

Universidad
Nacional
de Loja

Universidad Nacional de Loja

Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables

Maestría en Agroecología y Desarrollo Sostenible

Evaluación de soportes orgánicos en interacción con bacterias promotoras del crecimiento vegetal para la formulación de un prototipo de inoculante

Trabajo de Titulación previo a la obtención del título de Magister en Agroecología y Desarrollo Sostenible.

AUTOR:

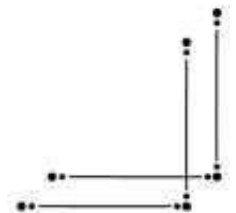
Franco Antonio Guillén Guzmán

DIRECTOR:

Ing. Klever Iván Granda Mora, PhD.

Loja – Ecuador

2023



Certificación

Loja, 23 de mayo de 2023

Klever Iván Granda Mora PhD.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN CURRICULAR

CERTIFICO:

Que he revisado y orientado todo el proceso de elaboración del Trabajo de Titulación denominado: **Evaluación de soportes orgánicos en interacción con bacterias promotoras del crecimiento vegetal para la formulación de un prototipo de inoculante**, de autoría del estudiante **Franco Antonio Guillén Guzmán** previo a la obtención del título de **Magister en Agroecología y Desarrollo Sostenible**, con cédula de ciudadanía **Nro. 1102484480**, una vez que el trabajo cumple con todos los requisitos exigidos por la Universidad Nacional de Loja, para el efecto, autorizo la presentación para la respectiva sustentación y defensa.

Klever Iván Granda Mora PhD.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN CURRICULAR

Autoría

Yo, **Franco Antonio Guillén Guzmán**, declaro ser autor del presente Trabajo de Titulación y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos y acciones legales, por el contenido del mismo. Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi Trabajo de Titulación, en el Repositorio Digital Institucional - Biblioteca Virtual.

Firma:

Autor: Franco Antonio Guillén Guzmán

Cédula de Identidad: 1102484480

Fecha: Loja, 05 de junio de 2023

Correo electrónico: faguilleng2010@hotmail.com

Teléfono: 0991567615

Carta de autorización por parte del autor, para consulta, reproducción parcial o total y/o publicación electrónica del texto completo, del Trabajo de Titulación.

Yo, **Franco Antonio Guillén Guzmán**, declaro ser autor del Trabajo de Titulación denominado: **Evaluación de soportes orgánicos en interacción con bacterias promotoras del crecimiento vegetal para la formulación de un prototipo de inoculante**, como requisito para optar el título de **Magister en Agroecología y Desarrollo Sostenible**, autorizo al sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que, con fines académicos, muestre la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el Repositorio Institucional, en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia del Trabajo de Titulación que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los cinco días del mes de junio de dos mil veintitrés.

Firma:

Autor: Franco Antonio Guillén Guzmán

Cédula: 1102484480

Dirección: Av. 8 de diciembre y Tribuno

Correo electrónico: faguilleng2010@hotmail.com

Teléfono: 0991567615

DATOS COMPLEMENTARIOS:

Director de Trabajo de Titulación: Ing. Klever Iván Granda Mora, PhD.

Dedicatoria

A Dios por su infinita misericordia por permitirme seguir vivo para lograr cada uno de mis sueños, ya que gracias a él hoy sigo de pie. Al amor de mi vida Cira a mis hijos preciosos que los amo Diego, Pablo, Sofía, Isaí, Rebeca y Estefanía los que me impulsa a seguir adelante y me levanta cada vez que tropiezo.

A mi madre (+), Yolanda Rebeca, a mi padre Higinio Aurelio sin ellos no habría logrado mis metas. Sus esfuerzos fueron impresionantes, su amor invaluable y sus bendiciones las que me protegen día a día. A mis hermanos, sobrinos a todos Dios les pague y los bendiga siempre.

Franco Antonio Guillén Guzmán

Agradecimiento

A Dios padre celestial, por guiarnos en nuestro camino, bendecirnos día a día y por brindarnos sabiduría en cada decisión que tomemos. A mi familia, por ser el pilar de este gran logro y esfuerzo, por darme ánimo y fortaleza para seguir adelante en los días cuando desmayaba. A mis amigos Roosevelt Armijos Tituana y Klever Iván Granda Mora por su apoyo y enseñanza impartida durante todo el proceso de elaboración y desarrollo de esta investigación. ¡Muchas gracias a todos, que Dios los bendiga siempre!

Franco Antonio Guillén Guzmán

Índice de contenido

Portada...	i
Certificación	ii
Autoría	iii
Carta de autorización	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimiento	vi
Índice de contenido	vii
Índice de tablas	ix
Índice de figuras.....	x
Índice de Anexos	xi
1. Título.....	1
2. Resumen. 	2
2.1 Abstract	3
3. Introducción	4
3.1. Hipótesis.....	5
3.2. Objetivos de investigación	5
3.2.1. <i>Objetivo general</i>	5
3.2.2. <i>Objetivos específicos</i>	5
4. Marco teórico	6
4.1. Estado del arte	6
4.2. Microorganismos nativos	7
4.3. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal.....	7
4.4. Mecanismos de mayor importancia de las bacterias promotoras del crecimiento vegetales en plantas.....	7
4.4.1. <i>Fijación de nitrógeno</i>	8
4.4.2. <i>Solubilización del fosforo</i>	8
4.4.3. <i>Producción de fitohormonas</i>	8
4.5. Soporte orgánico y su importancia.....	9
4.5.1. <i>Tipos de soportes</i>	10

4.5.1.1. Soportes Sólidos.....	10
4.6. Principales funciones de la formulación de inoculantes	12
5. Metodología.....	13
5.1. Localización del área de estudio	13
5.2. Tipo de investigación	13
5.3. Material biológico	13
5.4. Reactivación de crío viales de las cepas: AZM1R2, ASM3R1 y PM8R1	14
5.5. Selección del medio de cultivo y dinámica de crecimiento bacteriano.....	14
5.6. Metodología para determinar la eficiencia de diferentes soportes orgánicos en la supervivencia de bacterias promotoras del crecimiento vegetal	14
5.6.1. <i>Evaluación de la supervivencia de las rizobacterias en interacción con los soportes orgánicos.....</i>	<i>15</i>
5.6.2. <i>Diseño experimental.....</i>	<i>16</i>
5.6.3. <i>Determinación de la Viabilidad.....</i>	<i>17</i>
5.6.4. <i>Análisis estadístico.....</i>	<i>18</i>
5.7. Metodología para seleccionar la mejor interacción bacteriana-soporte orgánico para la formulación de un prototipo de inoculante.....	18
5.7.1. <i>Recuento de los microorganismos en los prototipos seleccionados</i>	<i>19</i>
6. Resultados 20	
6.1. Viabilidad de la bacteria <i>Azotobacter spp.</i>	20
6.1.1. <i>Viabilidad de la bacteria Azospirillum spp.</i>	21
6.1.2. <i>Viabilidad de la bacteria Pseudomona spp.</i>	21
6.2. Selección de la mejor interacción bacteria-soporte orgánico para la formulación de un prototipo de inoculante	23
7.	Discusión
.....
...26	
8. Conclusiones.....	30
9. Recomendaciones.....	31

10. Bibliografía.....	32
11. Anexos.....	42

Índice de tablas:

Tabla 1. Especificaciones técnicas del soporte Turba peat mix utilizado para evaluar la eficiencia de diferentes soportes orgánicos en interacción con bacterias promotoras del crecimiento vegetal para la formulación de un prototipo de inoculante	10
Tabla 2. Especificaciones del producto alginato de sodio utilizado para la elaboración de encapsulados	11
Tabla 3. Composición Química del soporte humus utilizado en la investigación sobre la Evaluación de la eficiencia de diferentes soportes orgánicos en interacción con bacterias promotoras del crecimiento vegetal para la formulación de un prototipo de inoculante.	11
Tabla 4. Aislados bacterianos capturados en tres cantones de la provincia de Loja y caracterizados en el laboratorio de microbiología vegetal del centro de biotecnología UNL	14
Tabla 5. Tratamientos y su codificación para evaluar la eficiencia de los soportes orgánicos en la supervivencia de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal.....	16
Tabla 6. Las unidades experimentales para la evaluación de la eficiencia de los soportes orgánicos en la supervivencia de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal .	17

Índice de figuras:

- Figura 1.** Mapa de ubicación del laboratorio del Centro de Biotecnología perteneciente a la Dirección de Investigación de la UNL..... 13
- Figura 2.** Evolución del comportamiento dinámico de la bacteria *Azotobacter* spp. inoculado en una concentración inicial de 1.2×10^9 UFC g^{-1} en los soportes perlas de alginato, humus, turba y caldo nutriente durante un tiempo de 80 días. Fuente: Elaboración propia 20
- Figura 3.** Evolución de los diferentes soportes en interacción con *Azospirillum* spp. con una concentración de siembra inicial de $7,7 \times 10^7$ UFC g^{-1} y su comportamiento dinámico en un periodo de tiempo de 80 días. Fuente: Elaboración propia 21
- Figura 4.** Comportamiento dinámico de la *Pseudomona* spp. en concentración inicial de siembra 3.3×10^8 UFC g^{-1} en interacción con los diferentes soportes a través del tiempo de evaluación. Fuente: Elaboración propia 22
- Figura 5.** Comportamiento de la viabilidad en anaquel a través del tiempo a una temperatura ambiente de 20 ± 2 °C de los prototipos seleccionados para la formulación de un bioproducto a base de soportes humus y el testigo (CN) con la bacteria *Azotobacter* spp. Fuente: Elaboración propia..... 23
- Figura 6.** Resultados del ensayo de estabilidad en percha de los prototipos de formulación de la bacteria *Azospirillum* spp. en interacción con los soportes perlas de alginato y caldo nutriente testigo a través del tiempo a una 24
- Figura 7.** Comportamiento en percha de los mejores prototipos de bioproductos a base de soportes orgánicos y *Pseudomonas* spp. seleccionados almacenados en percha a una temperatura ambiente de 20 ± 2 °C durante 75 días. Fuente: Elaboración propia 24

Índice de anexos:

Anexo 1. Valores estadísticos de la media como resultado de inoculación de la bacteria <i>Azotobacter</i> spp. a una concentración de 1.2×10^9 UFC g^{-1} en interacción con soportes perlas de alginato, humus, turba y caldo nutriente en el tiempo de 80 días.....	42
Anexo 2. Información estadística de la media como resultado de inoculación de la bacteria <i>Azospirillum</i> spp a una concentración inicial de 7.7×10^8 UFC g^{-1} en interacción con soportes perlas de alginato, humus, turba y caldo nutriente expresado en UFC g^{-1} durante los 80 días del experimento.	42
Anexo 3. Resultado de los valores medios de la interacción bacteria <i>Pseudomonas</i> spp a una concentración de 3.3×10^8 UFC g^{-1} con los soportes perlas de alginato, humus, turba y caldo nutriente expresado en UFC g^{-1} en un periodo de 80 días del ensayo.....	42
Anexo 4. Evidencias de Trabajo en laboratorio.....	43
Anexo 5. Certificado de traducción del abstract.....	43

1. Título

Evaluación de soportes orgánicos en interacción con bacterias promotoras del crecimiento vegetal para la formulación de un prototipo de inoculante.

2. Resumen

El manejo convencional de la agricultura ha generado daños irreversibles en la calidad del suelo y la salud ambiental, lo que ha obligado a implementar un nuevo modelo de prácticas ambientales sostenibles. Los biofertilizantes han sido identificados como una alternativa biotecnológica para aumentar la fertilidad del suelo y la producción de cultivos en la agricultura sostenible. Los microorganismos benéficos necesitan un soporte que les brinde protección y viabilidad desde el momento de la producción del biofertilizante hasta su aplicación en campo. A través de esta investigación se logró evaluar los soportes orgánicos humus, turba y perlas de alginato como portadores de los microorganismos nativos: *Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp. y *Pseudomonas* spp., además se seleccionó el mejor soporte para la formulación de un prototipo de inoculante. Los resultados obtenidos en el comportamiento de los soportes en interacción con las bacterias promotoras del crecimiento vegetal a concentraciones iniciales fueron: *Azotobacter* spp. de 1.2×10^9 , para *Azospirillum* spp. 7.7×10^7 y en *Pseudomonas* spp. 3.3×10^8 UFC g⁻¹. El T4 testigo Caldo Nutriente (CN) más *Azotobacter* spp. desde los 35 días después de la inoculación (DDI) hasta los 80 DDI muestra los valores más altos. Seguido del T2 humus presentaron los mayores valores a los 50 DDI y 65 DDI. El T4 testigo (CN) más *Azospirillum* spp. se evidenció los mayores valores desde los 35 DDI hasta los 80 DDI. Seguido del T3 (alginato) inoculado con *Azospirillum* spp. donde se visualizó los mayores valores a partir de los 20 DDI hasta los 65 DDI. El T3 *Pseudomonas* spp. con perlas de alginato presentó durante los 80 días los mayores valores. Así mismo el T2 *Pseudomonas* spp. con humus presentó los mayores valores a partir de los 35 DDI hasta los 80 DDI. La viabilidad en percha para T4 y T2 de *Azotobacter* spp., T3 y T4 *Azospirillum* spp. y T3 *Pseudomonas* spp. mantienen su concentración bacteriana hasta los 155 DDI, mientras que T2 *Pseudomonas* spp. a los 155 DDI bajo su valor en una unidad logarítmica. El mayor potencial de encapsulado se logró con las perlas de alginato para las cepas *Azospirillum* spp. y *Pseudomona* spp. con una viabilidad de hasta 155 DDI, mientras que el soporte humus en interacción con *Azotobacter* spp. y *Pseudomona* spp. la mayor sobrevivencia llega hasta los 65 DDI y 110 DDI respectivamente.

Palabras claves: soportes orgánicos, inoculante, *Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp. y *Pseudomonas* spp., caldo nutriente.

2.1 Abstract

Conventional agricultural management has caused irreversible damage to soil quality and environmental health, forcing the implementation of a new model of sustainable environmental practices. Biofertilisers have been identified as a biotechnological alternative to increase soil fertility and crop production in sustainable agriculture. Beneficial microorganisms need a support that provides them with protection and viability from the moment of biofertiliser production to its application in the field. Through this research it was possible to evaluate the organic supports humus, peat and alginate beads as carriers of native microorganisms: *Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. and the best support was selected for the formulation of an inoculant prototype. The results obtained in the behaviour of the supports in interaction with the plant growth promoting bacteria at initial concentrations were: *Azotobacter* spp. of 1.2×10^9 , for *Azospirillum* spp. 7.7×10^7 and in *Pseudomonas* spp. 3.3×10^8 CFU g⁻¹. The T4 control Nutrient Broth (NC) plus *Azotobacter* spp. from 35 days after inoculation (DDI) to 80 DDI showed the highest values. Followed by T2 humus showed the highest values at 50 DDI and 65 DDI. T4 control (CN) plus *Azospirillum* spp. showed the highest values from 35 DDI to 80 DDI. This was followed by T3 (alginate) inoculated with *Azospirillum* spp. where the highest values were observed from 20 DDI to 65 DDI. T3 *Pseudomonas* spp. with alginate beads showed the highest values during the 80 days. Likewise, T2 *Pseudomonas* spp. with humus showed the highest values from 35 DDI to 80 DDI. The perch viability for T4 and T2 *Azotobacter* spp., T3 and T4 *Azospirillum* spp. and T3 *Pseudomonas* spp. maintained their bacterial concentration up to 155 DDI, while T2 *Pseudomonas* spp. at 155 DDI lowered its value by one logarithmic unit. The highest encapsulation potential was achieved with the alginate beads for *Azospirillum* spp. and *Pseudomonas* spp. strains with a viability up to 155 DDI, while the humus support in interaction with *Azotobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. had the highest survival up to 65 DDI and 110 DDI respectively.

Keywords: organic media, inoculant, *Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp. and *Pseudomonas* spp., nutrient broth.

3. Introducción

La agricultura es una actividad milenaria y de uso racional de los recursos naturales renovables (Andrade y Ayaviri, 2018). Sin embargo, el proceso de modernización implementado por la revolución verde en los últimos cincuenta años adoptó un modelo tecnológico de producción agrícola reduccionista lo que ha causado problemas ecológicos, sociales, culturales y económicos por el uso agresivo de los agroquímicos (Sarandón, 2008). El reto es alimentar a una población creciente que se espera alcance los 9 000 y 10 000 millones de personas aproximadamente para el año 2050 (Reganold y Wachter, 2016).

