

# UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

REPÚBLICA DEL ECUADOR

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

INFORME DE INVESTIGACIÓN  
PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA

TEMA:

BACTERIA FIJADORA DE NITRÓGENO DEL GÉNERO  
*Gluconacetobacter spp.* COMO BIOFERTILIZANTE POTENCIAL EN  
SEMILLA SEXUAL DE CAÑA DE AZUCAR (*Saccharum officinarum*)

Autor:

BLGO. JAVIER ALEJANDRO BARRAGAN BUSTAMANTE

Director:

ALEX EDWIN GUILLEN BONILLA

*Milagro, mayo 2024*

## Derechos de autor

**Sr. Dr.**

**Fabricio Guevara Viejó**

Rector de la Universidad Estatal de MilagroPresente.

Yo, **Javier Alejandro Barragán Bustamante**, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedo los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de mi Grado, de **Magíster en Biotecnología**, como aporte a la Línea de Investigación Desarrollo Productivo de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedo a favor de la Universidad Estatal de Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizo a la Universidad Estatal de Milagro para que realice la digitalización y publicación de este Informe de Investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su forma de expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.

Milagro, 27 de mayo de 2024



Firmado electrónicamente por:  
JAVIER ALEJANDRO  
BARRAGAN BUSTAMANTE

---

**Javier Alejandro Barragán Bustamante**

**C.C.: 1203553605**

## Aprobación del director del Trabajo e Titulación

Yo, ALEX EDWIN GUILLEN BONILLA en mi calidad de director el trabajo de titulación, elaborado por el Blgo. **Javier Alejandro Barragán Bustamante**, cuyo tema es BACTERIA FIJADORA DE NITRÓGENO DEL GÉNERO *Gluconacetobacter spp.* COMO BIOFERTILIZANTE POTENCIAL EN SEMILLA SEXUAL DE CAÑA DE AZUCAR (*Saccharum officinarum*), que aporta a la Línea de Investigación Desarrollo Productivo, previo a la obtención del GradoMagister en Biotecnología, Trabajo de titulación que consiste en una propuesta innovadora que contiene, como mínimo, una investigación exploratoria y diagnóstica, base conceptual, conclusiones y fuentes de consulta, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos necesarios para ser sometido a la evaluación por parte del tribunal calificador que se designe, por lo que lo **APRUEBO**, a fin de que el trabajo sea habilitado para continuar con el proceso de titulación de la alternativa de Informede Investigación de la Universidad Estatal de Milagro.

Milagro, 27 de mayo 2024



firmado electrónicamente por:  
ALEX EDWIN GUILLEN  
BONILLA

---

**Alex Edwin Guillen Bonilla**

**C.C.: 0910330182**

**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**  
**DIRECCIÓN DE POSGRADO**  
**CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA**

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **BIOL. BARRAGAN BUSTAMANTE JAVIER ALEJANDRO**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "BACTERIA FIJADORA DE NITRÓGENO DEL GÉNERO GLUCONACETOBACTER SPP. COMO BIOFERTILIZANTE POTENCIAL EN SEMILLA SEXUAL DE CAÑA DE AZÚCAR (SACCHARUM OFFICINARUM)", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	57.00
SUSTENTACIÓN	38.83
PROMEDIO	95.83
EQUIVALENTE	Muy Bueno



Mgs. **BARZALLO GRANIZO DIEGO GEOVANNY**  
**PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL**



Msc **GARCÉS MONCAYO MARÍA FERNANDA**  
**VOCAL**



Ph.D. **VALENZUELA COBOS JUAN DIEGO**  
**SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL**

## **DEDICATORIA**

Este trabajo está dedicado a mi familia y en especial a mi esposa Mayra Sofia Valdez Almeida, por ser el apoyo incondicional en todo momento, por su comprensión en mi ausencia por trabajo, por la motivación a seguir adelante, a incentivar me en continuar en los momentos difíciles y en su deseo por verme cumplir este reto académico.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por haberme dado sabiduría y fortaleza para continuar con mis estudios y la oportunidad de alcanzar este logro académico que ahora se está cumpliendo

El agradecimiento infinito a mi familia, quienes me han brindado el apoyo emocional durante mis procesos de estudios.

Expreso mi agradecimiento a mi tutor de tesis al Ing. Alex Edwin Guillen Bonilla M.Sc. por ser el guía que ha brindado su dedicación durante este proceso de titulación.

Al personal de Investigación, jefes de áreas, personal operativo del Centro de Investigaciones de la Caña de Azúcar del Ecuador (CINCAE), dirigido por el Ing. Edison Gaston Silva Cifuentes Ph.D., quien me brindo la oportunidad y direccionamiento técnico dentro del centro de investigación y expresar mi mas sincero agradecimiento a los docentes, amigo Gustavo Saúl Escobar Valdiviezo y todos aquellos que han contribuido de manera significativa a la realización de este proyecto.

## Resumen

En el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L) se utilizan cantidades elevadas de fertilizantes químicos como la urea que aporta Nitrógeno (N) esencial para el desarrollo del cultivo, la aplicación excesiva conlleva un alto costo y el exceso de su uso provocaría contaminaciones ambientales; por ende, el papel de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) en plantas permite que la agricultura sea más productiva y sostenible sin dañar el medio ambiente (Loredo-Osti. et al 2016).

El objetivo de esta investigación ha sido el aislamiento de cepas nativas de bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Gluconacetobacter spp.* provenientes de seis variedades comerciales de caña de azúcar y suelo rizosférico en el lote: **1060604** del ingenio San Carlos – Laboratorio de Fitopatología en el Centro de Investigación de la caña de azúcar del Ecuador (CINCAE).

Como resultado se obtuvieron 19 UFC gram negativas a partir de diferentes partes de la planta; tallo, raíz, hoja y suelo rizosférico con los que se crearon diferentes tratamientos (gt1, gr1, gs1, gt2, gr2, gs2, gt7, gr7, gs7, gt8, gr8, gs8, gt9, gr9, gs9, gh9, gt85, gr85-90, gs85-90) los fueron consideradas como cepas de interés del género *Gluconacetobacter spp.* mediante la caracterización bioquímica y caracterización molecular del gen **ADNr 16 S** previamente amplificado por la técnica de PCR.

Los resultados del ensayo de inoculación en las plantas originadas desde semilla sexual de 1 mes de edad se dieron por combinaciones de 2 cepas (T1, T2, T3, T4, T6), 3 cepas (T5) y 6 cepas (T7); las que demostraron la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico y convertirlo en nutrientes que fueron asimilados por las plantas; con el objetivo principal de reducir el uso de urea mediante la aplicación de bacterias con características nitrificantes del género *Gluconacetobacter diazotrophicus*, las que fueron aisladas desde un lote de caña de azúcar y suelo rizosférico mostrando la factibilidad de su obtención, aislamiento, replicabilidad de las cepas bacterianas y posterior uso en la agricultura mediante la inoculación en los cultivos.

Palabras Claves. - Caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L), *Gluconacetobacter spp.*, fijación biológica de nitrógeno, cepas, inoculación.

## Abstract

In the cultivation of sugar cane (*Saccharum officinarum* L), high amounts of chemical fertilizers are used, such as urea, which provides Nitrogen (N) essential for the development of the crop. Excessive application carries a high cost and excessive use would cause environmental contamination; Therefore, the role of biological nitrogen fixation (BNF) in plants allows agriculture to be more productive and sustainable without damaging the environment (Loredo-Osti. et al 2016).

The objective of this research has been the isolation of native strains of nitrogen-fixing bacteria of the genus *Gluconacetobacter* spp. coming from six commercial varieties of sugar cane and rhizospheric soil in lot: 1060604 from the San Carlos sugar mill - Phytopathology Laboratory at the Sugar Cane Research Center of Ecuador (CINCAE).

As a result, 19 gram-negative CFU were obtained from different parts of the plant; stem, root, leaf and rhizospheric soil with which different treatments were created (gt1, gr1, gs1, gt2, gr2, gs2, gt7, gr7, gs7, gt8, gr8, gs8, gt9, gr9, gs9, gh9, gt85, gr85-90, gs85-90) were considered as strains of interest of the genus *Gluconacetobacter* spp. through the biochemical characterization and molecular characterization of the 16 S rDNA gene previously amplified by the PCR technique.

The results of the inoculation test in plants originating from 1-month-old sexual seed were given by combinations of 2 strains (T1, T2, T3, T4, T6), 3 strains (T5) and 6 strains (T7); those that demonstrated the ability to fix atmospheric nitrogen and convert it into nutrients that were assimilated by plants; with the main objective of reducing the use of urea through the application of bacteria with nitrifying characteristics of the genus *Gluconacetobacter diazotrophicus*, which were isolated from a batch of sugar cane and rhizospheric soil showing the feasibility of obtaining, isolating, replicating the bacterial strains and subsequent use in agriculture through inoculation in crops.

Keywords. - Sugar cane (*Saccharum officinarum* L), *Gluconacetobacter* spp., biological nitrogen fixation, strains, inoculation



## Lista de Figuras

Figura 1. Sistema radicular de la caña de azúcar .....	9
Figura 2. Hojas e inflorescencia de la flor de la caña de azúcar .....	9
Figura 3. Componentes morfológicos que identifican el nudo y entre nudo del tallo .....	10
Figura 4. Ciclo del nitrógeno .....	12
Figura 5. Proceso del nitrógeno .....	13
Figura 6. Producción de inóculo bacteriano a gran escala .....	20
Figura 7. Mecanismo de fijación no simbiótica de nitrógeno atmosférico por <i>Azotobacter spp.</i> .....	22
Figura 8. Estructura secundaria del 16S rADN.....	23
Figura 9. Etapas para seguir en el proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S .....	25
Figura 10. El operón ribosómico (rrn) .....	26
Figura 11. Purificación de <i>Gluconacetobacter spp.</i> .....	33
Figura 12. Resultado de PCR para <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Fw / Rv .....	35
Figura 13. Resultado de PCR para 16SrRNA FC27/RC1492.....	35
Figura 14. Resultado de PCR para 16SrRNA F1114/RC1492 .....	35
Figura 15. Muestreo en caña de azúcar en el Ingenio San Carlos a) lote 1060604, b) tallo completo con sistema radicular y hojas, c) suelo rizosférico, diciembre 2023.....	49
Figura 16. Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador, CINCAE.....	45
Figura 17. Muestras de suelo rizosférico .....	45
Figura 18. Muestras de raíces .....	50
Figura 19. Muestras de tallos .....	51
Figura 20. Muestras de hojas .....	52
Figura 21. Siembra en medio semisólido LGI-P.....	53
Figura 22. Morfología de las 19 cepas purificadas en medio sólido LGI-P .....	54
Figura 23. Observación por el método de tinción de Gram en 19 cepas presuntivas para el género <i>Gluconacetobacter spp.</i> .....	55
Figura 24. Extracción de ADN genómico bacteriano con TENS .....	58
Figura 25. Secuencia ITS1 del <i>G. diazotrophicus</i> .....	54
Figura 26. Diagrama del fragmento ITS1. Obteniendo un fragmento de 218 pb con los primers <i>G. diazotrophicus</i> Fw / Rv diseñados durante este trabajo .....	59
Figura 27. Secuencia de nucleótidos acceso numérico al Genbank GQ180113 considerando la subunidad 16S del RNA ribosómico, participación de dos iniciadores forward y un iniciador rever .....	60
Figura 28. Diagrama del largo total del ADN 1520 pb a nivel del gen 16SrRNA proveniente del número de acceso del Genbank GQ180113 .....	61
Figura 29. Proceso de inoculación bacteriana de <i>Gluconacetobacter spp.</i> a) concentración bacteriana, b) medición de plantulas sanas, c) inoculación por inmersión por 1 hora, d) suelo s-F1, e) primer día de inoculación en 24 bandejas, f) 30 días de inoculación, g) invernadero de fitopatología donde se llevo a cabo el ensayo de inoculación .....	62

## Lista de Tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la caña de azúcar (Fuente: Sangucho Lema, J. L., et al 2020)	7
Tabla 2. Tipos de raíces que conforman el sistema radicular en la caña de azúcar	8
Tabla 3. Reporte de bacterias endófitas y procedencia (Fuente: Rosenblueth y Martínez, 2006; Gaviria 2010)	15
Tabla 4. Procedimiento para aislamiento de <i>Gluconacetobacter spp.</i> en el cultivo de caña de azúcar (Gaviria, 2010)	17
Tabla 5. Pruebas bioquímicas para el género <i>Gluconacetobacter spp.</i>	18
Tabla 6. Clasificación taxonómica de la bacteria <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	21
Tabla 7. Crecimiento en medio semisólido LGI-P	33
Tabla 8. Morfología bacteriana de las 19 cepas aisladas en caña de azúcar y suelo rizosférico	34
Tabla 9. Resultado de pruebas bioquímicas en 19 cepas aisladas en caña de azúcar y suelo rizosférico	34
Tabla 10. Resultados de concentración bacteriana mediante el uso del espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25	37
Tabla 11. Promedio del desarrollo medidos en milímetros y análisis de varianza, prueba de Tukey realizados a la parte aérea de las plantas desarrolladas en condiciones de invernadero	39
Tabla 12. Promedio del desarrollo medidos en milímetros y análisis de varianza, prueba de Tukey realizados a las raíces de las plantas desarrolladas en condiciones de invernadero	40
Tabla 13. Promedio del peso (mg) alcanzados en las partes aéreas de las plantas aplicándoles el análisis de varianza y prueba de Tukey	41
Tabla 14. Promedio del peso (mg) alcanzados en las raíces de las plantas aplicándoles el análisis de varianza y prueba de Tukey	42
Tabla 15. Cuantificación de 19 muestras de ADN mediante NanoDrop®, marca Thermo Fisher	57
Tabla 16. Resultados del análisis fisicoquímico del suelo utilizado s-F1 en el ensayo de Invernadero de Fitopatología	63
Tabla 17. Distribución de tratamientos y resultados de crecimientos de plantas por parcelas dentro de invernadero del área de Fitopatología	64

## Lista de Siglas / Acrónimos

**CINCAE:** Centro de Investigación de la caña de azúcar del Ecuador

**ESPAC:** Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua

**FENAZUCAR:** Federación Nacional de Azucareros

## Lista de Abreviaturas

ADN:	Ácido desoxiribonucleico
cél/ml:	Células por mililitro
cm:	Centímetro
DEPC:	Dietil pirocarbonato
D.O:	Densidad óptica
dNTPs:	Desoxinucleotidos trifosfato
EDTA:	Acido etilendiaminotetraacético
FBN:	Fijación Biológica de nitrógeno
g:	Gramo
ha:	Hectárea
has:	Hectáreas
kg:	Kilogramo
LGI-P:	Lennox broth
mg:	Miligramo
mm:	Milímetro
ml:	Mililitro
min:	Minuto
mM:	Milimol
M:	Mol
m <sup>2</sup> :	Metro cuadrado
nm:	Nanómetro
nt:	Nucleótidos.
μl:	Microlitro
PCR:	Reacción en cadena de polimerasa
pM:	Picomol
pb:	Pares de base
seg:	Segundo
RNasa:	Ribonucleasa
rpm:	Revoluciones por minuto
Taq:	Enzima Taq ADN Polimerasa
T1:	Tratamiento 1
T2:	Tratamiento 2

T3: Tratamiento 3  
T4: Tratamiento 4  
T5: Tratamiento 5  
T6: Tratamiento 6  
T7: Tratamiento 7  
T8: Tratamiento 8  
TE: Tris-EDTA  
Tris HCl: Tris- cloro  
TSA: Trypto - Casein Soy Agar (Agar triptona)  
UFC: Unidades formadoras de colonias

## Lista de Símbolos

°C	:	Grados centígrados
%	:	Porcentaje
100 X	:	Grado de aumento óptico
Fe	:	Hierro
Mo	:	Molibdenio
NaCl	:	Cloruro de sodio
N <sub>2</sub>	:	Nitrógeno atmosférico

# Índice

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
---------------------------	----------

## **Capítulo I: El problema de la investigación**

1.1 Planteamiento del problema.....	3
1.2 Delimitación del problema.....	3
1.3 Formulación del problema .....	4
1.4 Preguntas de investigación.....	4
1.5 Determinación del tema .....	5
1.6 Objetivo general.....	5
1.7 Objetivos específicos .....	5
1.8 Hipótesis .....	5
1.9 Declaración de las variables (operacionalización).....	5
1.9.1 Variable independiente .....	5
1.9.2 Variable dependiente .....	6
1.10 Justificación .....	6
1.11 Alcance y Limitaciones.....	6
1.11.1 ALCANCES .....	6
1.11.2 LIMITACIONES .....	6

## **Capítulo II: Marco teórico referencial**

2.1 ANTECEDENTES .....	7
2.1.1 Caña de azúcar .....	7
2.1.2 Taxonomía .....	7
2.1.3 Características del cultivo .....	8
2.1.3.1 Sistema radicular.....	8
Raíces de sostén .....	8
Raíces superficiales.....	8
Raíces en sogá.....	8
2.1.3.2 Raíces primarias.....	8
2.1.3.3 Raíces permanentes.....	8
2.1.3.4 El tallo.....	9
2.1.3.5 El nudo .....	9
2.1.3.6 El entrenudo .....	10
2.1.3.7 Hoja.....	10
2.1.3.8 Lámina foliar.....	10
2.1.3.9 Yagua o vaina .....	10
2.1.3.10 La Flor.....	10
2.2 NITROGENO .....	11
2.2.1 Ciclo del nitrógeno.....	12

2.3 CONTENIDO TEÓRICO QUE FUNDAMENTA LA INVESTIGACIÓN.....	13
2.3.1 Bacterias Fijadoras de nitrógeno (BFN) .....	13
2.3.2 Bacterias endófitas .....	14
2.3.2.1 Ventajas.....	16
2.3.2.2 Características fisiológicas y bioquímicas .....	17
2.3.2.3 Métodos de conservación de bacterias .....	18
2.3.3 <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> .....	19
2.3.4 Enzima nitrogenasa .....	21
2.3.5 Filogenia y taxonomía del gen 16S rRNA .....	22
Características relevantes del 16S rRNA .....	23
Aspectos metodológicos de la identificación bacteriana 16S rRNA mediante secuenciación del 16S rRNA .....	25
La amplificación del 16S rRNA .....	25
Oligonucleótidos iniciadores .....	25
Secuenciación del amplicón.....	26

### Capítulo III: Diseño metodológico

3.1 TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN .....	28
3.1.1 La población y la muestra .....	28
3.1.1.1 Características de la población.....	28
3.1.1.2 Delimitación de la población .....	29
3.1.1.3 Tipo de muestra.....	29
3.1.1.4 Tamaño de la muestra .....	29
3.1.1.5 Proceso de selección de la muestras .....	29
3.2 LOS MÉTODOS Y LAS TÉCNICAS .....	30
3.2.1 <u>Aislamiento de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i></u> .....	30
3.2.2 <u>Proceso de purificación de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i></u> .....	30
3.2.3 <u>Identificación de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i></u> .....	30
3.2.4 <u>Caracterización Molecular de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i></u> .....	30
3.2.5 Preparación de Inoculo Bacteriano .....	32
3.3 PROCESAMIENTO ESTADISTICO DE LA INFORMACIÓN .....	32

### Capítulo IV: Análisis e Interpretación de Resultados

4.1 Aislamiento de <i>Gluconacetobacter spp.</i> .....	33
4.2 Purificación y Conservación de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> .....	33
4.3 Identificación de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> .....	34
4.4 Caracterización de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> .....	35
4.5 Inóculo bacteriano.....	37
4.6 Tratamiento estadístico de la información .....	38
4.6.1 Análisis de los resultados.....	38
4.6.2 Análisis de alturas y pesos alcanzados en plantas de caña de azúcar en condiciones de invernadero.....	39

### Capítulo V: Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Conclusiones .....	43
5.2 Recomendaciones .....	43
<b>Bibliografía</b> .....	45
<b>Anexos</b> .....	49



## Introducción

En las prácticas agrícolas se han utilizado bacterias fijadoras de nitrógeno, las que surgieron en Suiza alrededor del año 1940 con la finalidad de conservar el medio ambiente y ayudar a la reducción de contaminantes en suelos medios hídricos, la implementación de la fertilización biológica generan diferentes beneficios como materia orgánica, acumulación de nutrientes y conservación de los recursos naturales renovables que tomaron protagonismo en la década de 1980 (Andrade-Rueda, 2023).

En Ecuador, la superficie cosechada de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) para el año 2022 fue de 113,148 hectáreas decreciendo el 13.2 % con respecto a las cifras del año 2021 (ESPAC 2023), lo que representa un 73 % para la producción de azúcar y un 27 % para etanol y otros derivados mencionados por la Federación Nacional de Azucareros (FENAZUCAR, 2022). En este cultivo se usa cantidades elevadas de fertilizantes químicos que proporcionan nutrientes que son asimilados por las plantas para optimizar los procesos de producción eficaz, la disponibilidad de Nitrógeno (N) es el factor de rendimiento más significativo en muchos sistemas de producción agrícola (Cuellar Góngora, C. E. 2018). Estudios realizados conllevan, a que la aplicación de fertilizantes químicos nitrogenados es necesaria para el desarrollo del cultivo vegetal, considerando un alto costo y el exceso de su uso que está relacionado a la contaminación ambiental; por ende, el papel de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) en plantas permite que la agricultura sea más productiva y sostenible sin dañar el medio ambiente (Loredo-Osti. et al 2004; Cuellar Góngora, C. E. 2018).

