



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA EN
BIOTECNOLOGÍA**

AUTOR: ANA KATHERINE PINCAY VERDEZOTO

**TEMA: “CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE BACTERIAS
Pseudomonas sp. SOLUBILIZADORAS DE FÓSFORO, PRESENTES EN LA
RIZÓSFERA DEL MAÍZ (*Zea mays* L) DE LOS ENSAYOS
EXPERIMENTALES DEL INIAP DE LAS PROVINCIAS DE IMBABURA,
BOLÍVAR, CHIMBORAZO Y PICHINCHA”**

DIRECTOR: ING. JESSICA DUCHICELA, Ph.D.

CODIRECTOR: ING. MARCO TAIPE

SANGOLQUÍ, SEPTIEMBRE 2014

CERTIFICACIÓN

Ing. Jessica Duchicela, Ph. D.

Ing. Marco Taipe

Certifican:

Que el trabajo titulado **CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE BACTERIAS *Pseudomonas sp.* SOLUBILIZADORAS DE FÓSFORO, PRESENTES EN LA RIZÓSFERA DEL MAÍZ (*Zea mays* L) DE LOS ENSAYOS EXPERIMENTALES DEL INIAP DE LAS PROVINCIAS DE IMBABURA, BOLÍVAR, CHIMBORAZO Y PICHINCHA**, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS – ESPE.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf).

Autorizan a ANA KATHERINE PINCAY VERDEZOTO que lo entregue a ING. MARÍA AUGUSTA CHÁVEZ, en su calidad de Coordinadora de la Carrera.

Sangolquí, Septiembre 2014.

DIRECTOR

Ing. Jessica Duchicela , Ph.D.

CODIRECTOR

Ing. Marco Taipe

CERTIFICACIÓN

Los suscritos certifican:

Que el trabajo titulado “Caracterización y evaluación de bacterias *Pseudomonas sp.* solubilizadoras de fósforo, presentes en la rizósfera del maíz (*Zea mays L*) de los ensayos experimentales del Iniap de las provincias de Imbabura, Bolívar, Chimborazo y Pichincha”, realizado por la egresada Ana Katherine Pincay Verdezoto, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

Debido a que este estudio es parte de las investigaciones realizadas por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias – INIAP y financiado por el proyecto Senescyt PIC-12-INIAP-008 Convenio: 20120322 “Generación de conocimientos y tecnologías para el cultivo de maíz suave y su contribución a la seguridad y soberanía alimentarias en la sierra ecuatoriana”, se deja en libertad de la autora y del INIAP, para su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Se autoriza a Ana Katherine Pincay Verdezoto que lo entregue a Ing. María Augusta Chávez, en su calidad de Coordinadora de la Carrera.

Ing. María Augusta Chávez, MSc.
COORDINADOR DE CARRERA

Ing. Carlos Yáñez, MSc.
DIRECTOR (INIAP)

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Ana Katherine Pincay Verdezoto

Declaro que:

El proyecto de grado **CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE BACTERIAS *Pseudomonas sp.* SOLUBILIZADORAS DE FÓSFORO, PRESENTES EN LA RIZÓSFERA DEL MAÍZ (*Zea mays* L) DE LOS ENSAYOS EXPERIMENTALES DEL INIAP DE LAS PROVINCIAS DE IMBABURA, BOLÍVAR, CHIMBORAZO Y PICHINCHA**, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, Septiembre 2014.

Ana Katherine Pincay Verdezoto

AUTORIZACIÓN

Yo, Ana Katherine Pincay Verdezoto

Autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, la publicación en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo **CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE BACTERIAS *Pseudomonas sp.* SOLUBILIZADORAS DE FÓSFORO, PRESENTES EN LA RIZÓSFERA DEL MAÍZ (*Zea mays* L) DE LOS ENSAYOS EXPERIMENTALES DEL INIAP DE LAS PROVINCIAS DE IMBABURA, BOLÍVAR, CHIMBORAZO Y PICHINCHA**, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, Septiembre 2014.

Ana Katherine Pincay Verdezoto

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios, quien me dio la vida y me permitió llegar hasta este momento tan importante en mi formación profesional.

A mi madre querida, Aracely, por ser el pilar más importante en mi vida, por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional, enseñándome a encarar los problemas sin desfallecer en el intento. A Segundo Albán por su incondicional apoyo, tanto al inicio como al final de mi carrera; sin ellos, jamás hubiese podido conseguir lo que hasta ahora tengo. Su tenacidad y lucha ante las adversidades de la vida han hecho de ellos el gran ejemplo a seguir.

A mis hermanos Alex y Steffan por su apoyo, paciencia y cariño en los momentos más difíciles de mi vida.

Ana P.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por bendecirme, por acompañarme en cada momento de mi vida, por darme la fuerza y la paciencia necesaria para culminar mi tesis con éxito.

A mi familia que con su apoyo, amor y confianza me han ayudado a cumplir mis metas. Gracias mamá por ser mi ejemplo de perseverancia, por darme tus consejos en el momento indicado y sobre todo por creer en mí en todo momento y no dudar de mis habilidades.

A Leito por ser lo más hermoso que me ha dado la vida, por todos los momentos que hemos compartido durante años, por apoyarme, estar a mi lado en las buenas y en las malas. Te agradezco amor por hacerme feliz y espero seguir a tu lado en este largo camino que nos queda por recorrer.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas (UFA-ESPE), a mis estimados maestros, que a lo largo de mi carrera me han transmitido sus conocimientos, valores y consejos.

A la Dr. Jessica Duchicela y al Ing. Marco Taípe quienes en forma desinteresada compartieron sus conocimientos y me apoyaron constantemente en la realización de esta tesis, brindándome su dirección y codirección.

Al Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias - INIAP, en especial al Ing. Carlos Yáñez jefe del Programa de Maíz, por permitirme la ejecución de mi tesis, por su preocupación, guía y apoyo durante este tiempo. Al Ing. Marcelo Racines y al Ing. Rafael Parra por su gentil ayuda y amistad.

Al Departamento de Biotecnología, por medio del Dr. Eduardo Morillo, jefe del Departamento por su ayuda y guía brindado en el presente proyecto.

A mi querida Cris Tello por brindarme su amistad, apoyarme y aconsejarme en los momentos difíciles. A Johanna por sus consejos y ayuda incondicional durante el desarrollo de esta tesis.

Un agradecimiento especial a todas aquellas personas con las que he forjado lazos de amistad y he compartido gratos momentos a Don Jorge, Carlitos, Edwin, Mariela, Cris, Juanito, Alexis, Fitito.

No quisiera olvidarme de nadie, pero en fin estoy muy agradecida con la vida por haberme permitido conocer a muchas personas valiosas que me brindaron su amistad y compartimos alegrías durante mi estancia en la ESPE y en el INIAP.

Ana P.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

INIAP: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias

EESC: Estación Experimental Santa Catalina

DMSA: Departamento de Manejo de Suelos y Aguas

DCA: Diseño Completamente al Azar

ANOVA: Análisis de Varianza

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

BSP: Bacterias Solubilizadoras de fósforo

PGPR: Plant Growth Promotion Rhizobacteria

KB: Agar King B

PVK: Agar Pikovskaya

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

TE: Tris- EDTA

TRIS: Tris- Borate - EDTA

TAE: Tris - acetato - EDTA

CIA: Cloroformo – alcohol isoamílico

PCR: Reacción en Cadena Polimerasa

BLAST: Basic Local Aligenment Search Tool

NCBI: National Center for Biotechnology Information

M.O.: Materia Orgánica

MS: Materia Seca

AIA: ácido indol acético

ACC: ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	I
CERTIFICACIÓN	II
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD.....	III
AUTORIZACIÓN	IV
DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTO	VI
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	VIII
ÍNDICE DE CONTENIDOS	IX
RESUMEN	XX
ABSTRACT	XXI
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Formulación del problema.	1
1.2. Justificación del problema.....	3
1.3. Objetivos de la investigación	4
1.3.1. Objetivo General	4
1.3.2. Objetivos Específicos.....	4
1.4. Marco Teórico	5
1.4.1. Maíz (<i>Zea mays</i> L.)	5
1.4.1.1. Ubicación taxonómica.....	5
1.4.1.2. Descripción botánica.....	5
1.4.1.3. Situación del cultivo de maíz en el Ecuador	6
1.4.1.4. Variedades nativas y mejoradas	6
1.4.1.4.1. Variedad de maíz: INIAP – 101.....	7
1.4.1.5. Labores culturales del cultivo de maíz.....	8
1.4.2. Fósforo	10
1.4.2.1. Formas del fósforo en el suelo	10
1.4.2.1.1. Fósforo orgánico (Po)	10
1.4.2.1.2. Fósforo inorgánico (Pi)	10
1.4.2.2. Ciclo del fósforo.....	13
1.4.2.3. Factores que afectan la solubilidad del fósforo en el suelo.....	14
1.4.2.4. Fisiología de fósforo en el maíz.....	15
1.4.3. La agricultura y los microorganismos.....	16
1.4.3.1. Biosolubilización del fósforo.	17
1.4.3.1.1. Mineralización.....	17

1.4.3.1.2.	Producción de ácidos orgánicos	18
1.4.3.1.3.	Producción de enzimas	18
1.4.4.	Microorganismos solubilizadores de fósforo	19
1.4.5.	Género <i>Pseudomonas</i>	20
1.4.5.3.	Características generales	21
1.4.5.4.	Asociación <i>Pseudomona sp.</i> – planta.....	22
1.4.5.5.	Mecanismos de acción de <i>Pseudomonas sp.</i> en la solubilización de fósforo y el crecimiento vegetal	22
1.5.	Sistema de hipótesis	23
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS.....		24
2.1.	Participantes	24
2.1.1.	Instituciones	24
2.1.2.	Responsable del proyecto.....	24
2.1.3.	Colaboradores científicos.....	24
2.2.	Zona de estudio	24
2.3.	Período de investigación	26
2.4.	Diseño estadístico.....	26
2.5.	Procedimiento	29
2.5.1.	FASE I: Laboratorio.....	29
2.5.1.2.	Procesamiento de muestras para el aislamiento de <i>Pseudomonas sp.</i> ..	30
2.5.1.2.1.	Conteo de Unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en el suelo.	30
2.5.1.2.2.	Porcentaje de bacterias solubilizadoras de fósforo presentes en el suelo	30
2.5.1.3.	Aislamiento y purificación de <i>Pseudomonas sp.</i>	31
2.5.1.4.	Caracterización morfológica de <i>Pseudomonas sp.</i>	31
2.5.1.5.	Caracterización bioquímica de <i>Pseudomonas sp.</i>	32
2.5.1.6.	Caracterización molecular de las cepas de <i>Pseudomonas sp.</i>	34
2.5.1.7.	Evaluación de la Solubilización de fosfatos <i>in vitro</i>	38
2.5.1.8.	Conservación de las cepas de <i>Pseudomonas sp.</i>	39
2.5.2.	FASE II: Invernadero	39
2.5.2.1.	Análisis químico del sustrato	39
2.5.2.2.	Preparación del inóculo.....	40
2.5.2.3.	Siembra e inoculación.	41
2.5.2.4.	Cosecha del experimento	42
2.6.	Análisis de datos	42

2.6.1.	FASE I: Laboratorio.....	42
2.6.1.2.	Caracterización de <i>Pseudomonas sp.</i>	43
2.6.2.	FASE II: Invernadero.....	43
2.6.2.1.	Altura de las plantas	43
2.6.2.2.	Longitud de las raíces.....	44
2.6.2.3.	Porcentaje de materia seca y humedad.....	44
2.6.2.4.	Área foliar	44
2.6.2.4.1.	Análisis foliar	44
CAPÍTULO III: RESULTADOS		46
3.1.	FASE I. Laboratorio.....	46
3.1.1.	Procesamiento de muestras para el aislamiento de <i>Pseudomonas sp.</i> ..	46
3.1.1.1.	Conteo de Unidades formadoras de colonias presentes en el suelo.	47
3.1.1.2.	Porcentaje de bacterias solubilizadoras de fósforo (BSP) presentes en el suelo.	50
3.1.2.	Aislamiento y caracterización morfológica de <i>Pseudomonas sp.</i>	53
3.1.3.	Caracterización bioquímica de <i>Pseudomonas sp.</i>	54
3.1.4.	Caracterización molecular de las cepas de <i>Pseudomonas sp.</i>	56
3.1.5.	Evaluación de la Solubilización de fosfatos <i>in vitro</i>	62
3.2.	FASE II: Invernadero.....	64
3.2.1.	Análisis químico del sustrato	64
3.2.2.	Siembra e inoculación.	65
3.2.3.	Análisis de datos	66
3.2.3.1.	Altura de las plantas	66
3.2.3.2.	Longitud de las raíces.....	71
3.2.3.3.	Porcentaje de materia seca y humedad.....	72
3.2.3.4.	Área foliar	74
3.2.3.5.	Análisis Foliar	77
3.2.3.6.	Concentración de fósforo en el tejido Vs el área foliar del maíz	79
3.2.3.7.	Porcentaje de materia seca Vs Contenido de fósforo en el tejido.	80
3.2.3.8.	Área foliar del maíz Vs producción de materia seca.....	81
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN		82
4.1.	FASE I. Laboratorio.....	82
4.1.1.	Procesamiento de muestras para el aislamiento de <i>Pseudomonas sp.</i> ..	82
4.1.2.	Conteo de Unidades formadoras de colonias presentes en el suelo.	83
4.1.3.	Porcentaje de bacterias solubilizadoras de fósforo presentes en el suelo.	84

4.1.4.	Aislamiento y purificación de <i>Pseudomonas sp.</i>	85
4.1.5.	Caracterización bioquímica de <i>Pseudomonas sp.</i>	86
4.1.6.	Caracterización molecular de las cepas de <i>Pseudomonas sp.</i>	86
4.1.7.	Evaluación de la Solubilización de fosfatos <i>in vitro</i>	87
4.2.	FASE II: Invernadero	88
4.2.1.	Evaluación funcional en invernadero de las cepas bacterianas.....	88
4.2.2.	Análisis químico del sustrato	90
4.2.3.	Siembra e inoculación	90
4.2.4.	Análisis de datos	90
	CAPÍTULO V: CONCLUSIONES.....	92
	CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES	93
	CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA	94
	ANEXOS	103

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. 1: Variedades de maíz de la sierra ecuatoriana certificadas por el INIAP....	7
Tabla 1. 2: Principales formas de fósforo inorgánico en el suelo	11
Tabla 2. 1: Localización, situación geográfica, climática y características generales de las localidades de muestreo	25
Tabla 2. 2: Manejo agronómico de las localidades en estudio.....	26
Tabla 2. 3: Códigos y procedencia de las cepas de <i>Pseudomonas sp.</i> empleadas en la investigación	27
Tabla 2. 4: Tratamientos para el ensayo en invernadero.....	28
Tabla 2. 5: Combinación de primers para la amplificación de la secuencia 16Sr. ...	36
Tabla 2. 6: Análisis del sustrato estéril para el ensayo de invernadero	40
Tabla 3. 1: Análisis de Suelos del muestreo realizado en las provincias de Imbabura, Pichincha, Bolívar y Chimborazo.	46
Tabla 3. 2: Análisis de varianza para el número de unidades formadoras de colonias bacterianas por gramo de suelo (ufc/g) transformado con log base 10.....	48
Tabla 3. 3: Tukey al 5% para en el número de unidades formadoras de colonias de bacterias por gramo de suelo (ufc/g) expresados en log base 10. Fuente de variación: provincias.....	48
Tabla 3. 4: Tukey al 5% para en el número de unidades formadoras de colonias de bacterias por gramo de suelo (ufc/g) expresados en log base 10. Fuente de variación: uso de suelo (agrícola, remanente natural).	48
Tabla 3. 5: Prueba Tukey al 5% para en el número de unidades formadoras de colonias de bacterias por gramo de suelo (ufc/g) expresados en log base 10. Fuente de variación: provincias por uso de suelo (agrícola, remanente natural).	49
Tabla 3. 6: Análisis de varianza para el porcentaje de unidades formadoras de colonias de bacterias solubilizadoras de fósforo.	50
Tabla 3. 7: Prueba Tukey al 5% para el porcentaje de bacterias solubilizadoras de fósforo. Fuente de variación: provincias.	51

Tabla 3. 8: Prueba Tukey al 5% para el porcentaje de bacterias solubilizadoras de fósforo. Fuente de variación: uso de suelo (agrícola, remanente natural).....	51
Tabla 3. 9: Prueba Tukey al 5% para el porcentaje de bacterias solubilizadoras de fósforo. Fuente de variación: provincias por uso de suelo (agrícola, remanente natural).	52
Tabla 3. 10: Aislamientos bacterianos obtenidos en el medio KB, de las muestras de suelo de las provincias de Imbabura, Pichincha, Bolívar y Chimborazo.	54
Tabla 3. 11: Identificación de las cepas aisladas de suelo agrícola y suelo no cultivado	55
Tabla 3. 12: Concentración de ADN obtenida con el protocolo de extracción modificado de Jarrín 1995).....	56
Tabla 3. 13: Concentración de ADN purificado	59
Tabla 3. 14: Análisis de comparación y asignación del BLAST para las secuencias de las muestras bacterianas.....	61
Tabla 3. 15: Parámetros evaluados en el análisis químico realizado al sustrato antes y después de la evaluación del efecto de inoculación de las cepas solubilizadoras de fósforo sobre plantas de maíz de la variedad I-101 a condiciones de invernadero.	64
Tabla 3. 16: Análisis de Varianza para la variable altura de planta medida a los 15, 30, 45 y 60 días.....	66
Tabla 3. 17: Prueba Tukey al 5% para la variable altura de planta evaluada a los 15, 30, 45 y 60 días.....	68
Tabla 3. 18: Análisis de Varianza para el incremento de altura de planta.	70
Tabla 3. 19: Prueba Tukey al 5 % para el incremento de altura de planta.....	71
Tabla 3. 20: Análisis de Varianza para la variable longitud de raíz.	71
Tabla 3. 21: Análisis de Varianza para las variables porcentaje de materia seca y porcentaje de humedad.	73
Tabla 3. 22: Análisis de Varianza para la variable área foliar.	75

Tabla 3. 23: Promedios y Tukey al 5 % para las variables: longitud de raíz, porcentaje de materia seca, porcentaje de humedad y área foliar, obtenidas en el ensayo de invernadero.	76
Tabla 3. 24: Análisis foliares.	77
Tabla 3. 25: Contenido de P ₂ O ₅ absorbido por la planta.	78

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. 1: Ciclo del fósforo en agro sistemas.	14
Figura 2. 1: Criterios morfológicos para describir colonias bacterianas según su: forma, elevación y borde. Fuente: Prescott, <i>et al.</i> , (2004).....	32
Figura 3. 1: Contenido de nitrógeno, fósforo y materia orgánica en los suelos agrícolas de las provincias de Imbabura, Pichincha, Bolívar y Chimborazo; y en áreas no cultivadas (remanentes naturales).....	47
Figura 3. 2: Densidad bacteriana por gramo de suelo (UFC/g suelo) en las muestras de suelo agrícola (a) y suelo natural (n) de los ensayos experimentales del INIAP de las provincias de Bolívar, Chimborazo, Imbabura y Pichincha.	49
Figura 3. 3: Bacterias solubilizadoras de fósforo en medio PVK.....	50
Figura 3. 4: Porcentaje de bacterias solubilizadoras de fósforo (BSP), presentes en las muestras de suelo agrícola (a) y suelo natural (n) de los ensayos experimentales del INIAP de las provincias de Bolívar, Chimborazo, Imbabura y Pichincha.	52
Figura 3. 5: Morfología de las colonias aisladas de las muestras de suelo.....	53
Figura 3. 6: Caracterización macroscópica y bioquímica de las cepas aisladas. (a) tinción Gram. (b) pruebas Api 20 E.....	54
Figura 3. 7: Amplificación del gen 16Sr con tres combinaciones de primers E338F; E969R, U341F; U1053R, 27F; 1525R en tres muestras escogidas al azar. De izquierda a derecha: pocillo 1 es el marcador de peso molecular, los pocillos 5, 9 y 13 son controles negativos.....	57
Figura 3. 8: Amplificación del gen 16Sr con los primers 27F; 1525R en las 26 muestras bacterianas.	58
Figura 3. 9: Amplificación del gen 16Sr con los primers E338F; E969R. Todas muestran dos amplicones uno de 630pb y otro de 550pb aproximadamente.	58
Figura 3. 10: Visualización del gen 16Sr ADN ribosomal purificado de las 26 muestras bacterianas, en geles de agarosa.....	59

Figura 3. 11: Visualización del gen 16Sr ADN ribosomal purificado de las muestras cnB2, cnI3, cnP1 y caI3 (+).....	60
Figura 3. 12: Índice de solubilidad de fósforo de las cepas seleccionadas para su posterior ensayo en invernadero.....	62
Figura 3. 13: halos de solubilización de fosfato tricálcico en agar PVK por cepas de <i>Pseudomonas sp.</i> aisladas de muestras de suelo agrícola y no cultivado de las provincias de Imbabura, Pichincha, Bolívar y Chimborazo.	63
Figura 3. 14: Gráfico de los datos experimentales de la variable altura de planta medida a los 30 días después de la siembra.	69
Figura 3. 15: Gráfico de los datos experimentales de la variable altura de planta medida a los 45 días después de la siembra.	69
Figura 3. 16: Gráfico de los datos experimentales de la variable altura de planta medida a los 60 días después de la siembra.	69
Figura 3. 17: Gráfico de los datos experimentales del incremento de altura de planta para los 24 tratamientos con las cepas bacterianas mas dos testigos negativos Tf: Testigo fertilizado y Tab: Testigo Absoluto evaluados en invernadero.	70
Figura 3. 18: Gráfico de los datos experimentales de la variable longitud de raíz para los 24 tratamientos con las cepas bacterianas mas dos testigos negativos Tf: Testigo fertilizado y Tab: Testigo Absoluto evaluados en invernadero.	72
Figura 3. 19: Gráfico de los datos experimentales de la variable Materia Seca para los 24 tratamientos con las cepas bacterianas mas dos testigos negativos TF: Testigo fertilizado y Tab: Testigo Absoluto evaluados en invernadero.	73
Figura 3. 20: Gráfico de los datos experimentales de la variable porcentaje de humedad para los 24 tratamientos con las cepas bacterianas mas dos testigos negativos TF: Testigo fertilizado y Tab: Testigo Absoluto evaluados en invernadero.....	74

- Figura 3. 21:** Gráfico de los datos experimentales de la variable área foliar para los 24 tratamientos con las cepas bacterianas mas dos testigos negativos TF: Testigo fertilizado y Tab: Testigo Absoluto evaluados en invernadero. 75
- Figura 3. 22:** Gráfico de los datos experimentales de la variable contenido de fósforo en la planta, para los 24 tratamientos con las cepas bacterianas mas dos testigos negativos TF: Testigo fertilizado y Tab: Testigo Absoluto evaluados en invernadero. 79
- Figura 3. 23:** Efecto de la concentración de fósforo en el tejido sobre el área foliar del maíz..... 79
- Figura 3. 24:** Efecto de la extracción de fósforo sobre la producción de materia seca 80
- Figura 3. 25:** Efecto del área foliar en la acumulación de materia seca. 81

LISTADO DE ANEXOS.

ANEXO A: Medios de cultivo y soluciones	103
A. 1: Medio King B.....	103
A. 2: Agar Nutritivo	103
A. 3: Medio Pikovskaya.....	104
A. 4: Caldo Nutritivo.	104
A. 5: Solución de hipoclorito de Sodio con ácido clorhídrico	104
ANEXO B. Tampones de uso molecular	105
B. 1: Tampón de extracción de ADN.....	105
B. 2: Tampón TE.....	105
B. 3: Tampón TAE 50X.....	105
ANEXO C. Pruebas bioquímicas.....	106
C. 1: Pruebas de galería corta aplicadas a las cepas aisladas de los sitios en estudio.	106
C. 2: Pruebas Api 20E.....	108
ANEXO D: Análisis de suelo	110
D. 1: Análisis de nutrientes realizado por el Departamento de Manejo de Suelos y Aguas.	110
D. 2: Resumen de los análisis de suelos de las muestras recolectadas en la provincia de Imbabura, Pichincha, Bolívar y Chimborazo; de suelos con manejo agrícola y de remanentes naturales.	111
ANEXO E. Prueba de los signos	112
E. 1: Prueba de los signos para el contenido de fósforo en el sustrato, utilizado en el ensayo de invernadero, cuyo valor inicial de P fue 58ppm.	112
E. 2: Prueba de los signos para el porcentaje de fósforo en el tejido foliar.	112
E. 3: Prueba de los signos para el Contenido de P ₂ O ₅ absorbido por la planta.....	112

RESUMEN

La deficiencia de fósforo es una limitación importante para la producción agrícola, debido a que este elemento es fuertemente influenciado por las propiedades del suelo, convirtiéndose en complejos insolubles, que lo hacen inaccesible para las plantas. *Pseudomonas sp.*, son rizobacterias con capacidad para fomentar el crecimiento de las plantas a través sus diversos mecanismos como la solubilización de fósforo la producción de hormonas y sideróforos. Por esta razón, en la presente investigación se aisló bacterias del género *Pseudomonas*, de la rizosfera de maíz de las provincias de Imbabura, Pichincha, Bolívar y Chimborazo y en sitios cercanos a cada localidad sin manejo agrícola. Se caracterizaron bioquímica y molecularmente 24 aislamientos; con los que se realizaron pruebas para evaluar su capacidad de solubilizar fósforo *in vitro* y en condiciones de invernadero. Se inocularon semillas de maíz y se sembraron en suelo estéril para evaluar su desarrollo durante ocho semanas. De las cepas aisladas; 21 pertenecen al género *Pseudomonas* y 3 fueron *Acinetobacter*. La identificación del género fue confiable ya que coincidió en las pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares. En la evaluación *in vitro* la cepa aI3 (*P. fluorescens*) presentó un mayor índice de solubilidad con un promedio de 4.8; seguido de nP2 (*P. putida*) con 4.5; la cepa con menor índice de solubilidad fue aP3 (*P. palleroniana*) con 1.3. Por otra parte en la evaluación en condiciones de invernadero las cepas que demostraron mayor capacidad para producir un efecto benéfico en la planta de maíz fueron nC1 (*A. calcoaceticus*) y nC2 (*P. fluorescens*), mostrando valores mayores en cuanto a longitud de raíz, % de materia seca, área foliar, y acumulación de P en los tejidos, con respecto al testigo absoluto y testigo fertilizado. Mientras que las cepas aI2, aI6, nI3, nI5, nP2, aB1, aB5, nB1, nB2 y aC2 fueron superiores en todas las variables evaluadas respecto al testigo absoluto. En este estudio se observó que la absorción de P disponible en el suelo dio lugar a un aumento en la producción de biomasa y área foliar.

Palabras clave: Fósforo, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, rizosfera, bacterias solubilizadoras de fósforo.

ABSTRACT

Phosphorus deficiency is a major limiting factor to crop production, because this element is strongly influenced by soil properties, due to chemical reactions that fix it into insoluble forms. *Pseudomonas sp.*, is identified as an important organism with ability for plant growth promotion, by various mechanisms such as phosphate solubilization, production of hormones and siderophores. Therefore, in this investigation, bacteria from the genre *Pseudomonas* were isolated from rhizospheric soil samples of maize were collected from agricultural fields located at in the provinces of Imbabura, Pichincha, Chimborazo and Bolivar, and fields with no history of cultivation nearby to each location. 24 isolates were characterized in biochemical and molecular levels which were used to reproduce a series of test to evaluate their capacity to phosphate solubilization *in vitro* using the agar media PVK, to determine the level of solubility. In addition to this, an essay was conducted under greenhouse conditions, in which corn seeds were inoculated and planted in sterile soils to evaluate their development in a period of 8 weeks. All the cultural, biochemical and molecular studies confirmed that 21 isolate were *Pseudomonas sp* and 3 were *Acinetobacter sp.* The evaluation *in vitro* showed that aI3 strain (*P. fluorescens*) presented a higher rate of solubilization in average of 4.8; followed by nP2 strain (*P. putida*) with 4.5, the strain with lowest rate of solubilization was aP3 (*P. palleroniana*) with 1.3. Moreover the evaluation in greenhouse conditions of the strains showed greater capacity to produce a beneficial effect in the corn plant were nC1 (*A. calcoaceticus*) and nC2 (*P. fluorescens*), showing higher results as far as root length, dry matter, leaf area, and P accumulation in tissues, opposite to the absolute witness and the fertilized witness. While aI2, aI6, nI3, nI5, nP2, aB1, aB5, nB1, nB2 and aC2 strains showed major values in all variables compared to control treatment. In this study, it was observed that the absorption of the available P in the soil has helped increase the production of the biomass and the leaf area.

Keywords: Phosphate, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, rhizospheric soil, phosphate solubilization bacteria.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del problema.

El maíz (*Zea mays L.*) es uno de los cultivos más importantes en la sierra ecuatoriana, debido a la gran cantidad de terreno destinado a su producción y al papel que cumple como componente básico de la dieta de la población rural (Yáñez *et al.*, 2013). La superficie cosechada de maíz suave en el 2013 fue de 150982 ha, con una producción total de 145987 Tm (ESPAC, 2013).

El incremento de la producción de esta gramínea está estrechamente relacionado con la fertilización (Faggioli *et al.*, 2007). Después del nitrógeno; el fósforo constituye uno de los elementos más importantes en las primeras etapas del desarrollo normal de las plantas, basta señalar que se requieren alrededor de 4 Kg., de fósforo como elemento para producir 1000 kilogramos de maíz (González, 2008). Una deficiencia de este elemento en el cultivo puede provocar un crecimiento lento, poco desarrollo del sistema radicular, una coloración atípica en las hojas y por ende disminuye el rendimiento de la cosecha (Guzman, 2011).

Torriani citado por Paredes (2010), menciona que la planta absorbe el fósforo disponible en forma de H_2PO_4^- en suelos ácidos, y como HPO_4^{2-} en suelos alcalinos, sin embargo este elemento disponible en el suelo es fácilmente convertido en complejos insolubles, como fosfatos de Fe, Al o Mn en suelos ácidos y como fosfatos de Ca o Mg en suelos alcalinos. La concentración de fósforo disponible en general es baja y fluctúa entre 0.2 y 0.5 mg/lt (Sanzano, 2008).

El contenido de fósforo disponible para las plantas es una variable dinámica, fuertemente influenciada por las propiedades del suelo y las condiciones ambientales. En el suelo el P puede interactuar con sus componentes, involucrando procesos de mineralización e inmovilización y procesos de adsorción, desorción, precipitación y disolución (Capelle, 2011).

Aunque el fósforo es relativamente abundante en los suelos ecuatorianos, su absorción por la planta es mínima, ya que la mayor parte de este elemento se encuentra en forma de fosfatos tricálcicos y fosfatos de hierro, es por ello que debe ser suministrado por medio de fertilizantes químicos (Cepeda, 2008).