En Ecuador, la superficie de suelo para la producción de monocultivos en el año 2021 fue de 1 423 372 ha. En la provincia de Loja el área dedicada a los cultivos permanentes fue de 8 245 ha (Instituto Nacional de Estadística y Censo [INEC], 2022). La agricultura se desarrolló aplicando grandes cantidades de fertilizantes químicos para reponer los nutrientes removidos del suelo mediante la cosecha de cultivos importantes para los productores, como: maíz (*Zea mays* L.), Arroz (*Oryza sativa* L.), caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), entre otros. (MAG, 2020). Bajo este criterio es necesario proporcionar alternativas sostenibles a los agricultores para resolver los problemas de nutrición del suelo y los cultivos (Compant et al. 2019). La utilización de biofertilizantes a base de microorganismos benéficos en estos momentos tiene gran importancia para el sector agrícola, debido a que garantiza una alimentación segura como resultado de una producción sostenible de los cultivos (Itelima et al. 2018).

Es necesario impulsar la producción de biofertilizantes formulados con uno o varios microorganismos con los cuales se lograrán mejorar la disponibilidad de nutrientes. Existe una gran cantidad de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) de múltiples orígenes fundamentales para el desarrollo de las plantas. Las cepas nativas *Azospirillum brasilense*, *Azotobacter chroococcum* y *Pseudomonas fluorescens* son los principales microorganismos estudiados en interacción con soportes orgánicos (Siyar et al. 2019).

Díaz et al. (2021), recomiendan la utilización de diversos soportes orgánicos como base para la inoculación de microorganismos como son: la turba, bagazo, compost de diversos orígenes, residuos de caña de azúcar, suelos mezclados con varias enmiendas orgánicas, humus, alginato, entre otros. La turba es el principal portador de bacterias y el más utilizado como inoculante por su calidad y disponibilidad. La función de los soportes es prevenir la pérdida de viabilidad de los microorganismos y proporcionar el número correcto de células viables en buenas condiciones fisiológicas en el momento de ser liberadas en invernadero o campo (Vasilev et al. 2020). Rojas et al. (2022) manifiestan la importancia de aplicar el método

adecuado para producir bioencapsulados que se ajusten a las necesidades del cultivo y condiciones ambientales propias del lugar. Díaz et al. (2021) en su investigación sobre la evaluación de los soportes sólidos turba y cachaza suplementada más melaza al 1%, demostraron ser ideales para la viabilidad y la actividad biológica de las bacterias almacenadas en condiciones de refrigeración 4-8 °C.

En el país hace falta información científica sobre el uso de microorganismos beneficiosos y su interacción con los soportes orgánicos. La Universidad Nacional de Loja está generando investigación en temas de biofertilizantes a base de cepas nativas mediante el proyecto Bioproducto mixto con microorganismos benéficos para su aplicación en cultivo hortícolas [BMMB], (2022). El tema Evaluación de soportes orgánicos en interacción con bacterias promotoras del crecimiento vegetal para la formulación de un prototipo de inoculantes es parte de este proyecto macro. El objetivo de la investigación fue obtener un bioproducto que mantenga su viabilidad celular y la vida útil. Se utilizaron las cepas bacterianas seleccionadas y caracterizadas en el laboratorio de investigación de la UNL.

3.1. Hipótesis

H_1 : Existe diferencia estadística entre las interacciones bacterias promotoras del crecimiento vegetal y los soportes orgánicos

H_0 : No existe diferencia estadística entre las interacciones bacterias promotoras del crecimiento vegetal y los soportes orgánicos

La investigación cumplió los siguientes objetivos:

3.2. Objetivos de investigación

3.2.1. Objetivo general

Evaluar la eficiencia de diferentes soportes orgánicos en interacción con bacterias promotoras del crecimiento vegetal para la formulación de un prototipo de inoculante.

3.2.2. Objetivos específicos

Determinar la eficiencia de diferentes soportes orgánicos en la supervivencia de bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Seleccionar la mejor interacción bacteriana-soporte orgánico para la formulación de un prototipo de inoculante.

4.

Marco teórico

4.1. Estado del arte

Para producir un biofertilizante con una alta viabilidad es importante elegir el mejor material como soporte, el método de propagación y las condiciones óptimas de crecimiento del microorganismo (Itelima et al., 2018). Al evaluar el efecto de los soportes sobre la viabilidad de la cepa bacterianas Malusá y Vassilev (2014) consideran que la cantidad de células vivas depende del tipo de bacteria utilizada en la evaluación de la calidad de los distintos tipos de soportes y su rango de concentración bacteriana, la misma que va desde: $>1.5 \times 10^9$ UFC g^{-1} o $> 0.2 \times 10^9$ UFC g^{-1} para productos sólidos. Así mismo el contenido de materia orgánica (C) del biofertilizante no menor al 20 % y que el producto tenga al menos 6 meses de vigencia.

Malusá y Vassilev (2014), manifiestan que los valores permitidos para biofertilizantes recién formulados corresponden a concentraciones entre 10^6 y 10^9 UFC g^{-1} o mL^{-1} . De igual forma Díaz et al. (2021), revela que el valor mínimo en recuento de células viables es de 5×10^7 UFC g^{-1} en soporte sólido.

Según Pallo y Velasteguí (2014), en su investigación determinaron que a los 180 días de almacenamiento el soporte turba más vermiculita mantiene mayor concentración bacteriana (*Azospirillum* spp), con 5.52×10^8 UFC. g^{-1} . De la información obtenida por Quiroz et al. (2019) en relación al microorganismo *Pseudomona* y su interacción con perlas de alginato señalan que el tiempo de almacenamiento en percha se mantuvo hasta los 150 días con una carga bacteriana de 1×10^{13} UFC g^{-1} . Para obtener un bioproducto con la bacteria *Azotobacter* generalmente se utiliza el medio de cultivo caldo Ashby, alcanzando un nivel de concentración de 1×10^8 UFC mL^{-1} (Escobar C., 2011), como se citó en (Díaz et al., 2021).

Para Bashan et al. (2014), el tamaño de las microesferas de alginato de 50 μm no almacenan más de 10^4 UFC perla $^{-1}$ de bacterias del tipo *Azospirillum*, la cantidad de bacterias es insuficiente considerando que la planta requiere $10^6 - 10^7$ células/planta, así mismo recomiendan almacenar los biofertilizantes a temperatura ambiente o en condiciones de frío lejos del calor o la luz solar directa, el empaque utilizar bolsas de polietileno de baja densidad entre 50 a 75 micras. Itelima, et al. (2018) consideran un factor importante la esterilización de materiales portadores en autoclave ya que se produce sustancias tóxicas y cambia las propiedades de los portadores lo que reduciría la concentración de las bacterias contenidas.

El medio de cultivo caldo nutriente es el más utilizado para activar y propagar diferentes géneros de bacterias, sin embargo el estudio realizado por Quiroz et al. (2019) en el medio de cultivo caldo nutritivo obtuvieron resultados poco satisfactorios para el crecimiento de las cepas bacterianas del género *Pseudomonas*.

4.2. Microorganismos nativos

Los microorganismos son bacterias que se encuentran de manera natural en el suelo y en el tejido de las plantas especialmente en aquellos suelos con buen contenido de materia orgánica. Existe una amplia diversidad microbiana en el mundo, muchos de estos microorganismos pueden desarrollarse y vivir en ambientes extremos (García et al., 2021). Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal PGPR son de diversos tipos y orígenes. Los microorganismos se encuentran abundantemente en la rizosfera como organismos de vida libre. Ejemplo *Azospirillum*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Arthrobacter* entre otros (Siyar et al., 2019).

4.3. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

La aplicación constante de los fertilizantes sintéticos, manejo convencional y monocultivo generan un grave impacto en la salud de los suelos y el medio ambiente (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 2018; Bhatt et al. 2019). No obstante, es necesario proporcionar a los agricultores alternativas sostenibles para la nutrición de los cultivos a través del uso de bioinoculantes que en su composición poseen microorganismos benéficos, que ayudan en el mantenimiento del equilibrio del suelo, apoyan al crecimiento de los cultivos, incrementan el rendimiento y reducen los costos de producción (Sangoquiza et al., 2021). Lapiceirell et al. (2021), Romero y Getzabeth (2021), recomiendan la utilización de los biofertilizantes a base de microorganismos eficientes para suplir el uso de fertilizantes minerales. Los microorganismos como *Pseudomonas* spp., *Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp., colonizan la rizosfera, y ejercen efectos sobre el crecimiento de las plantas (Sandini et al., 2019).

4.4. Mecanismos de mayor importancia de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal

El suelo es un elemento importante ya que se convierte en el principal soporte para la vida de los microorganismos y la sustentabilidad, las raíces se desarrollan en presencia de un mayor número de microorganismos y mayor efecto en el crecimiento y la supervivencia de las plantas, el uso de mejoradores biológicos es una alternativa viable para la agricultura sustentable (Hernández et al., 2022). Según Ávila et al. (2022), las PGPR tienen la capacidad de promover el crecimiento de las plantas mediante la producción directa de fitohormonas, solubilización de fósforo (P), producción de sideróforos, enzima ACC desaminasa (1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase), así mismo las bacterias a través de mecanismos indirectos generan antagonismo con los microorganismos patógenos, evitando el ataque de

patógenos. Siyar et al. (2019) señalan que las PGPR son ideales para mitigar los efectos drásticos en suelos salinos, con metales pesados y otros contaminantes. Rojas et al. (2022) manifiestan que las PGPR, ejercen varios efectos benéficos sobre el crecimiento de las plantas y el rendimiento en muchos cultivos. Estos efectos benéficos pueden ser:

4.4.1. Fijación de nitrógeno

Las bacterias fijadoras de nitrógeno se caracterizan por tener especies no patógenas y fijadoras de nitrógeno de vida libre en donde convierten el nitrógeno molecular en amonio, como fuente de nitrógeno aprovechable (Rojas et al., 2022). Una opción para el uso como inoculante biológico son las especies; *Azotobacter vinelandii* y *Azotobacter chroococcum*, pues son bacterias de crecimiento rápido y de fácil producción masiva. La *Azotobacter* spp. pertenece al grupo de bacterias Gram negativas que presentan vida libre, cumpliendo varias funciones y mecanismos como fijar el nitrógeno libre del suelo, solubilizar el fósforo inorgánico, producir sideróforos, acelerar la producción de fitohormonas como el ácido indol-3-acético, aliviar los diversos factores de estrés, reducir la toxicidad de los alimentos, mejorar de la salud de las plantas, degradar los residuos de pesticidas y metabolizar los metales pesados (Sumbul et al., 2020).

4.4.2. Solubilización del fosforo

Los bajos niveles de fósforo asimilable pueden limitar el crecimiento de las plantas, así los microorganismos promotores del crecimiento vegetal: *Azotobacter* spp., *Azospirillum* spp., *Pseudomonas* spp., solubilizan los fosfatos orgánicos o inorgánicos, y facilita el aprovechamiento por las plantas (Oteino et al., 2015). Las bacterias solubilizadoras del fosfato utilizan diferentes mecanismos para convertir las formas insolubles en solubles, los microorganismos toman los azúcares que resulta de los exudados de las raíces de las plantas, lo metabolizan y liberan ácidos orgánicos que actúa como quelantes de los cationes de calcio (Ca^{2+}), hierro (Fe), aluminio (Al) y magnesio (Mg) (Rojas et al., 2022).

4.4.3. Producción de fitohormonas

Las bacterias que se encuentran en la rizosfera pueden intervenir en el crecimiento vegetal por la producción de hormonas, como las auxinas, gibelinas, citoquinina; así también, la producción de bioinoculantes que contengan cepas seleccionadas se puede considerar barata como producto final si se compara con un producto sintético (Backer et al., 2018; Orozco-Mosqueda et al., 2021); Lyu et al., 2022).

Las bacterias producen hormonas de crecimiento como:

- **Auxinas.** Romero y Getzabeth (2021) manifiestan que: Las auxinas son las primeras hormonas descritas como reguladoras de los procesos de desarrollo de las plantas como la

elongación de tallos, la dominancia apical, la organogénesis, el desarrollo de frutos y meristemas y el crecimiento orientado al geotropismo. El Ácido Indo acético (AIA) es la auxina más abundante y fisiológicamente importante, ya que regula procesos de división celular y formación y diferenciación del haz vascular (Jason y Mathesius, 2018; García et al., 2021).

- **Giberelinas.** Las giberelinas son un amplio grupo de aproximadamente 136 diferentes moléculas de hormonas, de este gran número solo 4 tipos son sintetizados por bacterias, GA1, GA2, GA3 y GA20. Estas hormonas son transportadas desde las raíces a las partes aéreas de la planta, donde los efectos de este grupo de hormonas radica en la estimulación de la elongación del tallo, cuando se asocian a las bacterias que también producen auxinas; estas estimulan el sistema radicular mejorando el suministro de nutrientes para facilitar el crecimiento en la parte aérea (Posada et al., 2021; Vejan et al., 2016).

- **Citoquininas.** Posada et al. (2021) indican que las citoquininas son un grupo de hormonas vegetales vitales para las plantas ya que promueven la división celular de forma continua. Tiene una gran importancia a nivel vegetal debido a que regula la citoquinesis y ayuda en el mejoramiento de la división celular, promueve la producción de raíces, la formación de pelos absorbentes es una hormona de baja concentración lo que dificulta su cuantificación.

- **Etileno.** El etileno es una hormona gaseosa anti estrés, que se activa en concentraciones bajas ($0,05 \text{ mL}^{-1}$), aumenta su concentración en condiciones de estrés abiótico y biótico. La acumulación de etileno es la respuesta al estrés que puede soportar o tolerar la planta o la respuesta a los síntomas de estrés y la senescencia (Backer et al., 2018).

- **Producción de sideróforos.** El hierro es un micronutriente necesario para el óptimo desarrollo de las plantas, la planta pueda sintetizar proteínas. En efecto, algunos microorganismos desarrollan estrategias para la producción de compuestos de bajo peso molecular llamados sideróforos, que son capaces de unirse al hierro insoluble y quelatar así, facilitar su transporte al interior de la célula (Romero y Getzabeth, 2021).

4.5. Soporte orgánico y su importancia

La producción de bioinoculantes que presenten cepas seleccionadas se puede considerar barata como producto final si se compara con un producto sintético, según Orozco-Mosqueda et al. (2021) todavía existen ciertas restricciones en su producción como resultado del alto coste de producción, la vida útil, el rendimiento, y factores como el medio de cultivo, los rasgos fisiológicos de las especies microbianas, el uso de materiales de protección soporte, además, la manipulación no eficientes son las principales causas del bajo rendimiento.

4.5.1. Tipos de soportes

Los soportes se clasifican en:

4.5.1.1. Soportes Sólidos. Las formulaciones sólidas se utilizan ampliamente en la industria agrícola debido a las ventajas que ofrecen durante el almacenamiento y el transporte. La mezcla de microorganismos con un soporte sólido, como la vermiculita, la perlita, la sepiolita, el caolín, la tierra de diatomeas, la zeolita natural, la arcilla, la turba es de gran interés en la agricultura gracias a su capacidad y proporcionar excelentes condiciones de almacenamiento para diversos inóculos (Rojas et al., 2022).

- La turba es el soporte orgánico más utilizado en todo el mundo en los cultivos comerciales debido a su bajo coste. Sin embargo, este material orgánico es muy variable químicamente y difícil de mantener la calidad en almacenamiento por la susceptibilidad a la humedad y disminuye la cantidad de células del inóculo (Rojas et al. 2022). En la Tabla 1. Se muestra las especificaciones técnicas del soporte turba utilizado para la investigación (Edifarm, 2022).

Tabla 1. Especificaciones técnicas del soporte Turba peat mix utilizado para evaluar la eficiencia de diferentes soportes orgánicos en interacción con bacterias promotoras del crecimiento vegetal para la formulación de un prototipo de inoculante.