El uso de biofertilizantes en la agricultura se convierte en una alternativa debido a las ventajas de las preparaciones con microorganismos vivos que cumplen funciones específicas dentro del cultivo tales como: Fijación de nitrógeno, producción de hormonas de crecimiento, producción de antibióticos y la generación de agentes quelantes de hierro. Considerando que el nitrógeno (N) es una sustancia esencial para el desarrollo y crecimiento vegetal en los cultivos ya que su absorción se da en la etapa temprana promoviendo el desarrollo foliar y la floración. Este elemento es parte de las moléculas en las proteínas e interviene en los procesos de fotosíntesis y transferencia de información genética por lo que se lo encuentra en diferentes partes de las plantas (Ube Anchundia, 2021).

El nitrógeno es considerado como el tercer elemento de importancia en la producción de alimentos provenientes de los cultivos, (Guillen-Palma, 2022). En la actualidad se están buscando los métodos más eficientes para el cultivo a partir de la obtención de microorganismos benéficos nitrificantes amigable para el entorno.

Dentro del marco del presente trabajo se realizó aislamientos de bacterias del género *Gluconacetobacter spp.* en seis variedades comerciales de caña de azúcar, usando como medio selectivo el agar LGI-P semisólido y sólido libre de nitrógeno (Tortora, et al, 2022). La identificación morfológica y bioquímica se la realizó mediante características fenotípicas usando procesos como tinción de Gram, oxidasa, catalasa, etc. (Rozo, et al, 2020). Para la técnica de identificación molecular para *Gluconacetobacter diazotrophicus* fue realizada mediante la reacción en cadena de la polimerasa PCR – convencional utilizando los cebadores específicos del gen 16S rRNA (Molinares-Pacheco, et al, 2021). Y para la inoculación en plántulas de semilla sexual, se realizó mediante inmersión (Rivera-Urbalejo, 2017).

El objetivo de la presente investigación fue aislar cepas nativas de bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Gluconacetobacter spp.* provenientes de seis variedades comerciales de caña de azúcar y de la rizosfera obtenida dentro del lote **1060604** del ingenio San Carlos – Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación de la caña de azúcar del Ecuador (CINCAE).

# Capítulo I: El problema de la investigación

## 1.1 Planteamiento del problema

El uso de productos de origen químico aplicados como fertilizantes del tipo nitrogenado se han convertido en una alternativa de elementos necesarios en la agricultura, ya que gracias a su implementación la producción en los cultivos se ve mejorada. La desventaja con la aplicación de este tipo de fertilizantes en los cultivos principalmente es en forma de urea, conteniendo alrededor del (46 % de N); y la pérdida que presenta este componente producida por la descomposición en su aplicación en el suelo en forma de gas ( $\text{NH}_3$ ) tipo amoníaco, por esta razón para evitar las pérdidas por lixiviación al momento de la nitrificación y volatilización del amonio durante la fase de hidrólisis, se emplea urea de liberación lenta de sus compuestos para aumentar la absorción del nitrógeno en los cultivos agrícolas (Morales-Morales, E. J., et al 2019).

En el tiempo actual, el uso de fertilizantes se ha constituido como una de las características con mayor relevancia debido a la competitividad en el mercado nacional, convirtiéndose en la alternativa que determina la productividad en los cultivos agrícolas en países no industrializados. En el caso de Ecuador que en la actualidad cuenta con el acuerdo al Arancel Nacional de Importaciones, con la finalidad de incentivar el progreso agrícola mediante importaciones al país con las denominaciones de abonos (Coba Villavicencio, 2018).

En este sentido la búsqueda de alternativas económicamente viables, como el desarrollo de biofertilizantes mixtos, se vuelven una necesidad para el sector agrícola representando una alternativa segura, llevando el equilibrio con el medio ambiente, por tal razón el efecto generado por el uso de microorganismos del género *Gluconacetobacter diazotrophicus* en cada uno de los cultivos a ensayar los que demostrarían el potencial que como bio-estimulador ofrece para el mejoramiento en la absorción de nitrógeno y mejorando la producción (González Cadena, R. 2021).

Debido a la búsqueda de grandes niveles de producción en cultivos y de otorgarles la protección de agentes patógenos y plagas, se opta por el uso de pesticidas y fertilizantes de origen químico. Sin embargo, la implementación de estos productos, producen efectos negativos al ambiente y daños a la salud (Aguilar, O. A. V.,2023).

## 1.2 Delimitación del problema

El presente trabajo se llevó a cabo en el sector productivo de caña de azúcar, ubicado km 49.9 vía Durán - El triunfo, dentro de las instalaciones del Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador (CINCAE); en donde se realizó la obtención y procesamiento de muestras de seis

variedades de caña de azúcar y de suelo rizosférico, obteniendo bacterias aisladas del género *Gluconacetobacter spp.* para después ser inoculadas a manera de ensayo, evaluando su crecimiento en plantas de semilla sexual donde se evaluaron por altura, sistema radicular, y peso.

### 1.3 Formulación del problema

La agricultura en el país juega un rol de gran importancia ya que no solo constituye la forma de vida laboral de cientos de personas dedicadas al campo ecuatoriano, sino que forma parte del sector estratégico contribuyendo de manera directa al desarrollo rural; por ende, al desarrollo económico y social del Ecuador. Por esta razón, los cultivos agrícolas necesitan complementar sus requerimientos nutricionales necesarios para su buen desarrollo, siendo el principal nutriente el Nitrógeno que no se aplica adecuadamente por lo que se verán afectados el crecimiento y desarrollo obteniendo un bajo rendimiento en los cultivos (Coba Villavicencio, 2018)

El uso de biofertilizante en la agricultura se ha convertido en una alternativa debido a las ventajas de las preparaciones de microorganismos vivos que cumplen funciones específicas en los cultivos tales como: Fijación de nitrógeno, producción de hormonas de crecimiento, producción de antibióticos y la generación de agentes quelantes de hierro. Considerando estas ventajas, los métodos de cultivo más utilizados para el aislamiento de bacterias del género *Gluconacetobacter* consisten en el uso de medios selectivos como agar LGI-P semisólido y sólido libre de nitrógeno (Ube - Anchundia, 2021).

La superioridad de esta clase de bacterias se manifiesta en su capacidad de producir sustancias durante el desarrollo radicular que inhiben el desarrollo de otro tipo de microorganismos, lo que puede suponer una ventaja en la colonización a las plantas. El solo hecho de mostrar una reducción en otros microorganismos ya se considera una ventaja adaptativa que mantiene en armonía el entorno de crecimiento (Pineda-Pineda, S. 2019).

El efecto de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en cada uno de los cultivos a ensayar demostrarían el potencial que como bio-estimulador ofrece para el mejoramiento en la producción vegetal (González Cadena, R. 2021).

### 1.4 Preguntas de investigación

- ¿Cómo determinamos si las bacterias aisladas son benéficas para las plantas de caña de azúcar?
- ¿Cuáles serían los beneficios en el desarrollo de la planta de caña de azúcar proveniente de semilla sexual de caña de azúcar al ser inoculadas con las diferentes mezclas de cepas nativas aisladas del género *Gluconacetobacter spp.*?

## 1.5 Determinación del tema

BACTERIA FIJADORA DE NITRÓGENO DEL GÉNERO *Gluconacetobacter spp.* COMO BIOFERTILIZANTE POTENCIAL EN SEMILLA SEXUAL DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum*).

## 1.6 Objetivo general

- Determinar la presencia de bacteria fijadora de nitrógeno del género *Gluconacetobacter spp.* como biofertilizante potencial en semilla sexual de caña de azúcar *Saccharum spp.*

## 1.7 Objetivos específicos

- Aislar bacterias del género *Gluconacetobacter spp.* mediante el uso de un agar específico LGI-P.
- Caracterización bioquímica y molecular del género *Gluconacetobacter spp.* mediante técnicas aplicadas en laboratorio de Fitopatología.
- Evaluar el efecto de inoculación de cepas aisladas del género *Gluconacetobacter spp.* en plántulas de semillas sexual.

## 1.8 Hipótesis

La presencia de las bacterias fijadoras de nitrógeno identificadas del género *Gluconacetobacter spp.* que fueron aisladas de seis variedades comerciales de caña de azúcar y del suelo rizosférico, funcionarían como biofertilizante altamente eficiente en plántulas de semilla sexual, promoviendo un crecimiento y desarrollo vegetativo óptimo.

## 1.9 Declaración de las variables (operacionalización)

### 1.9.1 Variable independiente:

Cepas aisladas del género *Gluconacetobacter spp.* a partir de seis variedades comerciales de caña y de suelo rizosférico:

Tratamiento 1= gt1+gr1(ECU-01)

Tratamiento 2= gt2+gr2 (EC-02)

Tratamiento 3= gt7+gr7 (EC-07)

Tratamiento 4= gt8+gr8 (EC-08)

Tratamiento 5= gt9+gr9+gh9 (EC-09)

Tratamiento 6= gt85+gr85 (CC85-92)

Tratamiento 7= gs1+gs2+gs7+gs8+gs9+gs85-92(suelo rizosférico)

Tratamiento 8= agua destilada.

### **1.9.2 Variable dependiente:**

Desarrollo de plántulas de semillas sexuales de caña de azúcar: altura (mm), sistema radicular (mm), peso (mg) a los 30 días de inoculación.

### **1.10 Justificación**

La presente investigación se justifica en virtud de la presencia de microorganismos fijadores de nitrógeno como potencializadores en la fertilización del cultivo de caña de azúcar en el Ecuador. Aislando bacterias nativas del género *Gluconacetobacter spp.* en seis variedades comerciales de caña de azúcar y suelo rizosférico; utilizando medios semisólidos y sólidos para el crecimiento del microorganismo benéfico.

La importancia de los cultivos de caña de azúcar se ha convertido en una fuente de ingresos y desarrollo de productos derivados de este cultivo. Por tal motivo el manejo y fertilización es de vital importancia para el desarrollo de la plantación, ya que uno de los elementos más importantes del cultivo de caña es el nitrógeno y es necesario para la producción agrícola, ya que forma parte de las moléculas de proteínas en la planta y participa en el proceso de fotosíntesis, crecimiento y desarrollo fisiológico para este tipo de cultivo.

### **1.11 Alcance y Limitaciones**

#### *1.11.1 ALCANCES:*

- Mejorar la absorción del nitrógeno en las plantas.
- Reducir la fertilización química con productos nitrogenados.

#### *1.11.2 LIMITACIONES:*

- Dependencias de condiciones ambientales
- Dependencia de la cepa de la bacteria.



## Capítulo II: Marco Teórico Referencial

### 2.1 ANTECEDENTES

#### 2.1.1 CAÑA DE AZUCAR

Se conoce que es uno de los cultivos más antiguos realizados en el mundo, cuyos inicios se registran hace 3000 años en la isla Nueva Guinea, considerada como la segunda mayor isla del mundo, ubicada al norte de Australia, desde allí se trasladó a Borneo y hacia otras islas; la caña de azúcar, caña dulce (*Saccharum officinarum*), fue llevada desde Asia, India hasta diferentes lugares de Europa y África, debido al flujo migratorio de la población de esta época y por la ruta de comercio, se menciona que en el año 337 A.C., Alejandro Magno y sus tropas al momento de la conquista de la India degustaron el azúcar producto de la caña y la llevaron consigo hasta Persia, tiempo después la caña de azúcar fue llevada al sur de Europa y norte de África por los árabes, mientras que desde China se dio la expansión desde las Filipinas hasta Java, años después entre los siglos XI y XII la población de los cruzados iniciaron su introducción a Francia, de esta manera se extendió al resto del continente (Espinoza - Cortez 2021).

Es importante mencionar que alrededor del 70% del azúcar que se produce en todo el mundo proviene de *Saccharum officinarum* e híbridos utilizando esta especie, originaria de Nueva Guinea y llevada por Cristóbal Colón hacia América en 1493 (Buitrago-Marulanda, S., et al., 2019); actualmente, es cultivada en más de 70 países siendo India y Brasil los que producen la mitad de azúcar en el mundo (Cardoso - Chávez, et al 2019).

En base a los reportes emitidos por FENAZUCAR (ASOBANCA, 2022), la cantidad en cuanto a la extensión de hectáreas registradas en el Ecuador son de 110.000 ha, de las cuales son destinadas hasta 85.000 ha para la producción de azúcar y el resto de la producción es utilizada para otros derivados como panela, melaza y etanol principalmente. La importancia de este tipo de cultivo es el de formar parte del aparato productivo del país contribuyendo de manera importante a su economía.

#### 2.1.2 TAXONOMIA

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de la caña de azúcar según (Fuente: Sangucho - Lema, et al 2020).

<b>Reino:</b>	Plantae
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Liliopsida
<b>Sub-clase:</b>	Commelinidae
<b>Orden:</b>	Poales
<b>Familia:</b>	Poaceae
<b>Subfamilia:</b>	Panicoideae
<b>Tribu:</b>	Andropogoneae
<b>Género:</b>	<i>Saccharum</i>
<b>Especie:</b>	<i>officinarum</i>
<b>Nombre común:</b>	Caña de azúcar

### 2.1.3 CARACTERISTICAS DEL CULTIVO

Mediante la morfología de la caña de azúcar, podemos distinguir lo que son: las raíces, el tallo, las hojas y la flor; de igual manera nos permite diferenciar y reconocer las variedades existentes mediante la observación externa en las etapas de crecimiento de la planta.

#### 2.1.3.1 Sistema radicular

Para este tipo de cultivo se describió un sistema típico para el sistema radicular en el que se dividió a las raíces de caña de azúcar en tres tipos funcionales: (Sangucho - Lema, et al 2020)

- **Raíces de sostén:** son las primeras en emerger de la base de los brotes jóvenes. Son relativamente gruesas con pequeñas ramificaciones y su crecimiento se produce en sentido vertical hacia las capas más profundas del suelo. Su función es dar anclaje a la planta.
- **Raíces superficiales:** emergen de los nudos inmediatamente superiores a las raíces de sostén. Son raíces más delgadas y muy ramificadas que se extienden lateralmente, formando una densa red de raíces superficiales responsable de la absorción de agua y nutrientes de las capas superficiales del suelo.
- **Raíces en sogá:** están formadas por aglomeraciones de raíces que crecen en sentido vertical. Alcanzan capas de suelo más profundas y permiten acceder a reservas de agua en dichas capas (Romero et al 2018 pag 15).

El órgano de soporte y mecanismo para captar agua y nutrientes de la tierra es la porción subterránea del eje de la planta. La planta conocida como caña de azúcar tiene dos tipos diferentes de raíces. ver tabla 2

**Tabla 2.** Tipos de raíces que conforman el sistema radicular en la caña de azúcar

Tipo de raíz	Clasificación
<i>Primarias</i>	Gruesas, delgadas, ramificadas, no ramificadas.
<i>Perenne</i>	anchas, cortas, pequeñas, medianas, escasas, abundantes, gruesas, delgadas, alargadas

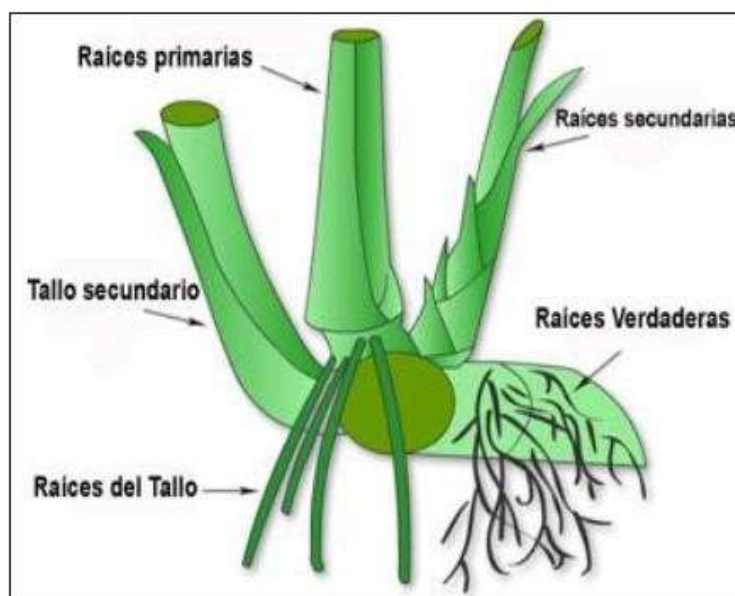
#### 2.1.3.2 Raíces primarias:

Son delgadas, muy ramificadas y pueden vivir hasta tres meses; se parecen a las raíces de la estaca de plantación original.

#### 2.1.3.3 Raíces permanentes:

Aparecen cuando los nuevos brotes emergen de sus anillos de crecimiento, proliferan rápidamente, son gruesas y aumentan en número a medida que la planta crece. La raíz de la caña es fasciculada; su número, longitud y edad vienen determinados por la variedad, así como por el suelo y los niveles de humedad. Figura 1



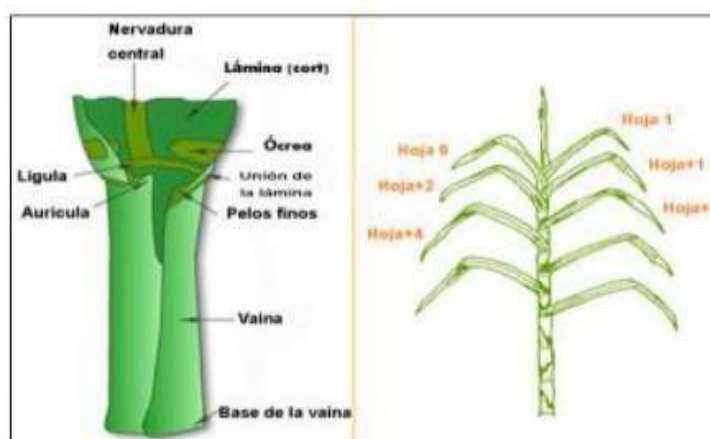


**Figura 1.** Sistema radicular de la caña de azúcar (Fuente: Sangucho - Lema, et al 2020).

#### 2.1.3.4 El tallo

Dado que en él se almacenan los azúcares, es el órgano más importante de la planta de caña de azúcar; la variedad determina su número, diámetro, color y comportamiento de crecimiento. Los factores ambientales de la zona y el manejo de la variedad tienen un impacto significativo en la longitud de los tallos. Son posibles tallos primarios, secundarios o terciarios. Figura 2

**Figura 2.** Hojas e inflorescencia de la flor de la caña de azúcar (Fuente: Sangucho - Lema, et al 2020).



#### 2.1.3.5 El nudo

Es la parte del tallo que divide dos entrenudos adyacentes es la más dura y fibrosa. El anillo de crecimiento, la banda radicular, la cicatriz foliar, el propio nudo, la yema y el anillo ceroso se combinan para producir el nudo. Dado que la forma de la yema y la pubescencia de cada variedad difieren, estas características se utilizan con frecuencia para la identificación de variedades.

### 2.1.3.6 El entrenudo

Es la parte del tallo que se encuentra en el espacio entre dos nudos. La variación afecta al diámetro, el color, la forma y la longitud. Las variables ambientales pueden afectar a la expresión de los genes genéticos que controlan el color. Sus formas más típicas son curvada, constrictiva, cilíndrica, en forma de barril y coniforme. Figura 3



**Figura 3.** Componentes morfológicos que identifican el nudo y entre nudo del tallo (Fuente: Sangucho - Lema, et al 2020).

### 2.1.3.7 Hoja

Comienza en los nudos y se extiende hacia el exterior a lo largo del tallo en direcciones alternas. La vaina, la yagua y la lámina foliar se combinan para formar cada hoja. La lígula, que conecta estas dos secciones, tiene un pabellón auricular con pubescencia variada en su extremo.

### 2.1.3.8 Lámina foliar

Es el componente más importante de la fotosíntesis, y los tipos de plantas varían en su forma de almacenarlo. El nervio central recorre toda la lámina de la hoja y los bordes presentan salientes dentados. Según el tipo, el color de las hojas puede variar del verde pálido al verde más intenso. La variedad también afecta a la anchura y la longitud.

### 2.1.3.9 Yagua o vaina

Tiene forma tubular, rodea el tallo y su base es más ancha. La cantidad y longitud de los pelos urticantes varían según la variedad. Pueden estar presentes o ausentes.

### 2.1.3.10 La Flor

Se trata de una inflorescencia en forma de espiga con panículas sedosas. En el interior de las espiguillas, situadas a lo largo de un raquis, se encuentra una flor hermafrodita con tres anteras y un ovario con dos estigmas. Las largas pubescencias que rodean cada flor dan a la inflorescencia un aspecto aterciopelado. Cuando los niveles nutricionales del suelo, el fotoperíodo, la temperatura y la disponibilidad de agua son ideales, se produce la floración.

