



UNL

Universidad
Nacional
de Loja

Universidad Nacional de Loja

Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables

Carrera de Ingeniería Agronómica

Aislamiento y caracterización morfológica, bioquímica y fisiológica de microorganismos rizosféricos provenientes de suelos agrícolas de la provincia de Loja

Trabajo de titulación previo a
la obtención del título de
Ingeniera Agrónomo.

AUTORA:

Esminer Jackeline Asunción Elizalde

DIRECTOR:

Ing. Klever Iván Granda Mora, PhD.

Loja – Ecuador

2022

CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Loja, 29 de agosto del 2022

Ing. Klever Iván Granda Mora, PhD.
DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

CERTIFICO:

Que he revisado y orientado todo el proceso de elaboración del Trabajo de Titulación denominado: **“Aislamiento y caracterización morfológica, bioquímica y fisiológica de microorganismos rizosféricos provenientes de suelos agrícolas de la provincia de Loja”** previo a la obtención del título de **Ingeniera Agrónomo**, de autoría de la estudiante: **Esminer Jackeline Asunción Elizalde**, con cédula d identidad Nro. **1105623399**, una vez que el trabajo cumple con todos los requisitos exigidos por la Universidad Nacional de Loja, para el efecto, autorizo la presentación del mismo para su respectiva sustentación y defensa.



.....
Ing. Klever Iván Granda Mora, PhD.
DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORÍA

Yo, **Esminer Jackeline Asunción Elizalde**, declaro ser autora 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 Institucional - Biblioteca Virtual.



Firma:

Cédula de identidad: 1105623399

Fecha: 8/11/2022

Correo electrónico: esminer.asuncion@unl.edu.ec

Celular: 098 597 5490

CARTA DE AUTORIZACIÓN POR PARTE DE LA AUTORA PARA CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y/O PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO, DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **Esminer Jackeline Asunción Elizalde**, declaro ser autora del Trabajo de Titulación denominado: **“Aislamiento y caracterización morfológica, bioquímica y fisiológica de microorganismos rizosféricos provenientes de suelos agrícolas de la provincia de Loja”** como requisito para optar al título de **Ingeniera Agrónomo**, 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 en el Repositorio institucional.

Los usuarios puedan 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 ocho días del mes de noviembre del dos mil veintidós.

Firma:

Autora: Esminer Jackeline Asunción Elizalde

Cédula: 1105623399

Dirección: La Argelia, Loja.

Correo electrónico: esminer.asuncion@unl.edu.ec

Celular: 098 597 5490

DATOS COMPLEMENTARIOS

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

Tribunal del Trabajo de Titulación:

PhD. Tulio Fernando Solano Castillo

Presidente

PhD. Marina Mazón Morales

Vocal

Mg.Sc. Freddy Eliazar Tinoco Tinoco

Vocal

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a Dios y a mi padre Julio Asunción, quien ha sido el pilar fundamental a lo largo de mi vida, sin duda, sin su ayuda no lo habría logrado. Tu bendición a diario a lo largo de mi vida me ha protegido, por ello, te brindo mi trabajo en ofrenda por tu paciencia y amor padre mío, TE AMO.

Con amor

Esminer Jackeline Asunción Elizalde

AGRADECIMIENTO

Doy gracias a Dios por estar a mi lado siempre, por darme sabiduría y fortaleza para alcanzar mis objetivos.

A mi padre Julio Asunción por todo su cariño, confianza y apoyo incondicional. A mis hermanos Saúl y Andrea, quienes a lo largo de mi vida han sido parte de mis alegrías, triunfos y tristezas.

A mi querida Luisa, amiga incondicional que me regalo la vida, gracias por ayudarme cuando más lo necesitaba. Asimismo, a la amistad más bonita que Dios me regaló durante la vida universitaria, mi estimada Adriana. Gracias a las dos por ayudar a la ejecución de este gran proyecto.

Agradezco a la Universidad Nacional de Loja, especialmente a la Carrera de Ingeniería Agronómica y a sus profesores por brindarme sus conocimientos y ayudar en mi formación profesional.

Un agradecimiento especial a mi director de Trabajo de Titulación, el Ing. Iván Granda Mora, PhD., por su guía, paciencia y apoyo durante el desarrollo del proyecto, de igual manera, al Ing. Ángel Robles, por su ayuda en todo momento.

Finalmente, quiero agradecer al personal técnico docente del Centro de Biotecnología, de manera especial, a la Ing. Yadira Collahuazo Reinoso por haberme brindado su valiosa colaboración en la investigación de Laboratorio.

Esminer Jackeline Asunción Elizalde

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA	i
CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
AUTORÍA	iii
CARTA DE AUTORIZACIÓN	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xii
1. TÍTULO	1
2. RESUMEN	2
2.1. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	4
Objetivo general	5
Objetivos específicos	5
4. REVISIÓN DE LITERATURA	6
4.1. Técnicas microbiológicas	6
4.1.1. Aislamiento de microorganismos de interés agrícola	6
4.1.2. Principales pruebas para la caracterización de microorganismos de interés agrícola	7
4.1.3. Crioconservación de microorganismos de interés agrícola	8
4.2. La rizosfera	11
4.3. Microorganismos del suelo de interés agrícola	11
4.3.1. Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal.....	11
4.3.2. Estudios con Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal	14

4.4. Pruebas bioquímicas y fisiológicas de identificación de los Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal.....	15
4.4.1. Pruebas bioquímicas	15
4.4.2. Pruebas fisiológicas	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS	18
5.1. Descripción del área de estudio.....	18
5.1.1. Fase de campo.....	18
5.1.2. Fase de laboratorio.....	18
5.2. Materiales.....	19
5.3. Diseño experimental.....	19
5.4. Análisis estadístico.....	19
5.5. Metodología.....	19
5.5.1. Metodología para el primer objetivo: “Obtener un cepario de microorganismos rizosféricos provenientes de suelos agrícolas de la provincia de Loja para su evaluación e identificación”	19
5.5.2. Metodología para el segundo objetivo “Caracterizar tanto morfológica, bioquímica y fisiológica los microorganismos aislados de la rizósfera de suelos agrícolas de la provincia de Loja como cepas de interés para inoculantes biológicos”.....	21
6. RESULTADOS	25
6.1. Resultados para el primer objetivo: “Obtener un cepario de microorganismos rizosféricos provenientes de suelos agrícolas de la provincia de Loja para su evaluación e identificación	25
6.1.1. Recolección y aislamiento de microorganismos rizosféricos	25
6.1.2. Cinética de crecimiento y crioconservación de microorganismos.....	26
6.1.3. Crioconservación	29
6.2. Resultado para el segundo objetivo “Caracterizar tanto morfológica, bioquímica y fisiológica los microorganismos aislados de la rizósfera de suelos agrícolas de la provincia de Loja como cepas de interés para inoculantes biológicos”	29
6.2.1. Caracterización morfológica.....	29

6.2.2.	Caracterización bioquímica	31
6.2.3.	Caracterización fisiológica.....	32
7.	DISCUSIÓN.....	35
8.	CONCLUSIONES	40
9.	RECOMENDACIONES	41
10.	BIBLIOGRAFÍA	42
11.	ANEXOS.....	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Potencial biotecnológico de rizobacterias en la agricultura.....	14
Tabla 2. Ubicación geográfica del área de estudio.	18
Tabla 3. Clima y ecología del área de estudio	18
Tabla 4. Aislados bacterianos obtenidos de los diferentes suelos y cantones muestreados....	25
Tabla 5. Aislados de hongos obtenidos de los diferentes suelos y cantones muestreados	25
Tabla 6. Características morfológicas de los aislados bacterianos	29
Tabla 7. Características morfológicas de los aislados fúngicos.....	30
Tabla 8. Crecimiento radial de los aislados fúngicos.....	30
Tabla 9. Número de esporas de los aislados fúngicos.....	31
Tabla 10. Pruebas de motilidad y catalasa aplicadas a los aislados bacterianos.....	31
Tabla 11. Solubilización de fosfato de los aislados bacterianos	32
Tabla 12. Solubilización de fosfato de los aislados fúngicos	32
Tabla 13. Actividad celulolítica de los aislados bacterianos	33
Tabla 14. Actividad celulolítica de los aislados fúngicos.....	33
Tabla 15. Producción de sideróforos y prueba NFB en aislados bacterianos	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva de crecimiento microbiano	8
Figura 2. Cinética de crecimiento para los aislados ZC1, MA2 y MA3.....	26
Figura 3. Cinética de crecimiento para los aislados LC5, SP14 y SP15.....	27
Figura 4. Cinética de crecimiento bacteriano para los aislados MA4, LC6 y SP10.....	27
Figura 5. Cinética de crecimiento bacteriano para los aislados SP9, SP12 y SP13.....	28
Figura 6. Cinética de crecimiento bacteriano para los aislados LL7, LL8 Y SP11	28
Figura 7. Producción de ácido indol-3-acético de los aislados bacterianos.....	34

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Evidencia fotográfica.....	53
Anexo 2: Componentes de los medios de cultivo utilizados.....	58
Anexo 4. Promedio de triplicados y desviación estándar obtenidos de la cinética de crecimiento bacteriano.....	61
Anexo 5: Análisis estadístico de datos	64
Anexo 6. Certificación de traducción del Abstract.....	65

**Aislamiento y caracterización morfológica, bioquímica y fisiológica
de microorganismos rizosféricos provenientes de suelos agrícolas de
la provincia de Loja**

2. RESUMEN

Los microorganismos rizosféricos benéficos se destacan por incrementar la disponibilidad de nutrientes, producir hormonas y proteger a las plantas frente a estreses bióticos y abióticos. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar microorganismos rizosféricos aislados de suelos agrícolas de la provincia de Loja con la finalidad de seleccionar cepas promisorias de interés como bioinoculantes. Se recolectaron muestras de suelo de cultivos hortícolas (1 kg por cada sitio) de las zonas más representativas de los cantones Zapotillo, Macará, Saraguro y Loja mediante un muestreo aleatorio simple y luego se transportaron al Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja. Para el aislamiento de microorganismos rizosféricos se realizaron diluciones seriadas de cada muestra de hasta 10^{-3} y 10^{-4} y se sembraron por triplicado en placas de Petri con Agar Nutriente para bacterias y Rosa de Bengala para hongos y se incubaron a 26 °C y 28 °C durante 48 y 72 horas respectivamente, luego, se procedió a purificar los microorganismos que presentaron características morfo-culturales de interés. Después del periodo de incubación determinado y con relación a los resultados de la cinética de crecimiento se conservó los aislados bacterianos en glicerol (20 % y 100 %) y los aislados fúngicos en agua destilada estéril para su posterior caracterización morfológica, bioquímica y fisiológica. En todos los casos se evidenció características de interés por parte de los aislados rizosféricos como motilidad, catalasa positiva, solubilización de fosfatos, actividad celulolítica, producción de sideróforos, fijación biológica de nitrógeno y producción de ácido indol-3-acético, en las cuales se destaca la cepa MA3 procedente del cantón Macará. Por tanto, estos resultados promisorios sientan las bases para la selección adecuada de cepas con capacidad para promover el crecimiento de las plantas que pudieran ser una alternativa a la fertilización química en cultivares de interés agrícola.

Palabras claves: Microorganismos rizosféricos, cinética de crecimiento, crioconservación, motilidad, solubilización de fosfatos, producción de sideróforos, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Penicillium* sp.

2.1. ABSTRACT

Beneficial rhizospheric microorganisms are noted for increasing nutrient availability, producing hormones and protecting plants against biotic and abiotic stresses. The objective of this work was to characterize rhizospheric microorganisms isolated from agricultural soils of the province of Loja in order to select promising strains of interest as bioinoculants. Soil samples of horticultural crops (1 kg per site) were collected from the most representative areas of the Zapotillo, Macará, Saraguro and Loja cantons by simple random sampling and then transported to the Biotechnology Center of the National University of Loja. For the isolation of rhizospheric microorganisms, serial dilutions of each sample of up to 10^{-3} and 10^{-4} were made and sown in triplicate in Petri dishes with Nutrient Agar for bacteria and Rose Bengal for fungi, incubated at 26 °C and 28 °C for 48 and 72 hours respectively, then, the microorganisms that presented morpho-cultural characteristics of interest were purified. After the determined incubation period and in relation to the results of the growth kinetics, the bacterial isolates were preserved in glycerol (20 % and 100 %) and the fungal isolates in sterile distilled water for subsequent morphological, biochemical and physiological characterization. In all cases, the rhizospheric isolates showed interesting characteristics such as motility, positive catalase, phosphate solubilization, cellulolytic activity, siderophore production, biological nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production, with the MA3 strain from the Macará canton standing out. Therefore, these promising results lay the groundwork for the selection of strains with the ability to promote plant growth that could be an alternative to chemical fertilization in cultivars of agricultural interest.

Key words: Rhizospheric microorganisms, growth kinetics, cryopreservation, motility, phosphate solubilization, siderophore production, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas* and *Penicillium* sp.

3. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos con capacidad de promover el crecimiento vegetal son usados para la fabricación de productos biológicos conocidos como bioinoculantes que ayudan a incrementar la producción y aportan a la recuperación de los suelos (Rodríguez *et al.*, 2020). Los géneros mayormente utilizados en la elaboración de bioinoculantes son *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* debido a su capacidad para fijar nitrógeno de la atmósfera, solubilizar fosfatos y sintetizar hormonas como el ácido-indol-3-acético (Hidayah *et al.*, 2021). Además, se ha demostrado que las comunidades bacterianas de *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* producen un efecto benéfico en el crecimiento y sanidad de las plantas (Meléndez *et al.*, 2016).

Las funciones directas de los microorganismos rizosféricos son: actuar como antagonistas para el control de fitopatógenos en los diferentes cultivos, estimular la germinación de las semillas, producir sideróforos, degradar la celulosa, promover el enraizamiento, incrementar la disponibilidad de nutrientes y proteger la salud frente a estreses bióticos y abióticos (Condori *et al.*, 2019; Velasco *et al.*, 2020; Cisneros y Sánchez, 2015; Álvarez *et al.*, 2020). En general, las investigaciones con enfoque en la diversidad genética y fisiológica de los microorganismos rizosféricos son una alternativa viable en la agricultura sostenible enfocada a una producción biológica, ecológica y económica (Hidayah *et al.*, 2021).

En el país, se comercializan bioinoculantes a base de microorganismos promotores del crecimiento vegetal, sin embargo, al aplicarlos en campo la respuesta no siempre es favorable debido a su resiliencia de origen a donde son aplicados con condiciones edafoclimáticas diferentes (Escobar *et al.*, 2011). En Ecuador poco o nada se realizan aislamientos e identificaciones de microorganismos benéficos, y se conoce poco acerca de la compatibilidad, especificidad y eficacia de los microorganismos rizosféricos en el incremento de biomasa y fijación de nitrógeno con su planta hospedera (Alvarez *et al.*, 2018), así como el crecimiento y rendimiento con cultivos hortícolas (Hernández *et al.*, 2022; Chanway *et al.*, 2014).

Además, no se dispone de inoculantes nativos para garantizar las necesidades nutricionales de estos cultivos mediante métodos sostenibles. Los esfuerzos se han centrado en la búsqueda de alternativas para incrementar los rendimientos agrícolas, mediante métodos convencionales, con la aplicación desmesurada de fertilizantes químicos, que además de costosos pueden significar una fuente de contaminación a los suelos y las aguas (Sulieman y Tran, 2015).

En este contexto, es necesario estudiar la diversidad biológica de microorganismos benéficos del suelo y su interacción con cultivos importantes de la región. Ello permitiría contar con una colección de microorganismos promisorios para el desarrollo de inoculantes. Su incorporación a la producción de cultivares hortícolas y otros de interés, garantizaría la implementación de una estrategia sostenible y amigable con el ambiente. Igualmente, se podría reducir la aplicación de fertilizantes químicos, ahorrar considerables sumas de divisas al país por concepto de importación de fertilizantes, mejorar la salud del suelo por un mayor aporte biológico y lograr el incremento de los rendimientos agrícolas en la región sur del Ecuador.

Teniendo en cuenta estos aspectos, la siguiente pregunta de investigación fue: ¿Cuáles son las características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas de los microorganismos rizosféricos provenientes de suelos agrícolas de la provincia de Loja?

Para dar cumplimiento al propósito de la investigación, se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general

- Caracterizar microorganismos rizosféricos provenientes de suelos agrícolas de la provincia de Loja para seleccionar cepas promisorias de interés como bioinoculantes.

Objetivos específicos

- Obtener un cepario de microorganismos rizosféricos provenientes de suelos agrícolas de la provincia de Loja para su evaluación e identificación.
- Caracterizar tanto morfológica, bioquímica y fisiológica los microorganismos aislados de la rizósfera de suelos agrícolas de la provincia de Loja como cepas de interés para inoculantes biológicos.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Técnicas microbiológicas

4.1.1. Aislamiento de microorganismos de interés agrícola

Las técnicas de aislamiento permiten la obtención de microorganismos a partir de muestras completas, ya sea de suelo, agua o alimentos. Además, ayudan a verificar la pureza de los cultivos obtenidos, pues es indispensable para identificar las características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y moleculares de los microorganismos (Carlina *et al.*, 2021).

Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados en laboratorio para realizar el aislamiento de microorganismos de interés agrícola permiten separar individuos, de esta manera, cada célula forma una colonia visible macroscópicamente al multiplicarse (Rubio *et al.*, 2015). De acuerdo con Sanz (2011) los medios de cultivo se clasifican de la siguiente manera:

1. **Medios selectivos:** permiten crecer un solo tipo de microorganismos.
2. **Medios diferenciales o indicadores:** permite identificar una actividad metabólica por cambio de estado o color de un determinado microorganismo.
3. **Medios de transporte:** traslada muestras biológicas y las mantiene viables.
4. **Medios de enriquecimiento:** proporciona nutrientes, condiciones ambientales y favorecen el desarrollo de un microorganismo en particular.

Métodos de aislamiento

Sanz (2011) afirma que el método a utilizar ya sea para la siembra, inoculación, o incluso resiembra, dependen específicamente de las características de las muestras, debido a esto, existen diversas técnicas de siembra o inoculación, algunas de ellas, se enumeran a continuación:

1. Siembra del inóculo en medio líquido y siembra por dilución.
2. Siembra del inóculo en medio sólido (técnica de Barry, Asa de Digrafsky, Agotamiento por estría, técnica de los cuatro cuadrantes, técnica de los tres giros).
3. Siembra del inóculo en tubo (siembra por estría en tubos con medio sólido inclinado, siembra por picadura, siembra por picadura y estría).
4. Siembra en placa por estría cultivos puros.

4.1.2. Principales pruebas para la caracterización de microorganismos de interés agrícola

La identificación de microorganismos permite determinar a qué especie pertenece un aislado, para ello, se debe seguir un proceso comparativo entre las características de la cepa obtenida con la descripción que tradicionalmente manifiesta una especie definida, por ejemplo, las claves taxonómicas más utilizadas en la identificación de hongos es la descrita por Barnett y Hunter en el año 1998, mientras que para la identificación de bacterias generalmente se utiliza Bergey's Manual segunda edición escrita en el año 2005. Por su parte, la caracterización de microorganismos rizosféricos en laboratorio se puede realizar a través de diversas pruebas, tanto a nivel morfológico, fisiológico, bioquímico o molecular (Morejón y Pardo, 2008).

Caracterización morfológica de microorganismos

Morfológicamente, las bacterias varían en algunos aspectos, como tamaño, color, forma, bordes, elevación, superficie, consistencia, pigmentación, olor, presencia y disposición de flagelos, forma de las células (esféricas o cocos, alargadas o bacilos y curvadas o espirilos), presencia de endosporas y tinción de Gram, entre otras., en el caso de la caracterización morfológica y taxonómica de las bacterias la coloración Gram es básica y es empleada para diferenciarlas en dos grupos, las Gram (+) y Gram (-). En el caso de ser una bacteria Gram (+), se obtienen células de tonalidad violeta, sin embargo, en Gram (-) se observan células de tonalidad rojiza (Carrasco *et al.*, 2020).

En el caso de los hongos, los aspectos a considerar son el color del micelio, el tipo de crecimiento, ausencia o presencia de septos, pigmentos, fíbulas, ausencia o presencia de fiálides, clamidosporas, ascas, basidios, esporangios, rizoides, conidióforos y conidios de acuerdo con Barnett y Hunter (1998).

Caracterización bioquímica de microorganismos

A nivel bioquímico, las pruebas generalmente aplicadas son: distintos niveles de temperatura, crecimiento en condiciones anaeróbicas, actividad oxidasa, peroxidasa, catalasa, producción de ácidos a partir de la degradación de diferentes azúcares, utilización de diferentes fuentes carbonadas, hidrólisis de caseína, esculina, gelatina, caseína, etc., (Carrasco *et al.*, 2020).

Caracterización fisiológica de microorganismos

A nivel fisiológico, Escobar *et al.* (2011) afirmaron que las pruebas más utilizadas para caracterizar e identificar microorganismos es evaluar la capacidad de los mismos para fijar nitrógeno, producir hormonas como el ácido indolacético, solubilizar fósforo inorgánico, solubilizar potasio, evaluar su capacidad celulolítica, producción de sideróforos, entre otros.