Material	Contenido
N-P-K: + microelementos	13-15-175.5
pH:	0.7 ms
EC	~ 80 g/l
Materia seca	0.7 - 1.2 g/l
Contenido de sales	45 - 55 %
Contenido de humedad	16 - 58 %
Contenido de aire	95 - 98 %
Densidad:	

Niveles de Hg, Cr, Col, Pb, As dentro de las normas internacionales. Libre de madera, semilla, radiación, arena, producto químico, grado de descomposición según von post: H2 –H4. Producto 100 % a base de turba natural, no se han usado otras materias primas como compost, corteza descompuesta, EC (conductividad eléctrica).

- El alginato de sodio es un polisacárido lineal aniónico e hidrófilo de origen natural, obtenido a partir de las macroalgas pardas su composición principal son los ácidos β -D-manurónico (M) y α -L-gulurónico (G) (Ore et al., 2020). Se utiliza ampliamente por su biodisponibilidad, compatibilidad, resistencia a la corrosión y coste (Xing et al., 2019). Además, los alginatos son polímeros naturales baja toxicidad y biodegradabilidad, posee excelentes propiedades gelificantes y espesantes al entrar en contacto con cationes (Jadach et al., 2022). Del mismo modo Marconi et al., (2022) coinciden y

manifiestan que el alginato por su biodisponibilidad, compatibilidad, estabilidad es muy útil para la elaboración de perlas, como soporte ayuda a mantener una comunicación célula-célula de los microorganismos. Las perlas de alginato como medio de inmovilización puede alargar la vida de las bacterias *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens*, después de ser inoculadas, secadas y almacenadas a temperatura ambiente durante 14 años (González et al., 2018).

A continuación la Tabla 2 detalla las especificaciones técnicas del alginato de sodio utilizado en la elaboración de las perlas de Alginato que sirvieron para Evaluar la eficiencia de diferentes soportes orgánicos en interacción con bacterias promotoras del crecimiento vegetal para la formulación de un prototipo de inoculante (Merck, s.f.).

Tabla 2. Especificaciones del producto alginato de sodio utilizado para la elaboración de encapsulados.

Prueba	Especificaciones
Aspecto (color)	Blanco a beige
Aspecto (forma)	Sólido
Espectro infrarrojo	Conf. a estruc.
Pérdida por secado	< 15,5
Viscosidad	5,0 - 40,0 cps
c = 1%, Agua	@ 25°C
pH	5 - 8
Arsénico (As)	< 3 ppm
Cadmio (Cd)	< 1 ppm
Mercurio (Hg)	< 1 ppm
Plomo (Pb)	< 10 ppm

- El humus de lombriz es un abono natural obtenido como resultado del estiércol de las lombrices y es de gran calidad nutricional. El humus de lombriz es el resultado de la descomposición de residuos orgánicos como hojas, restos de cultivo, estiércol o cualquier desecho de plantas y animales (Agroasa, 2019). El soporte humus utilizado para la investigación tiene la composición química descrita en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición Química del soporte humus utilizado en la investigación sobre la Evaluación de la eficiencia de diferentes soportes orgánicos en interacción con bacterias promotoras del crecimiento vegetal para la formulación de un prototipo de inoculante.

Material	Contenido
Nitrógeno	1.7 %
Fósforo como P ₂ O ₅	1.52 %
Potasio como K ₂ O	2.42 %
Calcio como CaO	6.62 %
Magnesio como MgO	0.79 %
Materia Orgánica	65.75 %
Ph	7.5
Conductividad Eléctrica	7.3 ms/cm
Color	Marrón Oscuro

4.5.1.2. Soportes Líquidos. Los soportes líquidos, son simples cultivos o suspensiones bacterianas modificadas con sustancias que pueden mejorar la adherencia, la estabilidad y la capacidad de dispersión (Díaz et al., 2021). La principal ventaja de los inoculantes líquidos es que su fabricación se puede realizar fácil, a través de fermentadores, bajo condiciones controladas de laboratorio y con bajos costos de producción en comparación las formulaciones sólidas (González et al., 2018).

4.6. Principales funciones de la formulación de inoculantes

La principal función de la formulación de inoculantes es proporcionar un ambiente adecuado para las cepas bacterianas durante un tiempo prolongado, así también prevenir la pérdida de células viables, mantener en buenas condiciones fisiológicas durante su almacenamiento y posterior liberación en invernadero o campo (Vasilev et al., 2020). Cuando se aplican bacterias al suelo sin tener un medio de transporte estas están desprotegidas y deben competir con la microflora nativa. Las formulaciones proporcionan protección física temporal a las bacterias mientras va liberando gradualmente y colonizando el suelo y las raíces (González et al., 2018). El efecto de los soportes sobre la viabilidad de la cepa bacterianas Malusá y Vassilev, (2014), consideran que la cantidad de células vivas depende del tipo de bacteria utilizada en la evaluación y la calidad de los distintos tipos de soportes así mismo de su rango de concentración bacteriana.

5.

Metodología

5.1. Localización del área de estudio

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio del Centro de Biotecnología, perteneciente a la Dirección de Investigación de la UNL, Ciudad Universitaria Guillermo Falconí Espinosa La Argelia, Av. Pío Jaramillo Alvarado, se encuentra ubicado en las coordenadas: Latitud Sur: 04° 08' 00'' y una longitud Oeste 79° 12' 00'' a una altitud de 2 170 m.s.n.m.(Centro de información territorial, 2022). (Figura 1).

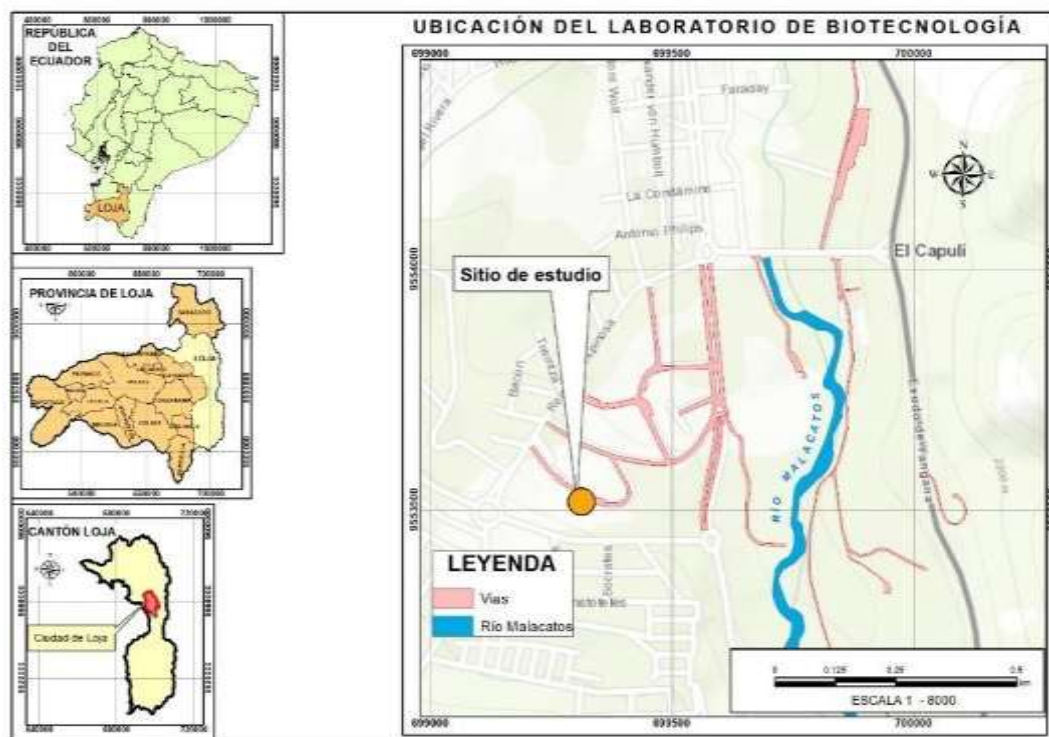


Figura 1. Mapa de ubicación del laboratorio del Centro de Biotecnología perteneciente a la Dirección de Investigación de la UNL.

5.2. Tipo de investigación

La presente investigación fue de tipo experimental siguiendo el método deductivo donde, a partir de ensayos en laboratorio se determinó la eficiencia del soporte y la sobrevivencia de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

5.3. Material biológico

Se utilizaron tres cepas de rizobacterias *Azotobacter* spp. - AZM1R2, *Azospirillum* spp. - ASM3R1 y *Pseudomonas* spp. - PM8R1, el material biológico fue caracterizado como promotor del crecimiento vegetal en el laboratorio de Microbiología Vegetal del Centro de Biotecnología de la UNL correspondiente al proyecto “Bioproducto Mixto con Microorganismos Benéficos (BMMB), para su aplicación en cultivos hortícolas.” codificadas con las siguientes nomenclaturas: AZM1R2, ASM3R1 Y PM8R1, se muestra en la Tabla 4

Tabla 4. Aislados bacterianos capturados en tres cantones de la provincia de Loja y caracterizados en el laboratorio de microbiología vegetal del centro de biotecnología UNL

Localidad	Cultivo	Aislados	Bacteria aislada
Zapotillo	Cebolla	AZ M1 R2	<i>Azotobacter</i> spp.
Macará	Arroz	AS M3 R1	<i>Azospirillum</i> spp.
Saraguro	Papa	P M8 R1	<i>Pseudomona</i> spp.

5.4. Reactivación de crio viales de las cepas: AZM1R2, ASM3R1 y PM8R1

De las cepas puras de rizobacterias *Azotobacter* spp. - AZM1R2 se tomaron los crioviales 1A, 1C, 1E y 1K, de *Azospirillum* spp. - ASM3R1 los 3A, 3C, 3E y 3K y *Pseudomonas* spp. - PM8R1 los crioviales 9A, 9C, 9E y 9K fueron reactivados utilizando el método descrito por Santillana, (2006). Las cepas que estaban conservados a - 80 °C, se colocaron en tubos falcón y llevados a temperatura de - 20 °C y luego a - 4 °C por una hora respectivamente, seguidamente los tubos fueron sometidos a baño María a 100 °C por un tiempo de 20 minutos. Posteriormente se tomó una asada de cada cepa y fue sembrada en cajas de Petri que contenían agar nutriente. A continuación, se incubaron a 28 °C durante 48 horas.

5.5. Selección del medio de cultivo y dinámica de crecimiento bacteriano

Para el crecimiento de las tres cepas bacterianas se utilizó el medio de cultivo caldo nutritivo. Se empleó un matraz de capacidad 250 µL, a los cuales se les colocó un volumen de 150 µL de caldo nutritivo. Se tomó una asada de la cepa y se colocó en cada uno de los frascos que contenían medio caldo nutritivo en condiciones de asepsia bajo una campana de flujo laminar. Los frascos fueron incubados en un agitador orbital Thermo Scientific™MaxQ™40000® a 150 rpm a una temperatura de 28°C por un tiempo de 48 horas. Una vez obtenido el crecimiento de cada cepa se realizó diluciones seriadas desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁹. Seguidamente de las diluciones 10⁻⁵ hasta 10⁻⁷ se tomó 100 µL y se sembró por inmersión en cajas de Petri con agar nutriente y se incubó a 28 °C durante 48 horas, transcurrido el tiempo de incubación se realizó el conteo de células viables o unidades formadoras de colonias (UFC) que crecieron en la superficie del medio de cultivo de la caja Petri. El conteo se efectuó con un contador de colonias, en todos los casos se hicieron tres repeticiones por dilución y cepa bacteriana metodología modificada (Santillana, 2006).

5.6. Metodología para determinar la eficiencia de diferentes soportes orgánicos en la supervivencia de bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Para determinar el mejor soporte en la supervivencia de bacterias, se utilizó la metodología desarrollada por LCB (2022) en condiciones de laboratorio, así:

a) Preparación de la turba y humus más las bacterias de interés *Azotobacter* spp., *Azospirillum* spp. y *Pseudomona* spp.

- b) Preparación del biofertilizante perlas de alginato más rizobacterias
- c) Preparación de Caldo Nutriente más microorganismos.

Para la preparación de los soportes orgánicos previamente seleccionados (turba y humus) por sus características físicas y químicas de interés, se realizó una esterilización previa de cada soporte a 120 °C, 14 Psi durante 20 minutos. Luego en cabina de flujo laminar bajo condiciones estériles se adicionó en cada soporte (500 g) 30 µL del microorganismo de interés a una concentración de 1.2×10^9 UFC g⁻¹ para *Azotobacter* spp. _ AZM1R2, 7.7×10^7 UFC g⁻¹ para *Azospirillum* spp. _ ASM3R1 y 3.3×10^8 UFC g⁻¹ para *Pseudomonas* spp._ PM8R1, la mezcla se homogenizó perfectamente sin presencia de saturación de humedad, seguidamente se colocó alícuotas de peso 20 g en fundas ziploc de aluminio se selló y se incubó a 28 °C por 15 días, de cada formulación soporte más cepa bacteriana se empacaron 25 fundas/ microorganismo Posterior después de los 15 días de la incubación se llevó a refrigeración con temperatura de 4 ± 2 °C por 65 días, el testigo fue el medio de cultivo Caldo Nutriente con microorganismos (BMMB, 2022).

Mientras que para la preparación de las perlas de alginato fue la de Bashan, (1986) y Marconi et al., (2022) con algunas modificaciones, para el efecto en un frasco de 750 µL se disolvió el *Alginato* de sodio al 2% en 500 µL con agua destilada a 65 °C, luego se mezcló con el homogeneizador a 6 000 rpm durante 10 minutos y se esterilizó a 120 °C a 14 Psi durante 20 minutos. Cuando la solución estuvo a 27 °C se adicionó 30 µL de agua peptona la cual contenía el microorganismo de interés a una concentración de 1.2×10^9 UFC g⁻¹ para *Azotobacter* spp., 7.7×10^7 UFC g⁻¹ para *Azospirillum* spp. y 3.3×10^8 UFC g⁻¹ para *Pseudomonas* spp. Se homogenizó nuevamente la mezcla a 4000 rpm durante 5 minutos, para finalmente colocar la mezcla en una jeringa de 50 ml; se preparó una solución de CaCl al 3 % m/v y NaCl al 0,9 % m/v y seguidamente se colocó la mezcla de CaCl y NaCl en una placa de agitación a 80 rpm sin imán, al mismo tiempo se colocó gota a gota desde la jeringa (50 µL) en el vaso para obtener las gotas, se dejó la solución en agitación por un lapso de una hora. Transcurrido ese tiempo las perlas se enjuagaron tres veces con una solución salina (NaCl 0.85%) y se colocaron en un colador para quitar el exceso de humedad. Todo el proceso de la elaboración de las perlas se llevó a cabo en una campana de flujo laminar. Finalmente, las perlas se colocaron en bolsas ziploc estériles y se conservaron en refrigeración a 4 ± 2 °C por 80 días.

5.6.1. Evaluación de la supervivencia de las rizobacterias en interacción con los soportes orgánicos

Se evaluó la supervivencia de las bacterias en interacción con soportes orgánicos, por un periodo de 80 días. Para cuantificar la carga bacteriana se utilizó la técnica de dilución y

conteo en placas, para las evaluaciones en todos los casos se tomaron 5 fundas con 20 g/funda de inoculante cada uno de los tratamientos y se vertieron en un vaso de precipitación de 1000 μL previamente esterilizado, se agitó para uniformizar la muestra y posteriormente se pesó 1 g del microorganismo y se colocó en un tubo de ensayo que contenía 9 μL de agua peptona al 10% estéril (dilución 10^{-1}), el tubo de ensayo se agitó por un minuto utilizando el vórtex. En todos los casos, se tomaron 1000 μL de la suspensión y se adicionó en un tubo que contenía 9000 μL de agua peptona estéril (dilución 10^{-2}), el tubo se agitó y a partir de cada soporte inoculado se realizaron diluciones sucesivas de 10^{-1} hasta 10^{-7} . Se tomó una alícuota de 100 μL de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} se colocó en el centro de las cajas de Petri con agar nutritivo las placas fueron diseminadas he incubadas a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Se realizó cinco conteos cada 15 días, así a los 20, 35, 50, 65 y 80 días después de la inoculación (DDI) de la bacteria en el soporte.

A partir de los resultados del ensayo anterior, se seleccionó el prototipo más estable durante el almacenamiento de 65 días en refrigeración a ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$), se colocó en percha a temperatura ambiente ($20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) por un tiempo de 75 días para posteriormente como paso final realizar el recuento de células viables (UFC g^{-1}) a los 30 días y posterior a los 45 días de permanecer en percha con el fin de verificar el número de colonias bacterianas en los soportes (Gómez et al., 2021) modificado el tiempo en percha. De acuerdo a las normas de calidad internacionales un bioproducto debe contener valores de viabilidad bacteriana de 1.0×10^8 a 1.0×10^9 de UFC g^{-1} (Díaz, et al., 2021).

