bacterias celulolíticas	12
7.5.4. Actinomicetos	12

7.5.5.	Bacterias fijadoras de nitrógeno	12
7.5.6.	Pseudomonas	13
7.6.	La papa.....	13
7.6.1.	Taxonomía	14
8.	PREGUNTA CIENTÍFICA.....	15
9.	METODOLOGÍA.....	15
	Objetivo 1: Analizar los consorcios bacterianos asociados a la rizosfera de la papa.	15
	Actividad 1. Delimitación del área de estudio.	15
	Actividad 2. Muestreo de la rizosfera del suelo del cultivo de papa.....	16
	Actividad 3. Análisis genómico microbiano	16
	Actividad 4. Agrupación de consorcios microbianos	16
	Objetivo 2: Determinar los diferentes grupos funcionales encontrados en la rizosfera de la papa.....	16
	Actividad 1: Escoger la metodología específica para el cultivo y aislamiento.....	16
	Actividad 2: Preparación de medios de cultivos específicos para cada grupo funcional a encontrar.	17
	Actividad 3. Preparación de diluciones seriadas	22
	Actividad 4: Siembra e incubación en los medios de cultivos.....	23
	Actividad 5. Preparación de la muestra para recuento de UFC y numero de colonias.	23
	Actividad 6. Determinación de la concentración UFC y numero de colonias.	24
10.	ANÁLISIS Y RESULTADOS.....	24
10.1.	Identificación de consorcios bacterianos.....	24
10.2.	Determinación de grupos funcionales	31
10.2.1.	Determinación de Microbiota total.....	31
10.2.2.	Determinación de bacterias solubilizadoras de fósforo.....	33
10.2.3.	Determinación de Actinomicetos.	35
10.2.4.	Determinación de Pseudomonas.	36
10.2.5.	Determinación de Bacterias celulolíticas.....	38

10.2.6.	Determinación de Población total de hongos.....	39
10.2.7.	Determinación de bacterias fijadoras de nitrógeno.....	41
10.3.	Determinación de grupos funcionales asociados a la rizosfera de la papa.....	42
11.	CONCLUSIONES	44
12.	BIBLIOGRAFÍA	45
13.	ANEXOS.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Cuadro de actividades por objetivo	8
Tabla 2.	Grupo funcional y medio utilizado	17
Tabla 3.	Se muestran los 10 primeros taxones a nivel de familia con una abundancia > 0.1 % con relación a grupos funcionales.....	25
Tabla 4.	Se muestran los 10 primeros taxones a nivel de género con una abundancia > 0.1 % con relación a grupos funcionales.....	27
Tabla 5.	Se muestran los 10 primeros taxones a nivel de especie con una abundancia > 0.1 % con relación a grupos funcionales.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ubicación geográfica del lugar de toma de muestras (piso altitudinal).....	15
Figura 2.	Diluciones seriadas	22
Figura 3.	Árbol de taxonomía del NCBI para las bacterias identificadas por familia de la muestra de suelo.....	24
Figura 4.	Árbol de taxonomía del NCBI para las bacterias identificadas por género de la muestra de suelo.....	27
Figura 5.	Árbol de taxonomía del NCBI para las bacterias identificadas por especie de la muestra de suelo	29

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Concentración de colonias *gr-1 de Población total de bacterias	31
Gráfico 2.	Concentración de UFC*gr-1 de Población total de bacterias	32
Gráfico 3.	Concentración de colonias *gr-1 de Bacterias solubilizadoras de fósforo	33

Gráfico 4. Concentración de UFC*gr-1 de Bacterias solubilizadoras de fósforo.....	34
Gráfico 5. Concentración de colonias*gr-1 de Actinomicetos.....	35
Gráfico 6. Concentración de UFC*gr-1 de Actinomicetos.....	35
Gráfico 7. Concentración de colonias*gr-1 de Pseudomonas.....	36
Gráfico 8. Concentración de UFC*gr-1 de Pseudomonas.....	37
Gráfico 9. Concentración de colonias*gr-1 de Bacterias celulolíticas.....	38
Gráfico 10. Concentración de UFC*gr-1 de Bacterias celulolíticas.....	39
Gráfico 11. Concentración de colonias*gr-1 de Población total de hongos.....	39
Gráfico 12. Concentración de UFC*gr-1 de Población total de hongos.....	40
Gráfico 13. Concentración de colonias *gr-1 de Bacterias fijadoras de nitrógeno.....	41
Gráfico 14. Concentración de UFC*gr-1 de Bacterias fijadoras de nitrógeno.....	41
Gráfico 15. Concentración de colonias *gr-1 de los grupos funcionales asociados a la rizosfera de la papa.....	42
Gráfico 16. Concentración de UFC*gr-1 de los grupos funcionales asociados a la rizosfera de la papa.....	43

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de diluciones seriadas para Microbiota total del suelo.....	50
Anexo 2. Protocolo de diluciones seriadas para raíz (maceración) para actinomicetos, bacterias y hongos.....	51
Anexo 3. Protocolo de siembra de fragmentos de raíz para actinomicetos, bacterias y hongos.....	52
Anexo 4. Protocolo de medio de cultivo PDA.....	53
Anexo 5. Protocolo de medio de cultivo Tryptone soya Agar.....	54
Anexo 6. Protocolo de medio de cultivo de Agar nutritivo.....	55
Anexo 7. Protocolo de Técnica de tinción.....	56
Anexo 8. Toma de datos y recolección de muestras.....	58
Anexo 9. Preparación de medios de cultivos selectivos.....	58
Anexo 10. Preparación de diluciones de suelo.....	59

Anexo 11. Preparación de fragmentos de raíz	59
Anexo 12. Siembra de diluciones de suelo y fragmentos de raíz	60
Anexo 13. Incubación de bacterias y hongos en sus respectivos medios selectivos	60
Anexo 14. Conteo en él cuenta colonias y cámara de Neubauer	60
Anexo 15. Tabla de conteo de población total de bacterias	61
Anexo 16. Tabla de conteo de bacterias solubilizadoras de fósforo	61
Anexo 17. Tabla de conteo de población total de hongos.....	61
Anexo 18. Tabla de conteo de actinomicetos	62
Anexo 19. Tabla de conteo de pseudomonas	62
Anexo 20. Tabla de conteo de bacterias celulolíticas.....	62
Anexo 21. Tabla de conteo de bacterias fijadoras de nitrógeno	63
Anexo 22. Análisis de suelo INIAP	63
Anexo 23. Informe de Identificación bacteriana a través de la secuenciación del gen 16s. (Suelo rizosférico)	64

1. INFORMACIÓN GENERAL

Título del Proyecto:

“ANÁLISIS DE CONSORCIOS BACTERIANOS Y GRUPOS FUNCIONALES ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DE LA PAPA (*Solanum tuberosum*), Var. SÚPER CHOLA EN EL PISO ALTITUDINAL DE 3400 msnm. COTOPAXI. 2021.”

Fecha de inicio:

Abril del 2021.

Fecha de finalización:

Agosto del 2021.

Lugar de ejecución:

Localidad de Cuturuví Chico - Cantón Pujilí - Provincia de Cotopaxi.

Facultad que auspicia:

Facultad De Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales.

Carrera que auspicia:

Ingeniería Agronómica.

Proyecto de investigación vinculado:

Proyecto “ANÁLISIS DE CONSORCIOS BACTERIANOS Y GRUPOS FUNCIONALES ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DE LA PAPA (*Solanum tuberosum*), Var. SÚPER CHOLA EN EL PISO ALTITUDINAL DE 3400 msnm. COTOPAXI. 2021.”

Equipo de Trabajo:

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

Lector 1: Ing. Mtr. Richard Molina

Lector 2: Ing. Mtr. Clever Castillo

Lector 3: Ing. Mg. Chancusig Francisco

Autor del proyecto

Nombre: Francisco Javier Cruz Almagro

Teléfonos: 0985738065

Correo electrónico: francisco.cruz7985@utc.edu.ec

Área de Conocimiento:**1.1. Línea de investigación:**

Análisis, conservación y aprovechamiento de la biodiversidad local.

1.2. Sub líneas de investigación de la Carrera:

- a. Caracterización de la biodiversidad

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

El presente proyecto consistió en la identificación de consorcios bacterianos y la determinación de diferentes grupos funcionales presentes en la rizosfera de la papa. Los grupos funcionales encontrados fueron, bacterias fijadoras de nitrógeno, bacterias solubilizadoras de fósforo, hongos, actinomiceto, bacterias celulolíticas, pseudomonas, así como también se determinó la microbiota total en los cuales se realizó el conteo de colonias y UFC por cada uno de los grupos anteriormente descritos que se encuentran asociados a la rizosfera del cultivo de papa, realizando el conteo de colonias y UFC en el laboratorio de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con la utilización de medios específicos para los siete grupos funcionales a identificar, siendo los anteriormente mencionadas.

Las muestras recolectadas fueron tomadas dentro de la Provincia de Cotopaxi, localidad de Cuturuví Chico, en una altitud de 3400 msnm, donde dicho sector tiene como principal rubro económico el cultivo de papa. Donde se recolectó dos muestras, una raíz y una de suelo de la variedad súper chola para los grupos funcionales y adicionalmente dos muestras de la rizosfera para los análisis metagenómicos y composicionales del suelo; estos análisis se los realizó en el laboratorio de microbiología de la Universidad Técnica de Cotopaxi, en el laboratorio de biotecnología del CIBE y en las instalaciones del Centro Experimental Santa Catalina (INIAP) en el departamento de suelos, plantas y aguas respectivamente.

La identificación bacteriana se la realizó a través del método de secuenciación en nanoporos con dispositivo MinION, con amplificación de los genes 16s de la muestra y preparación de librerías de ADN, para secuenciar utilizando el kit de código de barras para posterior análisis de las lecturas resultantes en el flujo bioinformático online 16S en EPI2ME (una plataforma de análisis basada en la nube que proporciona flujos de trabajo de análisis en tiempo real)

Para el análisis de los diferentes grupos funcionales se tomó de referencia metodológica la metodología de (Bernal, Gustavo, 2005) mismo que se utilizó para los análisis de bacterias fijadoras de nitrógeno, bacterias solubilizadoras de nitrógeno, hongos, actinomiceto, bacterias celulolíticas, pseudomonas, se utilizó medios de cultivos como los es Agar Nutitivo, Rosa de Bengala, Agar Ramos Callao, B de king, Agar Extracto de Suelo, Watanabe, Agar Caseina.

De los grupos funcionales antes mencionados se realizó cinco repeticiones en suelo y raíz más un testigo blanco donde obtuvimos las UFC *gr^{-1} de cada uno.

3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

La papa es uno de los rubros importantes de los sistemas de producción de la sierra ecuatoriana, constituye una fuente importante de alimentación e ingresos para la familia campesina. El cultivo de papa se realiza en alturas comprendidas entre los 2700 a 3400 msnm, a lo largo del callejón interandino; sin embargo, los mejores rendimientos se presentan en zonas ubicadas entre los 2900 y los 3300 msnm, donde las temperaturas fluctúan entre 9 y 11°C (INIAP, 2002).

Actualmente, la diversidad de papa en el país proviene de la agricultura familiar, siendo una fuente de sustento para miles de agricultores en medio de la pandemia Covid-19 y la apremiante situación económica que el país vive. Este cultivo es importante, ya que puede soportar sequías, es decir, es más resistente y adaptable al cambio climático (El Telégrafo, 2019).

La vegetación es uno de los factores más importantes que inciden en la dinámica de las comunidades microbianas del suelo y que actúa como regulador de la microflora edáfica (Pedraza et al., 2010). El papel fundamental de la comunidad macrofítica se debe al aporte de materia orgánica mediante la deposición de las hojas y de otros restos vegetales, también por el lavado de las hojas a través del agua de lluvia, así como por la liberación radical de sustratos carbonados (Martelo & Lara, 2012).

La raíz se puede considerar como la interface entre la vida terrestre y el sustrato mineral que aporta un número elevado de elementos esenciales (Mela, 1955). El estudio de la interacción entre el sistema radical de una planta y su inmediato entorno edáfico es técnicamente difícil e implica un enfoque multidisciplinario para evaluar los factores que influyen sobre las características de la zona de contacto directo entre suelo y raíz.

Según, (Pozuelo, 1991) menciona que el medio que forman las raíces para la comunidad microbiana es muy inestable. Las raíces cuando crecen cambian y evolucionan creando muchos tipos de hábitats; por ello determinan la densidad y diversidad de la comunidad bacteriana rizosférica junto con las condiciones físico-químicas del medio edáfico.

El área de las micorrizas se encuentra en una situación de avance de las investigaciones, tratando de obtener cepas eficientes en el biocontrol contra patógenos y como biofertilizantes. Es verdad que en el mercado existe una gama amplia de productos a base de micorrizas importadas del exterior y de otros microorganismos con una versatilidad eficiente. Sin embargo un buen número de estos productos comerciales no funcionan bajo condiciones propias ejemplo el clima y/o el suelo del Ecuador, creando la necesidad de llevar a cabo proyectos nacionales de investigación específicos en cada región (Bernal, Gustavo, 2005).

El conocimiento que tenemos hoy en día sobre la estructura de las comunidades microbianas que integran los agroecosistemas, a nivel de composición, distribución y función, es muy escaso, pero suficiente como para poner de manifiesto su importancia. Así pues, la estructura de la comunidad microbiana de un ecosistema se puede considerar el indicador biológico más sensible del estado del mismo, puesto que reacciona de manera rápida y reproducible en respuesta a los impactos antropogénicos (Nuria Bonilla, 2012).

Por todo lo expuesto anteriormente, y contestando a las interrogantes antes planteadas, en los diferentes pisos altitudinales, se identificarán los consorcios bacterianos y grupos funcionales asociados a la rizosfera de la papa (*Solanum tuberosum*).

4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Según (Ferrera & Alarcón, 2001) menciona que en la actualidad, el continuo deterioro del suelo ha tenido un impacto negativo en la comunidad microbiana del suelo y ha causado pérdidas económicas en las áreas agrícolas, debido a los efectos adversos de los fertilizantes químicos sobre los suelos. Por lo tanto, es importante estudiar la relación entre microorganismos-planta ya que permite establecer relación entre el tipo de suelo, especies de plantas y grupos microbianos relacionados (Ferrera & Alarcón, 2001).

El mayor problema es la erosión del suelo, con el consiguiente desgaste físico, pérdida de la base nutrimental y húmica, como de la actividad microbiana, comprometiendo su fertilidad y productividad en detrimento de la seguridad y soberanía agroalimentaria de la sociedad ecuatoriana (Ferrera & Alarcón, 2001).

La papa (*Solanum tuberosum*) 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. En el 2015, la producción de papa del Ecuador fue de 345,900 t en una superficie de 49.371 ha. El área sembrada en la sierra ecuatoriana fue de 98.56%, mientras que en la costa y en la región oriental fue de 1.11% y el 0.33% respectivamente. Carchi, fue la provincia de mayor producción, con un aporte del 28% del total nacional, seguida de Chimborazo (23%), Cotopaxi (18%), Pichincha (12%) y Tungurahua (10%). Las provincias restantes de la sierra reportaron producciones inferiores. El rendimiento promedio del cultivo a nivel nacional fue de 7.3 t/ha, que esconde una gran variabilidad entre provincias (Ferrera & Alarcón, 2001).

La Provincia de Cotopaxi con un aporte del 18% del total de producción en el territorio nacional, es considerada como una potencia agrícola de la sierra centro del Ecuador, por lo que la agricultura es una de las mayores actividades que sustentan el desarrollo económico de la misma, es por esto que el suelo es uno de los componentes del medio fuertemente afectado cuando no existe un manejo adecuado de los recursos naturales. Son muchas las consecuencias de un mal manejo que repercuten directamente en el suelo, como destacan la erosión, compactación, salinidad, disminución de fertilidad, etc. Todas estas pueden ser englobadas en una sola: la degradación del suelo (Naturales, 2017).

5. OBJETIVOS

5.1.Objetivo General

Analizar los consorcios bacterianos y grupos funcionales asociados a la rizosfera de la papa (*Solanum tuberosum*) Var. Súper chola en el piso altitudinal de 3400 msnm.

5.1.1. Objetivos Específicos

- Identificar los consorcios bacterianos asociados a la rizosfera de la papa.
- Determinar los grupos funcionales asociados en la rizosfera de la papa

6. TABLA DE ACTIVIDADES POR OBJETIVO

Tabla 1. Cuadro de actividades por objetivo

OBJETIVO	ACTIVIDAD	RESULTADO	MEDIO DE VERIFICACIÓN
<p>Analizar los consorcios bacterianos asociados a la rizosfera de la papa.</p>	<p>Delimitación del área de estudio</p> <p>Muestreo de la rizosfera del cultivo de la papa.</p> <p>Análisis genómico microbiológico del suelo y de la raíz de la papa.</p> <p>Agrupación de consorcios microbianos</p>	<p>Agrupación taxonómica de consorcios microbianos.</p>	<p>Árbol de taxonomía del NCBI para las bacterias identificadas.</p>
<p>Determinar los diferentes grupos funcionales encontrados en la rizosfera de la papa.</p>	<p>Escoger la metodología específica de identificación de grupos funcionales.</p> <p>Preparación de medios de cultivo específicos para cada grupo funcional a encontrar.</p> <p>Preparación de diluciones seriadas.</p> <p>Siembra e incubación de los medios de cultivo.</p> <p>Preparación de la muestra para recuento de UFC y Numero de colonias.</p> <p>Determinación de la concentración de unidades formadoras de colonia.</p>	<p>Grupos funcionales identificados.</p> <p>Conteo de unidades UFC por grupo funcional y UFC por gramo de suelo.</p>	<p>Memoria fotográfica</p> <p>Tabla de grupos funcionales identificados.</p> <p>Tabla de conteo.</p>

Elaborado por: (Cruz, Ortiz, Nasimba & Chiquimba, 2021)

7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

7.1.Rizosfera

Es el volumen de suelo que rodea a las raíces de las plantas en donde ocurren un sin número de fenómenos de interacción química, física, bioquímica y biológica entre los componentes bióticos y abióticos del suelo (Sevilla, 2015).

7.1.1. Características de la rizosfera

Ofrece un ambiente muy favorable para el desarrollo de microorganismos, gracias a una gran estabilidad de las partículas del suelo, esto es por la acción mecánica de las raíces y la acción aglutinante. Además, existe también una alta concentración de nutrientes al ser un lugar destino de producción de carbohidratos por el proceso de fotosíntesis, es decir, las plantas producen exudados radiculares ricos en hidratos de carbono que son una fuente importante de energía para los microorganismos presentes, benéficos como fitopatógenos. Entre un 2-5 % de las bacterias presentes en la rizósfera ejercen un efecto benéfico sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas (Sevilla, 2015).

7.2.¿Qué son las bacterias?