Según la variedad y el clima, la caña de azúcar pasa por las siguientes etapas en su ciclo vegetativo:

La germinación se produce, en promedio, unos 30 días después de la plantación y, quince días más tarde, se produce un fenómeno denominado "macolla miento", es decir, un aumento del número de sarmientos o tallos por cepa. A los seis meses, la planta empieza a florecer. Entre los diez y los trece meses, la planta alcanza la maduración de la caña, o concentración de sólidos solubles, que se mide en grados brix.

## 2.2 NITROGENO

El nitrógeno (N) es un elemento químico que conforma el 78% del total del aire en la atmósfera; se ubica en primer lugar del grupo 15 en la tabla periódica de los elementos químicos, y se lo encuentra en su forma natural como molécula constituida por dos átomos de manera gaseosa ( $N_2$ ). Este elemento se encuentra presente en varios compuestos y a pesar de esto, se necesita un alto nivel de energía y presión para la ruptura de sus enlaces. La atmósfera es una fuente abundante de nitrógeno, también existen pocos microorganismos que son capaces que transferir electrones a una molécula mediante la acción enzimática.

Antes de ser utilizado para nutrir las plantas, el nitrógeno atmosférico debe someterse a un proceso natural conocido como fijación del nitrógeno; adquirir nitrógeno activo mejoraría la situación financiera de la industria agrícola. Es posible fijar el nitrógeno atmosférico en el suelo utilizando la enzima nitrogenasa producida por las bacterias fijadoras de nitrógeno que se encuentran en los nódulos radiculares de las leguminosas para convertirlo catalíticamente en  $NH_4^+$ . Este proceso fija el nitrógeno atmosférico y lo hace disponible para su uso en el suelo (Guillen-Palma, 2022).

Uno de los elementos más importantes para los procesos biológicos de todos los seres vivos es el nitrógeno, que se utiliza para construir el componente estructural de las paredes celulares y macromoléculas que incluyen proteínas, aminoácidos, enzimas, vitaminas, hormonas y ácidos nucleicos. Está catalogado como uno de los macronutrientes más importantes para el crecimiento y el buen funcionamiento de los cultivos, ya que interviene principalmente en la síntesis de la clorofila en las plantas y en la estimulación del desarrollo y la actividad de las raíces según Guillen Palma 2022 de acuerdo con (INPOFOS, 1997; Palma & Segat, 2000; Perdomo et al., 2003).

Para el proceso de obtención del nitrógeno a escala industrial se requieren altas temperaturas y presión, lo que no es viable comercialmente; para la transformación del  $N_2$  a amoníaco  $NH_4^+$  (ingrediente principal de los fertilizantes) se conoce como proceso Haber, Se trata de la mezcla de  $H_2$  y  $N_2$  sobre un catalizador de hierro a altas presiones y temperaturas. Por consiguiente, la economía mejoraría mucho si se buscara una forma más rentable de producir nitrógeno activo,

sobre todo en el sector agrícola. La forma en la que el nitrógeno de la atmósfera llega a fijarse en el suelo es mediante su conversión catalítica a  $\text{NH}_4^+$  mediante la intervención de la enzima nitrogenasa; este proceso se realiza a temperatura ambiente e intervienen bacterias fijadoras de nitrógeno que se encuentran formando nódulos de las raíces de leguminosas (Atkins et al., 2008; citado por Guillen - Palma 2022).

### 2.3 CICLO DEL NITRÓGENO

El nitrógeno que se encuentra en la tierra es propenso a una variedad de cambios en sus muchos estados de oxidación; se encuentra principalmente en su forma diatómica orgánica y gaseosa menos reactiva, así como en sus dos formas inorgánica y orgánica. El ciclo del nitrógeno se refiere a la interacción entre todas las transformaciones, que incluyen procesos que implican reacciones químicas, enzimáticas y biológicas. (Palma & Segat, 2000; Castellanos et al., 2005 citado por Guillen - Palma 2022). Figura 4

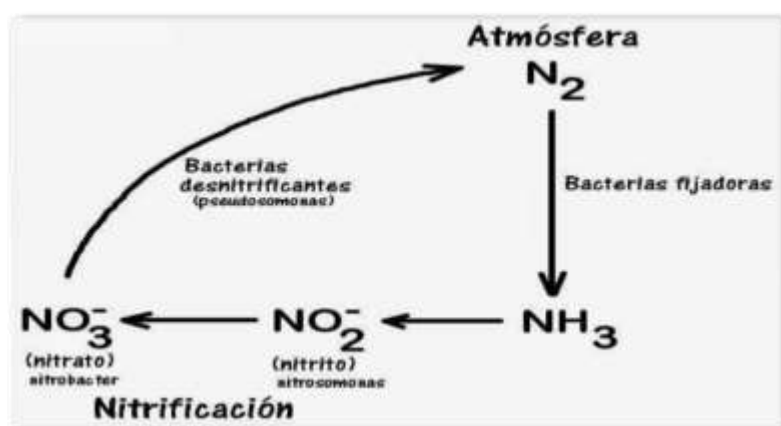


Figura 4. Ciclo del nitrógeno (Fuente: Moreno P., 2018)

Cuando las bacterias fijadoras de nitrógeno, sobre todo las que se encuentran en los nódulos radiculares de las leguminosas, transforman la materia orgánica en amonio y luego en nitrato, es un ejemplo de fijación biológica del nitrógeno. Las bacterias desnitrificantes vuelven a transformar el exceso de nitrato en nitrógeno inorgánico que se vierte a la atmósfera, mientras que las plantas absorben el nitrato del suelo y lo descomponen en el nitrógeno que necesitan. Además, los rayos pueden iniciarla; el calor también puede romper los triples enlaces del nitrógeno atmosférico, liberando sus átomos para combinarse con el oxígeno y formar gas de óxido nitroso, que se disuelve en la lluvia y es absorbido por el suelo; y, por último, la lixiviación puede eliminar el exceso de nitrato al eliminar los nutrientes que han sido disueltos por la lluvia. (Orchardson, 2020).

Figura 5

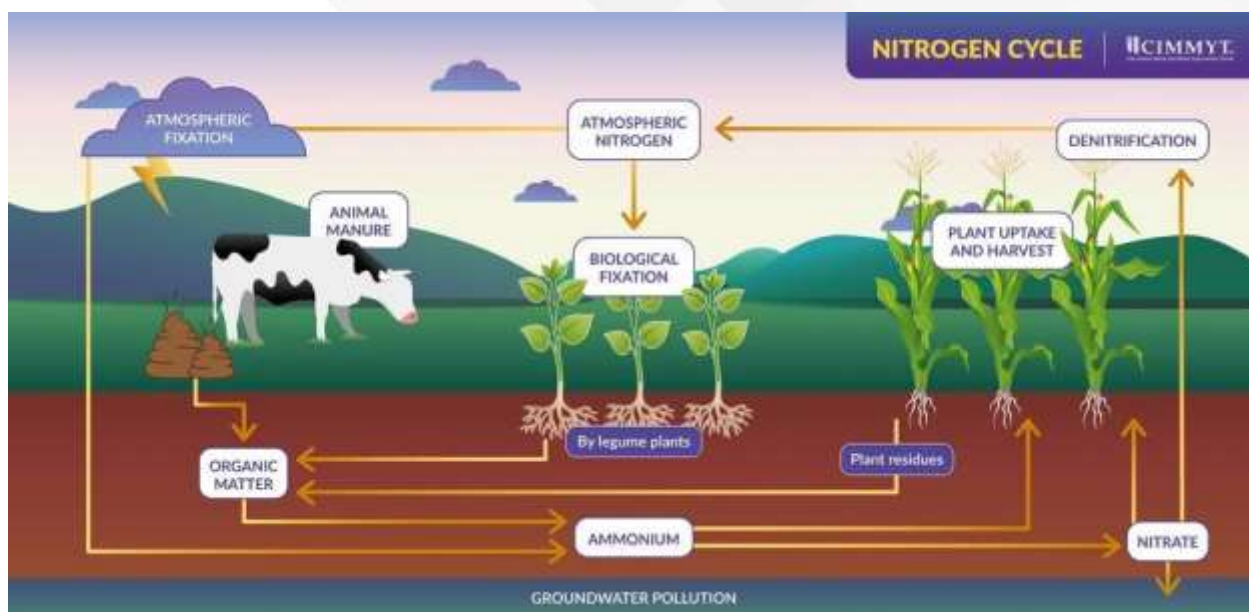


Figura 5. Proceso del nitrógeno (Fuente: Orchardson, 2020).

## 2.4 CONTENIDO TEÓRICO QUE FUNDAMENTA LA INVESTIGACIÓN

### 2.4.1 Bacterias Fijadoras de nitrógeno (BFN)

El estudio relacionado a bacterias fijadoras de nitrógeno se dio por primera vez en 1950, en base a la existencia de abonar nitrógeno de forma extrínseca a las plantas en el cultivo de caña de azúcar, mediante el desarrollo de un medio de cultivo sin fuentes de nitrógeno, donde fueron aisladas altas poblaciones de la rizosfera de dos especies de bacterias *Beijerinckia fluminensis* y *Beijerinckia indica* (Roa - Lozano, 2017).

Es importante mencionar que las plantas que obtienen todo el nitrógeno del suelo y generalmente muestran una señal positiva, en las plantas de referencia vecinas que no fijan nitrógeno se muestran con variaciones tan grandes en los ecosistemas naturales; a menudo es imposible siquiera distinguir las plantas que se benefician de las bacterias fijadoras de nitrógeno de las que realizaron aportes de FBN a las plantas de caña de azúcar cultivadas en Brasil y obtuvieron valores significativos, oscilando entre 25 y 60% del nitrógeno atmosférico para la síntesis proteínas celulares las que son mineralizadas y asimiladas; observando que de la producción por bacterias produjo más de 150 Kg N/ha; mientras que las aplicaciones de fertilizantes de síntesis química no superan los 60 Kg de Nitrógeno / ha.



Como se da a conocer que en Brasil las bacterias fijadoras de nitrógeno son altamente comercialmente para el cultivo de la caña de azúcar (Roa - Lozano, 2017).

Los microorganismos que pertenecen al género *Gluconacetobacter* y cuya especie es *diazotrophicus*; presentan el complejo enzimático de la nitrogenasa que cataliza la reducción del triple enlace que une los dos átomos de nitrógeno atmosférico para formar amonio,  $\text{NH}_3^+$  (Bonilla et al., 2021). Pueden presentar simbiosis con las plantas como sucede con microorganismos de los géneros Actinobacterias y Rizobios que se colonizan ingresando en los tejidos de la planta mediante el sistema radicular como endófitos facultativos, ejemplos: *Azoarcus spp.*, *Burkholderia spp.*, *G. diazotrophicus*, *Herbaspirillum spp.*, (Velasco - Jiménez et al., 2020).

Mediante la micropropagación vegetativa de la caña de azúcar que se realiza dentro del laboratorio por cultivo de tejido in vitro, se determina la cantidad a multiplicar de cada variedad / clon libres de patógenos; también se considera la reducción de la presencia bacteriana que en algunos casos podrían ser benéficas y que sirven para efectuar pruebas de inoculaciones y evaluar la capacidad de colonización y los efectos sobre la planta considerando un grupo de microorganismos que se han incrementado a partir de 1970 hasta la actualidad tal es el caso de *Azospirillum brasilensis*, *Enterobacter spp.*, *Burkholderia unamae*, *Rhizobium spp.*, que interactúan en el crecimiento de la planta; mientras que *Herbaspirillum seropedicae* y *Gluconacetobacter diazotrophicus* promueven la estimulación de las raíces por el desarrollo de fitohormonas y la acumulación del nitrógeno en los tejidos de la raíces de la caña de azúcar resulta de la fijación de las bacterias endófitas en el cultivo (Rivera - Urbalejo et al., 2019).

#### **2.4.2 Bacterias endófitas**

Las bacterias endófitas son aquellas que se encuentran presentes en los diferentes tejidos de las plantas, o cuando se aíslan desde sus tejidos mediante la desinfección superficial determinando la presencia de estas mediante la observación microscópica y cuando no existe la observación del microorganismo se lo conoce como posible endófito (Bonilla et al., 2021). Actualmente se considera que *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum spp.* y *Herbaspirillum spp.* se han convertido en las endófitas de mayor importancia e interés agronómico por su contribución de nitrógeno y producción de fitohormonas internamente en los tejidos de caña de azúcar, con poblaciones bacterianas de 100 a 1000 UFC/g hojas/tallo/raíces de caña de azúcar y con un promedio de reducción de acetileno- etileno de 416,93 nmol  $\text{C}_2\text{H}_4/\text{h}-1$  (Roa – Lozano, 2018).

Gaviria (2010) da a conocer un estudio donde se recopilan datos de diferentes microorganismos endófitos relacionados con diferentes cultivos, según la tabla # 3 publicada por (Rosenblueth y Martínez, 2006; Gaviria-Giraldo 2011 ).

**Tabla 3.** Reporte de bacterias endófitas y procedencia.

Endófitas	Planta	Referencia
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	Arroz	Engelhard et al. 2000
<i>Azospirillum brasilense</i>	Banana	Weber et al. 1999
<i>Azospirillum amazonense</i>	Banana, piña	Weber et al. 2000
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Arroz	Chantreuil et al . 2000
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Caña de azúcar, café	Cavalcante y Döbereiner 1988; Jiménez-Salgado et al . 1997
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	Cítricos	Araujo et al. 2002
<i>Methylobacterium extorquens</i>	Pino, cítricos	Araujo et al. 2002; Pirtillä et al . 2004
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Arroz	Yanni et al . 1997
<i>Rhizobium (Agrobacterium)</i>	Zanahoria, arroz	Surette et al . 2003
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Batata 2003	Reiter et al .
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Arroz	Engelhard et al . 2000
<i>Azoarcus sp</i>	Arroz, pasto	Engelhard et al . 2000; Reinhold-Hurek et al. 1993
<i>Burkholderia pickettii</i>	Maíz	Mcinroy y Kloepper 1995
<i>Burkholderia cepacia</i>	Citricos	Araujo et al. 2001; Barac et al. 2004
<i>Burkholderia sp.</i>	Banana, piña, arroz	Weber et al. 1999; Engelhard et al. 2000
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Arroz	Phillips et al. 2000
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Caña de azúcar, arroz	Olivares et al. 1996; Weber et al. 1999
<i>Herbaspirillum rubrisulbalbicans</i>	Caña de azúcar	Olivares et al. 1996
<i>Citrobacter sp</i>	Banana	Martínez et al. 2003
<i>Enterobacter spp</i>	Maíz	Mcinroy y Kloepper 1995
<i>Enterobacter sakazakii</i>	Soya	Kuklinsky-Sobral et al. 2004
<i>Enterobacter cloacae</i>	Cítricos, maíz	Araujo et al. 2002; Hinton et al. 1995
<i>Enterobacter agglomerans</i>	Soya	Kuklinsky-Sobral et al. 2004
<i>Enterobacter asburiae</i>	Batata	Asis y Adachi 2003
<i>Erwinia sp.</i>	Soya	Kuklinsky-Sobral et al. 2004
<i>Escherichia coli</i>	Lechuga	Ingham et al. 2005
<i>Klebsiella sp.</i>	Trigo, batata, arroz	Engelhard et al. 2000; Iniguez et al. 2004; Reiter et al. 2003
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Soya	Kuklinsky-Sobral et al. 2004
<i>Klebsiella variicola</i>	Banano, arroz, Maíz ,Caña de azúcar	Rosenblueth et al. 2004.
<i>Klebsiella terrigena</i>	Zanahoria	Surette et al. 2003
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Soya	Kunklinsky_Sobral et al. 2004
<i>Pantoea sp.</i>	Arroz, soya	Kunklinsky_Sobral et al. 2004
<i>Pantoea agglomerans</i>	Cítrico, batata	2003
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Zanahoria	Sturz y Kimpinski 2004; Serette et al. 2003
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Zanahoria	Surette et al. 2003
<i>Pseudomonas citronellolis</i>	Zanahoria	Surette et al. 2003
<i>Pseudomonas synxantha</i>	Soya	Kuklinsky-Sobral et al. 2004
<i>Salmonella entérica</i>	Pino	Pirttilä et al. 2004
<i>Serratia sp.</i>	Zanahoria, rabano,tomate	Cooley et al. 2003; Guo et al. 2002; Islam et al. 2004
<i>Serratia marcescens</i>	Arroz	Sandhiya et al. 2005
<i>Stenotrophomonas</i>	Arroz	Gyaneshwar et al. 2001
<i>Bacillus spp.</i>	Pasto	Dalton et al. 2004
<i>Bacillus megaterium</i>	Cítricos	Araujo et al. 2001, 2002
<i>Clostridium sp</i>	Maíz, zanahoria, cítricos	Araujo et al. 2001; Mcinroy y Kloepper 1995; Surette et al. 2003
<i>Paenibacillus odorifer</i>	Pastura	Miyamoto et al. 2004
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Batata	Reiter et al. 2003
<i>Sphingobacterium sp</i>	Zanahoria	Surette et al. 2003
<i>Arthrobacter globiformis</i>	Arroz	Phillips et al. 2000
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	Maíz	Chelius y Triplett 2000
<i>Kocuria varians</i>	Cítricos	Araujo et al. 2002
<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	Caléndula	Sturz y Kimpinski 2004
<i>Microbacterium testaceum</i>	Caléndula	Sturz y Kimpinski 2004
<i>Mycobacterium sp.</i>	Maíz	Zinnel et al. 2002
<i>Nocardia sp.</i>	Trigo, pino	Conn y Franco 2004; Pirttilä et al. 2005
<i>Streptomyces</i>	Cítricos	Araujo et al. 2002
	Trigo	Coombs y Franco 2003

### 2.4.3 Ventajas

Flores y Tocto (2023) menciona que la comparación con las bacterias rizosféricas y las bacterias endofíticas también ofrecen las siguientes ventajas:

1. Poseen nutrientes que ayudan en situaciones adversas.
2. Se encuentran en todos los tejidos, a pesar de su reducida población.
3. Favorecen la actividad de la enzima nitrogenasa, que fija o reduce el nitrógeno.

Gaviria (2010) menciona que entre los métodos empleados para el aislamiento de la bacteria endófito *Gluconacetobacter diazotrophicus* fue reportado por Cavalcante y Döbereiner (1988), en caña de azúcar proveniente de Brasil; A partir de estas investigaciones se han evaluado diferentes métodos que consisten en la desinfección y uso de medios de cultivo los que han permitido el aislamiento de las bacterias. Inicialmente se han usado para la desinfección del tejido vegetal soluciones como: cloramina T al 1%, alcohol al 70%, Tween 80 %, hipoclorito de calcio al 5%, agua destilada, buffer de fosfato a 25 Mm y agua de la llave, durante el proceso de aislamientos realizados en caña de azúcar. ver tabla 4

Adicionalmente se han empleado diferentes diluyentes en la homogenización del material vegetal con el fin de suministrar condiciones adecuadas que faciliten la expresión de *G. diazotrophicus*. En este sentido se ha empleado principalmente solución de azúcar entre el 1% y 5% seguido de glicerol al 30%, agua destilada y solución salina estéril. ver tabla 4

El principal medio de cultivo empleado en el aislamiento primario de *G. diazotrophicus* es el medio semisólido LGI-P, el cual es libre de nitrógeno y esta compuesto por una fuente de carbono, un indicador de pH y sales. El crecimiento del microorganismo se evidencia por la formación de una película amarilla en la superficie del medio de cultivo, que puede mostrar un viraje de color azul a amarillo o verde y algunas veces presenta producción de gas (Cavalcante y Döbereiner, 1988). Moutia et al 2003 citado por Gaviria-Giraldo (2010) indica que posteriormente en la purificación del microorganismo se han empleado medios de cultivo como agar papa dextrosa (PDA) y agar extracto de levadura, glucosa y carbonato de calcio, donde se ha comprobado la producción de pigmento café en las colonias recuperadas (pag. 16).



**Tabla 4.** Procedimiento para aislamiento de *Gluconacetobacter spp.* en el cultivo de caña de azúcar (Gaviria - Giraldo, 2010) modificada por autor.