5.6.2. *Diseño experimental*

Para la evaluación de la eficiencia de los soportes orgánicos en la supervivencia de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, se utilizó un diseño completamente al azar DCA con tres bacterias *Azotobacter* spp., *Azospirillum* spp. y *Pseudomonas* spp.; cada una de estas fue expuesta a cuatro diferentes soportes (turba, humus, alginato y testigo (CN) y diferente concentración en cajas de Petri (100×20 mm). Cada tratamiento (soporte) contó con cinco repeticiones.

Tabla 5. Tratamientos y su codificación para evaluar la eficiencia de los soportes orgánicos en la supervivencia de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Bacterias	Soporte (tratamientos)	Codificación
<i>Azotobacter</i> spp	Turba	T1 AZM1R2 T
	Humus	T2 AZM1R2 H
	Alginato	T3 AZM1R2 A

	Testigo (CN)	T4 AZM1R2 MC
<i>Azospirillum</i> spp	Turba	T1 ASM3R1 T
	Humus	T2 ASM3R1 H
	Alginato	T3 ASM3R1 A
	Testigo (CN)	T4 ASM3R1 MC
<i>Pseudomonas</i> spp	Turba	T1 PM8R1 T
	Humus	T2 PM8R1 H
	Alginato	T3 PM8R1 A
	Testigo (CN)	T4 PM8R1 MC

La Expresión matemática del experimento es la siguiente:

(1)

$$T_{ij1...4} = B (3) \times S (3) + \text{Testigo} (1)$$

Dónde: $T_{ij1...4}$ = Tratamientos

B = bacterias AZM1R2, ASM3R1 y PM8R1

S = soporte: humus, turba y alginato

C = Testigo (Caldo nutriente + bacteria)

Especificaciones del diseño experimental.

La unidad experimental fue la caja de Petri, las cuales fueron inoculadas los 4 tratamientos y 5 repeticiones, cada tratamiento estuvo conformado por soporte e inoculante y en total fueron 60 cajas para todo el experimento **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

Tabla 6. Las unidades experimentales para la evaluación de la eficiencia de los soportes orgánicos en la supervivencia de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Unidad Experimental:	Cajas Petri
Número de tratamientos:	4
Número de repeticiones:	5
Número de cajas Petri por repetición	1
Número total de cajas Petri por tratamiento	5
Número de unidades experimentales del ensayo:	60

5.6.3. Determinación de la Viabilidad

Para determinar la cantidad de células de las bacterias, se tomó en cuenta el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro (μL) o por gramo (g) de la muestra, a partir del número de colonias obtenidas en las placas de Petri que contenían menos de 300

colonias. Para el cálculo respectivo se realizaron diluciones seriadas de 10⁻¹ hasta 10⁻⁶ (Arana et al., 2010).

Para el cálculo respectivo se utilizó la siguiente formula:

$$\frac{UFC}{ml} = \frac{\text{colonias enumeradas (media)}}{ml sembrados} \times \text{Factor de dilución} \quad (2)$$

5.6.4. Análisis estadístico

Para el análisis se ordenaron los datos en una tabla de Excel y posterior los datos fueron procesados a través del programa estadístico InfoStat versión 2008, primero se realizó una prueba de normalidad y homogeneidad para observar la distribución de los datos utilizando pruebas paramétricas y no paramétricas, se llevó a cabo un ANOVA de un factor para observar si los tratamientos presentaban diferencias significativas respecto al testigo caldo nutriente más los inoculo bacterianos y por último se hizo una comparación de medias prueba de Tukey (P -value < 0.05), de esta forma se logró determinar cuál fue el mejor tratamiento.

Para determinar la viabilidad de la bacteria *Azotobacter* spp. inoculado a una concentración inicial de 1.2x10⁹ UFC g⁻¹ en los soportes turba, humus, perlas alginato y caldo nutriente. Para los 50 DDI y 65 DDI se aplicó una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis ya que no se cumplió con el supuesto de distribución normal de los errores. Mientras que, para los 20 DDI, 35 DDI y 80 DDI se realizó una prueba paramétrica con un análisis de varianza ANOVA.

El comportamiento de la bacteria *Azospirillum* spp. inoculado en una concentración inicial 7.7x10⁷ UFC g⁻¹ en los soportes perlas de alginato, humus, turba y caldo nutriente. Para los 20 DDI, 50 DDI y 65 DDI se aplicó un modelo estadístico paramétrico ANOVA. Entre tanto, para los 35 DDI y 80 DDI se empleó el modelo estadístico no paramétrico de Kruskal Wallis ya que la media no cumplió con los supuestos de distribución normal de los errores.

Se evidencia que, a los 20 DDI, 35 DDI, 65 DDI y 80 DDI los valores medios no cumplieron con los supuestos de distribución normal, por lo tanto, fue necesario aplicar el modelo estadístico no paramétrico de Kruskal Wallis. Por otra parte, el análisis estadístico para el día 50 DDI se aplicando un ANOVA.

5.7. Metodología para seleccionar la mejor interacción bacteriana-soporte orgánico para la formulación de un prototipo de inoculante

A partir de los resultados obtenidos del primer objetivo se seleccionó los dos prototipos de inoculantes por bacteria con mayor estabilidad en el tiempo de 65 días almacenado en

refrigeración a una temperatura de 4 ± 2 °C. y posteriormente colocado en percha por un tiempo de 75 días a la temperatura 20 ± 2 °C (Díaz, et al., 2021).

5.7.1. Recuento de los microorganismos en los prototipos seleccionados

Empleando los dos tratamientos con valores de media más altos estadísticamente se evaluó su viabilidad considerando el tiempo inicial a los 80 DDI y el tiempo final después de transcurrir los 75 días de almacenamiento en percha. La carga bacteriana se determinó utilizando la técnica de dilución y conteo en placas, sobre cada bolsa de ziplop con el soporte elegido más el inóculo bacteriano correspondiente se agitó para uniformizar la muestra y posteriormente se pesó 1 g del microorganismo y se colocó en un tubo de ensayo que contenía 9 ml de agua peptona al 10% estéril (dilución 10-1), el tubo de ensayo se agitó por un minuto utilizando el vórtex. En todos los casos, se tomaron 100 µL de la suspensión y se adicionó en un tubo que contenía 9 µL de agua peptona estéril (dilución 10-2), el tubo se agitó y a partir de cada soporte inoculado se realizaron diluciones sucesivas de 10-1 hasta 10-7. A continuación, se tomó alícuotas de 100 µL de las diluciones 10-4, 10-5 y 10-6 y se realizó la siembra con cuatro repeticiones por inundación en cajas de Petri con agar nutritivo las placas fueron diseminadas he incubadas a 28 °C por 48 horas y posterior lectura de células viables.

6. Resultados

6.1. Viabilidad de la bacteria *Azotobacter* spp

En el anexo 1. Se muestran la tabla 7 con los valores estadísticos de la media como resultado de inoculación de la bacteria *Azotobacter* spp. a una concentración de 1.2×10^9 UFC g^{-1} en interacción con soportes perlas de alginato, humus, turba y el testigo caldo nutriente (CN) en un periodo de tiempo de 80 días.

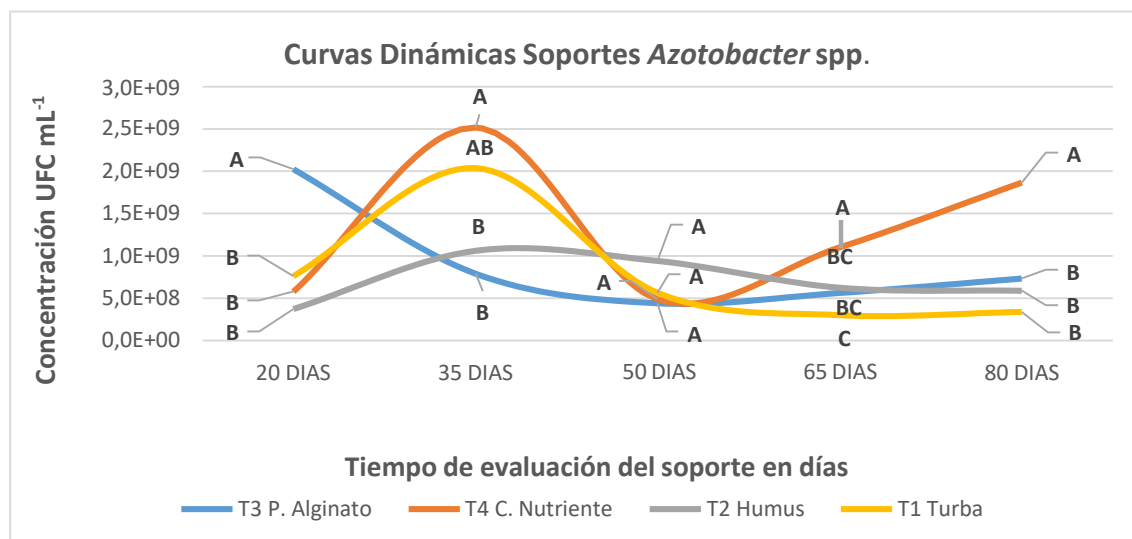


Figura 2. Evolución del comportamiento dinámico de la bacteria *Azotobacter* spp. inoculado en una concentración inicial de 1.2×10^9 UFC g^{-1} en los soportes perlas de alginato, humus, turba y caldo nutriente durante un tiempo de 80 días. Fuente: Elaboración propia

Los resultados del estudio muestran que para los 20 DDI el tratamiento T3 perlas de alginato con *Azotobacter* spp. presenta un valor resultante 2.0×10^9 UFC g^{-1} (A) mayormente significativo. Así mismo se evidencian los valores de los tratamientos T1 7.6×10^8 (B), T2 3.7×10^8 UFC g^{-1} (B) y T4 5.9×10^8 UFC g^{-1} (B). A los 35 DDI el valor de T4 caldo nutriente fue estadísticamente mayor con 2.5×10^9 UFC ml (A), seguido del tratamiento T1 turba con un valor 2.0×10^9 UFC g^{-1} (A) estadísticamente es mayor con relación a los tratamientos T2 (B) y T3 (B).

Como se visualiza en la figura 2 a los 50 DDI los datos de las interacciones entre los tres tratamientos y el testigo no se refleja diferencias significativas. Así mismo, los valores de supervivencia para el testigo T4 a base de CN más *Azotobacter* spp. a los 65 DDI se obtuvo el mayor valor con 1.1×10^9 UFC g^{-1} (A) seguido de T2 humus con 6.2×10^8 UFC g^{-1} (AB) es un valor de media estadísticamente más alto después del T4 con 1.1×10^9 UFC g^{-1} . Por el contrario, los valores T1 de 3.1×10^8 UFC g^{-1} (C) turba y T3 5.9×10^8 UFC g^{-1} (BC) perlas de alginato estadísticamente los valores son bajos. Finalmente, a los 80DDI el valor estadístico más alto corresponde al tratamiento T4 CN con un valor 1.9×10^9 UFC g^{-1} (A). por otra parte, los tratamientos T1, T2 y T3 sus valores son bajos estadísticamente frente al T4.

6.1.1. Viabilidad de la bacteria *Azospirillum* spp.

En la figura 3 se observa el comportamiento dinámico de la bacteria de *Azospirillum* spp. en interacción con el soporte perlas de alginato en una concentración inicial de siembra 7.7×10^7 UFC g^{-1} como resultado los valores de la media más altos se reflejan en el tratamiento T3 perlas de alginato desde la primera lectura a los 20 DDI manteniendo sus concentraciones hasta los 65 DDI por el contrario a los 80 DDI baja su valor de concentración estadísticamente. Por otro lado, con respecto al tratamiento T4 testigo (C. Nutriente) los mayores valores estadísticos se observaron desde los 35 DDI, 50 DDI, 65 DDI y 80 DDI con 7.3×10^8 , 8.4×10^8 , 7.0×10^8 y 6.4×10^8 UFC g^{-1} respectivamente.

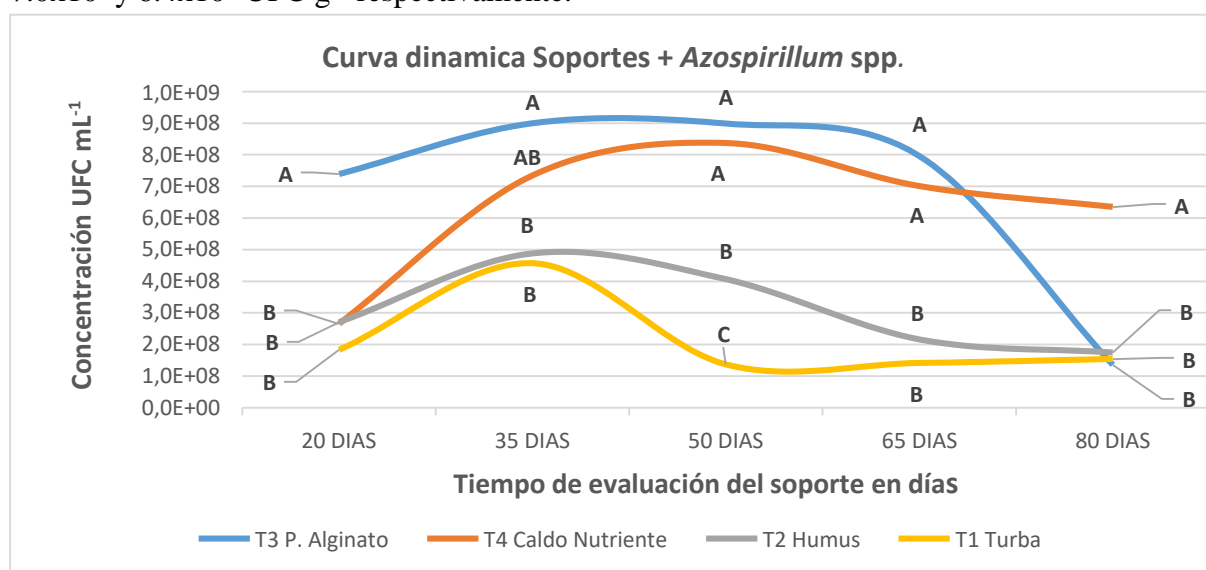


Figura 3. Evolución de los diferentes soportes en interacción con *Azospirillum* spp. con una concentración de siembra inicial de $7,7 \times 10^7$ UFC g^{-1} y su comportamiento dinámico en un periodo de tiempo de 80 días. Fuente: Elaboración propia

En el anexo 2. Se presenta la tabla 8 con información estadística de la media como resultado de inoculación de la bacteria *Azospirillum* spp. a una concentración inicial de 7.7×10^7 UFC g^{-1} en interacciones soportes perlas de alginato, humus, turba y caldo nutriente expresado en UFC g^{-1} durante los 80 días del experimento.

6.1.2. Viabilidad de la bacteria *Pseudomona* spp.

En la figura 4 se presentan los valores de la media más altos a través de la curva dinámica del tratamiento T3 perlas de alginato en interacción con *Pseudomona* spp. sembrado a una concentración inicial de 3.3×10^8 UFC g^{-1} , así a partir de los 20 DDI los valores se mantienen durante los 80 DDI del estudio. Por otra parte, los resultados de la supervivencia de la bacteria son altos para el soporte humus, en dicho caso los valores altos se reflejan a partir de la lectura del día 35 hasta finalizar el tiempo de evolución de la investigación.

