

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

Ana Pincay¹

¹Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Universidad de la Fuerzas Armadas- Espe

RESUMEN

En este trabajo 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 bioquímicamente y molecularmente 24 aislamientos; con los que se realizaron pruebas para evaluar su capacidad de solubilizar fósforo en condiciones *in vitro* y en invernadero. De las cepas aisladas; 21 pertenecen al género *Pseudomonas* y 3 fueron *Acinetobacter*. En la evaluación *in vitro* la cepa al3 (*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, nC2, al2, al6, nI3, nI5, nP2, aB1, aB5, nB1, nB2 y aC2 mostrando valores mayores en cuanto a longitud de raíz, % de materia seca, área foliar, y acumulación de P en los tejidos, con respecto al tratamiento testigo. 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

In this investigation we isolate *Pseudomonas* sp 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* and greenhouse conditions. All the cultural, biochemical and molecular studies confirmed than 21 isolate were *Pseudomonas* sp and 3 were *Acinetobacter* sp. The evaluation *in vitro* showed than al3 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, nC2, al2, al6, nI3, nI5, nP2, aB1, aB5, nB1, nB2 and aC2 showing higher results as far as root length, dry matter, leaf area, and P accumulation in tissues, opposite to the absolute. 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

INTRODUCCIÓN

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). El incremento de la producción de esta gramínea está estrechamente relacionado con la fertilización.

Después del nitrógeno; el fósforo constituye uno de los elementos más importantes en las primeras etapas del desarrollo normal de las plantas (Faggioli et al., 2007).

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.

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, lo cual conlleva a un aumento en los costos de producción (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 fosfatasa ácida o alcalina (Paredes, 2010) *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. Pero aunque estos microorganismos 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 las rizósferas de los cultivos, es por ello que para obtener una alta solubilización de P, es necesario inocularlas en una alta concentración bacteriana.

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.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

El muestreo se realizó en los ensayos experimentales del Programa de Maíz del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias ubicados en: Hacienda Tunibamba provincia de Imbabura (0°19'08" latitud norte y 78°15'35" longitud Oeste), Universidad de Bolívar provincia de Bolívar (01°36'52" latitud sur y 78°59'54" longitud Oeste), Guntuz provincia de Chimborazo (1°40'41.5" latitud sur y 78°34'24.3" longitud Oeste) y Pichincha - Sección Oriental- INIAP (0°22'09" latitud sur y 78°31'06" longitud Oeste) 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. 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 de la Estación Experimental Santa Catalina (EESC)

Análisis químico y microbiológico de las muestras de suelo

Se realizó el análisis de nutrientes en el Departamento de Manejo de Suelos y Aguas (DMSA) de la EESC. Se determinó el número de unidades formadoras de colonia (UFC) que crecieron en el agar King B, y el porcentaje de bacterias solubilizadoras de fósforo (BSP) utilizando el medio Pikovskaya (Pvk)

Aislamiento de *Pseudomonas sp.*

Se pesaron 20g de suelo de cada sitio y se colocaron en 180ml 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 9ml de agua destilada estéril, de los

cuales con espátula de Digrafski se sembró 100µl de solución en agar King B. Las cajas petri fueron incubadas a 30°C por un periodo de 48 horas. La selección de las cepas *Pseudomonas* se realizó observando la fluorescencia bajo luz UV.

Caracterización de *Pseudomonas* sp.

Se realizó la descripción morfológica de colonias, en base a los criterios morfológicos descritos por Prescott *et al.* (2004). Se utilizaron pruebas de galería corta (catalasa, oxidasa, TSI, citrato, hidrólisis de la gelatina, nitrato, ureasa, prueba de motilidad) y pruebas API20E (BioMerieux, St Louis, MO, USA). Para el análisis molecular se realizó la extracción de ADN 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). Para la secuenciación del gen 16Sr se utilizaron los primers 27F;1525R y E338F;E969R (Wang y Quian 2009). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias de la subunidad 16Sr presentes en el Gene Bank (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Evaluación de la Solubilización de fosfatos *in vitro*