Desinfección	Dilución	Medio de cultivo	Referencia
Agua de grifo	Solución de azúcar al 5 %	LGI	Cavalcante y Döbereiner , 1988
Agua destilada estéril, inmersión con cloramine T al 1 % por 5 segundos	Solución de azúcar al 5 %	LGI-PDA-GYC	Fuentes-Ramirez, 1993
Alcohol al 70% x 3 segundos; lavado con agua destilada	Agua destilada estéril	LGI -GYC	Muthukumarasamy, 1999
Cloramine T al 1 % por 5 segundos	No descrito	LGI	Euan - James, 2001
Cloramine T al 1 % por 5 segundos más solución estéril de SDW por 10 minutos	Solución salina 0.85%	LGI	Moutia, 2003
Agua destilada estéril más hipoclorito de calcio al 5% por 5 minutos, despues lavar con agua destilada estéril	Solución de azúcar al 1 %	LGI	Madhaiya, 2004
Tween 80	No descrito	LGI	Dibut, 2004

#### 2.4.4 Características fisiológicas y bioquímicas

La bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* es capaz de tolerar concentraciones de sacarosa (10%), crecimiento de la bacteria a pH ácidos (5.0 o menos), en PDA enriquecido con 10% de sacarosa se observa la colonia de color chocolate. Este género utiliza la enzima levanosacarasa para transportar la sacarosa presente en la planta e hidrolizar la fructuosa y glucosa; utilizándolas en el proceso de respiración como fuente de carbono, así como otros azúcares: inositol, glucosa, manitol, ramnosa, sorbitol, arabinosa, melobiosa y citratos, favoreciendo a la fijación de nitrógeno de caña de azúcar ( Gaviria - Giraldo, 2010) y para la caracterización bioquímica para el género *Gluconacetobacter spp.* ver tabla 5

**Tabla 5.** Pruebas bioquímicas para el género *Gluconacetobacter spp.*, modificada por el autor.

		<i>Gluconacetobacter</i>	<i>Gluconacetobacter</i>
			<b>ATTC49037</b>
		Por Roa, 2017	Por Gaviria, 2010
<b>Características</b>	Bacilo corto	+	+
	Bacteria gram negativa	+	+
	Movilidad	+	+
	Aeróbicas	+	+
	Productoras de indol	+	+
	Actividad nitrogenasa	+	+
<b>Carbohidratos</b>	D-fructosa	-	-
	D- glucosa	+	+
	D-manitol	-	+
	D- sucrosa	-	+
	D- maltosa	+	-
	D-lactosa	-	-
	D- arabinosa	-	+
	D- sorbitol	+	+
	D- xylosa	-	-
<b>Oxidación enzimática</b>	Etanol o ácido acético	+	+
	Oxidasa	+	+
	Catalasa	-	-

#### 2.4.5 Métodos de conservación de bacterias

Para la preservación o conservación de microorganismos existen recomendaciones que garantizan estabilidad y reproducibilidad, teniendo en cuenta las posibles contaminaciones durante el proceso de conservación y evitar la contaminación del microorganismo y que genéticamente sean estables. Existen métodos de conservación que no son universales y que se pueden adaptar a las condiciones y necesidades del laboratorio, conservándolas a corto, mediano y largo plazo (Morales et al. 2010; Gaviria - Giraldo, 2010).

La conservación a largo plazo mediante temperaturas de congelación a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  de temperatura y mediante la liofilización; estas técnicas minimizan el riesgo de cambio genético en las células, manteniéndolas viables por más de 10 años. Conservación a mediano plazo, la viabilidad es entre 2 y 5 años; estos métodos incluyen la desecación en diferentes sustratos como: arena, sílica gel y perlas de vidrio, con estas técnicas se disminuye el crecimiento microbiano y la conservación a corto plazo se basa en la transferencia de un cultivo a uno fresco proporcionándole las condiciones óptimas de crecimiento (Alemán et al., 2005; Gaviria - Giraldo, 2010).

De acuerdo con lo descrito en el Manual tradicional de la microbiología Bergey (Gaviria - Giraldo, 2010) los crecimientos de *Gluconacetobacter spp.* se pueden preservar durante cuatro semanas en el medio de cultivo en el cual ha sido aislado inicialmente siempre y cuando se mantengan a una temperatura de -4 °C. También se puede preservar en glicerol al 30% (v/v) a una temperatura de -70 °C que permite garantizar la viabilidad del microorganismo durante mayor tiempo. Otro método de preservación utilizado es el que consiste en el empleo de una base de vinagre, donde las células son congeladas a -10 °C; la utilización de extracto de malta al 20 % es otra opción de preservación, con posterior congelación empleando nitrógeno líquido.

Es importante mencionar que cada laboratorio elige el método de conservación teniendo en cuenta sus insumos y requerimientos. Sin embargo, la viabilidad y pureza se debe observar, para garantizar la estabilidad de los aislamientos.

#### **2.4.6 *Gluconacetobacter diazotrophicus***

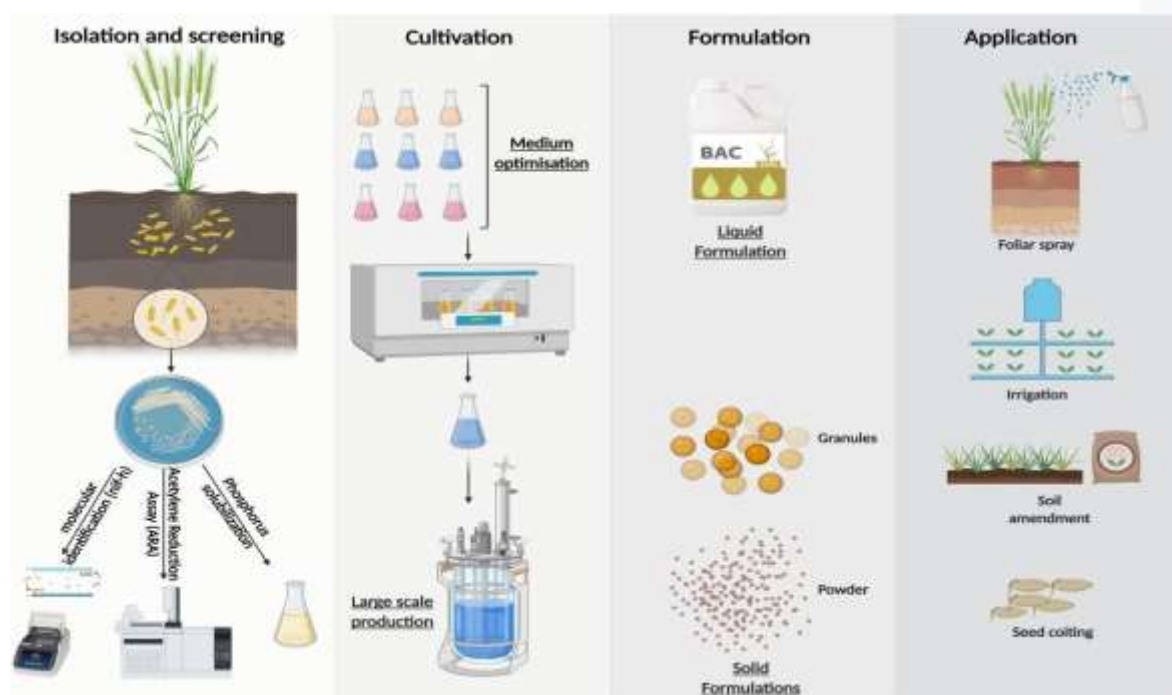
Es una bacteria diazotrófica, que fue aislada en 1988 y encontrada en el interior de la caña de azúcar la que contiene fuente de carbono para su crecimiento como es la sacarosa al 10% y produce sideróforos, aumentando el crecimiento mediante efectos hormonales de ácido indol acético y giberelinas, además solubiliza los fosfatos y presenta antagonismo a fitopatógenos (Saranraj et al., 2021). En este estudio de *G. diazotrophicus* se demostró que el medio de cultivo si influye en las características como promotor de crecimiento vegetal en *Daucus carota L.* “zanahoria” y *Beta vulgaris L.* “remolacha” (Ríos – Rocafull et al., 2019) y en otro estudio donde se realizaron inoculaciones, se observaron incrementos significativos en biomasa considerando el crecimiento de la planta y convirtiéndose en una alternativa potencial para una diversidad de cultivos agrícolas incluyendo *Sorghum sp.* “sorgo”, *Zea mays L.* “maíz” y *Gossypium sp.* “algodón” (Lovaisa et al., 2018; Flores-Diaz et al 2023).

*Gluconacetobacter diazotrophicus* es un microorganismo Gram-negativo, que fija nitrógeno atmosférico hasta 150 Kg N/ha y secreta ácidos orgánicos que son útiles para el crecimiento de los cultivos, es importante mencionar que se considera a esta bacteria como el fertilizante nitrogenado de la caña de azúcar para incrementar la productividad (Giraldo Parra & Rosero Realpe 2023).

La producción del inoculo bacteriano podría resumirse en 4 pasos (Figura 6). Empezando desde el aislamiento, purificación, conservación de cepas con características que incluyen fijación de nitrógeno, solubilización de fosforo, etc.

Utilizando un medio de cultivo adecuado y finalmente la elección de la formulación según el modo de aplicación buscado. Las formulaciones sólidas pueden ser polvos y gránulos y dependen mucho del tamaño de partículas y se aplican como recubrimientos de semillas o enmiendas del suelo; mientras que las formulaciones líquidas son adecuadas para las aplicaciones, debido al recubrimiento directo sobre la semilla (con un fijador adhesivo) antes de la siembra o al utilizarse como recubrimiento en fertilizantes ( Aasfar et al., 2022; Chavez Jacobo, 2021).

También se pueden colocar en surcos del suelo antes de la siembra o en una etapa posterior mediante sistemas de fertilización - irrigación (Malusá et al., 2012). Considerando las formulaciones líquidas que permiten el tratamiento de las partes aéreas, por ejemplo, en forma de pulverización foliar (Deantonio-Florido et al., 2021).



**Figura 6.** Producción de inoculo bacteriano a gran escala (Fuente: Aasfar et al., Chavez - Jacobo, 2021).

## 2.4.7 Taxonomía

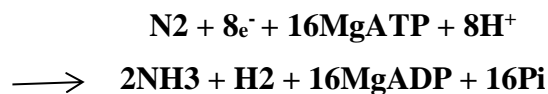
**Tabla 6.** Clasificación taxonómica de la bacteria *G. diazotrophicus* (Fuente: Salinas, 2014)

<b>Reino:</b>	Bacteria
<b>División:</b>	Protobacteria
<b>Clase:</b>	Alphaprotobacteria
<b>Orden:</b>	Rhodospirillales
<b>Familia:</b>	Acetobacteraceae
<b>Género:</b>	<i>Gluconacetobacter</i>
<b>Especie:</b>	<i>diazotrophicus</i>

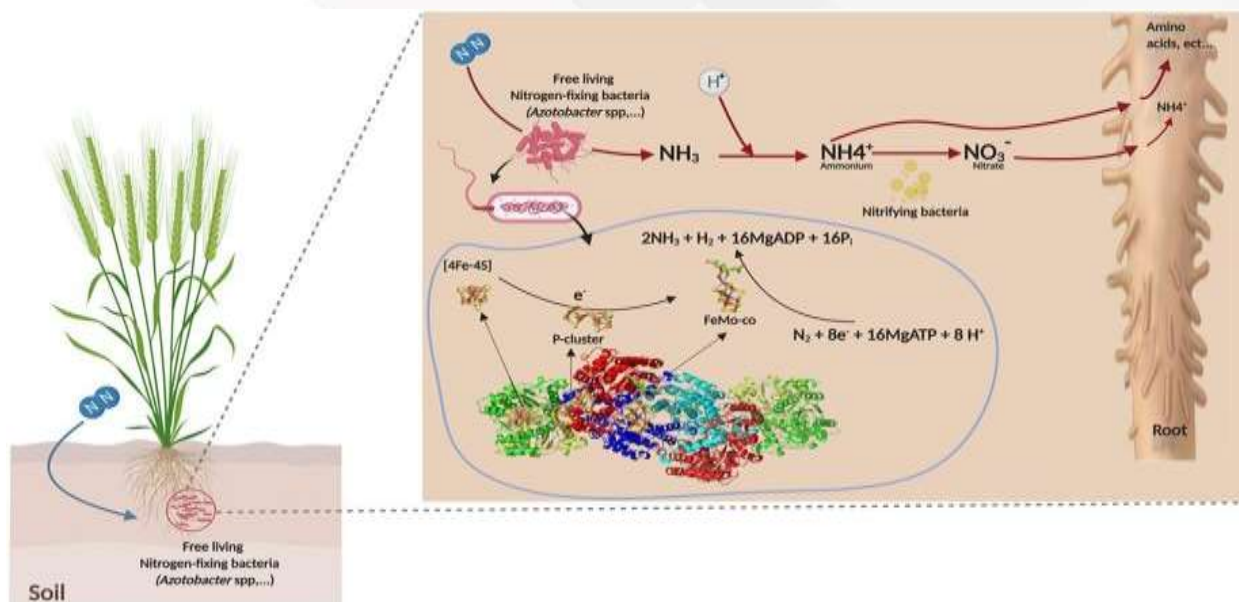
## 2.4.8 Enzima nitrogenasa

Cabe recalcar que el proceso de bacterias fijadoras de nitrógeno en condiciones aeróbicas es una característica principal del género *Azotobacter* que tolera el oxígeno, durante la fijación de nitrógeno ya que cuenta con una protección respiratoria de la enzima nitrogenasa ( Aasfar et al., Chavez - Jacobo, 2021).

Según las proteínas de dos componentes de la nitrogenasa dependen de un cofactor Mo-Fe (Molibdeno – Hierro) que es el más eficiente ligando al N<sub>2</sub> reduciéndolo al amoniac; estas proteínas de dos componentes actúan juntas para catalizar la reducción de di- nitrógeno en una compleja reacción con una estequiometría de reacción ideal mencionada por (Aasfar et al., 2021). que se muestra a continuación:



La proteína Fe es un homodímero que contiene dos nucleótidos o sitios de unión (MgATP o MgADP), uno en cada subunidad y un único grupo 4Fe-4S que une las dos subunidades. La MoFe-nitrogenasa es un heterotetrámero a, b. Cada dimérico a, b. contiene dos metaloclusters únicos: un P-cluster (8 Fe-7S) y un cofactor FeMo (FeMo-co). Durante el ciclo catalítico la proteína Fe se une a una unidad ab de proteína MoFe. Durante este encuentro, un electrón se transfiere del grupo 4 Fe-4S a la proteína MoFe. Este paso de transferencia de electrones está acoplado en la hidrólisis de un mínimo de dos moléculas de Mg ATP. La siguiente transferencia de electrones e hidrólisis de ATP, es la proteína Fe que se desconecta de la proteína MoFe y en su lugar se une una nueva proteína Fe para repetir el ciclo (figura 7). Dado que sólo hay un electrón transferido por ciclo, deben ocurrir un mínimo de ocho encuentros para reducir N como lo demuestra la ecuación. Detalladas de la proteína Fe, los grupos P y el cofactor están disponibles (Chavez Jacobo, 2021).



**Figura 7.** Proceso por el que *Azotobacter spp.* fija el nitrógeno atmosférico de forma no simbiótica. (Fuente: Aasfar et al., 2021).

## 2.4.9 Filogenia y taxonomía del gen 16S rADN

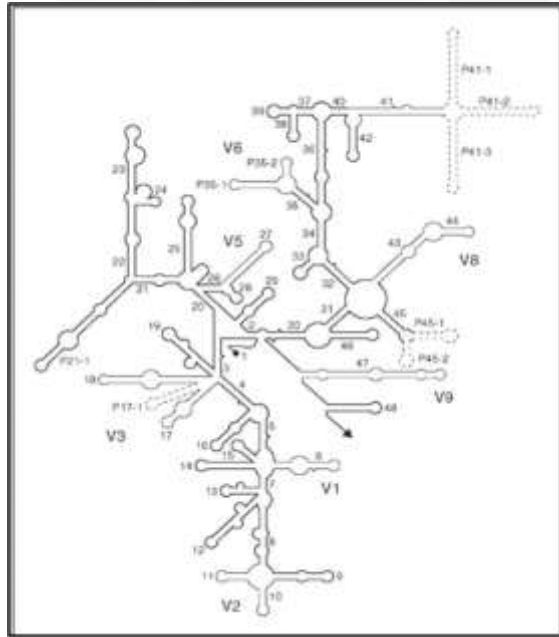
### ♦ 16S rRNA

Se trata de un polirribonucleótido de 1.500 nt que está codificado por el gen rrs, comúnmente conocido como ARN 16S ADN ribosómico, de cuya secuencia pueden derivarse datos taxonómicos y evolutivos. Al igual que todas las secuencias de nucleótidos monocatenarios, el ARN 16Sr se pliega en una estructura secundaria que se distingue por la presencia de secciones monocatenario y bicatenario alternativamente. El ARNr 18S es la macromolécula correspondiente en los eucariotas. (Jimenez – Avella, 2007)

Dado que los 16Sr RNA y 18S proceden de las subunidades pequeñas de los ribosomas, el acrónimo ARNr SSU (del inglés, small subunit) se utiliza para ambos. Los ARNr SSU presentan regiones que son universales para todos los organismos y están muy conservadas. Sin embargo, también presentan variantes que se localizan en regiones concretas. (figura 8)

El análisis de secuenciación del ARN 16Sr de varios grupos filogenéticos permitió descubrir un hallazgo adicional de enorme importancia práctica: la existencia de una o más secuencias distintivas conocidas como oligonucleótidos signatura. Se trata de secuencias breves y especializadas que son exclusivas de un determinado grupo filogenético y que están ausentes o son extremadamente raras en otros grupos, incluso en los más cercanos. Se encuentran en todos o en la mayoría de los miembros de ese grupo. Como resultado, cada bacteria puede asignarse a un grupo distinto utilizando firmas de oligonucleótidos.





**Figura 8.** Estructura secundaria del ADNr 16S (adaptado de Neefs et al., bajo el permiso Oxford University Press, Reino Unido). El término "hélices universales" se refiere a las hélices que están presentes en todos los seres vivos y están numeradas del 1 al 48 en secuencia de aparición desde el extremo 59. Pa-b, donde an es el número de la hélice universal anterior y b el número de serie, representa las hélices específicas de procariontes. En negrita se indican las secciones que están comparativamente conservadas.

Las regiones variables, en líneas finas, se designan V1-V9, teniendo en cuenta que V4 es exclusiva de eucariotas. Las regiones que se muestran en líneas discontinuas sólo están presentes en un número limitado de estructuras.

#### ♦ *Características relevantes del 16Sr RNA*

Aunque existen otros cronómetros moleculares además del ARN 16Sr, ninguno de ellos ha podido sustituirlo hasta ahora. En realidad, esta macromolécula posee una serie de rasgos que la han convertido en el patrón oro de los cronómetros moleculares:

1. Se encuentra en todos los microorganismos vivos actuales y es una sustancia química extremadamente antigua. Por tanto, puede identificarse utilizando cualquier diana universal.
2. Debido a su larga historia de estabilidad tanto en estructura como en función, los cambios en la secuencia son muy probablemente el resultado de fluctuaciones aleatorias.
3. Junto con las variaciones en los ARNr 18S, los cambios se producen con suficiente lentitud como para ofrecer información sobre todos los procariontes a lo largo de toda la escala evolutiva. No obstante, existe suficiente variación en los ARNr SSU para distinguir entre los organismos más próximos y los más lejanos.

4. La longitud comparativamente larga del ARN 16Sr (1.500 nt) reduce las variaciones estadísticas.
5. La conservación de la estructura secundaria puede facilitar las comparaciones y ofrecer una base para una alineación precisa.
6. Debido a la facilidad de secuenciación de los ARN 16S, existen grandes bases de datos en constante expansión.

El grado de similitud entre las secuencias de ARN 16Sr de dos bacterias revelará su relación evolutiva una vez identificada la secuencia de nucleótidos y realizadas las comparaciones. Además, los árboles filogenéticos -que representan visualmente la genealogía biológica de la bacteria e ilustran su lugar evolutivo en el contexto de la especie objeto de comparación- pueden crearse mediante el análisis comparativo de secuencias.

Sin embargo, cabe destacar que un indicador preciso de los vínculos evolutivos procede de la comparación de genomas completos, no de la comparación de ARN 16S. En caso de que no existan, se denomina especie bacteriana al conjunto de cepas que presentan un grado de similitud igual o superior al 70% en los ensayos de reasociación ADN-ADN. Las cepas con este grado de parentesco suelen contener un 97% o más de identidad entre sus genes de ARN 16S, como demostraron Stackebrandt y Goebel.

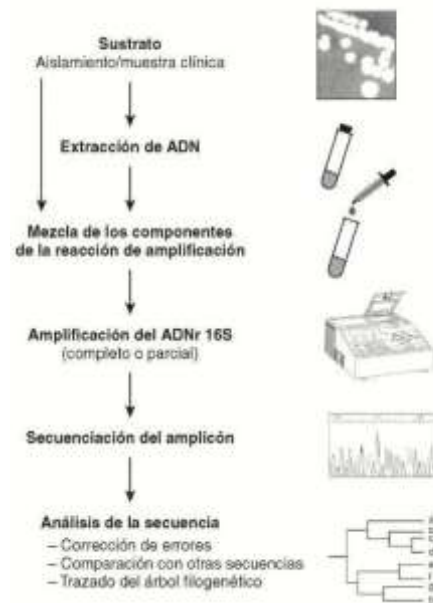
Por lo tanto, es improbable que cepas con una identidad de secuencia de ARN 16Sr inferior al 97% estén relacionadas entre sí a nivel de especie. Por otra parte, algunas cepas muestran una identidad del 99-100% a nivel del ARN 16S y, sin embargo, comparten menos del 50% de similitud en los estudios de reasociación, lo que lleva a clasificarlas como especies distintas. Por consiguiente, en la presente taxonomía se aconseja la identificación polifásica, que combina datos de secuenciación con criterios fenotípicos.

Esto sugiere que la secuenciación del ARN 16Sr no siempre permite una identificación concluyente a nivel de especie en microbiología clínica.