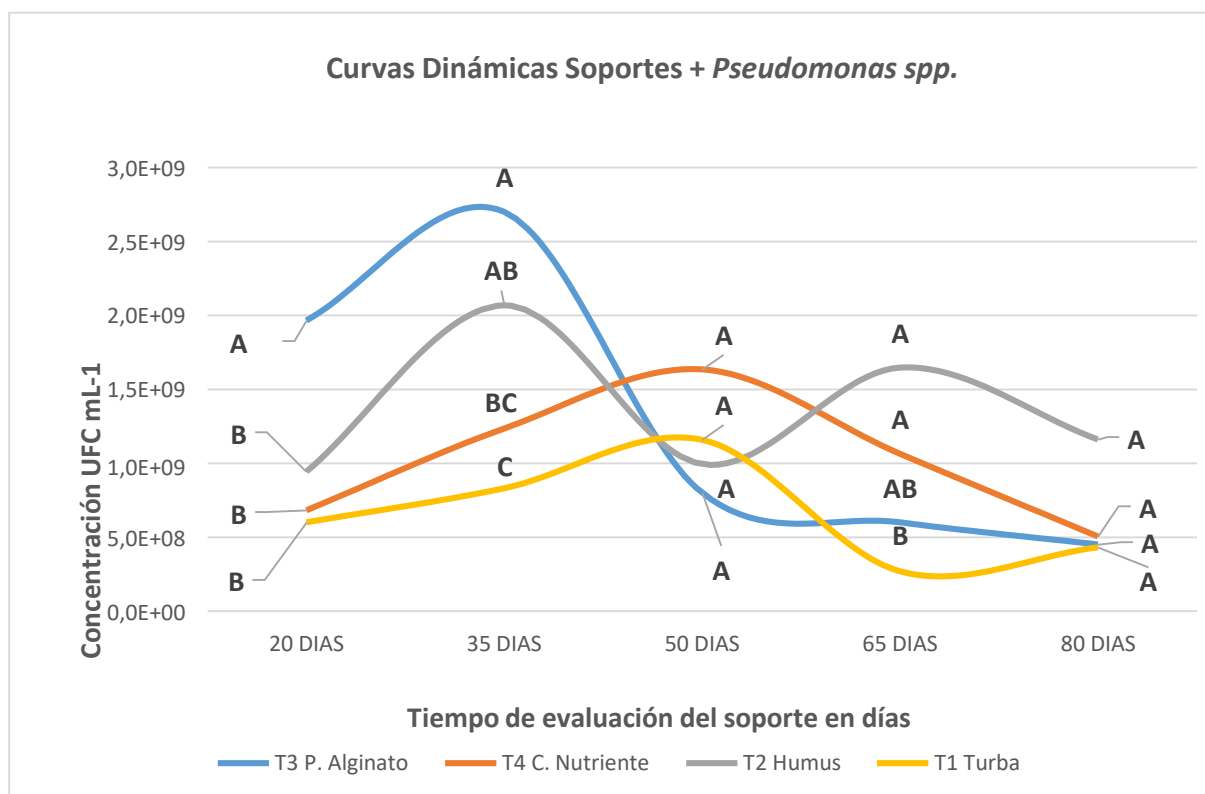


Figura 4. Comportamiento dinámico de la *Pseudomonas* spp. en concentración inicial de siembra 3.3×10^8 UFC g⁻¹ en interacción con los diferentes soportes a través del tiempo de evaluación. Fuente: Elaboración propia

En el anexo 3 se presenta la tabla 9 con información estadística de los valores medios como resultado de la interacción de la bacteria *Pseudomonas* spp. a una concentración de 3.3×10^8 UFC g⁻¹ con los soportes perlas de alginato, humus, turba y caldo nutriente expresado en UFC g⁻¹ en un periodo de 80 días del ensayo.

Como se observa en la tabla 9 el comportamiento del tratamiento T3 perlas de alginato en interacción con *Pseudomonas* spp. a los 20 DDI presenta el mayor valor de la media estadísticas comparado con los T1, T2 y T4.

Así mismo a los 35 DDI los tratamientos T3 perlas de alginato más *Pseudomonas* spp. con 2.7×10^9 UFC g⁻¹ seguido de T2 9.9×10^8 UFC g⁻¹ respectivamente muestran las medias con mayor valor estadístico frente a los tratamientos T4 y T1. No obstante los resultados obtenidos durante el 50 DDI se observa que no existe diferencia significativa.

A los 65 DDI los resultados son estadísticamente significativos tanto para el tratamiento T2 con 1.6×10^9 UFC g⁻¹ con un valor mayor seguido por el tratamiento T4 caldo nutriente en una concentración de 1.1×10^9 UFC g⁻¹. Además, el tratamiento T3 *Pseudomonas* spp. más perlas de alginato el valor de concentración bacteriana es mayormente significativo, sí comparamos con el valor del tratamiento T1 turba.

Ahora bien, a los 80 DDI los valores de la media no presentan diferencias significativas entre los tratamientos.

6.2. Selección de la mejor interacción bacteria-soporte orgánico para la formulación de un prototipo de inoculante

En el anexo 4 se muestra la tabla 10 con resultados de la viabilidad en percha de los prototipos seleccionados más estables de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal estudiada: *Azotobacter spp.*, *Azospirillum spp.* y *Pseudomona spp.*

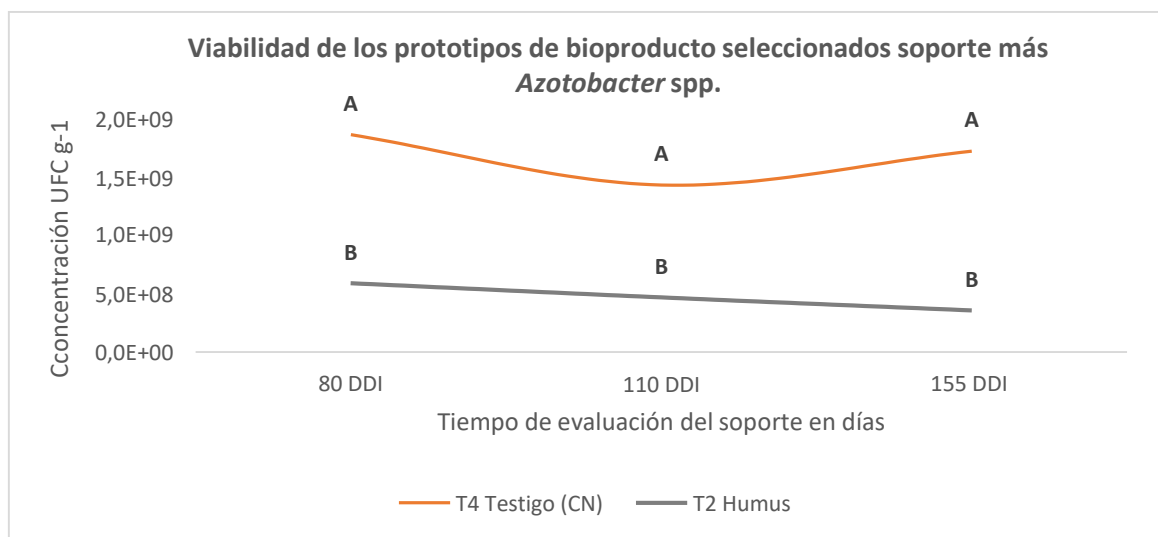


Figura 5. Comportamiento de la viabilidad en anaquel a través del tiempo a una temperatura ambiente de 20 ± 2 °C de los prototipos seleccionados para la formulación de un bioproducto a base de soportes humus y el testigo (CN) con la bacteria *Azotobacter spp.* Fuente: Elaboración propia

La prueba de la viabilidad en anaquel para los soportes seleccionados testigo T4 (CN) con una concentración de 1.9×10^9 UFC g⁻¹ a los 80 DDI, los mayores valores estadísticamente se mantienen hasta los 155 DDI con 1.7×10^9 UFC g⁻¹. Mientras tanto que para el caso del T2 humus a los 80 DDI el valor de la concentración fue 5.9×10^8 UFC g⁻¹ y posteriormente almacenado en percha hasta los 155 DDI y a una temperatura ambiente de 20 ± 2 °C el valor bajo a 3.5×10^8 UFC g⁻¹.

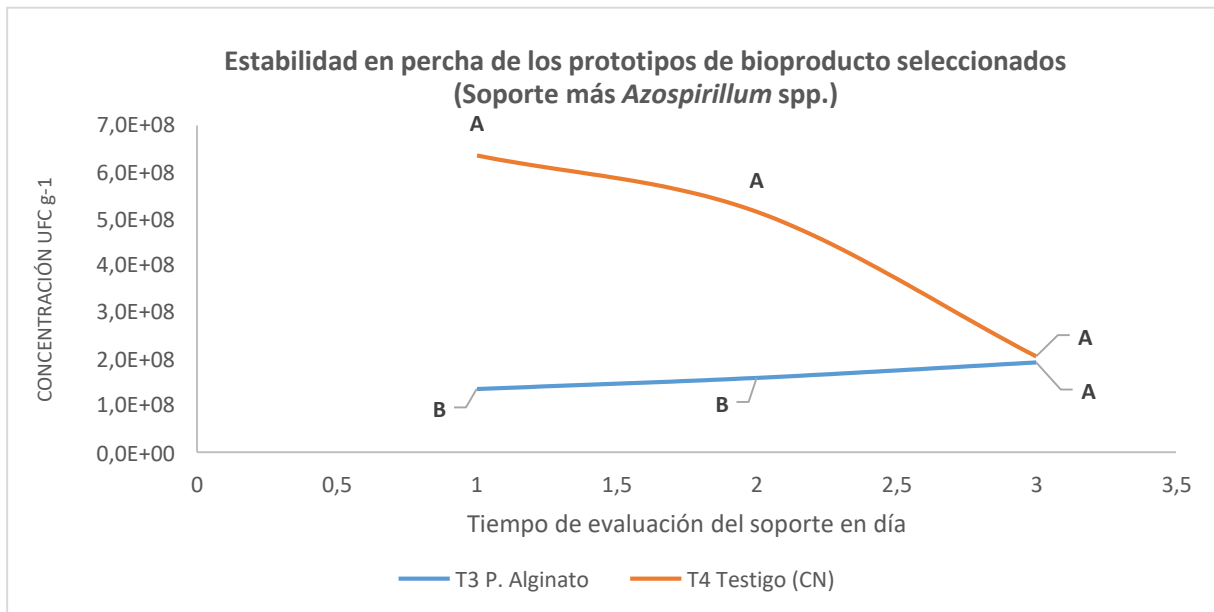


Figura 6. Resultados del ensayo de estabilidad en percha de los prototipos de formulación de la bacteria *Azospirillum* spp. en interacción con los soportes perlas de alginato y caldo nutriente testigo a través del tiempo a una

El resultado de la estabilidad del prototipo de bioproducto seleccionado a base de perlas de alginato más *Azospirillum* spp. a los 80 DDI el valor de supervivencia es 1.4×10^8 UFC g⁻¹, posteriormente después de ser colocado el prototipo en percha a temperatura ambiente 20 ± 2 °C se obtuvo a los 155 DDI un incremento aun mayor de viabilidad hasta llegar a 1.9×10^8 UFC g⁻¹. Por el contrario, el T4 humus más *Azospirillum* spp. a los 80 DDI tuvo una concentración bacteriana de 6.4×10^8 UFC g⁻¹, para luego a los 155 DDI el valor fue menor estadísticamente con 5.9×10^8 UFC g⁻¹.

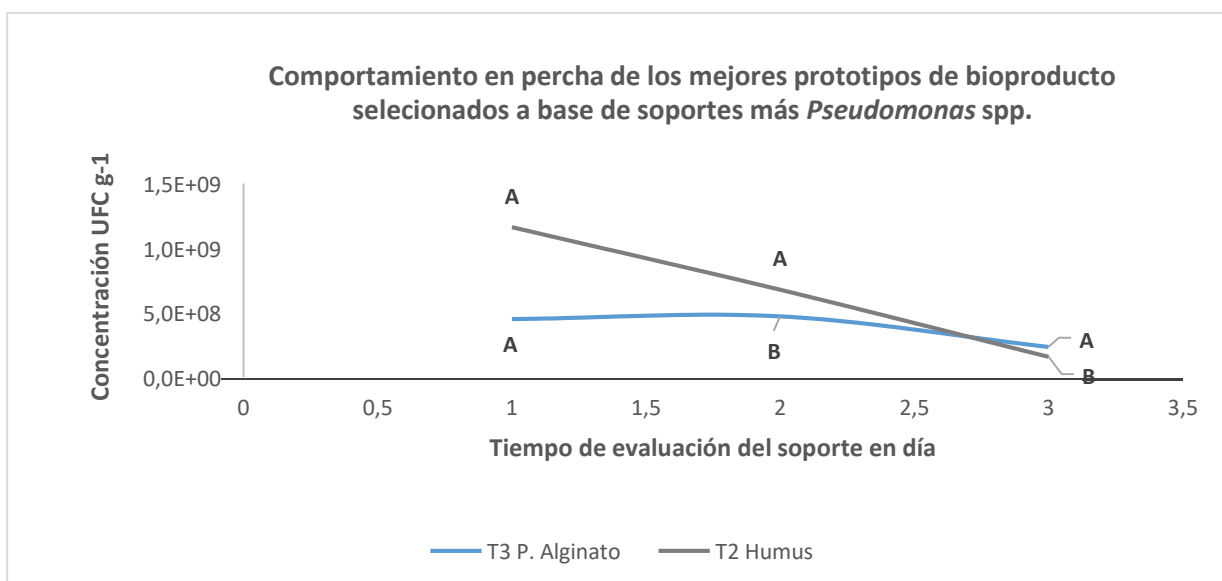


Figura 7. Comportamiento en percha de los mejores prototipos de bioproductos a base de soportes orgánicos y *Pseudomonas* spp. seleccionados almacenados en percha a una temperatura ambiente de 20 ± 2 °C durante 75 días. Fuente: Elaboración propia

Los prototipos biofertilizantes a base de *Pseudomonas* spp. se almacenaron en estantería a 20 ± 2 °C por un tiempo de 75 días logrando obtener resultados de viabilidad en el caso de perlas de alginato a los 80 DDI fue de 4.5×10^8 posteriormente transcurrido los 75 días en estantería presenta un menor valor estadísticamente llegando a 2.3×10^8 de viabilidad. De forma similar el prototipo T2 humus hasta los 110 DDI su valor de concentración fue mayor estadísticamente llegando a 6.8×10^8 y después de permanecer en percha hasta los 155 DDI su valor de concentración es menor estadísticamente con 1.6×10^8 .

7. Discusión

En este proyecto se logró evaluar los soportes orgánicos en interacción con bacterias promotoras del crecimiento vegetal para la formulación de un prototipo de inoculante, en el laboratorio del Centro de Biotecnología de la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Loja. El estudio muestra que el uso de soportes tiene efectos estadísticamente significativos con diferentes bacterias, se encontró que tanto la viabilidad celular como la actividad biológica de la cepa se mantienen a lo largo de la investigación.

Los resultados del T4 testigo (CN) a los 35 DDI el valor fue estadísticamente mayor con 2.5×10^9 UFC g^{-1} (A), hasta llegar a los 80 DDI con 1.9×10^9 UFC g^{-1} cabe destacar que el valor de concentración bacteriana se mantiene alto hasta el final de la investigación. Estudios similares realizados en Colombia por Camelo et al. (2017) donde evaluaron la viabilidad y la actividad biológica de la biomasa de *Azotobacter chroococcum* durante un tiempo de 105 días empleando medios de cultivo MBR enriquecido, al inicio la concentración fue $9,0 \times 10^9$ UFC g^{-1} manteniendo su valor hasta $5,0 \times 10^9$ UFC g^{-1} .

En cuanto T2 humus más *Azotobacter* spp. se observan los datos estadísticos a los 20 DDI y 35 DDI se mantienen por debajo del valor de inoculación. Sin embargo, para los días 50 DDI y 65 DDI el valor de la concentración estadísticamente es mayor. Probablemente se deba a un bajo contenido de materia orgánica del sustrato humus. Lo que coincide con la investigación realizada por Roychowdhury et al. (2017) determinaron que los valores de las poblaciones de *Azotobacter* no superan el 10^4 a 10^5 UFC g^{-1} por cuando la bacteria no se desarrolla en soportes con cantidades de materia orgánica bajo.

Los datos obtenidos para el caso del tratamiento T1 turba más *Azotobacter* spp al inicio 20 DDI se observa que el valor 7.6×10^8 UFC g^{-1} es estadísticamente menor. Los valores de las UFC g^{-1} a 35 DDI y 50 DDI los resultados son mayores. Por el contrario, los valores medios para los 65 DDI y 80 DDI vuelve a bajar la concentración la concentración de la bacteria *Azotobacter* spp. en interacción con el soporte.