Una bacteria es un microorganismo unicelular procariota con una estructura sencilla, no presentan núcleo ni orgánulos membranosos internos, tienen pared celular compuesta por peptidoglicano y algunas también presentan flagelos, u otros componentes similares con este, que les permiten moverse, pueden vivir en condiciones ambientales muy extremas. Por lo general su tamaño es de algunos micrómetros de largo (entre 0,5 y 5 μm) y se presentan de diversas formas: esferas (cocos), barras (bacilos) y hélices (espirales), etc (Ambientech, 2021).

7.2.1. Consorcios bacterianos

Es una asociación natural de dos o más poblaciones bacterianas, que actúan conjuntamente como una comunidad en un sistema complejo, donde todos se benefician de las actividades de los demás, sus miembros mantienen la compatibilidad metabólica y ecológica siempre y cuando las transformaciones ambientales que se generan permitan que ellos coexistan. La asociación refleja estilos de vida sinérgicos o sintróficos (que significa “comiendo juntos”) en el que el crecimiento y el flujo cíclico de nutrientes se conduce más efectiva y eficientemente que en poblaciones individuales (Carreño & Restrepo, 2010).

7.3.Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

Las rizobacterias promotoras de crecimiento en las plantas (PGPR), son un grupo de diferentes microorganismos que pueden incrementar el crecimiento y la productividad vegetal, los géneros más conocidos y utilizados en la agricultura son: *Rhizobium*, *Pseudomonas*, y *Azospirillum*, *Actinoplanes*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Bacillus*, etc (Intagri, 2021).

Las PGPR presentan grandes ventajas para incrementar la productividad de los cultivos AL actuar favoreciendo el crecimiento vegetal de manera diferentes maneras, como:

- Fijación de nitrógeno atmosférico.
- Producción y síntesis de sideróforos (es un compuesto quelante de hierro secretado por microorganismos).
- Solubilización de minerales (especialmente fósforo).
- Síntesis de fitohormonas (auxinas, citocininas y giberelinas).
- Síntesis de la enzima ACC Deaminasa.
- Enzimas líticas de pared celular fungosa.

(Intagri, 2021).

Para llevar a cabo estas funciones las PGPC actúan a través de diversos mecanismos, como bioestimulantes, fitoestimuladores, biopesticidas o agentes de biocontrol. Las bacterias que actúan como fitoestimuladores, tienen la habilidad de producir o cambiar la concentración de los reguladores de crecimiento tales como: ácido indolacético, ácido giberélico, citocininas y etileno. Mientras que los biopesticidas o agentes de control biológico, promueven el crecimiento de las plantas a través del control del fitopatógeno, principalmente por la producción de antibióticos y metabólicos antifúngicos (Intagri, 2021).

7.4.Microbiota del suelo interface raíz suelo

La microbiota del suelo, está definida como los microorganismos presentes en el suelo tales como bacterias, hongos, protozoos etc, que se establecen generalmente en la rizosfera, y en su mayoría viven la capa superficial del litter o residuos vegetales frescos. Estos organismos constituyen la parte viva de los suelos y contribuyen al funcionamiento de los ecosistemas, ya que de ellos depende el mantenimiento de la estructura del suelo, la descomposición de la materia orgánica y la disponibilidad y reciclaje de nutrientes (Orlando & Catagña, 2019).

7.5. Grupos funcionales

Se define como la presencia y abundancia relativa de los rasgos funcionales de los microorganismos (hongos y bacterias) en un ecosistema que se consideran relevantes en relación con su respuesta al ambiente y/o su efecto en el funcionamiento del ecosistema que comparten el estado o nivel de varios atributos que pueden conformar un grupo funcional y al igual que los atributos, pueden ser definidos respecto a su contribución a los procesos ecosistémicos o por la respuesta de las especies a cambios en las variables ambientales (Castellanos-castro & Argenis Bonilla, 2011).

7.5.1. Los hongos

Son organismos con capacidad de mostrar formas diversas según las condiciones ambientales (pleomorfismo). Son heterotróficos con núcleo verdadero, rodeados por una pared celular hecha de celulosa, quitina o ambas, con base estructural somática filamentosas ramificadas debido a sus hifas que a su conjunto se lo denomina micelio, la reproducción es sexual o asexual, mediada por esporas (Herrera, 2012).

Asumen un papel clave en la cadena alimenticia del suelo, en los procesos de descomposición de que mineralizan y reciclan nutrientes de plantas y la rizósfera, son mediadores del equilibrio entre los patógenos y sus antagonistas, interactúan con una compleja comunidad microbiana que incluye: bacterias, actinomicetos (actinobacterias) y pequeños invertebrados (Pfenning & Abreu, 2011).

7.5.2. Bacterias solubilizadoras de fósforo y captadores de fósforo

Los organismos involucrados en las transformaciones del fósforo (P) en el suelo incluyen bacterias, hongos, cromistas, protozoos y algunos nematodos. En general, los microorganismos del suelo dinamizan el ciclo del fósforo (P) a través de procesos de mineralización, inmovilización y solubilización, los cuales están relacionados con su metabolismo nutricional. Debido a que las fuentes orgánicas no son utilizadas directamente para la nutrición microbiana, éstas deben primero hidrolizarse por la acción de enzimas fosfatasas, producidas y secretadas al suelo por los microorganismos, varios estudios pusieron en evidencia la capacidad solubilizadora de fosfatos de: *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereo-bacter*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Arthrobacter*, *Rhodobacter*,

Pantotea y Klebsiella, entre las bacterias y, Aspergillus, Penicillium, Trichoderma y Fusarium entre los hongos (Patiño-torres, 2014).

7.5.3. Bacterias celulolíticas

Estas bacterias tienen la habilidad bioquímica de producir células, enzimas que pueden hidrolizar la celulosa. También pueden utilizar celobiosa (disacárido) y otros carbohidratos. Especies celulolíticas de importancia son: Bacteroides succinogenes, Ruminococcus flavefaciens, Ruminococcus albus, Clostridium loch headii y Cillobacterium cellulosolvens (U Chile, 2021).

7.5.4. Actinomicetos

Los actinomicetos son bacterias filamentosas, Gram positivas, 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. 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 Los suelos que presentan condiciones semiáridas, con una humedad baja, como los suelos franco arenosos, son ideales para el desarrollo de estos microorganismos debido a la aireación y poca capacidad para retener agua (Jiménez, 2010).

7.5.5. Bacterias fijadoras de nitrógeno

Dentro de las bacterias fijadoras de nitrógeno encontramos dos grupos de organismos. Al primer grupo pertenecen bacterias móviles del suelo, que son atraídas hacia la raíz por compuestos que ésta libera. Pertenecen al grupo de quimioorganotrofos aerobios, se denominan Rizobios. A este grupo pertenecen Rhizobium (nodulan en raíces de leguminosas de climas templados y subtropicales), Azorhizobium (nódulos en tallos y raíces) y Bradyrhizobium (nodula raíces de soja). Existen otros formadores de nódulos de fijación dudosa de nitrógeno como son: Phyllobacterium (forma nódulos en tallos y hojas de mirsináceas y rubiáceas) y Agrobacterium (García, 2011).

El segundo grupo está formado por Actinomicetos (bacterias Gram positivas) que nodulan raíces de muchos árboles y arbustos. Son aquellas bacterias filamentosas que viven en simbiosis con plantas actinorrícicas (angiospermas capaces de formar nódulos) y son pertenecientes al género (Frankia). No forma micelio aéreo y sus esporas son inmóviles (García, 2011).

7.5.6. Pseudomonas

Son muy comunes en la naturaleza y pueden aislarse de una gran variedad de materiales naturales. Varias cepas son conocidas por su versatilidad nutricional hacia compuestos orgánicos de bajo peso molecular en medios totalmente desprovistos de factores orgánicos de crecimiento; esta capacidad, combinada con una rápida tasa de crecimiento, les permite predominar en microorganismos que crece en medios naturales que tienen una reacción cercana a la neutralidad y alguna materia orgánica en solución (Green, 2013).

Las características morfológicas básicas comunes a casi todas las especies son la forma de varilla recta. No se producen esporas y la reacción de Gram es negativa. Estos atributos morfológicos definen las “pseudomonas” pero la admisión al género *Pseudomonas* requiere algunas propiedades fisiológicas adicionales, como un metabolismo energético puramente respiratorio y una nutrición de tipo quimioorganotróficas (Green, 2013).

7.6.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. (FAO, 2012).

El Instituto de Estadísticas y Censos (INEC), 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 (FAO, 2012).

Según el mismo INEN, a este cultivo se dedican en el país alrededor de 42.000 familias en el país, tanto por su importancia nutricional, como por el aporte económico que representa a sus economías (FAO, 2012).

7.6.1. Taxonomía

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Solanales
Familia	Solanáceas
Género	Solanum
Especie	Tuberosum

(U Chile, 2021).

8. PREGUNTA CIENTÍFICA

¿Mediante la secuenciación genómica y la utilización de medios específicos para el cultivo de bacterias se puede identificar y determinar consorcios bacterianos y grupos funcionales asociados a la rizosfera del cultivo de la papa?

9. METODOLOGÍA

Objetivo 1: Analizar los consorcios bacterianos asociados a la rizosfera de la papa.

Actividad 1. Delimitación del área de estudio.

Para la delimitación del área de estudio, se buscó un predio que cuente con las condiciones favorables al cultivo de papa, utilizando herramientas de ubicación geográfica (Google-Earth, 2021) se procede al levantamiento geográfico con coordenadas y altitud exacta del piso altitudinal.

Figura 1. Ubicación geográfica del lugar de toma de muestras (piso altitudinal)



Cotopaxi - Pujilí - Cuturuví Chico	
<u>Coordenadas</u>	<u>Altitud</u>
<u>-1.00061662 LAT</u>	<u>3400 msnm</u>
<u>-78.730547 LONG</u>	

Fuente:(Google-Earth, 2021). **Elaborado por:** (Cruz, 2021).

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

Se utilizó la metodología del manual establecido por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) donde indica que las muestras edáficas deben ser tomadas de áreas que se encuentre libres de fertilizaciones inorgánica y labores culturales, la profundidad para obtener la muestra es de 20 a 30 cm (INIAP, 1989).

Se obtuvo tres muestras de suelo mediante el método de zig-zag de manera aleatoria con sus puntos GPS correspondientes de cada muestra, aproximadamente se obtendrá un kilogramo de toda el área de estudio. Se procede a retirar materiales extraños que no son parte del microbiota del suelo, para facilitar la preparación del medio de cultivo.

Empaquetado y etiquetado de muestras.

Las muestras fueron colocadas en funda ziploc con su respectiva identificación del lugar o parte del suelo con siglas A1, A2, A3 de donde fueron tomadas cada una, previo a su análisis.

Actividad 3. Análisis genómico microbiano

La identificación bacteriana se la realizó a través del método de secuenciación en nanoporos con dispositivo MinION, con amplificación de los genes 16s de la muestra y preparación de librerías de ADN, para secuenciar utilizando el kit de código de barras para posterior análisis de las lecturas resultantes en el flujo bioinformático online 16S en EPI2ME (una plataforma de análisis basada en la nube que proporciona flujos de trabajo de análisis en tiempo real)

Actividad 4. Agrupación de consorcios microbianos

Para la estructuración de árboles taxonómicos se analizó con los taxones identificados en contraste con la base de datos de la NCBI. El archivo contiene una tabla con los descriptores de las guías y la hoja con los taxones según los códigos de barra publicado en el flujo bioinformático de EPI2ME

Objetivo 2: Determinar los diferentes grupos funcionales encontrados en la rizosfera de la papa.

Actividad 1: Escoger la metodología específica para el cultivo y aislamiento

Se realizó una revisión bibliográfica de las diferentes metodologías para el aislamiento microbiológico de grupos funcionales y se escogió la metodología de (Bernal, Gustavo, 2005).

Para el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC*gr⁻¹) de suelo se utilizó el manual de análisis de calidad para formulaciones con base en hongos biocontroladores (determinación de viabilidad / concentración de unidades formadoras de colonia, cuantificación por recuento en cajas Petri) (Baez et al., 2019).

Actividad 2: Preparación de medios de cultivos específicos para cada grupo funcional a encontrar.

Para realizar los medios de cultivo específicos se utilizo los siguientes reactivos y procedimientos indicados en la tabla adjunta

Medios de cultivo y grupo funcional

Agar nutritivo	Microbiota total
Agar extracto de suelo	Bacterias celulolíticas.
Agar rosa de bengala	Población total de hongos
Agar watanabe	Bacterias fijadoras de nitrógeno
Agar caseína	Actinomicetos
Agar B de King	Pseudomonas
Agar Ramos Callao	Solubilizadores de fósforo

(Bernal,Gustavo, 2005)

Tabla 2. Grupo funcional y medio utilizado

GRUPO FUNCIONAL Y MEDIO UTILIZADO DOSIS	
MICROBIOTA TOTAL	
<u>AGAR NUTRITIVO</u>	
<ul style="list-style-type: none"> • Agua destilada • Agar nutritivo • Ph 	<ul style="list-style-type: none"> • 1000 ml • 20 g/l • 7.0
PROCEDIMIENTO:	
<p>En un frasco con tapa se coloca 1000 ml de agua destilada y se pesan 20 g de agar nutritivo. Se lo lleva a un agitador, hasta que la mezcla sea algo homogénea, a la vez que se mide el pH, estabilizándolo en 7.0 con el uso de ácido clorhídrico 1N o hidróxido de sodio 1N. Se esteriliza en el autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión.</p>	

POBLACIÓN TOTAL DE HONGOS**AGAR ROSA DE BENGALA**

<ul style="list-style-type: none"> • D – Glucosa • Peptona micológica • Fosfato monopotásico • Sulfato de magnesio hidratado • Rosa de bengala • Estreptomicina • Agar • Agua destilada • Ph 	<ul style="list-style-type: none"> • 10 g/l • 5 g/l • 1 g/l • 0.5 g/l • 0.035 g /l • 30 mg/l • 15 g/l • 1000 ml • 5.5
---	--

PROCEDIMIENTO:

En un recipiente con tapa se coloca 1000 ml de agua destilada en la que se va colocando todos los reactivos en las cantidades establecidas, excepto la estreptomicina. Se lo lleva a un agitador, hasta que la mezcla sea algo homogénea, a la vez que se mide el pH, estabilizándolo en 5.5 con el uso de ácido clorhídrico diluido o hidróxido de sodio en solución. Se esteriliza en el autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión.

Luego, la estreptomicina se diluye en 10 ml de agua y se la añade antes de dispensar el medio en las respectivas cajas, con la ayuda de una jeringuilla y un filtro. La estreptomicina inhibe el desarrollo y crecimiento de bacterias, permitiendo que solo los hongos aparezcan.

BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FÓSFORO**AGAR RAMOS CALLAO**

<ul style="list-style-type: none"> • Extracto de levadura • Glucosa • Fosfato tricálcico • Agua destilada • Agar • Ph 	<ul style="list-style-type: none"> • 2 g/l • 20 g/l • 2 g/l • 1000 ml • 22 g/l • 7
---	--

PROCEDIMIENTO:

En un recipiente con tapa se coloca 1000 ml de agua destilada en la que se va colocando el extracto de levadura, la glucosa y el fosfato tricálcico, en las cantidades indicadas. Se lo lleva a un agitador, hasta que la mezcla sea algo homogénea, a la vez que se mide el pH, estabilizándolo en 7.0 con el uso de ácido clorhídrico 1N o hidróxido de sodio 1 N, se añade el agar y luego se lo esteriliza en el autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión.

BACTERIAS CELULOLÍTICAS**AGAR EXTRACTO DE SUELO**

• Fosfato dibásico de potasio (PO_4HK_2)	• 0.5 g/l
• Nitrato de amonio (NO_3NH_4)	• 0.15 g/l
• Carboximetilcelulosa	• 1.25 g/l
• Agar	• 20 g/l
• Extracto de suelo	• 100 ml
• Ph	• 6.5

PROCEDIMIENTO:

En un recipiente con tapa se coloca 850 ml de agua destilada en la que se va colocando el fosfato dibásico de potasio y el nitrato de amonio en las cantidades indicadas. Los 850 ml van en función de los restantes volúmenes que se van a utilizar (carboximetilcelulosa y extracto de suelo).

La carboximetilcelulosa se diluye en 50 ml de agua destilada, con la ayuda de un agitador y se lo coloca al calor y una vez que ha sido diluida se lo pone al medio final.

El extracto de suelo se obtiene mediante la recolección de tierra de jardín rica en humus. Se limpia la hojarasca o impurezas de la superficie, se toma aproximadamente 1 kilogramo de suelo el mismo que se tamiza a una malla menor a 2 mm, hasta obtener una muestra de 500 gramos. Luego en 1000 ml de agua corriente se coloca el suelo y se agita bien. Se esteriliza en erlenmeyer amplio en la autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión. Se lo retira y se deja decantar lo suficiente para luego filtrar a través de papel Whatman (papel filtro) en una bomba de vacío por lo menos dos veces. El filtrado es llevado a la centrífuga, a 3600 rpm, por 20 minutos. De la solución final se toma 100 ml y se añade a la solución inicial del medio

de cultivo, se lo lleva a la agitadora y se regula el pH a 6.5, al final se añade el agar. El medio se esteriliza en la autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión.

ACTINOMICETOS

AGAR CASEÍNA

- | | |
|-----------------------------------|---------|
| • Almidón soluble | • 10 g |
| • Caseína | • 1 g |
| • KH ₂ PO ₄ | • 0.5 g |
| • Agar | • 10 g |
| • Ph | • 7.1 |

PROCEDIMIENTO:

En un recipiente con tapa se coloca 950 ml de agua destilada, se coloca la caseína, el fosfato monopotásico. El almidón debe ser diluido a parte al calor en 50 ml de agua destilada hasta que esté transparente, sin llegar a ebullición, entonces se lo pasa a la formulación final. Se lo lleva a la agitadora, se estabiliza el pH en 7.0, y se coloca el agar, para luego esterilizar en el autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión.

BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO

WATANABE

- | | |
|-----------------------------------|--------------------|
| • Glucosa | • 5 g/l |
| • Manitol | • 5 g/l |
| • Almidón | • 4.5 g/l |
| • Ácido málico | • 3.5 g/l |
| • Agar | • 1.75 g/l |
| • pH | • 6.8 – 7.2 |
| • Solución II | • 50 ml |
| • Solución III | • 15 ml |
| • Bromotimol azul al 1% en etanol | • 2 ml |
| • Agua destilada | • Aforar a 1000 ml |

<p>SOLUCIÓN I</p> <ul style="list-style-type: none"> • H_3BO_3 • $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ • $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ • $\text{CuSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ • $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ • Agua destilada 	<ul style="list-style-type: none"> • 750 mg/l • 550 mg/l • 350 mg/l • 21.8 mg/l • 20 mg/l • 1000 ml
<p>SOLUCIÓN II</p> <ul style="list-style-type: none"> • $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ • $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ • $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ • $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ • EDTA ácido • Solución I • Agua destilada 	<ul style="list-style-type: none"> • 0.8 g/l • 4.0 g/l • 0.1180 g/l • 4 g/l • 0.8 g/l • 4 ml/l • 1000 ml
<p>SOLUCIÓN III</p> <ul style="list-style-type: none"> • KH_2PO_4 • K_2HPO_4 • Agua destilada 	<ul style="list-style-type: none"> • 40 g/l • 60 g/l • 1000 ml
<p>PROCEDIMIENTO:</p> <p>Para preparar 1000 ml de medio watanabe se mide 500 ml de agua destilada en una botella con tapa rosca, se coloca la glucosa, el manitol y el ácido málico. El almidón se diluye al calor en 50 ml de agua destilada, una vez bien diluido se lo añade al medio, tomando en cuenta todos los volúmenes agregados. Se añade las soluciones II y III (tomando los reactivos en las cantidades indicadas) se toman los volúmenes especificados y se añade al medio de cultivo. El bromotimol azul al 1% en etanol se prepara pesando 1 g de este reactivo y diluyendo en 100 ml de etanol; de lo cual se toma 2 ml en 1000 ml de medio, con la ayuda de una pipeta. Se suman los volúmenes indicados y se descuentan para saber la cantidad faltante para completar 1000 ml. Se nivela el pH entre 6.8 y 7.2 y se coloca el agar. Se coloca 6 ml en cada tubo y se esteriliza a 15 libras por 15 minutos en el autoclave. Luego dentro de la cámara de flujo se siembran 0.2 ml de la dilución de la muestra correspondiente.</p>	

PSEUDOMONAS**B DE KING**

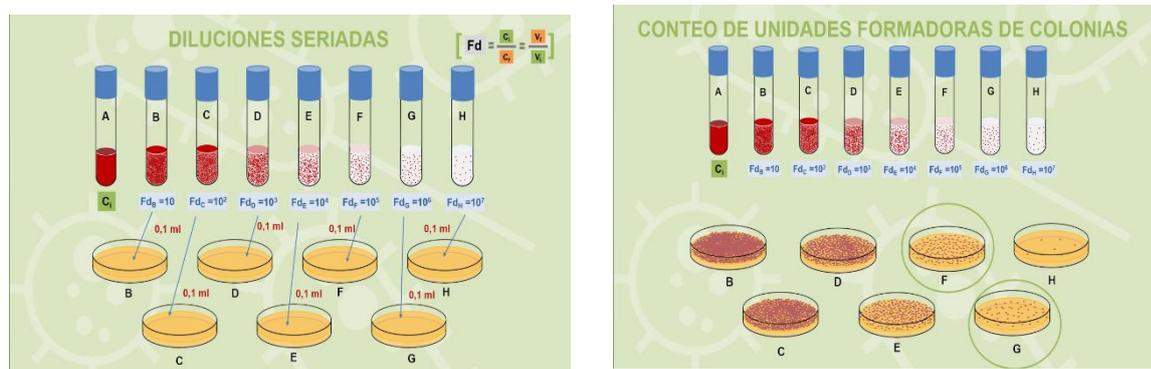
- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Peptona • Agar purificado • K₂HPO₄ (anhidro) • MgSO₄ · 7 H₂O (anhidro)) • Solubilizante | <ul style="list-style-type: none"> • 20 g/l • 12 g/l • 1,5g/l • 1.5g/l • 1000ml |
|---|--|

COMPOSICIÓN TEÓRICA (g/l de agua destilada) El medio King B se elabora de acuerdo con la fórmula teórica descrita por King, Ward y Raney.

Fuente: (Bernal, Gustavo, 2005). **Elaborado por:** (Cruz, Chasi, Ortiz, Nasimba, & Chiquimba 2021).

Actividad 3. Preparación de diluciones seriadas**Método de siembra por diluciones seriadas**

Se realizó cuando una muestra de microorganismos supera los 300 UFC facilitando el conteo y obtener resultados confiables contenga disoluciones.

Figura 2. Diluciones seriadas

Fuente: (UpoTV, 2017).

1. Tomar (1 ml) de la suspensión madre y colocar en otro tubo con 9 ml de solución estéril de agua destilada.
2. Agitar en vortex vigorosamente el tubo hasta que la muestra se disperse completamente
3. A partir de la dilución 10^{-2} repetir los pasos anteriores tantas veces como sea necesario para alcanzar la (dilución 10^{-5}).

4. Marcar los tubos con el nombre de la dilución correspondiente (ej. 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , etc.) El número de diluciones dependerá de la concentración del producto generalmente se realiza hasta la dilución 10^{-5} .

(Baez et al., 2019)

Método de siembra por fragmento de raíz

Es una siembra directa consiste en introducir muestra vegetal (inóculo) a una medida de las diferentes zonas de la raíz y posterior colocar en una solución nutritiva, con el fin de iniciar un cultivo microbiano, para su desarrollo y multiplicación. Una vez sembrado, el medio de cultivo se incuba a una temperatura adecuada para el crecimiento (UpoTV, 2017).

Actividad 4: Siembra e incubación en los medios de cultivos.

- Seleccionar las diluciones a la en la muestra de suelo 10^{-5} y colocar 1 ml de dilución por caja Petri.
- Fragmentar partes iguales de raíz y colocar entre 4 a 5 fracciones.
- Tener 10 repeticiones (cajas inoculadas) por grupo funcional 5 de suelo y 5 de raíz por dilución y fragmento de raíz se siembra 10 cajas, es decir cinco cajas Petri por repetición resultando en total de 10 muestras más un testigo.
- Rotular las cajas Petri con medio de cultivo Agar Agua.
- Sellar la caja Petri sembrada con papel Parafilm o papel plástico de cocina.
- Incubar entre 25°C y 27°C por el tiempo estandarizado.

(Baez et al., 2019)

Actividad 5. Preparación de la muestra para recuento de UFC y numero de colonias.

Proceso

1. Realizar un raspado de la caja Petri
2. Tomar una muestra 1 gr para muestras sólidas o 1 ml con micropipeta para muestras líquidas.

3. Colocar las muestras en tubos de ensayos con 9 ml de agua destilada.
4. Agitar en vortex hasta que la muestra se disperse completamente.
5. La suspensión obtenida corresponde a la suspensión madre o dilución 10^{-1}
6. A partir de la dilución 10^{-2} repetir los pasos anteriores tantas veces como sea necesario para alcanzar la (dilución 10^{-6}).

(Baez et al., 2019)

Actividad 6. Determinación de la concentración UFC y número de colonias.

Basados en la concentración del producto reportada por el fabricante, se seleccionó las diluciones a sembrar para realizar el conteo destacar que en algunos casos se desconoce la concentración y entonces se debe seleccionar un rango más amplio de diluciones para sembrar.

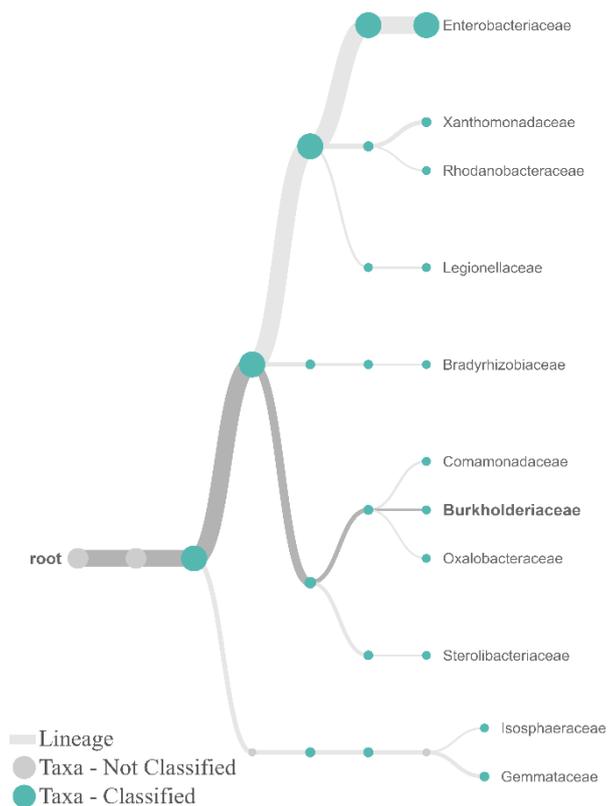
- Colocar una muestra en la cámara de Neubauer, colocar el cubreobjetos y contar.
- Para el conteo en él cuenta colonias se procede a colocar la caja Petri en el equipo.
- Registro de los datos obtenidos según la dilución sembrada y la repetición.
- Calcular el porcentaje de germinación.

(UpoTV, 2017)

10. ANÁLISIS Y RESULTADOS

10.1. Identificación de consorcios bacterianos

Figura 3. Árbol de taxonomía del NCBI para las bacterias identificadas por familia de la muestra de suelo



Fuente: (CIBE, 2021).

Como se presenta en la (Figura 3) las familias dominantes en la muestra fueron Enterobacteriaceae y Xanthomonadaceae, además de estas 2 familias se identificó Gemmataceae, como principales familias en relación a lecturas acumuladas.

Tabla 3. Se muestran los 10 primeros taxones a nivel de familia con una abundancia > 0.1 % con relación a grupos funcionales.

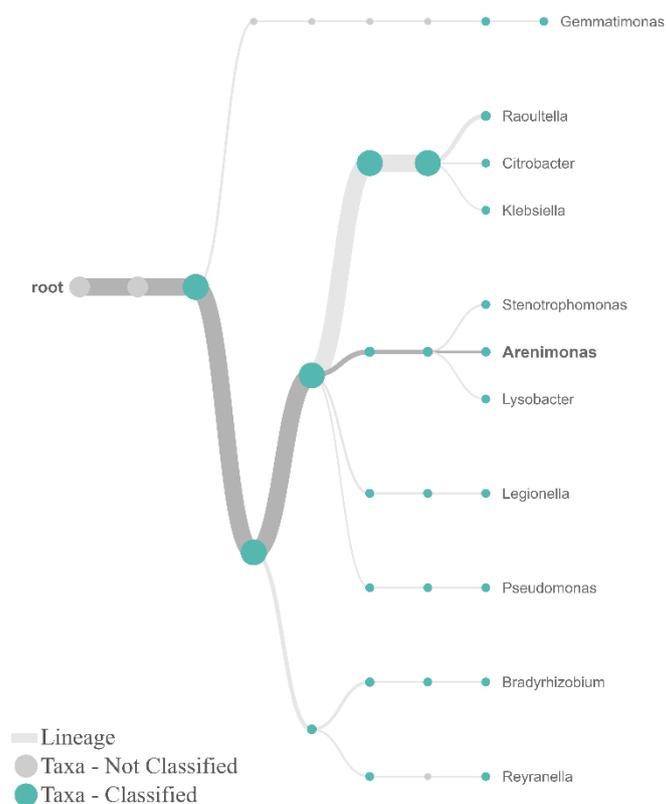
Familia	Lecturas acumuladas	Grupo funcional
<i>Enterobacteriaceae</i>	34,238	Solubilizadoras de fosforo y fijadoras de nitrógeno (Hernández, 2015)

<i>Xanthomonadaceae</i>	2,009	Fijadoras de nitrógeno, celulolíticas (Candido da Silva et al., 2017)
<i>Gemmataceae</i>	1,609	Población total de bacterias (Calvo Vélez et al., 2008)
<i>Burkholderiaceae</i>	600	Fijadoras de nitrógeno (Bolívar-Anillo et al., 2016)
<i>Comamonadaceae</i>	596	Fijadoras de nitrógeno (Hernández Zavala, 2016)
<i>Legionellaceae</i>	520	Patógeno (Microservices, 2021)
<i>Isosphaeraceae</i>	381	Población total de bacterias (Calvo Vélez et al., 2008)
<i>Oxalobacteraceae</i>	327	Fijadoras de nitrógeno (Alonso, 2021)
<i>Sterolibacteriaceae</i>	282	Población total de bacterias (Calvo Vélez et al., 2008)
<i>Rhodanobacteraceae</i>	262	Población total de bacterias (Calvo Vélez et al., 2008)

Fuente: (CIBE, 2021) **Elaborado por:** (Cruz, 2021)

Como se determina en la (Tabla N°3) se puede distinguir 10 taxones representativos con el 0.1% de abundancia, siendo la familia más dominante la *Enterobacteriaceae* con 34,238 lecturas acumuladas, lo que hace prever que en esas se encuentran grupos funcionales representativos esto concuerda con (Hernández, 2015) donde indica que estas bacterias se caracterizan por ser solubilizadoras de fósforo y fijadoras de nitrógeno. Seguido de *Xanthomonadaceae* con 2,009 lecturas acumuladas, mismas que según (Candido da Silva et al., 2017) describe que esta familia se caracteriza por poseer bacterias celulolíticas y fijadoras de nitrógeno. Las presencias de estas dos familias con sus características funcionales podrían incidir en el alto contenido de nitrógeno y fósforo obtenido en el análisis de suelo con 43 ppm de N y 79 ppm de fósforo (P) respectivamente (Anexo 22).

Figura 4. Árbol de taxonomía del NCBI para las bacterias identificadas por género de la muestra de suelo



Fuente :(CIBE, 2021)

Como se presenta en la (Figura 4) los géneros dominantes en la muestra fueron *Raoultella* y *Arenimonas*, como principales familias en relación a lecturas acumuladas.

Tabla 4. Se muestran los 10 primeros taxones a nivel de género con una abundancia > 0.1 % con relación a grupos funcionales.

Género	Lecturas acumuladas	Grupo funcional
<i>Raoultella</i>	1,949	Patógeno (Cubero-Agüero et al., 2021)

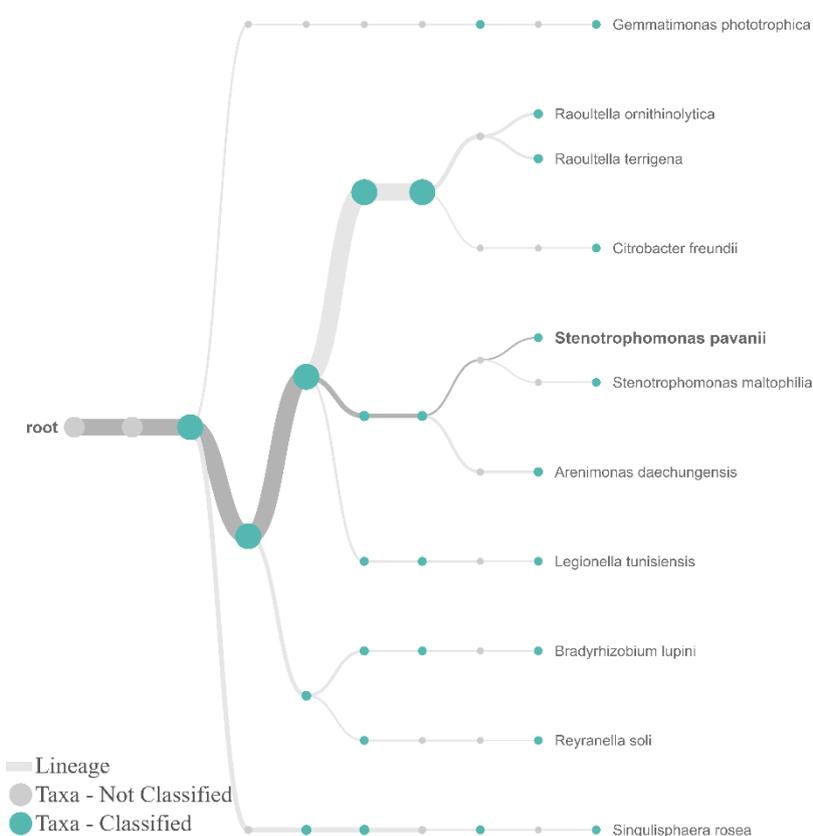
<i>Arenimonas</i>	1,002	Solubilizadoras de fosforo (Posso, 2019)
<i>Legionella</i>	497	Patógeno (Microservices, 2021)
<i>Stenotrophomonas</i>	412	Fijadoras de nitrógeno – Solubilizadoras de fosforo (Pérez-Corral et al., 2017)
<i>Lysobacter</i>	232	Nematicida (Almazán et al., 2015) Población total de bacterias
<i>Bradyrhizobium</i>	225	Fijadoras de nitrógeno (Llerena, 2014)
<i>Pseudomonas</i>	220	Solubilizadoras de fosforo- Fijadoras de nitrógeno (ControlBio, 2021)
<i>Reyranella</i>	214	Población total de bacterias (Calvo Vélez et al., 2008)
<i>Citrobacter</i>	150	Población total de bacterias (Calvo Vélez et al., 2008)
<i>Gemmatimonas</i>	146	Población total de bacterias (Calvo Vélez et al., 2008)

Fuente: (CIBE, 2021) **Elaborado por:** (Cruz, 2021)

Como se observa en la (Tabla N°4) se puede distinguir 10 taxones representativos con el 0.1% de abundancia, siendo el genero más dominante la *Raoultella* con 1,949 lecturas acumuladas, mismas que según (Microservices, 2021) indica que este género posee bacterias patógenas causantes de enfermedades. Seguido de *Arenimonas* con 1,002 lecturas acumuladas, lo que hace prever que en esas se encuentran grupos funcionales representativos, esto concuerda con (Posso, 2019) mismo, que describe que esta familia se caracteriza por poseer bacterias solubilizadoras de fósforo. Las presencias de esta familia con sus características funcionales

podrían incidir en el alto contenido de fósforo obtenido en el análisis de suelo con 79 ppm de fósforo (P) (Anexo 22).

Figura 5. Árbol de taxonomía del NCBI para las bacterias identificadas por especie de la muestra de suelo



Fuente:(CIBE, 2021)

Como se observa en la (Figura 5) los géneros dominantes en la muestra fueron Raoultella ornithinolytica, Arenimonas daechungensis y Raoultella terrigena como principales familias en relación a lecturas acumuladas.

Tabla 5. Se muestran los 10 primeros taxones a nivel de especie con una abundancia > 0.1 % con relación a grupos funcionales.