Se preparó una suspensión bacteriana en caldo nutritivo de cada cepa aislada. Se sembraron 10 µL de cada cultivo (concentración 1x10⁸) en medio Pvk por triplicado. Se incubaron las placas durante 14 días a 30°C hasta observar la aparición de un halo claro alrededor de las colonias. Para la determinación del índice de solubilización (IS) se aplicó la siguiente fórmula (Niklitschek, 2008):

$$IS = \frac{Dc(mm) + Dh(mm)}{Dc(mm)} \quad [1]$$

Dónde: *Dc*: diámetro de la colonia, *Dh*: diámetro del halo (Niklitschek, 2008)

Evaluación funcional en invernadero de las cepas bacterianas

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), con 24 tratamientos (24 cepas bacterianas aisladas) y 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. Se utilizó como sustrato una mezcla de turba y suelo (1:3), 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 (con fines de fertilización) como finales. El sustrato fue fertilizado con 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)

Se utilizaron semillas de maíz, variedad INIAP-101, sin tratamiento químico, las cuales se desinfectaron superficialmente con alcohol al 96% y una solución de hipoclorito de sodio con ácido clorhídrico. Posteriormente se hicieron germinar estas semillas y se sumergieron durante 45 minutos en 150 ml de inóculo a concentración de 10⁸ UFC, en constante agitación, luego de este tiempo se procedió a sembrar una semilla por maceta (Rubio 2003).

El ensayo tuvo una duración de ocho semanas, las variables evaluadas fueron: altura de planta, longitud de raíz, % de materia seca, área foliar y contenido de fósforo en tejido foliar

Análisis de datos

Los datos registrados se analizaron mediante el software estadístico InfoStat/Estudiantil versión 2.0.

Resultados y discusión

Análisis químico y microbiológico de las muestras de suelo

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 (Tabla 1) similar a los resultados obtenidos por Lozano *et al.* (2011), y Mingxiang *et al.* (2006). 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, lo cual conlleva a un efecto residual y acumulativo de este elemento (Espinoza, 2008).

Tabla1: 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 el conteo de UFC 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 2.82×10^6 UFC/g suelo y el coeficiente de variación fue de 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, 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. Esto puede deberse a que el suelo agrícola de Pichincha ha sido sometido 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)

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)

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.

Además 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).

El análisis de varianza del porcentaje de BSP, establece diferencias significativas para las fuentes de variación de provincias y la interacción provincias por uso de 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.

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.

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 ésta capacidad de solubilización, lo que se conoce como el efecto Feedback.

Aislamiento y caracterización de *Pseudomonas* sp.

Todas las cepas aisladas, fueron identificadas como bacilos Gram (-), mediante tinción Gram. De las 21 cepas aisladas como posibles *Pseudomonas*, por pruebas de galería corta y pruebas API 20 E, 19 fueron identificadas como *Pseudomonas* sp y 3 fueron *Acinetobacter* sp. (Tabla 2). De estas cepas se obtuvieron productos de amplificación de 1500 pb del gen que codifica para la subunidad 16S del ADNr (Figura 1), los cuales fueron secuenciados. En la Tabla 2 se muestra la concordancia de identificación entre ambos métodos.

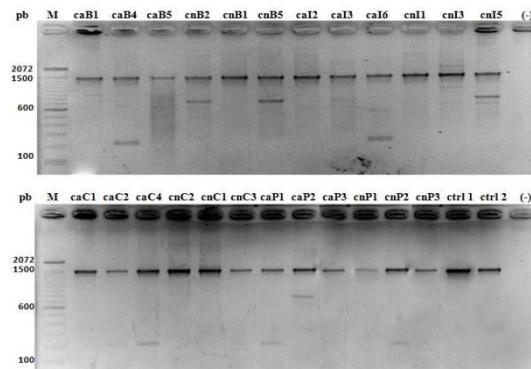


Figura 1: Amplificación del gen 16Sr con los primers 27F-1525R en las 26 muestras bacterianas.

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).

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).