Para, Díaz et al. (2021) el valor mínimo en recuento de células viables es de 5×10^7 UFC g^{-1} en interacción con turba. Los valores obtenidos son confiables si comparamos los datos obtenidos en nuestra investigación podemos manifestar que la turba es un buen portador de *Azotobacter* spp. De igual forma Núñez, (2009) manifiesta que la turba es un soporte que ayuda a mantener una alta viabilidad de los microorganismos por tener en su composición química carbono 59%, oxígeno 33% y nitrógeno 2% elementos necesarios para supervivencia bacteriana.

El efecto del tratamiento T3 perlas de alginato en interacción con *Azotobacter* spp., en el ensayo se refleja en los mayores valores estadísticos de la bacteria en los 20 DDI y 50 DDI, contrariamente la concentración a los 65 DDI y 80 DDI baja su carga bacteriana lo que coincide con el criterio de Conde et al. (2022) en la investigación realizado en la ciudad de Puebla México sobre el comportamiento de la bacteria *Azotobacter* inoculado en dos soportes tanto líquido como encapsulados en perlas de alginato obteniendo los mayores resultados de supervivencia desde los 7 DDI con una concentración de 2.1×10^6 UFC g^{-1} hasta los 28 DDI con resultados de concentración 1.1×10^6 UFC g^{-1} , observando una disminución de la concentración con el tiempo. Desde otra perspectiva, Alvarado et al. (2019) realizan en Cuba un estudio de viabilidad bacteriana obteniendo en perlas de alginato los mayores valores hasta los 50 días.

Los resultados del testigo T4 caldo nutriente (CN) y la bacteria *Azospirillum* spp. es mayor estadísticamente a la concentración que fue inoculado 7.7×10^7 UFC g^{-1} . A partir de los 35 DDI hasta los 80 DDI los valores de la media estadísticamente es mayor se encontró diferencias significativas con relación a T1 turba más *Azospirillum* spp. con un (p-valor 0.05). Cabe considerar que los datos observados con el soporte perlas de alginato los valores medios son mayores desde el 20 DDI hasta 65 DDI; posteriormente a los 80 DDI existe un descenso del valor de concentración. Mientras que los datos obtenidos por Quiroz et al. (2019) donde determinaron que *Azospirillum* spp., en perlas de alginato pierde su viabilidad después de transcurrido 180 días desde su inoculación. Para Gogoi et al. (2021) desde una perspectiva diferente manifiestan que las perlas de alginato protegen a la bacteria *Azospirillum brasilense* durante periodo prolongado de tiempo.

Para el tratamiento T2 humus más *Azospirillum* spp. los valores en UFC g^{-1} no existe diferencia significativa a lo largo de los 65 días del estudio. Pero los valores de concentración bacteriana están por encima del valor de concentración inicial antes de la siembra en el soporte humus. Sánchez, (2020) en el estudio realizado en Costa Rica coincide y manifiesta que *Azospirillum* más vermicompost es el soporte que presentó los valores más altos de supervivencia con una carga bacteriana de 1×10^8 UFC g^{-1} .

Con el propósito de analizar la viabilidad en la bacteria *Pseudomona* spp. en interacción con los soportes perlas de alginato, humus, turba y caldo nutriente. Conforme a los resultados del comportamiento el tratamiento T3 perlas de alginato en interacción con *Pseudomona* spp. presenta el mayor valor de las medias estadísticas a partir de los 20 DDI los valores se mantienen hasta los 80 DDI del estudio. Lo que coinciden con Quiroz et al. (2019) cuando evaluaron la supervivencia de las rizobacterias en el soporte perlas de alginato donde obtuvieron

la mayor supervivencia de las bacterias *Pseudomonas* spp. y *Serratia* la investigación fue realizado en México.

Seguidamente, los resultados del tratamiento T2 soporte humus más *Pseudomona* spp. los valores más alto estadísticamente en concentración de UFC g⁻¹ la encontramos a partir de los 35 DDI hasta los 80 DDI. En todos los casos los valores obtenidos estadísticamente son mayores a la concentración inicial de siembra 3.3x10⁸ UFC g⁻¹.

Con respecto a los valores del testigo T4 caldo nutriente con *Pseudomonas* spp. son estadísticamente menores desde los 20 DDI y 35 DDI, pero a partir de los 50 DDI hasta los 80 DDI los valores incrementan su concentración considerando como una característica a destacar. Lo que concuerda con los estudios realizados por Quiroz et al. (2019) quienes manifiestan que caldo nutriente a pesar de ser el soporte más utilizado para activar y propagar diferentes géneros de bacterias, sin embargo obtuvieron resultados poco satisfactorios para el crecimiento de las cepas bacterianas del género *Pseudomonas*.

Para el segundo objetivo se seleccionó los mejores prototipos de bioproductos.

Los resultados mostraron que los prototipos seleccionados T4 caldo nutriente (CN) más *Azotobacter* spp. la viabilidad se mantiene igual desde el momento de la preparación del prototipo a los 0 DDI hasta los 155 DDI como se observa en el anexo 4. Para Caycedo et al. (2021) el caldo nutriente es un medio de cultivo que posee un alto contenido de proteína y un bajo potencial rédox, lo que incide directamente en la recuperación y crecimiento bacteriano. Por el contrario, el T2 biofertilizante seleccionado a base de humus más *Azotobacter* spp., desde los 80 días el resultado de la concentración bacteriana pierde viabilidad hasta concluir el ensayo (155 DDI) con un valor de 3.5x10⁸. Lo que se contrapone con los resultados obtenidos por Ulina et al. (2019) donde la dinámica de la población microbiana obtenida con *Azotobacter chroococcum* en biovermicompost después de 6 semanas de incubación la población más alta fue 8.4x10¹¹ UFC mL⁻¹, y después de 1 año de almacenamiento, la población disminuyó a un rango de 5.0x10⁶-9.0x10⁶ UFC mL⁻¹.

Es importante destacar los resultados obtenidos en el prototipo T2 humus más *Azotobacter chroococcum* a los 155 días después de la inoculación se cumple la norma de calidad internacional sobre los valores de concentración bacteriana que debe contener un bioproducto 1.0x10⁸ al 1.0x10⁹ de UFC g⁻¹ (Díaz, et al., 2021).

Se determinó que el bioproducto T3 compuesto por las perlas de alginato más *Azospirillum* spp. desde los 80 DDI hasta los 155DDI mantuvo la concentración bacteriana con valores de 1.4x10⁸ UFC g⁻¹ y 1.9x10⁸ UFC g⁻¹ respectivamente, mostrando un incremento de 1 unidad logarítmica con relación a la concentración inicial de siembra ver anexo 4. Para

Gamalero et al. (2022) la viabilidad de las bacterianas encapsuladas en alginato de sodio por lo general no se conserva por completo debido a la baja resistencia mecánica de las perlas de alginato, por lo que sugieren agregar polímeros como alcohol polivinílico o sílica, de esta forma se garantiza un entorno protegido y una larga viabilidad de la cepa.

Cabe señalar que el prototipo T4 (CN) más *Azospirillum* spp. el valor de viabilidad durante el periodo de tiempo hasta los 80 días llegó a una concentración de 6.4×10^8 mayor con respecto al día cero. Mientras que para el día 155 sufre un descenso llegando a 5.9×10^8 . Lo que concuerda con Pallo y Velasteguí, (2014) en un estudio hecha por ellos en la Estación Experimental Santa Catalina, Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) en el evidenciaron una menor sobrevivencia con el transcurrir del tiempo de almacenamiento. Así, a los 90 días con 4.6×10^7 UFC mL⁻¹ hasta llegar a los 180 días con una concentración de 2.4×10^7 UFC mL⁻¹.

Entre tanto los datos para los prototipos seleccionados T3 perlas de alginato inoculado *Pseudomonas* spp. durante el tiempo transcurrido en percha reflejaron que el valor se mantuvo alto durante los 75 días que duró la prueba de viabilidad en percha. Para Quiroz et al. (2019) manifiestan que *Pseudomonas* spp. inoculado en perlas de alginato su carga bacteriana disminuyó hasta 10^3 después de seis meses en percha.

Finalmente, el soporte T2 humus más *Pseudomonas* spp. a los 110 días después de la inoculación se mantuvo su valor estadísticamente significativo. Mientras que la última lectura de la concentración realizada a los 155 DDI se observó una pérdida de viabilidad llegando a 1.6×10^8 UFC g⁻¹. En la India se describe normas de producción y comercialización con respecto a los distintos tipos de microorganismos que forman el biofertilizante el recuento mínimo de células viables es de 5×10^7 UFC g⁻¹ de soporte sólido (Malusá y Vassilev, 2014).

8. Conclusiones

El uso excesivo e indiscriminado de agroquímicos ha causado serias problemáticas medioambientales y sociales. Bajo la premisa de la sostenibilidad, se ha planteado la alternativa de usar biofertilizantes, los cuales son amigables con el medio ambiente. La propuesta para encapsular bacterias promotoras del crecimiento vegetal como: *Azotobacter* spp., *Azospirillum* spp. y *Pseudomonas* spp. en soportes turba, humus, perlas de alginato y caldo nutriente como testigo absoluto resultaron ser bastante eficientes.

- El testigo caldo nutriente (CN) estadísticamente es el mejor soporte tanto para mantener las poblaciones más altas y mayor viabilidad de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal *Azotobacter* spp. y *Azospirillum* spp.
- Del análisis estadístico de los resultados obtenidos en esta investigación se determinó que el soporte humus en interacción con *Azotobacter* spp. y *Pseudomonas* spp. muestran una mayor capacidad de sobrevivencia de las bacterias hasta los 65 DDI y 110 DDI respectivamente.
- En el presente estudio se determinó que el mayor potencial de encapsulado se logró con las perlas de alginato para las cepas *Azospirillum* spp. y *Pseudomonas* spp. con una viabilidad de hasta 155 DDI.
- Estos resultados obtenidos serán un aporte importante en la selección de un soporte adecuado y eficiente. Así promover la producción de los bioproductos necesarios para un manejo adecuado del suelo y la biodiversidad en los Agroecosistemas de la zona y la región sur del Ecuador.

9. Recomendaciones

- Por la poca o casi nula información a nivel de nuestro país sobre los soportes orgánicos en interacción con las rizobacterias es muy importante que se mantenga esta investigación hasta que se logre validar los resultados obtenidos y poder llegar a la fase de producción de los bioproductos.
- Con base en estos resultados y los prototipos de bioproducto seleccionados y almacenado en percha continuar evaluando en períodos de tiempo mayores con la finalidad de obtener resultados comparativos.
- Se recomienda considerar la disponibilidad de los soportes y el coste para proyectar la producción en volumen de los bioproductos.

10. Bibliografía

- Agroasa. (2019, mayo 15). Qué es el Humus de Lombriz. *Agroasa*. <http://agroasa.com/que-es-el-humus-de-lombriz/>
- Aguilar, A. (2020). *Producción masiva de Azospirillum spp., formulación, control de calidad y su uso en la agricultura: Revisión de Literatura*.
- Alvarado, K., Blanco, A., Martín, G., Ríos, Y., Capdesuñer, R., Matos-Thompson, K., Noval-Pons, B. M. de la, Alvarado-Ruffo, K., Blanco-Imbert, A., Martín-Alonso, G. M., Ríos-Rocafull, Y., Capdesuñer-Rojas, R., Matos-Thompson, K., y Noval-Pons, B. M. de la. (2019). Influencia de un sistema de abonado orgánico y Azotobacter chroococcum sobre posturas de cocotero. *Cultivos Tropicales*, 40(1). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0258-59362019000100006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Andrade, C., y Ayaviri, D. (2018). Demand and Consumption of Organic Products in the Riobamba Cantón, Ecuador. *La Serena*, 29(Demanda y Consumo de Productos Orgánicos en el Cantón Riobamba, Ecuador). <https://doi.org/10.52080/rvgluz.27.98.8>
- Arana, I., Orruño, M., y Barcina, I. (2010). Como abordar y resolver aspectos prácticos de Microbiología. En *Accelerating the world's research*.
- Ávila, M., Urgiles, N., Loján, P., y Araujo, S. (2022). Microorganismos benéficos en suelos de ecosistemas naturales y agroecosistemas de Ecuador. *Suelos de Ecuador: Clasificación, Uso y Manejo*, May, 387-407.
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., y Smith, D. L. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria: Context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 871(October), 1-17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>

- Bashan, Y. (1986). Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(5), 1089-1098.
<https://doi.org/10.1128/aem.51.5.1089-1098.1986>
- Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., y Hernandez, J.-P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil*, 378(1-2), 1-33.
<https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>
- Bhatt, M., Labanya, R., y Joshi, H. C. (2019). Influence of Long-term Chemical fertilizers and Organic Manures on Soil Fertility—A Review. *Universal Journal of Agricultural Research*, 7(5), 177-188. <https://doi.org/10.13189/ujar.2019.070502>
- BMMB. (2022). *Protocolo elaborado para el Proyecto Bioproducto mixto con microorganismos benéficos para su aplicación en cultivos hortícolas, Laboratorio de Biotecnología, UNL.*
- Camelo, M., Moreno, A., Romero, F., y Bonilla, R. (2017). Desarrollo de un sistema de fermentación líquida y de enquistamiento para una bacteria fijadora de nitrógeno con potencial como biofertilizante. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(3), 289-296.
<https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.06.005>
- Caycedo, L., Corrales, L., y Trujillo, D. (2021). Las bacterias, su nutrición y crecimiento: Una mirada desde la química. *Nova*, 19(36), 49-94.
<https://doi.org/10.22490/24629448.5293>
- Centro de información territorial. (2022). *Base de datos del Centro de información territorial CIT (Facultad Agropecuaria y de los Recursos Naturales Renobables, UNL) [Map].*
- Compant, S., Samad, A., Faist, H., y Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research*, 19(April), 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>

- Conde, V., Ortega, L., Loera, O., Pérez, B., y Martínez, C. (2022). Encapsulation of *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837 in Alginate-Na Beads as a Tomato Seedling Inoculant. *Facultad de Biotecnología, Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, México, 13 Poniente No. 1927 Col. Barrio de Santiago, C.P.72410 Puebla, Pue, Mexico*, 112-122.
- Díaz, A., Gómez, M., Quiroga, G., Grijalba, E., Ramírez, M., Camelo, M., y Bonilla, R. (2021). Desarrollo tecnológico de biofertilizantes en Colombia: Experiencia en agrosavia. *Bioproductos y Bioprocesos Agropecuarios. Corporación Colombiana de Investigación, Sistemas Agropecuarios (agrosavia). Centro de Investigación Tibaitatá. Cundinamarca, Colombia.*, 348. <https://doi.org/10.21930/agrosavia.analisis.7405019>
- Díaz, A., Martha, G., Quiroga, G., Grijalba, E., Camelo, M., y Bonilla, R. (2021). *Producción de biofertilizantes* (pp. 158-175). <https://editorial.agrosavia.co/index.php/publicaciones/catalog/book/230>
- Edifarm. (2022, mayo 25). *Edifarm Ecuador | Revista Vademécum Agrícola*. <https://www.edifarm.com.ec/revista-vademecum-agricola/>
- Escobar1 C. H. Y. C. C., Mendoza G; (2011). Caracterización de cepas nativas de *Azotobacterspp.* Y su efecto en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate” en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque.*2Departamento de Agronomía y Zootecnia, *Universidad Nacional de Trujillo.*, 39-49.
- FAO, O. de la N. U. para la A. y la A. (2018). *La contaminación de los suelos está contaminando nuestro futuro*. <https://www.fao.org/fao-stories/article/es/c/1126977/#:~:text=Los contaminantes en el suelo,largo plazo%2C como el cáncer.>