Especie	Lecturas acumuladas	Grupo funcional
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1,097	Patógeno (Cubero-Agüero et al., 2021)

<i>Arenimonas daechungensis</i>	949	Solubilizadoras de fosforo (Posso, 2019)
<i>Raoultella terrigena</i>	840	Patógeno (Cubero-Agüero et al., 2021)
<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	257	Fijadoras de nitrógeno – Solubilizadoras de fosforo (Pérez-Corral et al., 2017)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	152	Fijadoras de nitrógeno – Solubilizadoras de fosforo (Pérez-Corral et al., 2017)
<i>Legionella tunisiensis</i>	111	Patógeno (Microservices, 2021)
<i>Reyranella soli</i>	102	Población total de bacterias (Calvo Vélez et al., 2008)
<i>Citrobacter freundii</i>	99	Población total de bacterias (Calvo Vélez et al., 2008)
<i>Gemmatimonas phototrophica</i>	84	Población total de bacterias (Calvo Vélez et al., 2008)
<i>Singulisphaera rosea</i>	84	Población total de bacterias (Calvo Vélez et al., 2008)

Fuente: (CIBE, 2021) **Elaborado por:** (Cruz, 2021)

Como se muestra en la (Tabla N°5) se puede distinguir 10 taxones representativos con el 0.1% de abundancia, siendo la especie más dominante la *Raoultella ornithinolytica* con 1,097 lecturas acumuladas, especie que se caracteriza según (Cubero-Agüero et al., 2021) por causar patologías en el cultivo. Seguido de *Arenimonas daechungensis* con 949 lecturas acumuladas, lo que hace prever que en estas se encuentran grupos funcionales representativos esto concuerda con (Posso, 2019) describe que esta familia se caracteriza por poseer bacterias solubilizadoras de fósforo. Las presencias de esta familia con sus características funcionales

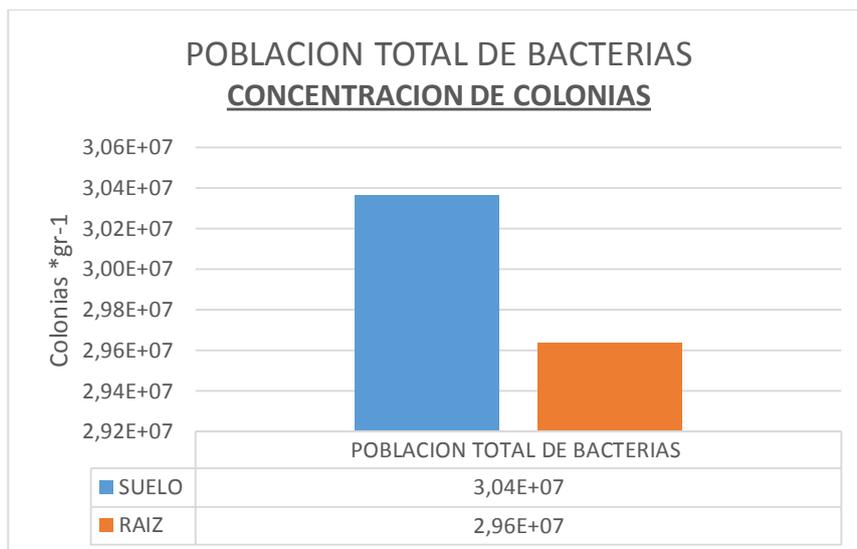
podrían incidir en el alto contenido de fósforo obtenido en el análisis de suelo con 79 ppm de fósforo (P) (Anexo 22).

10.2. Determinación de grupos funcionales

La interpretación de los resultados se los realizó de acuerdo a los datos obtenidos por el conteo de colonias, mediante el contador de colonias, en colonias*gr-1 y del conteo de Unidades formadoras de colonias mediante el uso de la Cámara de Neubauer en UFC*gr⁻¹. A continuación se realiza la descripción de las figuras de barras tanto por método de siembra de diluciones de suelo, como de siembra por fragmentos de la raíz.

10.2.1. Determinación de Microbiota total.

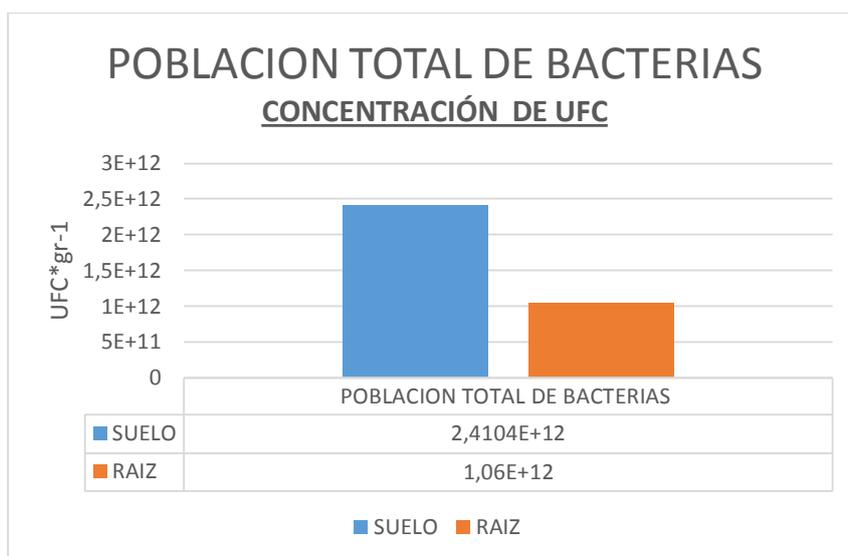
Gráfico 1. Concentración de colonias *gr-1 de Población total de bacterias



Elaborado por:(Cruz, 2021)

Como se observa en el (Gráfico 1), encontramos $3,04 \cdot 10^7$ colonias*gr⁻¹ en la muestra de suelo y $2,96 \cdot 10^7$ colonias en la muestra de raíz lo que nos permite determinar que existe mayor presencia de población total de bacterias asociados a la rizosfera de la papa en la muestra de suelo.

Gráfico 2. Concentración de UFC*gr-1 de Población total de bacterias



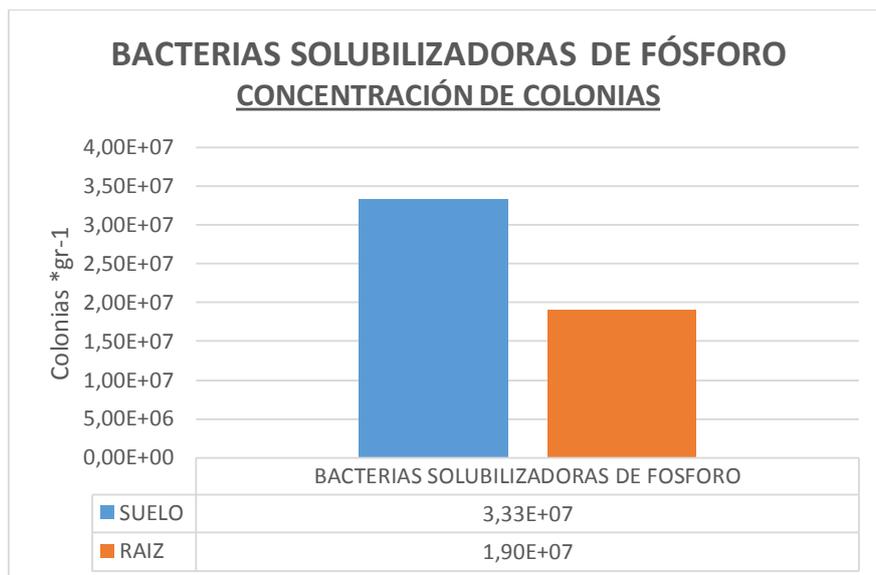
Elaborador por:(Cruz, 2021)

Como se observa en el (Gráfico 2), encontramos $2,41 \cdot 10^{12}$ UFC*gr⁻¹ en la muestra de suelo y $1,06 \cdot 10^{12}$ en la muestra de raíz lo que nos permite determinar que existe mayor presencia de población total de bacterias asociados a la rizosfera de la papa en la muestra de suelo.

Esto indica una diferencia entre las lecturas obtenidas de suelo y raíz lo que depende de varios factores como afirma (Calvo Vélez et al., 2008) en su “Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas” el cual escribe que la abundancia de bacterias en la rizosfera en comparación con otros microorganismos se puede deber a su rápido crecimiento y la habilidad que presentan de utilizar un amplio rango de sustratos como fuentes de carbono o nitrógeno. Así también que los factores de los que depende el crecimiento bacteriano son: la temporada, el tipo de suelo, la vegetación, el contenido de humedad, el tipo de labranza y fertilización.

10.2.2. Determinación de bacterias solubilizadoras de fósforo.

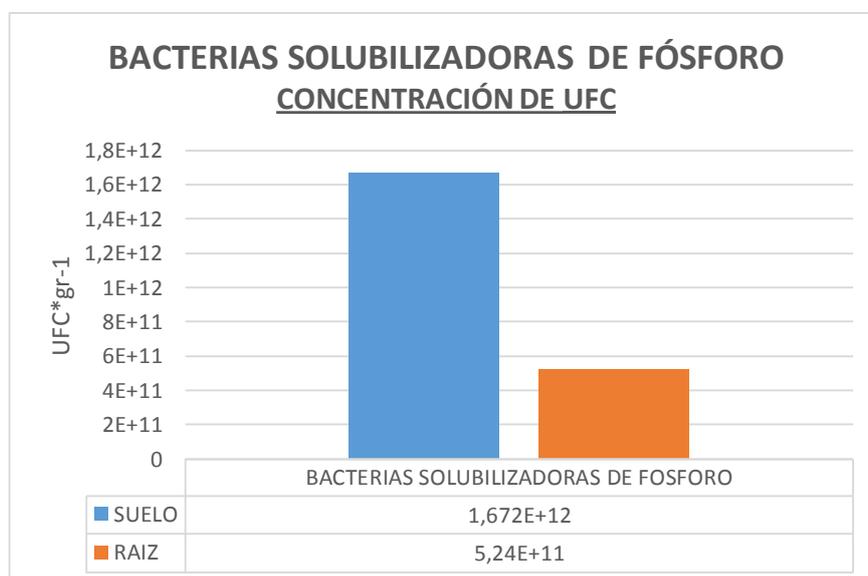
Gráfico 3. Concentración de colonias *gr-1 de Bacterias solubilizadoras de fósforo



Elaborado por:(Cruz, 2021)

Como se observa en el (Gráfico 3), encontramos $3,33 \cdot 10^7$ colonias gr^{-1} en la muestra de suelo y $1,90 \cdot 10^7$ colonias gr^{-1} en la muestra de raíz lo que nos permite determinar que existe mayor cantidad de microorganismos asociados a la rizosfera de la papa en la muestra de suelo.

Gráfico 4. Concentración de UFC*gr-1 de Bacterias solubilizadoras de fósforo



Elaborado por:(Cruz, 2021)

Como se observa en la (Gráfico 4), encontramos $1,67 \cdot 10^{12}$ UFC gr^{-1} en la muestra de suelo y $5,24 \cdot 10^{11}$ UFC gr^{-1} en la muestra de raíz lo que nos permite determinar que existe mayor

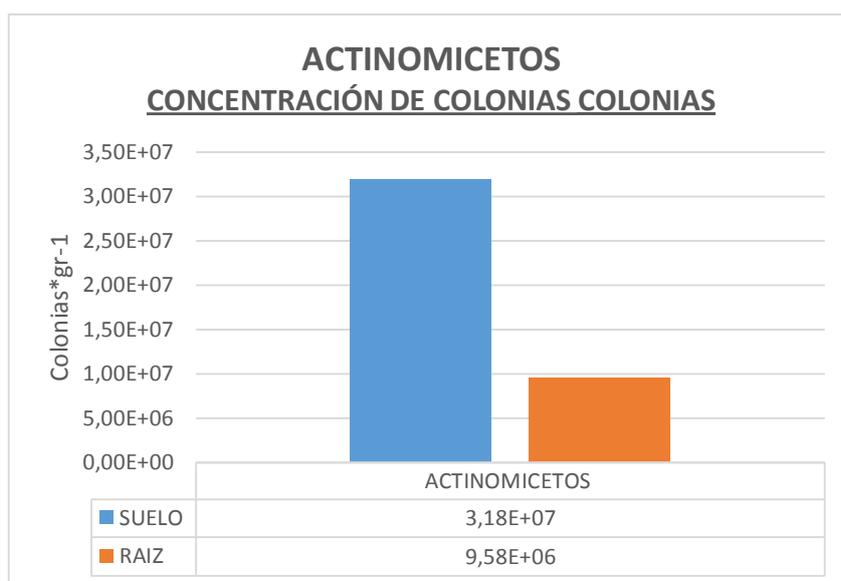
cantidad de bacterias solubilizadoras de fósforo, asociados a la rizosfera de la papa en la muestra de suelo.

Lo que nos permite determinar una mayor cantidad de bacterias solubilizadoras de fósforo en el suelo lo cual demuestra que hay una mayor actividad microbiana en las muestras de suelo lo cual corrobora con el análisis de suelo emitido por el INIAP que determina un Ph de 5,92 (Anexo 22)

Así mismo, (Pineda M, 2015) menciona que un pH alto en el medio de cultivo puede favorecer la actividad de la glucosa oxidasa [4], que es la principal enzima implicada en la solubilización de fosfatos. De igual forma, se ha observado que la disminución en la concentración de fósforo insoluble puede ser influenciada por otros factores.

10.2.3. Determinación de Actinomicetos.

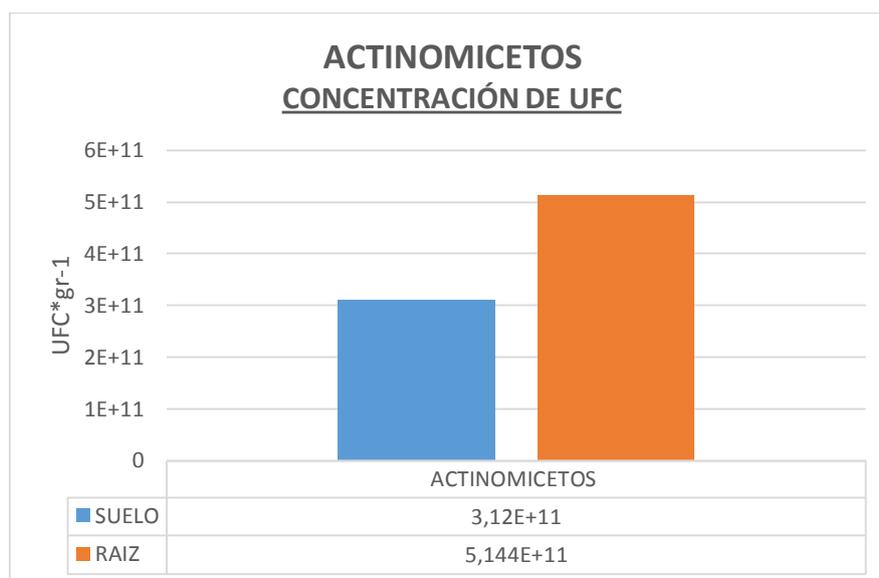
Gráfico 5. Concentración de colonias*gr-1 de Actinomicetos.



Elaborado por:(Cruz, 2021)

Como se observa en el (Gráfico 5), encontramos $3,18 \times 10^7$ colonias gr^{-1} en la muestra de suelo y $9,58 \times 10^6$ colonias gr^{-1} en la muestra de raíz lo que nos permite determinar que existe mayor cantidad de actinomicetos asociados a la rizosfera de la papa en la muestra de suelo.

Gráfico 6. Concentración de UFC*gr-1 de Actinomicetos.



Elaborado por:(Cruz, 2021)

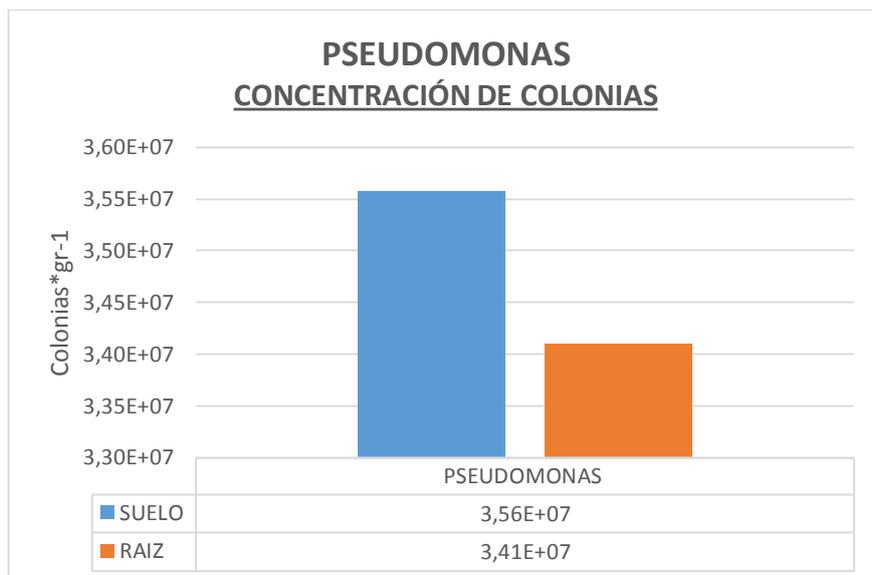
Como se observa en el (Gráfico 6), encontramos $3,12 \cdot 10^{11}$ UFC*gr⁻¹ en la muestra de suelo y $5,14 \cdot 10^{11}$ UFC*gr⁻¹ en la muestra de raíz lo que nos permite determinar que existe mayor cantidad de actinomicetos en el conteo de UFC asociados a la rizosfera de la papa en la muestra de raíz.

Lo que nos permite determinar una mayor presencia microbiana relacionada al suelo en si mas no a la raíz lo cual (Pérez-Corral et al., 2017) menciona que se debe a las diferencias encontradas en el número de actinomicetos aislados, con relación a los diferentes medios se debe generalmente al contenido de nutrientes en cada uno de ellos y a los requerimientos por parte de los microorganismos.

Por lo que se concluye que la diferencia significativa de presencia de actinomicetos en suelo se debe a que, los actinomicetos presentan versatilidad nutricional y en la mayoría de los casos al usar medios formulados se encuentran diferencias cuantitativas en los aislados, inclusive de la misma muestra de suelo (Pérez-Corral et al., 2017).

10.2.4. Determinación de Pseudomonas.

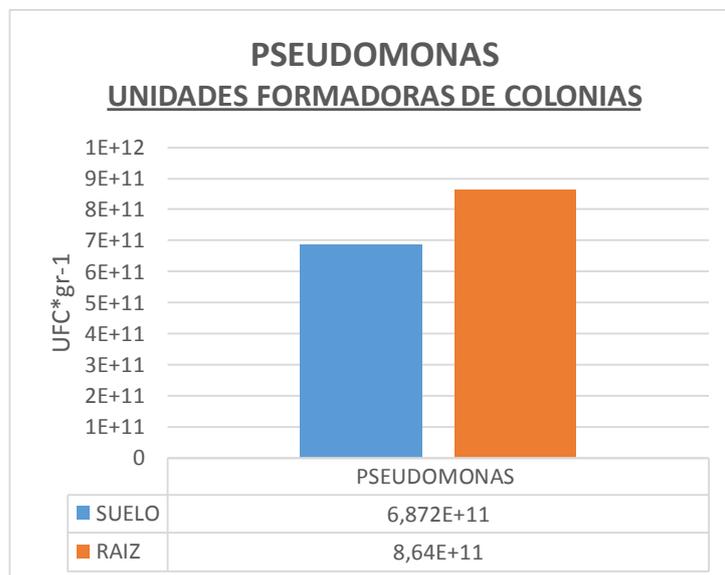
Gráfico 7. Concentración de colonias*gr-1 de Pseudomonas.