♦ *Aspectos metodológicos de la identificación bacteriana mediante secuenciación del 16Sr RNA.*

El enfoque molecular de la secuenciación del ADNr 16S para la identificación bacteriana consta de tres pasos: a) amplificación del gen a partir del material pertinente; b) determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón; y c) análisis de la secuencia del amplicón. Figura 9



**Figura 9.** Procedimientos aplicados para el reconocimiento de bacterias, aplicando la secuenciación del ADNr 16S.

♦ *La amplificación del 16Sr RNA*

La reacción en cadena de la polimerasa se realiza en un termociclador (PCR). Normalmente, se utiliza como sustrato ADN purificado a partir de un cultivo puro de un patógeno. Alternativamente, cuando la muestra procede de órganos o tejidos típicamente estériles y contiene bacterias fastidiosas o no cultivables, el ADN puede extraerse directamente de la muestra clínica. Existen procedimientos generales para la extracción de ADN bacteriano, pero dependiendo del tipo de bacteria, podrían ser necesarios ajustes. Además, la amplificación puede realizarse directamente a partir de una muestra clínica, un cultivo líquido o una colonia aislada de la bacteria objetivo. Esto simplifica enormemente la identificación, ya que elimina la necesidad del largo procedimiento de extracción de ADN.

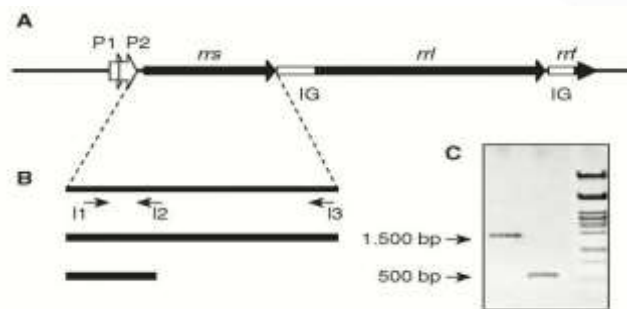
♦ *Oligonucleótidos iniciadores*

Las zonas conservadas facilitan el diseño de oligonucleótidos cebadores (de unos 20 nt) para la amplificación del ARN 16S. Los cebadores basados en secuencias conservadas entre los extremos 59 y 39 del gen se emplean para crear amplicones de 1.500 pb cuando el objetivo es amplificar la casi totalidad del ARN 16Sr. aproximadamente. Sin embargo, se ha demostrado que la amplificación y secuenciación completas del ARN 16S no siempre son necesarias para una

identificación fiable. En estas condiciones, se emplearán oligonucleótidos que faciliten la amplificación de fragmentos más cortos, idealmente la región de 500 pb que corresponde al extremo 5' del gen.

En cualquier caso, lo mejor es utilizar la electroforesis en gel de agarosa para verificar que el resultado contiene un único fragmento del tamaño adecuado antes de pasar al siguiente paso.

Figura 10.



**Figura 10.** El operón ribosómico (rrn). A) Ilustración esquemática del operón, mostrando los promotores P1 y P2, las regiones intergénicas (IG) y los genes estructurales de los tres tipos de ARNr (rrs, rrl y rrf). B) Enfoque de amplificación del gen rrs (16S rDNA). Para la amplificación (y posterior secuenciación) de todo el gen (I1-I3; amplicón de aproximadamente 1500 pb) o de un fragmento más pequeño (I1-I2; 500 pb correspondientes al extremo 5' del gen; véase la explicación en el texto), se indican las posiciones de los cebadores I1 (directo), I2 (intermedio) e I3 (inverso). C) Los dos fragmentos se observaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

#### ◆ *Secuenciación del amplicón*

En este punto se realizan las reacciones de secuenciación y el análisis electroforético del producto. Actualmente, en la secuenciación cíclica se emplean terminadores marcados con los fluorocromos necesarios y un único cebador por reacción, una reacción comparable al proceso de amplificación. Esto permite la interrupción aleatoria de la síntesis y facilita el reconocimiento posterior de los fragmentos interrumpidos.

El proceso de detección es mucho más fácil gracias a la disponibilidad de secuenciadores automáticos. Un secuenciador automático puede producir de 500 a 900 bases, dependiendo del capilar que se utilice para la electroforesis. Por lo tanto, se necesitarán de 8 a 4 cebadores -dos de los cuales podrían ser los mismos que los utilizados para la amplificación- para la secuenciación de las dos cadenas del ADNr 16S completo. Sin embargo, como indica N, la secuencia obtenida puede tener lugares inciertos o contener errores. Por consiguiente, para resolver cualquier incoherencia y adquirir la secuencia definitiva, deben evaluarse los electroferogramas y alinearse las cadenas directa e inversa. Por lo tanto, aunque la secuenciación de una sola hebra del amplicon

puede dar lugar a una identificación precisa, cuando se comparan ambas hebras para corregir errores, la calidad de la secuencia será óptima.

Como ya se ha mencionado, la secuenciación de todo el ADNr 16S no siempre es necesaria para la identificación a nivel de especie de las bacterias. En realidad, la mayor parte de la diversidad se localiza en las primeras 500 bases, o el extremo 59, aunque haya lugares filogenéticamente significativos en todo el gen. Por lo general, sólo se necesitan dos cebadores para identificar correctamente un aislado clínico utilizando esta secuencia de 500 bases. En cualquier caso, para descubrir nuevas enfermedades, será necesario secuenciar ambas cadenas del ADNr 16S completo.

## Capítulo III: Diseño metodológico

### 3.1 TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Se llevó a cabo una investigación experimental, en el que se evaluó el efecto al inocular bacterias fijadoras de nitrógeno en plantas. Las muestras fueron tomadas en campo y clasificadas dentro del laboratorio por secciones de la planta, con la finalidad de determinar la presencia de las bacterias fijadoras de nitrógeno y su mayor incidencia en diferentes partes de la planta como son: raíz, tallo, hojas y suelo rizosférico en el cultivo de caña de azúcar.

El presente trabajo de titulación es de un enfoque cuantitativo y cualitativo de tipo observacional con un nivel de alcance descriptivo con un diseño experimental, la elaboración de este ensayo fue en el laboratorio de Fitopatología, utilizando muestras vegetales provenientes de seis variedades comerciales de caña de azúcar las cuales fueron analizadas aplicando técnicas de laboratorio del tipo bioquímico y mediante técnicas de biología molecular, las mismas que permitieron determinar la presencia y/o actividad de las bacterias del género *Gluconacetobacter spp.* y los datos generados fueron analizados mediante el diseño completamente al azar mediante el programa estadístico InfoStat.

Dentro de la metodología se incluyó la identificación por método de observación directa en microscopio en base a la morfología y mediante el análisis bioquímico, esta metodología incluirá el análisis mediante técnicas de biología molecular para la confirmación taxonómica de la bacteria.

#### 3.1.1 La población y la muestra

La población en caña de azúcar (*Saccharum spp.*) fue tomada del lote **1060604**, con 10.4 hectáreas y el tipo de suelo franco limoso a la edad de 4.2 meses fue sembrado con seis variedades comerciales diferentes. De este lote se obtuvieron las muestras para el aislamiento de cepas nativas del género (*Gluconacetobacter spp.*) en las seis variedades de caña de azúcar y suelo rizosférico.

##### 3.1.1.1 Características de la población

Es importante mencionar que para este estudio se consideró seis variedades comerciales, cinco de origen ecuatoriano y una de origen colombiano: ECU-01, EC-02, EC-07, EC-08, EC-09, CC85-92 y suelo rizosférico.

### 3.1.1.2 Delimitación de la población

Los estudios de esta investigación se llevaron a cabo en el lote **1060604** del ingenio San Carlos ubicado en el cantón Coronel Marcelino Maridueña, cuyas coordenadas geográficas son 2°15'14.7" latitud sur y 79°28'09.8" longitud oeste, a una altitud de 41 msnm. En el laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador (CINCAE), en el período comprendido entre diciembre 2023 y marzo del 2024. El CINCAE está ubicado en el Km 49.6 vía Durán-El Triunfo, cuyas coordenadas geográficas son 79°26'83" longitud este y 02°19'33" latitud sur, a una altitud de 45 msnm.

### 3.1.1.3 Tipo de muestra

En el cultivo de caña de azúcar, se aisló *Gluconacetobacter spp.* a partir de tallo, hoja, raíz y suelo rizosférico.

### 3.1.1.4 Tamaño de la muestra

El muestreo se realizó con 20 puntos escogidos al azar de cada variedad comercial de caña de azúcar: ECU-01, EC-02, EC-07, EC-08, EC-09, CC85-92 en donde se tomaron: hojas, tallos, raíces y suelo rizosférico. Las muestras fueron al laboratorio de Fitopatología donde se homogenizaron por cada órgano, obteniendo una muestra compuesta a sembrar en medio LGI-P.

### 3.1.1.5 Proceso de selección de la muestra

*Suelo.* - mediante el uso del barreno, se colecto veinte submuestras al azar de cada variedad hasta completar la cantidad de 250 g. Posteriormente se llevó al laboratorio para homogenizar bien la muestra y se pesó 1 g de suelo en 10 ml de solución azucarada al 0.85%, posteriormente se sembró 100 ul de solución de suelo en medio semisólido LGI-P.

*Raíz.* - El sistema radicular fue cortado y lavado con agua de la llave hasta que no exista presencia de suelo rizosférico, se secó por 10 minutos y luego se pesó y se colocó dentro de un vaso de licuadora con 20 ml de solución azucarada (0.85 % de solución sacarosa), posteriormente se tamizó el contenido haciendo uso de una gasa estéril y se tomaron 100 ul del sobrenadante para ser sembrado en medio semisólido LGI-P.

*Tallos y Hojas.* - Las muestras colectadas en campo fueron desinfectadas de manera externa con solución de tween al 0.1% según (Dubit et al; 2004), para los tallos, se cortaron trozos en cada entrenudo de aproximadamente 5 cm de alto por 1.5 cm de diámetro haciendo uso de la maquina extractora de yemas del CINCAE, posteriormente fueron llevados todos los tallos hacia el laboratorio de Fitopatología en donde se homogenizaron para tener una muestra compuesta de cada variedad, finalmente se macero de manera manual hasta obtener como mínimo 20 ml de jugo, luego se sembró 100 ul sobre medio semisólido LGI-P.

En hojas se cortó la parte media de la lámina foliar de las 20 plantas muestreadas de cada variedad con ayuda de una perforadora de un agujero, se obtuvieron en total de 100 a 200 discos por variedad, posteriormente se colocaron dentro un mortero y se colocó 10 ml de solución azucara al 0.85 % macerando de manera manual hasta obtener una coloración verde reluciente. Se sembró 100 ul en medio semi solido LGI-P.

### 3.2 LOS MÉTODOS Y LAS TÉCNICAS

El método para la obtención de la toma de muestras en el cultivo de caña de azúcar fue al azar en seis variedades comerciales y en suelo rizosférico mediante las técnicas que se describen a continuación:

#### 3.2.1 Aislamiento de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Para el proceso de aislamiento de estas bacterias, se lo realizo mediante el uso de método selectivo con medio de cultivo agar semisólido LGI-P.

#### 3.2.2 Proceso de purificación y conservación de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Para el proceso de purificación de las colonias bacterianas, se preparó el agar selectivo solido LGI-P enriquecido con extracto de levadura en donde fueron sembradas la UFC e incubadas a 30°C durante 7 a 10 días. Posteriormente se seleccionaron las UFC para ser repicadas en el medio solido de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) para obtener su pureza y posterior almacenamiento.

Para la preservación de las cepas se utilizó criotubos de 1.5 ml, colocando 400 µl de medio liquido LGI más 400 µl de glicerol al 30%, y 200 µl de caldo bacteriano de *Gluconacetobacter spp.*, crecido a 30°C en medio liquido LGI por 4 días. Luego se dejó reposar por el tiempo de 1 hora a 4°C y después se guardó a -20°C.

#### 3.2.3 Identificación de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

La identificación de las cepas fue realizada considerando el criterio de pruebas de: motilidad, oxidasa, catalasa, tinción de Gram, entre otras características bioquímicas tales como crecimiento en medio libre de nitrógeno LGI-P, sacarosa al 30%, glucosa al 30%, ETOH 1%; ETOH 10%.

#### 3.2.4 Caracterización Molecular de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

La caracterización molecular para este tipo de bacterias se la llevo a cabo mediante los siguientes procesos:



- a) Extracción de ácido desoxirribonucleicos (ADN) para *Gluconacetobacter spp.*, mediante el método TENS (Sambrook, 2006). EL buffer de extracción TENS contiene 50 mM de Tris HCL 1M pH 8, 50mM de EDTA 0,5 M pH 8; 100mM de ClNa 5M; 1% de SDS al 10%. Las 19 cepas de bacterias Gram. negativas fueron procesadas en la fase exponencial (1X10<sup>8</sup> ufc); 1.5 ml de caldo bacteriano fue representativo para la extracción de ADN genómico.
- b) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El proceso de elaboración y el manejo de las muestras deben realizarse sobre hielo y en condiciones de asepsia. Para la preparación del mix de PCR se debe tomar en cuenta el número de muestras a analizar más + Cext (-) + Creac (-) + 1 (reacción adicional la cual evita que falte reactivo en el momento de repartir el mix a los tubos de reacción).

Por cada tubo de reacción adicionar 33.8 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura; 5 µl de buffer 10X; 4 µl de Cl<sub>2</sub>Mg 2mM; 4 µl de dNTPs 200uM; 1µl de primers 25pM Forwards; 1 µl de primers 25 pM Revers; 0.2 µl taq 1U. Y 1 µl de ADN dando un volumen final de 50 µl.

Se trabajó con dos juegos de primers para caracterización del género *Gluconacetobacter spp.*, cuya información se obtuvo de publicaciones; los primers a probar fueron los siguientes: 16SrRNAFC27/16SrRNARC1492 tamaño de amplicon es de 1.500 pb y 16SrRNARC1492/ 16SrRNAF1114 tamaño de amplicon es de 450 pb (Gontang et al, 2007).

Para la amplificación de *Gluconacetobacter diazotrophicus* se trabajó con 1 juego de primer: G. diazotrophicus Fw/ Rw (diseño de primer, cuyo producto de amplificación es de 218 Pb).

Se utilizó el termociclador Techne Flexigen para llevar a cabo la reacción de amplificación PCR. El protocolo incluía cinco minutos de pre-desnaturalización a 95°C, un segundo segmento consistente en 35 ciclos, un minuto de desnaturalización a 95°C, un minuto de hibridación a 60°C, un minuto de polimerización a 72°C, y cinco minutos de extensión final a 72°C.

La visualización de fragmentos amplificados con 3 juegos de primers fue realizada mediante la colocación de muestras en cada pocillo del gel de agarosa al 2% en TBE 1X; posteriormente se migró a 125V, durante 1 hora; en este paso se omite

el proceso de tinción, ya que al gel antes de solidificarse, se le adiciono el componente SYBR® Gold nucleic acid gel stain, (el mismo que fue mezclado con 10 µl del SYBR® Gold por cada 100 ml de TBE 1X. Para la visualización de los productos de PCR, se utilizó el equipo trans iluminador BioDoc-It TM System UV.

### **3.2.5 Preparación de Inoculo Bacteriano**

A partir de cada cepa aislada del género *Gluconacetobacter spp.*, se sembró 1 UFC en 10ml de medio líquido LGI-P se dejó incubando a 30°C durante el periodo de 3 a 4 días. Posteriormente se realizó el conteo mediante la Densidad Óptica (D.O.) 600nm de longitud de onda haciendo uso del espectrofotómetro marca Perkin Elmer Lambda 25 (Laboratorio Químico - CINCAE).

Después cada cepa contenida en tubos de 10 ml fue colocada en el interior de un frasco que contenía 140 ml de medio liquido LGI-P e incubadas a 30°C durante 3 a 4 días para su respectivo inoculo (Laboratorio de Fitopatología -CINCAE).

El método que se utilizó en inoculación fue el de inmersión de plántulas de semilla sexual por 1 hora a 30°C antes de ser sembrada en sustrato pobre de elementos importantes N, P y K. (Laboratorio Químico - CINCAE).

### **3.3 PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO DE LA INFORMACIÓN.**

Para esta investigación, se empleó el diseño completamente al azar (DCA) como variables independientes con 8 tratamientos de diferentes cepas bacterianas del género *Gluconacetobacter spp.*, y tres repeticiones inoculadas en plantas provenientes de semilla sexual de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) y como variable dependiente: altura (mm), sistema radicular (mm) y peso (mg) en cinco plántulas tomadas al azar de semilla sexual a los 30 días de la etapa de crecimiento.



## Capítulo IV: Análisis e Interpretación de Resultados

### 4.1 Aislamiento de *Gluconacetobacter spp.*

Se aislaron un total de 19 colonias en diferentes órganos de la caña de azúcar de las seis variedades comerciales: 6 colonias en raíz, 6 colonias en tallo, 1 colonia en hoja y 6 colonias en suelo rizosférico. Sembradas en medio semisólido LGI-P a 30°C por un período de 7 a 10 días. tabla 7

**Tabla 7.** Crecimiento en medio semisólido LGI-P.

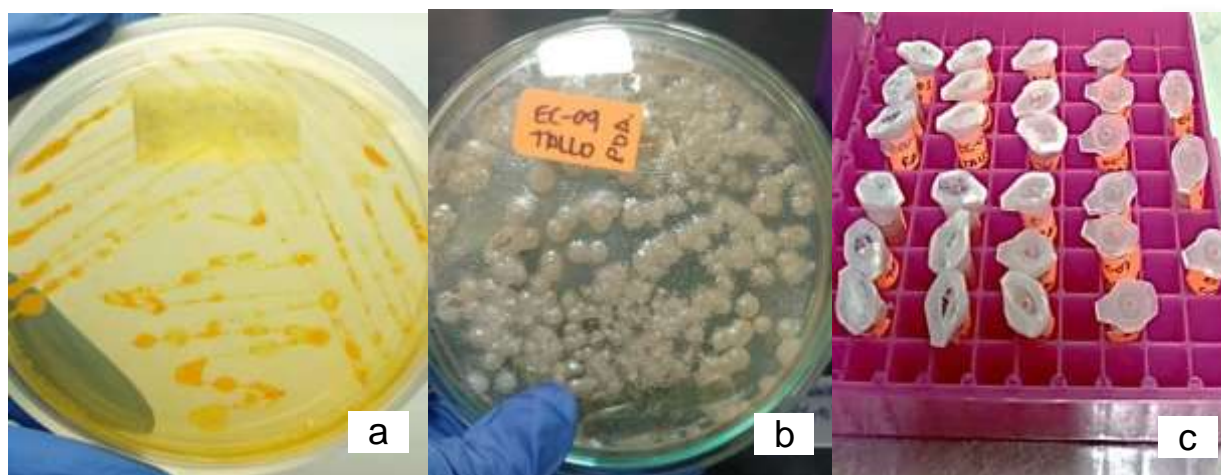
Ingenio	Lote	Variedades	<i>Gluconacetobacter spp.</i>			
			hoja	tallo	raíz	suelo
San Carlos	1060604	ECU-01	-	+	+	+
		EC-02	-	+	+	+
		EC-07	-	+	+	+
		EC-08	-	+	+	+
		EC-09	+	+	+	+
		CC85-92	-	+	+	+

+ = presencia de *Gluconacetobacter spp.*

- = ausencia de *Gluconacetobacter spp.*

### 4.2 Purificación y conservación de *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Posteriormente las 19 cepas aisladas fueron purificadas para garantizar la pureza de cada cepa en medio sólido LGI-P y PDA, y conservadas por triplicado a -20°C (figura 11). Posteriormente se observó la morfología de cada cepa de acuerdo con el color, forma y tamaño. tabla 8



**Figura 11.** Purificación de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. a) medio sólido LGI-P, b) medio sólido PDA y c) conservación en medio líquido LGI con glicerol al 30%.