4.1.3. Crioconservación de microorganismos de interés agrícola

Crecimiento microbiano

Matheus *et al.* (2016) afirman que el crecimiento y viabilidad de los microorganismos se encuentra determinada por factores ambientales, nutricionales y por las condiciones de laboratorio, si los factores son ideales, es posible predecir una curva de crecimiento de tipo sigmoide característica de cada especie microbiana. Por lo general, la curva acostumbra a dividirse en 4 partes (Figura 1):

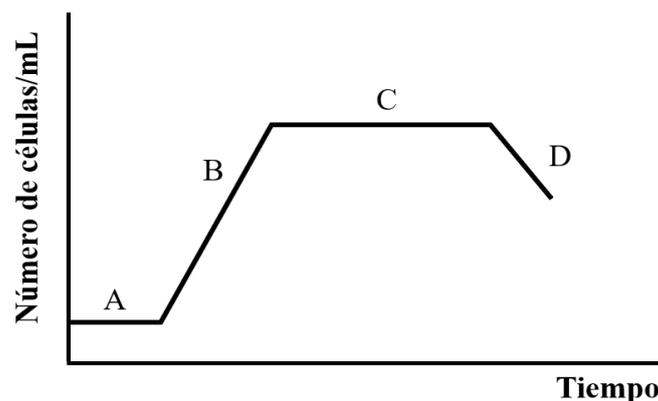


Figura 1. Curva de crecimiento microbiano (Cobas *et al.*, 2007).

- A. **Fase de latencia o de adaptación:** no existe división celular, ya que en esta etapa la célula sintetiza nuevos componentes.
- B. **Fase de crecimiento exponencial:** la masa bacteriana crece hasta que se agotan los nutrientes, es el punto máximo del crecimiento.
- C. **Fase estacionaria:** el crecimiento de la población se vuelve constante y la curva horizontal. En esta fase, los nutrientes del medio de cultivo se agotan.
- D. **Fase de declinación o muerte:** la población empieza a decrecer por la acumulación de residuos tóxicos y por la falta de nutrientes.

Conservación de cepas microbianas

García y Uruburu (2012) mencionan que la conservación microbiana es una técnica muy utilizada ya que por un periodo de tiempo determinado permite mantener la viabilidad de los microorganismos hasta en un 80 % sin alterar su estructura morfológica, fisiológica o genética. Sin embargo, para que la conservación tenga éxito debe cumplir con 3 objetivos fundamentales, es decir, que el cultivo sea puro, supervivencia de al menos el 70 % de las células, y que permanezcan genéticamente estables. Existen varios métodos de conservación microbiana, pero para un mejor estudio se agrupan en tres categorías, las cuales se detallan a continuación:

A. Métodos de elección o de conservación a largo plazo

La técnica consiste en paralizar el crecimiento de las células microbianas, de esta manera, se garantiza la estabilidad genética ya que evita la aparición de nuevas generaciones. En la actualidad, es el mejor método a emplear, sin embargo, no se debe descartar un cambio en las células originado por el proceso preparatorio. En este grupo, García y Uruburu (2012) mencionan que los métodos de conservación son dos: criopreservación y liofilización.

Congelación: cuando las células no disponen de agua en forma líquida no existe crecimiento microbiano, bajo este concepto, en esta técnica las células se congelan en suspensión con un agente crioprotector. Sin embargo, existen factores como la edad de las células, velocidad de congelación y descongelación, temperatura de almacenamiento y el empleo de agentes crioprotectores que influyen en la viabilidad y estabilidad de las células, ante ello, se recomienda utilizar células en su fase exponencial y células maduras para los microorganismos que tienen la capacidad de esporular, por otro lado, es preferible que el cambio de temperatura sea rápido ya sea para congelación o descongelación y que se mantengan mínimo a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en tubos de plástico esterilizables con agentes crioprotectores como el glicerol a una concentración del 15 % al 20 % (García y Uruburu, 2012).

Liofilización: la técnica consiste en quitar el agua mediante la liofilización y gracias a esto la estabilidad genética es alta, además, permite el transporte y almacenamiento de las cepas ya que puede mantenerse en temperatura ambiente ($18\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $20\text{ }^{\circ}\text{C}$), sin embargo, su proceso es más complicado que en la congelación y existen más factores que influyen en la eficacia de la conservación, por ejemplo, el tipo de microorganismo, concentración celular, temperatura durante la sublimación, grado de deshidratación alcanzado, atmósfera del tubo y las condiciones de almacenamiento (García y Uruburu, 2012).

B. Métodos alternativos

Generalmente se los utiliza cuando no se pueden emplear los métodos de elección antes mencionados, ya sea por la carencia de los equipos o bien porque la cepa microbiana no resiste a los tratamientos. Existen dos métodos alternativos que se pueden emplear, la conservación por transferencia periódica y la conservación por suspensión en agua destilada o en agua de mar estéril.

Conservación por transferencia periódica: consiste en guardar la cepa microbiana en el medio de cultivo que ha crecido inicialmente a una temperatura de 4 °C a 8 °C, sin embargo, no es recomendable utilizar este método ya que las células activas excretan productos tóxicos del metabolismo que provocan el envejecimiento y muerte celular, además, existe una alternancia de generaciones por el tiempo de almacenamiento lo que puede provocar una pérdida en sus características predominantes (García y Uruburu, 2012).

Conservación por suspensión en agua destilada o en agua de mar estéril: es un método recomendado para hongos, levaduras y algunas bacterias, su técnica consiste en suspender en agua estéril cierta cantidad de células de microorganismos a conservar y su concentración no debe superar a 10^4 células/mL (García y Uruburu, 2012).

C. Métodos restringidos

Por lo general, se utilizan estos métodos cuando no es posible aplicar la conservación con los anteriormente mencionados, o en su defecto, cuando se requiere mantener a microorganismos bacterianos como *Spirillum* o *Rhodospirillum* (García y Uruburu, 2012). Su técnica consiste en la eliminación del agua disponible para las células y existen cuatro grupos en esta categoría, los cuales son:

Desecación en papel filtro: se utiliza un papel absorbente con una solución muy densa de células y se deja secar al aire libre en condiciones estériles.

Desecación en suelo, arena o silicagel: se añaden células a estos sustratos y luego se protegen.

Desecación en bolitas de alginato: la eliminación de agua se realiza por tratamiento con soluciones hipertónicas sucesivas. Se conserva en tubos cerrados a – 80 °C, 4 °C y 18 °C. También se recomienda para conservar algas y células vegetales.

Desecación en sal gorda para halobacterias: las células se mezclan con sal y se deja secar espontáneamente, gracias a esto, las células dejan de multiplicarse por falta de agua.

4.2. La rizosfera

La rizosfera es la región del suelo que rodea la superficie de la raíz, en ella, se generan procesos de intercambio catiónico, absorción de nutrientes y producción de exudados por parte de la raíz (Marrero *et al.*, 2015). En la rizosfera existen diferentes sustancias, mismas que son liberadas desde las raíces y permiten estimular la actividad microbial, tales como, carbohidratos, ácidos orgánicos, vitaminas, nucleótidos, flavonoides, enzimas, hormonas y compuestos volátiles (Osorio-Vega *et al.*, 2009). Según Meléndez-Jácome *et al.* (2021) la rizosfera se divide en 3 zonas:

- La endorizosfera: se encuentra el tejido radicular.
- El rizoplano: es la zona donde está la superficie de la raíz y donde se adhieren los microorganismos.
- El ectorizosfera: es el suelo inmediato a la raíz.

4.3. Microorganismos del suelo de interés agrícola

4.3.1. Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal

- *Azospirillum*

El género *Azospirillum* fue descrito por primera vez por Krieg y Döbereiner en el año 1984, constituyen un subgrupo dentro de la familia *Rhodospirillaceae*, asimismo, pertenecen a la subclase *Proteobacteria*. Son células no formadoras de esporas, tienen forma de varilla en espiral o ligeramente curvada con gránulos de polihidroxibutirato formadores de quistes, presentan tinción de Gram negativa, son móviles, tienen un flagelo polar y varios laterales (Pedraza *et al.*, 2020).

Hasta la actualidad se han descrito 22 especies, mismas que son: *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens*, *A. irakense*, *A. largimobile*, *A. doebereinae*, *A. oryzae*, *A. melinis*, *A. canadense*, *A. zae*, *A. rugosum*, *Candidatus A. massiliensis*, *A. picis*, *A. palatum* (no validado), *A. thiophilum*, *A. formosense*, *A. fermentarium*, *A. humicireducens*, *A. himalayense* (no validado), *A. soli* y *A. agrícola*. Sin embargo, en términos de fisiología, genética y aprovechamiento agrícola los más estudiados son *A. brasilense* y *A. lipoferum* descritos por diversos autores en asocio con gramíneas forrajeras, maíz, trigo, arroz, sorgo, caña de azúcar y otras plantas (Pedraza *et al.*, 2020).

Al género *Azospirillum* se lo ha catalogado como Microorganismo Promotor del Crecimiento Vegetal, pues tiene la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico mediante la conversión de dinitrógeno atmosférico (N₂) en amoníaco (NH₃) catalizada mediante la enzima nitrogenasa, gracias a esto, las plantas producen biomoléculas nitrogenadas como clorofila, aminoácidos, ATP y ácidos nucleicos. Además, el género *Azospirillum* en condiciones in vitro sintetizan hormonas como el ácido indol-3-acético, giberelinas, ácido abscísico, ácido salicílico y etileno (Pedraza *et al.*, 2020).

- ***Azotobacter***

Azotobacter sp. fue descubierto en el año 1901 por el microbiólogo y botánico holandés Beijerinck, son bacterias heterotróficas no simbióticas capaces de fijar un promedio de 20 kg N/ha/por año. Asimismo, son microorganismos de vida libre, presentan tinción Gram negativa, forma ovalada o esférica, formadores de quistes de paredes gruesas, son móviles y su tamaño varía de 2 a 10 µm de largo y 1–2 µm de ancho, generalmente, son de reproducción asexual (Jnawali *et al.*, 2015). *Azotobacter* sp., es beneficioso para el crecimiento y el rendimiento de los cultivos a través de la biosíntesis biológica de sustancias activas, además, estimula microbios rizosféricos y produce inhibidores fipatogénicos (Jnawali *et al.*, 2015).

Se ha comprobado que *Azotobacter* es sensible a pH ácido y altas concentraciones de sales y temperatura (Jnawali *et al.*, 2015), sin embargo, mejora la germinación de semillas además de tener una respuesta beneficiosa sobre la tasa de crecimiento de cultivos, pues esta bacteria es capaz de sintetizar algunas auxinas, citoquininas y varias sustancias similares a la fitohormona GA (ácido giberélico) (Jnawali *et al.*, 2015).

- ***Pseudomonas***

Pseudomonas pertenece al grupo *Gammaproteobacteria*, generalmente, se encuentra en el suelo, agua y en las superficies de las plantas. Es un bacilo aerobio de tinción Gram negativa, mide aproximadamente de entre 0,50 a 1,00 de largo x 1,50 a 5,00 µm de ancho, no produce esporas, es móvil, tiene un flagelo polar único. Por lo general, producen n-lipasa y fermentan el D-manitol. Estos microorganismos producen β-hemólisis en agar sangre y 3 tipos de colonias que permiten diferenciarlos, y, por ende, ayudan a los investigadores a determinar la virulencia del patógeno (Hesse *et al.*, 2018).

Las colonias pueden ser pequeñas, dispersas en aislamientos naturales; grandes de apariencia elevada y bordes planos; y de apariencia mucóide por producción de gel de alginato. Actualmente, existen más de 180 especies validadas en la lista de nombres procariontas con posición en nomenclatura, se organizan en 11 a 13 grupos, de los cuales, el grupo más grande es *Pseudomonas fluorescens* y esta se divide en ocho o nueve subgrupos (Hesse *et al.*, 2018).

Las *Pseudomonas fluorescens* son rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal con características que le permiten ejercer un efecto benéfico tanto directo como indirecto, el beneficio directo lo realiza a través de la síntesis de fitohormonas, estimulación de la germinación y emergencia de plántulas, inhibición de la síntesis de etileno y solubilización de fósforo inorgánico. Sin embargo, de manera indirecta, lo realiza por la síntesis de antibióticos y fungicidas, competencia por nutrientes, producción de sideróforos o por la inducción de la resistencia sistémica a patógenos, además, actuar como Biocontrolador, pues es capaz de proteger a las plantas de la infección, causadas por agentes fitopatógenos (Motta *et al.*, 2022).

- *Penicillium* sp

Penicillium sp. fue descrito por primera vez por Johann Heinrich Friedrich en 1809 y cuenta con más de 200 especies reconocidas (Pitt, 2014). Especies como *Penicillium simplicissimum*, *Penicillium bilaiae*, *Penicillium radicum*, *Penicillium janthinellum*, *Penicillium brevicompactum*, entre otras, se las ha catalogado como promotoras del crecimiento vegetal debido a sus múltiples cualidades biotecnológicas, entre las que se encuentran la solubilización de fosfatos, la producción de enzimas tales como celulasas, xilanasas y proteasas, entre otras, involucradas en procesos de descomposición de materia orgánica como residuos de procesos agrícolas e industriales (Beltrán, 2014; Morocho y Leiva, 2019; Padrón *et al.*, 2020).

A nivel morfológico, las colonias en su etapa inicial son de color blanco, vellosas, circulares y con un gran nivel de esporulación en colores verde grisáceo o azul verdoso, la superficie de la colonia suele ser algodonosa y pueden crecer fácilmente en pH bajos y altos, con relación a la temperatura son capaces de desarrollarse hasta en 0 °C, pero su temperatura óptima oscila de entre 25 °C a 37 °C, las estructuras reproductivas son pequeñas y contienen conidióforos, métulas, fiálides y fialoconidios (microconidios), en general, el género *Penicillium* sp. se caracteriza por formar conidios en una estructura ramificada semejante a un pincel que termina en células conidiógenas llamadas fiálides (Pitt, 2014).

4.3.2. Estudios con Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal

Uypan *et al.* (2021) en su estudio “Hongos rizosféricos de *Echinopsis pachanoi* “San Pedro hembra” y su potencial como promotores de crecimiento en *Zea mays* L. bajo estrés salino” aislaron hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma*., de los cuales *Penicillium* y *Trichoderma* incrementaron la altura, número de hojas, longitud y peso de las raíces de plantas de maíz en un suelo salino, el mismo, les permitió demostrar su potencial como promotores de crecimiento en plantas bajo salinidad.

Florez *et al.* (2016) presentaron el estudio “Capacidad y diversidad de bacterias celulolíticas aisladas de tres hábitats tropicales en Boyacá, Colombia” y reportaron aislados de bacterias como *Bacillus* sp., *Erwinia* sp., y *Pseudomonas* sp., asimismo, indicaron que la capacidad celulolítica de dichas bacterias es muy variable.

Como se ha mencionado, las bacterias cumplen papeles importantes, por ello, en la tabla 1 se detallan algunos de los principales compuestos inhibidores producidos por *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Pseudomonas*.

Tabla 1. Potencial biotecnológico de rizobacterias en la agricultura.

Rizobacteria	Planta	Condiciones	Resultados	Referencia
<i>Pseudomonas gessardii</i> BLP141, <i>P. fluorescens</i> A506 y <i>P. fluorescens</i> LMG 2189	Girasol (<i>Helianthus annuus</i>)	Invernadero	Mejóro el crecimiento de las plantas, fisiología, rendimiento y actividades antioxidantes, así como la acumulación de prolina.	Saleem <i>et al.</i> (2018)
<i>Pseudomonas putida</i> , <i>Azospirillum</i> , <i>Azotobacter</i>	Alcachofa (<i>Cynara scolymus</i>)	<i>In vitro</i>	Aumentó la longitud de los brotes, peso de brote y tiempo de germinación.	Jahanian <i>et al.</i> (2012)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Soya y trigo	Campo	Aumentó las actividades enzimáticas del suelo, la productividad total y la absorción de nutrientes.	Sharma <i>et al.</i> (2011)
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Lupinus luteus</i>	Campo	Aumentó tanto la biomasa como el contenido de nitrógeno.	Dary <i>et al.</i> (2010)
<i>Azospirillum amazonense</i>	Arroz (<i>Oryza sativa</i> L.)	Invernadero	Aumentó la acumulación de materia seca en el grano (7,00-11,60 %), el número de panículas (3,00-18,60 %) y acumulación de nitrógeno en la maduración del grano (3,50-18,50 %).	Rodrigues <i>et al.</i> (2008)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Arroz (<i>Oryza sativa</i>), maíz (<i>Zea mays</i>)	<i>In vitro</i>	Mostraron capacidad para controlar los patógenos fúngicos de la raíz.	Lawongsa <i>et al.</i> (2008)
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp245	Frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Invernadero	Aumentó el crecimiento de la raíz.	Remans <i>et al.</i> (2008)

Fuente: Rodríguez-Sahagún *et al.* (2020).

4.4. Pruebas bioquímicas y fisiológicas de identificación de los Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal

4.4.1. Pruebas bioquímicas

4.4.1.1. Motilidad

La movilidad es una característica importante a la hora de realizar una caracterización de especies, en las bacterias, el responsable de la movilidad es un órgano llamado flagelo y estos son filamentos helicoidales que se extienden desde el citoplasma a través de la pared celular, los mismos, presentan una estructura formada por un cuerpo basal, gancho y filamento (Morejón y Pardo, 2008). Debido a la gran cantidad de proteínas y el flujo de protones resultantes del metabolismo propio de la bacteria, la función principal del flagelo es rotar y permitir al microorganismo moverse en medios líquidos a una velocidad aproximada de entre 200 a 1 000 rpm (Morejón y Pardo, 2008).

Morejón y Pardo (2008) afirman que, de acuerdo al género bacteriano, los flagelos se clasifican según el número y la posición en la que se encuentren, es decir, monotricos (un solo flagelo), lofotricos (poseen dos flagelos), anfitricos (poseen un grupo de flagelos en un extremo) y flagelos peritricos (muchos flagelos en toda la superficie de la bacteria).

4.4.1.2. Catalasa

La catalasa es una enzima presente en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que poseen citocromos, la función principal que cumple la catalasa es eliminar sustancias como el peróxido de hidrógeno, radical superóxido y el radical hidroxilo que se producen durante el metabolismo bacteriano, mismas que pueden ser tóxicas para las bacterias, ya que pueden dañar las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos, es por ello que hoy en día se ha catalogado como enzimas desintoxicantes (Fernández *et al.*, 2010).

Díaz (2003) asegura que el mecanismo de acción es hidrolizar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas. Existen dos reacciones, en un primer momento se produce agua gracias a una molécula de peróxido ya que la catalasa se oxida y forma un intermediario llamado compuesto I. En un segundo momento, el compuesto I es reducido por otra molécula de peróxido y la catalasa regresa a su estado inicial, lo que permite producir agua y dióxígeno.

4.4.2. Pruebas fisiológicas

4.4.2.1. Fijación de biológica de nitrógeno (FBN)

El nitrógeno es un nutriente básico que debe estar presente para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Existen organismos llamados bacterias diazotróficas como la familia Rhizobiaceae y el género *Frankia* capaces de fijar nitrógeno que se clasifican en bacterias simbióticas fijadoras de N₂ y cianobacterias, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azocarus* y *Pseudomonas* que se clasifican en bacterias no simbióticas de vida libre, asociativa y endófitas. La característica común de los microorganismos involucrados en la fijación biológica de nitrógeno es la presencia de enzimas nitrogenasas, mismas que reducen el nitrógeno atmosférico en el ion asimilable amonio (Velasco *et al.*, 2020).

La enzima nitrogenasa consta de dos proteínas distintas llamadas dinitrogenasa y dinitrogenasa reductasa, cabe recalcar que ambos tienen hierro, sin embargo, la dinitrogenasa contiene otro componente llamado molibdeno que junto con el hierro forma parte de un cofactor conocido como *FeMo-Co*, mismo que permite la reducción real del N₂ (Loredo *et al.*, 2004).

La evaluación de los microorganismos promotores del crecimiento vegetal capaces de fijar nitrógeno para aplicarlos en los diferentes cultivos es una alternativa viable puesto que en la actualidad la aplicación de productos químicos es una práctica frecuente por parte de los medianos y grandes productores, además, ayuda a la reducción de la contaminación del medio ambiente y a evitar enfermedades en los seres humanos (Loredo *et al.*, 2004).

4.4.2.2. Producción de sideróforos

El hierro es otro elemento esencial para el desarrollo y crecimiento de los diferentes organismos, por su parte, las plantas lo obtienen del suelo cuando su presencia no es limitada (Wani *et al.*, 2013). Existe un grupo denominado rizobacterias que producen compuestos de bajo peso molecular (0,50 a 1,00 kDa) llamados sideróforos y su principal función es solubilizar hierro para luego incorporarlo al metabolismo celular gracias a sus compuestos ligantes sin la necesidad de generar cambios en el estado de oxidación (Álvarez *et al.*, 2020).

Las rizobacterias productoras de sideróforos son capaces de colonizar la raíz, inhibir hongos fitopatógenos por la baja concentración de Fe³⁺ disponible en los suelos y proteger el nicho ecológico en el que se encuentran (Velasco *et al.*, 2020). En la actualidad, la pioverdina sintetizada por *Pseudomonas* son los mejores solubilizadores de hierro gracias a que tienen sitios de ligación múltiple (Álvarez *et al.*, 2020).