Elaborado por:(Cruz, 2021)

Como se observa en el (Gráfico 7), encontramos $3,56 \cdot 10^7$ colonias gr^{-1} en la muestra de suelo y $3,41 \cdot 10^7$ colonias gr^{-1} en la muestra de raíz lo que nos permite determinar que existe mayor presencia de pseudomonas en relación al resto de grupos funcionales en estudio.

Gráfico 8. Concentración de UFC*gr-1 de Pseudomonas.



Elaborado por: (Cruz, 2021)

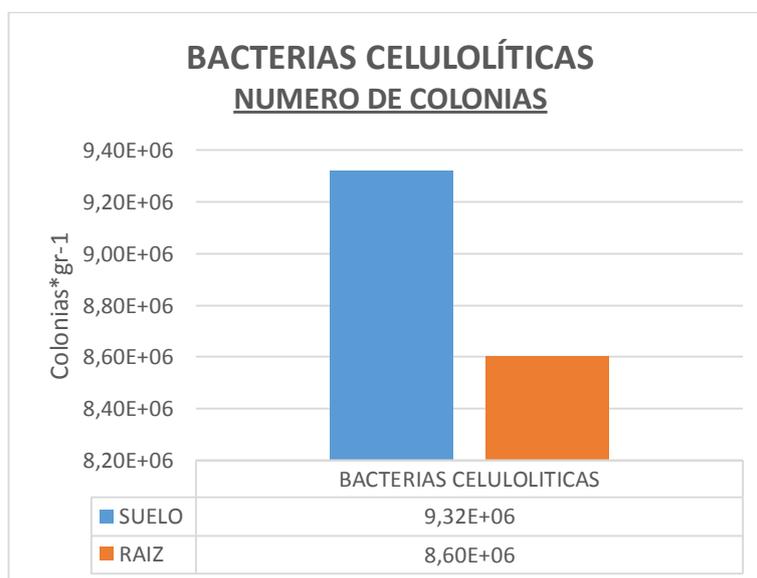
Como se observa en el (Gráfico 8), encontramos $6,87 \cdot 10^{11}$ UFC gr^{-1} en la muestra de suelo y $8,64 \cdot 10^{11}$ UFC gr^{-1} en la muestra de raíz lo que nos permite determinar que existe una

cantidad superior de pseudomonas en la muestra de raíz y en relación al resto de grupos funcionales en estudio.

Se determina que al ser pseudomonas el grupo funcional con más UFC de los siete grupos funcionales se debe según (Uribe et al., 1999) en su estudio de Diversidad de pseudomonas fluorescentes en cultivos de papa de la región Cundiboyacense y su actividad antagonista in vitro sobre *Rhizoctonia solani*. El microhábitat específico y por consiguiente la composición y actividad de los microorganismos a nivel rizosféricos deben estar principalmente determinados por los exudados secretados por la planta y algunas condiciones físicas y químicas del suelo como materia orgánica, pH, humedad y nutrientes minerales para el desarrollo de microbiota incluyendo pseudomonas. Esto corrobora con el análisis de suelo emitido por el INIAP (Anexo 22) en el cual presenta una cantidad de micro y macro nutrientes entre medios y altos además una alta actividad microbiana, las condiciones del suelo muestreado presenta características ideales para el desarrollo óptimo de pseudomonas y por ende una mayor concentración de UFC en el conteo respectivo.

10.2.5. Determinación de Bacterias celulolíticas.

Gráfico 9. Concentración de colonias*gr-1 de Bacterias celulolíticas.

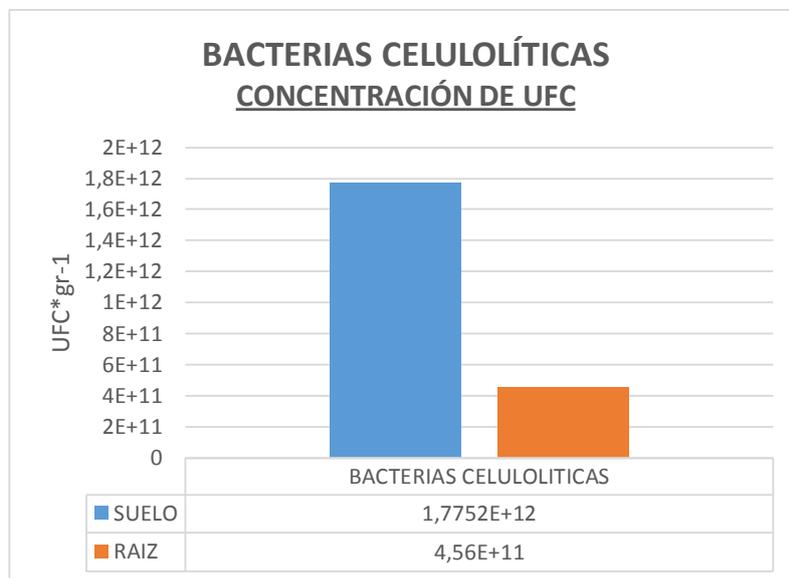


Elaborado por: (Cruz, 2021)

Como se observa en el (Gráfico 9), encontramos $9,32 \cdot 10^6$ colonias gr^{-1} en la muestra de suelo y $8,60 \cdot 10^6$ colonias gr^{-1} en la muestra de raíz lo que nos permite determinar que existe mayor

presencia de bacterias celulolíticas en relación a la raíz, pero en contraste con los siete grupos funcionales en estudio es uno de los más bajos.

Gráfico 10. Concentración de UFC*gr-1 de Bacterias celulolíticas.



Elaborado por:(Cruz, 2021)

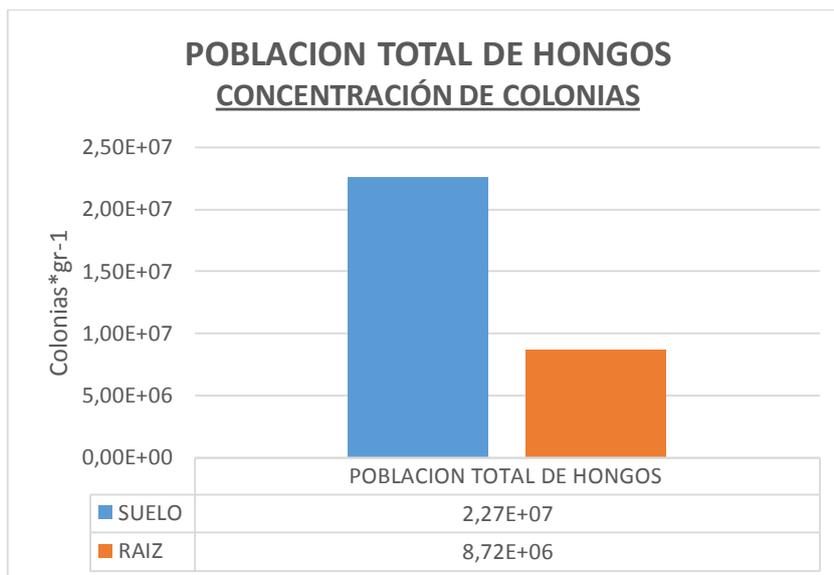
Como se observa en el (Gráfico 10), encontramos $1,77 \cdot 10^{12}$ UFC*gr⁻¹ en la muestra de suelo y $4,56 \cdot 10^{11}$ UFC*gr⁻¹ en la muestra de raíz lo que nos permite determinar que existe mayor presencia de bacterias celulolíticas en relación a la raíz.

Algunos estudios evidencian la ocurrencia y abundancia de microorganismos celulolíticos en su hábitat natural, en estrecho contacto con las plantas, determinado por factores físicos, químicos y ambientales (Santamaría-baldera et al., 2019) lo cual concuerda con la menor actividad celulolítica asociados a la rizosfera de las plantas en comparación con los aislados bacterianos.

Por lo que se referencia que la materia orgánica en abundancia tiene una influencia en la microbiota de estas bacterias (Santamaría-baldera et al., 2019).

10.2.6. Determinación de Población total de hongos.

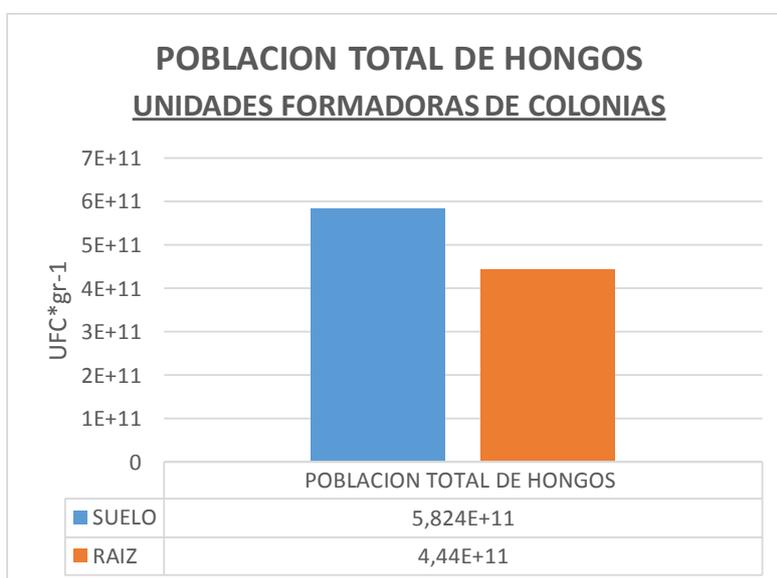
Gráfico 11. Concentración de colonias*gr-1 de Población total de hongos.



Elaborado por:(Cruz, 2021)

Como se observa en el (Gráfico 11), encontramos $2,27 \cdot 10^7$ colonias gr^{-1} en la muestra de suelo y $8,72 \cdot 10^6$ colonias gr^{-1} en la muestra de raíz lo que nos permite determinar que existe una cantidad superior de hongos en el suelo. Sin embargo, presenta una presencia baja de colonias en relación al resto de grupos funcionales en estudio.

Gráfico 12. Concentración de UFC*gr-1 de Población total de hongos.



Elaborado por:(Cruz, 2021)

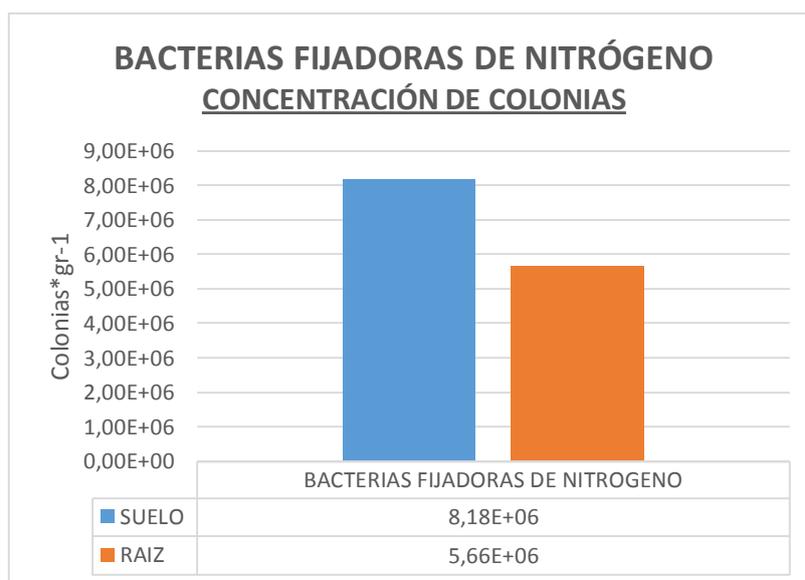
Como se observa en el (Gráfico 12), encontramos $5,82 \cdot 10^{11}$ UFC gr^{-1} en la muestra de suelo y $4,44 \cdot 10^{11}$ UFC gr^{-1} en la muestra de raíz lo que nos permite determinar que existe una cantidad

superior de hongos en el suelo. Sin embargo, presenta una presencia baja de UFC en relación al resto de grupos funcionales estudiados.

Lo cual según (Pozuelo, 1991) menciona que en el caso de las poblaciones de hongos se sabe que éstas son más competitivas en suelos ácidos, sin embargo, cuando se habla de rizosfera, los exudados producidos por las plantas pueden jugar un rol tan determinante como el tipo de suelo. Por esta razón las poblaciones de hongos en el estudio a pesar de poseer pH más ácido son bajas. Todo esto indica que la dinámica microbiana en la rizosfera puede variar considerablemente de la dinámica poblacional del suelo, y la presencia de microorganismos puede estar altamente influenciada por los exudados vegetales y por otras poblaciones propias de la rizosfera.

10.2.7. Determinación de bacterias fijadoras de nitrógeno.

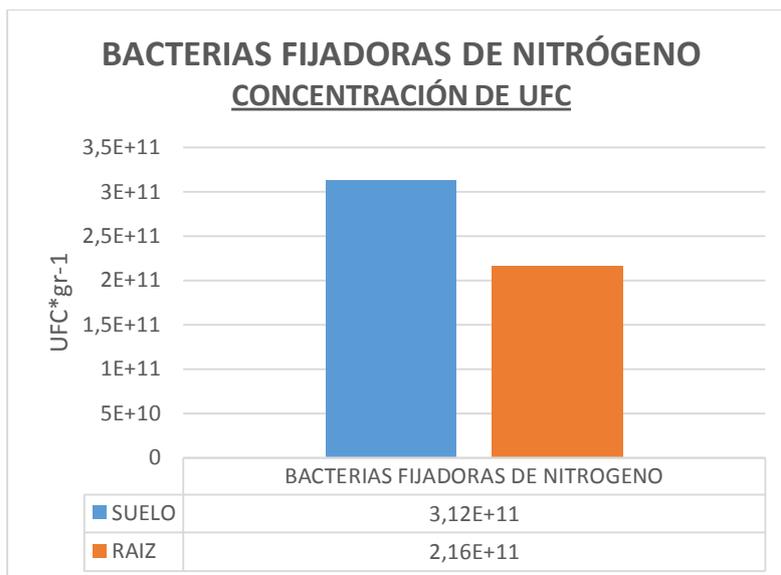
Gráfico 13. Concentración de colonias *gr-1 de Bacterias fijadoras de nitrógeno.



Elaborado por:(Cruz, 2021)

Como se observa en el (Gráfico 13), encontramos $8,18 \cdot 10^6$ colonias gr^{-1} en la muestra de suelo y $5,66 \cdot 10^6$ colonias gr^{-1} en la muestra de raíz lo que nos permite determinar que existe una cantidad superior de bacterias fijadoras de nitrógeno en el suelo. Sin embargo, presenta una presencia baja de BFN tanto en suelo como en raíz de UFC en relación al resto de grupos funcionales estudiados.

Gráfico 14. Concentración de UFC*gr-1 de Bacterias fijadoras de nitrógeno.

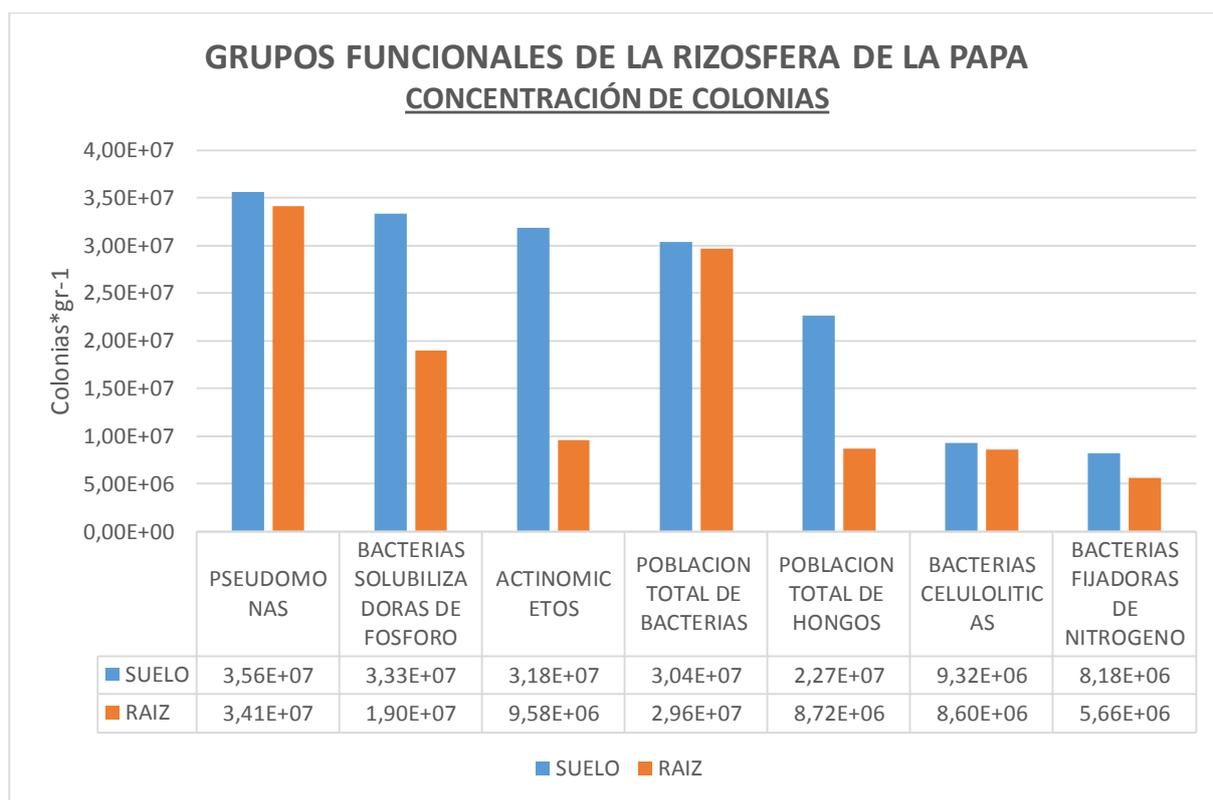


Elaborado por: (Cruz, 2021)

Como se observa en el (Gráfico 14), encontramos $3,12 \cdot 10^{11}$ UFC*gr⁻¹ en la muestra de suelo y $2,16 \cdot 10^{11}$ UFC*gr⁻¹ en la muestra de raíz lo que nos permite determinar que existe presencia mínima de bacterias fijadoras de nitrógeno en relación al resto de grupos funcionales.