**Tabla 8.** Morfología bacteriana de las 19 cepas aisladas en caña de azúcar y suelo rizosférico.

Variedades	Origen de las cepas	Nombre de las cepas	Morfología	
			LGI-P	PDA
ECU-01	tallo	gt1	NIM	CRM
	raiz	gr1	NRM	CRM
	suelo	gs1	NIG	CRP
EC-02	tallo	gt2	NIG	CRM
	raiz	gr2	NRM	CRM
	suelo	gs2	NIM	CRM
EC-07	tallo	gt7	NRM	CRM
	raiz	gr7	NIM	CRP
	suelo	gs7	NIM	CRP
EC-08	tallo	gt8	NIG	CRM
	raiz	gr8	NRM	CRM
	suelo	gs8	NIG	CRP
EC-09	tallo	gt9	NRM	CIG
	raiz	gr9	NRP	CRM
	suelo	gh9	NIG	CRP
	hoja	gs9	NIG	CRP
CC85-92	tallo	gt85	NIM	CRM
	raiz	gr85	NIG	CRP
	suelo	gs85	NIG	CRM

LGI-P = N (naranja) R(redondo) I (irregular) G (grande) M (mediano) P (pequeño)

PDA= C (café) Cr(crema) R (redondo) I (Irregular)G (grande) M (mediano) P (pequeño)

### 4.3 Identificación de *Gluconacetobacter spp.*

Identificación bioquímica de 19 cepas aisladas en caña de azúcar que fueron evaluadas mediante diferentes métodos como tinción de Gram en donde su coloración rosada es considerada como bacterias Gram -, carbohidratos en medios líquidos y oxidación enzimática como oxidasa y catalasa, logrando confirmar que 17 cepas corresponden al perfil bioquímico del género *Gluconacetobacter spp.* tabla 9

**Tabla 9.** Resultado de pruebas bioquímicas en 19 cepas aisladas en caña de azúcar y suelo rizosférico.

		ECU-01		EC-02		EC-07		EC-08		EC-09		CC85-92								
		T	R	S	T	R	S	T	R	S	T	R	S	H	T	R	S			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Características	Bacilo corto	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Bacteria gram negativa	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Movilidad	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Aeróbicas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Productoras de indol	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Actividad nitrogenasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Carbohidratos	D-fructosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	D- glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	manitol	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	D- sucrosa	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	D- maltosa	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
	lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	D- arabinosa	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
	D- sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
D- xylosa	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-		
Oxidación enzimática	Etanol o ácido acético	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Oxidasa	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
	Catalasa	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-		

T=tallo, R=raíz, H=hoja y S= suelo rizosférico

+= positivo

-= negativo

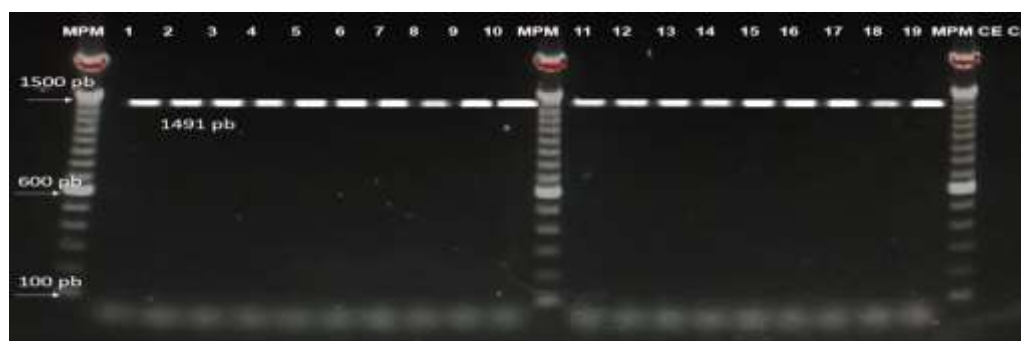
#### 4.4 Caracterización Molecular de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Las 19 cepas aisladas fueron caracterizadas como *Gluconacetobacter diazotrophicus* mediante la técnica de PCR con un juego de iniciadores diseñados en base al alineamiento de secuencia de la región intergénica espaciadora de los genes 16-23Sr DNA de bacterias del género *Gluconacetobacter*: *G. diazotrophicus* Fw 5'- AGC TGG GTG GGG TAA AG -3' y *G. diazotrophicus* Rv 5'- GTA CCG TCA TCA TCG TCC CC -3' cuyo producto amplificado es 218 pb., migrado en un gel de agarosa al 1.2% . Figura 12



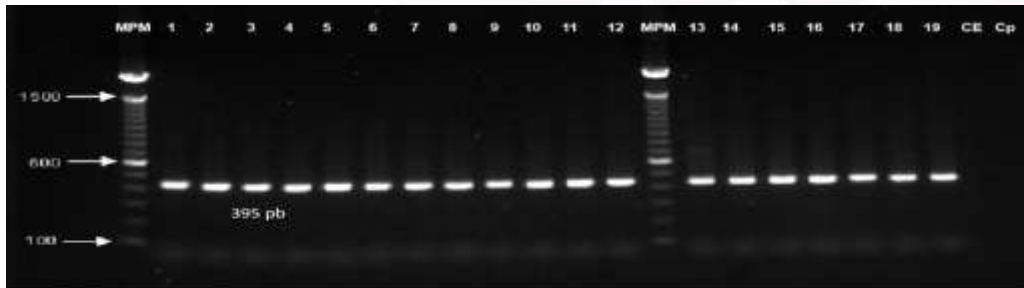
**Figura 12.** Resultado de PCR para *Gluconacetobacter diazotrophicus* Fw / Rv. MPM marcador de peso molecular Línea 1. Cepa gt1 EC-01; 2. Cepa gr1 ECU-01; 3. Cepa gs1; 4. Cepa gt2 EC-02; 5. Cepa gr2 EC-02 6. Cepa gs2; 7. Cepa gt7 EC-07; 8. Cepa gr7 EC-07; 9. Cepa gs7; 10. Cepa gt8 EC-08; 11. Cepa gr8 EC-08; 12. Cepa gs8; 13. Cepa gt9 EC-09; 14. Cepa gr9 EC-09; 15. Cepa gs9; 16. Cepa gh9 EC-09; 17. Cepa gt85 CC85-92; 18. Cepa gr85 CC85-92; 19. Cepa gs85; CE. Control negativo de extracción; Cp. Control negativo de PCR.

Posteriormente se trabajó con dos juegos de iniciadores universales que se utilizan en la secuenciación y caracterización del gen 16SrDNA para determinar género y especie en bacterias: el primer juego de iniciadores es 16SrRNAFC27 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3' / 16SrRNARC1492 5'- TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T -3'; y el segundo juego de iniciadores es 16SrRNAF1114 5'- GCA ACG AGC GCA ACC C -3' / 16SrRNARC1492 5'- TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T -3' cuya información se obtuvo de una publicación, (Gontang et al, 2007). Figura 13 y 14



**Figura 13.** Resultado de PCR para 16SrRNA FC27/RC1492. MPM marcador de peso molecular Línea 1. Cepa gt1 EC-01; 2. Cepa gr1 ECU-01; 3. Cepa gs1; 4. Cepa gt2 EC-02; 5. Cepa gr2 EC-02 6. Cepa gs2;

7. Ceba gt7 EC-07; 8. Ceba gr7 EC-07; 9. Ceba gs7; 10. Ceba gt8 EC-08; 11. Ceba gr8 EC-08; 12. Ceba gs8; 13. Ceba gt9 EC-09; 14. Ceba gr9 EC-09; 15. Ceba gs9; 16. Ceba gh9 EC-09; 17. Ceba gt85 CC85-92; 18. Ceba gr85 CC85-92; 19. Ceba gs85; CE. Control negativo de extracción; Cp. Control negativo de PCR.



**Figura 14.** Resultado de PCR para 16SrRNA F1114/RC1492. MPM marcador de peso molecular Línea 1. Ceba gt1 EC-01; 2. Ceba gr1 ECU-01; 3. Ceba gs1; 4. Ceba gt2 EC-02; 5. Ceba gr2 EC-02 6. Ceba gS2; 7. Ceba gt7 EC-07; 8. Ceba gr7 EC-07; 9. Ceba gs7; 10. Ceba gt8 EC-08; 11. Ceba gr8 EC-08; 12. Ceba gs8; 13. Ceba gt9 EC-09; 14. Ceba gr9 EC-09; 15. Ceba gs9; 16. Ceba gh9 EC-09; 17. Ceba gt85 CC85-92; 18. Ceba gr85 CC85-92; 19. Ceba gs85; CE. Control negativo de extracción; Cp. Control negativo de PCR.

#### 4.5 Inoculo Bacteriano.

Antes de la inoculación con diferentes tratamientos que van a partir de dos combinaciones (T1, T2, T3, T4 y T6), tres combinaciones (T5) y seis combinaciones (T7) de cepas del género *Gluconacetobacter spp.* fueron analizados por espectrofotometría a una absorbancia D.O. / 600 nm de longitud de onda en todos los tratamientos crecidos en medio líquido. Tabla 10

**Tabla 10.** Resultados de concentración bacteriana mediante el uso del espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 25.

Densidad óptica	Identificación de muestra	Concentracion	Valor
600	Blanco	1,0000 µg/mL	0,0000
600	Tratamiento 1	1,0000 µg/mL	0,0966
600	Tratamiento 2	1,0000 µg/mL	0,1768
600	Tratamiento 3	1,0000 µg/mL	0,0798
600	Tratamiento 4	1,0000 µg/mL	0,1123
600	Tratamiento 5	1,0000 µg/mL	0,0943
600	Tratamiento 6	1,0000 µg/mL	0,0486
600	Tratamiento 7	1,0000 µg/mL	0,1568
600	Tratamiento 8	1,0000 µg/mL	0,0000

## **4.6 Procesamiento estadístico de la información.**

El ensayo de inoculación se llevó a cabo dentro de un invernadero con cubierta de plástico en donde se analizaron los parámetros de crecimiento vegetal de las plántulas de caña de azúcar que fueron sometidas a diferentes tratamientos con cepas de bacterias aisladas; para este ensayo se empleó un diseño experimental controlado basado en el que se análisis de varianza a una vía, comparando las medias utilizando la prueba Tukey, este modelo estadístico es conocido como Diseño Completamente al azar (DCA).

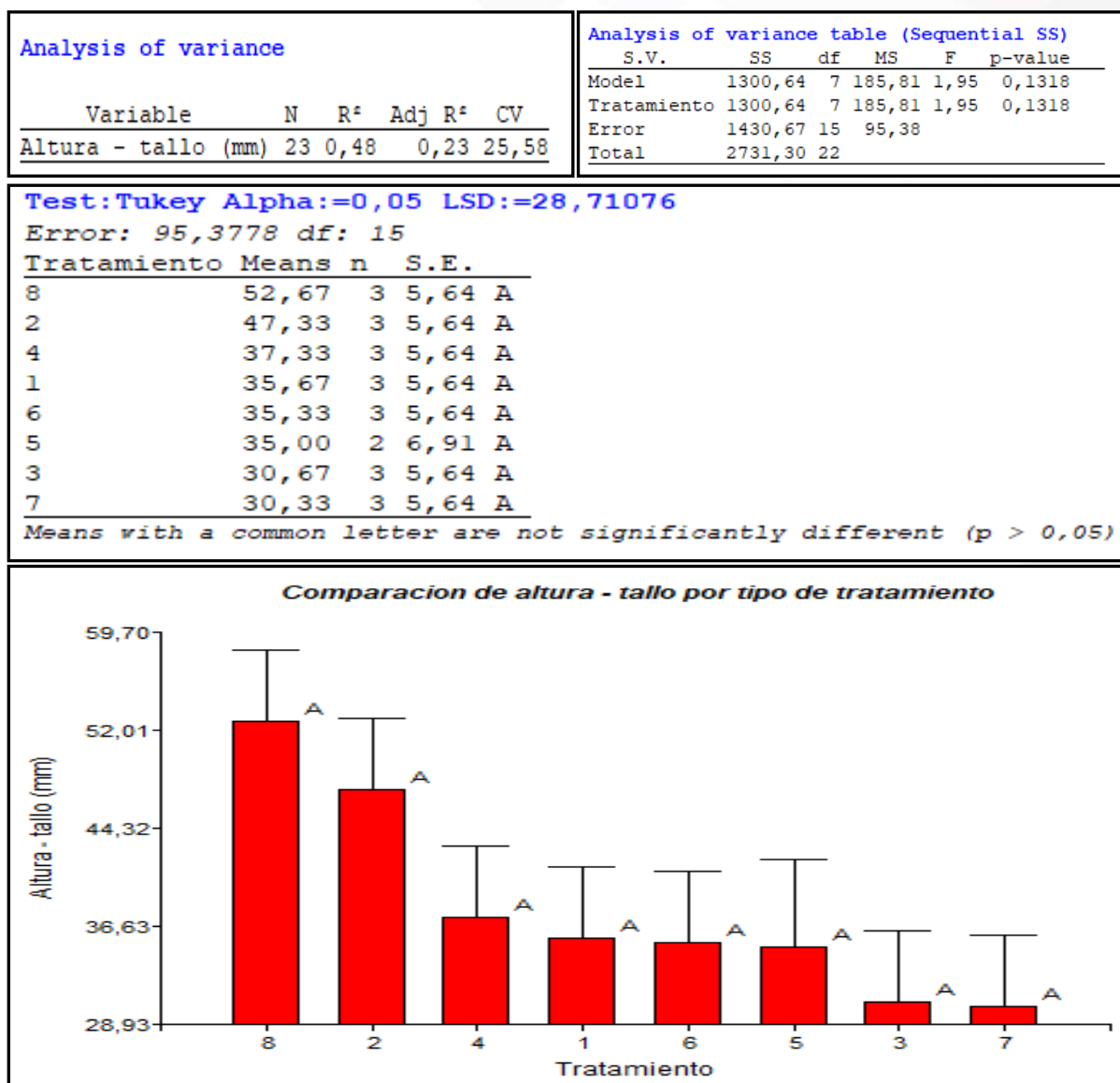
### **4.6.1 Análisis de los resultados**

Este proyecto está centrado en el aislamiento de bacterias nitrificantes y la determinación del uso de diferentes tratamientos con cepas aisladas, con lo que se espera la optimización en el crecimiento de las plantas de caña de azúcar provenientes de semillas sexuales con lo cual se evaluó el desarrollo de las plantas en cuanto a las longitudes y pesos de tallos y raíces.

Esta investigación pretende demostrar otra forma eficiente de fertilización mediante las implementaciones de microorganismos en los cultivos que demuestren ser efectivos y sostenibles; este análisis no solo es fundamental para validar la hipótesis planteada sino también para establecer una base sólida para recomendaciones futuras y estudios avanzados sobre alternativas de fertilización en los cultivos.

#### 4.6.2. Análisis de alturas y pesos alcanzados en cañas de azúcar en condiciones de invernadero

**Tabla 11.** Promedio del desarrollo medidos en milímetros y análisis de varianza, prueba de Tukey realizados a la parte aérea de las plantas desarrolladas en condiciones de invernadero.

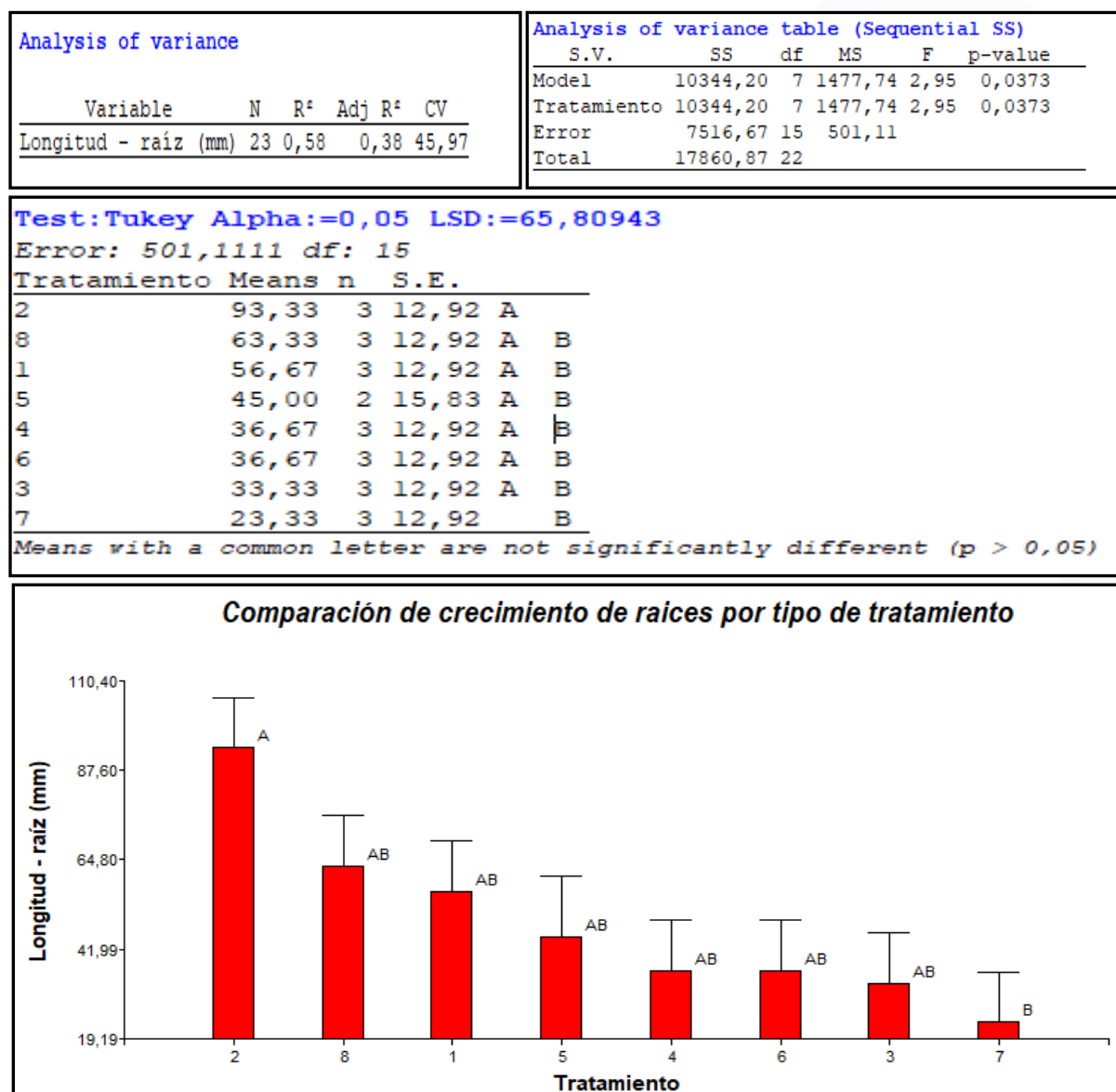


El modelo presenta valores en cuanto el coeficiente de variación (CV) que es de 25.58% lo cual es alto, indicando una variabilidad en la altura de las plantas en relación de la media, este modelo presenta un bajo valor de F (1.95) y un alto valor p (0.1318), lo que sugiere que al menos uno de los tratamientos presento un efecto significativo en la altura de las plantas.



Para este análisis, se implementó la prueba de Tukey con el que se comparó la diferencia entre las medias de los tratamientos indicando que el tratamiento (2), tuvo la segunda media más alta (47.33 cm), después del tratamiento testigo (8), seguido del tratamiento (4) con (37,33) en la gráfica se aprecia la comparación entre altura – tallo, por tipo de tratamiento realizado en las parcelas con plantas de 30 días.

**Tabla 12.** Promedio del desarrollo medidos en milímetros y análisis de varianza, prueba de Tukey realizados a las raíces de las plantas desarrolladas en condiciones de invernadero.



El modelo presenta valores en cuanto el coeficiente de variación (CV) que es de 45,97% lo cual es alto, indicando una variabilidad del crecimiento radicular de las plantas en relación de la media, este modelo presenta un bajo valor de F (2.95) y un bajo valor de p (0.0373), lo que sugiere que los tratamientos presentaron un efecto significativo en el desarrollo de las raíces.



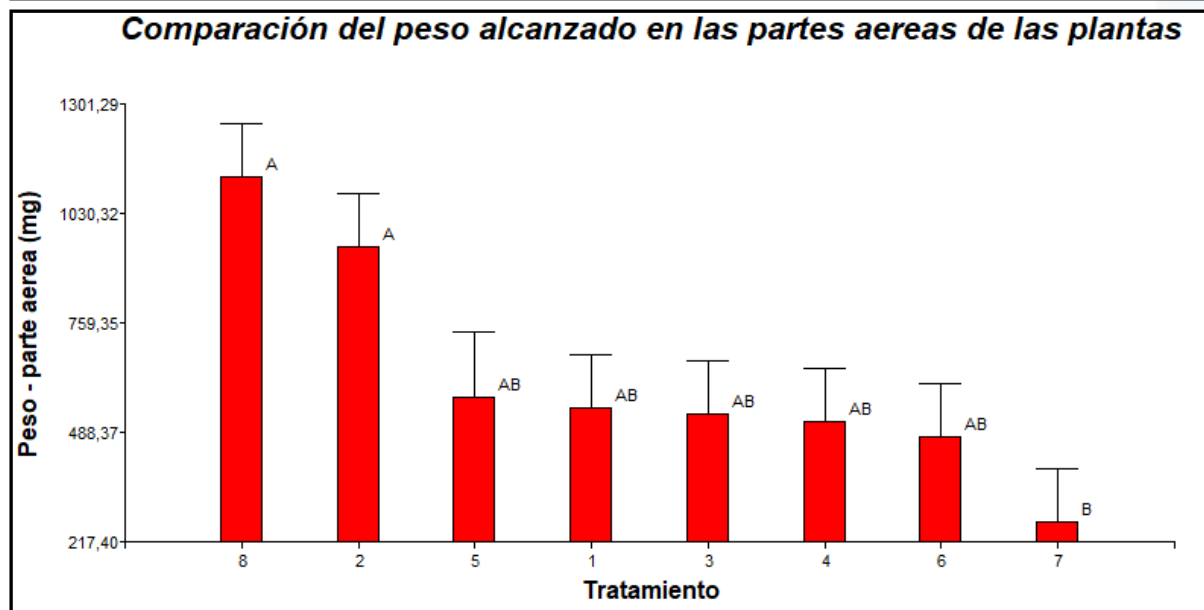
**Tabla 13.** Promedio del peso (mg) alcanzados en las partes aéreas de las plantas aplicándoles el análisis de varianza y prueba de Tukey.