4.4.2.3. Producción de ácido indol-3-acético (AIA)

Las auxinas cumplen funciones importantes para el desarrollo de las plantas, por ejemplo, división celular, elongación, dominancia apical, formación de raíces adventicias y el fototropismo (Asgher *et al.*, 2014). Por su parte, el ácido indol-3-acético es una de las principales auxinas conocidas y producidas por las rizobacterias ya que géneros como *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum* han sido reportados como productores de AIA puesto que al ser liberado aumenta el tamaño, peso, nutrición y número de ramificaciones de las plantas (Velasco *et al.*, 2020).

Las rizobacterias sintetizan el AIA en 3 rutas metabólicas y tienen como precursor el triptófano, la primera, es la ruta del ácido indol-3-pirúvico presente en géneros bacterianos como *Azospirillum* y *Pseudomonas*, la segunda ruta forma la triptamina para la producción de AIA y en tercera es la síntesis de AIA vía indol-3-acetamida (Camelo y Bonilla, 2011).

4.4.2.4. Solubilización de fosfatos

Callejas *et al.* (2018) aseguran que el fósforo (P) es el segundo macronutriente esencial para el crecimiento de los seres vivos y su función principal es la adquisición, almacenamiento y uso de energía, por su parte, las plantas requieren al fósforo entre 0,20 % y 0,40 % de su peso seco ya que ayuda en la fotosíntesis y respiración de las plantas, construcción de biomasa, obtención de micronutrientes y participa en varios procesos fisiológicos. Existen microorganismos solubilizadores de P que generalmente se concentran en la rizosfera de las plantas, algunos hongos y bacterias asociadas son *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Erwinia* (Cisneros y Sánchez, 2015).

4.4.2.5. Actividad celulolítica

La celulosa es un carbohidrato compuesto de unidades de glucosa y su degradación es importante en el proceso de descomposición de materia orgánica ya que proporciona azúcares simples y energía fácilmente utilizable por los microorganismos (Álvarez *et al.*, 2014). La celulosa es uno de los compuestos orgánicos más abundantes de la naturaleza, sin embargo, existen factores que pueden alterar su presencia, por ejemplo, el nivel de nitrógeno disponible, la temperatura, aireación, humedad, pH y la proporción relativa de lignina en los restos vegetales (Alvarado *et al.*, 2019). Dentro de los microorganismos celulolíticos destacan *Cellulosomas* sp., *Pseudomonas*, *Bacillus* sp., *Trichoderma reesei*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Penicillium funiculosum* y *Aspergillus* sp (Guzmán *et al.*, 2015).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Descripción del área de estudio

5.1.1. Fase de campo

En una primera fase, la recolección de muestras de suelo rizosférico se llevó a cabo en cuatro cantones de la provincia de Loja, para ello, se consideraron las zonas más representativas donde se cultivan hortalizas. La ubicación geográfica (latitud, longitud, altitud) y ecológica (zonas de vida, precipitación, temperatura) de los cantones seleccionados se detallan en las tablas 2 y 3:

Tabla 2. Ubicación geográfica del área de estudio.

Cantón	Sector	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)
Zapotillo	Limones	4° 23' 10''	80° 80' 55''	507
Macará	Algodonal	4° 16' 46''	80° 03' 00''	440
Macará	La Cruz	4° 22' 07''	79° 58' 42''	410
Macará	La Ceiba	4° 21' 46''	79° 59' 11''	405
Loja	Zenén	3° 50' 03''	79° 17' 37''	2 637
Loja	Carigán	3° 57' 34''	79° 14' 27''	2 250
Loja	Motupe	3° 56' 31''	79° 13' 38''	2 117
Saraguro	Carboncillo	3° 33' 01''	79° 14' 58''	2 947
Saraguro	Saraguro	3° 37' 25''	79° 14' 23''	2 549

Fuente: PDOT provincia de Loja 2015-2025 (2015).

Tabla 3. Clima y ecología del área de estudio

Localidad	Zona de Vida	Precipitación (mm)	Temperatura (°C)
Zapotillo	be-T; bms-T	500 – 2 500	27 °C
Macará	bms-T	750 - 1 626	26 °C
Saraguro	bh-M	400 - 800	16 °C
Loja	bh-MB; bs-MB; bmh-M	700 - 1 700	18 °C

Clasificación de las Zonas de Vida Natural del Mundo de L.R. Holdridge: Be-T: Bosque Espino-Tropical; bms-T: Bosque Muy Seco-Tropical; bh-M: Bosque Húmedo-Montano; bh-MB: Bosque Húmedo-Montano Bajo; bs-MB: Bosque Seco-Montano Bajo; bmh-M: Bosque muy Húmedo-Montano.

Fuente: PDOT provincia de Loja 2015-2025 (2015).

5.1.2. Fase de laboratorio

Se realizó en el laboratorio de Microbiología Vegetal del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja en el periodo comprendido entre noviembre de 2021 y junio 2022. Se encuentra ubicado en la parroquia San Sebastián, al sur de la ciudad de Loja. Geográficamente, se encuentra en las siguientes coordenadas: Latitud 04° 03' 74'' S. Longitud 79° 20' 46'' W y Altitud de 2 134 msnm (Centro Integrado de Geomática Ambiental, 2012).

5.2. Materiales

Los materiales, equipos y reactivos que se utilizaron durante el desarrollo de la investigación estuvieron disponibles en el laboratorio del Centro de Biotecnología de la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Loja.

5.3. Diseño experimental

Para la colecta de muestras de suelo agrícola de diferentes zonas de la provincia de Loja, se realizó un muestreo aleatorio simple, mientras que para el aislamiento y caracterización de los microorganismos rizosféricos se utilizó un Diseño Completamente al Azar debido a los escenarios del laboratorio ya que todos los aislados fueron expuestos a condiciones similares y completamente controlables.

5.4. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se procesaron mediante la utilización del paquete estadístico “*IBM SPSS Statistic*” versión 22 para Windows. Se analizó la normalidad de datos y homogeneidad de varianzas con la finalidad de obtener las diferencias estadísticas de cada prueba realizada, para ello, se realizó un análisis de varianza simple (ANOVA) mediante la prueba de Tukey para las pruebas paramétricas y un análisis de Kruskal Wallis para las pruebas no paramétricas. Las variables analizadas fueron el crecimiento radial y número de esporas de los aislados fúngicos, solubilización de fosfato, actividad celulolítica y producción de ácido indol-3-acético de aislados bacterianos.

5.5. Metodología

5.5.1. Metodología para el primer objetivo: “Obtener un cepario de microorganismos rizosféricos provenientes de suelos agrícolas de la provincia de Loja para su evaluación e identificación”

Recolección y aislamiento de microorganismos rizosféricos

Se recolectaron nueve muestras (1 kg/cada una) de suelo rizosférico de las zonas hortícolas más representativas de la provincia de Loja. Las muestras fueron colocadas en bolsas con cierre hermético Ziploc y etiquetadas de acuerdo con su lugar de origen, por último, fueron transportadas al laboratorio de Microbiología Vegetal del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja para su debido procesamiento (anexo 1 - foto 1).

Para el aislamiento de los microorganismos se pesaron 10 g de cada muestra, fueron colocadas en matraces de 250 mL a las cuales se les agregó 100 mL de agua peptonada y se mezcló hasta disolver por completo (Fábrega *et al.*, 2019). Luego, se realizaron diluciones seriadas de hasta 10^{-3} y 10^{-4} en tubos de ensayo que contenían 9 mL de solución salina (Tolozá y Lizarazo, 2018). De la dilución 10^{-3} y 10^{-4} se tomó 1 mL y se sembró por triplicado en cajas de Petri con medio de cultivo Agar Nutriente y se incubaron a 28 °C durante 48 h para bacterias y en medio de cultivo PDA y Saboroud a 26 °C durante 72 h para hongos (Mora *et al.*, 2020). Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a seleccionar y purificar los microorganismos que presentaron características morfo-culturales de interés, para ello, en bacterias se utilizó la técnica de estriado por agotamiento con ayuda de un asa bacteriológica y se sembró por triplicado en medio de cultivo Agar Nutriente (Torres *et al.*, 2017), sin embargo, en hongos se realizaron cortes del medio de cultivo con ayuda de un sacabocados número 7 y se sembró por triplicado en Rosa de Bengala y PDA (Mora *et al.*, 2020). El procedimiento se realizó hasta obtener colonias y cultivos puros de los microorganismos de interés. La preparación de los medios de cultivo se realizó de acuerdo con las características indicadas en cada reactivo, se esterilizó a 120 °C por 20 min en la autoclave y por cada una de las cajas de Petri se dispensó un aproximado de 20 mL (anexo 1 – fotos 4 y 5).

Cinética de crecimiento y crioconservación de microorganismos

Para determinar la cinética de crecimiento se evaluaron las condiciones de crecimiento de cada bacteria, para ello, los aislados bacterianos fueron sembrados por triplicado en tubos de ensayo que contenían 10 mL de caldo nutriente a 28 °C y 150 rpm. La absorbancia fue medida en el espectrofotómetro JASCO V-730 a 560 nm. Finalmente, se elaboró las curvas de crecimiento para determinar el tiempo en que las bacterias crecen exponencialmente y se encuentran aptas para realizar la crioconservación.

La crioconservación de los aislados bacterianos se llevó a cabo al reactivar las bacterias por duplicado en Agar Nutriente a 28 °C durante 24 horas, luego, se tomó una colonia y se sembró por duplicado en tubos de ensayo que contenían 5 mL de Caldo Nutriente e incubadas a 28 °C y 150 rpm (Morales *et al.*, 2010). Después del tiempo de incubación determinado y acorde a los resultados de la cinética de crecimiento se tomó 1 mL del Caldo Nutriente y se sembró en Agar Nutriente durante 24 horas a 28 °C para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC). Para continuar, se tomó 500 µL del caldo nutriente y se colocó en 16 tubos crioviales

mismos que estuvieron distribuidos de la siguiente manera: dos repeticiones con 500 µL de caldo nutriente, 500 µL de glicerol al 20 % y 10 perlas plásticas; dos repeticiones con 500 µL de caldo nutriente, 500 µL de glicerol puro y 10 perlas plásticas; 6 repeticiones con 500 µL de caldo nutriente, 500 µL de glicerol al 20 % y sin perlas plásticas; 6 repeticiones con 500 µL de caldo nutriente, 500 µL de glicerol puro y sin perlas plásticas. Para finalizar, los tubos crioviales fueron etiquetados, sellados y conservados en el ultracongelador a -80 °C (Saeki, 2015).

Para la conservación de los hongos, los aislados se reactivaron en medio de cultivo Rosa de Bengala a 26 °C durante 4 días, luego, se tomó una porción de micelio con ayuda de un bisturí y se colocó en tubos crioviales que contenían 1 mL de agua destilada estéril con 10 repeticiones por cada cepa. Finalmente, los tubos crioviales fueron etiquetados, sellados y conservados en el ultracongelador a - 80 °C (anexo 1 – fotos 7 a 10) (Franco *et al.*, 2006).

5.5.2. Metodología para el segundo objetivo “Caracterizar tanto morfológica, bioquímica y fisiológica los microorganismos aislados de la rizósfera de suelos agrícolas de la provincia de Loja como cepas de interés para inoculantes biológicos”

Para la caracterización morfológica, bioquímica y fisiológica de microorganismos rizosféricos se utilizaron 15 aislados bacterianos sembrados en Agar Nutriente y 7 aislados de hongos sembrados en Rosa de Bengala. Cada uno de los aislados, fueron seleccionados por presentar características morfo-culturales diferentes entre sí.

Caracterización morfológica

Para la caracterización morfológica de las cepas bacterianas, los aislados fueron sembrados en medios de cultivo específicos para *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* con un pH ajustado a 7,00. Además, se realizaron siembras en Nfb (Nitrógeno con Azul de Bromotimol) con pH ajustado a 6,00, Ashby-sacarosa y King B ajustados a pH 7,00. Con relación a los parámetros de verificación evaluados fueron: color de la colonia, mucosidad, bordes, elevación y tipo de crecimiento tal y como lo describió Brenner (2005). Asimismo, en el microscopio óptico (OLYMPUS CX21, USA) se observaron las células para definir forma, agrupación y respuesta a la tinción de Gram (Torres *et al.*, 2017).

Para realizar la tinción de Gram, en primer lugar, en un portaobjeto se colocó una gota de agua destilada, y sobre esta una colonia bacteriana y se homogeneizó. Después, con ayuda de una pinza metálica se flameó el portaobjetos hasta que la solución se evaporó con la finalidad de fijar las bacterias al vidrio. A continuación, se cubrió con cristal violeta durante 30 segundos y se lavó con agua destilada, y seguidamente se cubrió con Lugol-Yodo por un minuto y nuevamente se lavó con agua destilada. Después, se aplicó una solución decolorante de alcohol cetona durante 30 segundos y se lavó con agua destilada, luego se utilizó una tinción diferenciadora de safranina durante 1 minuto, se lavó con agua destilada y se dejó secar, y finalmente, se colocó una gota de aceite de inmersión en el portaobjetos y se observó en el lente 100 X (anexo 1 - fotos 2, 3, 11, 12 y 13). Cuando se observó un color rojo el resultado se consideró negativo, y para una coloración azul, el resultado fue positivo (López *et al.*, 2014).

Con relación a la caracterización morfológica de los hongos, los aislados fueron sembrados en medio de cultivo Rosa de Bengala y se observaron características tales como: color, forma y crecimiento de micelio. Además, se realizaron pruebas de crecimiento radial, conteo de esporas y observación de las estructuras mediante la tinción con lactofenol (anexo 1 – 14 a 19).

Para evaluar el crecimiento radial de los hongos, se utilizó un sacabocados número 9 y se sembró por triplicado en medio de cultivo Rosa de Bengala para observar el color del micelio, forma, crecimiento y el tiempo que le tomó para llenar la caja de Petri (Rubio *et al.*, 2015). Por su parte, para realizar el conteo de esporas, se utilizaron 6 tubos de ensayo por cada aislado, mismos que contenían 10 mL de agua destilada estéril; con ayuda de un asa bacteriológica se adquirió un pequeño fragmento de micelio fúngico, se colocó en el tubo de ensayo y se dio vortex durante 5 min, se tomó 10 μ L del sobrenadante y se colocó en la cámara de Neubauer para observar las esporas en el microscopio óptico (OLYMPUS CX21, USA) con lente 40 X (Narváez *et al.*, 2017). Por último, la observación de estructuras fúngicas se realizó mediante la tinción con lactofenol en el microscopio óptico con lente 100 X (López *et al.*, 2014).

Caracterización bioquímica

En la caracterización bioquímica se realizaron pruebas de motilidad y pruebas de catalasa, para ello, los aislados bacterianos fueron sembrados por triplicado en medio de cultivo Agar Nutriente mediante la técnica de estriado por agotamiento y se incubaron durante 24 horas a 28 °C (Sánchez *et al.*, 2022). La prueba de motilidad a los aislados bacterianos consistió en

colocar una gota de agua destilada en un portaobjeto cóncavo y sobre ella hacer un frotis de una colonia pura, luego, se procedió a sellar con un cubreobjeto y sobre él se depositó una gota de aceite de inmersión para observar en el microscopio óptico el movimiento con lente 100 X (Vázquez *et al.*, 2011). Sólo si existía movimiento bacteriano la prueba era considerada como positiva, caso contrario, se la catalogó como negativa. Para la prueba enzimática catalasa, se colocó una gota de peróxido de hidrógeno al 3 % y sobre ella se realizó un frotis de una colonia pura. Cuando al realizar el frotis se observó la formación inmediata de burbujas el resultado fue considerado positivo, no obstante, al no evidenciar la formación de burbujas o si la producción de las mismas, luego de 20 segundos era muy escasa, se la consideró negativa (anexo 1 – foto 20) (Reiner, 2010).

Caracterización fisiológica

- Solubilización de fosfatos

Los aislados obtenidos fueron sembrados por cuatro repeticiones en el medio de cultivo Agar Pikovskaya, en el caso de las bacterias se realizaron siembras en cajas de Petri por la técnica de punción y fueron incubadas a 28 °C durante 11 días, sin embargo, en hongos se realizaron cortes del medio con ayuda de un sacabocados número 6, se colocaron los cortes en las cajas de Petri, y, finalmente, se procedió a sellar las cajas con Parafilm, etiquetarlas e incubarlas a 26 °C durante 7 días (Cisneros y Sánchez, 2015). Los aislados capaces de solubilizar fosfatos formaron un halo translúcido alrededor del inóculo, el mismo se midió durante un periodo de tiempo determinado y el cálculo de la eficiencia de solubilización de fosfatos se lo realizó tal y como lo describe Goljanian *et al.* (2016), es decir, según el índice de solubilización: $IS = A/B$ (A: diámetro de la colonia + diámetro del halo y B: diámetro de la colonia) (anexo 1 – foto 21).

- Actividad celulolítica

Los aislados fueron sembrados por cuatro repeticiones en medio de cultivo Agar Carboximetil Celulosa con pH 7,00 mediante la técnica de punción durante 72 horas a 28 °C (bacterias) y a 26 °C (hongos). Después del tiempo de incubación, se reveló con solución Rojo Congo al 1 % durante 15 minutos y se lavó 2 veces con cloruro de sodio 2 molar, por último, se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente y se midió el halo (Isaza y Ramírez, 2019). Si al culminar el tiempo de espera se formaba un halo translúcido alrededor del inóculo el resultado era considerado positivo, caso contrario, se lo consideraba negativo (Alvarado *et al.*, 2019).

- **Producción de sideróforos y fijación biológica de nitrógeno (NFB)**

Las cepas bacterianas obtenidas fueron sembradas por triplicado en medio de cultivo selectivo King B (deficiente de hierro). Para ello, se utilizó la técnica de estriado por agotamiento durante 7 días a 28 °C y se consideró resultado positivo sólo a las cepas que presentaron un cambio de coloración en el medio de cultivo (Sasirekha y Srividya, 2016). En cuanto a la fijación biológica de nitrógeno se la determinó al sembrar los aislados bacterianos en el medio de cultivo NFB ajustado a pH 6,00. Para ello, todas las cepas fueron sembradas en cuatro repeticiones mediante la técnica de estriado por agotamiento durante 48 horas a 28 °C (Alcarraz *et al.*, 2019). La evaluación se llevó a cabo transcurrido el tiempo de incubación y se consideró resultado positivo a los aislados capaces de cambiar el color verde del medio a un color azul, caso contrario, fueron considerados negativos a la prueba de NFB (anexo 1 – fotos 24, 25 y 26).

- **Curva de calibración y producción de ácido indol-3-acético (AIA)**

Para la cuantificación del AIA se prepararon patrones con distintas concentraciones finales (0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 y 100 ppm de AIA de la marca TM MEDIA), para ello, todas las soluciones fueron diluidas en CaCl₂ 2 M, luego, se tomó 1 mL de cada concentración y se mezcló con 4 mL del reactivo Salkowski (FeCl₃ x 6H₂O 0,50 M y H₂SO₄ al 98 %) y se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente y en completa oscuridad. Para finalizar, con ayuda de celdas plásticas se midió la absorbancia a 530 nm en un espectrofotómetro JASCO V-730 y con los datos obtenidos se elaboró la curva de calibración correspondiente mediante la ecuación $y = 0,0045x + 0,0293$ con un $R^2 = 0,9473$ (anexo 1; foto 27, 28 y 29) (Vásconez *et al.*, 2020).

Para evaluar si los aislados bacterianos producían ácido indol-3-acético, todas las cepas fueron reactivadas por triplicado en tubos de ensayo con caldo nutriente y se incubaron a 28 °C durante 48 horas, luego, se tomó 1 mL de las bacterias previamente incubadas y fueron sembradas en 6 mL de medio TBS suplementado con L-Triptófano (1 mg/mL), se incubó a 28 °C durante 4 días a 100 rpm. La producción de ácido indol-3-acético se evaluó a las 48, 72 y 96 horas de incubación, concluido cada periodo, los tubos se centrifugaron a 3 000 rpm durante 15 min, luego, se tomó 1 mL del sobrenadante y se mezcló con 4 mL del reactivo Salkowski, se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente en completa oscuridad y se midió la absorbancia a 530 nm en un espectrofotómetro JASCO V-730 (Vásconez *et al.*, 2020).

6. RESULTADOS

6.1. Resultados para el primer objetivo: “Obtener un cepario de microorganismos rizosféricos provenientes de suelos agrícolas de la provincia de Loja para su evaluación e identificación

6.1.1. Recolección y aislamiento de microorganismos rizosféricos

En la tabla 4 se presentan los 15 aislados bacterianos obtenidos de los cantones Zapotillo, Macará, Loja y Saraguro, además, se detalla el cultivo del cual se obtuvieron las muestras y el código asignado de acuerdo con el lugar de origen:

Tabla 4. Aislados bacterianos obtenidos de los diferentes suelos y cantones muestreados

Número del aislado	Localidad	Cultivo	Código
1	Zapotillo	Cebolla	ZC1
2	Macará	Arroz	MA2
3	Macará	Arroz	MA3
4	Macará	Arroz	MA4
5	Loja	Coliflor	LC5
6	Loja	Coliflor	LC6
7	Loja	Lechuga	LL7
8	Loja	Lechuga	LL8
9	Saraguro	Papa	SP9
10	Saraguro	Papa	SP10
11	Saraguro	Papa	SP11
12	Saraguro	Papa	SP12
13	Saraguro	Papa	SP13
14	Saraguro	Papa	SP14
15	Saraguro	Papa	SP15

ZC: Zapotillo – cebolla; MA: Macará – arroz; LC: Loja – coliflor; LL: Loja – lechuga; SP: Saraguro – papa.