10.3. Determinación de grupos funcionales asociados a la rizosfera de la papa.

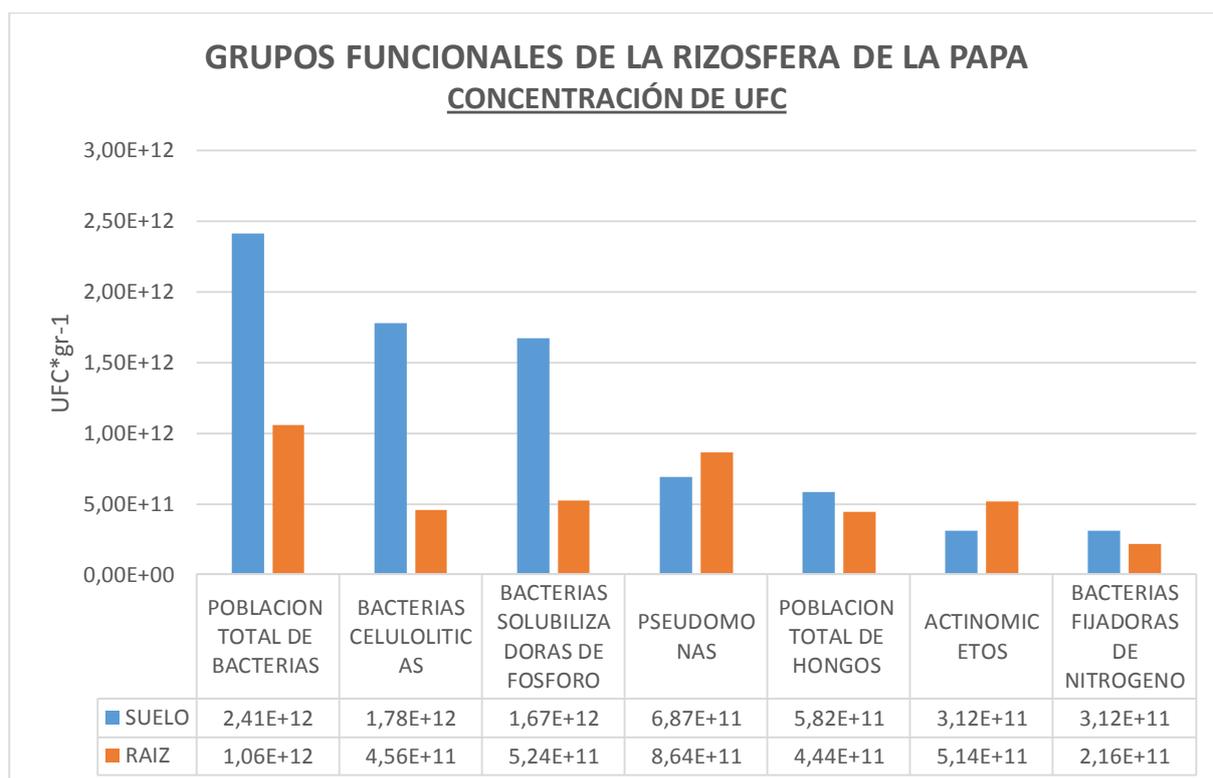
Gráfico 15. Concentración de colonias *gr-1 de los grupos funcionales asociados a la rizosfera de la papa.



Elaborado por:(Cruz, 2021)

Como se observa en el (Gráfico 15), del conteo de colonias de los grupos funcionales con mayor presencia de colonias a 3400 msnm en la rizosfera de la papa en la variedad súper chola, siendo los que mayor número de colonias presentan a pseudomonas con $3,56 \times 10^7$ colonias gr^{-1} en la muestra de suelo y $3,41 \times 10^7$ colonias gr^{-1} en la muestra de raíz. Seguido de Bacterias solubilizadoras de fósforo con $3,33 \times 10^7$ colonias gr^{-1} en la muestra de suelo y $1,490 \times 10^7$ colonias gr^{-1} en la muestra de raíz y población total de bacterias con $3,04 \times 10^7$ colonias gr^{-1} en la muestra de suelo y $2,96 \times 10^7$ colonias gr^{-1} en la muestra de raíz. Los datos obtenidos difieren con la investigación realizada por (Nasimba, 2021) quien menciona en su estudio a 3800 msnm obtuvo mayor presencia de actinomicetos, pseudomonas y solubilizadoras de fósforo, en muestra de suelo, en la muestra de raíz se encontró todos los grupos estudiados siendo los más representativas bacterias fijadoras de nitrógeno, bacterias celulolíticas y pseudomonas.

Gráfico 16. Concentración de UFC*gr-1 de los grupos funcionales asociados a la rizosfera de la papa.



Elaborado por:(Cruz, 2021)

Como se observa en el (Gráfico 16), encontramos como grupos funcionales con mayor presencia a población total de bacterias con $2,41 \cdot 10^{12}$ UFC $\cdot \text{gr}^{-1}$ en la muestra de suelo y $1,06 \cdot 10^{12}$ UFC $\cdot \text{gr}^{-1}$ en la muestra de raíz. Seguido de bacterias celulolíticas con $1,78 \cdot 10^{12}$ UFC $\cdot \text{gr}^{-1}$ en la muestra de suelo y $4,56 \cdot 10^{11}$ UFC $\cdot \text{gr}^{-1}$ en la muestra de raíz y bacterias solubilizadoras de fósforo con $1,67 \cdot 10^{12}$ UFC $\cdot \text{gr}^{-1}$ en la muestra de suelo y $5,24 \cdot 10^{11}$ UFC $\cdot \text{gr}^{-1}$ en la muestra de raíz. Los datos obtenidos difieren con la investigación realizada por (Nasimba, 2021) quien menciona en su estudio a 3800 msnm obtuvo mayor presencia de bacterias solubilizadoras de fósforo, pseudomonas y actinomicetos, en muestra de suelo, en la muestra de raíz se encontró todos los grupos estudiados siendo los más representativas bacterias celulolíticas, población total de hongos y bacterias solubilizadoras de nitrógeno.

11. CONCLUSIONES

- En el piso altitudinal de 3400 msnm en el suelo asociado a la rizosfera de la papa Var. Súper chola se identificó como las familias dominantes en la muestra de suelo la *Enterobacteriaceae* con 34,238 lecturas acumuladas, Seguido de *Xanthomonadaceae* con 2,009 lecturas acumuladas.
- El género más dominante en la muestra de suelo la *Raoultella* con 1,949 lecturas acumuladas, seguido de *Arenimonas* con 1,002 lecturas acumuladas.
- La especie más dominante en la muestra de suelo; *Raoultella ornithinolytica* con 1,097 lecturas acumuladas, seguido de *Arenimonas daechungensis* con 949 lecturas acumuladas, seguido de *Raoultella terrigena* con 840 lecturas acumuladas.
- Los grupos funcionales de mayor presencia en la rizosfera del cultivo de la papa antes descritos fueron bacterias celulolíticas y bacterias solubilizadoras de fósforo.
- Se determinó que los grupos funcionales de mayor presencia están dentro de las familias con mayor cantidad de lecturas acumulativas.

12. RECOMENDACIONES

- Se recomienda aplicar la investigación en los pisos altitudinales bajos de 3000 msnm, 2500 msnm y así tener una visión general en todos estos parámetros en toda la comunidad productiva de la papa
- Se recomienda identificar consorcios bacterianos en el área foliar del cultivo de la papa, para determinar las relaciones entre componen suelo y foliar.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Ambientech. (2021). *¿Qué es una bacteria? - Glosario de ciencias | Ambientech.*
<https://ambientech.org/bacteria>
- Baez, F., Perdomo, C., Pincay, A., Tello, C., Villamizar, L., Jackson, T., Jaronski, S., & Viera, W. (2019). *Manual de análisis de calidad para formulaciones con base en hongos biocontroladores* (p. 15).
- Bernal, Gustavo, W. (2005). Memorias del I CONGRESO ECUAROTIANO DE LA PAPA. *INIAP -Estación Experimental Santa Catalina, 1.*
<http://181.112.143.123/bitstream/41000/2827/1/iniapsc322est.pdf>
- Calvo Vélez, P., Reymundo Meneses, L., & Zúñiga Dávila, D. (2008). A STUDY OF POTATO (*Solanum tuberosum*) CROP RHIZOSPHERE MICROBIAL POPULATION IN HIGHLAND ZONES. *Ecología Aplicada*, 7(1).
- Candido da Silva, L. C., Targino, B. N., Furtado, M. M., de Oliveira Pinto, M. A., Rodarte, M. P., & Hungaro, H. M. (2017). Xanthan: Biotechnological Production and Applications. *Microbial Production of Food Ingredients and Additives*, 385–422.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811520-6.00013-1>
- Carreño, & Restrepo, M. (2010). CONSORCIOS MICROBIANOS: UNA METÁFORA BIOLÓGICA APLICADA A LA ASOCIATIVIDAD EMPRESARIAL EN CADENAS PRODUCTIVAS AGROPECUARIAS* MICROBIAL CONSORTIA: A BIOLOGICAL METAPHOR APPLIED TO ENTERPRISE ASSOCIATION IN AGRICULTURAL PRODUCTION CHAINS. In *rev.fac.cienc.econ: Vol. XVIII* (Issue 2).
- Castellanos-castro, C., & Argenis Bonilla, M. (2011). GRUPOS FUNCIONALES DE PLANTAS CON POTENCIAL USO PARA LA RESTAURACIÓN EN BORDES Plant Functional Groups of Potential Restoration Use in Advancing Edges of High Andean Forests. In *Acta biol. Colomb* (Vol. 16, Issue 1).
- CIBE. (2021). *Identificación bacteriana a través de la secuenciación del gen 16s. (Suelo rizosférico).*
- Cruz, F. (2021). Análisis de consorcios bacterianos y grupos funcionales asociados a la rizosfera de la papa (*Solanum tuberosum*) Var. Super Chola a 3400 msnm. Cotopaxi. 2021. In *Universidad Técnica de Cotopaxi - Ingeniería Agronómica* .
- Cubero-Aguero, D., Brenes-Guillén, L., Vidaurre -Barahona, D., & Uribe-Lorío, L. (2021). *Raoultella terrigena* y *Pectobacterium carotovorum* en hortalizas en dos provincias de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 178–195.
<https://doi.org/10.15517/AM.V32I1.40845>

- Cuervo Mulet, R. A. (2010). Manual de protocolos de microbiología general. In *Universidad de San Buenaventura SECCIONAL CALI*.
- El Telégrafo. (2019). Papa, un alimento milenario que no pasa de moda. In *El Telégrafo*.
- FAO. (2012). Producción orgánica de cultivos andinos . *Manual Técnico FAO* .
http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/mountain_partnership/docs/1_produccion_org_anica_de_cultivos_andinos.pdf
- Ferrera, R., & Alarcón, A. (2001). The Microbial Activity in the Agroecosystem. *Ciencia Ergo Sum*, 8(2), 175–183.
- García, S. C. (2011). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. *Universidad de Salamanca*, 3, 5–6.
- Google-Earth. (2021). *Google Earth*. <https://earth.google.com/web/@-1.00578295,-78.73102612,3429.10919751a,437.8395465d,35y,0h,0t,0r>
- Green, E. G. L. H. (2013). Practical handbook of microbiology. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9).
- Hernández, V. (2015). Efecto de enterobacterias en el desarrollo vegetativo de Zea mays en invernadero. “UCV-HACER” *Revista de Investigación y Cultura*.
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=521751973001>
- Herrera, R. (2012). Viaje al asombroso mundo de los hongos. In *Fondo de cultura economica*.
<https://books.google.es/books?op=lookup&id=pS2RDwAAQBAJ&continue=https://books.google.es/books?id%3DpS2RDwAAQBAJ%26printsec%3Dfrontcover%26hl%3Des&hl=es>
- INIAP. (1989). Como tomar muestras de suelo para su análisis químico. *INIAP-Estación Experimental Santa Catalina*, 104.
- INIAP. (2002). *EL CULTIVO DE LA PAPA EN ECUADOR*.
- Intagri. (2021). *Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal* | Intagri S.C. Intagri S.C. Nutricion Vegetal. <https://www.intagri.com/articulos/nutricion-vegetal/bacterias-promotoras-del-crecimiento-vegetal>
- Jiménez, G. (2010). LOS ACTINOMICETOS: UNA VISIÓN COMO PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL. *PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA*, 9.
- Martelo, J., & Lara, J. (2012). Floating macrophytes on the wastewater treatment: a state of the art review. *Ingeniería y Ciencia*, 8(15), 221–243.
<http://www.scielo.org.co/pdf/ince/v8n15/v8n15a11.pdf>
- Mela, P. (1955). Edafologia. *Soil Science*, 80(3), 249. <https://doi.org/10.1097/00010694-195509000-00010>

- Microservices. (2021). *La Bacteria Legionella*. Microservices.
<https://microservices.es/legionela/la-bacteria-legionella>
- Nasimba. (2021). ANÁLISIS DE CONSORCIOS BACTERIANOS Y GRUPOS FUNCIONALES ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DE LA PAPA (*Solanum tuberosum*), Var. SÚPER CHOLA EN EL PISO ALTITUDINAL DE 3800 msnm. COTOPAXI. 2021. *Ingeniería Agronómica, 1*.
- Naturales, R. (2017). *Universidad tecnológica equinoccial*.
- Nuria Bonilla. (2012). Organic amendments and land management affect bacterial community composition., *Diversity and Biomass in Avocado Crop Soils. Plant and Soil*.
- Orlando, F., & Catagña, V. (2019). *Determinación de la microbiota del suelo en dependencia de la altitud y especies vegetales cultivadas*.
- Patiño-torres, C. O. (2014). *Los microorganismos solubilizadores de fósforo (msf): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible*. *10(2)*, 288–297.
- Pedraza, R. O., Teixeira, K. R. S., Scavino, A. F., De Salamone, I. G., Baca, B. E., Azcón, R., Baldani, V. L. D., & Bonilla, R. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria, 11(2)*, 155. https://doi.org/10.21930/rcta.vol11_num2_art:206
- Pérez-Corral, D. A., García-González, N. Y., Gallegos-Morales, G., Ruiz-Cisneros, M. F., Berlanga-Reyes, D. I., & Ríos-Velasco, C. (2017). Aislamiento de actinomicetos asociados a rizosfera de árboles de manzano antagonistas a *Fusarium equiseti*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 6(7)*, 1629. <https://doi.org/10.29312/remexca.v6i7.555>
- Pfenning, L. H., & Abreu, M. De. (2011). Hongos del suelo saprófitos y patógenos de plantas. *Manual de Biología de Suelos Tropicales, 243–280*.
- Pineda M. (2015). *Hongos solubilizadores de fosfato en suelo de páramo cultivado con papa (Solanum tuberosum)*. CIENCIA EN DESARROLLO. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-74882014000200009
- Posso, S. (2019). Explorando la biodiversidad de consorcios microbianos Amazónicos con capacidad biorremediadora de aguas residuales mediante secuenciación de última generación Samantha Carolina Posso Astudillo Samantha Carolina. *Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales USFQ*. <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/8283/1/142691.pdf>
- Pozuelo, J. (1991). Estudio de grupos funcionales de microorganismos edáficos en la rizosfera de *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Facultad de Ciencias Biológicas/Universidad Complutense. Madrid, España*.

- Santamaría-baldera, N., Mori-zavaleta, R., & Karina, M. (2019). Artículo Original AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA DE BACTERIAS RIZOSFÉRICAS DEL ISOLATION AND EVALUATION OF CELLULOLYTIC ACTIVITY OF RHIZOBACTERIA FROM BAGUA DISTRICT , AMAZONAS. *Rebiol*, 39(2), 41–48.
- Sevilla, J. G. (2015). La importancia de la rizósfera. *Fertilab*, 2–3. http://www.um.es/sabio/docs-cmsweb/aulademayores/importancia_de_la_atenciOn._texto.pdf
- U Chile. (2021). *Monografías Medicina Veterinaria*. Aspectos Generales de La Microbiología Del Rumen. https://web.uchile.cl/vignette/monografiasveterinaria/monografiasveterinaria.uchile.cl/CDA/mon_vet_simple/0,1420,SCID%253D7631%2526ISID%253D410%2526PRT%253D7627,00.html
- UpoTV. (2017). *Conteo de bacterias viables*.
- Uribe, D., Ortiz, E., Portillo, M., Bautista, G., & Cerón, J. (1999). Diversidad de pseudomonas fluorescentes en cultivos de papa de la región Cundiboyacense y su actividad antagonista in vitro sobre *Rhizoctonia solani*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2(1), 50–58.

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 1000 μ l de cada dilución en cajas Petri, estas placas se incuban hasta que las colonias son apreciables para su recuento. Esta metodología tiene la ventaja de tener un buen límite de detección de colonias de microorganismos en el suelo.

Esta técnica está basada en los Protocolos de siembra de partes vegetales en diferentes medios de cultivo propuesto por (Baez et al., 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, Cruz Francisco, Chiquimba Erik, Nasimba Nathalia y Ortiz Amanda. Para el reconocimiento de microorganismos utilizando diluciones seriadas para suelo.

Materiales y métodos

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

Procedimiento

- Se debe pesar 10 g 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 1 ml de solución que pasaremos a otro tubo con 9ml de agua destilada y así repetiremos la operación hasta conseguir las soluciones esperadas.

- Una vez realizadas las diluciones hacemos la siembra de la dilución seleccionada en una caja Petri con medio de cultivo, para ello tomamos 100 μ l, lo añadimos en la superficie de la placa y extendemos con la asa 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 el 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 1000 μ l de cada dilución en cajas Petri, estas placas se incuban hasta que las colonias son apreciables para su recuento. Esta metodología tiene la ventaja de tener un buen límite de detección de colonias de microorganismos en raíz.

Esta técnica está basada en los Protocolos de siembra de partes vegetales en diferentes medios de cultivo propuesto por (Baez et al., 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, Cruz Francisco, Chiquimba Erik, Nasimba Nathalia y Ortiz Amanda. Para el reconocimiento de microorganismos utilizando diferentes métodos de siembra en medio de cultivo.

Materiales y métodos

- Micropipetas 1000 μ l y 100 μ l
- Vórtex
- Balanza electrónica
- Cajas Petri
- Asas de Drigalski
- 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 1 ml de solución que pasaremos a otro tubo con 9ml de agua destilada y así repetiremos la operación hasta conseguir las soluciones esperadas.
- Una vez realizadas las diluciones hacemos la siembra de la dilución seleccionada en una caja Petri con medio de cultivo, para ello tomamos 100 μ l, lo añadimos en la superficie de la placa y extendemos con la asa 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 el 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 (Baez et al., 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, Cruz Francisco, Chiquimba Erik, Nasimba Nathalia y Ortiz Amanda. 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.
- Al 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 parafilm.
- Posteriormente introducimos las cajas a la incubadora y esperamos 5 días hasta observar el 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 están presentes en plantas o suelo como agentes benéficos o infecciosos.

Esta técnica está basada en el Manual de Protocolos Microbiológicos propuesto por (Baez et al., 2019) y fue replicada en los laboratorios de la Universidad Técnica de Cotopaxi por Chasi Paolo, Cruz Francisco, Chiquimba Erik, Nasimba Nathalia y Ortiz Amanda. 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 400 ml

- 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 homogeneizar el caldo.
- Meter a la autoclave por 15 minutos a 121°C.
- Dejar enfriar en el 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 Tryptone soya Agar.