Tabla 2: Identificación de bacilos Gran negativos con pruebas API 20E y secuenciación del gen 16Sr

Cepa	Pruebas de galería corta	Pruebas API 20E	% de identidad	Secuenciación gen 16S de ADNr	% de cobertura
aB1	<i>Pseudomona</i>	<i>P.putida</i>	99	<i>P.putida</i> ABAC61	100
aB4	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	90	<i>Pseudomona</i> sp WTPout_69	100
aB5	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	92	<i>Pseudomona</i> sp JPPB B25	100
nB1	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	92	<i>Pseudomona</i> sp EAPE	100
nB2	<i>Pseudomona</i>	<i>P.putida</i>	94	<i>Pseudomona</i> sp StFRB166	99
nB5	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	88	<i>P. putida</i> ABAC61	100
caC1	<i>Acinetobacter</i>	<i>A. calcoaceticus</i>	97	<i>Acinetobacter</i> sp. IB-5.1/1	99
caC2	<i>Pseudomona</i>	<i>P.putida</i>	88	<i>P.fluorescens</i> CPB Pse	100
caC4	<i>Acinetobacter</i>	<i>A. calcoaceticus</i>	97	<i>Acinetobacter</i> sp I-4-9	99
cnC1	<i>Acinetobacter</i>	<i>A. calcoaceticus</i>	99	<i>A. calcoaceticus</i> LAM21	100
cnC2	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	99	<i>P.fluorescens</i>	100
cnC3	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	92	<i>Pseudomonasp.</i> M	100
cal2	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	98	<i>P.fluorescens</i> PE16	100
cal3	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	99	<i>P.fluorescens</i> PE8	99
cal6	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	95	<i>Pseudomona</i> sp. AU	99
cnI1	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	96	<i>Pseudomona</i> sp. AceT-1	99
cnI3	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	95	<i>Pseudomona</i> sp. TA_AB3	99
cnI5	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens/putida</i>	83	<i>P.putida</i> CEN7	99
caP1	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	97	<i>P.fluorescens</i> PE8	100
caP2	<i>Pseudomona</i>	<i>P.aeruginosa</i>	83	<i>P.fluorescens</i> BND79A	99
caP3	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	86	<i>P. palleroniana</i> TCA16 16S	93
cnP1	<i>Pseudomona</i>	<i>P.fluorescens</i>	91	<i>Pseudomona</i> sp A106	100
cnP2	<i>Pseudomona</i>	<i>P.putida</i>	93	<i>Pseudomona</i> sp PN49.1	100
cnP3	<i>Pseudomona</i>	<i>P.aeruginosa</i>	82	<i>P.fluorescens</i> SU:MS1-1	100

Evaluación funcional en invernadero de las cepas bacterianas

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.

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 si 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. 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. 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.

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 (a16), 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 a12, a16, n13, n15, 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.

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). 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).