Una forma de movilizar el fósforo insoluble del suelo es a través de la participación de microorganismos que tienen la capacidad de solubilizar el fósforo, mediante la producción de ácidos y fosfatasas ácidas o alcalinas (Paredes, 2010).

Pero es importante mencionar que la efectividad de un microorganismo para producir un efecto benéfico en la planta se ve influenciada por el manejo agrícola. Un estudio realizado por Duchicela *et al.*, (2012) menciona que el uso de mecanización agrícola ha resultado en la degradación de agregados estables del suelo en las praderas de Norte-América, respuesta que está relacionada con la alteración de las comunidades microbianas y dominación de plantas exóticas. Por otro lado, el incremento de la producción de agregados estables del suelo están relacionados con la sucesión de las comunidades microbianas posterior a la cesación de prácticas agrícolas en Bolivia (Duchicela *et al.*, 2013).

Martinez y Johnson (2010) reportaron que micorrizas arbusculares provenientes de sitios sin disturbación agrícola son más eficientes en su contribución al crecimiento de maíz que los aislados de sitios de alta y baja fertilización.

En la sierra ecuatoriana los terrenos destinados para el cultivo de maíz se han explotado durante varios años, lo cual ha provocado una baja fertilidad, específicamente por la deficiencia de nutrientes y de microorganismos benéficos (INIAP, 2007), es por ello que se pretende aislar bacterias eficientes en la solubilización de P. Varios estudios han demostrado que el manejo agrícola no selecciona comunidades microbianas eficientes, al contrario favorece comunidades oportunistas o generalistas, por lo tanto es de vital importancia incluir un sitio control en cada localidad en estudio.

1.2. Justificación del problema

El fósforo en las plantas desempeña un papel muy importante ya que a nivel fisiológico interviene en la acumulación y liberación de energía durante el metabolismo celular. Debido a su lenta movilización, a los procesos de transformación que sufre este elemento en el suelo y a la disminución de comunidades microbianas, hacen que el fósforo aplicado como fertilizante pase rápidamente a formas menos disponibles para las plantas.

Este factor provoca que los agricultores tengan que aplicar cada vez más cantidad de fertilizante químico en sus cultivos, ya que la aplicación de un fertilizante fosforado inorgánico no determina necesariamente un incremento de la fracción del fósforo soluble. Esto lleva a que los costos de producción se incrementen por el alto precio de los insumos y las altas dosis que se deben usar para contrarrestar la cantidad de fertilizante que no llega a estar disponible para las plantas.

Sin embargo innumerables investigaciones mencionan la existencia de varios grupos de microorganismos presentes en el suelo con capacidad de solubilizar fósforo y que pueden ser usados como alternativas válidas en el proceso de producción agrícola, al disminuir el uso de fertilizantes químicos, aumentando su eficiencia. Adicionalmente estimula la producción más limpia, asegurando un producto sano y una renovación de la población bacteriana del suelo.

Por lo tanto el presente proyecto tiene por objetivo aislar e identificar microorganismos solubilizadores de fósforo del género *Pseudomonas sp.*, para a futuro utilizar estas cepas en la formulación de biofertilizantes para cultivos de maíz, que sirva a los agricultores del país como una alternativa al uso indiscriminado de agroquímicos y al mismo tiempo contribuya a disminuir sus costos de producción.

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo General

Caracterizar y evaluar *Pseudomonas sp.*, solubilizadoras de fósforo, presentes en la rizósfera del maíz (*Zea mays*) cultivado en los ensayos experimentales del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias de las provincias de Imbabura, Bolívar, Chimborazo y Pichincha.

1.3.2. Objetivos Específicos

- a. Aislar bacterias *Pseudomonas sp.*, presentes en la rizósfera de maíz de las provincias de Imbabura, Bolívar, Chimborazo y Pichincha.
- b. Caracterizar macroscópica, microscópica, bioquímica y molecularmente las cepas de *Pseudomonas sp.* aisladas.
- c. Determinar bajo condiciones *in vitro*, la capacidad de las bacterias aisladas para solubilizar fósforo y seleccionar aquellas con mayor porcentaje, para obtener un banco de cepas de *Pseudomonas sp.*
- d. Evaluar a nivel de invernadero el efecto que tiene *Pseudomonas sp.*, en el desarrollo del maíz (*Zea mays*).

1.4. Marco Teórico

1.4.1. Maíz (*Zea mays* L.)

1.4.1.1. Ubicación taxonómica

Según el sistema de clasificación de Cronquist, (1981), se ubica en la siguiente categoría Taxonómica:

Dominio: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Cyperales

Familia: Poaceae

Género: *Zea*

Especie: *mays*

Nombre científico: *Zea mays* L.

1.4.1.2. Descripción botánica

El maíz (*Zea mays*. L), es una planta monocotiledonea, de crecimiento anual, presenta variedades cuya altura fluctúa entre los 40 a 300 cm, posee un sistema radicular constituido por raíces fibrosas fasciculadas o primarias que le proporcionan los nutrientes necesarios a la planta y pueden alcanzar hasta dos metros de profundidad; y las raíces adventicias o secundarias que se originan en los nudos, cerca de la superficie del suelo, promoviendo una mejor estabilidad y reduciendo los problemas de acame (Person, 1990).

Su tallo es leñoso y cilíndrico, con un promedio de número de nudos de 16. Las hojas son alargadas, alternadas y se encuentran enrolladas en el tallo, su color usual es verde pero presenta en algunas ocasiones rayas de color púrpura, el número de hojas varía entre 8 y 25 (Person, 1990).

Es una especie monoica, es decir que posee ambos sexos, la inflorescencia femenina (espiga) y la masculina (panoja) separadas y bien diferenciadas en la misma planta. La polinización es abierta, ocurre con la transferencia del polen desde la espiga a los estigmas de la mazorca, generando de ocho o más filas de granos (Sánchez, 2009).

1.4.1.3. Situación del cultivo de maíz en el Ecuador

En el Ecuador es una de las gramíneas más importantes de consumo humano y animal, en el 2013 se tuvo una producción de 904225 Tm de maíz duro seco, en la región costa, mientras que en la región sierra fueron 145987 Tm de maíz suave (ESPAC, 2013).

Establecimientos como INIAP aprovechan la riqueza genética del maíz, para producir nuevas variedades fitogenéticamente mejoradas, con caracteres agronómicos deseables, resistentes a plagas y con mayor producción agrícola (Yáñez, *et al*, 2013).

1.4.1.4. Variedades nativas y mejoradas

Entre las principales variedades nativas de maíz que se siembran en la sierra ecuatoriana se tienen: cuzco ecuatoriano, canguil ecuatoriano, racimo de uva, chillos huandango, morochon, patillo, chulpi y kcello (Yáñez, *et al*, 2013).

Las variedades mejoradas han sido obtenidas por el Programa de Maíz del INIAP, mediante un proceso de selección muy riguroso, que se enfoca en las características fenotípicas y resistencia a enfermedades, actualmente existen 11 variedades mejoradas (Tabla 1.1) y 4 en proceso de mejoramiento.

Tabla 1. 1: Variedades de maíz de la sierra ecuatoriana certificadas por el INIAP

VARIEDAD	CÓDIGO	CARACTERÍSTICA	ZONA DE CULTIVO
Blanco Harinoso Precoz	INIAP – 101	Suave, blanco harinoso	Entre 2400 y 3000msnm
Blanco blandito mejorado	INIAP – 102	Suave, blanco harinoso	Chimborazo
Mishqui Sara	INIAP- 103	Suave, blanco harinoso	Loja
Guagal Mejorado	INIAP– 111	Suave, blanco harinoso	Bolívar
Chaucho mejorado	INIAP– 122	Suave, amarillo, harinoso	Imbabura
Mishca Mejorado	INIAP– 124	Suave, amarillo, harinoso	Pichincha, Cotopaxi y Tungurahua
Zhima Mejorado	INIAP– 153	Blanco, harinoso, amorochado	Cañar y Azuay
Almendral	INIAP – 182	Duro, amarillo cristalino	Loja
Para grano y forraje	INIAP – 176	Duro, amarillo cristalino	Pichincha
Maíz de alto rendimiento	INIAP -180	Duro, amarillo cristalino	Entre 2400 y 2800 msnm
Chulpi Mejorado	INIAP -192	Arrugado, amarillo pálido, semi- harinoso	Entre 2400 y 2800 msnm

Fuente: Yáñez *et al.*, 2013

1.4.1.4.1. Variedad de maíz: INIAP – 101

INIAP-101 fue desarrollada por el Programa de Maíz de la EESC del INIAP, en los años 1971 a 1979. Su progenitor es la variedad “Cacahuazintle” de México. La zonificación de la variedad es en los valles centrales de la región sierra, en altitudes comprendidas entre los 2400 a 3000 msnm. Posee buen rendimiento, precocidad, su grano es blanco de textura harinosa y de buena calidad, mazorca grande y resistente al acame (Yáñez *et al.*, 2003).

1.4.1.5. Labores culturales del cultivo de maíz.

Preparación del terreno: Se debe realizar, con tractor o con yunta, una labor de arado, una de rastra y la surcada. Es recomendable realizarlo con dos meses de anticipación para que el terreno quede suelto, evitar encharcamientos, malezas, insectos y facilitar la descomposición de residuos (Yáñez *et al.*, 2003).

Siembra: En la sierra altoandina la fecha de la siembra varía desde septiembre hasta mediados de enero, dependiendo de la zona o localidad del cultivo y de la disponibilidad de agua de riego o de la cantidad de lluvias. La siembra se realiza a una profundidad de 5 cm., con dos semillas por sitio distanciados a 80 cm entre surcos y a 50 cm entre sitios, o una semilla cada 25 cm. Si se cultiva maíz asociado con frejol trepador se recomienda colocar en cada surco tres semillas de maíz y dos de frejol distanciados a 0.80 m entre surcos y 0,80 m entre sitios. Por lo general se requiere 30 kg de semilla por hectárea (Yáñez *et al.*, 2003).

Raleo: Se realiza cuando la planta ha alcanzado un tamaño entre 0.25 a 0.30 m y consiste en dejar de una a dos plantas por surco mientras se eliminan las restantes (Yáñez *et al.*, 2003).

Control de malezas: Se lleva a cabo de dos formas: Química con el uso de herbicidas (Atrazina) los cuales se aplican inmediatamente después de la siembra, sobre suelo húmedo o cuando existe una alta presencia de malezas posemergencia. O de forma mecánica con el uso de azadón o lampa (deshierba), consiste en extraer las malezas del suelo sin causar daño al cultivo. El número de deshieras varía con la cantidad y desarrollo de las malezas. En la mayoría de los sectores de la sierra, se realiza de dos o tres deshieras durante el ciclo del cultivo (Yáñez *et al.*, 2003).

Aporque: Esta labor se realiza 45 días después de la siembra, consiste en arrimar tierra alrededor de la planta en la parte inferior del tallo, con el objeto de ayudar al sostén de la planta, aflojar el suelo y mantener la humedad de la tierra. Durante el aporque se debe colocar en forma lateral la fertilización nitrogenada (urea) complementaria (Yáñez *et al.*, 2003).

Defoliación: Se realiza en la etapa de emisión de estigmas (floración femenina) y en la etapa de grano lechoso (choclo suave lechoso), porque afecta a la formación y llenado del grano en la mazorca, disminuyendo notablemente la producción. Consiste en la remoción de hojas de las plantas de maíz cuando están verdes (Yáñez *et al.*, 2003).

Fertilización: Se recomienda fertilizar el suelo con nitrógeno (N) y fósforo (P), mientras que en el caso del potasio (K), solo debe aplicarse si se presenta una deficiencia de este elemento en el terreno. La fertilización se efectúa normalmente según las características de la zona de producción, para lo cual es necesario realizar el análisis químico del suelo por lo menos dos meses antes de la siembra (Yáñez *et al.*, 2003).

Control de insectos: Se recomienda hacer aplicaciones de insecticidas únicamente cuando sea necesario. Para el caso de gusano trozador (*Agrotis ipsilon*), si se observa en un 10% de plantas cortadas o con síntomas de marchitez, se recomienda aplicar a la base del tallo insecticidas como Thiodan (Endosulfán) en dosis de 2 l/ha. Para controlar los gusanos de la mazorca (*Heliothis zea*) se recomienda la aplicación de aceite comestible con un gotero o esponja en el lugar de salida de los pelos del choclo, cuando estos tengan unos 3 cm de largo (Yáñez *et al.*, 2003).

Manejo de enfermedades: El método más práctico y económico es el uso de variedades resistentes a plagas como: *Erwinia corotovora f. sp zea* (pudrición del tallo), *Ustilago maidis* (carbón del maíz), *Puccinia sorghi* (roya), *Helminthosporium turcicum* (tizón foliar), *Cercospora zea-maydis* (mancha foliar), *Phyllachora maydis: Monographella maydis Coniothyrium phyllachorae* (mancha de asfalto) (Yáñez *et al.*, 2003).

Cosecha: La cosecha para choclo se efectúa cuando el grano está en estado “lechoso”, para semilla al momento de la madurez fisiológica (cuando en la base del grano se observa una capa negra) (Yáñez *et al.*, 2003).

Selección y desgrane: Las mazorcas dañadas por plagas y enfermedades deben ser eliminadas para dejar solamente las que presentan grano grueso y uniforme. Durante el desgrane debe separarse el grano comercial del grano que servirá como semilla ya que en las mazorcas destinadas para semilla se debe desgranar únicamente la parte central de la mazorca (Yáñez *et al.*, 2003).

Almacenamiento: Para almacenar las mazorcas, grano comercial o semilla, deberán secarse completamente y se almacenarán en lugares frescos y secos, libres de gorgojo (Yáñez *et al.*, 2003).

1.4.2. Fósforo

1.4.2.1. Formas del fósforo en el suelo

Este elemento en el suelo se encuentra básicamente de dos formas orgánica e inorgánica, y pueden fijarse o precipitar, estando involucrados en mecanismos de: adsorción física (se pegan por sus cargas a cationes), adsorción química (por reacción en pH alcalino dando óxidos e hidróxidos), o sustitución de aniones por fosfatos (Maddonni, citado por Capelle, 2011).

1.4.2.1.1. Fósforo orgánico (Po)

Representan del 30 al 70% del fósforo presente en la superficie del suelo, proviene de restos vegetales y animales (Bobadilla C. R., 2008). Tres grupos de compuestos forman la reserva de Po en el suelo: inositol fosfato (ácido fítico o fitato) los cuales almacenan más del 50% del Po, fosfolípidos con un rango entre 0.5 – 7% del Po total y finalmente los ácidos nucleicos con una fracción más pequeña (< 3% del Po total) (Arai & Sparks, 2007).

1.4.2.1.2. Fósforo inorgánico (Pi)

Es predominante en la mayoría de los suelos destinados para cultivos, con un porcentaje entre 50% al 75% del fósforo total, está repartido entre la fase acuosa y sólida del suelo, donde se encuentra adsorbido en la superficie del complejo húmico-

arcilloso, de coloides de óxido de hierro y aluminio y de algunos carbonatos. La solubilidad de los complejos Fe-P y Al-P disminuye al incrementar el pH. Las principales formas de fósforo inorgánico se muestran en la Tabla 1.2 y su abundancia varía de acuerdo al origen del suelo, a los niveles de materia orgánica y al pH (Sanzano, 2008).

Tabla 1. 2: Principales formas de fósforo inorgánico en el suelo

Tipo de Fosfato	Nombre	Composición
Fosfatos de Calcio	Hidroxiapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_3 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$
	Oxipatita	$3\text{Ca}(\text{PO}_4)_2\text{CaO}$
	Fluorapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{CaF}_2$
	Carbonatoapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{CaCO}_3$
	Fosfato tricálcico	$3\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$
	Fosfato bicálcico	CaHPO_4
	Fosfato monocálcico	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$
Fosfatos de Hierro	Vivianita	$\text{Fe}(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$
	Estrengita	$\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Fosfatos de Aluminio	Variscita	$\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Fuente: (Navarro, 2003)

Por la naturaleza del enlace químico, los compuestos del P en el suelo pueden clasificarse en ésteres de fosfato, fosfonatos y anhídridos (Turner *et al.*, 2006). Los ésteres de fosfato son subclasificados de acuerdo al número de grupos éster que se unen a cada fosfato. Los fosfato monoésteres tienen un enlace éster simple P-O-C, mientras los diésteres tienen dos enlaces (O-P-O). Los principales monoésteres de fosfato son los ésteres fosfóricos de hexahidrox ciclohexano (inositol), y en pequeñas concentraciones fosfatos de azúcar, fosfoproteínas y nucleótidos monofosfato, mientras que los fosfato diésteres incluyen los ácidos nucleicos, los fosfolípidos y los ácidos teicoicos.

Los fosfonatos contienen un enlace directo P-C y son poco comunes en los suelos tropicales. Los fosfoanhídridos (polifosfatos orgánicos) tales como el ATP, son una fuente de energía para la mayoría de los procesos metabólicos, pero son detectados raramente en los suelos. Por otra parte, los polifosfatos inorgánicos se

presentan con frecuencia en los suelos, especialmente como pirofosfatos, aunque su función y origen preciso no son claros (Turner *et al.*, 2006).

Desde el punto de vista edafológico se lo ha clasificado de acuerdo a su disponibilidad mediata o inmediata para las plantas en: fósforo soluble, intercambiable e insoluble.

Fósforo soluble (Psol): su disponibilidad para las plantas es inmediata, se encuentra en la solución del suelo en forma de fosfatos diácidos (H_2PO_4^-) a pH bajos y mono ácidos (HPO_4^{2-}) a pH altos. Su concentración en general es baja y fluctúa entre 0.2 y 0.5 mg/lit, es decir, de 200 a 400 gr/ha en 30 centímetros de espesor. Esta determinada principalmente por los procesos de mineralización e inmovilización del Po, además, por el equilibrio entre los procesos de adsorción-desorción y precipitación-disolución del Pi. En suelos muy ricos la concentración puede llegar hasta 1 mg/lit (1ppm) y en suelos pobres a 0.1 mg/lit (Sims & Vadas, 2005; Sanzano, 2008).

Fósforo intercambiable lábil o adsorbido: su disponibilidad es más lenta que la anterior forma, estos iones forman parte de la gama de iones que rodean a las partículas coloidales y están en constante movimiento. Representan del 15 al 30% del fósforo inorgánico, lo que significa 800 a 2500 kg de P_2O_5 /ha (Sanzano, 2008).

Este fósforo puede estar adsorbido por los bordes de las arcillas estructura 1:1 (caolinita), o por uniones que usan al calcio como puente para unirse a las arcillas estructura 2:1 (esmectitas, micas, ilita, clorita, Vermiculita) e incluso puede estar adsorbido por los óxidos e hidróxidos de hierro y aluminio, que tienen un poder de fijación mucho mayor que el de las arcillas (Sanzano, 2008 y Jordán, 2005).

Fósforo insoluble: constituye la gran reserva de fósforo inorgánico en el suelo, forma parte de los minerales primarios (apatitas: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$; siendo $\text{X}_2 = \text{F}^-$, OH^- o Cl^-) y secundarios (formados por precipitación del P con Al, Ca y Fe) (Sanzano, 2008).

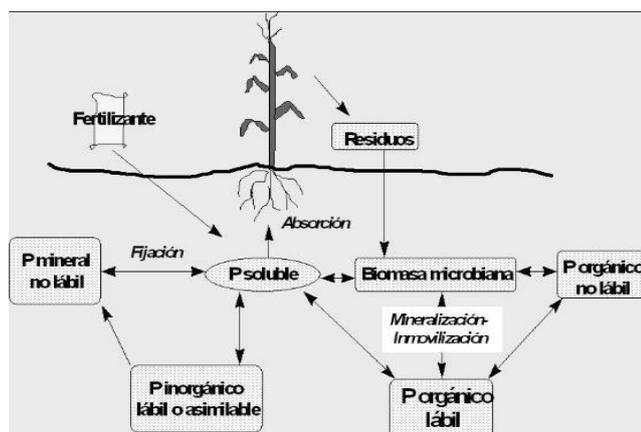
1.4.2.2. Ciclo del fósforo

El ciclo de este elemento es un sistema que incluye fuentes de fósforo en cuatro formas generales (P inorgánico disponible, P orgánico, P absorbido, y P como mineral primario), que son cicladas a través del agua, la corteza de la tierra y los organismos vivos. Además involucra la acumulación del elemento en la biomasa microbiana, materia orgánica y formas inorgánicas (Hyland *et al.*, 2005).

Boonkerd, citado por Cepeda (2008) indica que el fósforo ingresa a los sistemas vivos cuando las plantas lo toman en forma de iones fosfato del suelo, luego este elemento se mueve desde las plantas hacia los animales herbívoros y posteriormente a los carnívoros. El fosfato que pasa a formar parte del tejido de los animales es regresado al suelo por medio de excreción (orina o heces), en las plantas éste regresa por medio de su descomposición.

El fósforo se mueve a distancias muy cortas en la mayoría de los suelos, es un elemento que tiene entradas y salidas muy bajas en ecosistemas naturales, a diferencia de otros elementos como el nitrógeno, por lo que el nivel de fósforo de un suelo depende principalmente del contenido del material original. Sin embargo en agro sistemas existen entradas y salidas importantes por fertilización y extracción por cosecha (Capelle, 2011).

Cuando se agrega al suelo una forma soluble como el fosfato monocálcico ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$), rápidamente este se convierte en la forma di cálcica CaHPO_4 , que queda absorbida en los minerales arcillosos. Esto lleva a que se mantenga una concentración de iones H_2PO_4^- en la solución del suelo de 0.003 a 3 mg/Kg, dependiendo del tipo de suelo (Moorby, citado por Guzmán 2011). La aplicación de un fertilizante fosforado inorgánico no determina necesariamente un incremento de la fracción del fósforo soluble, ya que el fósforo puede sufrir procesos de mineralización e inmovilización y procesos de adsorción, desorción, precipitación y disolución (Capelle, 2011).



Fuente: (Torres, 2009).

Figura 1. 1: Ciclo del fósforo en agro sistemas.

1.4.2.3. Factores que afectan la solubilidad del fósforo en el suelo

Existen varios factores que limitan la disponibilidad de fósforo soluble utilizado por las plantas y esto se debe principalmente al tipo, pH y calidad del suelo (Cepeda, 2008).

Los suelos arcillosos retienen o fijan más fósforo que otros suelos, ya que los iones fosfato pueden fijarse al complejo arcilloso por adsorción superficial o por medio de puentes de calcio, sin embargo estos iones son fácilmente recuperables por mineralización. Existe también en el suelo hidróxidos de hierro y aluminio, que se comportan como coloides electropositivos y fijan iones PO_4^{2-} , este tipo de fosfatos pasan a la solución del suelo más lentamente que los que se fijan sobre la arcilla (Guzman, 2011).

La compactación del suelo también es otro factor, ya que reduce la aireación, la superficie de contacto de las raíces con el suelo, el espacio poroso en la zona radicular, y la descomposición de la materia orgánica por la actividad microbológica, lo cual disminuye la cantidad de fósforo soluble y dificulta absorción de este elemento (Guzman, 2011).

El pH del suelo es muy importante, influye en la presencia de formas asimilables y formas insolubles de fósforo para la nutrición vegetal. A pH ácido el fósforo asimilable

suele presentarse en forma de fosfatos de hierro y aluminio, a pH neutro existen fosfatos de calcio soluble, pero en suelos con un pH superior a 7.5 aumentan las formas insolubles del fósforo, que no son asimilables por las plantas (Guzman, 2011).

También se ha visto que la aplicación de otros nutrientes puede estimular la absorción de fósforo, por ejemplo aplicar calcio en suelos ácidos y azufre en suelos alcalinos parecen incrementar la disponibilidad de fósforo, pero la fertilización con zinc, en un cultivo que está al borde de una deficiencia de P, parece restringir aún más la absorción de este elemento (Guzman, 2011).

1.4.2.4. Fisiología de fósforo en el maíz

El fósforo es un componente esencial de las plantas, en forma de H_2PO_4^- alcanza concentraciones entre el 0.5 al 1% de la materia seca. Se encuentra, en estado mineral, y en forma de compuestos orgánicos fosforados como fosfolípidos, nucleótidos y ácidos nucleicos (Milthope, citado por Guzmán, 2011).

En el cultivo de maíz y en todas las plantas en general, la absorción de éste elemento se da por procesos de difusión a través de los tejidos jóvenes de las raíces dentro de las células de la capa superficial de la corteza radicular y dentro de las células epidérmicas con pelos radicales, las cuales se expanden de manera continua en la tierra y están expuestas a las concentraciones de fósforo encontradas en la solución del suelo (Cepeda, 2008).

El fósforo solo se desplaza escasos milímetros por su intensa interacción con el suelo, es por ello que su absorción depende en gran parte del grado en el que las raíces se expanden por el terreno. Debido a que la disponibilidad de fósforo es más elevada en la superficie del suelo y decrece con la profundidad, se ha afirmado que raíces con mayor concentración de pelos radicales en la superficie son más eficientes en la absorción de fósforo (Rubio, 2003).

Este elemento es esencial en las primeras etapas de crecimiento ya que interviene en el transporte y almacenamiento de energía en la planta, promueve el desarrollo de la raíz, la floración temprana y la maduración. Es decir favorece precisamente los periodos de vegetación que son críticos para el rendimiento del cultivo como germinación, fecundación, maduración y movimiento de las reservas (Milthope, citado por Guzmán, 2011).

Cuando existe una deficiencia de este elemento se generan tonalidades morado o purpúreo en hojas y tallos, debido a la acumulación de azúcares, ya que disminuye la traslocación de asimilados (Witt *et al*, 2007). Además, las plantas presentan muy baja eficiencia fotosintética por unidad de clorofila, lo que conlleva la reducción de la mayoría de los procesos metabólicos, y un retraso en los procesos de maduración (Taiz & Zeiger, 2010).

El papel fundamental del fósforo en la transferencia de energía ha sido bien estudiado, tanto en la formación de ATP durante la respiración celular y fotosíntesis, como en la formación del NADPH+H⁺, necesarios para la síntesis de nueva materia orgánica. Como el nitrógeno, el fósforo es un factor de crecimiento muy importante, existiendo una fuerte interacción entre éstos dos elementos, sobre todo durante las fases iniciales de crecimiento (Milthope, citado por Guzmán, 2011).

1.4.3. La agricultura y los microorganismos

Debido al incremento de los trabajos agrícolas en los últimos años, se ha visto una reducción gradual del contenido de materia orgánica en las tierras cultivadas intensivamente, además del deterioro de la estructura del suelo, lo cual lo ha hecho susceptible a la compactación, erosión, desertificación, salinización, alcalinización y contaminación de napas subterráneas con plaguicidas y fertilizantes (Rodas, 2006).

Debido a que los suelos son cada vez menos fértiles, la supervivencia de los microorganismos se ha limitado, ya que dependen de la disponibilidad de nutrientes y de la energía aportada por la materia orgánica del suelo. Algunos microorganismos

son buenos saprofitos o endofíticos, y un número limitado puede causar enfermedades a las plantas, animales y humanos (Coyne & Rasskin, 2000).

Sin embargo los microorganismos con gran importancia para el suelo son aquellos que transforman los nutrientes de éste y promueven el crecimiento de la planta. Este tipo de organismos juegan un papel clave en el mantenimiento del delicado balance entre la materia acumulada y la materia degradada. Numerosas bacterias son eficientes fijadoras de nitrógeno, otras son excelentes solubilizadoras de fósforo, e incluso algunas producen hormonas que estimulan el crecimiento de las plantas, sin duda estos organismos contribuyen a que los agricultores economicen en fertilizantes (Nogales, 2005).

1.4.3.1. Biosolubilización del fósforo.

Los microorganismos intervienen en los procesos de la solubilización, inmovilización (entrada activa del Pi a las células microbianas, convirtiéndose a formas de Po) y mineralización del fósforo de los depósitos orgánicos e inorgánicos, así como en las formas solubles e insolubles (Coyne & Rasskin, 2000).

1.4.3.1.1. Mineralización.

Es la conversión del fósforo orgánico a formas disponibles para las plantas, ortofosfatos (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}). Este proceso es lento y por vía microbiana, requiriendo temperaturas de aproximadamente 25 a 30 °C, pH neutro y humedad cercana a capacidad de campo (Sanzano, 2008).

El fósforo orgánico puede ser mineralizado como subproducto de la descomposición de la materia orgánica, o mediante la acción de enzimas específicas que son reguladas por la demanda de este nutriente (Picone y Zamuner, 2002). La degradabilidad de compuestos orgánicos de fósforo depende principalmente de la fisicoquímica y propiedades bioquímicas de sus moléculas, por ejemplo, ácidos nucleicos, fosfolípidos, y fosfatos de azúcares se degradan fácilmente, pero el ácido fítico, polifosfatos y fosfonatos se descomponen lentamente (Rodas, 2006).

1.4.3.1.2. Producción de ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos que intervienen en la solubilización de fósforo son el ácido nítrico, producido por agentes nitrificantes, el ácido sulfúrico, producido por los tiobacilos, el ácido carbónico, el ácido oxálico, cítrico, láctico, succínico y acético se producen en el suelo gracias a la descomposición de la materia orgánica por acción microbiana (Coyne & Rasskin, 2000).

Estos productos actúan sobre los compuestos insolubles de fosfato inorgánico: fosfato tricálcico, fosfato dicálcico, hidroxiapatita y roca fosfórica ya que su presencia cambia los valores de pH hasta valores ácidos, en donde el número elevado de protones provoca, por competencia en los sitios de adsorción del fósforo, el cambio de las cargas superficiales de los adsorbentes, dando como resultado la solubilización (Coyne & Rasskin, 2000).

La cantidad y tipo de ácidos orgánicos depende de los diferentes grupos de microorganismos (Coyne & Rasskin, 2000). Según un estudio realizado por Vyas y Gulati (2009), el ácido glucónico parece ser el agente más frecuente en la solubilización de fosfato mineral, seguido en menores cantidades de los ácidos 2-cetoglucónico, oxálico, málico, láctico, succínico, ácido fórmico y cítrico.

1.4.3.1.3. Producción de enzimas

Las enzimas principales que intervienen en la liberación del fósforo orgánico son:

Fosfatasas no específicas: (fosfomonoesterasas), las cuales catalizan la hidrólisis de los enlaces fosfoéster o fosfoanhídros presentes en la materia orgánica; pueden ser sintetizadas, tanto por las raíces de las plantas (fosfatasas ácidas), como por ciertos grupos de bacterias y hongos capaces de producir fosfatasas ácidas y alcalinas, las cuales se diferencian por su pH óptimo de acción, ya que las fosfatasas ácidas tienen actividad catalítica a pH de 3.5 a 4.5, mientras que las fosfatasas alcalinas a pH de 9 a 11 (Bobadilla & Rincón, 2008).

Las fosfatasa s ácidas no específicas producidas por las bacterias están formadas por tres familias moleculares, las cuales han sido designadas por su localización celular como clases moleculares A, B y C. Y parecen funcionar como secuestradores de fosfoésteres, proporcionándole a la célula nutrientes esenciales y liberando Pi a partir de nucleótidos y azúcares fosforilados (Rodríguez *et al.*, 2006).