- Gamalero, E., Bona, E., y Glick. (2022). Current Techniques to Study Beneficial Plant-Microbe Interactions. *Microorganisms* 2022, 10(7), 138.
10.3390/microorganisms10071380
- García, R., Zavala, L., Flores, E., Gonzáles, A., Díaz, C., Ramírez, J., y Gómez, B. (2021). *Uso de microorganismos benéficos para la conservación del suelo de áreas naturales protegidas*. 10, 1-7.
- Gogoi, R., Baruah, S., y Saikia, J. (2021). Azospirillum: A Salient Source for Sustainable Agriculture. En *Biofertilizers* (pp. 309-334). John Wiley & Sons, Ltd.
<https://doi.org/10.1002/9781119724995.ch10>
- Goljanian, S., Amiri, S., Donya, N., y Motesharrei, Z. (2016). The comparison of five low cost liquid formulations to preserve two phosphate solubilizing bacteria from the genera *Pseudomonas* and *Pantoea*. *Iranian Journal of Microbiology*, 8(6), 377-382.
- Gómez, M., Díaz, A., Quiroga, G., Grijalba, E., Ramírez, M., Rusinque, M., y Bonilla, R. (2021). Desarrollo tecnológico de biofertilizantes en Colombia: Experiencia en agrosavia, Selección de prototipos, Estudio de vida útil. I. *Bioproductos y Bioprocesos Agropecuarios. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria agrosavia. Sede Central. Cundinamarca. Colombia.*, 347-353.
- González, L., Moreno, M., Hernandez, J., Prabu, S., y Mendoza, J. (2018). Métodos de aplicación de biofertilizantes bacterianos. *Agrociencia*, 176-197.
- Hernández, J., Bautista, H., Merecias, V., Vázquez, F., y Gómez, L. (2022). *Uso de mejoradores biológicos en cultivos de razas nativas de maíz en la mixteca oaxaqueña. September.*
https://www.researchgate.net/publication/363888110_USO_DE_MEJORADORES_BIOLOGICOS_EN_CULTIVOS_DE_RAZAS_NATIVAS_DE_MAIZ_EN_LA_MIXTECA_OAXAQUENA

- INEC. (2022). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua*.
https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2021/Principales%20resultados-ESPAC_2021.pdf
- Itelima, J., Bang, W., Onyimba, I., Sila, M., y Egbere, O. (2018). *Los biofertilizantes como actor clave en la mejora de la fertilidad del suelo y la productividad de los cultivos: Una revisión*. 6(3), 25-37.
- Jadach, B., Świetlik, W., y Froelich, A. (2022). Sodium Alginate as a Pharmaceutical Excipient: Novel Applications of a Well-known Polymer. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 111(5), 1250-1261. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.12.024>
- Jason, L., y Mathesius, U. (2018). Acropetal auxin transport inhibition is involved in indeterminate but not determinate nodule formation. *Frontiers in Plant Science*, 9(February), 1-13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00169>
- Lapiceirell, J. do N., Ferreira, D., Cássia, R., Ícaro, A., y Matoso1, A. de O. (2021). *Vista do O uso de Biofertilizantes na Agricultura Orgânica*. 17(2), 11.
- LCB. (2022). *Metodología para determinar la eficiencia de diferentes soportes orgánicos en la supervivencia de bacterias promotoras del crecimiento vegetal*.
- Lyu, D., Backer, R., y Smith, D. L. (2022). Three plant growth-promoting rhizobacteria alter morphological development, physiology, and flower yield of *Cannabis sativa* L. *Industrial Crops and Products*, 178(October 2021), 114583.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114583>
- MAG, M. de A. y G. – C. G. de P. y G. E. (2020). *Resumen Ejecutivo de los Diagnósticos Territoriales del Sector Agrario*.

- Malusá, E., y Vassilev, N. (2014). A contribution to set a legal framework for biofertilisers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(15), 6599-6607.
<https://doi.org/10.1007/s00253-014-5828-y>
- Marconi, P., Zawoznik, M., Groppa, M., y De Cobo, L. (2022). Protocolos de microalgas de la Red Renuwal-I Book. En M. Gouveia, Luisa; Navarro, Llorens; Juana (Ed.), *Red Renuwal-I* (Vol. 1, Número Inmovilización de microalgas en perlas de alginato para su uso en procesos de biorremediación, pp. 12-17). Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo.
- Merck. (s. f.). *Sodium alginate 9005-38-3*. Recuperado 23 de febrero de 2023, de <http://www.sigmaaldrich.com/>
- Núñez, A. (2009). Turba y zeolinita como soporte de inoculantes microbianos con acción fertilizante. *Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar*, XLIII (3), 22-27.
- Ore B., Y., Pichilingue L., E. R., Valderrama Negrón, A. C., Ore B., Y., Pichilingue L., E. R., y Valderrama Negrón, A. C. (2020). Extracción y caracterización del alginato de sodio de la macroalga *Macrocystis pyrifera*. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 86(3), 276-287. <https://doi.org/10.37761/rsqp.v86i3.300>
- Orozco-Mosqueda, M. del C., Flores, A., Rojas-Sánchez, B., Urtis-Flores, C. A., Morales-Cedeño, L. R., Valencia-Marin, M. F., Chávez-Avila, S., Rojas-Solis, D., y Santoyo, G. (2021). Plant growth-promoting bacteria as bioinoculants: Attributes and challenges for sustainable crop improvement. *Agronomy*, 11(6), 1-101.
<https://doi.org/10.3390/agronomy11061167>
- Oteino, N., Lally, R., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K., y Dowling, D. (2015). Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic

Pseudomonas isolates. *Frontiers in Microbiology*, 6(JUL), 1-9.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00745>

Pallo y Velasteguí. (2014). EVALUACIÓN DE SOPORTES SÓLIDOS Y LÍQUIDOS, PARA LA PRODUCCIÓN DE UN BIOFERTILIZANTE A BASE DE *Azospirillum* spp. APLICABLE AL CULTIVO DE MAÍZ (*Zea mays*, L.). *Departamento de Maíz, Estación Experimental Santa Catalina, Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Panamericana Sur Km 1 Quito - Ecuador, Carrera de Ingeniería Bioquímica, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos Universidad Técnica de Ambato, Campus Huachi: Av. Los Chasquis y Río Payamino Ambato – Ecuador, E-mail: rvelasteguis@yahoo.com, Alimentos, Ciencia e Ingeniería*, 32-39.

Posada, L., Moreno, A., Santos, M., y Estrda, G. (2021). *Mecanismos de promoción de crecimiento de las PGPB* (pp. 78-105). AGROSAVIA.

Quiroz, V. F., Almaraz-Suarez, J. J., Sánchez Viveros, G., Argumedo Delira, R., y González Mancilla, A. (2019). Biofertilizantes de rizobacterias en el crecimiento de plántulas de chile Poblano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(8), 1733-1745.

<https://doi.org/10.29312/remexca.v10i8.1548>

Quiroz-Sarmiento, V. F., Almaraz-Suarez, J. J., Sánchez-Viveros, G., Argumedo-Delira, R., y González-Mancilla, A. (2019). Biofertilizantes de rizobacterias en el crecimiento de plántulas de chile Poblano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(8), 1733-1745. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i8.1548>

Reganold, J., y Wachter, J. (2016). *La agricultura ecológica en el siglo XXI*.

Rojas, B., Guzmán, P., Morales, L., Orozco, M. D. C., Saucedo, B., Sánchez, J., Morales, Ayomide, E., Olulbukola, O., y Bernard, G. (2022). *Bioencapsulation of Microbial Inoculants: Mechanisms , Formulation Types and Application Techniques*

- Bioencapsulation of Microbial Inoculants: Mechanisms , Formulation Types and Application Techniques. September, 198-220.*
- Romero, B., y Getzabeth, G. (2021). *Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal por rizobios simbióticos y asimbióticos.* 140-157.
- Roychowdhury, D., Mondal, S., y Banerjee, S. (2017). The Effect of Biofertilizers and the Effect of Vermicompost on the Cultivation and Productivity of Maize—A Review. *Advances in Crop Science and Technology, 05(1).* <https://doi.org/10.4172/2329-8863.1000261>
- Sánchez, E. (2020). Evaluación de acarreadores sólidos para la producción de un inoculante a base de *Azospirillum brasilense* y su efecto sobre la germinación y el crecimiento de arroz bajo condiciones de laboratorio e invernadero. *UNIVERSIDAD DE COSTA RICA FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS ESCUELA DE AGRONOMÍA*, 1-81.
- Sandini, I., Pacentchuk, F., Hungria, M., Nogueira, M., Da cruz, S., Nakatani, A., y Ricardo, A. (2019). *Seed Inoculation with Pseudomonas fluorescens Promotes Growth, Yield and Reduces Nitrogen Application in Maize.* INTERNATIONAL JOURNAL OF AGRICULTURE & BIOLOGY.
- Sangoquiza, C., Zambrano, J., Nieto, M., Quimbiamba, V., y Asakivay, C. (2021). *Efecto de la aplicación de bacterias promotores del crecimiento vegetal Azospirillum sp y Pseudomonas fluorescens sobre el cultivo de maíz de altura 2**. 13. <https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5800>
- Santillana, N. (2006). Producción de biofertilizantes utilizando *Pseudomonas sp.* *Ecología Aplicada*, 5(1-2), 87-91.

- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., y Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, 92-99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>
- Sarandón, S. (2008). ¿ Es sustentable la agricultura actual ? *Jornadas de Investigación del Centro de Investigaciones Geográficas y del Departamento de Geografía*, 6 y 7 de noviembre de 2008,.
- Siyar, S., Inayat, N., y Hussain, F. (2019). 2019 | Volume 4 | Issue 1 | 1-5 Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Plants ' Improvement: A Mini-Review.
- Sumbul, A., Ansari, R. A., Rizvi, R., y Mahmood, I. (2020). *Azotobacter: A potential bio-fertilizer for soil and plant health management | Lector mejorado de Elsevier*. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.004>
- Ulina, W. A. S. N., Sahar, A., Rauf, A., Sembiring, M., Munir, E., y Sabrina, T. (2019). Microbe population in biofertilizer with vermicompost as a carrier during the process and storage. *International Seminar and Congress of Indonesian Soil Science Society*. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/393/1/012006>
- Vasilev, N., Vassileva, M., Garcia, L., Kowalska, J., Tylkowski, B., y Malusa, E. (2020). Formulation of Microbial Inoculants by Encapsulation in Natural Polysaccharides: Focus on Beneficial Properties of Carrier Additives and Derivatives. *Frontiers in Plant Science*, 11(March), 1-9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00270>
- Vejan, Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., y Nasrulhaq Boyce, A. (2016). Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability-A review. *Molecules*, 21(5), 1-17. <https://doi.org/10.3390/molecules21050573>
- Xing, L., Sun, J., Tan, H., Yuan, G., Li, J., Jia, Y., Xiong, D., Chen, G., Lai, J., Ling, Z., Chen, Y., y Niu, X. (2019). Covalently polysaccharide-based alginate/chitosan hydrogel embedded alginate microspheres for BSA encapsulation and soft tissue

engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 127, 340-348.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.065>

11. Anexos

Anexo 1. Valores estadísticos de la media como resultado de inoculación de la bacteria *Azotobacter spp.* a una concentración de 1.2×10^9 UFC/g⁻¹ en interacción con soportes perlas de alginato, humus, turba y caldo nutriente en el tiempo de 80 días.

TRATAMIENTO		VIABILIDAD <i>Azotobacter spp</i> UFC g ⁻¹				
		20 DDI	35 DDI	50 DDI	65 DDI	80 DDI
			2.0x10 ⁹			3.4x10 ⁸
T1	Turba	7.6x10 ⁸ (B)	(AB)	5.6x10 ⁸ (A)	3.0x10 ⁸ (C)	(B)
T2	Humus	3.7x10 ⁸ (B)	1.1x10 ⁹ (B)	9.4x10 ⁸ (A)	6.2x10 ⁸	5.9x10 ⁸
T3	P. Alginato	2.0x10 ⁹ (A)	7.9x10 ⁸ (B)	4.4x10 ⁸ (A)	5.6x10 ⁸	7.3x10 ⁸
T4	C. Nutriente	5.9x10 ⁸ (B)	2.5x10 ⁹ (A)	4.9x10 ⁸ (A)	1.1x10 ⁹ (A)	1.9x10 ⁹

* letras iguales en sentido vertical no expresan diferencia estadística significativa mediante la prueba de Tukey (p -valor < 0,05)

** DDI: Días después de la inoculación de la bacteria en los soportes

Anexo 2. Información estadística de la media como resultado de inoculación de la bacteria *Azospirillum spp* a una concentración inicial de 7.7×10^8 UFC/g⁻¹ en interacción con soportes perlas de alginato, humus, turba y caldo nutriente expresado en UFC/g⁻¹ durante los 80 días del experimento.

TRATAMIENTO		VIABILIDAD <i>Azospirillum spp</i> UFC g ⁻¹				
		20 DDI	35 DDI	50 DDI	65 DDI	80 DDI
T5	Turba	1.8x10 ⁸ (B)	4.6x10 ⁸ (B)	1.4x10 ⁸ (C)	1.4x10 ⁸ (B)	1.5x10 ⁸ (B)
T6	Humus	2.7x10 ⁸ (B)	4.9x10 ⁸ (B)	4.1x10 ⁸ (B)	2.2x10 ⁸ (B)	1.8x10 ⁸ (B)
T7	P. Alginato	7.4x10 ⁸ (A)	9.0x10 ⁸ (A)	9.0x10 ⁸ (A)	8.0x10 ⁸ (A)	1.4x10 ⁸ (B)
T8	C. Nutriente	2.7x10 ⁸ (B)	7.3x10 ⁸ (AB)	8.4x10 ⁸ (A)	7.0x10 ⁸ (A)	6.4x10 ⁸ (A)

* letras distintas en sentido vertical expresan diferencia estadística significativa según la prueba de Tukey (p -valor < 0,05)

** DDI: Días después de la inoculación de la bacteria en los soportes

Anexo 3. Resultado de los valores medios de la interacción bacteria *Pseudomona spp* a una concentración de 3.3×10^8 UFC/g⁻¹ con los soportes perlas de alginato, humus, turba y caldo nutriente expresado en UFC/g⁻¹ en un periodo de 80 días del ensayo.

TRATAMIENTO		VIABILIDAD <i>Pseudomona spp</i> UFC g ⁻¹				
		20 DDI	35 DDI	50 DD I	65 DDI	80 DDI

T9 Turba	6.0x10 ⁸ (B)	8.3x10 ⁸ (C)	1,2x10 ⁹ (A)	2,7x10 ⁸ (B)	4.3x10 ⁸ (A)
T10 Humus	9.4x10 ⁸ (B)	2.1x10 ⁹ (AB)	9,9x10 ⁸ (A)	1,6x10 ⁹ (A)	1.2x10 ⁹ (A)
T11 P. Alginato	2.0x10 ⁹ (A)	2.7x10 ⁹ (A)	8,0x10 ⁸ (A)	6,0x10 ⁸ (AB)	4.5x10 ⁸ (A)
T12 C.	6.8x10 ⁸ (B)	1.2x10 ⁹ (BC)	1,6x10 ⁹ (A)	1,1x10 ⁹ (A)	5.1x10 ⁸ (A)
Nutriente					

* letras iguales en sentido vertical no expresan diferencia estadística significativa mediante la prueba de Tukey (p -valor < 0,005)

** DDI: Días después de la inoculación de la bacteria en los soportes

Anexo 4. Resultados de la viabilidad en percha de los prototipos seleccionados para la formulación de un bioproducto.

TRAT.	PROTOTIPO	Concentración UFC g-1		
		DDI 80	DDI 110	DDI 155
T4	Testigo (CN) + <i>Azotobacter</i> spp.	1.9x10 ⁹ A	1.4x10 ⁹ A	1.1x10 ⁹ A
T2	Humus + <i>Azotobacter</i> spp.	5.9x10 ⁸ B	4.7x10 ⁸ B	3.5x10 ⁸ B
T3	P. Alginato + <i>Azospirillum</i> spp.	1.4x10 ⁸ B	1.6x10 ⁸ B	1.9x10 ⁸ A
T4	Testigo (CN) + <i>Azospirillum</i> spp.	6.4x10 ⁸ A	5.2x10 ⁸ A	2.1x10 ⁸ A
T3	P. Alginato + <i>Pesudomonas</i> spp.	4.5x10 ⁸ A	4.7x10 ⁸ B	2.3x10 ⁸ A
T2	Humus + + <i>Pesudomonas</i> spp.	1.2x10 ⁹ A	6.8x10 ⁸ A	1.6x10 ⁸ B

* letras iguales en sentido vertical no expresan diferencia estadística significativa mediante la prueba de Tukey (p -valor < 0,005)

** DDI: Días después de la inoculación de la bacteria en los soportes



Imagen 1. Preparación del soporte turba y humus para la inoculación de las bacterias *Azotobacter* spp, *Azospirillum* spp y *Pseudomona* spp.



Imagen 2. Conteo de células a las 48 horas después de haber sido sembrado en las cajas de Petri.



Imagen 3. Células del testigo *Pseudomonas* ssp.