Tabla 3. 1: 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				Análisis foliar	
		longitud de raíz	% Materia seca	% Humedad	Área Foliar	% P	P2O5(mg/planta)
T1	cal2: Imbabura SA, <i>Pseudomona sp</i>	51.8 ABC	12.33 A	87.67 A	200.67 A	0.22	27.05
T2	cal3: Imbabura SA, <i>P. fluorescens</i>	58.4 A	11.93 ABC	88.07 ABC	169.26 AB	0.16	11.61
T3	cal6: Imbabura SA, <i>Pseudomona sp</i>	43.0 BCDEF	11.03 ABCDEFG	88.97 ABCDEFG	219.52 A	0.16	20.03
T4	cn11: Imbabura SN, <i>Pseudomona sp</i>	49.8 ABCDE	9.22 GH	90.78 GH	197.81 A	0.15	15.70
T5	cn13: Imbabura SN, <i>P. fluorescens</i>	48.2 ABCDE	11.36 ABCDEF	88.64 ABCDEF	187.99 A	0.20	18.79
T6	cn15: Imbabura SN, <i>P. fluorescens</i>	42.6 BCDEF	12.24 AB	87.76 AB	177.51 A	0.19	17.50
T7	caP1: Pichincha SA, <i>P. fluorescens</i>	27.8 F	8.71 H	91.29 H	79.87 BC	0.13	2.39
T8	caP2: Pichincha SA, <i>Pseudomona sp</i>	50 ABCD	9.88 CDEFGH	90.12 CDEFGH	199.54 A	0.17	14.47
T10	cnP1: Pichincha SN, <i>Pseudomona sp</i>	52.6 ABC	8.83 H	91.17 H	169.74 AB	0.14	10.17
T11	cnP2: Pichincha SN, <i>P. putida</i>	46.2 ABCDE	11.35 ABCDEF	88.65 ABCDEF	209.07 A	0.17	17.38
T12	cnP3: Pichincha SN, <i>P. fluorescens</i>	45.6 ABCDE	9.52 FGH	90.48 FGH	158.72ABC	0.16	10.82
T13	caB1: Bolívar SA, <i>P. putida</i>	59.8 A	11.19 ABCDEF	88.81ABCDEF	189.06 A	0.18	20.45
T14	caB4: Bolívar SA, <i>Pseudomona sp</i>	48.2 ABCDE	10.39 BCDEFGH	89.61 BCDEFGH	137.0 ABC	0.16	5.91
T15	caB5: Bolívar SA, <i>Pseudomona sp</i>	57 A	9.73 DEFGH	90.27 DEFGH	187.55 A	0.20	15.00
T16	cnB1: Bolívar SN, <i>P. fluorescens</i>	50.8 ABCD	11.55 ABCD	88.45 ABCD	152.3 ABC	0.19	15.83
T17	cnB2: Bolívar SN, <i>Pseudomona sp</i>	38.4 BCDEF	9.81 DEFGH	90.19 DEFGH	189.05 A	0.17	19.47
T18	cnB5: Bolívar SN, <i>P. putida</i>	37.8 CDEF	9.27 GH	90.73 GH	134.76 ABC	0.13	5.58
T19	caC1: Chimborazo SA, <i>Acinetobacter sp</i>	51.8 ABC	9.54 EFGH	90.46 EFGH	148.13 ABC	0.15	8.68
T20	caC2: Chimborazo SA, <i>Pseudomona sp</i>	43.8 BCDEF	12.63 A	87.37 A	224.48 A	0.18	19.88
T21	caC4: Chimborazo SA, <i>Acinetobacter sp</i>	46.2 ABCDE	11.39 ABCDE	88.61 ABCDE	170.32 AB	0.14	8.84
T22	cnC1: Chimborazo SN, <i>A. calcoaceticus</i>	53.8 ABC	11.68 ABC	88.32 ABC	218.58 A	0.26	35.68
T23	cnC2: Chimborazo SN, <i>P. fluorescens</i>	55.2 AB	12.51 A	87.49 A	216.86 A	0.28	37.61
T24	cnC3: Chimborazo SN, <i>Pseudomona sp</i>	32.67 EF	9.32 GH	90.68 GH	68.49 C	0.13	2.16
Tab	Testigo absoluto	33.8 DEF	9.24 GH	90.76 GH	165.91 ABC	0.22	8.02
Tf	Testigo fertilizado con Fósforo	50.78 ABCD	12.17 AB	87.83 AB	224.99 A	0.15	31.09

Conclusiones

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.

Las cepas al2, al3, 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 al2, al6, nl3, nl5, 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.

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 hidrocarburoclíticas provenientes de un suelo sometido a biorremediación. Recuperado el abril de 2 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. *The annual Review of Plant Biology*, 57, 233-266.

Bashan, L., Holguin, G., Glick, B., & Bashan, Y. (2007). Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. En R. Ferrera, & A. Alarcon (Edits.), *Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, 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). Aaracterización 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. V., Schultz, P. A., Kaonongbua, W., Middleton, E. L., & Bever, J. D. (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.
- ESPAEC. (2013). Visualizador de estadísticas agropecuarias del Ecuador ESPAEC. 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-ecuadoriano-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*) rhizosphere in Cameroon. *African Journal of Biotechnology*, 5 (24): pp. 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 2013 de Agosto de 30, de <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/download/509.pdf>
- Fgaier, H., & Eberl, H. (2010). A competition model between *Pseudomonas fluorescens* and pathogens viarion 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. Obtenido de <http://dspace.esoch.edu.ec/bitstream/123456789/1827/1/3T0728%20ESTEBAN%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., Czymbek, 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 – 471p
- 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 rizófera. *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 pp.
- 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.) *Biotecnología 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 orgánica 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 propagate 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>
- Para, 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.
- Para, 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%20de%20Suelo.pdf>
- Sims, J., & Vadas, P. (2005). Phosphorus in soils. En J. Hatfield, K. Scow, D. Powlson, M. Singer, C. Rosenzweig, & D. Sparks (Ed.), *Encyclopedia of soils in the environment*, 3, págs. 202-210.
- Suquilandá, 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/XI Congreso/Simposios/Conservacion/Documento/Ponencias/3.%20Ing.%20Manuel%20Suquilandá.%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 2014 de agosto de 03, 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 design 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, Modificación 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.