Fosfatasa s específicas Los fosfohidrolasa s específicos con diferentes actividades incluyen: 3` nucleotidasa s y 5` nucleotidasa s fosfatasa s hexosa, y fitasa s.

En relación con las fitasa s, estas pueden dividirse en dos grupos con base en el sitio de iniciación de la hidrólisis del fosfato sobre el anillo de inositol. Las fitasa s microbianas, especialmente las de origen fúngico, frecuentemente escinden el grupo fosfato en el carbono C1 o C3 del anillo de inositol, y son llamadas 3-fitasa s. Mientras que las fitasa s vegetales actúan preferentemente sobre el carbono C6 y se denominan 6-fitasa s. Este grupo de enzimas catalizan la hidrólisis del ácido fítico a mono, di, tri, tetra y penta fosfatos de myo-inositol y Pi (Lei & Porres, 2003).

Fosfonatasa s y liasa s C-P son enzimas que llevan a cabo el clivaje del enlace C-P presente en fosfonatos orgánicos (Rodríguez *et al.*, 2006).

1.4.4. Microorganismos solubilizadores de fósforo

En el suelo existen algunos géneros bacterianos como: *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Aereobacter*, *Flavobacterium*, *Yarrowia*, *Streptosporangium* y *Erwinia* capaces de solubilizar fósforo mineral y orgánico, mediante la producción de fosfatasa y ácidos orgánicos (oxálico, cítrico, butírico, malónico, láctico, succínico, málico, glucónico, acético, glicónico, fumárico, adípico, indolacético y 2-cetoglucónico) (Paredes 2010).

Basha, citado por Paredes, (2010), indica que, el conocimiento sobre los microorganismos solubilizadores de fosfato (MSP) ha aumentado significativamente. Entre los MSP se encuentran bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (plant growth promotion rhizobacteria), las cuales son de vida libre en el suelo y

tienen la capacidad de adaptarse, colonizar y persistir en a rizósfera de la planta, favoreciendo su crecimiento, desarrollo y producción.

Estudios realizados por Rodas (2006), muestran que ciertas especies de los géneros *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Bacillus* presentan mayor actividad solubilizadora de fósforo, pero aunque muchas de estas se encuentran presentes en el suelo, su número no es suficiente para competir con la gran variedad de bacterias que se encuentran ya establecidas en diferentes rizósferas, es por ello que para obtener una alta solubilización de P, es necesario inocularlas en una alta concentración bacteriana.

Se ha señalado que la inoculación de *Pseudomonas* en cultivos de gramíneas ejerce efectos positivos en las plantas, además se ha identificado la producción y segregación de reguladores del crecimiento de plantas como auxinas, giberelinas y citoquininas, mejorando procesos como germinación de semillas, nutrición mineral y desarrollo de raíces (Rodas, 2006; Santillana, 2006).

1.4.5. Género *Pseudomonas*.

1.4.5.1. Clasificación Taxonómica

Taxonómicamente según la novena edición del Manual Bergey's de Bacteriología Sistemática (Holt *et al.*, 1994) *Pseudomonas* pertenece a:

Dominio: Bacteria

División: Proteobacterias

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Pseudomonadales

Familia: Pseudomonadaceae

Especie: *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. luteola*,
P. oryzihabitans, *P. alcaligenes*, *P. mendocina*, etc.

1.4.5.2. Características generales

Son bacilos Gram negativos, rectos o ligeramente curvados, poseen un metabolismo oxidativo no fermentativo, son móviles gracias a los flagelos polares, su tamaño varía desde 0.5 a 0.8 μm x 1.5 a 3.0 μm , algunas especies producen pigmentos fluorescentes como la piocianina (azul en medio alcalino y rojo en ácido) o la fluoresceína (pigmento amarillo), otras sintetizan una cápsula de exopolisacáridos que facilita la adhesión celular, la formación de biopelículas, es común la presencia de plásmidos y no forman esporas (Prescott *et al.*, 2004).

Son saprofitos de vida libre en el suelo o agua, capaces de utilizar una gran variedad de compuestos orgánicos como sustrato para crecer. A nivel de laboratorio crecen bien en medios con poca materia orgánica y pH neutro, a temperaturas que oscilan entre los 10° C y 42° C pero su temperatura óptima es de 25° C a 30° C. Uno de los medios más usados para el cultivo de *Pseudomonas* en el laboratorio es el medio de King B (Hernández *et al.*, 2003).

Algunas especies pueden metabolizar ambos monosacáridos de la sacarosa, mientras otras solo asimilan la glucosa y acumulan la fructosa en forma de polisacárido (Pierre, 2008). Las especies de *Pseudomonas* son típicamente oxidasa positivas, hemolíticas (en agar sangre), prueba del indol, rojo de metileno y Voges Proskauer negativas, son aerobias, aunque en ciertos casos usan el nitrato como aceptor de electrones alternativo en condiciones anaerobias, esta propiedad es encontrada en especies como *P. auriginosa*, *P. stutzeri*, y en algunas especies de *P. fluorescens* (Prescott *et al.*, 2004).

Su importancia radica en la capacidad que tienen para producir un efecto benéfico sobre las plantas, ya sea como promotores del crecimiento vegetal (PGPR) o como agentes de control biológico (BCA) (Bashan *et al.*, 2007). Otra característica importante de este género es que existen algunas especies capaces de degradar una gran variedad de compuestos orgánicos entre los que están algunos pesticidas, además de una gran variedad de compuestos halogenados e hidrocarburos derivados del petróleo (Altamirano & Pozzo, 2000).

1.4.5.3. Asociación *Pseudomona sp.* – planta

Pseudomona sp. puede estar presente en la superficie de la semilla, raíz e incluso las hojas de la planta, la cual le proporciona a la bacteria los nutrientes necesarios para llevar a cabo sus funciones metabólicas, mientras esta ejerce un efecto benéfico a través de la síntesis tanto de antibióticos y fungicidas que protegen a la planta de agentes patógenos, como de fitohormonas y vitaminas, que estimulan la germinación de semillas y emergencia de plántulas, inhibición de la síntesis de etileno, solubilización de fósforo (P) inorgánico y desarrollo de raíces (Rosas *et al.*, 2009; Fgaier & Eberl, 2010).

Se adapta fácilmente al suelo para sobrevivir y colonizar el sistema radicular, formando microcolonias o biofilms discontinuos entre los surcos de las células de la epidermis, este mecanismo se inicia con el movimiento del flagelo, el cual se presume es influenciado a nivel genético por los exudados radicales como iones, oxígeno libre, agua, enzimas, aminoácido, mucílago, compuestos fenólicos, entre otros (Bais *et al.*, 2006).

1.4.5.4. Mecanismos de acción de *Pseudomonas sp.* en la solubilización de fósforo y el crecimiento vegetal

El proceso de solubilización de fósforo es realizado ya sea por medio de la producción de ácidos orgánicos como: ácido acético, cítrico, oxálico, glucónico o succínico que al tener carga negativa forman complejos metálicos, liberando los aniones fosfatos en la solución del suelo. O por medio de las fosfatasas que actúan sobre las uniones ésteres liberando los grupos fosfatos de la materia orgánica al suelo (Cepeda, 2008).

Además su capacidad metabólica facilita el desarrollo de biopesticidas y promotores de crecimiento como: auxinas que inducen a la iniciación de las raíces y de los pelos absorbentes, giberelinas que actúan promoviendo el alargamiento de las células que componen la raíz y citoquininas que activan la división celular y retardan la senescencia radicular (González, 2008). En un experimento sobre capacidad

antagónica, con cepas de *P.aeruginosa* *P. putida* y *P. fluorescens*, se descubrió que pueden producir ácido indolacético (AIA) cuando el triptófano está presente en el medio de cultivo (Rosas *et al.*, 2009).

1.5. Sistema de hipótesis

H₁: Las bacterias aisladas de las muestras de rizósfera del cultivo de maíz pertenecen al género *Pseudomonas*.

H₂: Las bacterias *Pseudomonas* aisladas de las muestras de rizósfera del cultivo de maíz son capaces de solubilizar fósforo insoluble.

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Participantes

2.1.1. Instituciones

Las instituciones auspiciantes y participantes de esta investigación son el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) en la Estación Experimental Santa Catalina y la Secretaria Nacional de Educación Superior Ciencia, Tecnología e investigación (SENESCYT-PIC-12-INIAP-008).

2.1.2. Responsable del proyecto

Ana Katherine Pincay Verdezoto.

2.1.3. Colaboradores científicos

Ing. MSc. Carlos Yáñez.	Responsable del Programa de Maíz del INIAP.
Ing. Carlos Sangoquiza.	Técnico del Programa de Maíz del INIAP
Ing. Eduardo Morillo Ph.D.	Responsable del Departamento de Biotecnología del INIAP.
Ing. Jessica Duchicela, Ph.D.	Directora de tesis.
Ing. Marco Taipe	Codirector de tesis.

2.2. Zona de estudio

El proyecto de investigación se realizó en los ensayos del INIAP – Programa de Maíz y en los lugares no cultivados cercanos a dichos ensayos, de las provincias Imbabura, Bolívar, Chimborazo, Pichincha (Tabla 2.1) y la fase de laboratorio e invernadero en la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) del INIAP, la cual está localizada en la provincia de Pichincha, cantón Mejía, parroquia Uyumbicho, a 3058 msnm, 00°22'00'' de latitud sur y 79°32'00'' de longitud occidental.¹

¹ Datos proporcionados por la Estación Meteorológica Izobamba, perteneciente al Instituto Nacional de Meteorología (INAMHI), 20012

Tabla 2. 1: Localización, situación geográfica, climática y características generales de las localidades de muestreo.

	LOCALIDAD 1	LOCALIDAD 2	LOCALIDAD 3	LOCALIDAD 4
Provincia	Imbabura	Pichicha	Bolívar	Chimborazo
Cantón	Cotacachi	Quito	Guaranda	Riobamba
Parroquia	El Sagrario	Amaguaña	Laguacoto III	Quimiag
Sitio	Hacienda	Sección Oriental-	Universidad de	Guntuz
Altitud ⁽²⁾	2422 msnm	2756 msnm	2360 msnm	2900msnm
Latitud ⁽¹⁾	0°19'08" N	0°22'09" S	01°36'52" S	1°40'41.5" S
Longitud ⁽¹⁾	78°15'35" W	78°31'06" W	78°59'54" W	78°34'24.3" W
Temperatura	14.4 °C ⁽³⁾	17 °C ⁽⁴⁾	14 °C ⁽⁵⁾	14°C ⁽²⁾
Precipitación	980 mm ⁽²⁾	1120 mm ⁽⁴⁾	1162.4 mm ⁽³⁾	1500 mm ⁽²⁾
Extensión	2500 m ²	3000 m ²	2000 m ²	5000 m ²
Taxonomía del suelo- orden	Mollisol ⁶	Andisol ⁷	Mollisol ⁶	Mollisol ⁶
Cultivo	Avena	Maíz	Trigo	Papa
Variedad	INIAP-111	INIAP-101	INIAP-122	INIAP-102
Edad	3meses	1mes	3meses	1 mes
Fecha de muestreo	27- nov-2013	25-nov-2013	09- dic-2013	13-nov-2013

El manejo agronómico de los terrenos en estudio es muy similar en todas estas localidades, se realizan labores de labranza antes de la siembra, se usan agroquímicos, para la fertilización, el control de plagas y enfermedades (Tabla 2.2).

⁽²⁾Datos de campo tomados con GPS por el Departamento de Maíz del INIAP

⁽³⁾ Datos tomados por la Estación Meteorológica Cotacachi del INAMHI.

⁽⁴⁾ Datos tomados por la Estación Meteorológica Izobamba del INAMHI

⁽⁵⁾ Datos tomados por la Estación Meteorológica de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente de la Universidad Estatal de Bolívar.

⁽⁶⁾ Mapa general de Suelos del Ecuador Mejía 1986

⁽⁷⁾ Departamento de Suelos y Agua Informe anual 2005

Tabla 2. 2: Manejo agronómico de las localidades en estudio.

	Producto	Dosis por	Épocas de aplicación
Fertilizantes nitrógenos	<u>Si se dispone de 10-30-10 se recomienda aplicar</u>		
	10-30-10	135 kg	A la siembra
	Urea	145 kg	A la siembra y 45 días después
	<u>Si se dispone de 18-46-0 se recomienda aplicar</u>		
	18-46-0	90 kg	A la siembra
	Urea	140 kg	A la siembra y 45 días después
Herbicidas	Atrazina / (Gesaprim, Atranex , Atrapac)	2 kilos	Preemergencia o posemgerencia
	Linuron + alaclor / (Linuron, Linurex +Alanex, Alapac,Nudox)	1.5 kilos + 2 litros	Preemergencia absoluta
	2,4-D amina 720g/l (Aminapac, Aminamont).	2 litros	Posemgerencia (aplicaciones a partir de 45 cm de altura del cultivo)

Fuente: Dpto. Manejo de Suelos y Aguas y Programa de Maíz del INIAP-EESC.

2.3. Período de investigación

La presente investigación se desarrolló en un periodo de 13 meses, desde Agosto del 2013 hasta Septiembre del 2014.

2.4. Diseño estadístico

La investigación se llevó a cabo en dos fases:

- Fase I: Laboratorio.
- Fase III: Invernadero

FASE 1: Laboratorio

Muestreo

En esta fase se estudiaron muestras de suelo provenientes de áreas agrícolas y suelos de áreas no cultivadas (remanentes naturales) en las cuatro localidades en estudio, las características del área de estudio se encuentran en la Tabla 2.1. Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), para comparar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) y el porcentaje de bacterias solubilizadoras de fósforo (BSP) presentes en los sitios de muestreo.

Aislamiento y caracterización de *Pseudomonas sp.*

Las cepas aisladas de los sitios en estudio fueron nombradas con códigos según su procedencia (Tabla 2.3). Para la identificación microbiológica se aplicaron pruebas de galería corta como: oxidasa, peroxidasa, citrato, ureasa, TSI, hidrólisis de la gelatina, glucosa nitrato agar y pruebas API 20E, para dar a conocer el metabolismo de las cepas bacterianas y compararlas con el metabolismo del género *Pseudomonas* reportado en la bibliografía. En la identificación molecular la secuencia obtenida fue comparada con las secuencias presentes en la base de datos del programa en web BLAST (Basic Local Aligement Search Tool). La prueba de solubilidad de fósforo *in vitro* fue evaluada midiendo los halos de solubilidad (Meera & Balabaskar, 2012).

Tabla 2. 3: Códigos y procedencia de las cepas de *Pseudomonas sp.* empleadas en la investigación.

Código	Procedencia de la cepa	Localidad
caI	Cepa aislada de suelo agrícola	Hacienda Tunibamba
cnI	Cepa aislada de suelo no cultivado	
caP	Cepa aislada de suelo agrícola	Sección Oriental- INIAP
cnP	Cepa aislada de suelo no cultivado	
caB	Cepa aislada de suelo agrícola	Universidad de Bolívar
cnB	Cepa aislada de suelo no cultivado	
caC	Cepa aislada de suelo agrícola	Guntuz
cnC	Cepa aislada de suelo no cultivado	

c: cepa

a: suelo agrícola; **n:** suelo no cultivado

I: Imbabura; **P:** Pichincha **B:** Bolívar; **C:** Chimborazo

FASE II: Invernadero

Evaluación de de las cepas bacterianas en condiciones de invernadero.

Para la evaluación de las cepas bacterianas en condiciones de invernadero se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), con 24 tratamientos y dos testigos, los tratamientos correspondieron a las 24 cepas bacterianas aisladas (Tabla 2.4) más dos testigos (sin inocular), uno con las mismas condiciones de sustrato y fertilización

de los tratamientos y otro con fertilización fosfatada, las repeticiones consistieron en 5 plantas de maíz por tratamiento.

Tabla 2. 4: Tratamientos para el ensayo en invernadero.

Tratamiento	Código	Descripción
T1	caI2	Cepa 1 de suelo agrícola de Imbabura
T2	caI3	Cepa 2 de suelo agrícola de Imbabura
T3	caI6	Cepa 3 de suelo agrícola de Imbabura
T4	cnI1	Cepa 1 de suelo en estado natural de Imbabura
T5	cnI3	Cepa 2 de suelo en estado natural de Imbabura
T6	cnI5	Cepa 3 de suelo en estado natural de Imbabura
T7	caP1	Cepa 1 de suelo agrícola de Pichincha
T8	caP2	Cepa 1 de suelo agrícola de Pichincha
T9	caP3	Cepa 1 de suelo agrícola de Pichincha
T10	cnP1	Cepa 1 de suelo en estado natural de Pichincha
T11	cnP2	Cepa 1 de suelo en estado natural de Pichincha
T12	cnP3	Cepa 1 de suelo en estado natural de Pichincha
T13	caB1	Cepa 1 de suelo agrícola de Bolívar
T14	caB4	Cepa 2 de suelo agrícola de Bolívar
T15	caB5	Cepa 3 de suelo agrícola de Bolívar
T16	cnB1	Cepa 1 de suelo en estado natural de Bolívar
T17	cnB2	Cepa 2 de suelo en estado natural de Bolívar
T18	cnB5	Cepa 3 de suelo en estado natural de Bolívar
T19	caC1	Cepa 1 de suelo agrícola de Chimborazo
T20	caC2	Cepa 2 de suelo agrícola de Chimborazo
T21	caC4	Cepa 3 de suelo agrícola de Chimborazo
T22	cnC1	Cepa 1 de suelo en estado natural de Chimborazo
T23	cnC2	Cepa 2 de suelo en estado natural de Chimborazo
T24	cnC3	Cepa 3 de suelo en estado natural de Chimborazo
Testigo fertilizado	T	Sin cepa bacteriana más fertilización fosfatada
Testigo absoluto	T ₀	Sin cepa bacteriana sin fertilización

2.5. Procedimiento

2.5.1. FASE I: Laboratorio

2.5.1.1. Muestreo

El muestreo se realizó en los ensayos experimentales del Programa de Maíz del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias ubicados en las provincias de Imbabura, Bolívar, Chimborazo y Pichincha; y en sitios cercanos a cada localidad que no tengan manejo agrícola. Se recogió aproximadamente 3 kg de suelo a una profundidad de 15 cm.

En las localidades agrícolas se tomaron muestras compuestas de suelo rizosférico del cultivo de maíz. El muestreo se realizó en forma de zig-zag en diez puntos del terreno de cada localidad, con la ayuda de un barreno (INIAP, 2007).

En los lugares no cultivados se removió la basura y la vegetación de la superficie (kikuyo), se tomaron tres submuestras en puntos al azar de cada localidad (Duchicela, *et al.* 2013).

Todas las herramientas de muestreo se esterilizaron con etanol al 70 %. Las muestras fueron colocadas en fundas Ziploc estériles, etiquetadas y almacenadas en un cooler a 4°C para su transporte hasta el laboratorio de la planta piloto del programa maíz de la EESC (Guzmán *et al.* 2012).

Se envió una submuestra de 1 Kg de suelo al Departamento de Manejo de Suelos y Aguas (DMSA) de la Estación Experimental Santa Catalina para realizar un análisis de nutrientes, pH y materia orgánica. La submuestra restante se utilizó para el presente estudio.

2.5.1.2. Procesamiento de muestras para el aislamiento de *Pseudomonas sp.*

Se pesaron 20 g de suelo de cada sitio y se colocaron en 180 ml de solución salina estéril al 0.85% de NaCl, esta dilución fue agitada a 120 rpm por 15 minutos, posteriormente se realizaron diluciones hasta 10^{-6} en tubos de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril, de los cuales con espátula de Digrafski se sembró 100 μ l de solución en agar King B (KB) (Anexo A.1). Las cajas petri fueron selladas, etiquetadas e incubadas a 30°C por un periodo de 24 horas para el conteo de UFC y por 48 horas para el aislamiento y purificación de *Pseudomonas sp* (Echeverría, 2012).

2.5.1.2.1. Conteo de Unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en el suelo.

Se sembró, por el método de extensión en placa, las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} por triplicado en agar KB; se incubaron a 30°C por 24 horas se utilizó la siguiente ecuación para la determinación de UFC (Fernández *et al.*, 2006).

$$\frac{UFC}{g_{suelo}} = \frac{N}{V_{inóculo} * D} * \frac{P}{FH}$$

Dónde:

UFC/g suelo: Unidades Formadoras de Colonias por gramo de suelo rizosferico.

N: número promedio de colonias obtenidas para una dilución dada

D: Dilución

P: peso de la muestra húmeda

FH: factor de corrección de humedad ($1 - (\% \text{humedad} / 100)$).

2.5.1.2.2. Porcentaje de bacterias solubilizadoras de fósforo presentes en el suelo

Por el método de extensión en placa, se sembró las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} por triplicado en agar Pikovskaya (Pvk) (Anexo A.3), se incubaron a 30°C por siete días, se contó el número de colonias que presentaron un halo transparente alrededor de la

misma y se dividió para el número total de colonias presentes en la caja petri (Abreu & Ferreira, 2010).

2.5.1.3. Aislamiento y purificación de *Pseudomonas sp.*

Luego de 48 horas de incubación, se observaron con luz UV y se seleccionaron las colonias que emitían fluorescencia, las cuales fueron sembradas por agotamiento en estría en un nuevo medio e incubadas a la misma temperatura (Meera & Balabaskar, 2012).

Se realizaron tres aislamientos sucesivos de cada cepa para asegurar su pureza, posteriormente con un asa estéril se seleccionó una colonia de cada aislamiento, la cual fue sembrada en 3 tubos pico de flauta con agar nutritivo (Anexo A.2) e incubadas a 30°C por 24 horas para su posterior almacenamiento a 4°C (Meera & Balabaskar, 2012).

2.5.1.4. Caracterización morfológica de *Pseudomonas sp.*

Para la descripción morfológica de colonias, cada aislado bacteriano se sembró en cajas Petri con agar nutritivo, las mismas que se incubaron a 30°C por 48h. Se describió a las colonias formadas y apreciables a simple vista en base a los criterios morfológicos descritos por Prescott *et al.* (2004), los parámetros y los procedimientos fueron los siguientes:

- **Tamaño:** Se determinó como colonias: pequeñas ≤ 1 mm, medianas de 1-4 mm y grandes >4 mm.
- **Forma:** Se atribuyó a cada colonia como: puntiforme, circular, filamentosa, irregular, rizoide y fusiforme o alargada (Figura 2.1).
- **Elevación:** Se observó si la colonia era: plana, elevada, convexa, pulvinada y umbonada según la Figura 2.1.
- **Margen o Borde:** La Figura 2.1 indica que el borde de las colonias puede ser: entero, ondulado, lobulado, erosionado, filamentoso ó rizado.

- **Superficie:** Se apreció si la colonia era: lisa brillante, lisa mate, Irregular brillante, irregular mate, filamentoso brillante ó filamentoso mate.
- **Consistencia:** Con un asa de platino estéril se tomó una porción de colonia y se determinó si su consistencia era: dura (colonias quebradizas), cremosa (fácilmente pasa el asa) ó viscosas (forma filamentos o mucosidades al tomarlas con el asa).
- **Color:** Se designó el color según el criterio del observador.



Figura 2. 1: Criterios morfológicos para describir colonias bacterianas según su: forma, elevación y borde. Fuente: Prescott, *et al.*, (2004).

2.5.1.5. Caracterización bioquímica de *Pseudomonas sp.*

Se sembraron las cepas en estudio en agar nutritivo a 30°C por 48 horas la identificación a nivel de género se realizó mediante el método bioquímico convencional aplicando pruebas como: tinción Gram, catalasa, oxidasa, TSI, citrato, hidrolisis de la gelatina, nitrato, ureasa, prueba de motilidad, cuyo procedimiento empleado se describe a continuación:

- **Tinción Gram:** Se tomó la muestra bacteriana con ayuda de un asa estéril y se realizó un frotis espiral en un portaobjetos, seguido se fijó la muestra al fuego y se tiñó siguiendo el procedimiento de Prescott, *et al.*, (2004).
- **Prueba de peroxidasa:** Se colocó la colonia en un portaobjetos y sobre esta se agregó una gota de una solución de peróxido de hidrógeno al 3%, para

inmediatamente observar la reacción positiva (formación de burbujas) o negativa (sin cambio alguno) (Jean & Faddin, 2003).

- **Prueba de oxidasa:** Se usaron discos Taxo N de 6 mm con 6% de monoclóhidrato de paminodimetilanilina, a los cuales se les frotó la colonia en estudio y se observó la reacción positiva (cambio de color a morado) o negativa (sin cambio alguno) (Jean & Faddin, 2003).
- **Prueba TSI (Triple Sugar Iron):** Se preparó medio TSI en tubos con pico de flauta, posteriormente con el asa estéril se tomó una colonia bacteriana y se realizó una picadura profunda, luego se estrió en la superficie y se incubó por 24, 48 y 72 horas a 30°C. Transcurrido el tiempo se observó la reacción (Jean & Faddin, 2003).
- **Prueba de Citrato:** Se preparó tubos con agar Citrato Simmons, solidificado en forma de pico de flauta. Con el asa se tomó una colonia bacteriana y se hizo una punción en el medio, posteriormente se estrió en la superficie y se incubaron los tubos a 30°C por 24, 48 y 72 horas. Transcurrido el tiempo se observó la reacción positiva con el cambio de color a azul (producción de citrato permeasa) o negativa sin cambio alguno (Jean & Faddin, 2003).
- **Hidrólisis de la gelatina:** Se preparó un medio con gelatina en tubos, posteriormente se inoculó, se incubó por 24, 48 y 72 horas y se comparó con un tubo sin inocular (Jean & Faddin, 2003).
- **Prueba de ureasa:** Se preparó tubos con agar Urea base, solidificado en forma de pico de flauta. Con un asa estéril se tomó la colonia bacteriana y se estrió en la superficie del medio, se incubaron los tubos a 30°C por 24, 48 y 72 horas. Transcurrido el tiempo se observó la reacción (Jean & Faddin, 2003).

- **Glucosa Nitarto Agar:** Se preparó tubos con agar Glucosa Nitrato, se inoculó la colonia por punción con asa recta, posteriormente se incubó a 30°C por 24, 48 y 72 horas, se evaluó oxidación, fermentación, movilidad y reducción de nitratos. (Britanialab) (Jean & Faddin, 2003).

La confirmación del género y definición de las especies se realizó mediante el sistema comercial API20E (BioMerieux, St Louis, MO, USA), siguiendo las instrucciones de la casa fabricante.

2.5.1.6. Caracterización molecular de las cepas de *Pseudomonas sp.*

Se preparó una suspensión bacteriana en 10 ml de caldo nutritivo, de las 24 cepas en estudio más dos controles negativos identificados con métodos moleculares por Carrera (2012) como *B.subtilis*. Se incubaron por 24h a temperatura ambiente a 120 rpm.

Extracción de ADN:

La extracción de ADN se realizó empleando el protocolo de “Extracción de ADN de bacterias y Hongos” modificado por Francisco Jarrín del Centro Internacional de la PAPA (Weising, *et al*, 1995), el cual se detalla a continuación:

Se colocó 1 ml del cultivo a tubos eppendorf estériles para luego centrifugar a 13000 rpm por 5 min, se eliminó el sobrenadante, se colocó una pequeña cantidad de arena de cuarzo y 0.5 mL de tampón de extracción (Anexo B.1) y con ayuda de un pistilo estéril se pulverizó la biomasa por un período de 4 minutos. Se colocó los tubos en hielo, posteriormente, se añadió 300µL de cloroformo: isoamilalcohol (CIA) 24:1 y se mezcló invirtiendo los tubos para homogenizar el tampón y el solvente. Se incubaron las muestras a 55°C por 30 minutos, luego se dejaron a temperatura ambiente por 5 minutos y se centrifugaron por 10 minutos a 13000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un microtubo nuevo, limpio y estéril evitando topar la interface, se añadió de 1 a 1.5 volúmenes de isopropanol y se colocó a -20°C por 1

hora, para que precipiten los ácidos nucleicos. Se centrifugó los microtubos por 3 minutos a 13000 rpm y se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet dos veces con 100 μ L de etanol frío al 70%, se descartó y evaporó todo el etanol. Posteriormente, se re suspendió el ADN en 50 μ L de tampón TE (Anexo B.2) y se guardó a -20°C (Morillo & Miño, 2009).

Cuantificación del ADN

La cuantificación se realizó mediante espectrofotometría con el EPOCHTM (BioTek, USA), este equipo detecta la radiación emitida por las bases nitrogenadas presentes en el ADN en absorbancia de 260 nm y 280 nm (Rocha, 2002). El análisis de datos se realizó a través del software de datos Gen5 (BioTek® Instruments, Inc., 2012), el cual nos muestra una tabla en Excel con las concentraciones de ADN. A continuación se diluyó las muestras hasta una concentración de ADN a 10 ng/ μ l (Morillo & Miño, 2009).

Amplificación del 16Sr:

Para la amplificación de la secuencia 16Sr se probaron distintas combinaciones de primers específicos para esta región de ADN. Los primers utilizados fueron basados en el estudio realizado por Wang y Quian (2009) y se detallan en la Tabla 2.5.

Para realizar la reacción de amplificación se utilizó 4 μ l de ADN [1.6 ng/ μ l], 2.5 μ l de Buffer PCR 1X, 0.75 μ l de MgCl_2 [1.5mM], 0.5 μ l de dNTP's [0.2 mM], 0.5 μ l de cada primer [0.2 μ M], 0.4 de Taq polimerasa [1.6ng/ μ l], en un volumen de 25 μ l que fue ajustado con agua ultrapura.

Adicionalmente se incluyó un control negativo, el cual contenía todos los componentes de la PCR antes mencionados excepto el ADN; que fue remplazado con 4 μ l de agua ultrapura, para constatar que no existe contaminación en la reacción.

El programa de amplificación consistió en una denaturación inicial de 5 minutos a 95°C, 30 ciclos de: 1 minuto a 94°C (denaturación); 45 segundos a 54°C (hibridación); y 1 minuto a 70°C (extensión), seguidos por una extensión final de 8 minutos a 70°C y un enfriamiento de 5 minutos a 4°C (Benitez *et al*, 2007). La PCR se realizó en un termociclador PTC-200 (Roche Molecular Systems, Inc. F, USA).

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% (p/v). Para la carga de las muestras se mezclaron 4µl de producto PCR con 2µl de Blui Juice 1X marca Invitrogen, el marcador de peso utilizado fuerackIt™ 100 bp DNA Ladder marca Invitrogen No. Cat. 10488-058. La corrida electroforética se realizó en buffer TAE 1X (Anexo B.3) a un voltaje constante de 100V durante 40 minutos, posteriormente se realizó la tinción de los mismos en una solución de bromuro de etidio (15ppm) por 30 minutos en agitación continua en oscuridad. Los geles se observaron en el fotodocumentador marca Dolphin - View (Wealtec, USA) (Morillo E. y G.Miño, 2011).