Introducción

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

Esta técnica está basada en el Manual de Protocolos Microbiológicos propuesto por (Baez et al., 2019) y fue replicada en los laboratorios de la Universidad Técnica de Cotopaxi por Chasi Paolo, Cruz Francisco, Chiquimba Erik, Nasimba Nathalia y Ortiz Amanda. 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 400 ml
- 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 homogeneizar el caldo.
- Meter a la autoclave por 15 minutos a 121°C.
- Dejar enfriar en el 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 están presentes en plantas o suelo como agentes benéficos o infecciosos.

Esta técnica está basada en el Manual de Protocolos Microbiológicos propuesto por (Baez et al., 2019) y fue replicada en los laboratorios de la Universidad Técnica de Cotopaxi por Chasi Paolo, Cruz Francisco, Chiquimba Erik, Nasimba Nathalia y Ortiz Amanda. 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 400 ml
- 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 60 ml de agua destilada.
- Agitar por 5 minutos para homogeneizar el caldo.
- Meter a la autoclave por 15 minutos a 121°C.
- Dejar enfriar en el 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 (Cuervo Mulet, 2010) y fue replicada en los laboratorios de la Universidad Técnica de Cotopaxi por Chasi Paolo, Cruz Francisco, Chiquimba Erik, Nasimba Nathalia y Ortiz Amanda. 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 lo colocamos en el portaobjetos estirándose sobre toda la superficie.
- Le agregamos una gota de agua luego extendemos suavemente la muestra y lo dejamos secar por unos momentos en el mechero.
- Posteriormente lo llevamos la tinta y le agregamos a la muestra cristal violeta, y posteriormente a lavarlo con agua le agregamos lugol por un minuto, nuevamente lavamos con agua y entonces le agregamos gotas de alcohol al 95% hasta que las gotas que salían se quedarán sin color. Al quedar sin color le añadimos una gota de agua y le agregamos 2 gotas de safranina y esperamos dos minutos.
- Ya realizada estos pasos secamos la muestra con calor, pero no tan pegada al mechero para que no se quemara la muestra.

Anexo 8. Toma de datos y recolección de muestras

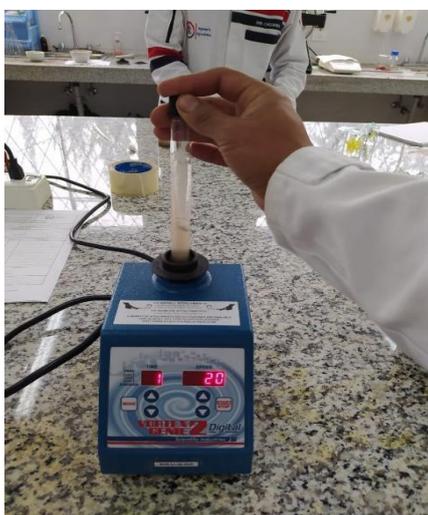


Anexo 9. Preparación de medios de cultivos selectivos



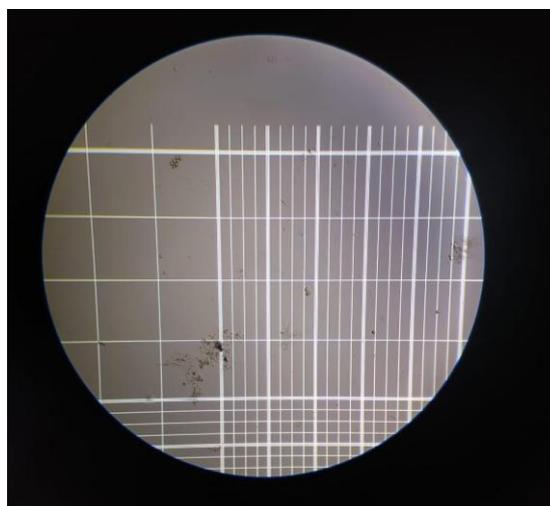


Anexo 10. Preparación de diluciones de suelo



Anexo 11. Preparación de fragmentos de raíz



Anexo 12. Siembra de diluciones de suelo y fragmentos de raíz**Anexo 13. Incubación de bacterias y hongos en sus respectivos medios selectivos****Anexo 14. Conteo en él cuenta colonias y cámara de Neubauer**

Anexo 15. Tabla de conteo de población total de bacterias

POBLACION TOTAL DE BACTERIAS																												
		Suelo																				Colonias						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20							
R1	Cuadrante 1	27	30	30	51	30	33	62	25	37	39	26	41	35	42	13	15	34	37	30	34	33,6	31,9	5,10E+12	228	2,28E+07		
	Cuadrante 2	41	29	41	29	23	15	29	27	57	32	23	33	24	24	52	43	23	16	28	15	30,2						
R2	Cuadrante 1	10	10	6	10	5	5	7	11	7	9	6	6	9	5	8	12	17	10	10	12	8,8	8,9	1,42E+12	398	3,98E+07		
	Cuadrante 2	6	9	16	7	9	5	10	7	13	9	7	8	4	10	12	16	4	9	10	8	9,0						
R3	Cuadrante 1	18	21	18	33	24	37	31	24	23	36	37	33	26	28	35	23	40	35	40	18	29,0	26,5	4,23E+12	2,41E+12	214	2,14E+07	3,04E+07
	Cuadrante 2	40	31	34	44	8	29	31	18	14	19	37	31	8	28	7	25	24	6	20	24	23,9						
R4	Cuadrante 1	3	4	2	6	8	8	2	6	8	10	7	9	5	2	4	2	0	3	0	4	4,7	5,4	8,60E+11		407	4,07E+07	
	Cuadrante 2	3	5	6	7	8	11	7	4	7	2	7	8	8	11	2	8	6	5	4	3	6,1						
R5	Cuadrante 1	0	2	4	4	1	0	2	0	2	1	2	4	2	4	3	0	5	7	1	5	2,5	2,8	4,44E+11		271	2,71E+07	
	Cuadrante 2	2	3	3	10	1	0	4	0	6	4	0	3	2	3	4	2	4	10	0	1	3,1						
		Raiz																				Colonias						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20							
R1	Cuadrante 1	75	95	11	92	54	11	68	75	11	40	78	2	74	10	40	11	21	79	65	12	46,2	49,4	7,90E+12		335	3,35E+07	
	Cuadrante 2	94	76	12	52	12	68	72	43	75	65	42	7	45	63	36	98	36	34	57	65	52,6						
R2	Cuadrante 1	11	75	83	63	45	65	80	1	92	22	72	2	11	94	96	11	87	26	87	94	55,9	56,7	9,07E+12		398	3,98E+07	
	Cuadrante 2	98	78	45	62	11	63	76	65	11	11	59	4	94	87	72	76	61	34	76	67	57,5						
R3	Cuadrante 1	12	22	34	11	90	94	57	78	72	70	79	40	80	60	52	60	90	64	60	50	58,8	62,0	9,92E+12	9,34E+12	198	1,98E+07	2,96E+07
	Cuadrante 2	83	52	73	46	87	99	53	75	64	67	71	34	76	62	45	58	83	58	67	51	65,2						
R4	Cuadrante 1	39	36	50	40	70	55	70	78	60	45	60	82	49	75	70	50	60	60	67	64	59,0	59,8	9,57E+12		255	2,55E+07	
	Cuadrante 2	32	42	45	34	64	46	79	86	75	57	76	67	81	65	76	46	54	66	76	46	60,7						
R5	Cuadrante 1	45	48	54	66	35	50	76	75	80	94	54	73	80	45	65	62	80	87	93	63	66,3	63,9	1,02E+13		296	2,96E+07	
	Cuadrante 2	36	46	51	64	33	52	67	73	86	91	53	73	76	32	66	76	81	96	15	62	61,5						

Anexo 16. Tabla de conteo de bacterias solubilizadoras de fósforo

BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFORO																												
		Suelo																				Colonias						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20							
R1	Cuadrante 1	2	4	0	3	3	4	3	4	2	3	4	2	1	2	10	112	2	7	10	1	9,0	8,2	1,32E+12		354	3,54E+07	
	Cuadrante 2	3	4	4	3	1	2	1	4	3	4	1	1	3	4	8	86	1	6	9	2	7,5						
R2	Cuadrante 1	32	10	8	9	3	4	3	4	7	3	6	3	3	0	11	99	12	10	10	7	12,2	8,7	1,39E+12		544	5,44E+07	
	Cuadrante 2	3	1	4	3	3	3	4	5	3	1	3	4	3	1	25	7	24	0	0	6	5,2						
R3	Cuadrante 1	39	54	36	33	36	46	56	46	15	25	44	30	44	38	36	60	18	21	38	20	36,8	21,1	3,38E+12	1,67E+12	206	2,06E+07	3,33E+07
	Cuadrante 2	3	5	4	11	2	14	2	10	7	7	3	7	1	4	3	4	10	4	4	4	5,5						
R4	Cuadrante 1	4	5	17	24	14	20	14	20	19	24	13	6	9	18	14	50	18	22	18	13	17,1	10,2	1,62E+12		226	2,26E+07	
	Cuadrante 2	3	3	1	3	3	11	12	0	2	0	3	4	1	1	3	2	5	1	2	4	3,2						
R5	Cuadrante 1	1	0	3	0	7	1	7	1	5	0	1	4	1	2	5	62	2	14	4	1	6,1	4,1	6,56E+11		337	3,37E+07	
	Cuadrante 2	1	2	5	1	2	1	1	5	4	2	1	5	5	1	2	0	0	0	3	2	2,2						
		Raiz																				Colonias						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20							
R1	Cuadrante 1	1	2	3	3	3	1	2	5	4	1	3	3	5	3	1	3	3	1	1	1	2,5	3,1	4,92E+11		75	7,50E+06	
	Cuadrante 2	4	2	5	3	1	2	3	4	4	5	4	3	3	7	3	4	4	2	5	6	3,7						
R2	Cuadrante 1	0	3	4	3	4	2	2	3	2	4	1	1	1	1	3	2	1	5	5	3	2,5	2,9	4,64E+11		113	1,13E+07	
	Cuadrante 2	2	1	11	5	3	2	0	3	2	4	1	3	11	4	6	5	0	1	1	1	3,3						
R3	Cuadrante 1	1	2	2	1	3	3	4	7	3	1	3	3	2	3	6	2	2	2	2	1	2,7	3,7	5,96E+11	5,24E+11	321	3,21E+07	1,90E+07
	Cuadrante 2	0	5	14	6	3	1	2	3	2	9	2	11	19	4	2	2	5	1	0	5	4,8						
R4	Cuadrante 1	0	2	2	0	4	0	0	4	0	2	5	12	21	10	2	2	0	1	0	3	3,5	3,4	5,36E+11		348	3,48E+07	
	Cuadrante 2	1	1	10	0	5	2	4	4	2	6	1	0	7	4	1	1	7	5	0	3	3,2						
R5	Cuadrante 1	1	4	7	7	3	2	6	2	3	3	2	2	3	4	8	2	2	4	3	12	4,0	3,3	5,32E+11		94	9,40E+06	
	Cuadrante 2	1	0	7	4	1	1	7	5	0	3	4	0	2	4	6	0	2	2	2	2	2,7						

Anexo 17. Tabla de conteo de población total de hongos

POBLACION TOTAL DE HONGOS																												
		Suelo																				Colonias						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20							
R1	Cuadrante 1	0	0	1	2	1	1	2	1	1	2	2	2	2	0	25	0	0	0	1	2	2,3	2,3	3,64E+11		185	1,85E+07	
	Cuadrante 2	1	2	0	1	3	1	1	1	2	1	2	1	11	5	3	2	0	3	2	4	2,3						
R2	Cuadrante 1	26	15	7	10	11	9	11	10	22	11	10	16	19	14	1	29	7	9	5	7	12,5	7,7	1,23E+12		142	1,42E+07	
	Cuadrante 2	2	0	4	6	4	3	5	0	2	4	0	2	4	6	0	2	2	2	4	6	2,9						
R3	Cuadrante 1	0	3	1	1	6	3	3	5	1	3	3	3	2	3	5	2	3	2	3	2	2,7	2,8	4,44E+11	5,82E+11	389	3,89E+07	2,27E+07
	Cuadrante 2	9	4	1	0	5	3	2	2	1	1	3	3	2	1	2	4	6	4	3	1	2,9						
R4	Cuadrante 1	10	0	7	0	0	3	0	4	2	1	7	2	5	2	1	0	1	4	1	1	2,6	2,9	4,60E+11		139	1,39E+07	
	Cuadrante 2	4	2	5	3	1	2	3	4	4	6	3	2	1	3	0	4	5	5	3	4	3,2						
R5	Cuadrante 1	8	0	0	3	1	1	2	2	0	1	0	0	0	2	1	2	4	2	2	3	1,7	2,6	4,16E+11		278	2,78E+07	
	Cuadrante 2	1	3	3	2	1	2	4	6	4	4	5	3	5	9	3	0	6	4	2	3	3,5						
		Raiz																				Colonias						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20							
R1	Cuadrante 1	8	4	2	2	1	9	4	3	1	5	4	4	6	2	4	3	0	1	5	0	3,4	2,9	4,64E+11		50	5,00E+06	
	Cuadrante 2	1	5	2	1	3	4	0	2	1	0	3	2	3	0	1	5	5	3	4	3	2,4						
R2	Cuadrante 1	3	3	2	2	3	1	2	3	8	1	4	5	2	4	3	3	4	4	1	1	3,0	2,6	4,16E+11		44	4,40E+06	
	Cuadrante 2	2	5	4	4	2	0	4	0	4	0	2	3	1	6	1	0	2	0	4	1	2,3						
R3	Cuadrante 1	6	9	6	1	1	5	6	1	1	3	5</																

Anexo 18. Tabla de conteo de actinomicetos

ACTINOMICETOS																												
		Suelo																				Colonias						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20							
R1	Cuadrante 1	4	4	0	2	1	1	2	2	0	1	0	4	5	4	5	7	2	0	4	0	2,4	2,8	4,44E+11	238	2,38E+07		
	Cuadrante 2	0	1	5	4	5	2	3	5	1	10	1	2	2	3	6	0	4	0	3	6	3,2						
R2	Cuadrante 1	1	0	0	5	2	0	1	4	3	0	5	0	4	0	0	10	0	0	0	2	1,9	1,7	2,68E+11	320	3,20E+07		
	Cuadrante 2	2	2	0	0	1	1	6	4	0	0	2	3	2	3	1	0	1	0	2	0	1,5						
R3	Cuadrante 1	2	0	0	4	3	3	1	2	0	2	3	1	2	2	1	3	3	2	0	1	1,8	1,7	2,72E+11	3,12E+11	253	2,53E+07	3,18E+07
	Cuadrante 2	1	2	0	1	4	1	0	0	6	4	0	2	2	3	3	0	4	0	0	0	1,7						
R4	Cuadrante 1	4	3	2	6	0	1	2	4	0	6	0	6	4	0	1	5	4	2	0	0	2,5	2,0	3,12E+11	349	3,49E+07		
	Cuadrante 2	1	1	1	0	2	1	0	0	3	2	3	0	2	5	3	1	2	0	0	1	1,4						
R5	Cuadrante 1	4	0	0	1	1	2	4	4	0	4	3	0	2	0	2	5	4	3	1	0	2,0	1,7	2,64E+11	432	4,32E+07		
	Cuadrante 2	0	3	2	1	0	1	1	0	3	2	0	1	2	0	2	0	0	0	3	5	1,3				0,00E+00		
		Raiz																				Colonias						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20							
R1	Cuadrante 1	3	5	2	4	15	0	3	3	3	1	0	3	4	3	5	3	3	2	3	10	3,8	4,0	6,36E+11	42	4,20E+06		
	Cuadrante 2	6	4	5	4	2	3	2	2	0	2	3	4	3	5	6	0	4	6	8	15	4,2						
R2	Cuadrante 1	3	0	6	3	3	2	3	4	5	4	0	2	5	0	4	2	6	5	0	2	3,0	2,3	3,68E+11	119	1,19E+07		
	Cuadrante 2	0	1	1	0	0	4	0	1	4	2	2	4	3	4	3	0	4	0	0	0	1,7						
R3	Cuadrante 1	6	1	2	1	6	0	3	4	2	2	1	1	2	4	2	2	3	3	0	3	2,4	2,4	3,76E+11	5,14E+11	77	7,70E+06	9,58E+06
	Cuadrante 2	2	3	2	8	1	2	2	2	0	5	1	3	4	3	2	2	1	0	2	1	2,3						
R4	Cuadrante 1	2	1	0	1	1	2	0	4	2	1	3	1	0	5	1	3	0	0	0	1,6	2,0		3,24E+11	175	1,75E+07		
	Cuadrante 2	3	2	3	1	0	2	1	2	3	3	2	2	12	3	3	4	1	0	1	1	2,5						
R5	Cuadrante 1	6	3	11	10	3	11	5	10	9	6	4	3	4	4	5	5	6	2	4	4	5,8	5,4	8,68E+11	66	6,60E+06		
	Cuadrante 2	3	11	1	5	6	8	3	6	4	3	7	4	9	5	5	4	5	4	3	6	5,1						

Anexo 19. Tabla de conteo de pseudomonas

PSEUDOMONAS																												
		Suelo																				Colonias						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20							
R1	Cuadrante 1	5	5	2	6	4	5	12	6	7	0	7	5	4	5	3	4	2	1	7	4	4,8	6,1	9,80E+11	313	3,13E+07		
	Cuadrante 2	3	6	8	6	7	5	6	4	9	5	5	3	11	18	5	2	4	21	17	5	7,5						
R2	Cuadrante 1	2	4	2	3	2	4	5	2	3	1	4	3	8	5	1	3	5	5	10	3	3,8	4,4	7,00E+11	387	3,87E+07		
	Cuadrante 2	4	3	9	5	10	3	7	0	8	3	8	3	5	6	11	2	1	8	0	4	5,0						
R3	Cuadrante 1	2	0	4	2	6	5	3	3	6	6	4	3	4	7	6	4	6	5	4	4	4,2	4,5	7,12E+11	6,87E+11	389	3,89E+07	3,56E+07
	Cuadrante 2	1	2	8	4	4	7	4	3	4	4	8	4	7	3	4	7	4	5	3	8	4,7						
R4	Cuadrante 1	1	4	0	4	1	3	8	7	4	1	4	2	4	15	5	4	5	2	3	5	4,1	4,5	7,20E+11	360	3,60E+07		
	Cuadrante 2	5	0	3	6	3	3	4	3	12	4	2	5	13	4	6	4	6	7	2	6	4,9						
R5	Cuadrante 1	4	0	0	2	2	3	2	3	1	2	4	0	3	3	0	5	3	0	0	10	2,4	2,0	3,24E+11	330	3,30E+07		
	Cuadrante 2	0	2	3	3	3	1	3	3	0	2	2	1	2	2	2	2	0	0	0	3	1,7						
		Raiz																				Colonias						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20							
R1	Cuadrante 1	2	10	8	10	3	6	15	8	6	10	17	14	3	17	5	19	10	6	9	8	9,3	10,8	1,73E+12	534	5,34E+07		
	Cuadrante 2	8	7	19	10	8	9	12	14	17	11	22	12	13	17	9	18	10	6	15	10	12,4						
R2	Cuadrante 1	3	0	1	4	3	4	10	0	4	15	10	8	3	4	2	4	3	0	4	8	4,5	5,0	8,04E+11	307	3,07E+07		
	Cuadrante 2	0	4	7	11	4	15	6	0	4	6	3	3	8	3	10	5	7	8	3	4	5,6						
R3	Cuadrante 1	0	3	2	4	4	9	6	3	3	9	3	7	4	5	2	2	3	8	15	4	4,8	6,0	9,52E+11	8,64E+11	309	3,09E+07	3,41E+07
	Cuadrante 2	3	3	4	16	0	5	6	4	5	2	16	5	7	11	8	6	4	10	18	9	7,1						
R4	Cuadrante 1	3	1	0	2	4	3	2	3	3	3	4	4	10	7	4	4	6	6	3	2	3,7	3,2	5,12E+11	258	2,58E+07		
	Cuadrante 2	2	3	4	1	6	2	0	2	8	4	4	1	3	1	3	0	3	1	1	5	2,7						
R5	Cuadrante 1	0	4	2	1	0	2	1	0	2	3	1	0	2	13	6	0	2	1	2	3	2,3	2,0	3,20E+11	297	2,97E+07		
	Cuadrante 2	6	0	0	3	4	2	3	0	3	3	1	2	1	2	0	1	0	3	0	1	1,8						