En la tabla 5 se presentan los 7 aislados fúngicos obtenidos en los cuatro cantones muestreados de la provincia de Loja, además, se detalla la localidad, el cultivo y el código asignado de acuerdo con el lugar de origen:

Tabla 5. Aislados de hongos obtenidos de los diferentes suelos y cantones muestreados

Número del aislado	Localidad	Cultivo	Código
1	Macará	Arroz	MA16
2	Macará	Arroz	MA17
3	Macará	Arroz	MA18
4	Saraguro	Papa	SP19
5	Loja	Coliflor	LC20
6	Loja	Coliflor	LC21
7	Macará	Arroz	MA22

MA: Macará – arroz; SP: Saraguro - papa; LC: Loja – coliflor

6.1.2. Cinética de crecimiento y crioconservación de microorganismos

La cinética de crecimiento bacteriano se evaluó de acuerdo con las características de crecimiento de cada aislado, en las figuras 2, 3, 4, 5 y 6 se muestra el crecimiento de los aislados con relación al tiempo. Los datos utilizados para elaborar las gráficas corresponden a los valores medios de triplicados \pm DE (Anexo 4).

En la figura 2 se muestra la cinética de crecimiento de las cepas bacterianas ZC1, MA2 y MA3 medidas durante 28 horas a 560 nm en medio de cultivo caldo nutriente. Todos los aislados crecieron exponencialmente después de la hora 6 y el inicio de la fase estacionaria fue a partir de la hora 20.

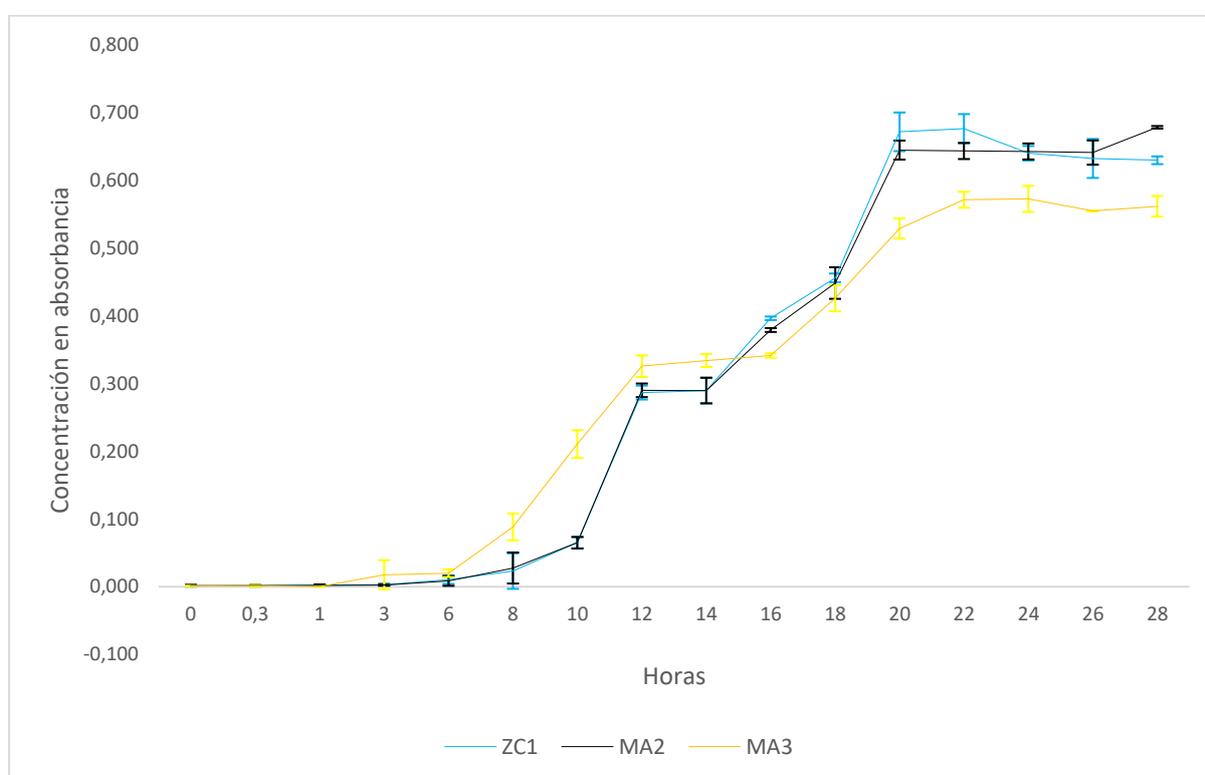


Figura 2. Cinética de crecimiento para los aislados ZC1, MA2 y MA3.

La cinética de crecimiento de las cepas bacterianas LC5, SP14 y SP15 medidas durante 28 horas a 560 nm en medio de cultivo caldo nutriente se observa en la figura 3. La fase exponencial de los aislados LC5 y SP14 inició en la hora 6 y la fase estacionaria fue a partir de la hora 20. En el caso de la cepa SP15 su fase exponencial empezó a la hora 10 y la estacionaria fue después de las 22 horas.

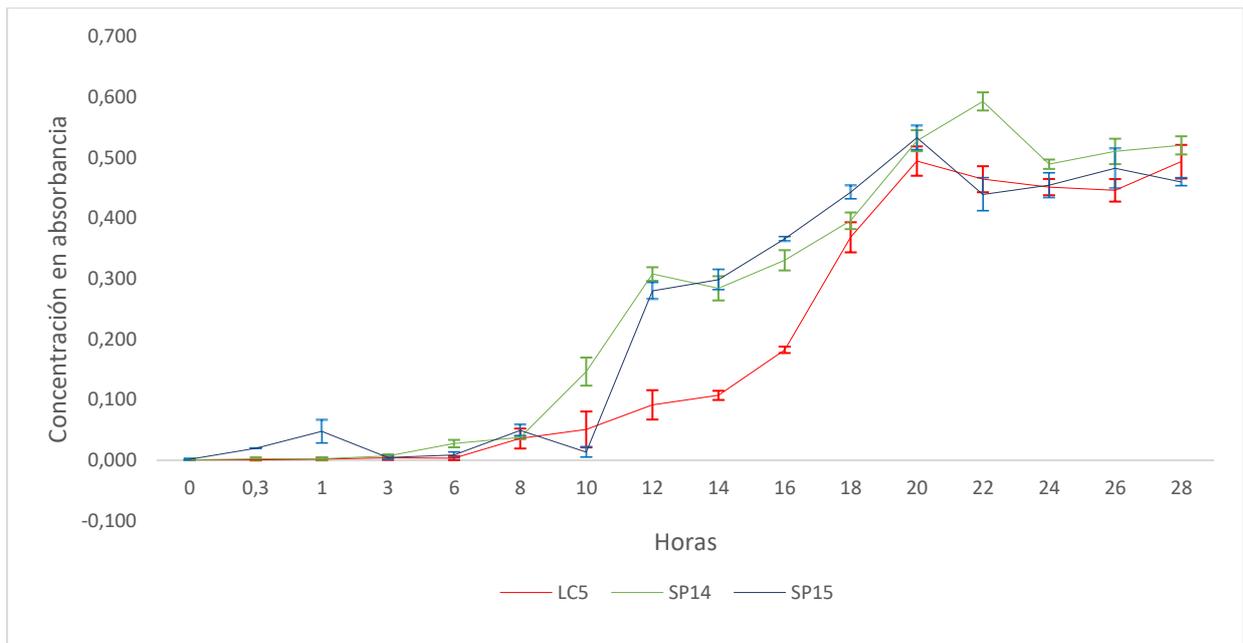


Figura 3. Cinética de crecimiento para los aislados LC5, SP14 y SP15

En la figura 4 se observa la cinética de crecimiento bacteriano para los aislados MA4, LP6 y SP10 medidas durante 48 horas a 560 nm en medio de cultivo caldo nutriente, la gráfica muestra que a las 12 horas inició la fase exponencial para todas las cepas. De igual modo, se analizó la fase estacionaria y la fase de muerte celular causada por la falta de nutrientes en el medio de cultivo.

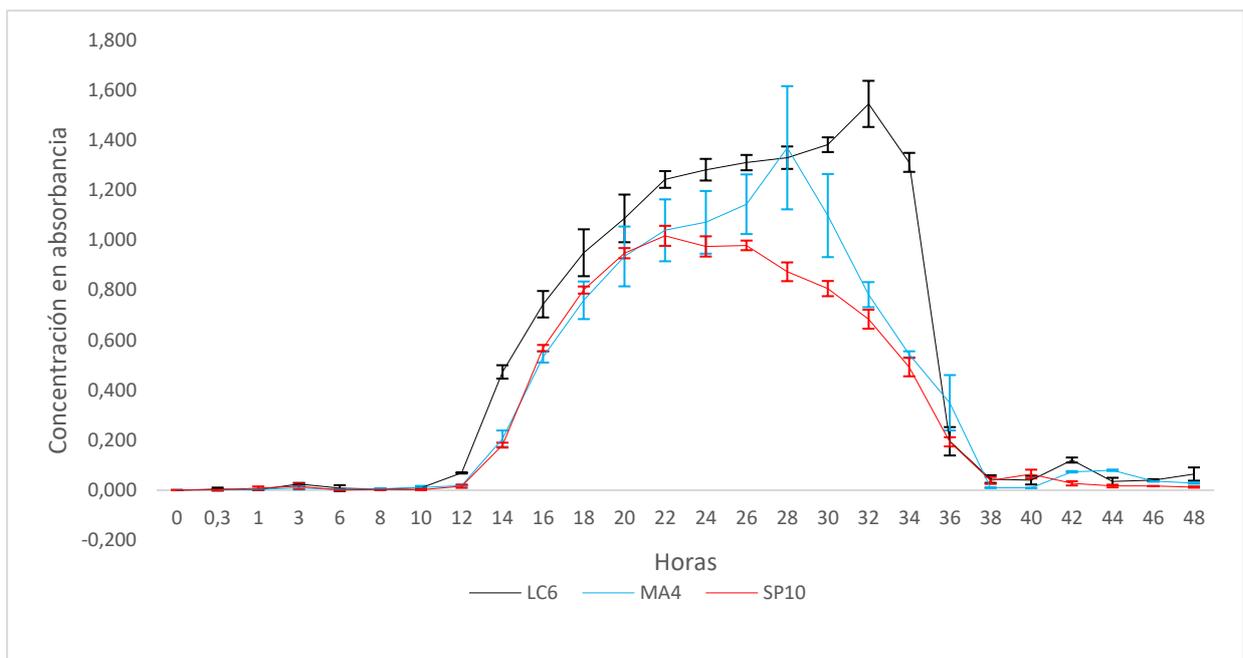


Figura 4. Cinética de crecimiento bacteriano para los aislados MA4, LC6 y SP10

En la figura 5 se observa la cinética de crecimiento bacteriano para los aislados SP9, SP12 y SP13 medidas durante 48 horas a 560 nm en medio de cultivo caldo nutriente, la gráfica muestra que a las 6, 8 y 12 horas inició la fase exponencial de las cepas. La fase estacionaria inició a las 22 y 28 (32) horas, y la fase de muerte celular en el caso del aislado SP9 inició a la hora 30.

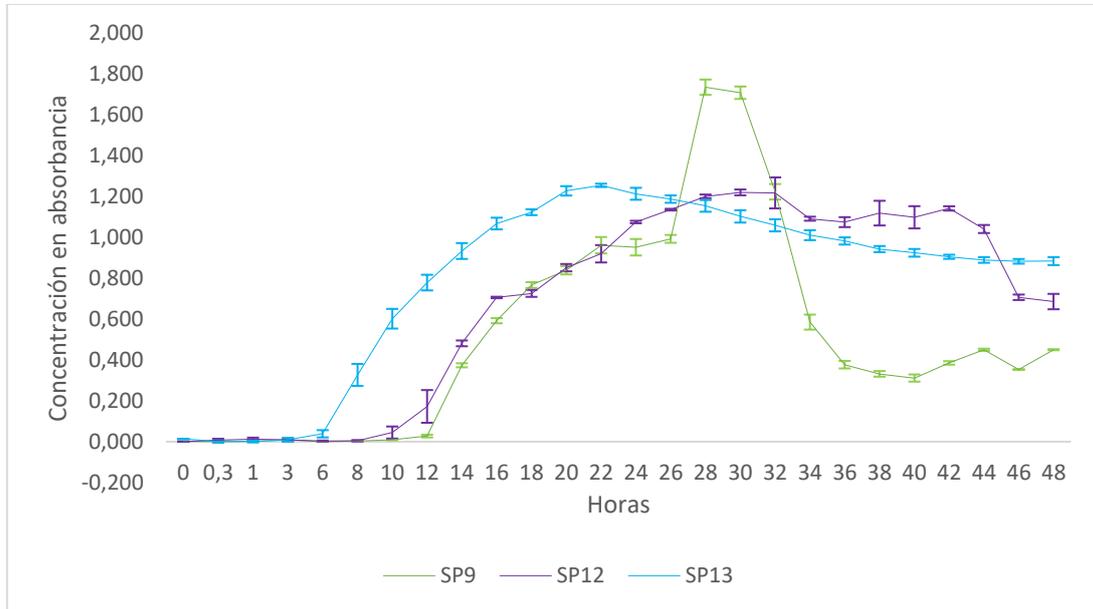


Figura 5. Cinética de crecimiento bacteriano para los aislados SP9, SP12 y SP13

La gráfica de la cinética de crecimiento bacteriano de los aislados LC7, LP8 y SP11 medidas durante 48 horas a 560 nm en medio de cultivo caldo nutriente (figura 6) muestra que la fase exponencial de los aislados LL7 y LL8 inició en la hora 10, mientras que el aislado SP11 inició a partir de la hora 16 y la fase de muerte celular del mismo empezó en la hora 32.

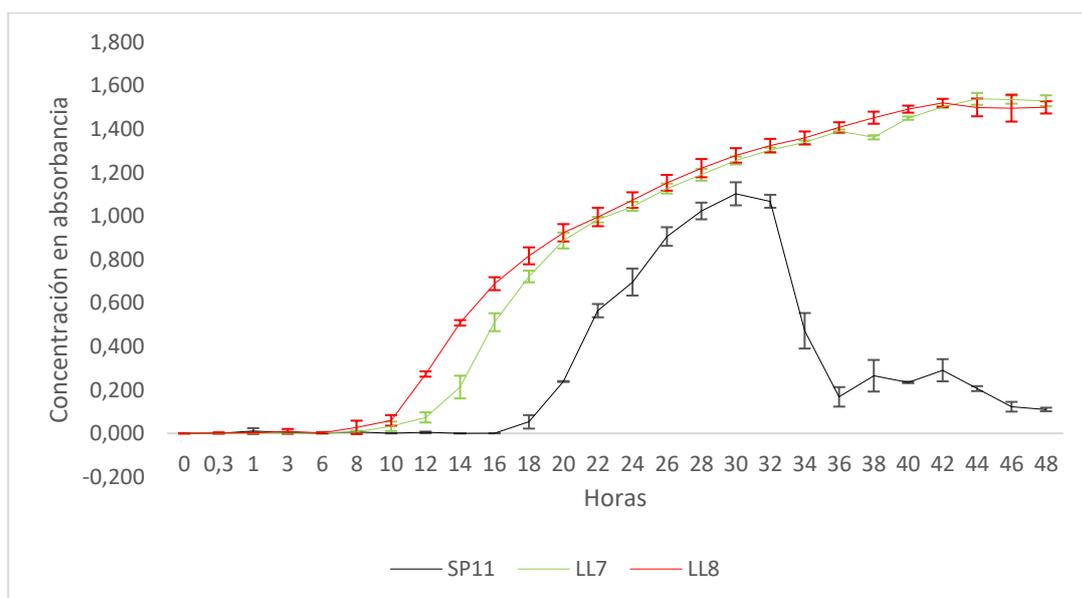


Figura 6. Cinética de crecimiento bacteriano para los aislados LL7, LL8 Y SP11

6.1.3. Crioconservación

Se conservaron 15 cepas bacterianas con 16 repeticiones cada una. En el caso de los aislados fúngicos, se conservaron 7 cepas con 10 repeticiones cada una y la conservación se realizó en tubos crioviales que contenían agua destilada estéril (ver anexo 1; cuadros 1 y 2).

6.2. Resultado para el segundo objetivo “Caracterizar tanto morfológica, bioquímica y fisiológica los microorganismos aislados de la rizósfera de suelos agrícolas de la provincia de Loja como cepas de interés para inoculantes biológicos”

6.2.1. Caracterización morfológica

Los aislados bacterianos sembrados en medios de cultivo específicos para *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* presentaron crecimiento moderado y abundante. El color varió de acuerdo al género, por ejemplo, aislados de *Azotobacter* presentaron color crema, *Azospirillum* presentaron color translúcido y los aislados de *Pseudomonas* presentaron color verde amarillento. La mucosidad fue ligera, los bordes ondulados, elevación convexa y su forma de crecimiento fue irregular. Por último, todos los aislados fueron negativos a la prueba de tinción de Gram con formas de estreptobacilo, bacilo corto y bacilo largo (tabla 6).

Tabla 6. Características morfológicas de los aislados bacterianos

Aislado	Género	Creci ^a	Color ^b	Mucus ^c	Bordes ^d	Eleva ^e	Form ^f	Gram ^g	Morfología ^h
ZC1	<i>Azotobacter</i>	+++	5	+	2	++	I	-	EB
MA2	<i>Pseudomonas</i>	+++	6	+	2	++	I	-	BC
MA3	<i>Azospirillum</i>	++	2	+	2	++	I	-	BL
MA4	<i>Azotobacter</i>	+++	5	+	2	++	I	-	BC
LC5	<i>Azotobacter</i>	+++	5	+	2	++	I	-	EB
LC6	<i>Pseudomonas</i>	++	6	+	2	++	I	-	BL
LL7	<i>Azospirillum</i>	++	2	+	2	++	I	-	BC
LL8	<i>Azotobacter</i>	+++	5	+	2	++	I	-	BC
SP9	<i>Pseudomonas</i>	+++	6	+	2	++	I	-	BC
SP10	<i>Pseudomonas</i>	+++	6	+	2	++	I	-	BC
SP11	<i>Azotobacter</i>	+++	5	+	2	++	I	-	BC
SP12	<i>Azospirillum</i>	++	2	+	2	++	I	-	BC
SP13	<i>Pseudomonas</i>	+++	6	+	2	++	I	-	BL
SP14	<i>Azospirillum</i>	++	2	+	2	++	I	-	BC
SP15	<i>Azotobacter</i>	+++	5	+	2	++	I	-	BC

ZC: Zapotillo – cebolla; MA: Macará – arroz; LC: Loja – coliflor; LL: Loja - lechuga; SP: Saraguro – papa. a: Crecimiento: (+) ligero, (++) moderado, (+++) abundante; b: Color: (2) traslucido, (3) opaco, (4) blanco opaco, (5) crema, (6) amarillo verdoso; c: Mucosidad: (+) ligero, (++) moderado, (+++) abundante; d: Bordes: (1) liso, (2) ondulado, (3) lobulado; e: Elevación: (+) cóncavo, (++) convexo; f: forma: (I) irregular; g: tinción de Gram: (+) positivo, (-) negativo; h: morfología: (BC) bacilo corto, (BL) bacilo largo, (CB) coco-bacilo, (EB) estreptobacilo.

La identificación morfológica de los aislados fúngicos mostró que todos pertenecen al género *Penicillium* sp. la observación macroscópica en estado inicial manifestó forma de micelio globoso de color blanco, mientras que al finalizar el crecimiento presentó coloración verde oscuro a excepción de MA22 que dio un color amarillento, todas las colonias presentaron un borde blanco. En la tabla 7 se detallan las características morfológicas de los aislados fúngicos:

Tabla 7. Características morfológicas de los aislados fúngicos

Aislado	Forma del micelio	Color de la colonia joven	Color de la colonia madura	Género	Tamaño de las conidias (largo x ancho - μm)
MA16	Globosa	Blanco	Verde oscuro; borde blanco	<i>Penicillium</i> sp	11,71 - 10,02
MA17	Globosa	Blanco	Verde oscuro; borde blanco	<i>Penicillium</i> sp	12,48 - 10,55
MA18	Globosa	Blanco	Verde oscuro; borde blanco	<i>Penicillium</i> sp	12,64 - 11,40
SP19	Globosa	Blanco	Verde claro y café	<i>Penicillium</i> sp	11,67 - 10,12
LC20	Globosa	Blanco	Verde oscuro; borde blanco	<i>Penicillium</i> sp	11,33 - 11,02
LC21	Globosa	Blanco	Verde claro en el centro; Verde oscuro; borde blanco.	<i>Penicillium</i> sp	10,99 - 10,98
MA22	Globosa	Blanco	Verde claro y amarillo; bordes blancos	<i>Penicillium</i> sp	11,06 - 11,24

MA: Macará – arroz; SP: Saraguro - papa; LC: Loja – coliflor

El crecimiento radial de los aislados fúngicos a las 24, 48, 72 y 96 horas fue significativamente mayor para el aislado MA18, en todos los tiempos de evaluación presentó mayor diámetro de crecimiento con respecto a los demás aislados (Tabla 8). Caso contrario sucedió para el aislado LC20 y MA17 quienes presentaron los valores más bajos de crecimiento radial a las 96 horas.