Tabla 2. 5: Combinación de primers para la amplificación de la secuencia 16Sr.

Primer	Secuencia*	Pb	Tamaño del
<i>Combinación # 1</i>			
27F	5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3'	20	1498
1525R	5'- AAGGAGGTGWTCCARCC -3`	17	
<i>Combinación # 2</i>			
E338F	5'- ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT -3'	21	631
E969R	5'- TTACCAGGTCTTGACA -3'	16	
<i>Combinación # 3</i>			
U341F	5'- CCTACGGGRSGCAGCAG -3'	17	712
U1053R	5'- CTGGTGTCTCGTGAGATG -3'	16	

*Primers degenerados (nucleótidos que son dos o más bases) M=A,T; R=A,G; S=C,G.

De las combinaciones presentadas en la Tabla 2.5 se escogió la combinación 27F; 1525R para secuenciar en MACROGEN Inc. y E338F; E969R para secuenciar en el laboratorio de biotecnología del INIAP- EESC.

Purificación

Por muestra de ADN se hicieron cuatro reacciones de amplificación, las cepas cnB2, cnI3, y cnP1 fueron amplificadas con la combinación de primers E338F; E969R, mientras el resto de cepas fueron amplificadas con los primers 27F; 1525R.

Se utilizó 50µl de producto PCR, el cual fue purificado con el kit PureLink® PCR Purification marca Invitrogen (No. Cat. K3100-001), siguiendo el procedimiento modificado de la casa comercial, el cual se detalla a continuación:

1. Añadir 200µl de tampón de unión B3 con isopropanol en 50 µl de producto PCR. Mezclar bien.
2. Pipetear la muestra en una columna de centrifugación PureLink® en un tubo de recogida. Centrifugar la columna a 10000 rpm. Desechar el sobrenadante.
3. Insertar la columna en el tubo colector y añadir 500 µl de tampón de lavado (W1) con etanol. Centrifugar a 10000 rpm. Desechar el sobrenadante y colocar la columna en el mismo tubo de recogida. Centrifugar la columna a la velocidad máxima durante 2-3 minutos.
4. Colocar la columna en un tubo de elución limpio 1.7 ml (suministrado con el kit).
5. Añadir 15 µl de tampón de elución al centro de la columna. Incubar la columna a temperatura ambiente durante 5 minutos. Centrifugar la columna a la velocidad máxima durante 2 minutos.
6. Repetir el paso 5. El tubo de elución contiene el producto de PCR purificado. Almacenar el ADN purificado a 4 ° C para su uso inmediato o a -20 ° C para almacenamiento a largo plazo.

Secuenciación del ADNr 16Sr

Las muestras del 16Sr fueron enviadas al laboratorio MACROGEN Inc. (Seoul, Korea), para su secuenciación con el primer 27F. Aquellas que no presentaron una buena lectura fueron secuenciadas en el laboratorio de biotecnología del INIAP, para

lo cual se utilizaron los productos amplificados con los primers E338F; E969R, se purificaron y realizó la reacción de secuencia en el secuenciador ABI-PRISM 310 (Applied Biosystems, USA).

Para realizar la reacción de secuenciación se utilizó el siguiente mix por primer 2µl de ADN [4 ng/µl], 1µl de Buffer Seq 0.5X, 2µl Master Mix 0.5X, 3.2µl de primer E338F o E969R, en un volumen de 10µl que fue ajustado con agua ultrapura.

Análisis de secuencias.

Debido a que solo se secuenció la cadena forward, se procedió a comparar el cromatograma dado por MACROGEN con la secuencia obtenida con el primer 27F, para posteriormente ingresar estas secuencias al programa BLAST disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST, el cual realizó alineamientos mostrando porcentajes de cobertura, e identidad.

Al contar con el género y especie de cada muestra, se verificó que los resultados de las pruebas morfológicas y bioquímicas correspondan a los géneros identificados.

2.5.1.7. Evaluación de la Solubilización de fosfatos *in vitro*

Se preparó una suspensión bacteriana de cada cepa identificada como *Pseudomonas sp.*, para lo cual fueron sembradas en frascos de vidrio con 30 ml caldo nutritivo (Anexo A.4), este inóculo se incubó a temperatura ambiente por 24 horas y a 100rpm. Posteriormente se midió la concentración bacteriana con un espectrofotómetro Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific, USA) y se ajustó con agua destilada estéril a una concentración uniforme de 1×10^8 aproximadamente, de este inóculo se tomaron 2 µl y se sembró por triplicado en agar Pvk con purpura de bromocresol como indicador de pH, se incubaron a 30°C por un periodo de 14 días y se midió el diámetro de los halos de solubilidad a los 3, 5, 7 y 14 días (Niklitschek, 2008).

Para la determinación del índice de solubilización (IS) se aplicó la siguiente fórmula (Niklitschek, 2008):

$$IS = \frac{Dc(mm) + Dh(mm)}{Dc (mm)}$$

Donde:

IS: índice de solubilidad

Dc: diámetro de la colonia

Dh: diámetro del halo

2.5.1.8. Conservación de las cepas de *Pseudomonas sp.*

Se conservaron las cepas aisladas de dos maneras:

1.- Se sembraron las cepas solubilizadoras de fósforo en tubos pico de flauta con agar nutritivo y se incubaron por 24 horas a 30°C, posteriormente se recogieron las colonias con caldo nutritivo y glicerol (1:1) estéril, y se distribuyó en tubos eppendorf estériles, los cuales fueron congelados a 0°C.

2.- Al finalizar la investigación se preparó un inóculo en 20 ml de caldo nutritivo de las mejores cepas tanto del ensayo de laboratorio como el de invernadero, se incubaron por 24 horas a 120 rpm, se centrifugaron a 13000 rpm por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se liofilizaron.

2.5.2. FASE II: Invernadero

2.5.2.1. Análisis químico del sustrato

El sustrato utilizado fue una mezcla de turba y suelo (1:3), el cual fue esterilizado a 120°C y 1 atm de presión por 70 min, por dos días consecutivos (Marques, *et al*, 2010). Se realizó un análisis de nutrientes tanto iniciales como finales, al comenzar el ensayo se envió una muestra de este suelo estéril al DMSA para el respectivo análisis (Tabla 2.6), con ello se procedió a realizar la fertilización añadiendo 0.3g de Urea, 0.2g de Muriato de potasio y 0.11g de Sulpomag por kg de

suelo. Para el testigo fertilizado se realizó la misma fertilización y adicionalmente se agregó 0.22g de súper fosfato triple (SFT) por kg de suelo (Parra, 2014).

El fertilizante sulphomag utilizado tiene la siguiente composición 22%K₂O-18%MgO-22%S, y el 0-0-60 (muriato de potasio) contiene 60% de (K₂O) (Parra, 2014).

Tabla 2. 6: Análisis del sustrato estéril para el ensayo de invernadero.

Elemento	Unidad ⁸	Concentración ⁹	
N	Ppm	102.00	A
P	ppm	58.00	A
S	ppm	35.00	A
K	meq/100 ml	0.10	B
Ca	meq/100 ml	12.30	A
Mg	meq/100 ml	1.60	M
Zn	ppm	3.00	M
Cu	ppm	5.90	A
Fe	ppm	197.00	A
Mn	ppm	77.10	A
B	ppm	0.60	B
MO	%	10.80	A

pH: 5.87

2.5.2.2. Preparación del inóculo

Se preparó 150 ml de inóculo en caldo nutritivo, por cada cepa, se incubaron a temperatura ambiente a 120 rpm, por 48 horas, posteriormente se midió la concentración bacteriana con ayuda de un espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys™ 20 (Thermo Fisher Scientific, USA) y se ajustó con agua destilada estéril a una concentración de 10⁸ UFC (Meera y Balabaskar, 2012).

⁸Unidades de concentración, ppm = Partes por millón, meq/100 ml suelo = miliequivalentes por 100 mililitros de suelo.

⁹Interpretación de concentración, A = Alto, M= Medio, B = Bajo.

2.5.2.3. Siembra e inoculación.

Desinfección y pre-germinación de la semilla de maíz

Se utilizaron semillas de maíz, variedad INIAP-101, sin tratamiento químico, las cuales se desinfectaron superficialmente sumergiéndolas en alcohol al 96% durante un minuto, transcurrido el tiempo se desechó el alcohol y se añadió una solución de hipoclorito de sodio con ácido clorhídrico (Anexo A.5) durante 1 minuto en agitación, posteriormente se desechó esta solución y se realizó cuatro lavados con agua destilada estéril para finalmente colocarlas en papel toalla humedecido e incubarlas a 28°C por tres días para promover la germinación, transcurrido este tiempo se seleccionaron aquellas semillas con radícula de 2 a 2.5 cm de longitud aproximadamente (Carrera, 2012).

Inoculación y siembra

Las semillas pre-germinadas seleccionadas fueron sumergidas durante 45 minutos en el inóculo preparado anteriormente, en constante agitación, luego de este tiempo se procedió a sembrar una semilla por maceta a una profundidad de 2.5cm aproximadamente. (Rubio 2003). El riego se realizó periódicamente con agua estéril, según su requerimiento y hasta alcanzar la capacidad de campo (Yáñez *et al.* 2013).

Microensayo

A los 35 días después de la siembra se realizó un pequeño ensayo con los tratamientos cuyas plantas no germinaron o no se desarrollaron correctamente. Para lo cual se desinfectaron 30 semillas de maíz INIAP – 101, se inocularon 5 semillas con las cepas cnB5, cnB2, caB4 cnC3, caP3 (cepas problema) además se incluyó un testigo cuya germinación y desarrollo en el ensayo de invernadero fue óptimo (caB1), y un testigo sin inocular.

La concentración bacteriana usada para este microensayo fue de 10^8 , y las semillas desinfectadas sin germinar fueron sumergidas por 45 minutos en los respectivos inóculos, posteriormente fueron sembradas en sustrato estéril.

2.5.2.4. Cosecha del experimento

Al finalizar las ocho semanas del ensayo, las plantas fueron retiradas de las macetas separando el sustrato de las raíces teniendo cuidado de no quebrarlas. Se recogió el sustrato de cada tratamiento y se envió al DMSA para el análisis de nutrientes. Por otra parte fueron separados la raíz y el vástago de la planta, se midió la altura de planta, área foliar y peso fresco del vástago, a su vez se lavaron las raíces eliminando los restos de sustrato y se midió la longitud de raíz, y peso fresco. Finalmente se colocaron en una estufa BINDER Modelo ED 23 (Instrumentación Científica Técnica, S.L, España) a 50°C por 48 horas para secarlas (Cepeda 2008). Los datos registrados se analizaron mediante el software estadístico InfoStat/Estudiantil versión 2.0.

2.6. Análisis de datos

Cada fase de la investigación analizó sus variables de manera independiente; a continuación se reporta la fase y las variables con el tipo de análisis de datos empleado:

2.6.1. FASE I: Laboratorio

2.6.1.1. Muestreo

Los factores en estudio en esta fase son el suelo agrícola y suelo no cultivado, para lo cual se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), ya que se quiere comparar la abundancia de la población bacteriana y el porcentaje de bacterias solubilizadoras de fósforo. Para el análisis estadístico se utilizó un ANOVA para determinar variabilidad los dos tipos de suelo, adicionalmente, se consideró un análisis funcional con la prueba de Tukey al 5% como prueba de significancia.

2.6.1.2. Caracterización de *Pseudomonas sp.*

Las variables observadas en esta fase son las pruebas bioquímicas, moleculares e índice de solubilización de fósforo, realizadas a las 26 cepas bacterianas aisladas. En la identificación bioquímica se obtuvieron datos cualitativos indicando si las muestras eran positivas (+) o negativas (-) para las pruebas, según la reacción química o metabólica que manifiesten (Gamazo *et al.*, 2005).

Mientras que en la caracterización molecular las secuencias enviadas por MACROGEN y obtenidas en el ABY fueron alineadas con la base de datos del GenBank empleando el programa Basic BLAST de acceso libre en el internet (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), el cual utiliza un algoritmo heurístico para realizar los alineamientos. De los resultados obtenidos en este programa se tomaron los valores de cobertura, máxima identidad y e-value, para determinar cuál fue el mejor alineamiento.

2.6.2. FASE II: Invernadero

Las variables de esta fase poseen una relación directa con el crecimiento de las plantas de maíz, para evaluar el efecto de inoculación con las 24 cepas bacterianas. En el análisis estadístico se utilizó un ANOVA para determinar variabilidad entre los tratamientos y las repeticiones. Además, se realizó un análisis funcional con la prueba de Tukey al 5%, este permitió conocer los mejores tratamientos en función de las variables involucradas en promover el crecimiento de las raíces y parte aérea del maíz. Las variables evaluadas fueron:

2.6.2.1. Altura de las plantas

Con la ayuda de un metro se tomó la altura de la planta a partir del nivel de la tierra hasta la hoja con más empinamiento de la planta, cada 15 días a partir de la siembra hasta finalizar las ocho semanas (Cepeda, 2008).

2.6.2.2. Longitud de las raíces

Para la longitud se midió desde la base del tallo hasta la parte apical de la raíz más larga con la ayuda de un metro (Cepeda, 2008).

2.6.2.3. Porcentaje de materia seca y humedad

Se pesó la raíz y el vástago de la planta (fresco y seco) por separado en una balanza analítica marca KERN ABS y se utilizó la siguiente fórmula descrita por Azofeifa y Moreira citado por Cepeda (2008) para el cálculo de porcentaje de materia seca.

$$\%Materia\ Seca = \frac{Peso\ seco}{Peso\ húmedo} * 100$$

Además se midió el contenido hídrico relativo al peso seco de las plantas, a través de la siguiente fórmula descrita por Azofeifa y Moreira citado por Cepeda (2008).

$$W = \frac{Peso\ húmedo - Peso\ seco}{Peso\ húmedo}$$

2.6.2.4. Área foliar

Se tomó una foto digital, se midió la longitud de la hoja y se utilizó el software libre para análisis de imágenes Imagej.

2.6.2.4.1. Análisis foliar

Se colectaron submuestras de tejido foliar seco por tratamiento las cuales fueron enviadas al DMSA para el análisis del contenido de N-P-K-Ca-Mg absorbido por la planta.

Con el porcentaje de fósforo se procedió a calcular la cantidad de P₂O₅ absorbido por la planta, para lo cual se aplicó la siguiente fórmula descrita por (Nicolalde & Quintana, 2011):

$$PP = \% \frac{P}{100} * MS * 2,29$$

Donde:

PP = Fósforo en g/planta de P₂O₅

%P = Porcentaje de P

MS = Materia seca en g/planta

2.29 = Factor para convertir P a P₂O₅

CAPÍTULO III: RESULTADOS

Los resultados se presentan en dos fases

- Fase I: Laboratorio: Caracterización de las cepas bacterianas aisladas.
- Fase III: Invernadero: Evaluación funcional en invernadero de las cepas bacterianas.

3.1. FASE I. Laboratorio

3.1.1. Procesamiento de muestras para el aislamiento de *Pseudomonas sp*

Los análisis de nutrientes de las muestras de suelo provenientes de áreas agrícolas y de suelos no cultivados (remanentes naturales) en las cuatro localidades en estudio se detallan en el Anexo D.2.

En este estudio se tomó en consideración el contenido de nitrógeno, fósforo y materia orgánica presente en los suelos de cada sitio de muestreo. Los mismos que se detallan a continuación.

Tabla 3. 1: Análisis de Suelos del muestreo realizado en las provincias de Imbabura, Pichincha, Bolívar y Chimborazo.

Provincia	Procedencia	N(ppm)	P (ppm)	MO %
Imbabura	Suelo agrícola (a)	27	18	3.2
	Suelo no cultivado (n)	52	9	9.8
Pichincha	Suelo agrícola (a)	51	40	2.1
	Suelo no cultivado (n)	69	7,1	7.9
Bolívar	Suelo agrícola (a)	20	30	2.9
	Suelo no cultivado (n)	61	14,1	11
Chimborazo	Suelo agrícola (a)	36	31	2.2
	Suelo no cultivado (n)	38	5	6.5

En los análisis de nutrientes de las muestras de suelo recolectadas se evidenció que existe un mayor porcentaje de materia orgánica (M.O.) y nitrógeno en los suelos no cultivados con respecto a los suelos de uso agrícola. Mientras que el contenido de fósforo se encuentra en mayor proporción en los suelos de uso agrícola (Tabla 3.1 y Figura 3.1).

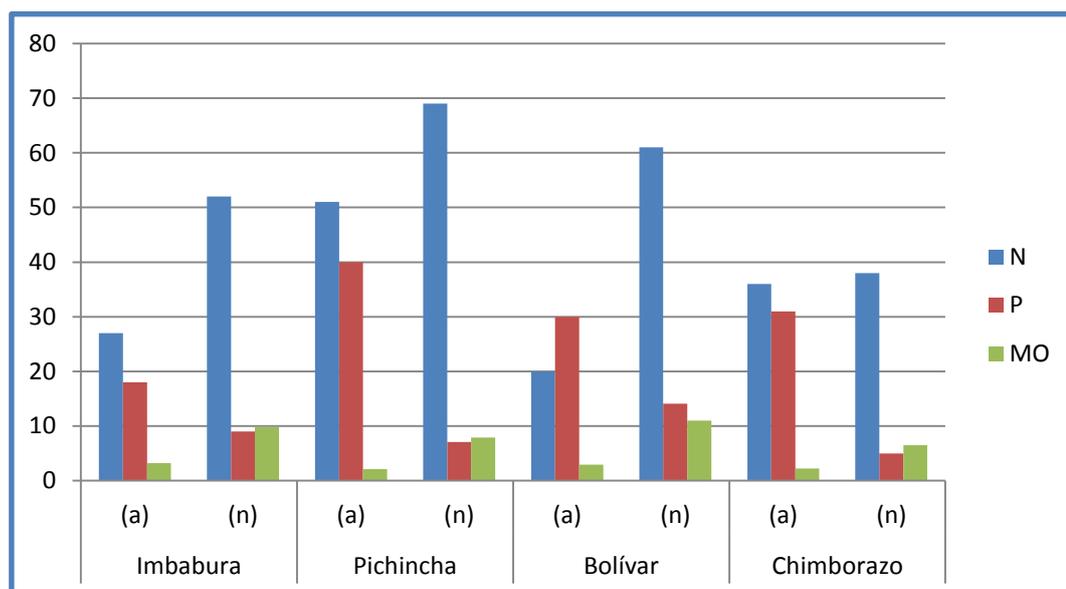


Figura 3. 1: Contenido de nitrógeno, fósforo y materia orgánica en los suelos agrícolas de las provincias de Imbabura, Pichincha, Bolívar y Chimborazo; y en áreas no cultivadas (remanentes naturales).

3.1.1.1. Cuento de Unidades formadoras de colonias presentes en el suelo.

Se realizó un ANOVA para el número de unidades formadoras de colonia (UFC/g de suelo), transformando la variable con el logaritmo de base 10 para normalizar los datos (Tabla 3.2); se encontró diferencias altamente significativas ($p < 0.0001$) para las fuentes de variación de provincias, uso de suelo, y la interacción provincias por uso de suelo. El promedio general fue de 6.45 (2.82×10^6 UFC/ g suelo) y el coeficiente de variación fue de 12.0%, que resulta excelente para este tipo de ensayo.

Tabla 3. 2: Análisis de varianza para el número de unidades formadoras de colonias bacterianas por gramo de suelo (ufc/g) transformado con log base 10.

Fuente de variación	GL	SC	CM	F	p-valor
Total	47	12.38			
provincias (P)	3	7.18	2.39	400.47	< 0.0001
Uso de suelo (S)	1	2.04	2.04	340.78	< 0.0001
P x S	3	2.91	0.97	162.49	< 0.0001
Error	40	0.24	0.01		
Promedio	6.45 (2.82 x 10 ⁶ UFC/ g suelo)				
C.V %	12.0 %				

La comparación de las UFC entre las provincias, determinó que en Bolívar hubo una mayor cantidad de UFC bacterianas por gramo de suelo, ubicándose en el primer rango (A), con un promedio de 6.31×10^6 UFC/ g; mientras que en Pichincha existió un menor número de UFC bacterianas; con un promedio de 6.31×10^5 UFC/ g suelo y se ubicó en el cuarto rango (D) (Tabla 3.3).

Tabla 3. 3: Tukey al 5% para en el número de unidades formadoras de colonias de bacterias por gramo de suelo (ufc/g) expresados en log base 10. Fuente de variación: provincias.

Código	Significado	Log ₁₀ UFC	UFC/g suelo
I	Imbabura	6.68 B	4.79×10^6
P	Pichincha	5.80 D	6.31×10^5
B	Bolívar	6.80 A	6.31×10^6
C	Chimborazo	6.51 C	3.24×10^6

De manera general en los suelos no cultivados se encontró un mayor número de UFC (4.57×10^6 UFC/ g suelo), con respecto a los suelos de uso agrícola (1.74×10^6 UFC/ g suelo), evidenciándose dos rangos (Tabla 3.4).

Tabla 3. 4: Tukey al 5% para en el número de unidades formadoras de colonias de bacterias por gramo de suelo (ufc/g) expresados en log base 10. Fuente de variación: uso de suelo (agrícola, remanente natural).

Código	Significado	Log ₁₀ UFC	UFC/g suelo
A	Suelo agrícola	6.24 B	1.74×10^6
N	Suelo no cultivado	6.66 A	4.57×10^6

Al realizar la prueba de Tukey para la interacción provincias por uso de suelo se determinó cuatro rangos, en el primer rango se ubican: el suelo no cultivado de Bolívar con un promedio de 6.95×10^6 UFC/ g suelo; seguido del suelo agrícola de Bolívar con 5.79×10^6 y el suelo no cultivado de Imbabura con 5.05×10^6 UFC/ g suelo; mientras que en el ultimo rango se encontró el suelo agrícola de la provincia de Pichincha con un promedio de 1.55×10^5 UFC/ g suelo (Tabla 3.5 y Figura 3.2).

Tabla 3. 5: Prueba Tukey al 5% para en el número de unidades formadoras de colonias de bacterias por gramo de suelo (ufc/g) expresados en log base 10. Fuente de variación: provincias por uso de suelo (agrícola, remanente natural).

Código	Significado	Log ₁₀ UFC	UFC/g suelo
Ia	Imbabura / suelo agrícola	6.67 B	4.61×10^6
Pa	Pichincha / suelo agrícola	5.18 D	1.55×10^5
Ba	Bolívar / suelo agrícola	6.77 AB	5.79×10^6
Ca	Chimborazo / suelo agrícola	6.36 C	2.36×10^6
In	Imbabura / suelo no cultivado	6.70 AB	5.05×10^6
Pn	Pichincha / suelo no cultivado	6.43 C	2.74×10^6
Bn	Bolívar / suelo no cultivado	6.84 A	6.95×10^6
Cn	Chimborazo / suelo no cultivado	6.67 B	4.65×10^6

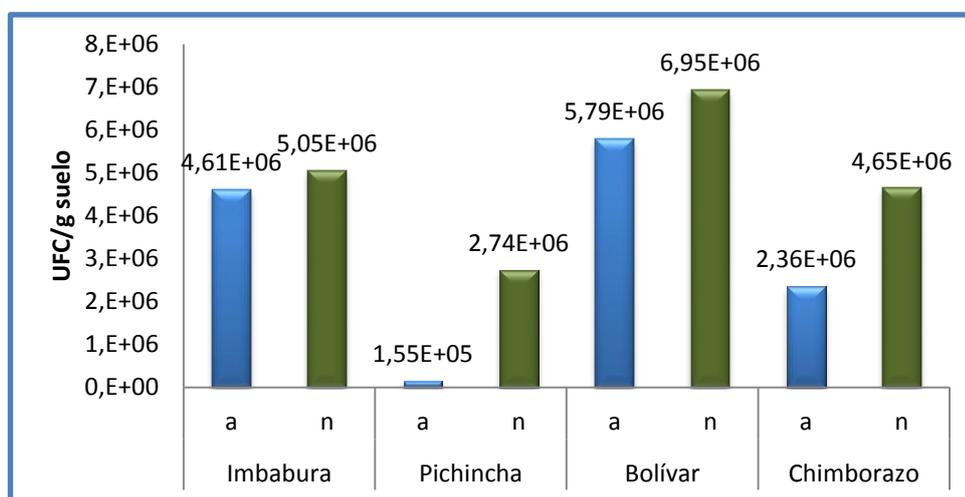


Figura 3. 2: Densidad bacteriana por gramo de suelo (UFC/g suelo) en las muestras de suelo agrícola (a) y suelo natural (n) de los ensayos experimentales del INIAP de las provincias de Bolívar, Chimborazo, Imbabura y Pichincha.

En los suelos de uso agrícola la cantidad de bacterias que crecieron en el medio KB, varió entre 1.55×10^5 y 5.79×10^6 UFC /g de suelo. Mientras que en los suelos no

cultivados (remanentes naturales) se encontró una mayor cantidad de bacterias cuyos valores promedios fluctuaron entre 2.74×10^6 y 6.95×10^6 UFC /g de suelo.

3.1.1.2. Porcentaje de bacterias solubilizadoras de fósforo (BSP) presentes en el suelo.

En el medio PVK se observó el crecimiento de una gran diversidad de colonias bacterianas, pero muy pocas presentaron halos de solubilización de fósforo (Figura 3.3).

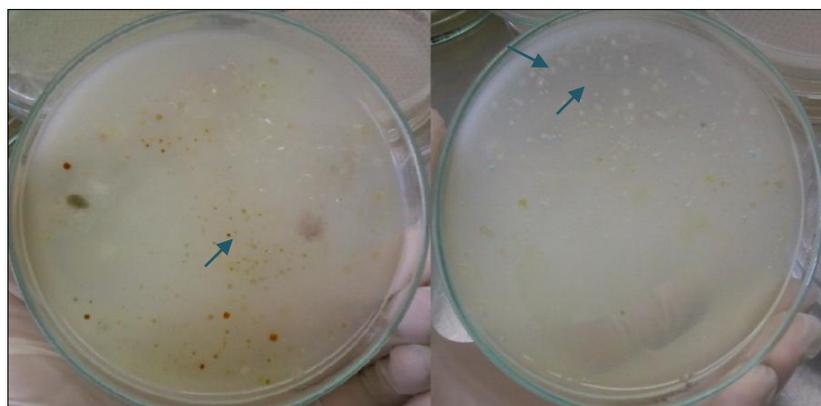


Figura 3. 3: Bacterias solubilizadoras de fósforo en medio PVK.

El análisis de varianza del porcentaje de BSP (Tabla 3.6), establece diferencias significativas para las fuentes de variación de provincias y la interacción provincias por uso de suelo, pero no hay diferencia en cuanto al uso de suelo (suelo agrícola y remanentes naturales). El promedio general fue de 8.59% BSP y el coeficiente de variación fue de 23.51%.

Tabla 3. 6: Análisis de varianza para el porcentaje de unidades formadoras de colonias de bacterias solubilizadoras de fósforo.

Fuente de variación	SC	GL	CM	F	p-valor
Total	1063.50	23			
Provincias (P)	890.78	3	296.93	72.79	< 0.0001
Uso de suelo (S)	8.93	1	8.93	2.19	0.1585
P x S	98.52	3	32.84	8.05	0.0017
Error	65.22	16	4.08		
Promedio	8.59% BSP				
C.V %	23.51 %				

De manera general en las provincias de Bolívar e Imbabura se encontró un mayor porcentaje de BSP con el 15.54% y 13.76% respectivamente, mientras que en Chimborazo y Pichincha se encontró porcentajes menores con el 2.8% y 2.26% de BSP. Tukey al 5% (Tabla 3.7).

Tabla 3. 7: Prueba Tukey al 5% para el porcentaje de bacterias solubilizadoras de fósforo. Fuente de variación: provincias.

Código	Significado	% BSP	Rangos
I	Imbabura	13.76	A
P	Pichincha	2.26	B
B	Bolívar	15.54	A
C	Chimborazo	2.80	B

Al comparar el porcentaje de BSP presente en suelos de uso agrícola y suelos de remanentes naturales; no se evidenció diferencias significativas, aunque el suelo no cultivado presenta un porcentaje ligeramente superior con 9.2% BSP, respecto al suelo agrícola con 7.98 % BSP. Tukey al 5% (Tabla 3.8).

Tabla 3. 8: Prueba Tukey al 5% para el porcentaje de bacterias solubilizadoras de fósforo. Fuente de variación: uso de suelo (agrícola, remanente natural).

Código	Significado	% BSP
A	Suelo agrícola	9.20
N	Suelo no cultivado	7.98

La prueba Tukey al 5% para la interacción entre las provincias y el uso del suelo, se evidenció tres rangos; en el primer rango se ubicaron tres muestras de suelo, el mayor porcentaje fue del suelo agrícola de Bolívar con 18.35% de BSP y el menor porcentaje de este rango fue del suelo no cultivado de Bolívar con 12.73% de BSP. En el ultimo rango se encuentran cuatro muestras de suelo, el mayor porcentaje de este rango fue del suelo no cultivado de Pichincha con 4.53% y el menor fue del suelo agrícola de Pichincha con 0.00% (Tabla 3.9).

Tabla 3. 9: Prueba Tukey al 5% para el porcentaje de bacterias solubilizadoras de fósforo. Fuente de variación: provincias por uso de suelo (agrícola, remanente natural).

Código	Significado	%BSP	Rangos
Ia	Imbabura / suelo agrícola	11.79	B
Pa	Pichincha / suelo agrícola	0.00	C
Ba	Bolívar / suelo agrícola	18.35	A
Ca	Chimborazo / suelo agrícola	1.78	C
In	Imbabura / suelo no cultivado	15.72	AB
Pn	Pichincha / suelo no cultivado	4.53	C
Bn	Bolívar / suelo no cultivado	12.73	AB
Cn	Chimborazo / suelo no cultivado	3.82	C

De manera general en los suelos de uso agrícola el porcentaje de BSP varió entre 1.78% a 11.79%, excluyendo a la provincia de Pichincha, en cuyo suelo agrícola no se encontró bacterias con la formación de halos de solubilidad. Con respecto a los suelos no cultivados (remanentes naturales) el porcentaje de BSP estuvo entre 3.82% a 15.72% (Figura 3.4).