Anexo 20. Tabla de conteo de bacterias celulolíticas

BACTERIAS CELULOLITICAS																												
		Suelo																				Colonias						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20							
R1	Cuadrante 1	8	13	10	18	17	12	6	17	24	18	21	28	16	22	18	13	20	26	28	12	17,4	17,1	2,73E+12	172	1,72E+07		
	Cuadrante 2	34	11	10	18	16	10	21	17	11	14	28	10	13	24	8	15	16	14	16	29	16,8						
R2	Cuadrante 1	6	5	5	4	7	2	3	9	11	6	12	9	12	3	5	6	4	5	6	9	6,5	6,4	1,02E+12	102	1,02E+07		
	Cuadrante 2	4	3	14	2	7	3	9	4	9	5	4	9	6	12	6	3	5	10	7	3	6,3						
R3	Cuadrante 1	3	2	5	15	7	12	8	3	8	9	6	4	3	38	3	5	3	3	7	18	8,1	7,0	1,12E+12	1,78E+12	70	7,00E+06	9,32E+06
	Cuadrante 2	3	4	6	5	2	1	9	3	3	10	9	4	2	11	8	5	11	5	11	7	6,0						
R4	Cuadrante 1	4	1	14	6	4	6	5	9	10	4	7	8	8	3	4	14	10	8	26	3	7,7	7,8	1,25E+12	41	4,10E+06		
	Cuadrante 2	4	6	7	9	10	7	16	12	7	14	5	6	7	5	7	3	5	6	5	18	8,0						
R5	Cuadrante 1	8	7	15	17	10	43	9	22	27	11	20	32	46	13	28	12	25	24	13	60	22,1	17,2	2,76E+12	81	8,10E+06		
	Cuadrante 2	12	15	20	3	4	6	8	4	4	16	3	21	30	17	10	19	18	11	15	11	12,4						
		Raiz																				Colonias						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20							
R1	Cuadrante 1	5	2	4	11	7	2	3	12	1	8	2	3	1	4	2	2	2	3	4	13	4,6	4,4	7,04E+11	18	1,80E+06		
	Cuadrante 2	10	0	6	10	6	1	5	7	10	2	5	2	1	3	2	2	1	1	2	6	5	4,3					
R2	Cuadrante 1	3	0	2	2	3	1	1	3	3	13	5	4	2	2	2	4	1	2	0	3	2,8	3,3	5,28E+11	47	4,70E+06		
	Cuadrante 2	4	0	2	1	3	1	2	20	2	8	4	3	1	3	11	5	5	0	1	0	3,8						
R3	Cuadrante 1	2	2	3	4	1	1	0	4	3	1	4	0	3	0	5	3	2	1	2	0	2,1	2,1	3,36E+11	4,56E+11	54	5,40E+06	8,60E+06
	Cuadrante 2	1	2	2	1	2	1	2	1	0	5	0	7	2	2	2	4	3	3	1	2	2,2						
R4	Cuadrante 1	0	0	2	3	0	1	1	1	2	0	1	0	8	2	4	13	3	0	2	0	2,2	2,2	3,48E+11	77	7,70E+06		

Anexo 23. Informe de Identificación bacteriana a través de la secuenciación del gen 16s. (Suelo rizosférico)

Guayaquil, 19 de julio de 2021
OFICIO CIBE-0060-2021

Señor
Wilman Paolo Chasi Vizuite
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
Ciudad.-

De mi consideración:

En atención a lo solicitado mediante Propuesta Técnico-Económica de Servicios Especializados No. FT-010-2021, anexo al presente, reporte de laboratorio, de acuerdo al siguiente detalle:

Nombre del servicio:	Identificación bacteriana a través de la secuenciación del gen 16s. (Suelo rizosférico)
Método de análisis:	Secuenciación en nanoporos con dispositivo MinION.
Laboratorio encargado:	Fitopatología y Microbiología

Agradecemos su confianza y esperamos poderle servir en un futuro cercano.

Atentamente,

JUAN
MANUEL
CEVALLOS
CEVALLOS
Firmado digitalmente
por JUAN MANUEL
CEVALLOS CEVALLOS
Fecha: 2021.07.19
11:54:40 -05'00'

Juan Manuel Cevallos, PhD.

Director General
Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
Escuela Superior Politécnica del Litoral



Adj: Reporte de laboratorio
Cc: Archivo

Elaborado por:	Reina Nolivos Morán
----------------	---------------------



N° de propuesta: FT-010-2021

FECHA: 4 de julio del 2021

REPORTE DE LABORATORIO

Identificación del Cliente	
Nombre del solicitante: Wilman Paolo Chasi Vizquete	
RUC: 0502409725	Empresa: Universidad Técnica de Cotopaxi
Teléfono: 0984203033	e-mail: wilman.chasi@utc.edu.ec
Dirección: Latacunga	

Detalles de la muestra analizada	
<p>Nombre:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Muestra 1: Suelo cultivo papa, 3800 msnm, Prov. Cotopaxi. Cantón Pujilí, Sector Cuturivi. - Muestra 2: Suelo cultivo papa, 3400 msnm, Prov. Cotopaxi. Cantón Pujilí, Sector Cuturivi. 	<p>Tipo de muestra: Suelo rizosférico</p>
<p>Número de muestras: 2</p>	<p>Empaque: Bolsa ziploc plástica</p>
<p>Fecha de recepción: 14/06/2021</p>	<p>Fecha de pruebas: 21/06/2021 al 04/07/2021</p>
<p>Análisis: Identificación bacteriana a través de la secuenciación del gen 16s.</p> <p>Asignación de códigos de barra para la secuenciación:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Barcode 01 (A05): ADN obtenido de muestra de suelo 1. - Barcode 02 (B05): ADN obtenido de muestra de suelo 2. - Barcode 03 (C05): Control negativo (agua) <p>Flujo de trabajo experimental:</p>	<p>Método: Secuenciación en nanoporos con dispositivo MinION.</p>

<ol style="list-style-type: none"> Amplificación de los genes 16s de cada muestra y preparación de librerías de ADN para secuenciar en el MinION Mk1B utilizando el kit de código de barras 16s 1-24 (SQK-16S024). Secuenciación de librerías 16s en el MinION de Oxford Nanopore y posterior basecalling en MinKNOW. Análisis de las lecturas resultantes en el flujo bioinformático online 16S en EPI2ME. 	
--	--

RESULTADOS

1. Control de calidad e identificación:

☰ Figuras claves

LECTURAS ANALIZADAS

187,794

RENDIMIENTO TOTAL

296,2 Mbases

PUNTUACIÓN DE CALIDAD PROMEDIO

13.26

LONGITUD DE SECUENCIA PROMEDIO

1,577

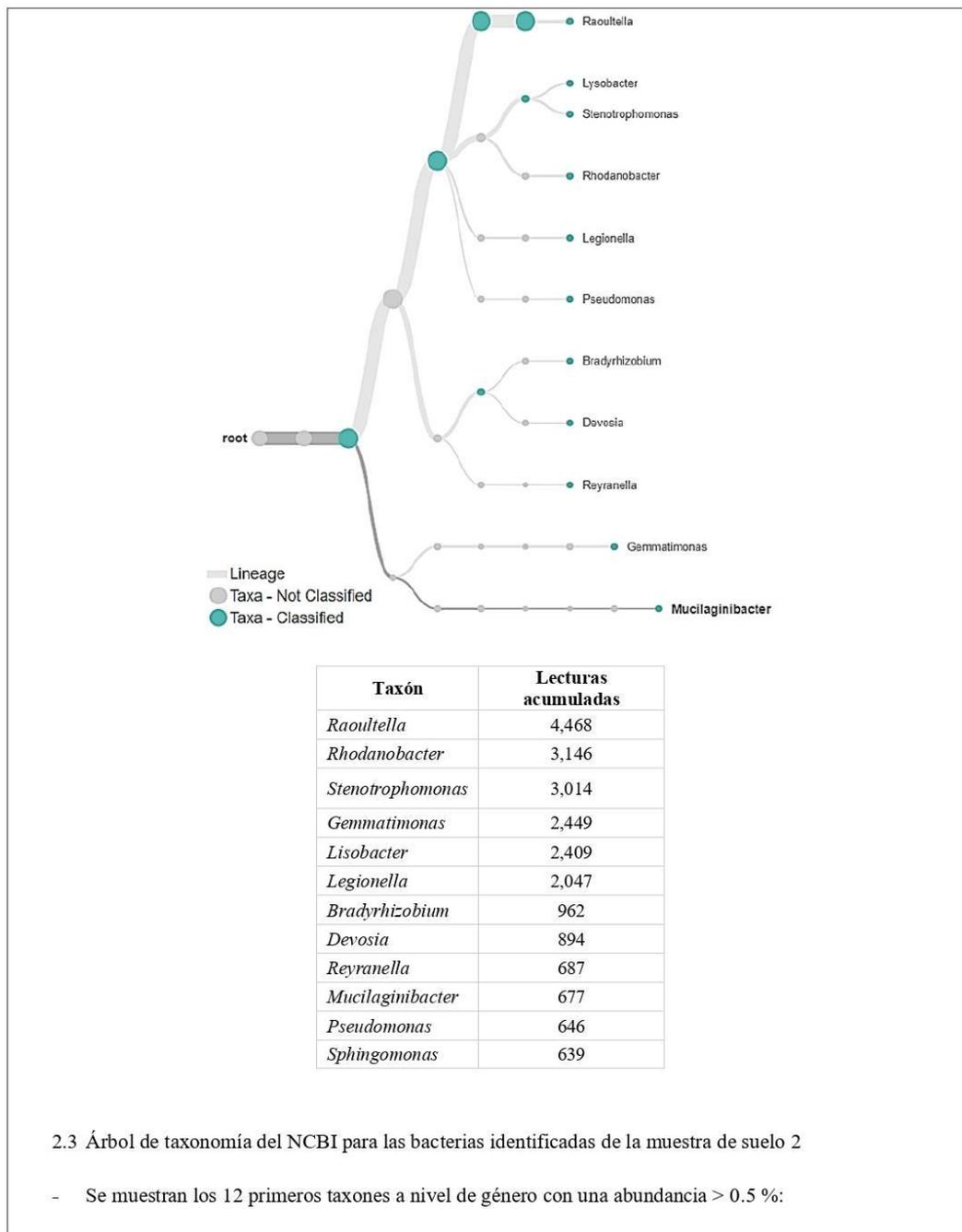
☰ Reads per Barcode ID

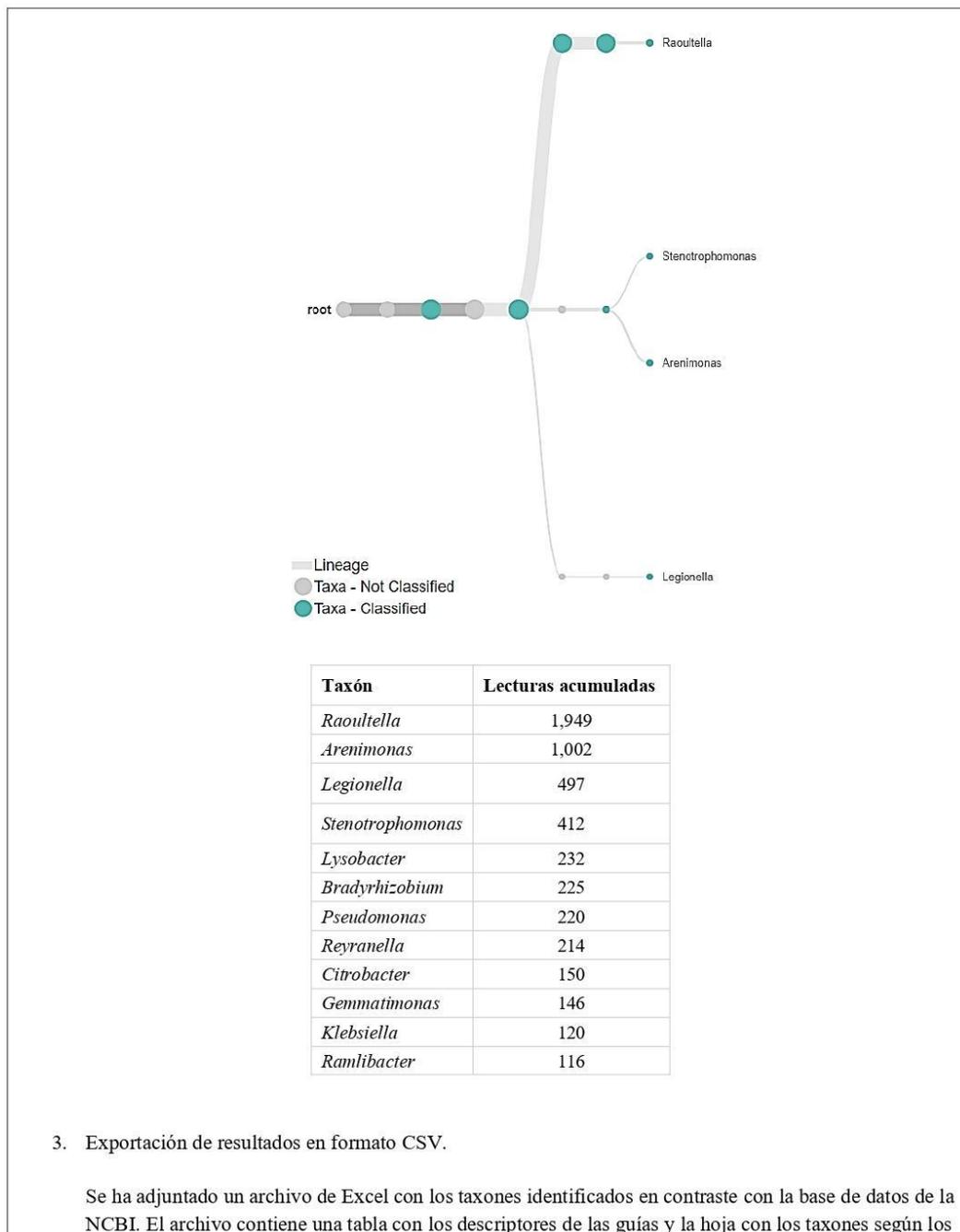
ID	Read Count	
barcode01	133,534	EXCLUDE
barcode02	54,260	EXCLUDE

☰ Reads per Run ID

d67e6370c6d5f7574bdaf252d9f... **187,794**







códigos de barra, 01 y 02. Se puede bajar el archivo en el siguiente [vínculo](#).

NOTA: El enlace puede borrarse en 10 días. Por favor bajar toda la información antes de esta fecha.

Comentarios:

1. Para la configuración del análisis 16s en EPI2ME se configuró:
 - El puntaje de calidad de las lecturas para ser consideradas válidas: 7.
 - El valor E de BLAST, definida en 0.01.
 - Cobertura mínima requerida de la secuencia para que el enlace se considere una coincidencia: 30.
 - P_ident BLAST mínimo requerido para que el enlace se considere una coincidencia: 77
 - Número máximo de hits por secuencia: 3

2. Referencia al número total de lecturas analizadas y su clasificación:
 - Lecturas clasificadas: es el número de lecturas para las que hay un taxid disponible ("Clasificación exitosa")
 - Lecturas sin clasificar: es el número de lecturas para las que no hay ningún resultado BLAST disponible ("Sin clasificación") o el resultado no cumple los criterios establecidos al principio ("Clasificación por debajo del umbral de control de calidad").

3. Los árboles de taxonomía del NCBI muestra los taxones clasificados para la muestra, donde el grosor de las ramas del linaje es proporcional al número de lecturas pertenecientes a cada taxón.

4. El código de acceso para la visualización de los resultados en EPI2ME es mediante: [Acceso EPI2ME](#)
 NOTA: El enlace puede borrarse en 10 días. Por favor bajar toda la información antes de esta fecha.

5. Los datos crudos (raw data) y basecalling son accesibles en el siguiente enlace: [Raw data soils](#)
 NOTA: El enlace puede borrarse en 10 días. Por favor bajar toda la información antes de esta fecha.

6. El filo dominante en ambas muestras de suelo fue Proteobacteria. Con una abundancia relativa > 3%, las familias dominantes en la muestra de suelo 01 fueron *Enterobacteriaceae* y *Xanthomonadaceae*. En la muestra de suelo 02, además de estas 2 familias se identificó *Gemmataceae*. El género *Raouliella* se mantuvo como el más abundante en ambas muestras de suelo.



Firmado digitalmente
por BYRON JESUS
DÍAZ CARDENAS

Ing. Byron Díaz Cárdenas
Técnico de investigación I
E-mail: byjediaz@espol.edu.ec

Anexo 24. Aval de traducción



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 al idioma Inglés del proyecto de investigación cuyo título versa: **“ANÁLISIS DE CONSORCIOS BACTERIANOS Y GRUPOS FUNCIONALES ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DE LA PAPA (*Solanum tuberosum*), Var. SÚPER CHOLA EN EL PISO ALTITUDINAL DE 3400 msnm. COTOPAXI. 2021.”** presentado por: **Cruz Almagro Francisco Javier**, egresado de la Carrera de: **Ingeniería Agronómica**, perteneciente a la **Facultad De Ciencias Agropecuarias Y Recursos Naturales**, 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 al peticionario hacer uso del presente aval para los fines académicos legales.

Latacunga, septiembre del 2021

Atentamente,

Mg. C. Wilmer Patricio Collaguazo Vega
DOCENTE CENTRO DE IDIOMAS-UTC
CI: 1722417571