Analysis of variance					Analysis of variance table (Sequential SS)					
Variable	N	R <sup>2</sup>	Adj R <sup>2</sup>	CV	S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Peso - parte aerea (mg)	23	0,67	0,51	36,60	Model	1581190,58	7	225884,37	4,32	0,0083
					Tratamiento	1581190,58	7	225884,37	4,32	0,0083
					Error	784383,33	15	52292,22		
					Total	2365573,91	22			

Test: Tukey Alpha:=0,05 LSD:=672,26366				
Error: 52292,2222 df: 15				
Tratamiento	Means	n	S.E.	
8	1120,00	3	132,03	A
2	946,67	3	132,03	A
5	575,00	2	161,70	A B
1	550,00	3	132,03	A B
3	533,33	3	132,03	A B
4	513,33	3	132,03	A B
6	476,67	3	132,03	A B
7	266,67	3	132,03	B

Means with a common letter are not significantly different (p > 0,05)



El modelo presenta valores en cuanto el coeficiente de variación (CV) de 36.60 % lo cual es alto, indicando una variabilidad en la altura de las plantas en relación de la media, este modelo presenta un bajo valor de F (4.32) y un bajo valor de p (0.0083), lo que sugiere que los tratamientos presentaron un efecto significativo en el desarrollo de las partes aéreas de las plantas de caña de azúcar dentro del invernadero.

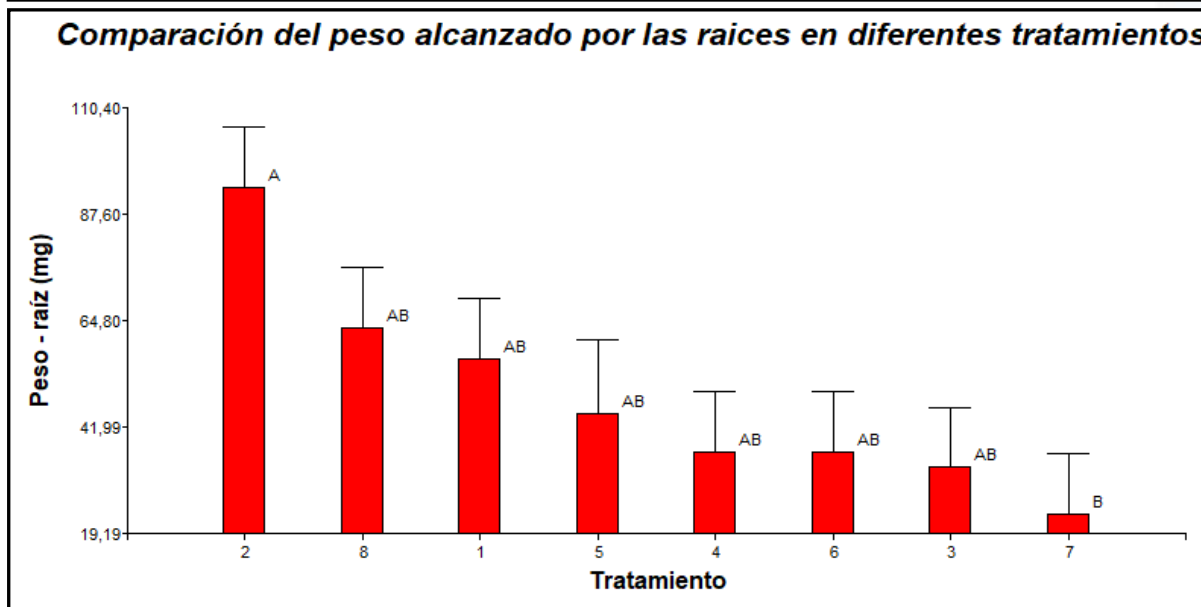
**Tabla 14.** Promedio del peso (mg) alcanzados en las raíces de las plantas aplicándoles el análisis de varianza y prueba de Tukey.

Analysis of variance					Analysis of variance table (Sequential SS)					
Variable	N	R <sup>2</sup>	Adj R <sup>2</sup>	CV	S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Peso - raíz (mg)	23	0,58	0,38	45,97	Model	10344,20	7	1477,74	2,95	0,0373
					Tratamiento	10344,20	7	1477,74	2,95	0,0373
					Error	7516,67	15	501,11		
					Total	17860,87	22			

**Test: Tukey Alpha:=0,05 LSD:=65,80943**  
**Error: 501,1111 df: 15**

Tratamiento	Means	n	S.E.	
2	93,33	3	12,92	A
8	63,33	3	12,92	A B
1	56,67	3	12,92	A B
5	45,00	2	15,83	A B
4	36,67	3	12,92	A B
6	36,67	3	12,92	A B
3	33,33	3	12,92	A B
7	23,33	3	12,92	B

Means with a common letter are not significantly different (p > 0,05)



El modelo presenta valores en cuanto el coeficiente de variación (CV) de 45.97 % lo cual es alto, indicando una variabilidad en cuanto al desarrollo radicular en relación de la media, este modelo presenta un bajo valor de F (2.96) y un bajo valor de p (0.0373), lo que sugiere que los tratamientos presentaron un efecto significativo en el desarrollo de las raíces de las plantas de caña de azúcar dentro del invernadero.

## Capítulo V: Conclusiones y Recomendaciones

### 5.1 Conclusiones

El presente trabajo corresponde a una investigación aplicada que tenía como objetivo principal el aislamiento y caracterización de cepas nativas de bacterias fijadoras de nitrógeno pertenecientes al género *Gluconacetobacter diazotrophicus* asociadas a seis variedades de caña de azúcar y suelo rizosférico en el que se evaluó su uso como biofertilizante.

Los resultados del presente trabajo indican que el aislamiento de las bacterias nativas en raíz, tallo y hoja de seis variedades comerciales de caña de azúcar y suelo rizosférico es posible y que sus aplicaciones, podrían reducir el uso indiscriminado de productos químicos por ser una alternativa de fertilización mediante organismos endófitos en los cultivos, de esta manera reducir la contaminación química en el suelo y agua.

### 5.2 Recomendaciones

Se recomienda que para el aumento de la producción se deben buscar alternativas amigables con el entorno donde se desarrollan los cultivos de caña de azúcar, realizar capacitaciones necesarias sobre fertilizaciones a los cultivos y suelos enfocadas a los pequeños cañicultores del país.

Se sugiere la implementación de este tipo de investigación en otras zonas cañeras del país para determinar la presencia de este tipo de bacterias, con las que se podrían realizar las evaluaciones de costos y beneficios por su aplicación durante la etapa inicial de los cultivos de caña, ya que influirían directamente en el desarrollo de las plantas, evitando la esterilización de suelos por aplicaciones excesivas de fertilizantes químicos.

Se recomienda extender este estudio, profundizando en aspectos que inciden al decrecimiento de rendimientos durante todo el ciclo productivo del cultivo; extender el ensayo aplicado al cultivo de caña de azúcar hasta los 12 meses de edad en condiciones de lote abierto y determinar los rendimientos obtenidos en cultivos inoculados con bacterias.

Es necesario la elaboración de una metodología para determinar la cantidad necesaria de bacterias *Gluconacetobacter diazotrophicus* que deba ser aplicadas durante el desarrollo vegetativo de este tipo de cultivo, ya que, al ser esta bacteria endófitas; no se ha determinado si la adición de la misma, mejoraría el rendimiento en cuanto al crecimiento y desarrollo de las plantas a corto plazo, por lo que es importante la realización de ensayos adicionales y evaluar los beneficios en cuanto a desarrollo vegetativo según lo mencionado en la literatura citada.

## Bibliografía

- Aguilar, O. A. V., ALAMILLO, M. A. H., & Zapata, L. C. R. (2023). Bacterias endofíticas en plantas; villanas o heroínas?. Desde El Herbario CICY, 15, 224–229, 2023. <https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/2952/1/2023-11-16-Bacterias-endofiticas-en-plantas-villanas-o-heroinas.pdf>
- Andrade Rueda W. S. (2023) Uso de Biofertilizantes microbianos en cultivos de importancia económica en américa latina: revisión sistemática [Tesis de Pregrado, Universidad Técnica del Norte]. <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/14242/2/03%20BIO%2008%20TRABAJO%20GRADO.pdf>
- Cardoso Chavez, V. M., Sigueñas Salazar, M. G., & Zevallos Tirado, E. A. (2019). Plan de negocio para la implementación de una empresa comercializadora de panela. [https://repositorio.esan.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12640/1596/2019\\_MATP17-1\\_17\\_T.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.esan.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12640/1596/2019_MATP17-1_17_T.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Cavalcante, V. A., & Dobereiner, J. (1988). A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and soil*, 108, 23-31. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02370096>
- Coba Villavicencio, A.X (2018). Impacto en las importaciones de fertilizantes en el Ecuador: caso Emda Cia Ltda (Bachelor's thesis, Universidad de Guayaquil).
- Cuellar Gongora, C. E. (2018). Estabilidad bioquímica de la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* conservada por diferentes metodologías de preservación. <https://repositorio.ucm.edu.co/handle/10839/2060>
- Deantonio-Florido, L. Y., Montealegre, L. G. B., Suárez, J. C. L., & Cardona, W. A. (2021). Respuesta alométrica de dos cultivares de caña para panela a la fertilización foliar en vivero. *Agronomía Mesoamericana*, 422-441. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/am/v32n2/2215-3608-am-32-02-00422.pdf>
- Malusá, E., Sas-Paszt, L., & Ciesielska, J. J. T. S. W. J. (2012). Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. *The scientific world journal*, 2012. <https://doi.org/10.1100/2012/491206>
- Emma Orchardson (2020) El nitrógeno en la agricultura. CIMMYT. <https://www.cimmyt.org/es/noticias/el-nitrogeno-en-la-agricultura/>

Espinoza Cortez J. (2021) ANÁLISIS DEL SISTEMA DE PRODUCCIÓN DEL CULTIVO DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum* L.) EN EL CANTÓN MILAGRO, PROVINCIA DEL GUAYAS

Flores Diaz, Miriam Liliana, Tocto Tomapasca, Ana Lucia (2023) Bacterias fijadoras de nitrógeno en *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar” y su potencial como promotoras de crecimiento de *Zea mays* L. “maíz”. <https://repositorio.unprg.edu.pe/handle/20.500.12893/11908?show=full>

Gaviria Giraldo, J. (2011). Evaluación de diferentes metodologías para el aislamiento de la bacteria endófito *Gluconacetobacter* spp. a partir de cultivos de caña de azúcar provenientes del municipio de Supía (Caldas).

González Cadena, R. (2021). *Alternativas agroecológicas de manejo de la fertilidad del suelo en ecosistemas agropecuarios en el municipio de Moa* (Bachelor's thesis, Universidad de Holguín, Facultad de Ciencias Naturales y Agropecuarias). <https://repositorio.uho.edu.cu/bitstream/handle/uho/8834/Rosangela%20Gonz%c3%a1lez%20Cadena.pdf?sequence=2&isAllowed=y>

Guillen Palma, T. P. (2022). Elaboración y Caracterización de un Nanofertilizante Urea-Hidroxiapatita para reducir aplicaciones de Nitrógeno en Cultivos Agrícolas (Master's thesis). <https://repositorio.unemi.edu.ec/handle/123456789/6538>  
<https://repositorioinstitucional.buap.mx/server/api/core/bitstreams/7e8afb39-ea49-4a67-83ab-744d366f17fc/content>

Jacobo, M. F. C. (2021). Metabolitos de *Azotobacter* spp. con posible aplicación biotecnológica (Doctoral dissertation, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).

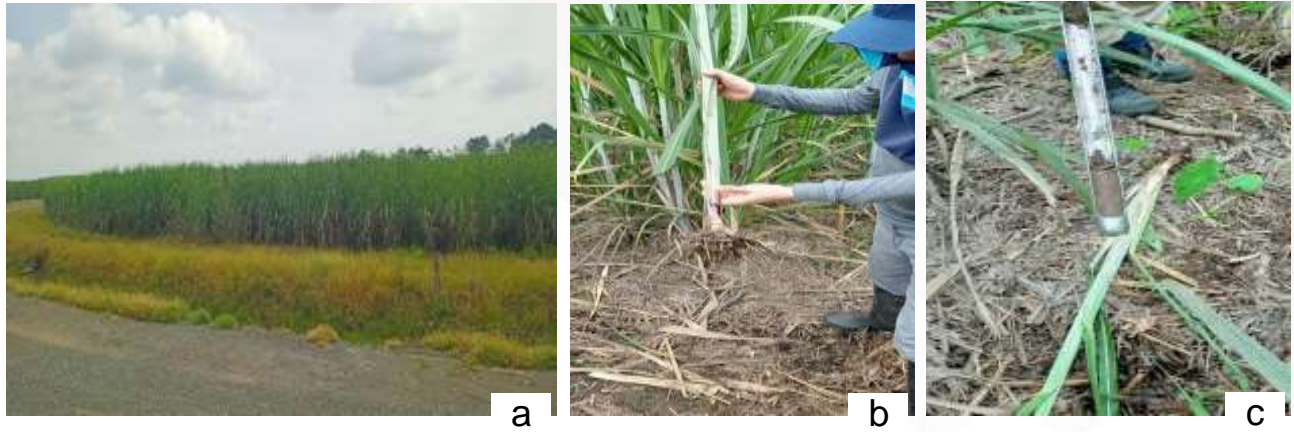
Jiménez Avella, D. J. (2007). Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de *Azotobacter* spp. mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal 16S. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8544/tesis14.pdf;jsessionid=16F812E811E39BC2533C3326C515721A?sequence=1>

- Loredo-Osti, C.; López-Reyes, L.; Espinosa-Victoria, D. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión TERRA Latinoamericana, Vol. 22, Núm. 2, abril-junio, 2004, pp. 225-239 Universidad Autónoma Chapingo México. [https://www.researchgate.net/publication/258219164\\_Plant\\_Growth-Promoting\\_Bacteria\\_in\\_Association\\_with\\_Graminaceous\\_Species\\_A\\_Review/link/0c9605275652345574000000/download?tp=eyJjb250ZXh0Ijp7ImZpcnN0UGFnZSI6InB1YmxpY2F0aW9uIiwicGFnZSI6InB1YmxpY2F0aW9uIn19](https://www.researchgate.net/publication/258219164_Plant_Growth-Promoting_Bacteria_in_Association_with_Graminaceous_Species_A_Review/link/0c9605275652345574000000/download?tp=eyJjb250ZXh0Ijp7ImZpcnN0UGFnZSI6InB1YmxpY2F0aW9uIiwicGFnZSI6InB1YmxpY2F0aW9uIn19)
- Molinares-Pacheco, C., Muñoz-Morales, J. M., Carbajal-Armenta, A., Hernández-Tenorio, A. L., Cueto-Becerra, A., & Muñoz-Rojas, J. (2021). Métodos de identificación molecular para *Gluconacetobacter diazotrophicus*. [https://doc-08-bk-apps-viewer.googleusercontent.com/viewer/secure/pdf/3nb9bdfcv3e2h2k1cmql0ee9cvc5l0le/dgvvd030s1129bshav9fhvn1bsb2p5co/1706418075000/lantern\\*/ACFrOgDthOqCVsHNU7oBX1bvH4Pr4e2dHTD2NT4FrE1k178WR4xyzCoLm\\_0TMhJYGRQA6-grMwaBhBsuHautbXBgBA\\_PGzm3NoUDkQ1N\\_5jxQIFMzfof-IcPIwtB9rWwOOycY4lYFfxeEpsjhf29?print=true](https://doc-08-bk-apps-viewer.googleusercontent.com/viewer/secure/pdf/3nb9bdfcv3e2h2k1cmql0ee9cvc5l0le/dgvvd030s1129bshav9fhvn1bsb2p5co/1706418075000/lantern*/ACFrOgDthOqCVsHNU7oBX1bvH4Pr4e2dHTD2NT4FrE1k178WR4xyzCoLm_0TMhJYGRQA6-grMwaBhBsuHautbXBgBA_PGzm3NoUDkQ1N_5jxQIFMzfof-IcPIwtB9rWwOOycY4lYFfxeEpsjhf29?print=true)
- Morales-Morales, E. J., Rubí-Arriaga, M., López-Sandoval, J. A., Martínez-Campos, Á. R., & Morales-Rosales, E. J. (2019). Urea (NBPT) una alternativa en la fertilización nitrogenada de cultivos anuales. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(8), 1875-1886.
- Pineda Pineda, S. (2019). Producción de biofertilizante a partir de la fermentación de vinazas azucareras por *Gluconacetobacter diazotrophicus* <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/76021>
- Ríos Rocafull, Yoania, Rojas Badia, Marcia, Ortega García, Marisel, Dibut Álvarez, Bernardo, & Rodríguez Sánchez, Janet. (2016). Aislamiento y caracterización de cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Cultivos Tropicales*, 37(1), 34-39. Recuperado en 12 de diciembre de 2023, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362016000100005&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362016000100005&lng=es&tlng=es).
- Rivera-Urbalejo, A. P., Rodríguez-Andrade, O., Morales-García, Y. O., Quintero-Hernández, V., Muñoz-Morales, J. M., Carbajal-Armenta, A., Romero-Navarro, E., De Jesús-Ramos, A., Muñoz-Rojas, J. (2017). Inoculación de plántulas micropropagadas de caña de azúcar con bacterias benéficas para potenciar su producción. *AyTBUAP* 2(7): 15-26. Recuperado de: <https://zenodo.org/records/5083458>



- Roa Lozano, J. (2017). *Caracterización bioquímica y molecular de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de caña de azúcar* (Doctoral dissertation). <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/64246>
- Rosero Realpe, M., & Giraldo Parra, N. (2023). caracterización de actividad promotora de crecimiento vegetal en bacterias aisladas de la compostera de la Universidad Libre seccional Pereira. <https://repository.unilibre.edu.co/handle/10901/28097>
- Rozo, L. Y. M., & Serrano, F. G. (2020). Identificación de bacterias diazotróficas rizosféricas y endófitas asociadas a *Lycopersicon esculentum* mill en el norte de Santander, Colombia. *Agrociencia*, 54(7), 843-857. <https://www.agrociencia-colpos.org/index.php/agrociencia/article/view/2237/1977>
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). Purification of nucleic acids by extraction with phenol: chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1), pdb-prot4455. <https://cshprotocols.cshlp.org/content/2017/4/pdb.prot093450.full.pdf+html>
- Sangucho Lema, J. L., & Romo Tacuamán, M. A. (2020). Evaluación morfológica de brotes de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), aplicando cuatro tratamientos de fertilización foliar como complemento a la Parroquia Tarqui-Pastaza (Bachelor's thesis, Universidad Estatal Amazónica). <https://repositorio.uea.edu.ec/bitstream/123456789/737/1/T.AGROP.B.UEA.1162>
- Steawar Redqueen Making Business Work for Society (2022) Guía de Producción de azúcar. ASOCIACIÓN DE BANCOS PRIVADOS DEL ECUADOR “ASOBANCA” 2021
- Tortora, M. L., Alderete, M. E. J., Núñez, M. A., Romero, E. R., & Digonzelli, P. A. (2022). Evaluación de la capacidad de una cepa autóctona de *Gluconacetobacter sp.* para mejorar el crecimiento inicial del cultivo de la caña de azúcar. *Revista industrial y agrícola de Tucumán*, 99(1), 29-36. Recuperado de <http://www.scielo.org.ar/pdf/riat/v99n1/v99n1a04.pdf>
- Ube Anchundia, J. L. (2021). Importancia del nitrógeno para el crecimiento, desarrollo y rendimiento del cultivo de café (*Coffea spp.*) en Ecuador (Bachelor's thesis, BABAHOYO: UTB, 2021).
- Velasco-Jiménez, A., Castellanos-Hernández, O., Acevedo-Hernández, G., Aarland, R. C., & Rodríguez-Sahagún, A. (2020). Bacterias rizosféricas con beneficios potenciales en la agricultura. *Terra Latinoamericana*, 38(2), 333-345. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i2.470>

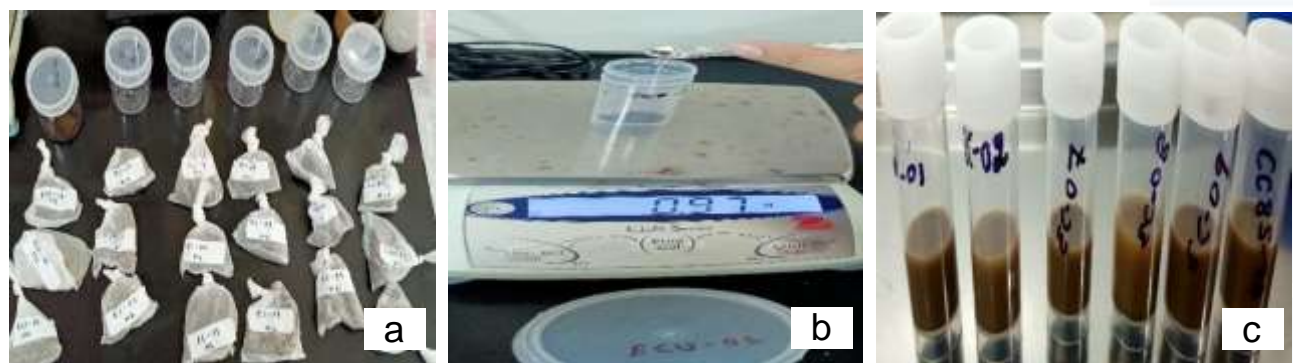
## Anexos



**Figura 15.** Muestreo en caña de azúcar en el Ingenio San Carlos a) lote 1060604, b) tallo completo con sistema radicular y hojas, c) suelo rizosférico, diciembre 2023.