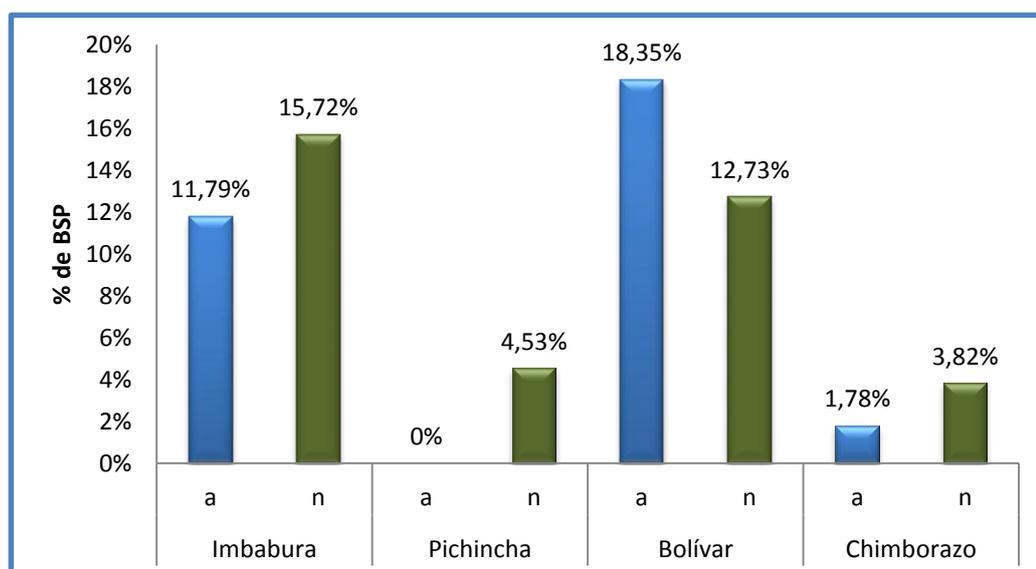


Figura 3. 4: Porcentaje de bacterias solubilizadoras de fósforo (BSP), presentes en las muestras de suelo agrícola (a) y suelo natural (n) de los ensayos experimentales del INIAP de las provincias de Bolívar, Chimborazo, Imbabura y Pichincha.

3.1.2. Aislamiento y caracterización morfológica de *Pseudomonas sp.*

En general las colonias que crecieron en el medio KB en las 6 diluciones presentaron diferentes morfologías y colores, de las cuales únicamente se aisló aquellas colonias circulares, de borde entero, lisas, color crema y con las siguientes variantes morfológicas:

- A. Grandes, planas, consistencia viscosa y con halo amarillo verdoso.
- B. Medianas, planas, consistencia cremosa y con halo amarillo verdoso.
- C. Medianas, convexas, consistencia cremosa y con halo amarillo verdoso.
- D. Medianas, convexas, consistencia cremosa y sin halo.

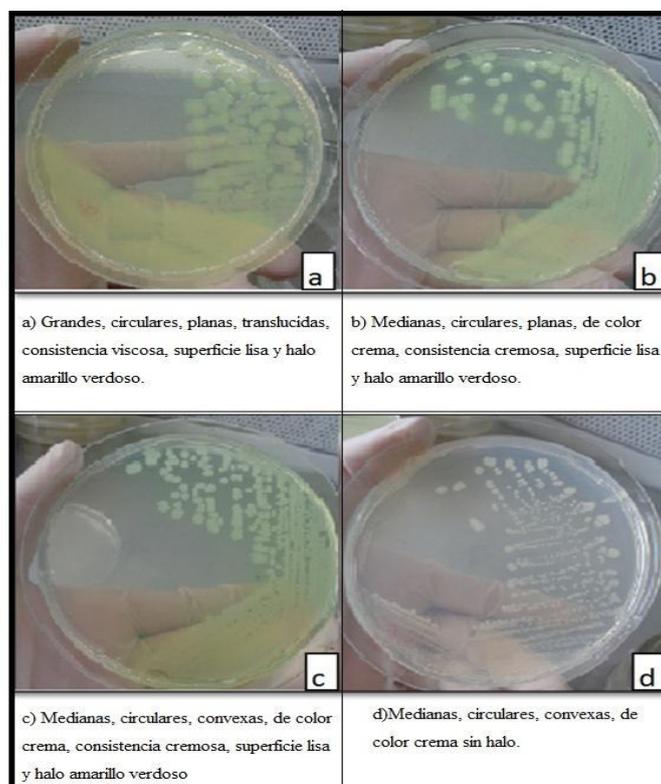


Figura 3. 5: Morfología de las colonias aisladas de las muestras de suelo.

Se obtuvieron treinta y ocho aislamientos bacterianos en el medio KB provenientes de las cuatro provincias muestreadas. Las colonias medianas, planas, consistencia cremosa y con halo amarillo verdoso (B), fueron aisladas con mayor frecuencia en las muestras de suelo. En la Tabla 3.10 se detalla el número de colonias aisladas por muestra de suelo y su caracterización morfológica.

Tabla 3. 10: Aislamientos bacterianos obtenidos en el medio KB, de las muestras de suelo de las provincias de Imbabura, Pichincha, Bolívar y Chimborazo.

Muestra	Morfología de la colonia				Cepas aisladas
	A	B	C	D	
Imbabura- Suelo Agrícola	0	4	2	0	6
Imbabura- Suelo no cultivado	1	3	1	0	5
Pichincha- Suelo Agrícola	0	1	2	0	3
Pichincha- Suelo no cultivado	1	2	0	0	3
Bolívar- Suelo Agrícola	1	3	2	0	6
Bolívar- Suelo no cultivado	1	6	0	0	7
Chimborazo- Suelo Agrícola	0	1	1	2	4
Chimborazo- Suelo no cultivado	0	2	1	1	4
Total	4	22	9	3	38

3.1.3. Caracterización bioquímica de *Pseudomonas* sp.

Todas las cepas aisladas, fueron identificadas como bacilos Gram (-), mediante tinción Gram. De las treinta y ocho cepas aisladas como posibles *Pseudomonas*, por pruebas de galería corta (Anexo C.1) y pruebas API 20 E (Anexo C.2), treinta y tres cepas fueron identificadas como *P. fluorescens*, *P. putida* y *P. aeruginosa* (Tabla 3.11).

Los resultados de las pruebas API 20 E, se expresaron en códigos los cuales fueron analizados Software de Identificación apiweb™, con el que se obtuvo porcentajes de confiabilidad que confirmaron el género y especie de las cepas en estudio.

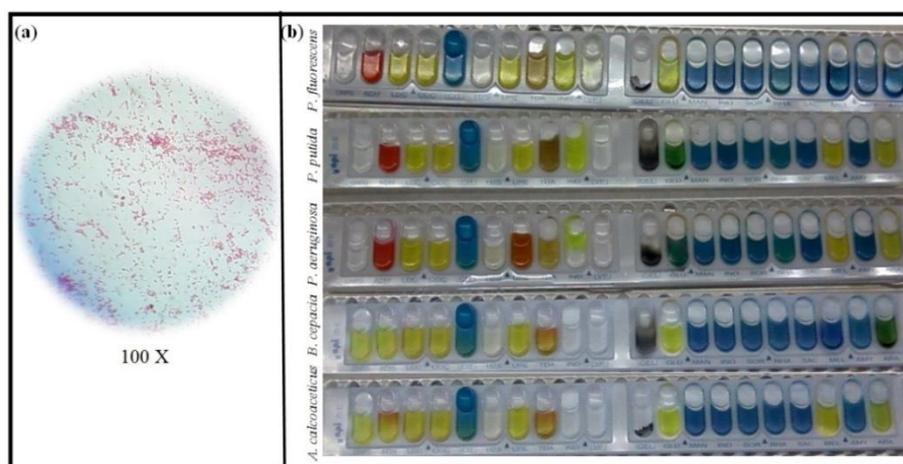


Figura 3. 6: Caracterización macroscópica y bioquímica de las cepas aisladas. (a) tinción Gram. (b) pruebas Api 20 E.

Tabla 3. 11: Identificación de las cepas aisladas de suelo agrícola y suelo no cultivado

Cepas	Género identificada (Galería corta)	Especie identificada (Api 20 E)	Morfología de la colonia
caI1	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	B
caI2	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	C
caI3	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	B
caI4	<i>Pseudomona</i>	<i>P.putida</i>	B
caI5	<i>Pseudomona</i>	<i>P.putida</i>	B
caI6	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	C
cnI1	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	B
cnI2	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	B
cnI3	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	C
cnI4	<i>Pseudomona</i>	<i>P.putida</i>	A
cnI5	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens/putida</i>	B
caP1	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	B
caP2	<i>Pseudomona</i>	<i>P.aeruginosa</i>	C
caP3	<i>Pseudomona</i>	<i>P.aeruginosa</i>	C
cnP1	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	B
cnP2	<i>Pseudomona</i>	<i>P.putida</i>	A
cnP3	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	B
caB1	<i>Pseudomona</i>	<i>P.putida</i>	B
caB2	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	B
caB3	<i>Pseudomona</i>	<i>P.putida</i>	A
caB4	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	B
caB5	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	C
caB6	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	C
cnB1	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	B
cnB2	<i>Pseudomona</i>	<i>P.putida</i>	A
cnB3	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	B
cnB4	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	B
cnB5	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	B
cnB6	<i>Pseudomona</i>	<i>P.putida</i>	B
cnB7	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	B
caC1	<i>Acinetobacter</i>	<i>A. calcoaceticus</i>	D
caC2	<i>Pseudomona</i>	<i>P.putida</i>	B
caC3	<i>Burkholderia</i>	<i>B. cepacia</i>	C
caC4	<i>Acinetobacter</i>	<i>A. calcoaceticus</i>	D
cnC1	<i>Acinetobacter</i>	<i>A. calcoaceticus</i>	D
cnC2	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	B
cnC3	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	B
cnC4	<i>Burkholderia</i>	<i>B. cepacia</i>	C

3.1.4. Caracterización molecular de las cepas de *Pseudomonas sp.*

Extracción y cuantificación de ADN

El protocolo de Jarrin (1995), utilizado en este estudio fue óptimo para la extracción de ADN, pues las 26 muestras seleccionadas (por criterio de la solubilización de fósforo *in vitro*) presentaron una concentración de ADN genómico promedio de 703.64 ng/μl. La concentración de ADN cuantificada con el EPOCH se muestra en la Tabla 3.12.

Tabla 3. 12: Concentración de ADN obtenida con el protocolo de extracción modificado de Jarrín 1995).

Cepa	Concentración de ADN (ng/μl)	Cepa	Concentración de ADN (ng/μl)
aI2	265.28	ab4	393.08
aI3	296.56	ab5	468.34
aI6	767.93	nb1	2588.88
nI1	529.72	nb2	1028.80
nI3	167.71	nb5	846.29
nI5	643.86	ac1	302.49
aP1	555.98	ac2	513.05
aP3	517.12	ac4	585.62
aP2	2763.80	nc1	812.50
nP2	1154.57	nc2	804.47
nP3	846.29	nc3	674.38
nP1	402.60	Ctrl 1	87.89
ab1	173.98	Ctrl 2	103.45

Amplificación del 16Sr:

Para amplificación de la región del gen 16Sr bacteriano se probaron tres combinaciones de primers y se visualizaron en gel de agarosa al 2%. Los primers E338F; E969R mostró doble amplicon uno de 650 pb y otro de 550 pb aproximadamente. La combinación U341F; U1053R resultó ser la más inespecífica por la cantidad de bandas que se observaron. Mientras que la combinación 27F; 1525R mostró doble banda o una sola banda (Figura 3.7).

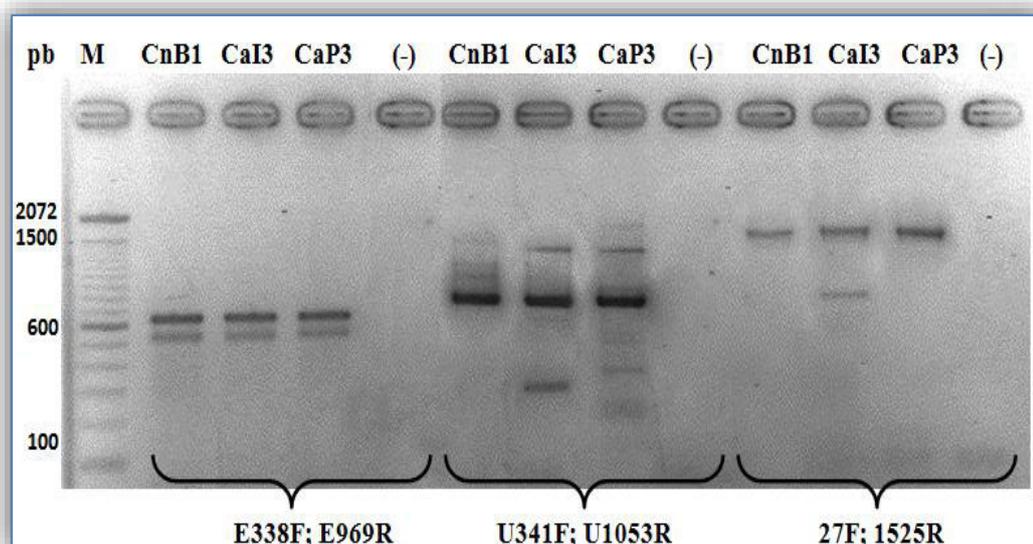


Figura 3. 7: Amplificación del gen 16Sr con tres combinaciones de primers E338F; E969R, U341F; U1053R, 27F; 1525R en tres muestras escogidas al azar. De izquierda a derecha: pocillo 1 es el marcador de peso molecular, los pocillos 5, 9 y 13 son controles negativos.

La amplificación de las 26 muestras con los primer 27 F; 1525R fue eficiente con la metodología empleada, ya que en todas las muestras se evidenció amplificación excepto en el control negativo como era de esperarse (Figura 3.8). El 62% de las muestras mostraron un solo amplicon de 1460 pb aproximadamente, mientras que en el resto de muestras se observó una doble banda con pesos que varían desde 200pb hasta 900pb aproximadamente.

Las cepas cnB2, cnI3, y cnP1 fueron amplificadas con la combinación de primers E338F; E969R, para su posterior secuenciación en el departamento de Biotecnología del INIAP-EESC, se utilizó un control positivo, el cual fue caI3 ya que la amplificación con los primers 27 F; 1525R y la lectura de la secuencia por MACROGEN fueron buenas. Se observó una doble banda en todas las muestras amplificadas (Figura 3.9).

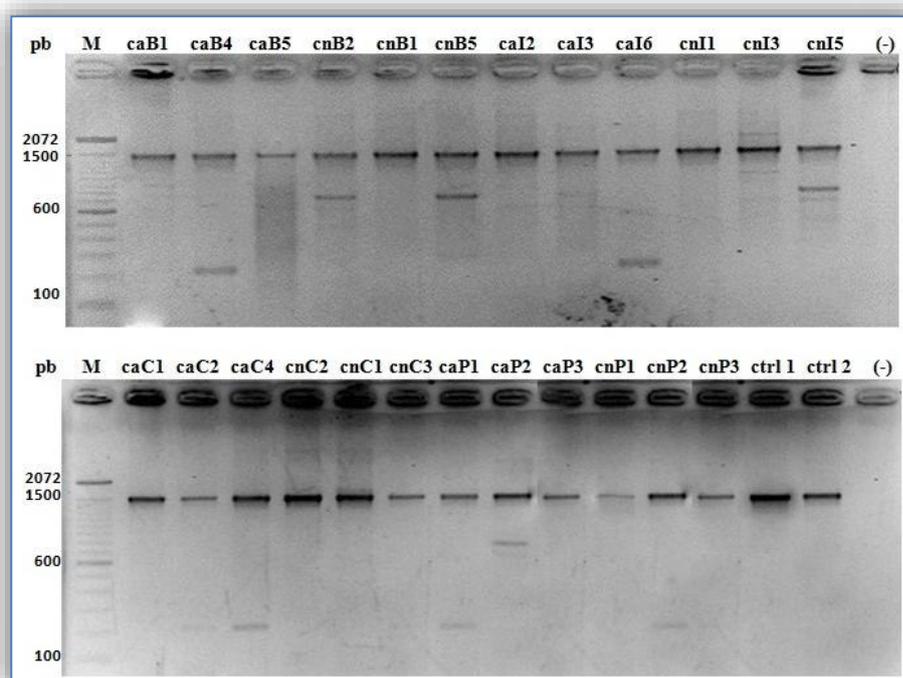


Figura 3. 8: Amplificación del gen 16Sr con los primers 27F; 1525R en las 26 muestras bacterianas.

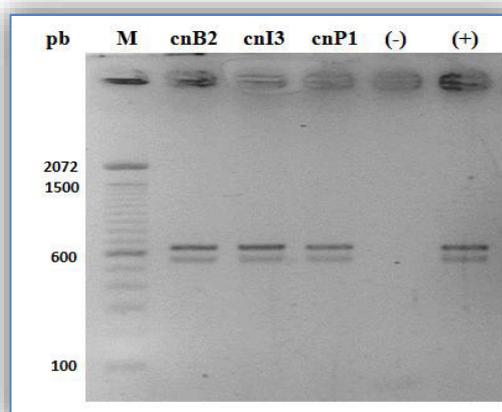


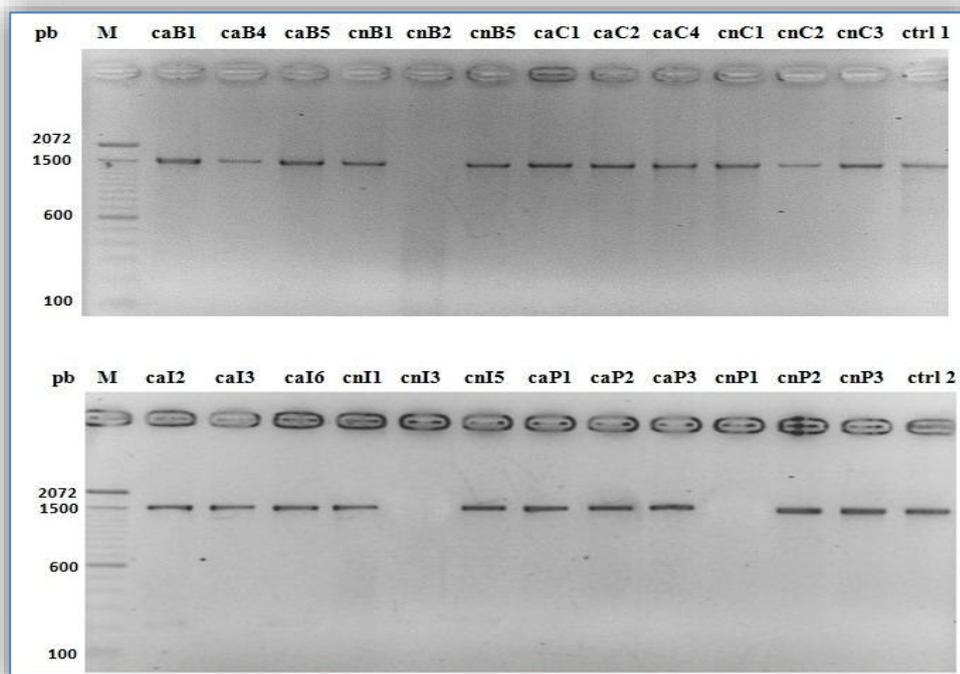
Figura 3. 9: Amplificación del gen 16Sr con los primers E338F; E969R. Todas muestras muestran dos amplicones uno de 630pb y otro de 550pb aproximadamente.

Purificación

En la purificación se logró obtener una sola banda tanto con los primers 27F; 1525R (Figura 3.10) como con la combinación E338F; E969R (Figura 3.11). Las concentraciones de los amplicados purificados se muestran en la Tabla 3.13.

Tabla 3. 13: Concentración de ADN purificado

Cepa	Concentración de ADN (ng/μl)	Cepa	Concentración de ADN (ng/μl)
aI2	55.60	aB4	52.95
aI3	85.00	aB5	58.90
aI6	48.80	nB1	53.65
nI1	58.25	nB5	64.85
nI3	59.35	nB2	50.34
nI5	63.45	aC1	54.70
aP1	52.60	aC2	48.55
aP3	52.40	aC4	65.10
aP2	56.05	nC1	66.20
nP2	54.00	nC2	55.15
nP3	55.60	nC3	52.20
nP1	96.15	Ctrl 1	55.85
aB1	85.50	Ctrl 2	64.25

**Figura 3. 10:** Visualización del gen 16Sr ADN ribosomal purificado de las 26 muestras bacterianas, en geles de agarosa.

Los amplicones con los primers 27F; 1525R purificados de las muestras cnB2, cnI3, cnP1, tuvieron una buena concentración de ADN, aunque en la visualización en

gel mostraron degradación, este pudo ser una limitante en la secuenciación hecha por MACROGEN, la cual no fue de buena calidad en estas tres muestras.

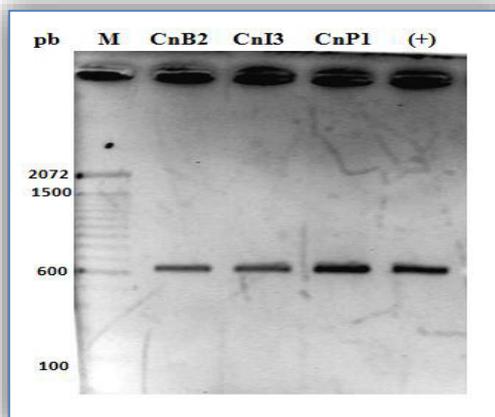


Figura 3. 11: Visualización del gen 16Sr ADN ribosomal purificado de las muestras cnB2, cnI3, cnP1 y caI3 (+).

Secuenciación del ADNr 16Sr

De las 26 muestras secuenciadas por MACROGEN, 23 fueron de buena calidad con un valor de $QV \geq 20$, cumpliendo con el tamaño esperado del amplicón, mientras que las tres muestras restantes no tenían buena longitud ya que se encontraban por debajo de las 100pb y en los cromatogramas se observó la presencia de solapamientos en los picos, lo cual no permite una lectura confiable de la secuencia. Debido posiblemente a la degradación que se observó después de la purificación.

Los resultados de la secuenciación fueron remitidos en formato (*.pdf) para los cromatogramas y en formato (*.abi) para las secuencias. Se analizaron todas las secuencias en la base de datos del NCBI mediante el algoritmo Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*); el cual buscó la homología más significativa para cada secuencia, dando como resultado la asignación del género y especie a las 26 cepas bacterianas. Esta asignación se describe en la Tabla 3.14. De todas las secuencias analizadas se obtuvo una significancia de alineamiento con un valor de $E = 0$, lo que estadísticamente hizo válida la comparación.

De igual manera, se analizó el % de identidad, el cual estuvo entre los valores del 98 al 100% para todas las cepas, indicando que las secuencias 16Sr pertenecen taxonómicamente al género bacteriano asignado por BLAST; y el % de cobertura de la secuencia problema con el homólogo, el cual fue para todas las cepas del 100%, indicando que en el alineamiento de los nucleótidos analizados coincidió totalmente con los nucleótidos del género asignado.

La identificación del género fue confiable ya que coincidió en las pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares.

Tabla 3. 14: Análisis de comparación y asignación del BLAST para las secuencias de las muestras bacterianas.

Cepas	Especie Identificada (gen 16 S)	% Identidad Máxima	% Cobertura
caI2	<i>Pseudomonas sp.</i> R-43638	99	100
caI3	<i>P. fluorescens</i> strain PE8	99	100
caI6	<i>Pseudomonas sp.</i> AceT-1	99	100
cnI1	<i>Pseudomonas sp.</i> AU	98	100
cnI3	<i>P. fluorescens</i> strain SR313-1	99	100
cnI5	<i>P. fluorescens</i> strain BND79A	99	100
caP1	<i>P. fluorescens</i> strain PE8 16S	100	100
caP2	<i>Pseudomonas sp.</i> PN49.1	100	100
caP3	<i>P. palleroniana</i> strain TCA16	100	100
cnP1	<i>Pseudomonas sp.</i> A106	99	100
cnP2	<i>P. putida</i> strain CEN7	99	100
cnP3	<i>P. fluorescens</i> partial	100	100
aB1	<i>P. putida</i> strain ABAC61	100	100
aB4	<i>Pseudomonas sp.</i> WTPout_69	99	100
aB5	<i>Pseudomonas sp.</i> JPPB B25	100	100
nB1	<i>P. fluorescens</i> strain CPB Pse	100	100
nB2	<i>Pseudomonas sp.</i> StFRB166	99	100
nB5	<i>P. putida</i> strain ABAC61	99	100
caC1	<i>Acinetobacter sp.</i> IB-5.1/1	99	100
caC2	<i>Pseudomonas sp.</i> EAPE	100	100
caC4	<i>Acinetobacter sp.</i> EA_S_3	99	100
cnC1	<i>A. calcoaceticus</i> strain LAM21	100	100
cnC2	<i>P. fluorescens</i> strain SU:MS1-1	99	100
cnC3	<i>Pseudomonas sp.</i> M	99	100
Ctrl 1	<i>Bacillus subtilis</i> strain HCST9	100	100
Ctrl 2	<i>Bacillus sp.</i> Fse14	100	100

3.1.5. Evaluación de la Solubilización de fosfatos *in vitro*

Se evaluó treinta y seis cepas, de las cuales se escogieron tres cepas por muestra de suelo, la cepa aI3 (*P. fluorescens*) presentó un mayor índice de solubilidad con un promedio de 4.8 seguido de nP2 (*P. putida*) con 4.5; la cepa con menor índice de solubilidad fue aP3 (*P. palleroniana*) con 1.3 (Figura 3.12 y Figura 3.13).

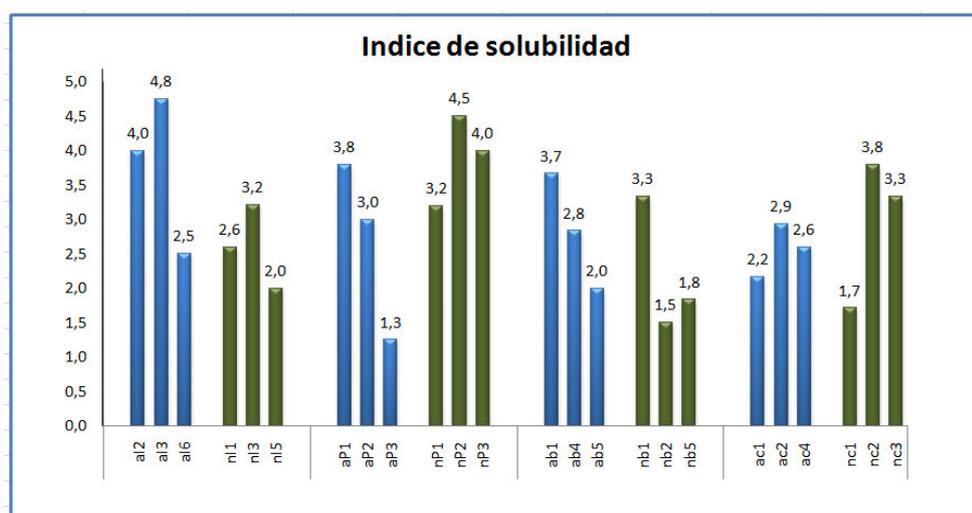


Figura 3. 12: Índice de solubilidad de fósforo de las cepas seleccionadas para su posterior ensayo en invernadero.

En el suelo agrícola las cepas con mayor índice fueron las encontradas en la provincia de Imbabura seguida por las provincias de Bolívar, Pichincha y Chimborazo, mientras que en los suelos no cultivados la provincia con mayor índice de solubilización fue Pichincha, seguido de las provincias Chimborazo Imbabura y Bolívar.

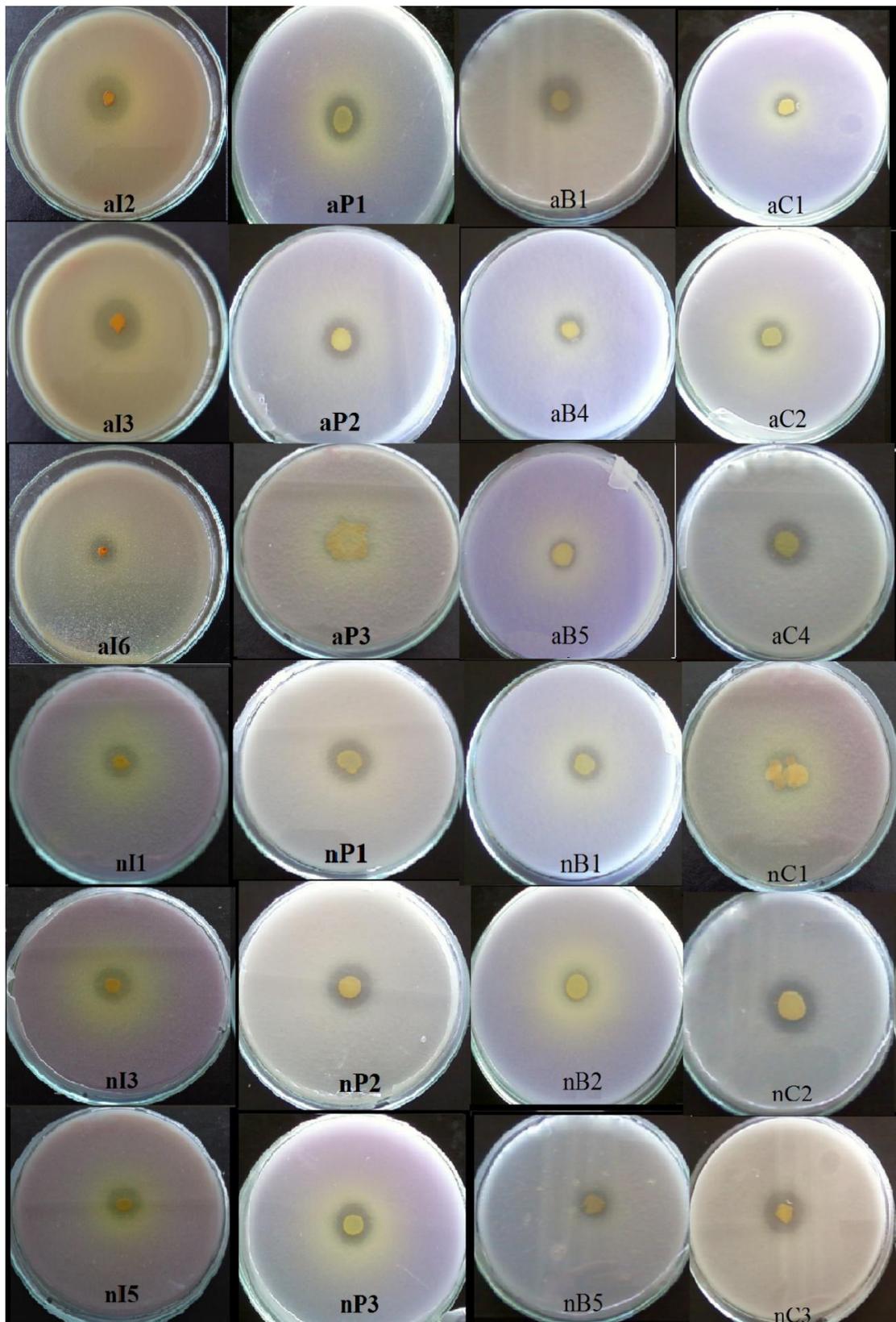


Figura 3. 13: halos de solubilización de fosfato tricálcico en agar PVK por cepas de *Pseudomonas sp.* aisladas de muestras de suelo agrícola y no cultivado de las provincias de Imbabura, Pichincha, Bolívar y Chimborazo.