Tabla 8. Crecimiento radial de los aislados fúngicos

Aislado	Género	Crecimiento/horas			
		24	48	72	96
MA16	<i>Penicillium</i> sp	17,00 cd	19,67 de	24,00 c	30,00 c
MA17	<i>Penicillium</i> sp	19,67 bcd	21,67 cde	23,33 c	26,00 d
MA18	<i>Penicillium</i> sp	27,33 a	30,00 a	32,67 a	42,00 a
SP19	<i>Penicillium</i> sp	20,67 bc	27,00 ab	30,33 ab	33,00 b
LC20	<i>Penicillium</i> sp	15,33 d	18,67 e	22,33 c	25,00 d
LC21	<i>Penicillium</i> sp	19,67 bcd	23,00 bcd	31,67 ab	34,00 b
MA22	<i>Penicillium</i> sp	21,67 b	24,67 bc	28,33 b	31,33 bc
	EE $\bar{x} \pm$	1,31	1,25	1,24	0,84

MA: Macará – arroz; SP: Saraguro - papa; LC: Loja – coliflor. Medidas con letras distintas en cada columna difieren según la prueba de Tukey ($\alpha < 0,05$) (n = 84). EE $\bar{x} \pm$ Error Estándar de la media.

El número de esporas de los aislados fúngicos del género *Penicillium* sp. mostró diferencias significativas entre sí. En la tabla 9 se observan los niveles más bajos de germinación presentados por MA18, significativamente menores a MA22 quien presentó los niveles más altos de germinación conidial.

Tabla 9. Número de esporas de los aislados fúngicos

Aislado	Género	Número
MA16	<i>Penicillium</i> sp	1,8 x 10 ⁶ ab
MA17	<i>Penicillium</i> sp	1,7 x 10 ⁶ ab
MA18	<i>Penicillium</i> sp	1,6 x 10 ⁶ b
SP19	<i>Penicillium</i> sp	1,8 x 10 ⁶ ab
LC20	<i>Penicillium</i> sp	2,0 x 10 ⁶ ab
LC21	<i>Penicillium</i> sp	2,1 x 10 ⁶ ab
MA22	<i>Penicillium</i> sp	2,6 x 10 ⁶ a
EE \bar{x} \pm		2,8 x 10 ⁵

MA: Macará – arroz; SP: Saraguro - papa; LC: Loja – coliflor. Medidas con letras distintas en cada columna difieren según la prueba de Tukey ($\alpha < 0,05$) (n = 42). EE \bar{x} \pm Error Estándar de la media.

6.2.2. Caracterización bioquímica

Todos los aislados bacterianos evaluados mostraron motilidad, los aislados ZC1, MA3, LL7, SP11, SP12, SP14 y SP15 presentaron catalasa positiva al liberar oxígeno al medio en reacción con el peróxido de hidrógeno, mientras que los demás aislados evaluados presentaron catalasa negativa (Tabla 10).

Tabla 10. Pruebas de motilidad y catalasa aplicadas a los aislados bacterianos

Aislado	Género	Motilidad ^a	Catalasa ^b
ZC1	<i>Azotobacter</i>	+	++
MA2	<i>Pseudomonas</i>	+	-
MA3	<i>Azospirillum</i>	+	+++
MA4	<i>Azotobacter</i>	+	+
LC5	<i>Azotobacter</i>	+	+
LC6	<i>Pseudomonas</i>	+	-
LL7	<i>Azospirillum</i>	+	++
LL8	<i>Azotobacter</i>	+	+
SP9	<i>Pseudomonas</i>	+	+
SP10	<i>Pseudomonas</i>	+	+
SP11	<i>Azotobacter</i>	+	+++
SP12	<i>Azospirillum</i>	+	++
SP13	<i>Pseudomonas</i>	+	+
SP14	<i>Azospirillum</i>	+	++
SP15	<i>Azotobacter</i>	+	+++

ZC: Zapotillo – cebolla; MA: Macará – arroz; LC: Loja – coliflor; LL: Loja - lechuga; SP: Saraguro – papa. a: motilidad: (+) positivo, (-) negativo; b: catalasa: (-) sin burbujas - reacción negativa, (+) bajas burbujas - reacción débil o retardada, (++) leves burbujas - reacción moderada, (+++) abundantes burbujas.

6.2.3. Caracterización fisiológica

- Solubilización de fosfatos

El índice de solubilización de fosfatos de los aislados bacterianos presentó diferencias en todos los días de evaluación (Tabla 11). El aislado con mayor índice de solubilización desde las 48 hasta las 240 horas fue SP9, caso contrario sucedió con MA3 quien presentó los valores más bajos de solubilización, pero significativamente no diferentes al resto (excepto SP9).

Tabla 11. Solubilización de fosfato de los aislados bacterianos

Aislado	Género	Eficiencia/horas								
		24	48	72	96	120	168	192	216	240
MA3	<i>Azospirillum</i>	7,50 b	3,67 c	4,42 b	7,42 b	4,25 b	3,25 b	3,50 b	4,25 b	4,75 b
SP9	<i>Pseudomonas</i>	7,50 b	17,33 a	17,50 a	17,50 a	13,50 a				
SP12	<i>Azospirillum</i>	7,50 b	11,63 ab	11,00 ab	6,00 b	4,75 b	8,00 ab	8,50 ab	7,63 ab	7,63 ab
SP14	<i>Azospirillum</i>	17,50 a	9,38 bc	8,63 b	9,13 b	6,88 b	4,13 b	3,50 b	4,00 b	4,25 b
	EE $\bar{x} \pm$	0,03	1,01	1,40	1,70	1,77	2,05	2,03	2,16	2,22

MA: Macará – arroz; SP: Saraguro - papa. Medidas con letras distintas en cada columna difieren según la prueba de Kruskal Wallis ($\alpha < 0,05$) (n = 176). EE $\bar{x} \pm$ Error Estándar de la media.

El menor índice de solubilización de fosfatos de los aislados fúngicos estuvo dado por la cepa SP19 a las 48 horas, mientras que la cepa MA16 a las 48 horas obtuvo los valores más altos de solubilización, sin embargo, es necesario mencionar que como tratamiento no es significativamente diferente con el resto (Tabla 12).

Tabla 12. Solubilización de fosfato de los aislados fúngicos

Aislado	Género	Eficiencia/horas						
		24	48	72	96	120	144	168
MA16	<i>Penicillium</i> sp	18,88 a	19,38 a	16,88 a	17,38 a	16,75 ns	16,75 ns	15,25 ns
MA17	<i>Penicillium</i> sp	16,50 a	19,13 a	17,75 a	15,75 ab	13,50 ns	10,13 ns	12,88 ns
MA18	<i>Penicillium</i> sp	11,83 ab	8,83 ab	14,50 a	12,33 abc	9,67 ns	10,67 ns	6,67 ns
SP19	<i>Penicillium</i> sp	3,00 b	2,88 b	3,00 b	4,13 c	10,13 ns	10,38 ns	10,13 ns
LC20	<i>Penicillium</i> sp	15,25 a	13,63 a	14,25 a	17,83 a	19,50 ns	20,00 ns	18,63 ns
LC21	<i>Penicillium</i> sp	10,33 ab	10,67 ab	7,50 ab	6,67 bc	4,50 ns	5,67 ns	5,75 ns
MA22	<i>Penicillium</i> sp	9,50 a	10,75 ab	13,25 ab	11,25 abc	9,00ns	11,00 ns	8,50 ns
	EE $\bar{x} \pm$	0,22	0,23	0,37	0,33	0,40	0,55	0,72

MA: Macará – arroz; SP: Saraguro - papa; LC: Loja – coliflor. Medidas con letras distintas en cada columna difieren según la prueba de Kruskal Wallis ($\alpha < 0,05$), ns (no significativo) (n = 196). EE $\bar{x} \pm$ Error Estándar de la media.

- Actividad celulolítica

La actividad celulolítica fue positiva sólo en 8 de los 15 aislados evaluados (Tabla 13). El aislado SP12 procedente del cantón Saraguro tuvo una eficiencia mayor en la degradación de

celulosa al formar un halo translúcido alrededor de la colonia bacteriana, aunque no presenta diferencias significativas con el resto de aislados.

Tabla 13. Actividad celulolítica de los aislados bacterianos

Aislados	Género	Eficiencia
MA2	<i>Pseudomonas</i>	6,50 ns
MA3	<i>Azospirillum</i>	12,00 ns
MA4	<i>Azotobacter</i>	19,00 ns
LC5	<i>Azotobacter</i>	6,67 ns
SP10	<i>Pseudomonas</i>	17,83 ns
SP11	<i>Azotobacter</i>	14,00 ns
SP12	<i>Azospirillum</i>	19,50 ns
SP14	<i>Azospirillum</i>	12,83 ns
EE \bar{x} \pm		0,58

MA: Macará – arroz; SP: Saraguro - papa; LC: Loja – coliflor. ns (no significativa) a la prueba de Kruskal Wallis ($\alpha < 0,05$) (n = 52). EE \bar{x} \pm Error Estándar de la media.

La actividad celulolítica fue positiva para todos los aislados fúngicos (Tabla 14). El aislado LC21 presentó la mayor degradación de celulosa, mientras que el menor valor corresponde al aislado MA18, sin embargo, no existen diferencias significativas entre los valores obtenidos.

Tabla 14. Actividad celulolítica de los aislados fúngicos

Aislados	Género	Eficiencia
MA16	<i>Penicillium</i> sp	10,00 ns
MA17	<i>Penicillium</i> sp	10,00 ns
MA18	<i>Penicillium</i> sp	11,17 ns
SP19	<i>Penicillium</i> sp	11,17 ns
LC20	<i>Penicillium</i> sp	10,00 ns
LC21	<i>Penicillium</i> sp	14,17 ns
MA22	<i>Penicillium</i> sp	10,50 ns
EE \bar{x} \pm		0,32

MA: Macará – arroz; SP: Saraguro - papa; LC: Loja – coliflor. ns (no significativa) a la prueba de Kruskal Wallis ($\alpha < 0,05$) (n = 21). EE \bar{x} \pm Error Estándar de la media.

- Producción de sideróforos y fijación biológica de nitrógeno

La producción de sideróforos fue evidente por el cambio de color en medio de cultivo King B, de marrón claro a marrón oscuro. En la tabla 15 se puede apreciar que el aislado MA1 procedente del cantón Zapotillo y perteneciente al género *Azotobacter* presentó la característica de solubilizar hierro. Asimismo, la respuesta de los aislados bacterianos MA3, LC5, LC6, LP8, SP9, SP11, SP12, SP13 y SP15 a la prueba de fijación biológica de nitrógeno fue positiva.

Tabla 15. Producción de sideróforos y prueba NFB en aislados bacterianos

Aislado	Género	Sideróforos ^a	NFB ^b
ZC1	<i>Azotobacter</i>	+	-
MA2	<i>Pseudomonas</i>	-	-
MA3	<i>Azospirillum</i>	-	+
MA4	<i>Azotobacter</i>	-	-
LC5	<i>Azotobacter</i>	-	+
LC6	<i>Pseudomonas</i>	-	-
LL7	<i>Azospirillum</i>	-	+
LL8	<i>Azotobacter</i>	-	+
SP9	<i>Pseudomonas</i>	-	+
SP10	<i>Pseudomonas</i>	-	-
SP11	<i>Azotobacter</i>	-	+
SP12	<i>Azospirillum</i>	-	+
SP13	<i>Pseudomonas</i>	-	+
SP14	<i>Azospirillum</i>	-	-
SP15	<i>Azotobacter</i>	-	+

ZC: Zapotillo – cebolla; MA: Macará – arroz; LC: Loja – coliflor; LL: Loja – lechuga; SP: Saraguro – papa. a: sideróforos: (+) positivo, (-) negativo; b: NFB: (+) positivo, (-) negativo.

- Producción de ácido indol-3-acético (AIA)

El aislado MA4 presentó la mayor producción de AIA (37,25 ppm) a las 48 horas de evaluación seguido de MA3, LC5 y MA2. Por el contrario, los valores mínimos de producción de AIA los presentó el aislado SP12 (1,10 ppm) a las 48 horas de evaluación, aunque el aislado MA4 presentó el valor más alto de producción, como tratamiento no es significativamente diferente con el resto (Figura 7). Los datos utilizados para elaborar la gráfica corresponden a los valores medios de triplicados de las 48 y 72 horas, los valores de la producción de AIA a las 96 horas no fueron graficados debido a no presentar diferencia significativa (anexo 5).

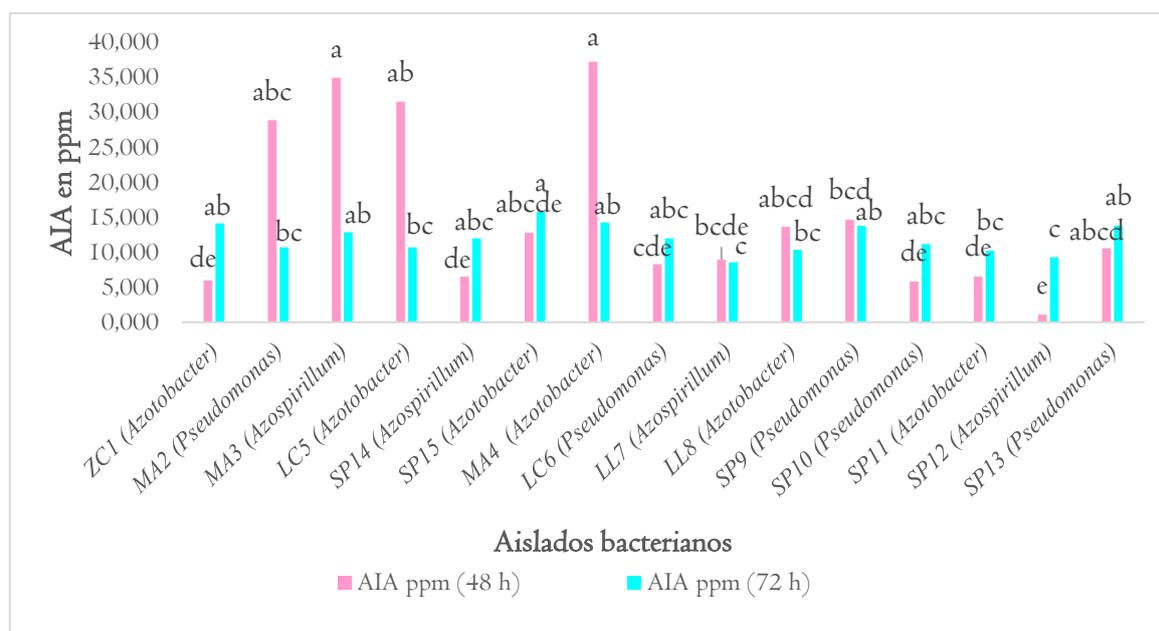


Figura 7. Producción de ácido indol-3-acético de los aislados bacterianos.

7. DISCUSIÓN

Recolección y aislamiento de microorganismos rizosféricos

Se aislaron 15 cepas bacterianas y 7 fúngicas procedentes de cuatro cantones de la provincia de Loja, ello indica la diversidad de microorganismos que pueden encontrarse en la rizosfera de las hortalizas (Salgado *et al.*, 2012). Por su parte, la rizosfera ha sido ampliamente reportada como hospedera de una diversidad de microorganismos involucrados en actividades fundamentales que aseguran estabilidad y productividad para las plantas (Pedraza *et al.*, 2010; Leal *et al.*, 2018; García y Uruburu, 2012). Los resultados obtenidos en la investigación coinciden con Alvarado *et al.* (2019), Rozo y Serrano (2020) y Hidayah *et al.* (2021) quienes reportaron microorganismos benéficos aislados de la rizosfera de distintos cultivos.

Cinética de crecimiento y crioconservación de microorganismos

La fase exponencial de los microorganismos expuestos a 28 °C permitió definir el momento oportuno para la conservación de las cepas. En este sentido, los aislados SP13 (*Pseudomonas*) y SP15 (*Azotobacter*) crecieron exponencialmente a las 14 horas, siendo los más rápidos en contraste con los demás aislados. Al comparar los resultados obtenidos con el estudio realizado por Zavala *et al.* (2020) se observa que existe mayor velocidad de crecimiento bacteriano y la culminación de la fase exponencial ocurre a las 7 horas. Una posible razón podría ser el cambio de temperatura, ya que en el estudio se describe un crecimiento rápido cuando las cepas fueron expuestas a 30 °C.

Respecto a la conservación de los aislados bacterianos se utilizó glicerol en concentraciones del 20 % y 100 % debido a que Saeki (2015) informó que la conservación con este tipo de crioprotectores es una alternativa válida y presenta duración de al menos un año y seis meses. Escobar *et al.* (2011) consideran suficiente una concentración al 10 % de glicerol cuando los periodos de conservación son cortos, debido a no permitir la contaminación de los aislados puros. Por otro lado, Franco *et al.* (2006) y Fernández *et al.* (2013) conservaron cepas de *Penicillium* en agua destilada estéril y reportaron una alta viabilidad en los microorganismos al volver a reactivarlas, por ello, en la presente investigación se utilizó esta técnica de conservación para el género *Penicillium*.

Caracterización morfológica

A partir de la siembra en medios de cultivo específicos se obtuvieron 15 aislados bacterianos de *Azotobacter* (ZC1, MA4, LC5, LP8, SP11 y SP15), *Azospirillum* (MA3, LL7, SP12 y SP14) y *Pseudomonas* (MA2, LC6, SP9, SP10 y SP13) y 7 aislados fúngicos de *Penicillium*. Al respecto, los aislados de *Azotobacter* sembrados en medio de cultivo Ashby Sacarosa presentaron una coloración crema, bordes irregulares, elevación convexa y microscópicamente se observaron bacilos grandes con tinción Gram negativa, características similares fueron descritas por Huamán *et al.* (2021) en su investigación. Asimismo, las cepas de *Azospirillum* mostraron coloración translúcida, bordes ondulados, elevación convexa y microscópicamente se observaron bacilos Gram negativos al igual que lo reportado por Nava *et al.* (2017).

Referente a los aislados de *Pseudomonas*, las colonias presentaron un crecimiento abundante en medio de cultivo King B, una coloración amarillo verdoso, una ligera mucosidad, bordes ondulados, una elevación convexa y microscópicamente se observaron bacilos cortos, bacilos largos y una tinción de Gram negativa, características típicas del género *Pseudomonas* de acuerdo con lo mencionado por Álvarez *et al.* (2020). Con relación a la morfología de los aislados fúngicos, la observación macroscópica en estado inicial se manifestó de color blanco, mientras que al finalizar el crecimiento presentó una coloración verde oscuro con borde blanco, características similares fueron presentadas por Nuraini *et al.* (2017) en su estudio.

Caracterización bioquímica

- Motilidad

Varios autores afirman que la mayoría de las cepas de *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* presentan movilidad (Guzmán *et al.*, 2012; Ojeda *et al.*, 2016; Paz *et al.*, 2019), resultados que concuerdan a los descritos en la presente investigación. La motilidad permite al organismo convertir energía química en movimiento mediante un sistema motor (Pérez, 2019). Rodrigues *et al.* (2015) mencionan que el flagelo de *Azospirillum* participa en la adherencia de las raíces gracias a una adhesina presente en la parte más distal de la flagelina polar. Por su parte, Rico *et al.* (2021) refieren en *Azospirillum* una quimiotaxis hacia exudados radiculares, fenómeno que permite a la célula ubicarse en regiones adecuadas para su supervivencia y desarrollo.

- **Catalasa**

La reacción abundante de burbujas por parte de los aislados bacterianos MA3, SP11 y SP15 al entrar en contacto con el peróxido de hidrógeno, explica la presencia de la enzima catalasa en la membrana celular, misma que actúa como catalizador al desdoblar el peróxido de hidrógeno. Los resultados expuestos son corroborados por Curi *et al.* (2019) quienes aislaron bacterias a partir de la rizosfera de cultivos cafetaleros y reportaron positiva la prueba de catalasa aplicada a los géneros *Azospirillum* y *Pseudomonas*. De modo similar, Román *et al.* (2017) aislaron *Azotobacter* de los cultivos de papa y maíz, y los identificaron como promotores del crecimiento vegetal debido a la fijación biológica de nitrógeno y catalasa positiva.

Caracterización fisiológica

- **Fosfatos**

Los aislados SP9 (*Pseudomonas*) con 17,50 (IS) y MA16 (*Penicillium*) con 19,38 (IS) presentaron los mayores índices de solubilización de fosfatos. Los valores de SP9 son altos al compararlos con lo reportado por Restrepo *et al.* (2015) donde indican que el mayor índice de solubilización fue de 4,33 (IS) para *Pseudomonas* aislada de un cultivo de nabo (*Brassica campestris* L). Así también, los valores de MA16 son altos al compararlos con el estudio de Chan *et al.* (2018) donde reportan que mayor índice de solubilización de fosfatos fue de 5,60 (IS), mientras que el menor índice fue de 1,00 (IS) para el género *Penicillium* sp.

Asimismo, Arias *et al.* (2021) y Ascencio *et al.* (2021) evaluaron géneros de *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Penicillium* en condiciones de laboratorio al sembrarlos en medio de cultivo Agar Pikovskaya y los reportaron como solubilizadores de fosfatos al formar un halo translúcido alrededor de la colonia. El cambio de pH en el medio de cultivo se relaciona con la producción de algún ácido orgánico, esto indica que los aislados pueden producir ácidos orgánicos como estrategia para solubilizar fosfatos y de esta manera hacerlo aprovechable para las plantas (Ruiz *et al.*, 2021).