Imagen 4. Colonias de células del testigo del soporte turba.

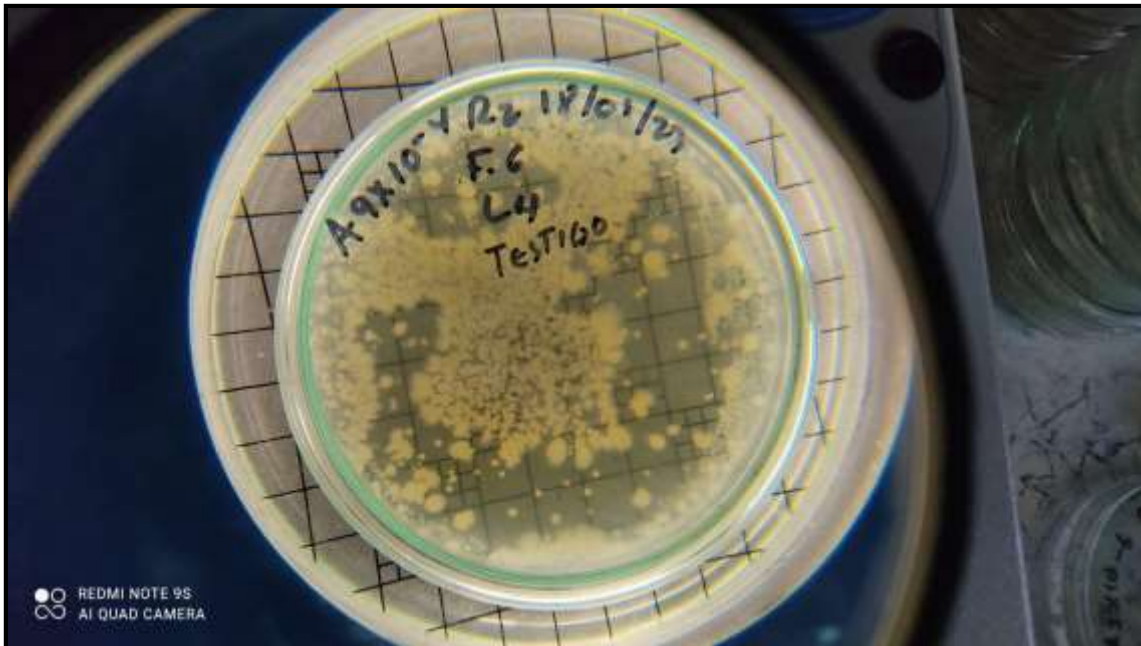


Imagen 5. Caja de Petri conteniendo colonias de *Pseudomonas* spp en interacción con perlas de alginato.

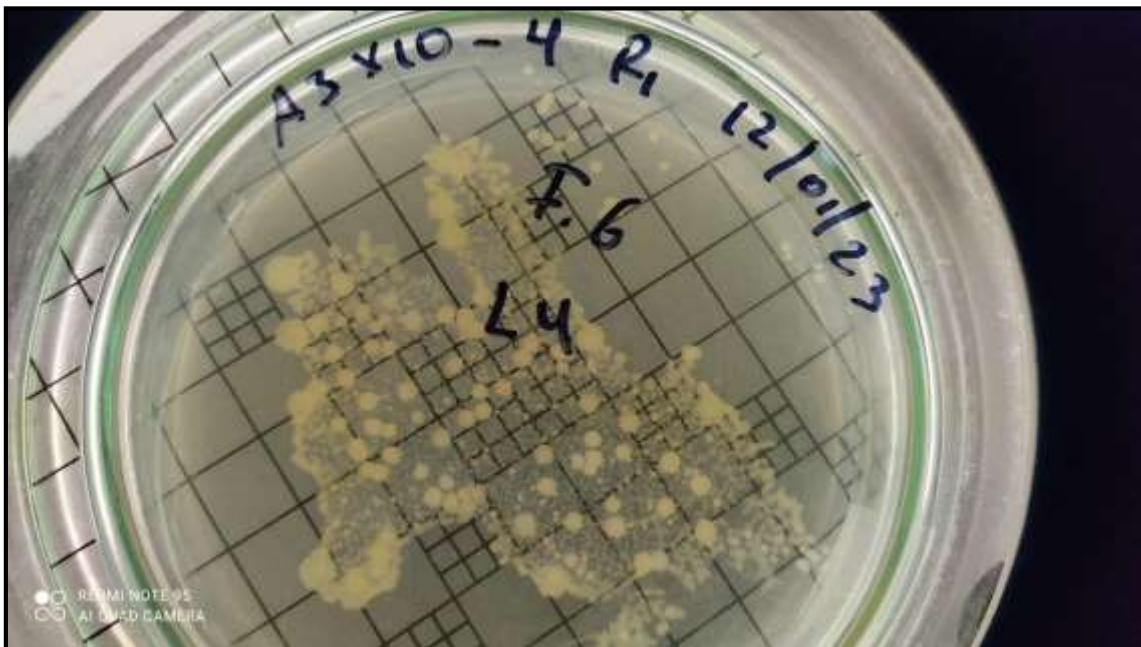


Imagen 6. Colonias observadas de *Azospirillum* spp en interacción con perlas de alginato leído a los 65 DDI.

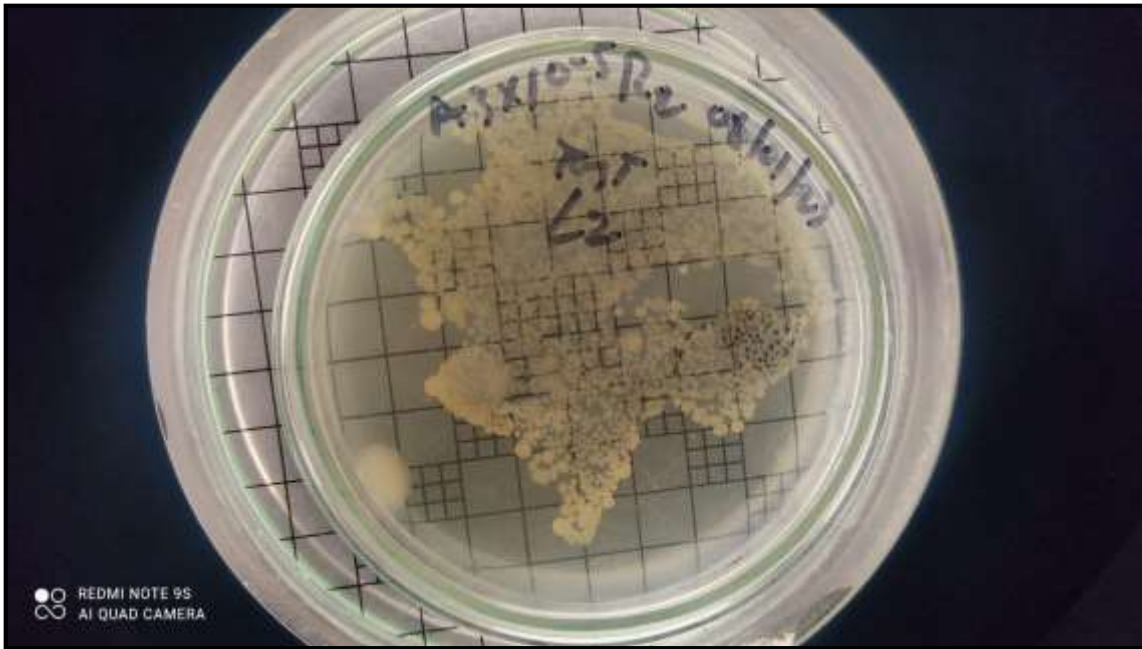


Imagen 7. Caja de Petri conteniendo colonias de *Azospirillum* spp en interacción con perlas de alginato observado a los 35 DDI.

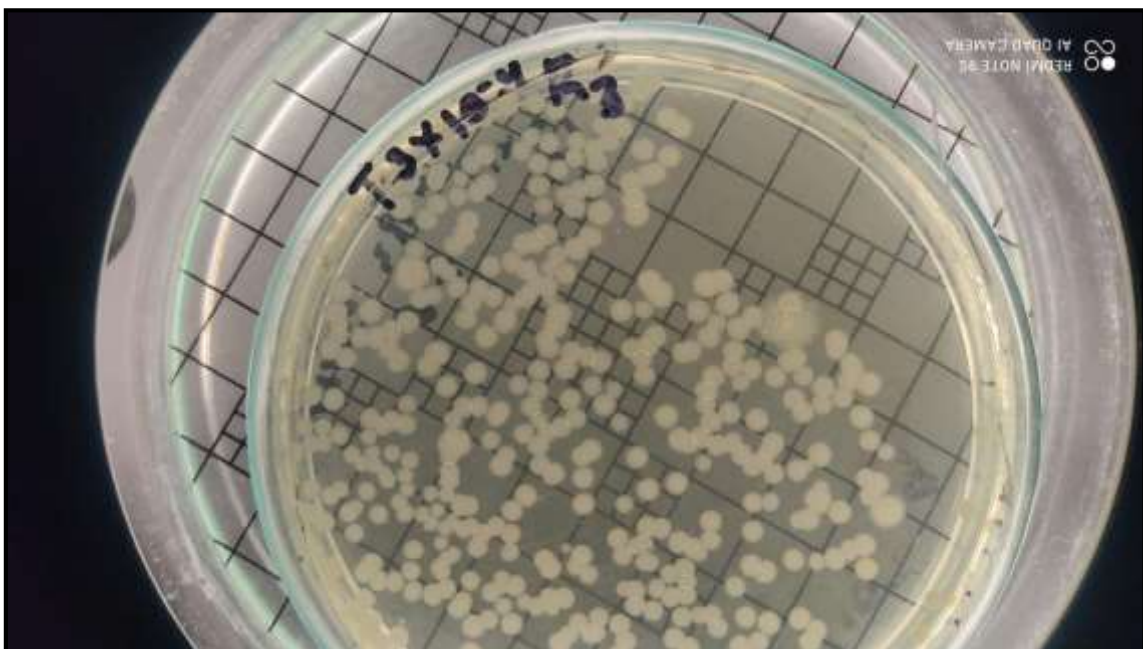


Imagen 8. Colonias observadas de *Azospirillum* spp en interacción con perlas de alginato leído a los 80 DDI DDI.

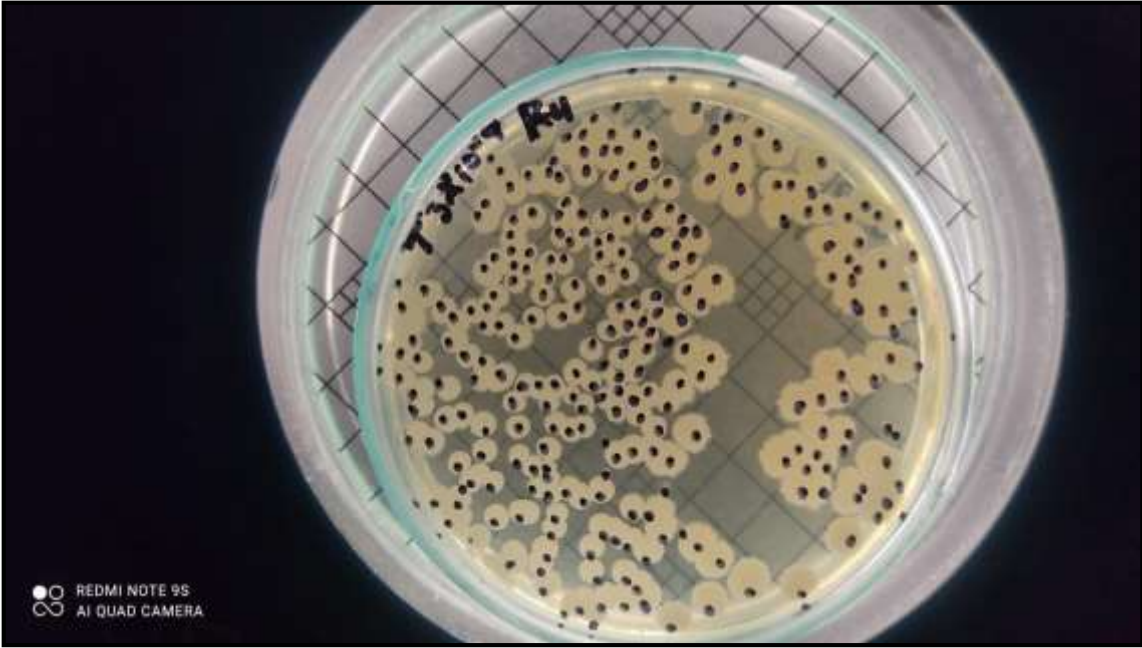


Imagen 9. Caja de Petri con colonias de células de *Azospirillum* spp en interacción con turba.

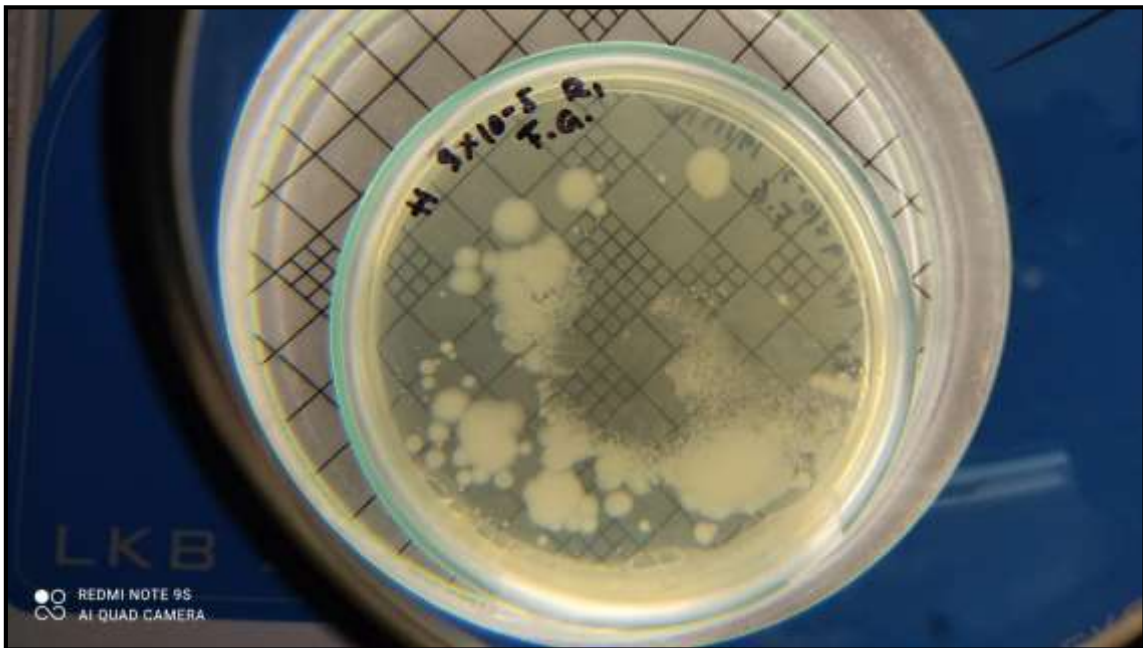


Imagen 10. Caja de Petri conteniendo colonias de *Pseudomonas* spp en interacción con el soporte humus.

Anexo 5. Certificado de traducción del abstract.



Mg. Yanina Quizhpe Espinoza
Licenciada en Ciencias de Educación mención Inglés
Magister en Traducción y mediación cultural

Celular: 0989805087
Email: yaniges@icloud.com
Loja, Ecuador 110104

Loja, 30 de mayo 2023

Yo, Lic. Yanina Quizhpe Espinoza, con cédula de identidad 1104337553, docente del Instituto de Idiomas de la Universidad Nacional de Loja, y certificada como traductora e interprete en la Senescyt y en el Ministerio de trabajo del Ecuador con registro **MDT-3104-CCL-252640**, certifico:

Que tengo el conocimiento y dominio de los idiomas español e inglés y que la traducción del resumen del Trabajo de **Integración Curricular Evaluación de soportes orgánicos en interacción con bacterias promotoras del crecimiento vegetal para la formulación de un prototipo de inoculante**, cuya autoría del señor Franco Antonio Guillén Guzmán, con cédula 1102484480, es verdadero y correcto a mi mejor saber y entender.

Atentamente



Yanina Quizhpe Espinoza.

Traductora freelance