3.2. FASE II: Invernadero

3.2.1. Análisis químico del sustrato

El sustrato empleado para la evaluación en invernadero se analizó químicamente en dos periodos distintos, el primero antes de la siembra de las semillas de maíz en invernadero y el segundo al finalizar el tiempo del ensayo, la Tabla 3.15 indica la variación de los nutrientes por tratamiento.

Tabla 3. 15: Parámetros evaluados en el análisis químico realizado al sustrato antes y después de la evaluación del efecto de inoculación de las cepas solubilizadoras de fósforo sobre plantas de maíz de la variedad I-101 a condiciones de invernadero.

Trat.	Muestra	ELEMENTOS EVALUADOS					
		PH	N (ppm)	P (ppm)	K $\left(\frac{meq}{100 ml}\right)$	Ca $\left(\frac{meq}{100 ml}\right)$	Mg $\left(\frac{meq}{100 ml}\right)$
	Sustrato inicial	5.87	102	58	0.1	12.3	1.6
T1	caI2	6.16	150	80	0.42	11.8	2.3
T2	caI3	6.06	138	72	0.47	11.6	2.3
T3	caI6	6.06	108	85	0.40	11.2	2.3
T4	cnI1	6.03	143	63	0.72	10.8	2.3
T5	cnI3	6.25	158	67	0.56	11.5	2.4
T6	cnI5	5.99	108	74	0.41	11.2	2.2
T7	caP1	6.44	158	60	0.69	10.5	2.1
T8	caP2	5.89	74	77	0.47	11.7	2.1
T10	cnP1	5.92	87	57	0.40	10.5	1.2
T11	cnP2	6.09	122	56	0.62	11.5	2.4
T12	cnP3	6.22	132	75	0.57	11.7	2.1
T13	caB1	6.11	71	86	0.53	11.4	2.5
T14	caB4	6.18	117	74	0.5	11.3	2.3
T15	caB5	6.08	108	68	0.34	12.1	2.5
T16	cnB1	6.02	110	87	0.57	11.9	2.4
T17	cnB2	6.10	104	88	0.53	11.9	2.4
T18	cnB5	5.94	99	108	0.69	11.5	2.2
T19	caC1	6.00	107	61	0.53	12.0	2.5
T20	caC2	6.19	115	78	0.40	11.3	2.2
T21	caC4	5.96	85	65	0.48	11.3	2.3
T22	cnC1	5.86	77	84	0.31	11.4	2.0
T23	cnC2	5.84	46	82	0.31	11.5	2.2
T24	cnC3	5.91	99	72	0.91	11.3	2.3
Tf	TF	5.66	30	119	0.35	12.7	2.3
TabS	TabS	5.86	139	41	0.64	11.7	2.5

Los valores de pH fluctuaron entre 5.66 a 6.44 y están dentro del rango ligeramente ácido. La fertilización realizada equilibró los valores mínimos para un buen desarrollo del cultivo los cuales son: 60ppm de Nitrógeno, 0.40 meq/100ml de Potasio, 8 meq/100ml de Calcio y 2 meq/100ml de Magnesio.

El elemento fósforo aumentó en un promedio de 18 ppm para la mayoría de tratamientos, excepto en los tratamientos cnP2 (56 ppm), cnP1 (57 ppm) y testigo absoluto (41 ppm) cuyos valores de fósforo disminuyeron en relación al sustrato inicial que fue de 58 ppm. Por otro lado como era de esperarse el testigo fertilizado tuvo el mayor contenido de fósforo en la solución del suelo con 119 ppm de P.

Se realizó la prueba no paramétrica de los signos usando el programa Statistix 10.0, versión de prueba, el cual mostró que el 91.3% de las cepas inoculadas aumentaron la cantidad de fósforo en el suelo con un valor de $p=0,0001$, al comparar con el sustrato inicial (58 ppm de P) (Anexo E.1).

3.2.2. Siembra e inoculación.

Desinfección y pre-germinación de la semilla de maíz

Las semillas de maíz, variedad INIAP-101, otorgadas por el Programa de Maíz de la EESC del INIAP, tuvieron un porcentaje de germinación del 94%. El protocolo de desinfección empleado en este ensayo no disminuyó dicho poder germinativo. Después de la germinación en cámara húmeda durante tres días, se obtuvieron radículas con tamaños variables entre 1-3.5 cm, de los cuales se escogieron 7 semillas por tratamiento con radículas de 2 a 2.5 cm de largo.

Inoculación y siembra

Las semillas inoculadas presentaron una capa brillante que cubría toda su superficie, en comparación con la semilla no inoculada. Al cabo de cuatro días después de la siembra, el 93.4% evidenció el desarrollo del hipocótilo, a los seis días

dieron lugar a la primera hoja. A los diez días las plantas se encontraban en el estado vegetativo V3 con la presencia de tres hojas desarrolladas, sin embargo el 6.6% restante aun no evidenciaba el desarrollo de plántulas.

Procesamiento de las plantas.

Ocho semanas después de la siembra se recolectó el suelo y la planta de cada repetición por tratamiento y se midieron las variables altura de planta, área foliar longitud de la raíz, peso fresco, peso seco.

3.2.3. Análisis de datos

Las variables altura de planta, longitud de raíz, porcentaje de humedad, porcentaje de materia seca y área foliar, se procesaron en el software estadístico InfoStat/Estudiantil versión 2.0.

3.2.3.1. Altura de las plantas

La altura de planta se midió a los 15, 30, 45 y 60 días. El ANOVA realizado mostró que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, para esta variable medida en los cuatro periodos mencionados (Tabla 3.16).

Tabla 3. 16: Análisis de Varianza para la variable altura de planta medida a los 15, 30, 45 y 60 días

Fuentes de variación	GL	15 días	30 días	45 días	60 días
	CUADRADOS MEDIOS				
Total	122				
Tratamientos	24	120.41**	309.39**	389.78**	703.16*
Error Exp.	98	8.51	35.46	106.31	144.39
Promedio General		18.68 cm	41. 16 cm	62. 10 cm	93.01
C. V. (%)		15.39%	14.33%	16. 49%	12.84%

** Altamente significativo (p-valor <0.0001)

En la primera evaluación de altura de planta, la prueba de Tukey al 5%, mostró cuatro rangos de significancia, en el primer rango se ubican diecisiete tratamientos, la mayor altura fue del tratamiento T21 (Cepa 4: Chimborazo, suelo agrícola) con 24.38 cm y la menor altura de este rango fue de T20 (Cepa 1: Chimborazo, suelo agrícola) con 19.22 cm, el testigo fertilizado y absoluto se encuentra dentro de este rango con 24.30 cm y 20.54 cm respectivamente. En el último rango se ubican cinco tratamientos el primero de este rango es el tratamiento T15 (Cepa 5: Bolívar, suelo agrícola) con 15.70 cm y el último es T24 (Cepa 3: Chimborazo, suelo no cultivado) con 6.43 cm (Tabla 3.17 y Figura 3.14).

A los treinta días después de la siembra se obtuvieron cinco rangos de altura de planta, en el primer rango se encontraron veinte tratamientos, la mayor altura fue del tratamiento T22 (Cepa 1: Chimborazo, suelo no cultivado) con 49.60 cm y la menor altura de este rango fue del tratamiento T15 (Cepa 5: Bolívar, suelo agrícola) con 36.28 cm, el testigo fertilizado y absoluto se encuentran dentro de este rango con 47.30 cm y 42.68 cm respectivamente. En el último rango se ubican tres tratamientos T18 (Cepa 5: Bolívar, suelo no cultivado), T7 (Cepa 1: Pichincha, suelo agrícola) y T24 (Cepa 3: Chimborazo, suelo no cultivado) con 26.72 cm, 22.36 cm y 16.33 cm respectivamente (Tabla 3.17 y Figura 3.15).

El día cuarenta y cinco se obtuvieron tres rangos de altura de planta, en el primer rango se ubicaron veinte tratamientos, la mayor altura fue del tratamiento T22 (Cepa 1: Chimborazo, suelo no cultivado) con 73.44 cm y la menor altura de este rango fue del tratamiento T17 (Cepa 2: Bolívar, suelo no cultivado) con 60.12 cm, el testigo fertilizado y absoluto se encuentran dentro de este rango con 73.70 cm y 55.64 cm respectivamente. En el último rango se ubican dos tratamientos T7 (Cepa 1: Pichincha, suelo agrícola) y T24 (Cepa 3: Chimborazo, suelo no cultivado) con 37.34 cm y 36.23 cm respectivamente (Tabla 3.17 y Figura 3.16).

A los sesenta días después de la siembra, en la prueba de Tukey al 5% se obtuvieron tres rangos, en el primer rango se ubicaron veinte y dos tratamientos, el tratamiento T8 (Cepa 2: Pichincha, suelo agrícola) obtuvo la mayor altura con 108.00

cm y el tratamiento T18 (Cepa 5: Bolívar, suelo no cultivado) tuvo la menor altura dentro de ese rango con 83.00 cm, el testigo fertilizado y absoluto se encuentran dentro de este rango con 107.20 cm y 92.8 cm respectivamente. En el último rango se ubican dos tratamientos T24 (Cepa 3: Chimborazo, suelo no cultivado) y T7 (Cepa 1: Pichincha, suelo agrícola) con 59.67 cm y 58.8 cm respectivamente (Tabla 3.17 y Figura 3.17).

Tabla 3. 17: Prueba Tukey al 5% para la variable altura de planta evaluada a los 15, 30, 45 y 60 días.

Trat.	Cepas	PROMEDIOS Y RANGOS DE SIGNIFICANCIA			
		15 días	30 días	45 días	60 días
T1	caI2	22.58 ABCD	45.30 AB	69.20 A	100.60 AB
T2	caI3	21.10 ABCD	44.26 AB	61.94 AB	92.00 AB
T3	caI6	20.06 ABCDE	44.94 AB	67.44 A	106.20 AB
T4	cnI1	20.68 ABCD	43.10 AB	65.48 A	103.20 AB
T5	cnI3	16.20 CDEFG	40.30 ABC	62.82 A	98.00 AB
T6	cnI5	19.24 ABCDEF	43.98 AB	58.18 AB	91.8 AB
T7	caP1	7.50 H	22.36 DE	37.34 C	58.80 C
T8	caP2	22.80 ABC	46.08 AB	69.32 A	108.00 A
T10	cnP1	21.34 ABCD	45.64	65.34 A	98.20 AB
T11	cnP2	20.90 ABCD	47.14 AB	69.12 A	98.00 AB
T12	cnP3	12.40FGH	34.28 BCD	59.54 B	84.80 AB
T13	caB1	23.10 ABC	48.56 AB	71.72 A	101.80 AB
T14	caB4	17.12 BCDEF	38.30 ABD	58.12 AB	78.00 BC
T15	caB5	15.70 DEFG	36.28 ABCD	68.26 A	95.20 AB
T16	cnB1	23.02 ABC	45.98 AB	57.84 AB	90.60 AB
T17	cnB2	13.02 EFGH	34.56 BCD	60.12 AB	93.40 AB
T18	cnB5	9.15 GH	26.72 CDE	55.46 B	83.00 AB
T19	caC1	19.22 ABCDEF	46.14 AB	60.80 AB	89.00 AB
T20	caC2	24.00 AB	47.32 AB	69.76 A	102.60 AB
T21	caC4	24.38 A	44.50 AB	57.16 AB	91.49 AB
T22	cnC1	21.44 ABCD	49.60 A	72.44 A	101.00 AB
T23	cnC2	20.92 ABCD	47.30 AB	69.56 A	100.00 AB
T24	cnC3	6.43 H	16.33 E	36.23 C	59.67 C
Tf	Tf	24.30 A	47.30 AB	73.70 A	107.20 A
Tab	Tab	20.54 ABCD	42.68 AB	55.64 B	92.80 AB

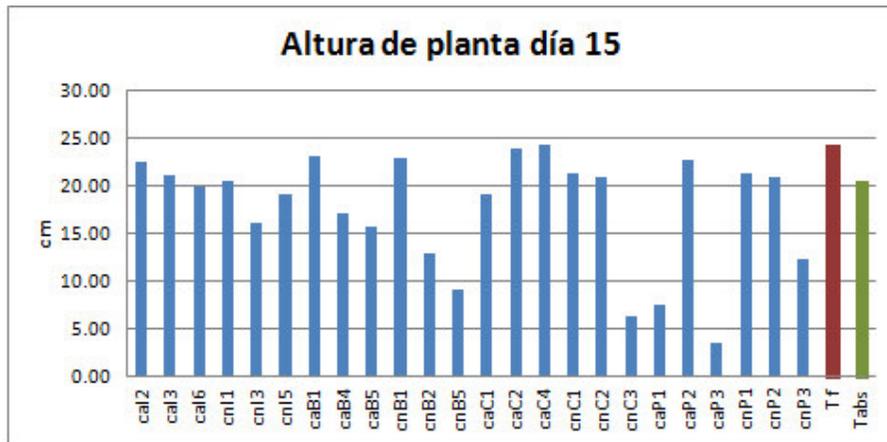


Figura 3. 14: Gráfico de los datos experimentales de la variable altura de planta medida a los 15 días después de la siembra.

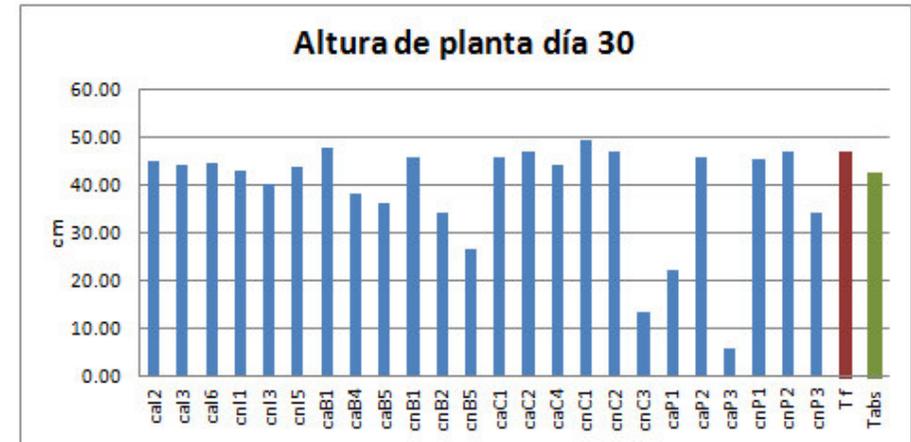


Figura 3. 14: Gráfico de los datos experimentales de la variable altura de planta medida a los 30 días después de la siembra.

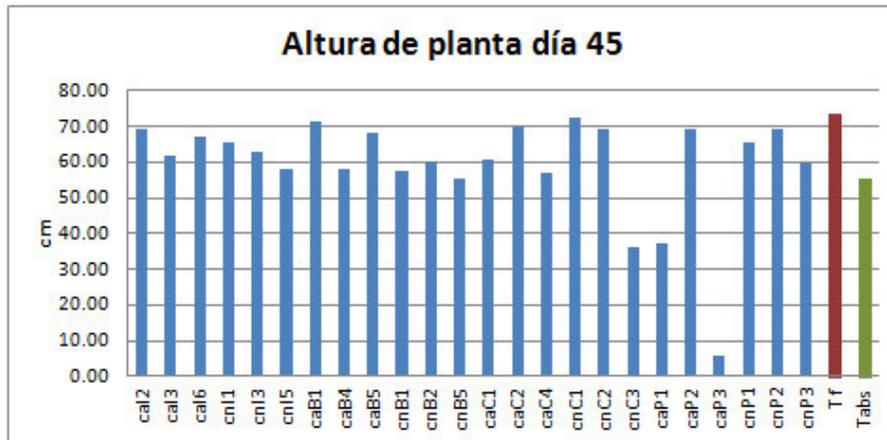


Figura 3. 15: Gráfico de los datos experimentales de la variable altura de planta medida a los 45 días después de la siembra.

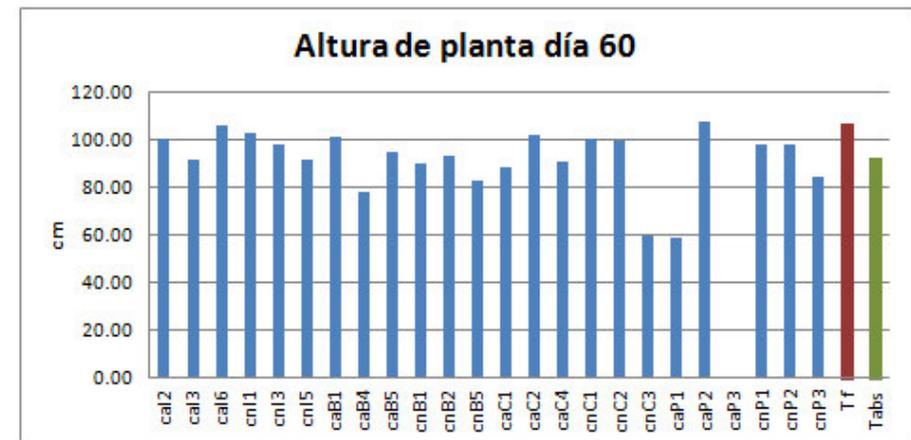


Figura 3. 16: Gráfico de los datos experimentales de la variable altura de planta medida a los 60 días después de la siembra.

Adicionalmente se calculó la variación de crecimiento por tratamiento, para lo cual se tomó la diferencia entre los periodos de medición y se realizó un ANOVA, el cual mostró diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, con un promedio general de 24.80 cm y un coeficiente de variación del 14.92% (Tabla 3.18).

Tabla 3. 18: Análisis de Varianza para el incremento de altura de planta.

Fuente de variación	SC	GL	CM	F	p-valor
Total	2327.07	122			
Trat.	972.92	24	40.54	2.93	0,0001
Error	1354.16	98	13.82		
Promedio	24.8 cm				
C.V %	14.92 %				

En la prueba de Tukey al 5% de significancia, se obtuvieron tres rangos de significancia, el primer rango lo ocupan veinte y dos tratamientos de los cuales doce tratamientos comparten medidas con el último rango, en el cual se encuentra un total de catorce tratamientos. El mayor incremento de altura lo obtuvo el tratamiento T3 (Cepa6: Imbabura, suelo agrícola) con 28.72 cm, mientras que el menor valor fue del tratamiento T7 (Cepa1: Pichincha, suelo agrícola) con 17.10 cm (Tabla 3.19 y Figura 3.18).

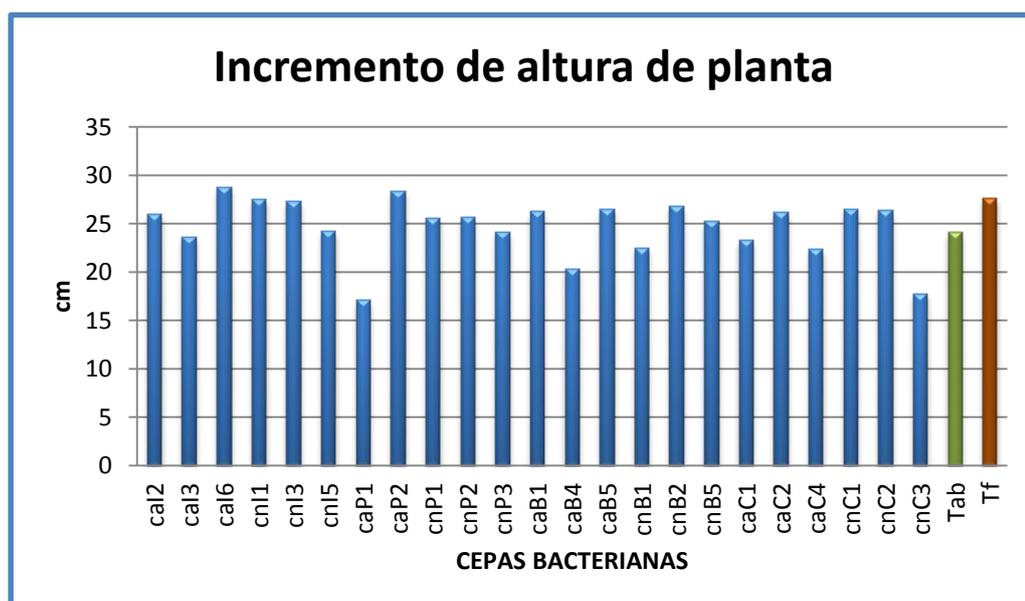


Figura 3. 17: Gráfico de los datos experimentales del incremento de altura de planta para los 24 tratamientos con las cepas bacterianas mas dos testigos negativos Tf: Testigo fertilizado y Tab: Testigo Absoluto evaluados en invernadero.

Tabla 3. 19: Prueba Tukey al 5 % para el incremento de altura de planta.

Trat.	Cepas	Promedios	Rangos
T1	caI2	26.01	ABC
T2	caI3	23.63	ABC
T3	caI6	28.72	A
T4	cnI1	27.51	A
T5	cnI3	27.27	A
T6	cnI5	24.19	ABC
T7	caP1	17.1	C
T8	caP2	28.4	A
T10	cnP1	25.62	ABC
T11	cnP2	25.7	ABC
T12	cnP3	24.13	ABC
T13	caB1	26.23	AB
T14	caB4	20.29	ABC
T15	caB5	26.5	AB
T16	cnB1	22.53	ABC
T17	cnB2	26.79	A
T18	cnB5	25.23	ABC
T19	caC1	23.26	ABC
T20	caC2	26.2	AB
T21	caC4	22.34	ABC
T22	cnC1	26.52	AB
T23	cnC2	26.36	AB
T24	cnC3	17.74	BC
Tf	Tf	27.63	A
Tab	Tab	24.09	ABC

3.2.3.2. Longitud de las raíces

El ANOVA realizado evidenció diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. El promedio general de longitud de raíces fue de 47.04 cm y el coeficiente de variación fue del 15.13% (Tabla 3.20).

Tabla 3. 20: Análisis de Varianza para la variable longitud de raíz.

Fuente de variación	SC	GL	CM	F	p-valor
Total	12536.51	122			
Trat.	7524.43	28	313.52	6.13	<0,0001
Error	5012.07	98	51.14		
Promedio	47.04 cm				
C.V %	15.13 %				

Al realizar la prueba de Tukey al 5% se obtuvieron seis rangos, en el primer rango se ubicaron veinte tratamientos, la mayor longitud de raíz fue del tratamiento T13 (C 1: Bolívar, suelo agrícola), con una longitud de raíz promedio de 59.8 cm y la menor longitud de este rango fue del tratamiento T12 (Cepa 3: Pichincha, suelo no cultivado) con 45.60 cm, el testigo fertilizado se encuentra dentro de este rango con 50.78 cm. En el último rango se ubican ocho tratamientos el primero de este rango es el tratamiento T20 (Cepa 2: Chimborazo, suelo agrícola) con 43.80 cm y el último es T7 (Cepa 1: Pichincha, suelo agrícola) con 27.80 cm, el testigo absoluto se ubica dentro de este rango con 33.80 cm (Tabla 3.23 y Figura 3.19).

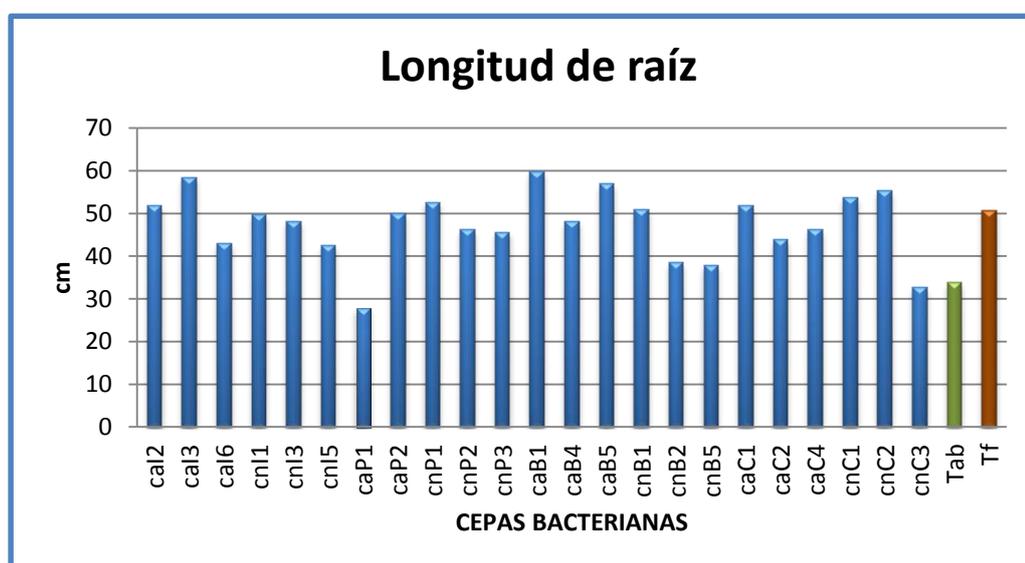


Figura 3. 18: Gráfico de los datos experimentales de la variable longitud de raíz para los 24 tratamientos con las cepas bacterianas mas dos testigos negativos Tf: Testigo fertilizado y Tab: Testigo Absoluto evaluados en invernadero.

3.2.3.3. Porcentaje de materia seca y humedad.

Esta variable está constituida por la suma de la materia seca aérea y la radical. El ANOVA realizado para las variables porcentaje de materia seca y de humedad indicó diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (Tabla 3.21). Para la el porcentaje de materia seca se obtuvo un promedio general de 10.67% y un coeficiente de variación del 7.25%, mientras que para la variable porcentaje de humedad, el promedio general fue de 89.33% y el coeficiente de variación fue de 0.87%.

Tabla 3. 21: Análisis de Varianza para las variables porcentaje de materia seca y porcentaje de humedad.

Fuente de variación	GL	% Materia seca		% Humedad	
		CM	p-valor	CM	p-valor
Total	122				
Trat.	24	8.18	<0.0001	8.18	<0.0001
Error	98	0.6		0.6	
Promedio			10.67%		89.33%
C.V %			7.25 %		0.87%

Al realizar la prueba de Tukey al 5% se obtuvieron ocho rangos, en el primer rango se ubicaron trece tratamientos, el mayor porcentaje de materia seca fue del tratamiento T20 (Cepa 2: Chimborazo, suelo agrícola) con 12.63% y el menor porcentaje de materia seca de este rango fue del tratamiento T3 (Cepa 6: Imbabura, suelo agrícola) con 11.03%, el testigo fertilizado se encuentra dentro de este rango con 12.17% de materia seca. En el último rango se ubican doce tratamientos el primero de este rango es el tratamiento T14 (Cepa4: Bolívar, suelo agrícola) con 10.39% y el último es T7 (Cepa 1: Pichincha, suelo agrícola) con 8.71% de materia seca, el testigo absoluto se ubica dentro de este rango con 9.24% de materia seca (Tabla 3.23 y Figura 3.20).

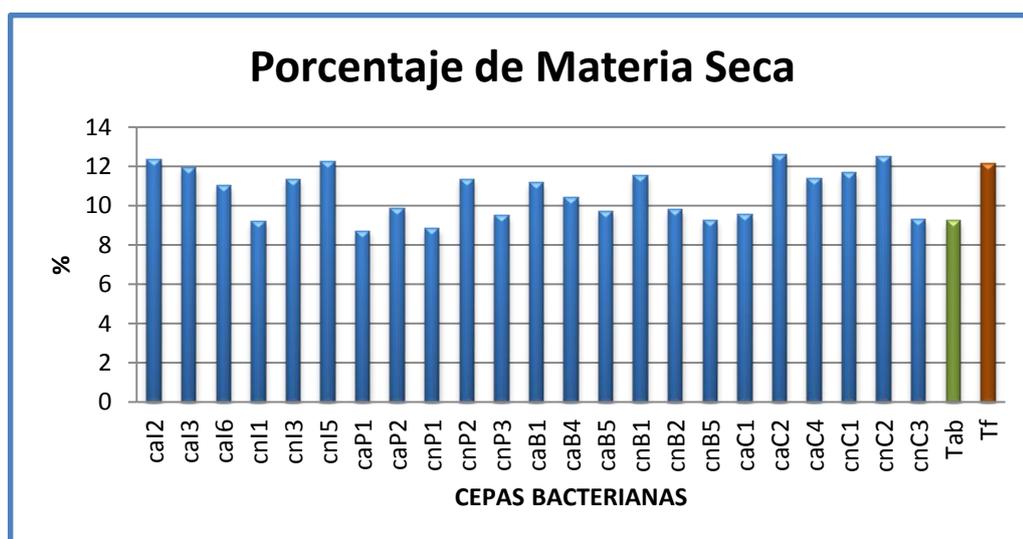


Figura 3. 19: Gráfico de los datos experimentales de la variable Materia Seca para los 24 tratamientos con las cepas bacterianas mas dos testigos negativos TF: Testigo fertilizado y Tab: Testigo Absoluto evaluados en invernadero.

Con respecto al porcentaje de humedad se obtuvieron ocho rangos, en el primer rango se ubicaron trece tratamientos, el menor porcentaje de humedad fue del tratamiento T20 (Cepa 2: Chimborazo, suelo agrícola) con 87.37% y el mayor porcentaje de humedad de este rango fue del tratamiento T3 (Cepa 6: Imbabura, suelo agrícola) con 88.97%, el testigo fertilizado se encuentra dentro de este rango con 87.83% de humedad. En el último rango se ubican doce tratamientos, el tratamiento de menor humedad en este rango es el T14 (Cepa4: Bolívar, suelo agrícola) con 89.61% y el de mayor porcentaje de humedad es T7 (Cepa 1: Pichincha, suelo agrícola) con 91.29%, el testigo absoluto se ubica dentro de este rango con 90.76% de humedad (Tabla 3.23 y Figura 3.21).

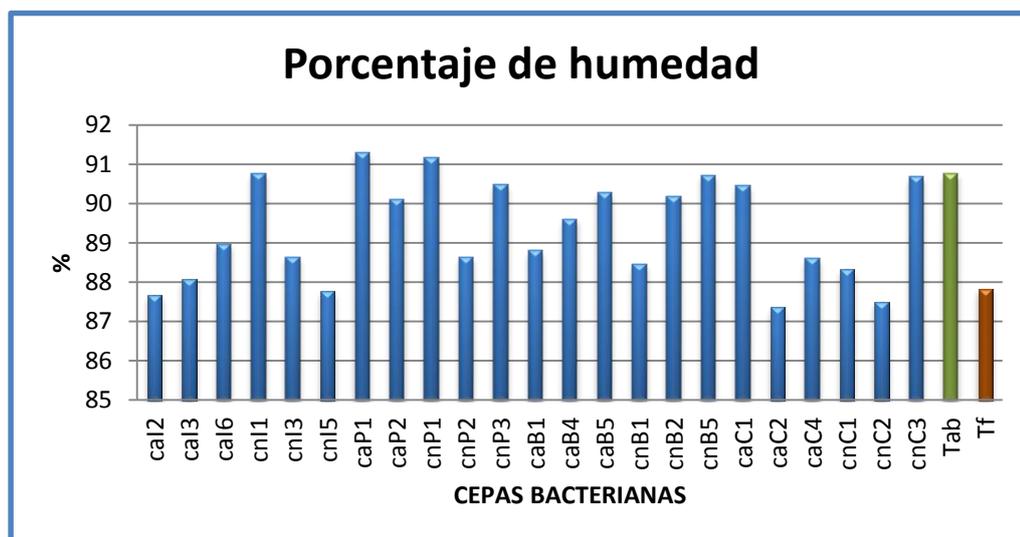


Figura 3. 20: Gráfico de los datos experimentales de la variable porcentaje de humedad para los 24 tratamientos con las cepas bacterianas mas dos testigos negativos TF: Testigo fertilizado y Tab: Testigo Absoluto evaluados en invernadero.