- **Actividad celulolítica**

Los aislados SP12 (*Azospirillum*) con 16,00 mm y LC21 (*Penicillium*) con 11,00 mm fueron los más efectivos en cuanto a la degradación de la celulosa. Estos valores son bajos comparados con el trabajo de Sánchez (2013) quien reporta un halo de hidrólisis de 33,00 mm, una posible

razón podría ser la diferencia de evaluación en el tiempo. En el presente trabajo se llevó a cabo hasta los 3 días de evaluación, sin embargo, en la investigación fueron hasta los ocho días.

Es necesario mencionar que la degradación de celulosa da como resultado la proporción de azúcares simples y energía fácilmente utilizable por los microorganismos, proceso primordial en la descomposición de la materia orgánica (Álvarez *et al.*, 2014). Por su parte, los géneros *Azospirillum* y *Penicillium* han sido ampliamente reportados por producir enzimas extracelulares y se destacan por encontrarse entre los más abundantes de la rizosfera de los suelos cultivables, especialmente en suelos ricos en materia orgánica (Cárdenas *et al.*, 2010; Galecio *et al.*, 2021; Morocho y Leiva, 2019).

- **Producción de sideróforos**

Los sideróforos también están asociados con la promoción del crecimiento vegetal debido a su estimulación mediante la proliferación de pelos radiculares y el incremento en la absorción de nutrientes (Wani *et al.*, 2013). Camelo y Bonilla (2011) describen a los sideróforos como moléculas quelantes de bajo peso molecular sintetizados por los microorganismos en respuesta a la limitación del hierro. Además, Parra (2017) menciona la capacidad de los mismos para actuar como un mecanismo antagónico de fitopatógenos, debido a que los sideróforos sintetizados por las rizobacterias absorben el hierro disponible e inhiben el crecimiento o la actividad metabólica de los patógenos.

El aislado ZC1 (*Azotobacter*) presentó capacidad para producir sideróforos. Los resultados concuerdan con Abdel *et al.* (2014) quienes reportaron la producción de sideróforos por parte del género *Azotobacter*. Florez *et al.* (2017) indicaron que los sideróforos de tipo biscatecolato y triscatecolato protoquelín sintetizados por *Azotobacter* están asociados con la captura de iones requeridos por el complejo enzimático de la nitrogenasa. En este sentido, la capacidad del aislado ZC1 para producir sideróforos es de suma importancia ya que podría ser utilizado como biocontrolador de microorganismos patógenos en el suelo por su alta capacidad de consumir hierro y por su aportación en el proceso de fijación biológica de nitrógeno.

- **Fijación biológica de nitrógeno**

El aislado MA3 (*Azospirillum*) presentó la mayor capacidad para crecer en un medio de cultivo libre de nitrógeno (NFB), lo que confirma la presencia de la enzima Nitrogenasa. La enzima Nitrogenasa es la encargada de romper el nitrógeno molecular (N₂) de la atmósfera para combinarlo con hidrógeno, y de esta manera formar amonio (Tortora *et al.*, 2019). Los resultados obtenidos son similares a lo reportado por Gómez *et al.* (2014), Ojeda *et al.* (2016), Alcarraz *et al.* (2019) y Velasco *et al.* (2020) quienes afirman que la mayoría de las cepas de *Azospirillum* pueden fijar nitrógeno atmosférico a la superficie de la tierra y contribuir al crecimiento de las plantas.

- **Producción de ácido indol-3-acético (AIA)**

Los aislados MA4 (*Azotobacter*) y MA3 (*Azospirillum*) presentaron los valores más altos (37,25 ppm y 34,96 ppm en promedio). Estos valores de AIA son bajos al compararlos con el estudio realizado por Cabello *et al.* (2014) donde las concentraciones de AIA para *Azotobacter* y *Azospirillum* alcanzan valores de hasta 118,00 ppm y 120,00 ppm respectivamente. Claramente, superan por mucho a los resultados obtenidos; dentro de las posibles razones es necesario considerar que los aislados son provenientes de suelos cultivables en las cuales se aplica una alta concentración de fertilizantes y esto puede afectar negativamente al mecanismo de secreción de la auxina de los microorganismos presentes en la zona de muestreo.

La producción de ácido indol-3-acético *in vitro* de los aislados bacterianos fue observada en presencia de L-triptófano, lo que refuerza el criterio de que este aminoácido podría ser el principal precursor para la biosíntesis de AIA por estos microorganismos mediante una conversión oxidativa (Lara *et al.*, 2011). Otros estudios refuerzan estas afirmaciones, dado que esta hormona está implicada directamente en el desarrollo de la raíz, alargamiento y división celular (Blanco y Castro, 2021), diferenciación de tejido, fototropismo (Licea *et al.*, 2020) y en la alteración de la fotosíntesis (Domingues *et al.*, 2020).

8. CONCLUSIONES

Se caracterizaron 22 aislados de microorganismos rizosféricos provenientes de suelos agrícolas de la provincia de Loja; de acuerdo con las características presentadas en los ensayos *in vitro*, se determina que 15 pertenecen a cepas bacterianas de los géneros *Azotobacter* (ZC1, MA4, LC5, LP8, SP11 y SP15), *Azospirillum* (MA3, LL7, SP12 y SP14) y *Pseudomonas* (MA2, LC6, SP9, SP10 y SP13) y 7 pertenecen a cepas fúngicas del género *Penicillium* sp (MA16, MA17, MA18, SP19, LC20, LC21 y MA22).

Todos los aislados bacterianos son motiles, los aislados SP13 y SP15 fueron los más rápidos en crecer exponencialmente, MA3, SP11 y SP15 liberaron la mayor cantidad de oxígeno al medio, MA3 fue la mejor cepa en la fijación biológica de nitrógeno, SP9 y MA16 solubilizaron la mayor cantidad de fosfatos, SP12 y LC21 degradaron la mayor cantidad de celulosa, MA4 presentó la mayor producción de AIA y ZC1 fue la única en producir sideróforos.

La caracterización de microorganismos rizosféricos permitió identificar a todas las cepas como promisorias de interés para bioinoculantes, debido a su capacidad frente a la solubilización de fosfatos, actividad celulolítica, producción de sideróforos, fijación biológica de nitrógeno, catalasa positiva, motilidad y producción de ácido indol-3-acético, lo cual significa una mayor disponibilidad de nutrientes en el suelo como el fósforo, hierro y nitrógeno, además de la aceleración del compostaje y la liberación de agua y oxígeno, características importantes que permiten contribuir con un mejor crecimiento en las plantas.

9. RECOMENDACIONES

Realizar la caracterización molecular complementaria a nivel genético para identificar la especie a la que pertenecen los aislados. Además, se sugiere ampliar la cobertura de monitoreo en la provincia de Loja con el propósito de aislar una mayor diversidad de microorganismos rizosféricos promotores del crecimiento vegetal.

Evaluar el índice de solubilización de fosfatos hasta las 120 horas para los aislados bacterianos y 72 horas para los aislados fúngicos ya que es el periodo de tiempo máximo de solubilización. Asimismo, considerar la producción de AIA de los aislados bacterianos hasta las 24 horas con el objetivo de escatimar recursos económicos.

Utilizar las cepas de *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Penicillium* sp. para realizar ensayos de inoculación en cultivos hortícolas que se encuentren establecidos en condiciones edafoclimáticas diferentes con la finalidad de corroborar el efecto positivo de las mismas en el crecimiento y desarrollo de las plantas, y de esta manera obtener datos necesarios que permitan producir bioinoculantes efectivos.

10. BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Fattah, DA, Eweda, WE, Zayed, MS y Hassanein, MK (2013). Efecto de los materiales portadores, el método de esterilización y la temperatura de almacenamiento sobre la supervivencia y las actividades biológicas del inoculante *Azotobacter chroococcum*. Anales de Ciencias Agrícolas, 58 (2), 111-118.

Alcarraz Curi, M., Heredia Jiménez, V., y Julian Ibarra, J. P. (2019). Cepas bacterianas nativas con actividades promotoras del crecimiento vegetal aisladas de la rizósfera de *Coffea* spp. en Pichanaqui, Perú. Biotecnología Vegetal, 19(4), 285-295.

Ali, SS y Vidhale, NN (2013). Sideróforo bacteriano y su aplicación: una revisión. Int J Curr Microbiol App Sci, 2 (12), 303-312.

Alvarado-Ibáñez, J. C., Estela-Urbina, R. O., López-Cuadra, Y. M., Santamaría-Baldera, N., Mori-Zavaleta, R., y Gutiérrez-Araujo, M. K. (2019). Aislamiento y evaluación de la actividad celulolítica de bacterias rizosféricas del Distrito de Bagua, Amazonas. REBIOL, 39(2), 41-48.

Álvarez-García, JA, Santoyo, G., y del Carmen Rocha-Granados, M. (2020). *Pseudomonas fluorescens*: Mecanismos y aplicaciones en la agricultura sustentable. Revista Latinoamericana De Recursos Naturales, 16 (1), 01-10.

Álvarez-López, C., Osorio-Vega, W., Díez-Gómez, M. C., y Marín-Montoya, M. (2014). Caracterización bioquímica de microorganismos rizosféricos de plantas de vainilla con potencial como biofertilizantes. Agronomía Mesoamericana, 25(2), 226-241.

Alvarez-Vera, M., Vázquez, J., Castillo, J., Tucta, F., Quispe, E., y Meza, V. (2018). Potencial de la flora de la provincia del Azuay (Ecuador) como fuente de microorganismos benéficos. Scientia Agropecuaria, 9(4), 561-568.

Arias Mota, R. M., Hernández Merel, N. D., Perea Rojas, Y. D. C., y de la Cruz Elizondo, Y. (2021). Estudio in vitro sobre hongos solubilizadores de fósforo bajo diferentes fuentes de carbono y nitrógeno.

Asgher, M., M. I. R. Khan, N. A. Anjum, y N. A. Khan. (2014). Minimising toxicity of cadmium in plants-role of plant growth regulators. Protoplasma 252: 399-413. doi: <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0710-4>.

Ascencio-Lino, T., Matamoros-Alcívar, E., Sandoya-Sánchez, V., Barcos-Arias, M., y Naranjo-Morán, J. (2021). Estudio exploratorio de bacterias solubilizadoras de fósforo en dos hábitats asociados con *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.

Barnett, H. L., y Hunter, B. B. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi (No. Ed. 4). American Phytopathological Society (APS Press).

Beltrán Pineda, M. E. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15(1), 101-113.

Blanco, E. L., y Castro, Y. (2021). Antagonismo de rizobacterias sobre hongos fitopatógenos, y su actividad microbiana con potencial biofertilizante, bioestimulante y biocontrolador. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 23(1), 6-16.

Cabello, R., Gamarra, M., y Ventocilla, D. G. (2014). Caracterización molecular de *Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp. y *Pseudomonas* sp. promotoras del crecimiento vegetal de cultivos de *Solanum tuberosum* y *Zea mays*. *Sagasteguiana*, 2(2), 145-156.

Callejas-Cañarte, G. V., Cisneros-Rojas, C. A., y Caicedo-Bejarano, L. D. (2018). Capacidad solubilizadora de fosfato de aluminio por hongos rizosféricos aislados de un Andisol colombiano. *Entramado*, 14(2), 218-227.

Camelo, M., Vera, S. P., y Bonilla, R. R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 12(2), 159-166.

Cárdenas, D. M., Garrido, M. F., Bonilla, R. R., y Baldani, V. L. (2010). Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. en pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) del Valle del Cesar. *Pastos y Forrajes*, 33(3), 1-1.

Carrasco, J., Millas, P., Santelices, C., y Castro, J. (2020). Identificación de Microorganismos. *Identificación de Microorganismos*. 1-16.

Carlina, S., Zúñiga, R., Inés, C., y Aristizábal, G. (2021). Manual práctico de microbiología básica. Editorial Universidad del Cauca.

Chan-Cupul, W., Juárez-González, M., Ruiz-Sánchez, E., Sánchez-Rangel, J. C., Molina-Ochoa, J., y Galindo-Velasco, E. (2018). Solubilización de fuentes inorgánicas de fósforo por micromicetos aislados de la rizosfera de papaya var. Maradol (*Carica papaya* L.) y su

susceptibilidad a herbicidas convencionales. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 34(2), 281-295.

Chanway, CP, Anand, R. y Yang, H. (2014). Fijación de nitrógeno fuera y dentro de los tejidos vegetales. En *Avances en biología y ecología de la fijación de nitrógeno*. InTechOpen.

Cisneros, C. A., y Sánchez de Prager, M. (2015). Solubilización de fosfatos por hongos asociados a un Andisol de tres agroecosistemas cafeteros de la región andina colombiana.

Cobas, H., Pavoni, S., Zayas, A., Rodríguez, F., Álvarez, E., y Contreras, R. (2007). Aplicación de la Voltametría en el Análisis del Crecimiento Microbiológico. In VII Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería. La Habana, Cuba.

Condori-Pacsi, S. J., Fernández-Guzman, P. R., y Valderrama-Valencia, M. R. (2019). Aislamiento y caracterización de *Streptomyces* spp rizosféricos promotores del crecimiento vegetal. *Idesia (Arica)*, 37(2), 109-116.

Curi, M. A., Jiménez, V. H., y Ibarra, J. P. J. (2019). Cepas bacterianas nativas con actividades promotoras del crecimiento vegetal aisladas de la rizosfera de *Coffea* spp. en Pichanaqui, Perú. *Biotecnología Vegetal*, 19(4), 285-295.

Díaz, A. (2003). La estructura de las catalasas. *Revista de educación bioquímica*, 22(2), 76.

Domingues Duarte, C. F., Cecato, U., Trento Biserra, T., Mamédio, D., y Galbeiro, S. (2020). *Azospirillum* spp. en gramíneas y forrajeras. Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 11(1), 223-240.

Escobar, C., Horna, Y., Carreño, C., y Mendoza, G. (2011). Caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* spp. y su efecto en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate” en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 2, 39–49.

Fábrega, J. H., Ábrego, I., y Aldrete, M. (2019). Identificación y capacidad degradadora de bacterias aisladas de suelos contaminados con hidrocarburos de desechos, Panamá. *Revista Colegiada de Ciencia*, 1(1), 30-42.

Fernández Andreu, C. M., Díaz Suárez, L. A., Illnait Zaragoza, M. T., Aragonés López, C., Martínez Machín, G., Perurena Lancha, M. R., y Rodríguez Gutiérrez, I. (2013). Conservación

de cultivos de hongos de importancia médica en agua destilada. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 65(3), 361-369.

Fernández, O. A., García, F. C., Saéz, N. J., y Valdezate, R. S. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. España.

Florez, P. A. V., Guerra, D. A. C., y Rosero, S. E. V. (2016). Capacidad y diversidad de bacterias celulolíticas aisladas de tres hábitats tropicales en Boyacá, Colombia. *Acta Agronomica*, 65(4), 2–7. <https://doi.org/10.15446/acag.v65n4.50181>

Florez-Márquez, J. D., Leal-Medina, G. I., Ardila-Leal, L. D., y Cárdenas-Caro, D. M. (2017). Aislamiento y caracterización de rizobacterias asociadas a cultivos de arroz (*Oryza sativa* L.) del Norte de Santander (Colombia). *Agrociencia*, 51(4), 373-391.

Franco-Correa, M., Henao, I., y Marín, G. (2006). Evaluación de métodos de conservación para *Aspergillus niger* con actividad enzimática amilolítica. *Universitas scientiarum*, 11(2), 51-60.

Galecio, M., Arteaga, M., Rojas, B., y Peña, R. (2021). Biofertilización con micro organismos eficientes de montaña para producción de cafés especiales resilientes al cambio climático provincia de San Ignacio. *Revista Científica Pakamuros*, 9(2), 58-72.

García, L. M., Uruburu, F. F (2012). La conservación de cepas microbianas. Colección Española de Cultivos Tipo. Universidad de Valencia. España.

Garrity, GM (2005). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: volumen dos Las proteobacterias Parte C Las proteobacterias alfa, beta, delta y épsilon*. DJ Brenner, NR Krieg y JT Staley (Eds.). Manual de confianza de Bergey.

Goljanian-Tabrizi, S., Amiri, S., Nikaein, D. y Motesharrei, Z. (2016). La comparación de cinco formulaciones líquidas de bajo costo para preservar dos bacterias solubilizadoras de fosfato de los géneros *Pseudomonas* y *Pantoea*. *Revista iraní de microbiología*, 8 (6), 377–382.

Gómez, M. M., Mercado, E. C., y Pineda, E. G. (2014). *Azospirillum* una rizobacteria con uso potencial en la agricultura. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias*, 16(1), 11-18.

Guzmán, A., Obando, M., Rivera, D., & Bonilla, R. (2012). Selección y caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*). *Revista colombiana de Biotecnología*, 14(1), 182-190.

Guzmán Cedeño, Á. M., Zambrano Pazmiño, D. E., Rivera Fernández, R. D., Rondón, A. J., Silva, M. L., y Pérez Quintana, M. (2015). Aislamiento y selección de bacterias autóctonas de Manabí-Ecuador con actividad celulolítica. *Cultivos Tropicales*, 36(1), 7-16.

Hernández Valencia, R. D., Juárez Maldonado, A., Pérez Hernández, A., Lozano Cavazos, C. J., Zermeño González, A., y González Fuentes, J. A. (2022). Influencia de fertilizantes orgánicos y del silicio sobre la fisiología, el rendimiento y la calidad nutracéutica del cultivo de fresa. *Nova scientia*, 14(28).

Hesse, C., Schulz, F., Bull, C. T., Shaffer, B. T., Yan, Q., Shapiro, N., Hassan, K. A., Varghese, N., Elbourne, L. D. H., Paulsen, I. T., Kyrpides, N., Woyke, T., y Loper, J. E. (2018). Genome-based evolutionary history of *Pseudomonas* spp. *Environmental Microbiology*, 20(6), 2142–2159. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14130>

Hidayah, B. N., Herawati, N., Aisah, A. R., y Utami, N. R. (2021). Diversity of fungi associated with rhizosphere of healthy and diseased garlic crop. *Biodiversitas*, 22(3), 1433–1440. <https://doi.org/10.13057/BIODIV/D220346>

Huamán-Castilla, N. L., Allcca-Alca, E. E., Allcca-Alca, G. J., y Quispe-Pérez, M. L. (2021). Biopolímeros producidos por *Azotobacter*: síntesis y producción, propiedades físico-mecánicas, y potenciales aplicaciones industriales. *Scientia Agropecuaria*, 12(3), 369-377.

ISAZA, M. C., RAMÍREZ, L. S. (2019). Actividad celulolítica de hongos aislados del jardín botánico de la universidad tecnológica de Pereira. *Microciencia*, 8, 12-19.

Jnawali. (2015). Evaluation of Maize Nutrient Contents in a Maize/Cowpea Intercropping Systems in South Africa. *Advances in Plants y Agriculture Research*, 2(6), 250–253. <https://doi.org/10.15406/apar.2015.02.00069>

Leal-Almanza, J., Gutiérrez-Coronado, M. A., Castro-Espinoza, L., Lares-Villa, F., Cortes-Jiménez, J. M., y Santos-Villalobos, S. D. L. (2018). Microorganismos promotores de crecimiento vegetal con yeso agrícola en papa (*Solanum tuberosum* L.) bajo casa sombra. *Agrociencia*, 52(8), 1149-1159.

Lara Mantilla, C., Oviedo Zumaqué, L. E., y Betancur Hurtado, C. A. (2011). Bacterias nativas con potencial en la producción de ácido indolacético para mejorar los pastos. *Zootecnia tropical*, 29(2), 187-194.

Licea-Herrera, J. I., Quiroz-Velásquez, J. D., y Hernández-Mendoza, J. L. (2020). Impact of *Azospirillum Brasilense*, a rhizobacterium stimulating the production of indole-3-acetic acid as the mechanism of improving plants' grow in agricultural crops. *Rev. Boliviana Quim*, 37, 34-39.

López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., y Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en discapacidad*, 3(1), 10-18.

López, LLMA, Aganon, CP y Juico, PP (2014). Aislamiento de especies de *Trichoderma* a partir de estiércol de carabao y evaluación de sus usos benéficos. *En t. J. Ciencia. Tecnología Res*, 3, 190-199.

Loredo-Osti, C., López-Reyes, L., y Espinosa-Victoria, D. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana*, 22(2), 225-239.

Matheus, P., Ramírez, E., Araque, J., Belandria, O., y Durán, J. (2016). Espectrofotometría de Absorción Molecular Ultravioleta como una herramienta para estudiar el crecimiento de Las Cepas ATCC 25922 Y ATCC 35218 de *Escherichia Coli*. *Acta Bioclínica*, 6(11), 44-59.

Marrero, M. A., Agaras, B., Mariana, A., Luis, G., y Wall, L. G. (2015). el rizoplasma de distintas especies cultivadas.

Meléndez-Jácome, M. R., Flor-Romero, L. E., Sandoval-Pacheco, M. E., Vasquez-Castillo, W. A., y Racines-Oliva, M. A. (2021). *Vaccinium* spp.: Karyotypic and phylogenetic characteristics, nutritional composition, edaphoclimatic conditions, biotic factors and beneficial microorganisms in the rhizosphere. *Scientia Agropecuaria*, 12(1), 109–120. <https://doi.org/10.17268/SCI.AGROPECU.2021.013>

Meléndez-Monroy, M., Aranda-Ocampo, S., Carrillo-Castañeda, G., Hernández-Morales, J., y Soto-Rojas, L. (2016). Rizobacterias nativas en jamaica antagonistas a *Phytophthora parasitica* Dastur: aislamiento y caracterización. *Revista fitotecnia mexicana*, 39(2), 151-158.

Mora, K. I. G., Araujo-Abad, S., Collahuazo-Reinoso, Y., Salas, Y. L., Rigaud, X. J., Robles-Carrión, Á., y Urgiles-Gómez, N. (2020). Caracterización morfológica y fisiológica de microorganismos rizosféricos nativos de sistemas agroforestales de café. *Bosques Latitud Cero*, 10(2), 124-136.

Morales-García, Y. E., Duque, E., Rodríguez-Andrade, O., De la Torre, J., Martínez-Contreras, R. D., Pérez-Terrón, R., y Muñoz-Rojas, J. (2010). Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *BioTecnología*, 14(2), 11-29.

Morejón, L., y Pardo, E. (2008). Microbiología I. Texto de Microbiología I, 107. <http://repositorio.una.edu.ni/2454/1/n579m838.pdf>

Morocho, M., y Leiva-Mora, M. (2019). Microorganismos eficientes, propiedades funcionales y aplicaciones agrícolas. *Centro Agrícola*, 46(2), 93-103.

Motta Escobar, S., Salazar Cabezas, L. D., y Sánchez Leal, L. C. (2022). Perspectiva del uso de *Pseudomonas* spp. como biocontrol de fitopatógenos en cultivos de hortalizas en Colombia: una revisión sistemática.

Nava-López, L. F., Camacho-Millán, R., Aguilar-Medina, E. M., Romero-Navarro, J. G., Sosa-Pérez, R., Ruiz-Abitia, A. I., ... y Ramos-Payán, R. (2017). Biofertilizer formulation from *Azotobacter* and *Azospirillum* regional isolates and its effect on sugar cane (*Saccharum officinarum*) in greenhouse Formulaci3n de biofertilizantes a partir de aislados regionales de *Azotobacter* y *Azospirillum* y su efecto en cultivo de caña de azúcar.

Narváez Baque, F. J., Barzola Miranda, S. E., Fon-Fay Vásquez, F. M., Martínez Chávez, M. J., Neira Mosquera, J. A., y Sánchez Llaguno, S. N. (2017). Potencial antifúngico de *Citrus sinensis* y *Citrus nobilis* sobre el crecimiento de *Rhizopus stolonifer* y *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya. *Ciencia y Tecnología (1390-4051)*, 10(1).

NURAINI, FR, SETYANINGSIH, R. y Susilowati, ARI (2017). Detección y caracterización de hongos endófitos como agentes antagonistas de *Fusarium oxysporum* en berenjena (*Solanum melongena*). *Revista Biodiversitas de Diversidad Biológica*, 18 (4), 1377-1384.

Ojeda-Quintana, L. J., Toledo-Vazquez, L., Hernández-Rodríguez, C., Machado-Díaz, Y., y Furrázola-Gómez, E. (2016). Influencia de la aplicaci3n de *Azospirillum lipoferum* en

Megathyrus maximus vc. guinea tobiatá en un suelo Pardo Grisáceo. Pastos y Forrajes, 39(1), 27-32.

Osorio-Vega, N. W. (2009). Microorganismos del suelo y su efecto sobre la disponibilidad y absorción de nutrientes por las plantas. Materia Orgánica Biología Del Suelo y Productividad Agrícola: Segundo Seminario Regional Comité Regional Eje Cafetero, 43–71. https://doi.org/10.38141/10791/0003_3

Parra-Cota, F. I. (2017). Potencial agrobiotecnológico de bacterias aisladas de suelos agrícolas asociados al cultivo de maíz en el Valle del Fuerte, Sinaloa. Revista Latinoamericana de Recursos Naturales, 13(2), 51-57.

Paz-Zarza, V. M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S. G., y Vázquez-López, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. Revista chilena de infectología, 36(2), 180-189.

Pedraza, R. O., Filippone, M. P., Fontana, C., Salazar, S. M., Ramírez-Mata, A., Sierra-Cacho, D., y Baca, B. E. (2020). *Azospirillum*. In Beneficial Microbes in Agro-Ecology. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823414-3.00006-x>

Pedraza, RO, Teixeira, KR, Scavino, AF, de Salamone, IG, Baca, BE, Azcón, R., ... y Bonilla, R. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. Ciencia y Tecnología Agropecuaria, 11 (2), 155-164.

Pérez-Varela, M. (2019). Motilidad y virulencia en el patógeno nosocomial *Acinetobacter baumannii*.

Pitt, J.I. (2014). Encyclopedia of Food Microbiology || *PENICILLIUM* | *Penicillium* and *Talaromyces*. 6–13. doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00248-2

Padrón-Rodríguez, L., Arias-Mota, R. M., Medel-Ortíz, R., y la Cruz-Elizondo, D. (2020). Interacción de hongos micorrízicos arbusculares y una cepa fosfato solubilizadora en *Canavalia ensiformis* (Fabaceae). Botanical Sciences, 98(2), 278-287.

Reiner, K. (2010). Catalase test protocol. *American society for microbiology*, 1-6.

Restrepo-Franco, G. M., Marulanda-Moreno, S., de la Fe-Pérez, Y., Díaz-de la Osa, A., Lucia-Baldani, V., y Hernández-Rodríguez, A. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 46(1), 63-76.

Rico-Jiménez, M., Muñoz-Mira, S., Krell, T., y Matilla, M. A. (2021). Relevancia de la quimiotaxis bacteriana para la colonización e infección de plantas.

Román, N., Mamani, G., y García, D. (2017). Caracterización molecular de bacteria *Azospirillum* sp, *Azotobacter* sp y *Pseudomonas* sp. promotoras del crecimiento vegetal de cultivos de *Solanum tuberosum* y *Zea mays*. *Prospectiva Universitaria*, 10(1).

Rodrigues, AC, Bonifacio, A., Araujo, FFD, Junior, MAL, y Vale Barreto Figueiredo, MD (2015). *Azospirillum* sp. como un desafío para la agricultura. En *Metabolitos bacterianos en agroecosistemas sostenibles* (págs. 29-51). Springer, Cham.

Rodríguez-Sahagún, A., Velasco-Jiménez, A., Castellanos-Hernández, O., Acevedo-Hernández, G., y Clarenc Aarland, R. (2020). Bacterias rizosféricas con beneficios potenciales en la agricultura. *Revista Terra Latinoamericana*, 38(2), 333–345. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i2.470>

Rozo, L. Y. M., y Serrano, F. G. (2020). Identificación de bacterias diazotróficas rizosféricas y endófitas asociadas a *Lycopersicon esculentum* mill en el norte de Santander, Colombia. *Agrociencia*, 54(7), 843-857.

Rubio, C., García, A., y Cardona, F. (2015). Técnicas básicas de microbiología y bioquímica. *Síntesis*, 15–24.

Ruiz-Chután, J. A., Berdúo-Sandoval, J. E., Sacbajá, A., Kalousová, M., Lojka, B., Fernández, E., ... y Sánchez-Pérez, A. (2021). Eficiencia de solubilización de fósforo de aislados nativos guatemaltecos de *Pseudomonas fluorescens*. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 8(2), 184-201.

Saeki, E. K. S. (2015). Eficiência dos crioprotetores glicerol e leite desnatado para o congelamento de micro-organismos. *Acta Veterinaria Brasilica*, 9(2), 195-198.

Salgado-Bernal, I., Martínez-Sardiñas, A., Carballo-Valdés, M. E., Cruz-Arias, M., y del Carmen Durán-Domínguez, M. (2012). Diversidad de las bacterias rizosféricas asociadas a

plantas de *Typha dominguesis* en humedales del río Almendares. Revista CENIC Ciencias Biológicas, 43(1), 01-07.

Sanz, Susana. (2011). *Prácticas de Microbiología*. Universidad de la Rioja. Segunda Edición.

Sánchez Garibello, A. M. (2013). Evaluación de la degradación del tamo de arroz por hongos celulolíticos aislados de suelos de cultivo de arroz. Posgrado Interfacultades en Microbiología.

Sánchez-Yáñez, J. M., Velázquez-Medina, A., Cabrera-Reinaldo, I., Amador-Vargas, W. L., & Vela-Muzquiz, G. R. (2022). Supervivencia de *Azotobacter* y otros grupos microbianos en suelo seco almacenado. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 13(1), 3-15.

Sasirekha, B. y Srividya, S. (2016). Producción de sideróforos por *Pseudomonas aeruginosa* FP6, una cepa de control biológico de *Rhizoctonia solani* y *Colletotrichum gloeosporioides* que causan enfermedades en Chile. *Agricultura y Recursos Naturales*, 50 (4), 250-256.

Sulieman, S. y Tran, LSP (2015). Homeostasis del fósforo en nódulos de leguminosas como estrategia adaptativa a la deficiencia de fósforo. *Ciencia vegetal*, 239, 36-43.

Tolosa Moreno, D. L., y Lizarazo Forero, L. M. (2018). Poblaciones microbianas asociadas a la rizósfera y filósfera de plantas de uchuva (*Physalis peruviana* L.).

Torres-Gutiérrez, R., Granda-Mora, K. I., Alvarado-Capó, Y., Rodríguez, A. S., Mogollón, N. G. S., y Almeida, J. R. de. (2017). Genetic and phenotypic diversity of *Rhizobium* isolates from Southern Ecuador. *Ciencia e Agrotecnología*, 41(6), 634–647. <https://doi.org/10.1590/1413-70542017416008517>

Tortora, M. L., Vera, L., Grellet-Naval, N., Dantur, K., Núñez, M. D. L. Á., Alderete, M., y Romero, E. R. (2019). Aislamiento, caracterización y actividad de cepas de *Azospirillum brasilense* asociadas a la caña de azúcar. *Cultivos Tropicales*, 40(1).

UYPAN FARRO, Carlos Jair¹; GARCÍA GUERRERO, M. A., y CARREÑO FARFÁN, Carmen Rosa³; ARELLANO SÁNCHEZ, César Wilson⁴; ZÚÑIGA VALDERA, G. E. (2021). Hongos rizosféricos de *Echinopsis pachanoi* “San Pedro hembra” y su potencial como promotores de crecimiento en *Zea mays* L. bajo estrés salino. *UCV HACER*. 10(2). 2414-8695.

Vásconez, R. D. A., Mossot, J. E. M., Shagñay, A. G. O., Tenorio, E. M., Utreras, V. P. C., y Suquillo, I. D. L. Á. V. (2020). Evaluación de *Bacillus* spp. como rizobacterias promotoras del

crecimiento vegetal (RPCV) en brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) y lechuga (*Lactuca sativa*). *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 21(3), 1-16.

Vázquez, C., Martín, A., de Silóniz, M. I., y Serrano, S. (2011). Técnicas básicas de Microbiología. Observación de bacterias. *Reduca (Biología)*, 3(5).

Velasco-Jiménez, A., Castellanos-Hernández, O., Acevedo-Hernández, G., Aarland, R. C., y Rodríguez-Sahagún, A. (2020). Bacterias rizosféricas con beneficios potenciales en la agricultura. *Terra Latinoamericana*, 38(2), 333-345.

Wani, SA, Chand, S. y Ali, T. (2013). Uso potencial de *Azotobacter chroococcum* en la producción de cultivos: una descripción general. *Curr Agric Res J*, 1 (1), 35-38.

Zavala, J., Alcarraz, M., y Julian, J. (2020). Evaluación para la producción de *Azotobacter* sp. promotor de crecimiento para cultivos de *Coffea arabica*. *Ciencia e Investigación*, 23(1), 45-50.

11. ANEXOS

Anexo 1: evidencia fotográfica



Foto 1: Muestra de suelo recolectado



Foto 2: Balanza analítica para el pesado de muestras.



Foto 3: Vortex de la muestra para preparar diluciones seriadas.

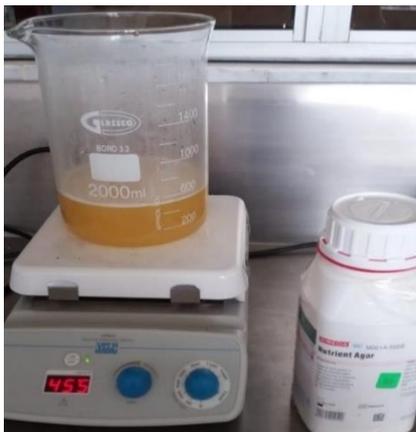


Foto 4: Preparación de medio de cultivo Agar Nutriente



Foto 5: Preparación de medio de cultivo Rosa de Bengala

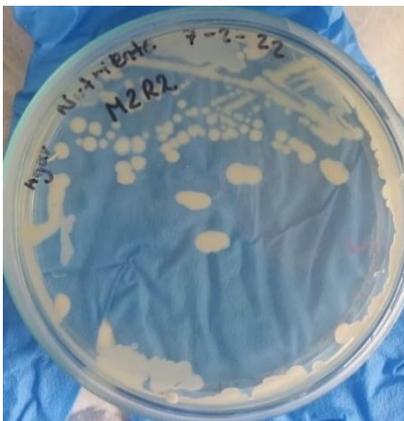


Foto 6: Crecimiento bacteriano



Foto 7: Crecimiento fúngico

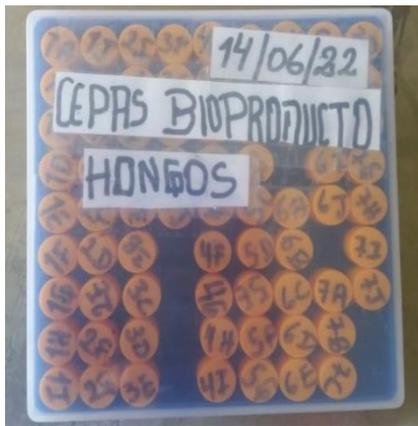


Foto 8: Crioconservación de hongos.



Foto 9: Crioconservación de bacterias.

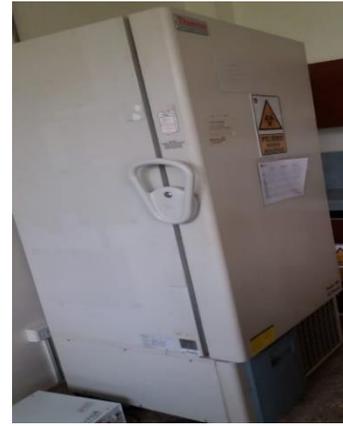


Foto 10: Ultracongelador.

Aislado bacteriano	Glicerol al 20 % con perlas		Glicerol al 100 % con perlas		Glicerol al 20 % sin perlas						Glicerol al 100 % sin perlas					
	1A	1B	1C	1D	1E	1F	1G	1H	1I	1J	1K	1L	1M	1N	1O	1P
ZC1	1A	1B	1C	1D	1E	1F	1G	1H	1I	1J	1K	1L	1M	1N	1O	1P
MA2	2A	2B	2C	2D	2E	2F	2G	2H	2I	2J	2K	2L	2M	2N	2O	2P
MA3	3A	3B	3C	3D	3E	3F	3G	3H	3I	3J	3K	3L	3M	3N	3O	3P
MA4	4A	4B	4C	4D	4E	4F	4G	4H	4I	4J	4K	4L	4M	4N	4O	4P
LC5	5A	5B	5C	5D	5E	5F	5G	5H	5I	5J	5K	5L	5M	5N	5O	5P
LC6	6A	6B	6C	6D	6E	6F	6G	6H	6I	6J	6K	6L	6M	6N	6O	6P
LP7	7A	7B	7C	7D	7E	7F	7G	7H	7I	7J	7K	7L	7M	7N	7O	7P
LP8	8A	8B	8C	8D	8E	8F	8G	8H	8I	8J	8K	8L	8M	8N	8O	8P
SP9	9A	9B	9C	9D	9E	9F	9G	9H	9I	9J	9K	9L	9M	9N	9O	9P
SP10	10A	10B	10C	10D	10E	10F	10G	10H	10I	10J	10K	10L	10M	10N	10O	10P
SP11	11A	11B	11C	11D	11E	11F	11G	11H	11I	11J	11K	11L	11M	11N	11O	11P
SP12	12A	12B	12C	12D	12E	12F	12G	12H	12I	12J	12K	12L	12M	12N	12O	12P
SP13	13A	13B	13C	13D	13E	13F	13G	13H	13I	13J	13K	13L	13M	13N	13O	13P
SP14	14A	14B	14C	14D	14E	14F	14G	14H	14I	14J	14K	14L	14M	14N	14O	14P
SP15	15A	15B	15C	15D	15E	15F	15G	15H	15I	15J	15K	15L	15M	15N	15O	15P

Cuadro 1: bitácora de conservación de aislados bacterianos

Aislados fúngicos

		1A	1J	2H	3F	4A	4J	5H	6F	7D
1	MA16	1B		2I	3G	4B		5I	6G	7E
2	MA17	1C	2A	2J	3H	4C	5A	5J	6H	7F
3	MA18	1D	2B		3I	4D	5B		6I	7G
4	SP19	1E	2C	3A	3J	4E	5C	6A	6J	7H
5	LC20	1F	2D	3B		4F	5D	6B		7I
6	LC21	1G	2E	3C		4G	5E	6C	7A	7J
7	MA22	1H	2F	3D		4H	5F	6D	7B	
		1I	2G	3E		4I	5G	6E	7C	

Cuadro 2: bitácora de conservación de aislados fúngicos



Foto 11: Fijación de la muestra para tinción de Gram

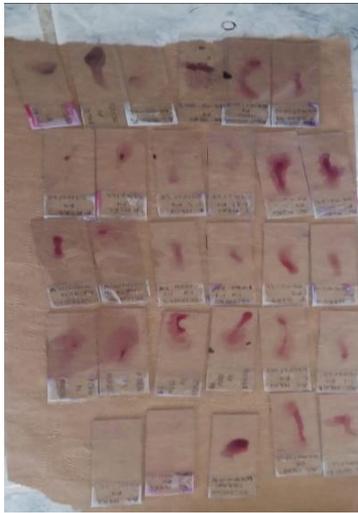


Foto 12: Placas de tinción de Gram

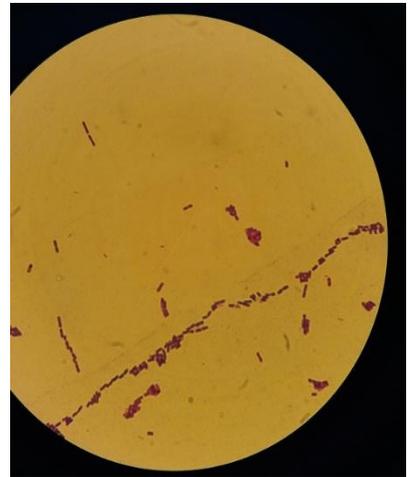


Foto 13: Observación microscópica de bacilos gran negativos.



Foto 14: Tinción con lactofenol.

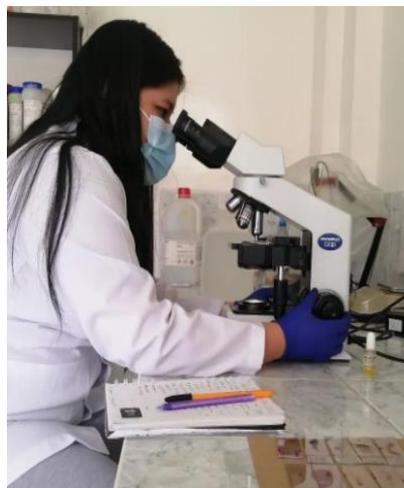


Foto 15: Observación microscópica



Foto 16: Observación microscópica de estructuras fúngicas.

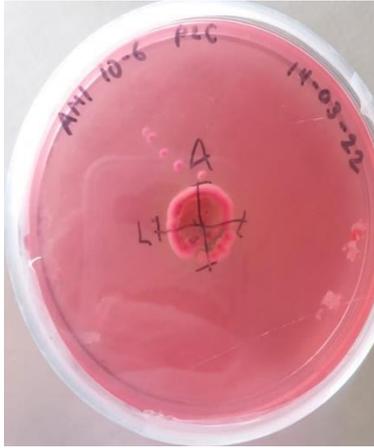


Foto 17: Medición de crecimiento radial.

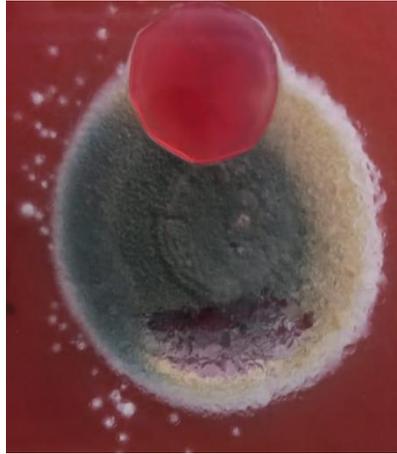


Foto 18: Crecimiento radial de hongos.

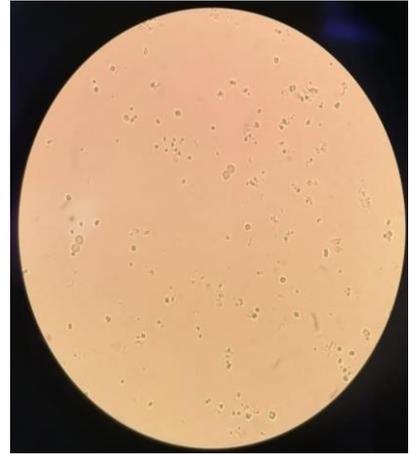


Foto 19: Conteo de conidios.