3.2.3.4. Área foliar

Con los datos obtenidos por el programa Imagej se realizó el ANOVA para la variable área foliar, el cual indicó diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, con un promedio general de 175.89 cm² y un coeficiente de variación del 22.81% (Tabla 3.22).

Tabla 3. 22: Análisis de Varianza para la variable área foliar.

Fuente de variación	SC	GL	CM	F	p-valor
Total	334275.39	122			
Trat.	173315.38	28	7221.47	4.40	<0.0001
Error	160.0960	98	1642.45		
Promedio	175.89 cm ²				
C.V %	22.81 %				

Se evidenció una mayor área foliar en catorce tratamientos incluido el testigo fertilizado (Tabla 3.23), en los tratamientos T7 (C1: Pichincha, suelo agrícola) y T24 (C 3: Chimborazo, suelo no cultivado) sus promedios fueron menores en comparación con el testigo absoluto con 79.87 cm² y 68.49 cm²; mientras que el resto de tratamientos compartieron los mismos rangos que el testigo absoluto (Figura 3.22).

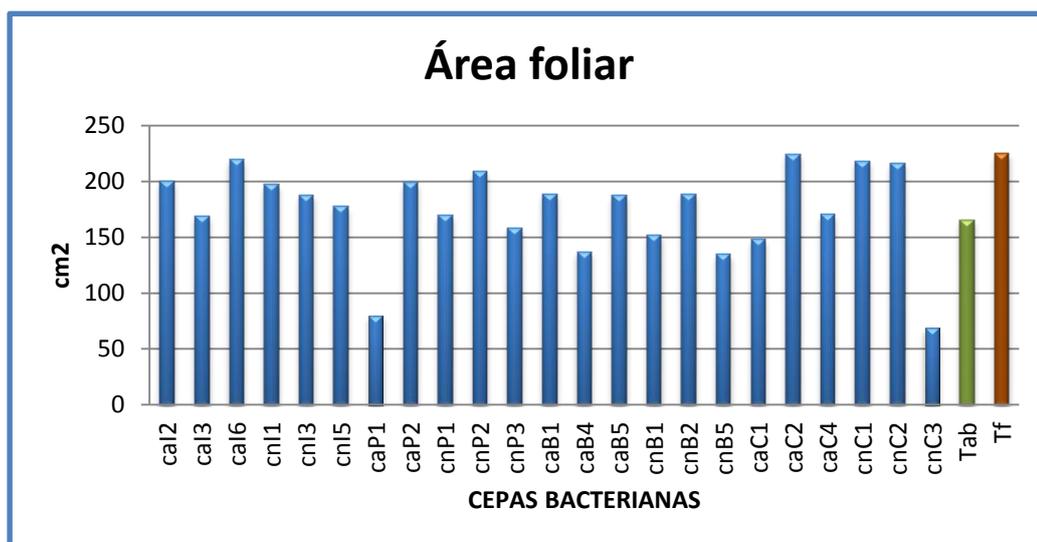


Figura 3. 21: Gráfico de los datos experimentales de la variable área foliar para los 24 tratamientos con las cepas bacterianas mas dos testigos negativos TF: Testigo fertilizado y Tab: Testigo Absoluto evaluados en invernadero.

Tabla 3. 23: Promedios y Tukey al 5 % para las variables: longitud de raíz, porcentaje de materia seca, porcentaje de humedad y área foliar, obtenidas en el ensayo de invernadero.

Tratamiento	Código, procedencia, especie	PROMEDIOS Y RANGOS DE SIGNIFICANCIA			
		longitud de raíz	% Materia seca	% Humedad	Área Foliar
T1	caI2: Imbabura SA, <i>Pseudomona sp</i>	51.8 ABC	12.33 A	87.67 A	200.67 A
T2	caI3: Imbabura SA, <i>P. fluorescens</i>	58.4 A	11.93 ABC	88.07 ABC	169.26 AB
T3	caI6: Imbabura SA, <i>Pseudomona sp</i>	43.0 BCDEF	11.03 ABCDEFG	88.97 ABCDEFG	219.52 A
T4	cnI1: Imbabura SN, <i>Pseudomona sp</i>	49.8 ABCDE	9.22 GH	90.78 GH	197.81 A
T5	cnI3: Imbabura SN, <i>P. fluorescens</i>	48.2 ABCDE	11.36 ABCDEF	88.64 ABCDEF	187.99 A
T6	cnI5: Imbabura SN, <i>P. fluorescens</i>	42.6 BCDEF	12.24 AB	87.76 AB	177.51 A
T7	caP1: Pichincha SA, <i>P. fluorescens</i>	27.8 F	8.71 H	91.29 H	79.87 BC
T8	caP2: Pichincha SA, <i>Pseudomona sp</i>	50 ABCD	9.88 CDEFGH	90.12 CDEFGH	199.54 A
T10	cnP1: Pichincha SN, <i>Pseudomona sp</i>	52.6 ABC	8.83 H	91.17 H	169.74 AB
T11	cnP2: Pichincha SN, <i>P. putida</i>	46.2 ABCDE	11.35 ABCDEF	88.65 ABCDEF	209.07 A
T12	cnP3: Pichincha SN, <i>P. fluorescens</i>	45.6 ABCDE	9.52 FGH	90.48 FGH	158.72ABC
T13	caB1: Bolívar SA, <i>P. putida</i>	59.8 A	11.19 ABCDEF	88.81ABCDEF	189.06 A
T14	caB4: Bolívar SA, <i>Pseudomona sp</i>	48.2 ABCDE	10.39 BCDEFGH	89.61 BCDEFGH	137.0 ABC
T15	caB5: Bolívar SA, <i>Pseudomona sp</i>	57 A	9.73 DEFGH	90.27 DEFGH	187.55 A
T16	cnB1: Bolívar SN, <i>P. fluorescens</i>	50.8 ABCD	11.55 ABCD	88.45 ABCD	152.3 ABC
T17	cnB2: Bolívar SN, <i>Pseudomona sp</i>	38.4 BCDEF	9.81 DEFGH	90.19 DEFGH	189.05 A
T18	cnB5: Bolívar SN, <i>P. putida</i>	37.8 CDEF	9.27 GH	90.73 GH	134.76 ABC
T19	caC1: Chimborazo SA, <i>Acinetobacter sp</i>	51.8 ABC	9.54 EFGH	90.46 EFGH	148.13 ABC
T20	caC2: Chimborazo SA, <i>Pseudomona sp</i>	43.8 BCDEF	12.63 A	87.37 A	224.48 A
T21	caC4: Chimborazo SA, <i>Acinetobacter sp</i>	46.2 ABCDE	11.39 ABCDE	88.61 ABCDE	170.32 AB
T22	cnC1: Chimborazo SN, <i>A. calcoaceticus</i>	53.8 ABC	11.68 ABC	88.32 ABC	218.58 A
T23	cnC2: Chimborazo SN, <i>P. fluorescens</i>	55.2 AB	12.51 A	87.49 A	216.86 A
T24	cnC3: Chimborazo SN, <i>Pseudomona sp</i>	32.67 EF	9.32 GH	90.68 GH	68.49 C
Tab	Testigo absoluto	33.8 DEF	9.24 GH	90.76 GH	165.91 ABC
Tf	Testigo fertilizado con Fósforo	50.78 ABCD	12.17 AB	87.83 AB	224.99 A

3.2.3.5. Análisis Foliar

Los análisis foliares están expresados en porcentaje y se muestran en la (Tabla 3.24).

Tabla 3. 24: Análisis foliares.

Tratamiento	Cepas	Elemento %				
		N	P	K	Ca	Mg
T1	ca2	3.25	0.22	4.33	0.73	0.26
T2	ca3	1.89	0.16	4.71	0.64	0.32
T3	ca6	3.71	0.16	4.35	0.56	0.29
T4	cn11	1.60	0.15	3.39	0.19	0.49
T5	cn13	3.32	0.20	3.89	0.63	0.31
T6	cn15	3.20	0.19	3.78	0.60	0.29
T7	caP1	3.07	0.13	4.13	0.65	0.28
T8	caP2	2.98	0.17	4.06	0.79	0.28
T10	cnP1	3.16	0.14	4.12	0.59	0.22
T11	cnP2	4.34	0.17	4.44	0.81	0.33
T12	cnP3	2.80	0.16	3.79	0.92	0.32
T13	caB1	4.72	0.18	4.69	0.67	0.27
T14	caB4	2.80	0.16	3.77	0.67	0.33
T15	caB5	3.80	0.20	4.60	0.57	0.27
T16	cnB1	3.45	0.19	4.12	0.62	0.22
T17	cnB2	4.34	0.17	4.33	0.80	0.33
T18	cnB5	2.50	0.13	4.07	0.71	0.25
T19	caC1	2.37	0.15	4.03	0.66	0.28
T20	caC2	2.98	0.18	3.96	0.77	0.28
T21	caC4	3.00	0.14	3.79	0.76	0.29
T22	cnC1	2.88	0.26	3.27	0.70	0.31
T23	cnC2	4.39	0.28	4.62	0.65	0.27
T24	cnC3	3.02	0.13	3.89	0.75	0.28
Tf	TF	2.71	0.22	2.89	0.57	0.27
Tab	Tab	3.85	0.15	4.60	0.76	0.35

El mayor porcentaje de fósforo presente en el tejido foliar, fue en los tratamientos T23 (Cepa 2: Chimborazo, suelo no cultivado) y T22 (Cepa 1: Chimborazo, suelo no cultivado) siendo estos superiores al testigo fertilizado, con

0.28% y 0.26% respectivamente; por otro lado los tratamientos con porcentajes de (P) igual o inferiores con respecto al testigo absoluto fueron: T4 (Cepa 1: Imbabura, suelo no cultivado) con 0.15% P, T7 (Cepa 1: Pichincha, suelo agrícola) con 0.13%P, T10 (Cepa 1: Pichincha, suelo no cultivado) con 0.14% P, T18 (Cepa 5: Bolívar, suelo no cultivado) con 0.13% P, T21 (Cepa 4: Chimborazo, suelo agrícola) con 0.14% P y T24 (Cepa 3: Chimborazo, suelo no cultivado) con 0.13% P.

Se realizó la prueba no paramétrica de los signos usando el programa Statistix 10.0 versión de prueba, el cual mostró que el 69.57% de las cepas inoculadas aumentaron el porcentaje de fósforo en el tejido foliar con un valor de $p= 0.0266$, al comparar con el testigo absoluto (0.15% P) (Anexo E.2).

Tabla 3. 25: Contenido de P_2O_5 absorbido por la planta.

Cepas	P_2O_5(mg/planta)	Cepas	P_2O_5(mg/planta)
caI2	27.05	caB5	15.00
caI3	11.61	cnB1	15.83
caI6	20.03	cnB2	19.47
cnI1	15.70	cnB5	5.58
cnI3	18.79	caC1	8.68
cnI5	17.50	caC2	19.88
caP1	2.39	caC4	8.84
caP2	14.47	cnC1	35.68
cnP1	10.17	cnC2	37.61
cnP2	17.38	cnC3	2.16
cnP3	10.82	TABS	8.02
caB1	20.45	TF	31.09
caB4	5.91		

El mayor contenido de P_2O_5 (mg/planta) absorbido por la planta, fue en los tratamientos T23 (Cepa 2: Chimborazo, suelo no cultivado) con 37.61 mg/planta y T22 (Cepa 1: Chimborazo, suelo no cultivado) con 35.68 mg/planta, siendo estos superiores al testigo fertilizado (Tabla 3.25 y Figura 3.23). La prueba de los signos mostró que el 82.61% de las cepas inoculadas aumentaron el contenido de P_2O_5 (mg/planta) absorbido por la planta de maíz con un valor de $p= 0.0026$, al comparar con el testigo absoluto (8.02 mg P_2O_5 /planta) (Anexo E.3).

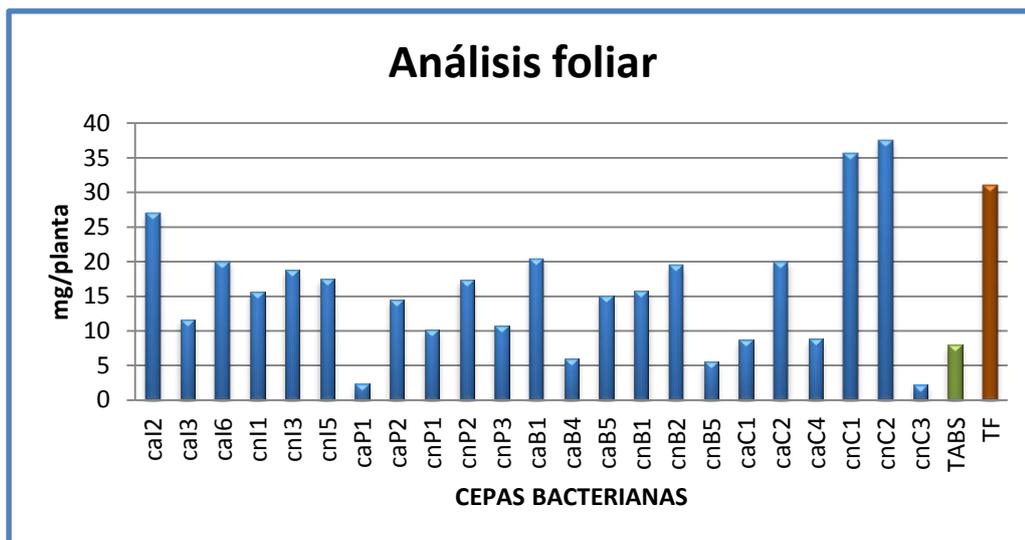


Figura 3. 22: Gráfico de los datos experimentales de la variable contenido de fósforo en la planta, para los 24 tratamientos con las cepas bacterianas mas dos testigos negativos TF: Testigo fertilizado y Tab: Testigo Absoluto evaluados en invernadero.

3.2.3.6. Concentración de fósforo en el tejido Vs el área foliar del maíz

La absorción de fósforo por la planta tiene una relación polinómica con la expansión del área foliar; en condiciones de deficiencia dicha expansión es baja y aumenta con el incremento del P absorbido (Figura 3.24).

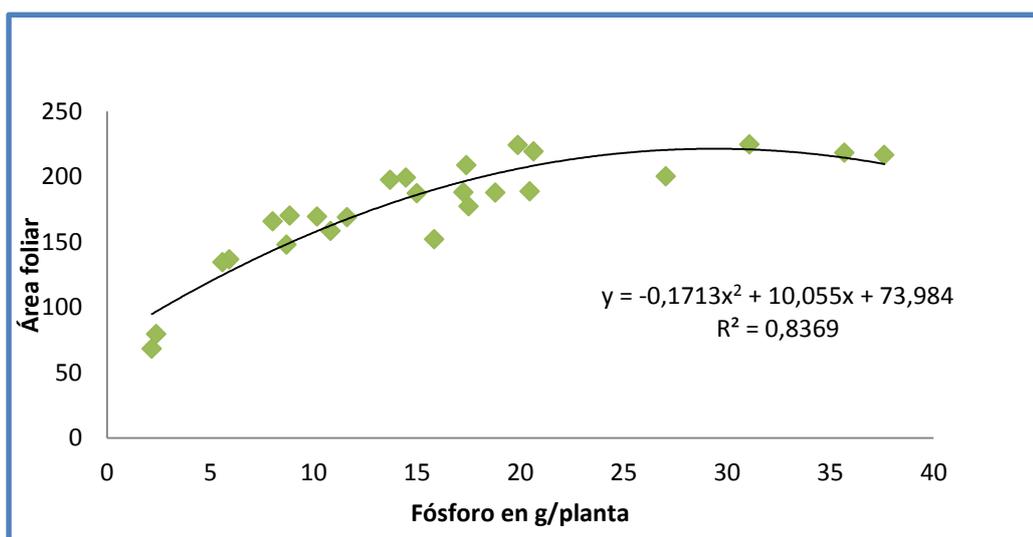


Figura 3. 23: Efecto de la concentración de fósforo en el tejido sobre el área foliar del maíz.

Los datos obtenidos permitieron establecer una ecuación de regresión ajustada a la forma cuadrática que demuestra la dependencia de la absorción de P por la planta en la expansión del área foliar, el coeficiente $R^2 = 0.836$ indican que la expansión foliar del maíz en los dos primeros meses del desarrollo podría ser atribuida en un 83.6% de los casos a la capacidad de los cultivares de acumular P en el tejido vegetal.

3.3.4.7. Porcentaje de materia seca Vs Contenido de fósforo en el tejido.

En la Figura 3.25, se observa una relación directa entre la materia seca y la absorción de fósforo por la planta, lo cual nos indica que al tener una mayor acumulación de materia seca en plantas de maíz; se incrementa la absorción fósforo disponible en el suelo. Existe una correlación $R^2 = 0.876$ entre las dos variables. Esto indica que el incremento de materia seca puede atribuirse en un 87.6% a la capacidad de acumulación de P en el tejido vegetal en los dos primeros meses de desarrollo de la planta.

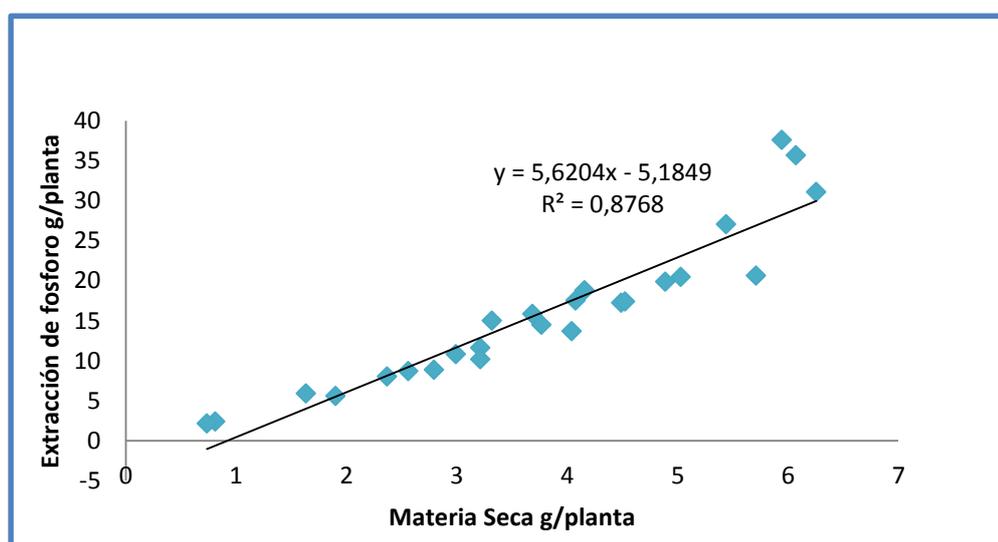


Figura 3. 24: Efecto de la extracción de fósforo sobre la producción de materia seca

3.3.4.8. Área foliar del maíz Vs producción de materia seca

El área foliar tiene una relación polinómica con el incremento de la materia seca, es decir mientras mayor sea el área foliar; mayor será la materia seca acumulada en la planta de maíz, en los dos primeros meses de su desarrollo (Figura 3.26).

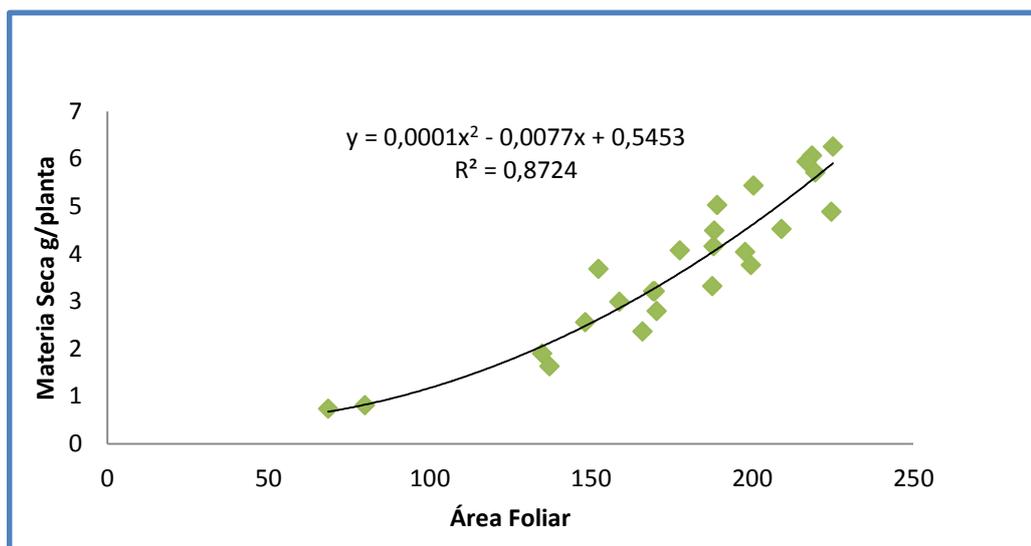


Figura 3. 25: Efecto del área foliar en la acumulación de materia seca.

La relación área foliar y materia seca mostró una tendencia cuadrática, con un coeficiente $R^2 = 0.872$, lo que significa que el incremento de materia seca puede verse influenciada positivamente en un 87.2% por el aumento de área foliar en los dos primeros meses de desarrollo de la planta.

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

4.1. FASE I. Laboratorio

4.1.1. Procesamiento de muestras para el aislamiento de *Pseudomonas sp*

Los análisis de suelo mostraron que en los suelos no cultivado, en los cuales se encontraban pastizales naturales de kikuyo, existió un mayor porcentaje de materia orgánica (8.8%) y nitrógeno (55 ppm). Lozano *et al.* (2011), y Mingxiang *et al.* (2006) han demostrado que en los suelos destinados para el cultivo hay menor cantidad de M.O con respecto a los suelos sin disturbación agrícola, esto se debe a la extracción de nutrientes generada por los cultivos.

Una forma de explicar el alto contenido de M.O. en estos suelos es debido a que las raíces de los pastizales son densas y fibrosas, que al morir, son incorporadas como materia orgánica fresca al suelo. Esto permite que cada año, el porcentaje de M.O. del suelo se mantenga en niveles altos. La asignación de biomasa a raíces no sólo aumenta el C que entra al suelo sino también la retención de N dentro del ecosistema (Piñeiro, 2006).

Los suelos agrícolas contienen grandes reservas de fósforo, como consecuencia de las aplicaciones de fertilizantes fosfatados que se realiza frecuentemente. Sin embargo, una gran parte del fosfato inorgánico soluble en fertilizantes es inmovilizado en el suelo y se convierte en no disponible para las plantas. El suelo agrícola de la provincia de Pichincha – Sección Oriental tiene mayor cantidad de N (51 ppm) y P (40 ppm) con respecto a los suelos agrícolas de Imbabura- Hacienda Tunibamba (N: 27 ppm, P: 18 ppm), Chimborazo- Guntuz (N: 36 ppm, P: 31 ppm) y Bolívar- Universidad de Bolívar (N: 20 ppm, P: 30 ppm) esto es debido a la fertilización constante que se realiza en cada ciclo de cultivo de maíz. Además al ser un suelo Andisol, está dominado por complejos humus-Al y alófana, que hacen que la reacción de la fijación de fósforo sea mucho más enérgica y absorban cantidades apreciables de P a través del tiempo (Espinoza, 2008).

El nitrógeno es liberado fácilmente a la atmósfera por lo que la acumulación de este elemento en el suelo es mínima, por el contrario el fósforo interacciona con los componentes del suelo, convirtiéndose en agregados insolubles, lo cual conlleva a un efecto residual y acumulativo de la aplicación de fertilizantes fosfatados, pero esta residualidad en ningún caso es suficiente para fertilizar al siguiente ciclo de cultivo, aún cuando la dosis anterior haya sido alta (INIAP, 2007).

Se estima que en el país de los 2'361.786 ha destinadas para la actividad agrícola el 46% están afectadas por la degradación del suelo (Ministerio del Ambiente, 2013). Una forma de disminuir el desgaste del suelo es mediante buenas prácticas agrícolas o proporcionándole un descanso al suelo, lo cual podría incrementar el porcentaje de M.O. y posiblemente también el número de microorganismos benéficos que renueven las propiedades del suelo, ya que se ha encontrado que en aquellos suelos de uso agrícola que tienen un descanso de varios años el porcentaje de materia orgánica incrementa a medida que aumentan los años de descanso (Duchicela *et al*, 2013).

4.1.2. Conteo de Unidades formadoras de colonias presentes en el suelo.

El número promedio de bacterias que crecieron en el medio KB, fue de 4.04×10^6 UFC/gramo de suelo, este valor es menor al encontrado por Hernández *et al*, (2003), cuyo promedio de UFC fue de 6.2×10^6 UFC. Esto se debe a que el número de microorganismos es diferente en cada ecosistema, ya que las condiciones ambientales y los nutrientes disponibles influyen en su crecimiento y desarrollo (González, 2010).

Los microorganismos del suelo presentan una actividad bioquímica baja, como resultado la producción de CO₂ de su respiración es residual y la materia orgánica tiene una proporción C/N muy baja. Sin embargo, tras el aporte de materia orgánica al suelo, la relación C/N incrementa, y el número de microorganismos se eleva rápidamente, debido a la existencia de energía y nutrientes en el suelo (Jordán, Manual de Edafología, 2005). Esto explica porque se encontró una mayor población

bacteriana en suelos no cultivados, especialmente en la provincia de Bolívar cuyo %M.O. y UFC/g suelo; fueron superiores, a todas las muestras de suelo analizadas.

Varios estudios revelan que la actividad agrícola modifica las propiedades del suelo, lo cual influye en el crecimiento y metabolismo de los microorganismos que lo habitan. El uso de mecanización agrícola y de agroquímicos, ocasionan impactos negativos en el suelo de cultivo, donde el mayor problema es la erosión (Suquilanda, 2008).

En los suelos de Sección Oriental – provincia de Pichincha, se encontró una menor cantidad de UFC (1.55×10^5 UFC/ g de suelo), esto puede deberse a que han sido sometidos por más de 40 años a un monocultivo extensivo e intensivo de maíz, lo cual ha generado cambios en los recursos minerales del suelo, que reducen paulatinamente la diversidad microbiológica y edáfica del suelo (Pérez *et al*, 2010).

4.1.3. Porcentaje de bacterias solubilizadoras de fósforo presentes en el suelo.

La cantidad de fósforo presente en el suelo no influye en la cantidad de microorganismos solubilizadores (Fernández *et al.*, 2005), es por ello que a pesar de que se encontró mayor cantidad de P en suelos agrícolas (29.75 ppm) con respecto a los suelos no cultivados (8.8 ppm), estadísticamente no existió diferencia significativa entre estos dos grupos de suelo, pero matemáticamente sí; ya que en el suelo agrícola existió un porcentaje ligeramente superior con 9.2% BSP, respecto al suelo no cultivado con 7.98 % BSP.

La provincia de Pichincha presentó mayor cantidad de P, pero no se pudo observar BSP. Los monocultivos influyen en la selección natural de los grupos microbianos presentes en la rizosfera, debido a que los exudados propios de una misma planta condicionan el desarrollo de grupos microbianos específicos (Pérez *et al*, 2010).

Micanova y Novakova (2002), mencionan que en suelos pobres de fósforo las BSP tienen mayor capacidad de solubilización, mientras que en suelos ricos en

fósforo soluble, o con aportes de fertilizante solubles, las bacterias pierden esta capacidad de solubilización, lo que se conoce como el efecto Feedback.

El porcentaje de microorganismos solubilizadores de fósforo presentes en suelos depende de varios factores como; el tipo de suelo, el ciclo del cultivo, el manejo agronómico. Sin embargo, es importante mencionar que el método para determinar el porcentaje de BSP utilizado por cada investigador también podría ser causa de variabilidad (Fernández *et al.*, 2005).

En un estudio realizado por Figueroa y García (2012) se analizaron 13 cepas bacterianas con capacidad para solubilizar fósforo. La población de bacterias solubilizadoras de P, fue mayor en el medio adicionado con fosfato tricálcico, en comparación con la población encontrada en medio con roca fosfórica. Kucey (1983) afirma que un medio de cultivo con fuentes carbonadas excluye a aquellos organismos solubilizadores de fosfato que no utilicen eficientemente los carbohidratos.

4.1.4. Aislamiento y purificación de *Pseudomonas sp.*

Los resultados de los análisis químicos evidenciaron que en todos los suelos muestreados existen condiciones favorables para el crecimiento de microorganismos, Berge *et al*, (1991) demostró la importancia de algunas propiedades de la fertilidad del suelo, como el pH y la materia orgánica, en la supervivencia y establecimiento de microorganismos en la rizosfera de maíz.

Con relación al cultivo de maíz los géneros bacterianos predominantes encontrados en la rizófora, independientemente de la edafología, clima o altitud son: *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* y *Streotomyces* (Berge *et al*, 1991 y Hernández *et al*, 2003). En este estudio se logró aislar al menos una cepa del género *Pseudomona* en cada una de las muestras de suelo pertenecientes a las provincias de Imbabura, Pichincha, Bolívar y Chimborazo.

4.1.5. Caracterización bioquímica de *Pseudomonas sp.*

Pseudomonas sp., son bacilos Gram (-), oxidasa, peroxidasa citrato, motilidad, positivos, se diferencian de otros géneros por la producción de pigmentos fluorescentes como piocianina y fluoresceína; ocasionando alteraciones en los medios de cultivo para su crecimiento (Prescott *et al.*, 2004), similar a los resultados observados en esta investigación ya que las colonias aisladas presentaron pigmentos de color verde, que se difundieron en el agar KB y emitían fluorescencia bajo luz UV.

Este género tiene un metabolismo oxidativo no fermentativo razón por la cual en la prueba TSI su resultado fue K/K (alcalino/alcalino), lo que significa que no fermenta azúcares (Britanialab). Además la utilización de pruebas API 20E de Biomérieux, fueron muy útiles para confirmar el género de las cepas en estudio (Anexo C.2 y Figura 3.6).

Las cepas pertenecientes al género *Acinetobacter* poseen la capacidad de degradar la urea al ser positivas para esta prueba. Ésta característica es motivo de investigación, ya que en la degradación de este compuesto disponible en forma de materia orgánica o en la orina de algunos animales, se obtiene como producto amoníaco, el cual es precursor para la formación de productos como amonio y nitrato, que son fácilmente absorbidos por las plantas (Valero, 2003).