Foto 20: Reacción positiva a la prueba catalasa.

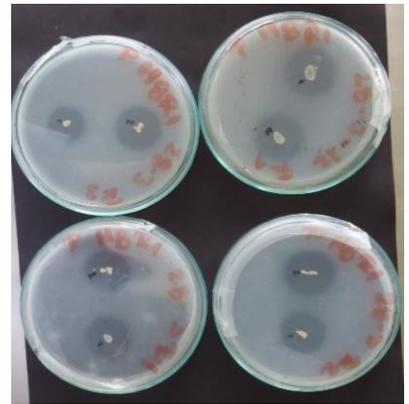


Foto 21: Formación de halo de solubilización de fosfatos.



Foto 22: formación de halo de actividad celulolítica de bacterias.

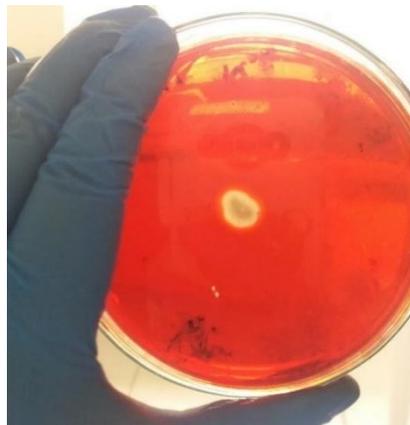


Foto 23: formación de halo de actividad celulolítica de hongos.

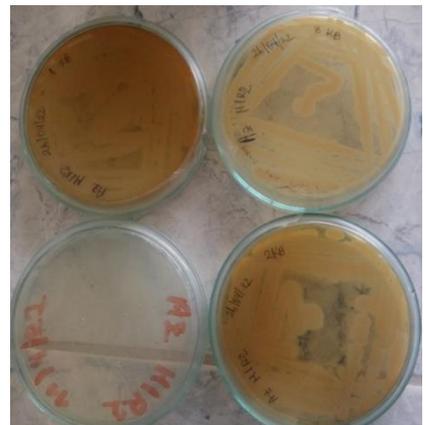


Foto 24: Cambio de color en el medio de cultivo como indicador de la producción de sideróforos.

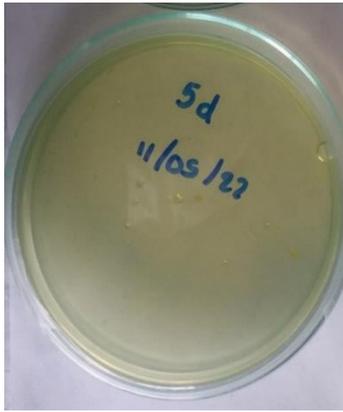


Foto 25: Aislado bacteriano no fijador de nitrógeno.

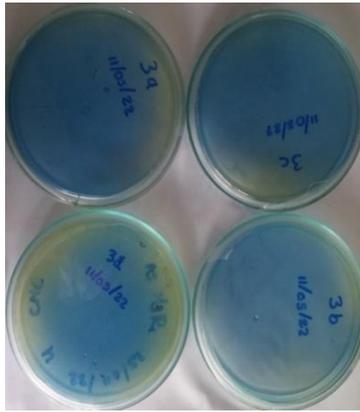


Foto 26: Cambio de color en el medio de cultivo como indicador de la fijación de nitrógeno.



Foto 27: Preparación de la curva de calibración de AIA

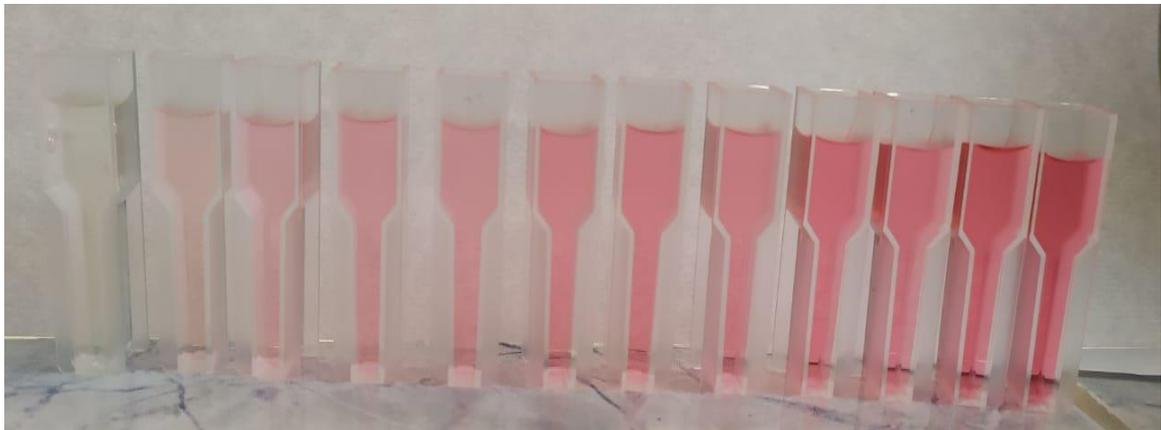


Foto 28: Reacción al reactivo Salkovski

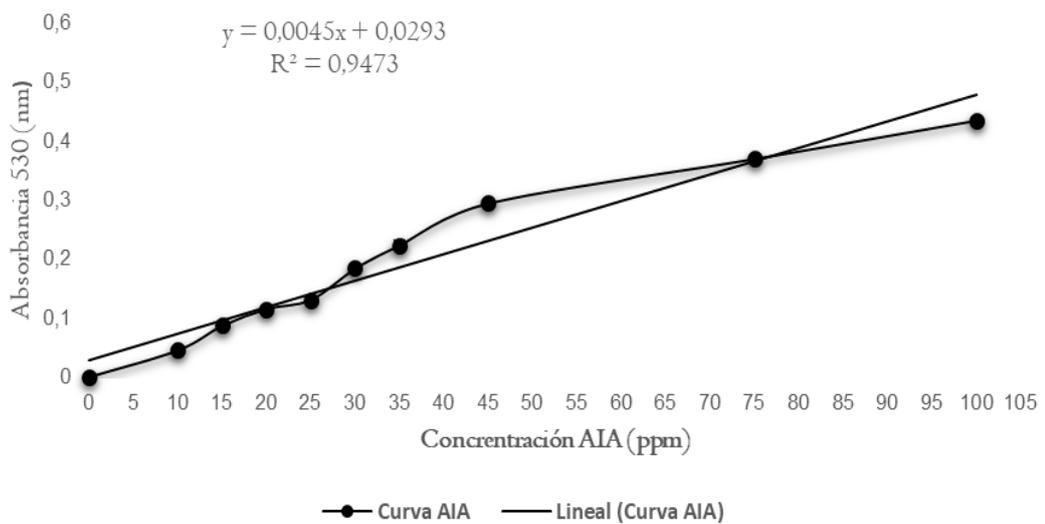


Foto 29: Curva de calibración de ácido indol-3acético



Foto 30: Divulgación de resultados en el séptimo ciclo de la carrera de Agronomía. 15 de julio del 2022.

Anexo 2: Componentes de los medios de cultivo utilizados

- **Agar nutriente**

COMPUESTO	g/L
Peptona	5,00
Extracto de levadura	3,00
Cloruro de sodio	5,00
Agar bacteriológico	15,00

- **Medio de cultivo específico para *Azospirillum***

COMPUESTO	g/L
Glucosa	10,00
NaCl	0,01
CaCl ₂	0,02
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,01
Na ₂ MoO ₄	0,02
K ₂ HPO ₄	6,00
KH ₂ PO ₄	0,02
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,01
Bromotimol azul	(5 % en etanol) 5 mL
Agar	15,00

- **Medio de cultivo específico para *Azotobacter***

COMPUESTO	g/L
Glucosa	5,00
Mannitol	5,00
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,10
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,10
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	5,00
K ₂ HPO ₄	0,90
KH ₂ PO ₄	0,10
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,01
CaCO ₃	5,00
Agar	15,00
pH 6.8 – 7.0	

- **Medio de cultivo específico para *Pseudomonas***

COMPUESTO	g/L
Trytone	10,00
Protease peptone	10,00
K ₂ HPO ₄	1,50
MgSO ₄	1,50
Glicerol	7,92 ml
Agar	15,00
pH 7	

- **Medio Nfb**

COMPUESTO	g/L
Ácido málico	5,00
K ₂ HPO ₄	0,05
EDTA Fe y Na	0,01
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,001
MnSO ₄ X 2 H ₂ O	0,002
MgSO ₄ X H ₂ O	0,20
NaCl	0,1
CaCl ₂ X 2 H ₂ O	0,026
Biotina	0,0001
Agar	15,00
Azul de bromotimol	0,0375
pH 6	

- **Medio King B**

COMPUESTO	g/L
Peptona de proteosa	20,00
Fosfato de hidrógeno dipotásico	1,50
Sulfato de magnesio heptahidrato	1,50
Agar	20,00

- **Medio Agar Carboximetil Celulosa**

COMPUESTO	g/L
CMC	10,00
Extracto de levadura	2,50
Peptona	2,50
Sulfato de amonio	0,50
ClCa	0,50
KH ₂ PO ₄	0,10
K ₂ HPO ₄	0,10
Agar	15,00
pH 7	

- **Medio Agar Pikovskaya**

COMPUESTO	g/L
Extracto de levadura	0,50
Dextrosa	10,00
Fosfato de calcio	5,00
Sulfato de amonio	0,50
Cloruro de potasio	0,20
Sulfato de magnesio	0,10
Sulfato de manganeso	0,0001
Sulfato de hierro	0,0001
Agar	15,00
pH 7	

Anexo 4. Promedio de triplicados y desviación estándar obtenidos de la cinética de crecimiento bacteriano.

Hora	ZC1		MA2		MA3		LC5		SP14		SP15	
	Promedio	Desviación estándar										
0	0,001	0,001	0,002	0,001	0,001	0,000	0,001	0,000	0,001	0,000	0,002	0,001
0,3	0,001	0,001	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,003	0,002	0,020	0,000
1	0,002	0,000	0,002	0,001	0,000	0,000	0,002	0,002	0,003	0,002	0,048	0,019
3	0,003	0,001	0,003	0,001	0,018	0,022	0,004	0,003	0,007	0,002	0,004	0,003
6	0,010	0,006	0,009	0,007	0,020	0,006	0,004	0,003	0,028	0,006	0,009	0,005
8	0,023	0,026	0,028	0,023	0,088	0,020	0,036	0,017	0,038	0,003	0,050	0,009
10	0,065	0,008	0,065	0,008	0,211	0,020	0,051	0,030	0,147	0,023	0,014	0,009
12	0,287	0,010	0,290	0,010	0,326	0,016	0,092	0,024	0,308	0,011	0,280	0,014
14	0,290	0,019	0,290	0,019	0,334	0,010	0,107	0,008	0,284	0,020	0,299	0,017
16	0,396	0,003	0,379	0,003	0,341	0,003	0,183	0,005	0,331	0,017	0,366	0,004
18	0,456	0,006	0,448	0,023	0,426	0,019	0,369	0,025	0,396	0,014	0,443	0,011
20	0,672	0,029	0,645	0,014	0,529	0,015	0,495	0,024	0,528	0,017	0,533	0,020
22	0,676	0,021	0,643	0,012	0,571	0,012	0,465	0,022	0,593	0,015	0,440	0,027
24	0,640	0,011	0,643	0,012	0,573	0,019	0,452	0,013	0,490	0,008	0,455	0,020
26	0,632	0,029	0,641	0,018	0,555	0,000	0,446	0,019	0,511	0,021	0,483	0,033
28	0,630	0,006	0,678	0,002	0,562	0,015	0,494	0,028	0,521	0,015	0,460	0,007

4.1. Promedio de triplicados y desviación estándar de los aislados ZC1, MA2, MA3, LC5, SP14 y SP15.

Hora	MA4		LC6		LL7		LL8		SP9	
	Promedio	Desviación estándar								
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000
0,3	0,002	0,001	0,004	0,006	0,001	0,001	0,002	0,003	0,001	0,001
1	0,003	0,001	0,002	0,002	0,001	0,001	0,002	0,002	0,001	0,001
3	0,010	0,007	0,024	0,005	0,000	0,000	0,009	0,011	0,010	0,009
6	0,003	0,002	0,008	0,012	0,002	0,003	0,003	0,002	0,000	0,000
8	0,006	0,000	0,004	0,002	0,007	0,005	0,028	0,031	0,003	0,001
10	0,011	0,007	0,009	0,000	0,032	0,022	0,060	0,024	0,009	0,002
12	0,018	0,002	0,069	0,002	0,073	0,023	0,273	0,012	0,028	0,007
14	0,206	0,033	0,473	0,027	0,213	0,052	0,509	0,013	0,374	0,010
16	0,533	0,022	0,743	0,053	0,511	0,041	0,689	0,030	0,592	0,013
18	0,759	0,075	0,949	0,094	0,722	0,027	0,817	0,039	0,767	0,014
20	0,934	0,120	1,086	0,095	0,887	0,037	0,923	0,040	0,840	0,020
22	1,039	0,124	1,242	0,033	0,983	0,013	0,995	0,042	0,962	0,040
24	1,071	0,125	1,281	0,043	1,044	0,021	1,073	0,036	0,952	0,040
26	1,143	0,119	1,309	0,031	1,126	0,023	1,153	0,036	0,993	0,019
28	1,369	0,246	1,329	0,045	1,190	0,027	1,220	0,042	1,736	0,037
30	1,098	0,166	1,381	0,029	1,255	0,018	1,279	0,033	1,709	0,030
32	0,782	0,050	1,544	0,092	1,303	0,011	1,324	0,031	1,224	0,038
34	0,543	0,012	1,310	0,038	1,338	0,009	1,359	0,030	0,586	0,037
36	0,350	0,111	0,196	0,057	1,389	0,008	1,408	0,024	0,377	0,018
38	0,010	0,002	0,045	0,015	1,362	0,009	1,452	0,028	0,332	0,014
40	0,009	0,001	0,040	0,017	1,450	0,008	1,491	0,016	0,312	0,018
42	0,074	0,003	0,121	0,010	1,502	0,004	1,520	0,019	0,386	0,009
44	0,080	0,003	0,035	0,015	1,539	0,027	1,499	0,041	0,450	0,005
46	0,037	0,003	0,040	0,004	1,535	0,019	1,496	0,062	0,353	0,001
48	0,029	0,003	0,065	0,027	1,530	0,025	1,500	0,028	0,450	0,003

4.2. Promedio de triplicados y desviación estándar de los aislados MA4, LC6, LL7, LL8 y SP9.

Hora	SP10		SP11		SP12		SP13	
	Promedio	Desviación estándar						
0	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,013	0,000
0,3	0,002	0,000	0,000	0,000	0,008	0,007	0,001	0,006
1	0,008	0,007	0,010	0,014	0,012	0,008	0,001	0,004
3	0,016	0,011	0,004	0,002	0,009	0,005	0,010	0,009
6	0,000	0,000	0,001	0,000	0,003	0,003	0,039	0,018
8	0,003	0,001	0,007	0,000	0,005	0,003	0,327	0,054
10	0,002	0,002	0,001	0,000	0,045	0,030	0,602	0,048
12	0,016	0,007	0,005	0,004	0,173	0,080	0,779	0,038
14	0,180	0,010	0,000	0,000	0,481	0,014	0,934	0,039
16	0,568	0,013	0,001	0,000	0,706	0,004	1,068	0,029
18	0,800	0,014	0,053	0,031	0,726	0,017	1,124	0,014
20	0,947	0,020	0,239	0,002	0,852	0,018	1,228	0,023
22	1,017	0,040	0,565	0,031	0,920	0,042	1,255	0,008
24	0,974	0,040	0,696	0,062	1,076	0,006	1,214	0,029
26	0,979	0,019	0,906	0,043	1,136	0,004	1,188	0,018
28	0,873	0,037	1,023	0,038	1,201	0,009	1,154	0,029
30	0,806	0,030	1,102	0,053	1,221	0,014	1,103	0,030
32	0,684	0,038	1,068	0,030	1,218	0,076	1,059	0,030
34	0,492	0,037	0,472	0,082	1,092	0,010	1,011	0,024
36	0,194	0,018	0,168	0,045	1,075	0,024	0,983	0,018
38	0,039	0,014	0,265	0,073	1,119	0,060	0,943	0,015
40	0,065	0,018	0,235	0,004	1,099	0,054	0,925	0,019
42	0,028	0,009	0,291	0,051	1,142	0,011	0,905	0,010
44	0,017	0,005	0,206	0,011	1,041	0,020	0,890	0,014
46	0,017	0,001	0,123	0,022	0,707	0,013	0,883	0,011
48	0,013	0,003	0,110	0,008	0,686	0,038	0,884	0,020

4.3. Promedio de triplicados y desviación estándar de los aislados SP10, SP11, SP12 y SP13.

Anexo 5: Análisis estadístico de datos

Aislado	Género	Absorbancia/horas		
		48	72	96
ZC1	<i>Azotobacter</i>	11,5 de	30,83 ab	24,67 ns
MA2	<i>Pseudomonas</i>	36,0 abc	17,33 bc	15,33 ns
MA3	<i>Azospirillum</i>	41,67 a	30,17 ab	14,83 ns
LC5	<i>Azotobacter</i>	39,0 ab	16,83 bc	14,00 ns
SP14	<i>Azospirillum</i>	10,67 de	22,50 abc	13,50 ns
SP15	<i>Azotobacter</i>	24,83 abcd	40,33 a	38,17 ns
MA4	<i>Azotobacter</i>	41,33 a	35,50 ab	37,17 ns
LC6	<i>Pseudomonas</i>	16,83 cde	20,33 abc	26,00 ns
LL7	<i>Azospirillum</i>	20,17 bcde	6,33 c	36,67 ns
LL8	<i>Azotobacter</i>	27,17 abcd	15,50 bc	14,00 ns
SP9	<i>Pseudomonas</i>	28,0 bcd	32,50 ab	15,50 ns
SP10	<i>Pseudomonas</i>	10,50 de	19,50 abc	16,00 ns
SP11	<i>Azotobacter</i>	14,83 de	14,67 bc	34,50 ns
SP12	<i>Azospirillum</i>	2,33 e	8,67 c	15,50 ns
SP13	<i>Pseudomonas</i>	20,17 abcd	34,00 ab	29,17 ns
	EE \bar{x} \pm	0,0144	0,0092	0,0218

ZC: Zapotillo – cebolla; MC: Macará – arroz; LC: Loja – coliflor; LL: Loja – lechuga; SP: Saraguro – papa. Medidas con letras distintas en cada columna difieren según la prueba de Kruskal Wallis ($\alpha < 0,05$) (n = 135). EE \bar{x} \pm Error Estándar de la media.

Anexo 5. Rangos obtenidos mediante la prueba no paramétrica de la producción de AIA de los aislados bacterianos

Anexo 6. Certificación de traducción del Abstract

ABSTRACT

Beneficial rhizospheric microorganisms are noted for increasing nutrient availability, producing hormones and protecting plants against biotic and abiotic stresses. The objective of this work was to characterize rhizospheric microorganisms isolated from agricultural soils of the province of Loja in order to select promising strains of interest as bioinoculants. Soil samples of horticultural crops (1 kg per site) were collected from the most representative areas of the Zapotillo, Macará, Saraguro and Loja cantons by simple random sampling and then transported to the Biotechnology Center of the National University of Loja. For the isolation of rhizospheric microorganisms, serial dilutions of each sample of up to 10^{-3} and 10^{-4} were made and sown in triplicate in Petri dishes with Nutrient Agar for bacteria and Rose Bengal for fungi, incubated at 26 °C and 28 °C for 48 and 72 hours respectively, then, the microorganisms that presented morpho-cultural characteristics of interest were purified. After the determined incubation period and in relation to the results of the growth kinetics, the bacterial isolates were preserved in glycerol (20 % and 100 %) and the fungal isolates in sterile distilled water for subsequent morphological, biochemical and physiological characterization. In all cases, the rhizospheric isolates showed interesting characteristics such as motility, positive catalase, phosphate solubilization, cellulolytic activity, siderophore production, biological nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production, with the MA3 strain from the Macará canton standing out. Therefore, these promising results lay the groundwork for the selection of strains with the ability to promote plant growth that could be an alternative to chemical fertilization in cultivars of agricultural interest.

Key words: Rhizospheric microorganisms, growth kinetics, cryopreservation, motility, phosphate solubilization, siderophore production, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas* and *Penicillium* sp.

Yo, Ángel Darío Jiménez Vera, por la presente certifico que traduje el documento adjunto del idioma español al inglés y que, es una traducción correcta de acuerdo a los documentos originales. Así lo certifico, en base a la formación de grado en la enseñanza del Idioma Inglés como lengua extranjera.


Darío Jiménez V.
ENGLISH TEACHER
REG. 1008-2018-1998231
CHECKED
Lic. Ángel Darío Jiménez Vera
LICENCIADO EN CIENCIAS DE LA EDUCACION MENCION IDIOMA INGLES
Registro Senescyt: 1008-2018-1998231

08 de noviembre, 2022