4.1.6. Caracterización molecular de las cepas de *Pseudomonas sp.*

Para la identificación taxonómica y validación de análisis de un microorganismo se deben aplicar tanto: criterios morfológicos, bioquímicos y moleculares (Rodício y Mendoza, 2004).

El gen 16Sr se ha convertido en un marcador molecular por excelencia, debido a que se transmite verticalmente entre los individuos de la población, además tiene regiones conservadas y variantes que permite establecer relaciones filogenéticas (Wang y Quian, 2009).

En la actualidad existen varios secuenciadores automáticos que facilitan conocer el orden de los nucleótidos de un fragmento de ADN en particular. Sin embargo las secuencias obtenidas con dichos equipos podrían tener errores o presentar posiciones ambiguas en los nucleótidos, lo cual dificulta el análisis de las mismas. Para resolver estos problemas y asegurar la validez de los resultados, se debe realizar la secuenciación de la cadena forward (5'-3') y reverse (3'-5'), para alinearlas y obtener una secuencia consenso (Morillo E. y G.Miño, 2011). Sin embargo por la falta de recursos económicos no se pudo realizar la secuenciación de la cadena reverse.

Rodicio y Mendoza, (2004) mencionan que la evaluación de los electroferogramas ayudan a la corrección de errores, y que para la identificación de bacterias a nivel de género no se requiere necesariamente la secuenciación del ADNr 16S completo, ya que la mayor variabilidad se encuentra en las primeras 500 bases, correspondientes al extremo 5'.

Es posible que por la mala manipulación de los capilares de purificación, se contaminaran con DNAsas los ADNr de las cepas cnB2, cnI3, y cnP1, lo cual provocó la degradación de los mismos.

4.1.7. Evaluación de la Solubilización de fosfatos *in vitro*

Los halos de solubilidad variaron 2 mm a 16 mm, sin embargo esto no quiere decir que la cepa con mayor halo es capaz solubilizar mayor cantidad de fósforo. Lara *et al.*, (2013) observaron que los mayores valores del diámetro del halo no correspondieron con los valores más elevados de la concentración de fosfato solubilizado en medio líquido. Esto se debe a que ciertas bacterias producen citrato; el único carbolixato con capacidad de solubilizar fosfato tri cálcico bajo condiciones neutrales de pH (Fankem *et al.*, 2006).

En esta investigación se usó en el medio de cultivo púrpura de bromocresol, como indicador de pH, el cual permitió observar el descenso de pH, por el cambio de

color del medio. Con relación a los posibles mecanismos de solubilización de fosfatos, varios estudios confirman que las especies *Pseudomonas* producen ácidos orgánicos, especialmente a través de la oxidación de glucosa a ácido glucónico por la ruta de oxidación directa, lo cual provoca la acidificación del medio de cultivo (Naik *et al.*, 2008) y conlleva a la liberación del fósforo inorgánico (Pi) mediante el intercambio protónico (Rodas, 2006).

Niklitschek (2008), menciona que la capacidad de un microorganismo para solubilizar fósforo, depende del tipo de ácido que produzca, y no necesariamente del poder de acidificación que tenga dicha molécula. Pero su capacidad de solubilización de P y la producción de ácido, es un fenómeno complejo que no depende tanto de su genética; sino de las condiciones nutricionales, y fisiológicas en las que se encuentre dicho microorganismo (Vyas & Gulati, 2009).

Un estudio realizado por Vyas y Gulati (2009) identificaron a los ácidos glucónico y 2-cetoglucónico; como los ácidos que *P. fluorescens*, *P. poae* *P. trivialis* y *Pseudomonas sp* sintetizan en mayor proporción durante la solubilización de fósforo. Mientras que los ácidos: málico, láctico, fórmico, oxálico, fueron restringidos para ciertas especies de *Pseudomonas*.

4.2. FASE II: Invernadero

4.2.1. Evaluación funcional en invernadero de las cepas bacterianas

Lara *et al.*, (2013), menciona que solo los ensayos de campo pueden establecer la capacidad de los microorganismos para solubilizar fósforo inorgánico y producir un efecto benéfico en plantas de interés comercial como el maíz, ya que no todos los microorganismos que solubilizan fósforo en condiciones de laboratorio, pueden hacerlo en condiciones de campo.

Pseudomonas sp. ha sido aislada en esta investigación por su capacidad reportada en bibliografía; para establecer una relación simbiótica con las plantas o

vivir libremente en los suelos (Bashan *et al.*, 2007). Existe un sinnúmero de investigaciones sobre los efectos de biofertilización, fitoestimulación y biocontrol, que ejercen varias especies de *Pseudomonas* sobre diferentes cultivos (Rosas *et al.*, 2009; Fgaier y Eberl, 2010; Ulloa, 2011; Höfte y Altier, 2010), favoreciendo el crecimiento de las plantas mediante la solubilización de fósforo, producción de fitohormonas (AIA, ACC desaminasa), síntesis de sideróforos (pioverdin) (Hernández *et al.*, 2006).

El ácido indol acético (AIA), estimula la proliferación y elongación celular vegetal, además induce la síntesis de la enzima ACC sintasa, que interviene en la síntesis del etileno el cual ayuda a germinación de la semilla y maduración de la planta, pero en altas concentraciones puede inhibir su crecimiento, provocar marchitamiento e inducir a la senescencia y muerte prematura.

Las bacterias del suelo que sintetizan a la enzima ACC desaminasa juegan un papel importante en el desarrollo de plantas expuestas a factores de estrés biótico y abiótico, ya que promueven el crecimiento vegetal mediante la disminución de los niveles de etileno en plantas, al convertir al precursor inmediato del etileno, el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), en α -cetobutirato (α -CB) y amonio, este último puede ser utilizado por las plantas y microorganismos como fuente de nitrógeno (Holguin, *et al.*, 2003). Pero el efecto de la inoculación de estas bacterias en el crecimiento de las plantas depende significativamente de varios factores, como del estatus nutricional de la planta o del manejo de las prácticas agrícolas (Holguin, *et al.*, 2003 y Esquivel, *et al.*, 2013).

Los sideróforos que *Pseudomonas* sintetizan son del tipo catecol, el cual desempeña un papel fundamental en el control de hongos fitopatógenos, sin afectar a las plantas colonizadas. También produce antibióticos como pyluteorina, 2,4 diacetyl-phloroglucinol, ácido cianhídrido y ácido salicílico, y en ocasiones se ha visto que pueden inducir a que la planta genere resistencia al ataque de bacterias u hongos como *Pythium spp* y *fusarium sp*, pero esta resistencia inducida depende de la especie vegetal (Hernández *et al.*, 2006).

4.2.2. Análisis químico del sustrato

Al realizar la prueba no paramétrica de los signos se observó que el 91.3% de las cepas inoculadas aumentaron la cantidad de fósforo en el suelo en comparación con los valores iniciales (58 ppm), esto podría deberse a la solubilización de este elemento llevado a cabo por las bacterias inoculadas en las semillas de maíz. Resultados similares se obtuvieron en estudios realizados por Vyas & Gulati (2009) donde inocularon semillas de maíz con varias especies de *Pseudomonas* y evaluaron por 90 días, al realizar los análisis de suelo se observó que existió un incremento significativo en la cantidad de fósforo presente en el suelo, además de una mayor absorción de P en los tejidos de la planta.

4.2.3. Siembra e inoculación

Para una buena calidad de inoculante, la concentración bacteriana es muy importante, ya que esta debe ser mayor a las densidades naturales que existen en el suelo para que así tengan la capacidad de competir efectivamente con las cepas existentes en él (Niklitschek, 2008).

4.2.4. Análisis de datos

Con respecto a la variable altura de planta, el testigo absoluto compartió rangos con todos los tratamientos excepto con las cepas caP1 y cnC3, que presentaron valores inferiores, esto posiblemente se deba a la viabilidad de la semilla, ya que desde el inicio del ensayo presentaron un lento desarrollo. Se ha observado que la inoculación de plantas de maíz con PGPR no influye significativamente en esta variable pero sí en el porcentaje de materia seca (Faggioli, *et al.*, 2007).

El desarrollo de la raíz influye en la absorción de nutrientes y esto se refleja en la acumulación de materia orgánica. La producción de IAA por PGPR generalmente provoca la elongación y acumulación de P y N en los tejidos de la planta. En el sistema radicular; se ha visto que los bajos niveles de IAA producidos por

rizobacterias promueve la elongación de la raíz primaria, mientras que altos niveles incrementa la formación de raíces laterales y adventicias, pero inhibe el crecimiento de la raíz primaria (Marques *et al.*, 2010), esto puede explicar porque en ciertos tratamientos se observó una mayor cantidad de raíces secundarias pero menor longitud de su raíz principal; y viceversa, sin embargo en los tratamientos T3 (aI6), T13 (aB1), T22 (nC1) y T23 (nC2), presentaron una raíz primaria larga y mayor cantidad de raíces secundarias con respecto al testigo absoluto, lo que quiere decir que es posible que en estas cepas la cantidad de IAA producido estuvo en equilibrio.

El fósforo es el elemento principal de la molécula ATP, la cual es la encargada de la transferencia de energía. La asimilación de fosfatos por los vegetales contribuye al aumento de su metabolismo y ello se manifiesta en un aumento del contenido de materia seca total, ya que mientras mayor sea la absorción de fósforo, mayor energía tendrá la planta para producir tejidos y órganos vegetales, así como azúcares, proteínas, entre otras moléculas indispensables para generar mayor cantidad de células (Niklitschek, 2008).

Parra *et al.*, (2011), mencionan que la absorción de fósforo en las primeras etapas del desarrollo de la planta de maíz, influye en el contenido de biomasa y en el área foliar, ya que este nutriente juega un papel importante en la morfogénesis y expansión foliar, lo cual permite una mejor captación de energía radiante. Es por ello que las plantas de maíz inoculadas con cepas aI2, aI6, nI3, nI5, nP2, aB1, aB5, nB1, nB2 y aC2, al absorber fósforo eficientemente, obtuvieron altos porcentajes de materia seca y área foliar con respecto al testigo absoluto.

Existen pocas investigaciones sobre la actividad metabólica de *Acinetobacter sp.* Sin embargo un estudio realizado por Islama *et al.*, (2006) menciona que la cepas *Acinetobacter sp.* BR-25 y *Klebsiella sp.* BR-15, solubilizaron mayor cantidad de fósforo con respecto a la cepa *Pseudomona sp.* BRS-2.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

Se logró aislar 19 cepas solubilizadoras de fósforo, presentes en la rizósfera de maíz, de las cuales 6 cepas pertenecen a la provincia de Imbabura, 6 son Bolívar, 4 de Chimborazo y 3 de Pichincha. En los suelos no cultivados se aislaron 5 cepas de Imbabura, 7 de Bolívar, 4 de Chimborazo y 3 de Pichincha.

Existe mayor porcentaje de materia orgánica y UFC de bacterias en suelos sin disturbación agrícola con respecto a los suelos de uso agrícola. La actividad agrícola y sobre todo el monocultivo disminuye la cantidad de nutrientes, la población bacteriana, y por consiguiente la fertilidad del suelo se reduce.

La caracterización microbiológica alegó que de las 38 cepas aisladas de las muestras de suelo analizadas, 33 cepas fueron identificadas como *Pseudomonas sp.* 3 pertenecen al género *Acinetobacter* y 2 al género *Burkoldela*.

Las cepas aI2, aI3, nP2, nP3 presentaron mayor índice de solubilización *in vitro*, pero esto no se vio reflejado en el ensayo de invernadero, ya que las cepas más eficientes en promover el desarrollo de la planta fueron nC1 (*A. calcoaceticus*) y nC2 (*P. fluorescens*), mostrando valores mayores en cuanto a longitud de raíz, % de materia seca, área foliar, y acumulación de P en los tejidos, con respecto al testigo absoluto y testigo fertilizado.

Al comparar el testigo absoluto con los demás tratamientos se obtuvo que las cepas aI2, aI6, nI3, nI5, nP2, aB1, aB5, nB1, nB2 y aC2 fueron superiores en todas las variables evaluadas.

La absorción de P disponible en el suelo dio lugar a un aumento en la producción de biomasa, atribuible a un aumento del área foliar, cuya consecuencia es un aumento en la cantidad de radiación fotosintéticamente activa interceptada.

CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES

Se debería realizar pruebas de solubilización de fósforo en medio líquido para determinar con mayor certeza que bacterias son mejores solubilizadoras de fósforo.

Para una mejor relación entre la materia seca y el área foliar se debe calcular el índice de área foliar ya que este nos da un dato más real sobre la acumulación de biomasa.

Se deberían hacer estudios bajo condiciones de invernadero para observar el comportamiento que tienen estos microorganismos al realizar fertilizaciones orgánicas vs fertilizaciones químicas.

Es importante realizar estudios con consorcios bacterianos que sean promotoras de crecimiento, ya que en muchos estudios se ha visto que los consorcios bacterianos producen mejores efectos que un solo tipo de bacteria.

Debido a que cada microorganismo se comporta de diversas formas en función de las condiciones ambientales, se debería realizar ensayos en campo para evaluar el comportamiento de estos microorganismos.

Como perspectivas futuras de investigación se debería estudiar la capacidad que tiene *Pseudomona* como agente de control biológico.

CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA

- Abreu, M., & Ferreira, C. (2010). Biofertilizante mixto a base de bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fósforo. Recuperado el septiembre de 17 de 2013, de http://www.sian.inia.gob.ve/repositorio/congresos/CVCS19/propiedades_procesos/PPS38.pdf
- Altamirano, M., & Pozzo, M. (2000). Aislamiento e identificación de bacterias hidrocarburolicias provenientes de un suelo sometido a biorremediación. Recuperado el 2 de abril de 2014, de XXVII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental: <http://www.cepis.org.pe/bvsaidis/resisoli/iii-131.pdf>.
- Arai, Y., & Sparks, D. (2007). Phosphate reaction dynamics in soils and soil components: a multiscale approach. *Agron* , 94, 135-179.
- Bais, H., Weir, T., Perry, L. S., & Vivanco, J. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interaction with plants and other organisms. *Plant Biology* , 57, 233-266.
- Bashan, L., Holguin, G., Glick, B., & Bashan, Y. (2007). Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propositos agricolas y ambientales. En R. Ferrera, & A. Alarcon (Edits.), *Microbiologia agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biologico, planta-microorganismo*. (págs. 170-224). Mexico: Trillas.
- Benitez, M., Tustal, F., Rotenberg, D., Kleinhenz, M., Cardina, J., Stinner, D., y otros. (2007). Multiple statistical approaches of community fingerprint data reveal bacterial populations associated with general disease suppression arising from the application of different organic field management strategies. *Soil Biology & Biochemistry* , 39 (9), 2289-2301.
- Berge, O., Heulin, T., Balandreau, J. (1991). Diversity of diazotroph populations in the rhizosphere of maize (*Zea mays*) growing on different French soil. *Biol.Fertil.Soils*. 11. 210-215.
- BioTek® Instruments, Inc. (2012). Gen5™ Getting Started Guide Microplate Data Collection and Analysis Software. USA.

- Bobadilla, C., & Rincón, S. (2008). Aislamiento y evaluación de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza. Recuperado el 7 de octubre de 2013, de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis130.pdf>
- Britanialab. TSI, Glucosa nitrato agar. Recuperado el 08 de agosto de 2013, de <http://www.britanialab.com.ar>
- Capelle. (2011). Fertilización fosfatada de trigo. Pontificia Universidad Católica Argentina. Recuperado el 2 de septiembre de 2013, de <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/fertilizacion-fosfatada-trigo-juan-capelle.pdf>
- Carrera, A. (2012). Caracterización bioquímica, molecular y funcional del banco de cepas de *Azospirillum spp.* del Iniap aisladas de la rizósfera del cultivo de maíz (zea mays l.) de la sierra ecuatoriana. 135 pp.
- Cepeda, M. (2008). Prueba a nivel de invernadero y determinación de la sobrevivencia de un biofertilizante producido a partir de bacterias solubilizadoras de fósforo utilizando un medio de cultivo alternativo. Recuperado el 19 de septiembre de 2013, de <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/973/T-ESPE-020341.pdf?sequence=1>
- Coyne, M., & Rasskin, M. (2000). Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. Paraninfo, Editorial S. A.
- Cronquist, A. (1981). An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Recuperado el 29 de Octubre de 2013, de Columbia University: http://www.conabio.gob.mx/informacion/catalogo_autoridades/plantas/112007/Cronquist/Cronquist.pdf
- Duchicela, J., Schultz, P., Kaonongbua, W., Middleton, E., & Bever, J. (2012). Non-native plants and soil microbes: potential contributors to the consistent reduction in soil aggregate stability caused by the disturbance of North American grasslands. *New Phytologist*, 196(1), 212-222.
- Duchicela, J., Sullivan, T. S., Bontti, E., & Bever, J. D. (2013). Soil aggregate stability increase is strongly related to fungal community succession along an

- abandoned agricultural field chronosequence in the Bolivian Altiplano. *Journal of Applied Ecology* .
- Echeverría, E. (2012). Efecto de la interacción de hongos micorrícicos arbusculares y *Pseudomonas fluorescens* sobre el desarrollo y nutrición de plantulas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) durante las primeras fases de crecimiento.
- ESPAC. (2013). Visualizador de estadísticas agropecuarias del Ecuador ESPAC. Recuperado el 24 de agosto de 2014, de http://www.inec.gob.ec/estadisticas/?option=com_content&view=article&id=103&Itemid=75
- Espinoza, J. (2008). Suelos Volcánicos, Dinámica del Fósforo y Producción de Papa. Recuperado el 20 de julio de 2014, de <http://cipotato.org/region-quito/congresos/ii-congreso-ecuatoriano-de-la-papa/presentaciones/jespinoza.pdf>
- Esquivel, R., Gavilanes, M., Cruz, R., Huante, P. (2013). Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias, una revisión. *Rev. Fitotec. Mex*, 36 (3): 251 – 258.
- Faggioli, V., Cazorla, C., Vigna, A., & Berti, M. (2007). Fertilizantes biológicos en maíz. Ensayo de inoculación con cepas de *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens*. Recuperado el 10 de marzo de 2013, de http://www.ckc.com.ar/eng/images/biblioteca/ensayos_04.pdf.
- Fankem, H, Nwaga, D, Deubel, A, Dieng, L, Merbach, W, Etoa, F. (2006). Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rizosphere in Cameroon. *African Journal of Biotechnology*, 5 (24): 2450-2460
- Fernández, L., Rojas, N., Roldán, T., Ramírez, M., Zegarra, H., Uribe, R., y otros. (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. Recuperado el 30 de agosto de 2013, de <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/download/509.pdf>
- Fgaier, H., & Eberl, H. (2010). A competition model between *Pseudomonas fluorescens* and pathogens via iron chelation. *Theoret. Biol.* , 263, 566-578.

- Figuroa, P, García, S. (2012) Selección y evaluación de microorganismos solubilizadores de fosfatos en suelos calcáreos del valle del Mantaro. Ciencias en Suelos. Universidad Nacional Agraria La Molina. 114 p.
- Gamazo, C. López -Goñi, I. Díaz, R. (2005). Manual práctico de Microbiología. 3ra. Editorial Masson S.A. Barcelona-España. p. 47-52.
- González, G. (2008). Promotores de crecimiento: un modo eficiente para optimizar los recursos en la producción de maíz. Argentina. . Recuperado el 11 de marzo de 2013, de <http://www.agrositio.com/vertext/vertext.asp?id=91299&se=1000>
- González, A. (2010). Estudio comparativo de propiedades químicas, microflora y Citrange Troyer (*Poncirus trifoliata* x *C. sinensis*) estimulado con fertilización en invernadero y vivero. Recuperado el 03 de agosto de 2014, de Colegio de Postgraduados: http://www.biblio.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/10521/301/Gonzalez_Mancil
- 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.
- Guzman, E. (2011). Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fósforo a partir de cuatro suelos de la provincia de Chimborazo. Recuperado el 03 de agosto de 2013. de: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1827/1/13T0728%20ESTE%20BAN%20GUAZM%C3%81N.pdf>
- Hernández, A., Caballero, A., Pazos, M., Ramírez, R., & Heydrich, M. (2003). Identificación de algunos géneros microbianos asociados al cultivo de maíz (*Zea Mays* L.) en diferentes suelos de Cuba. . *Revista colombiana de Biotecnología*, 45-55.
- Hernández, A., Heydrich, M., Velásquez, M., & lauzardo, A. (2006). Perspectivas del empleo de rizobacterias como agentes de control biológico en cultivos de importancia económica. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24 (001), 42-49.

- Hyland, C., Ketterings, Q., Dewing, D., Stockin, K., Czymmek, K., Albrecht, G., y otros. (2005). Phosphorus Basics – The Phosphorus Cycle. Recuperado el 30 de Octubre de 2013, de Agronomy Fact Sheet Series.: <http://nmsp.cals.cornell.edu/publications/factsheets/factsheet12.pdf>
- Höfte, M., Altier, N. (2010). Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. *Research in Microbiology*, 61: 464 – 471
- Holguin, G., Bashan, Y., Puente, E., Carrillo, A., Bethlenfalvay, G., Rojas, A., Vázquez, P., Toledo, T., Bacilio, M., Glick, B., González, L., Lebsky, V., Moreno, M., Hernández, J. (2003). Promoción del crecimiento en plantas por bacterias de la rizófora. *Agricultura Técnica en México*, 29 (2): 201- 211.
- Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J. y Williams, S. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Novena edición. Williams & Wilkins. Baltimore, USA. 39- 56.
- INIAP. (2007). Manejo de Nutrientes por sitio específico con Labranza de Conservación en el Cultivo de Maíz. Informe Anual, Quito.
- Islama, T., Deoraa, A., Hashidokoa, Y., Rahmana, A., Itoa, T., & Taharaa, S. (2006). Isolation and Identification of Potential Phosphate Solubilizing Bacteria from the Rhizoplane of *Oryza sativa* L. cv. BR29 of Bangladesh. *Z. Naturforsch* , 103-110.
- Jean, F., & Faddin, M. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. (E. M. S.A., Trad.) Buenos Aires, Argentina.
- Jordán, A. (2005). Manual de Edafología. Recuperado el 30 de Octubre de 2013, de <http://libnet.unse.edu.ar/1bi/ba/cefaya/cdig/000005.pdf>
- Kucey, R. (1983). Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and Virgin Alberta soils. *Soil Sci.* 63:671-67p.
- Lara, C, Sanes, S, Oviedo, L. (2013). Impacto de bacterias nativas solubilizadoras de fosfato en el crecimiento y desarrollo de plantas de rábano (*Raphanus sativus* L.) *Biotechnología Aplicada*, 30(4): 271-275 p
- Lei, X., & Porres, J. (2003). Phytase enzymology, applications and biotechnology. *Biotech. Letters*, 25, 1787–1794.

- Lozano, P; Rivero, C; Bravo, C; Hernández, R Fracciones de la materia organica del suelo bajo sistemas de siembra directa y cultivos de cobertura. (2011). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 28: 35-56
- Marques, A., Pire, C., Moreira, H., Rangel, A., & Castro, P. (2010). Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. *Soil Biology & Biochemistry* , 42, 1229-1235
- Martinez, T., & Johnson, N. (2010). Agricultural management influences propagule densities and functioning of arbuscular mycorrhizas in low- and high-input agroecosystems in arid environments. *Applied Soil Ecology* , 46, 300-306.
- Meera, T., & Balabaskar, P. (2012). Isolation and characterization of *Pseudomonas fluorescens* from rice fields. . *Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences* , 2 (1), 113-120.
- Mikanova, O., Novakova, J. (2002). Evaluation of the P-solubilizing activity of soil microorganisms and its sensitivity to soluble phosphate. *Rostlinná výroba*, 48: 397-400.
- Mingxiang, X, Yunge, Z, Guobin, L, Wilson, G. (2006). Identification of soil quality factors and indicators for the loess plateau of China. *Soil Science*, 171 (5): 400–413
- Ministerio del Ambiente. (2013). Beneficios del Manejo Sostenible de la Tierra. Quito, Ecuador.
- Morillo, E., & Miño, G. (2009). Protocolos de Marcadores Moleculares (compilación). .Departamento Nacional de Biotecnología del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).
- Naik, P., Sahoo, N., Goswami, D., Ayyadurai, N., Sakthivel, N. (2008). Genetic and functional diversity among fluorescent pseudomonads isolated from the rhizosphere of banana. *Microbial Ecol*, Nautiyal, C. S. and Dion, P. Springer-Verlag, Berlin.
- Navarro, G. (2003). Química agrícola: el suelo y los elementos químicos esenciales para la vida. Madrid: Ediciones Mundi Prensa.
- Niklitschek, M. (2008). Evaluación del rendimiento del trigo (*triticum aestivum*), inoculado con bacterias solubilizadoras de fósforo y una cepa fijadora de Nitrogeno, aisladas de la rizósfera de especies arbustivas. Recuperado el 6 de

- abril de 2013, de Universidad Austral de Chile:
<http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2008/fan692e/doc/fan692e.pdf>
- Nogales, B. (2005). La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. . *Revista Científica y Técnica de Ecología y medio ambiente: Ecosistemas* , 14 (2), 41-51.
- Paredes, M. (2010). Aislamiento y caracterización bioquímica de metabolitos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato. Recuperado el 7 de marzo de 2013, de <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/573/57316076007.pdf>.
- Parra, J., Ramírez, R., Lobo, D., Subero, N., & Sequera, O. (2011). Respuesta del maíz (*Zea mays* L.) en la etapa temprana a las formas de aplicación de fósforo. *Rev. Fac. Agron* , 37 (2), 86-92.
- Parra, R. (28 de Abril de 2014). Fertilización química para Maíz. (A. Pincay, Entrevistador)
- Pérez, C., Huidobro, J., Conforto, C., Arzeno, A., March, G., Meriles, J., y otros. (2010). efecto de la rotación de cultivos sobre la diversidad de las comunidades microbianas del suelo cuantificada mediante PCR-TRFLP. Recuperado el julio de 31 de 2014, de INTA: http://inta.gob.ar/documentos/efecto-de-la-rotacion-de-cultivos-sobre-la-diversidad-de-las-comunidades-microbianas-del-suelo-cuantificada-mediante-pcr-trflp/at_multi_download/file/INTA-EnsayoSaltaRotacion.pdf.
- Person, M. (1990). Manuales para educación Agropecuaria. Producción Vegetal N.-10. México, DF.: Trillas.
- Piñeiro, G. (2006). Biogeoquímica del carbono y nitrógeno en los pastizales pastoreados del Río de la Plata: Un análisis basado en modelos de simulación, sensores remotos y experimentos a campo. Recuperado el 18 de julio de 2014, de http://www.agro.uba.ar/users/pineiro/Articulos/Tesis_PhD_pineiro_doble%20faz.pdf
- Prescott, L., Harley, J., & Klein, D. (2004). Microbiología. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.

- Rocha, P. (2002). Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite. *Palmas* , 23, 9-17.
- Rodas, A. (2006). La Agricultura y microorganismos. *Revista electrónica Engormix* , 13-27.
- Rodicio, M. y Mendoza, M. (2004). Identificación Bacteriana mediante secuenciación del ARNr16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en Microbiología Clínica. Departamento de Biología Funcional. Área de Microbiología. Universidad de Oviedo. España. Cap. 11.7.
- Rodríguez, H.; Fraga, R.; Gonzalez, T. and Bashan, Y. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth - promoting bacteria. *Plant Soil*, 56(3): 492- 504
- Rosas, S., Vanzini, G., Carlier, E., Pasluosta, C., Pastor, N., & Rovera, M. (2009). Root colonization and growth promotion of wheat and maize by *Pseudomonas aurantiaca* SR1. *Soil Biology & Biochemistry* , 41, 1802-1806.
- Rubio, E. (2003). Caracterización molecular y funcional de bacterias del género *Azotobacter* aisladas de suelos de la República Argentina. El rol de las auxinas en la respuesta a la inoculación de trigo. Recuperado el 20 de marzo de 2013, de <http://ri.agro.uba.ar/files/download/tesis/maestria/2011rubioestebanjulian.pdf>
- Sánchez, J. (2009). Evaluación Técnica- Económicas para la producción de una bebida a partir de Morocho Blanco (*Zea mays* variedad morochón) y leche. 187.
- Santillana, N. (2006). Producción de biofertilizantes utilizando *Pseudomonas sp.* *Ecología Aplicada* , 5, 87-91.
- Sanzano, A. (2008). El fósforo del suelo. Universidad de Alicante. Recuperado el 30 de octubre de 2013, de <http://www.edafo.com.ar/Descargas/Cartillas/Fosforo%20del%20Suelo.pdf>
- Sims, J., & Vadas, P. (2005). Phosphorus in soils. . En J. Hatfield, K. Scow, D. Powelson, M. Singer, C. Rosenzweig, & D. Sparks (Ed.), *Encyclopedia of soils in the environment*, 3, 202-210.
- Suquilanda, M. (2008). Deterioro de los suelos en el Ecuador y la producción agrícola. Recuperado el 21 de julio de 2014, de XI Congreso Ecuatoriano de la Ciencia

del Suelo
[:http://www.secsuelo.org/XICongreso/Simposios/Conservacion/Documento/Ponencias/3.%20Ing.%20Manuel%20Suquilanda.%20Suelos.pdf](http://www.secsuelo.org/XICongreso/Simposios/Conservacion/Documento/Ponencias/3.%20Ing.%20Manuel%20Suquilanda.%20Suelos.pdf)

- Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology*. 5th (Quinta ed.). Sinauer Associates.
- Torres, A. (2009). Ciclo del fósforo en agroecosistemas y reacción de los fertilizantes fosfatados en el suelo. Recuperado el 21 de agosto de 2013, de <http://www.madrimasd.org/blogs/universo/2009/05/13/118178>
- Turner, B. L., Frossard, E., & Oberson, A. (2006). Enhancing Phosphorus Availability in Low-Fertility Soils. In: *Biological Approaches to Sustainable Soil Systems*. Taylor & Francis Group, LLC.
- Ulloa, L. (2011). Efecto biocontrolador de *Pseudomonas fluorescens* sobre dos especies de hongos fitopatógenos del género *Fusarium sp.* Recuperado el 03 de agosto de 2013, de http://bibliodigital.itcr.ac.cr/xmlui/bitstream/handle/2238/2908/Informe_final.pdf?sequence=1
- Vyas, P, Gulati, A. (2009) Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing *fluorescent Pseudomonas*. *BMC Microbiology* 9: 174
- Wang, Y., & Quian, P. (2009). Conservative Fragments in Bacterial 16s rRNA Genes and primer dising for 16S DNA Amplicons un Metagenomic Studies. *PloS ONE*, 1-9.
- Weising, K., Nybom, K., Wolff, K., & Meyer, W. (1995). ADN fingerprinting in plants and fungi. USA, Modifiacion de Francisco Jarrin, Centro Internacional de la Papa.
- Yáñez, C., Zambrano, J., & Caicedo, M. (2013). *Guía de Producción de Maíz para pequeños agricultores y agricultoras*. Quito, Ecuador.