**Figura16.** Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador, CINCAE.

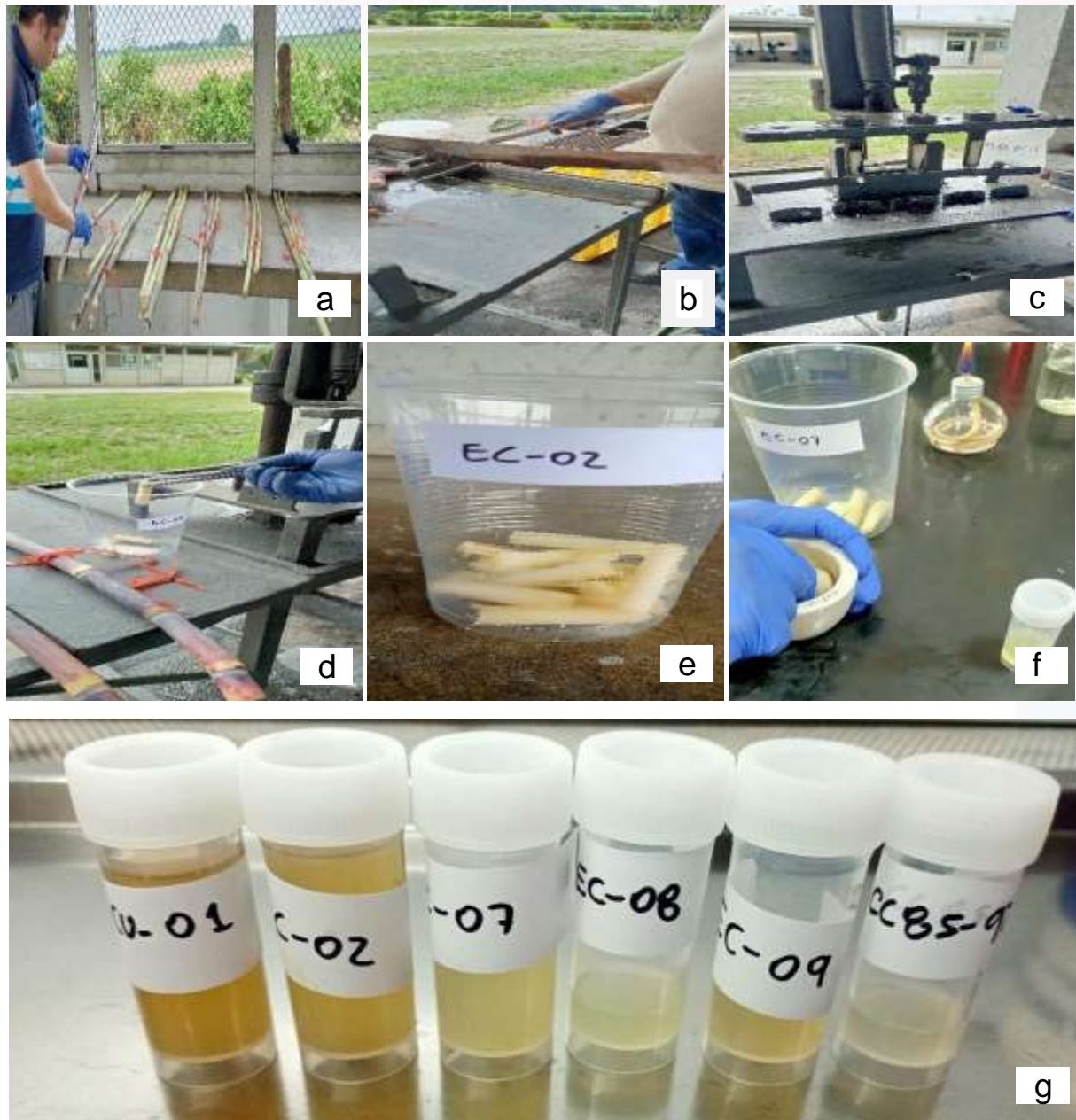


**Figura 17.** Muestras de suelo rizosférico a) homogenizar todas las submuestras en una sola muestra b) pesar 1 gramo de suelo, c) resuspender en 10 ml de agua destilada estéril.





**Figura 18.** Muestras de raíces a) separación de las raíces del tallo, b) lavado de raíces con agua corriente, c) secado de raíces, d) clasificación de raíces por variedad, e), f), g) muestras de raíces llevadas a laboratorio para ser trituradas mediante licuadora y posterior filtrado a través de gasa estéril, h) colección del filtrado de raíces en frascos estériles.

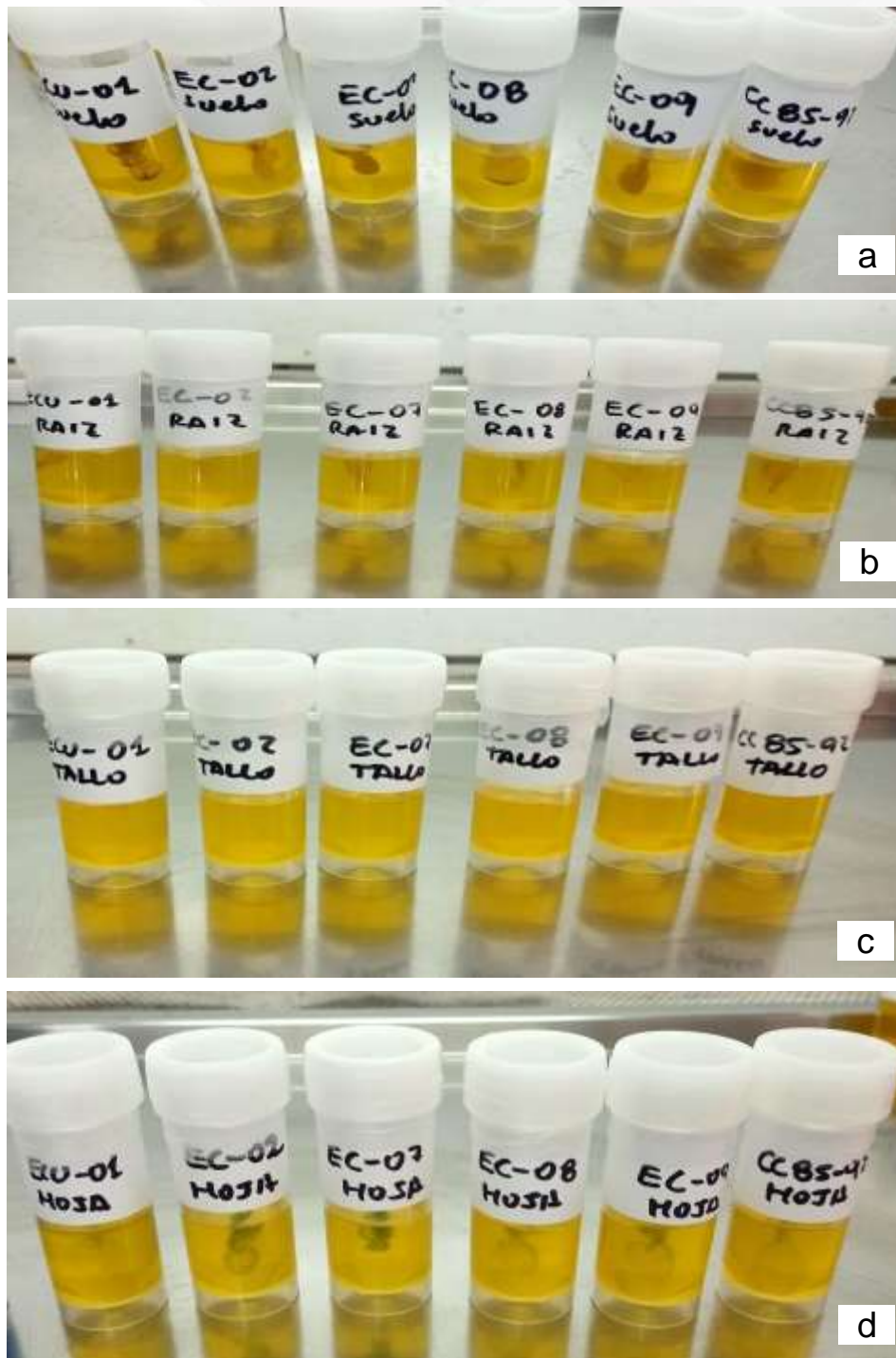


**Figura 19.** Muestras de tallos a) desinfección externa de tallos, b) corte de tallo a partir de entrenudo, c) extracción de tallo d) toma de muestra con pinza estéril, e) colección de muestra, f) maceración de tallos en mortero, g) almacenamiento de jugos de tallo en tubos de 20 ml.





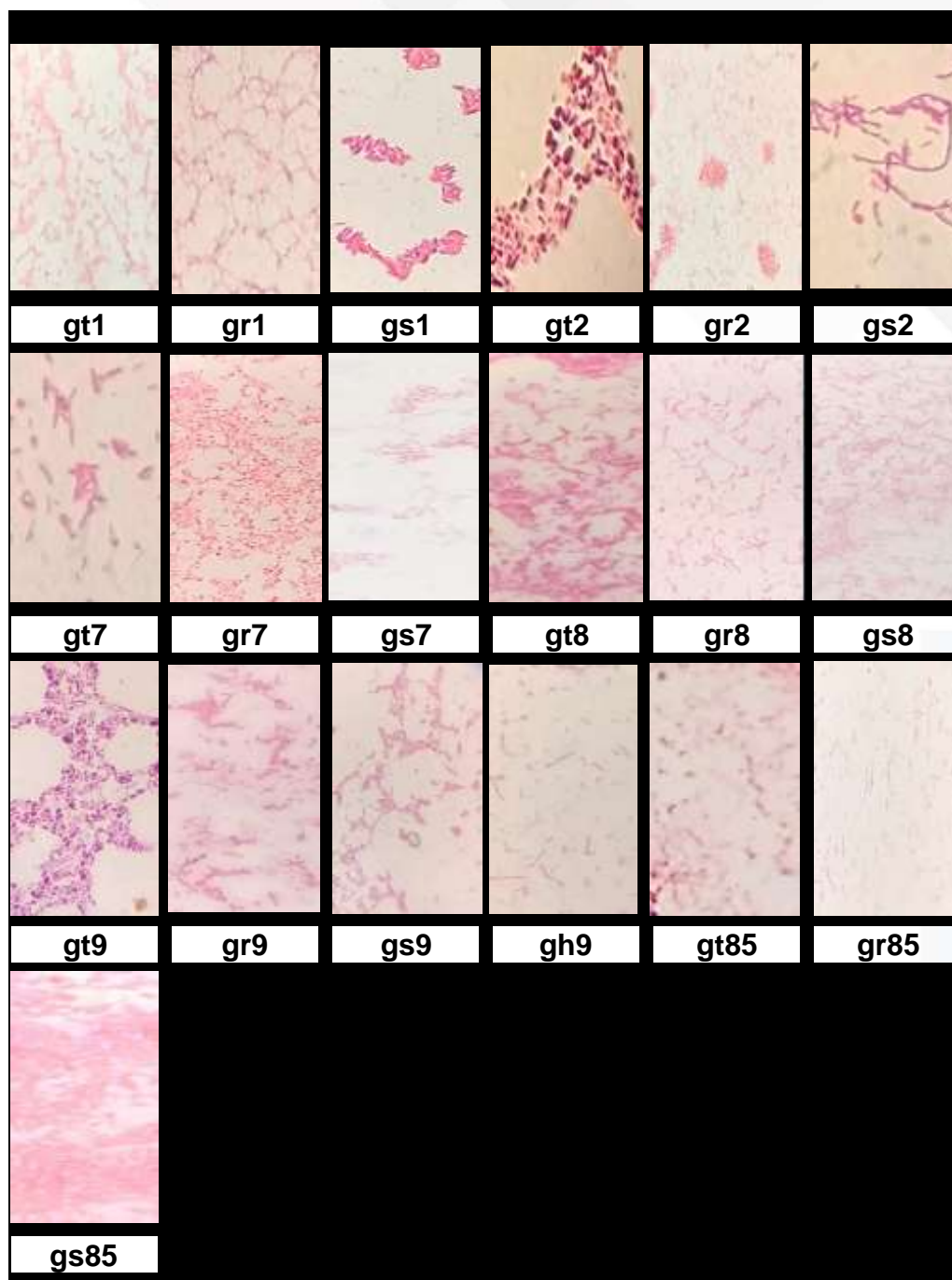
**Figura 20.** Muestras de hojas a) desinfección externa de hojas, b) corte de tallo a partir de entrenudo, c) extracción de tallo d) toma de muestra con pinza estéril, e) colección de muestra, f) maceración de tallos en mortero, g) almacenamiento de jugos de tallo en tubos de 20 ml.



**Figura 21.** Siembra en medio semisólido LGI-P, a) muestras de suelo rizosférico, b) muestras de raíz, c) muestras de tallo, d) muestras de hojas.

**Figura 22.** Morfología de las 19 cepas purificadas en medio sólido LGI-P





**Figura 23.** Observación por el método de tinción de Gram en 19 cepas presuntivas para el género *Gluconacetobacter* spp., objetivo de 100X con aceite de inmersión, microscopio binocular marca OLYMPUS.BX41.

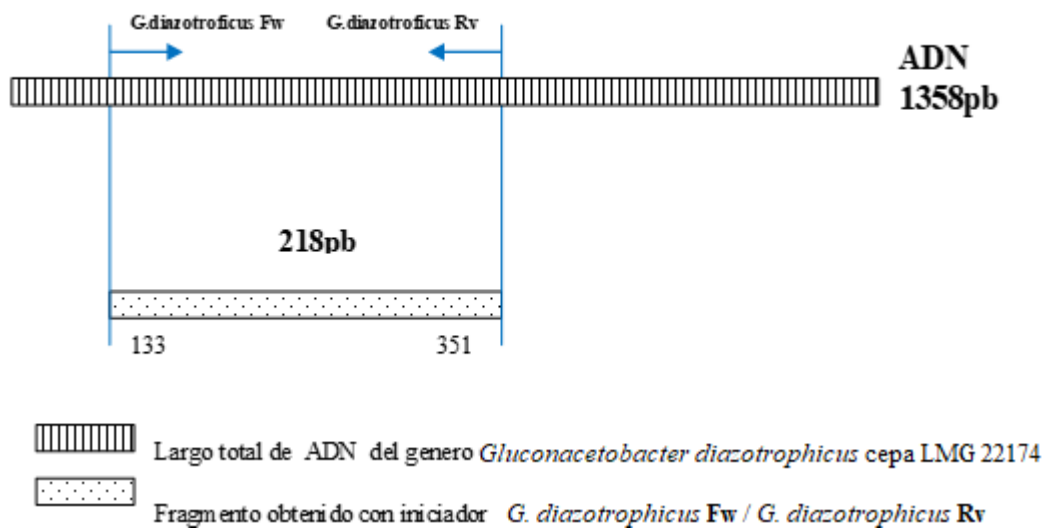


**Figura 24.** Extracción de ADN genómico bacteriano mediante protocolo TEN S.

**Tabla 15:** Cuantificación de 19 muestras de ADN mediante NanoDrop®, marca Thermo Fisher.

Medio	Cepa	Código	Concentración ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
LGI (1 ml)	gt1	1	10.6	0.212	0.152	1.39	0.16
	gr1	2	20.7	0.414	0.299	1.38	0.21
	gs1	3	9.1	0.183	0.091	2.01	0.26
	gt2	4	11.6	0.231	0.191	1.21	0.18
	gr2	5	13.5	0.270	0.209	1.29	0.18
	gs2	6	20.8	0.416	0.263	1.58	0.33
	gt7	7	27.9	0.559	0.289	1.59	1.06
	gr7	8	11.6	0.232	0.139	1.66	0.23
	gs7	9	24.1	0.482	0.389	1.24	0.25
	gt8	10	14.8	0.295	0.207	1.42	0.18
	gr8	11	11.9	0.238	0.181	1.31	0.19
	gs8	12	12.5	0.251	0.194	1.29	0.17
	gt9	13	14.6	0.292	0.216	1.35	0.2
	gr9	14	14.9	0.299	0.199	1.5	0.22
	gs9	15	14.6	0.293	0.213	1.37	0.2
	gh9	16	9.9	0.198	0.161	1.23	0.24
	gt85	17	16.3	0.325	0.267	1.22	0.16
	gr85	18	16.5	0.329	0.241	1.37	0.23
	gs85	19	13.2	0.263	0.193	1.37	0.16
		CE 1	-1	-0.02	-0.024	0.82	0.25
		CE 2	-0.8	-0.017	-0.025	0.67	0.19





**Figura 26.** Diagrama del fragmento ITS1. Obteniendo un fragmento de 218 pb con los primers *G. diazotrophicus* Fw / Rv diseñados durante este trabajo; los números inferiores indican la posición de los iniciadores en la secuencia de nucleótidos.

1 **agagtttgat cctggctcag** gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgagc

**16SrRNAFC27**

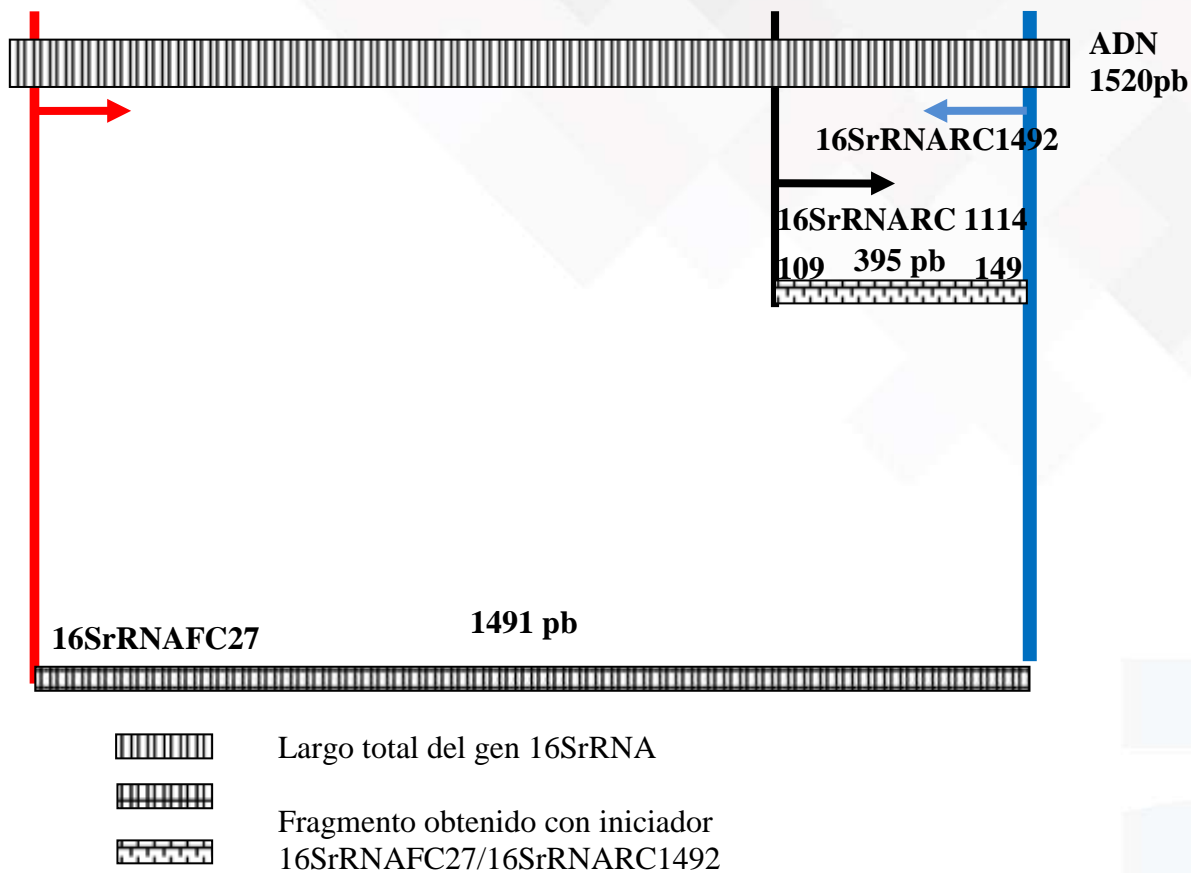
61 ggaccgaacg ggagcttgct ctcgtttggt cagcggcggga cgggtgagta acacgtgggc  
121 aacctgcccc caagaccggg ataactccgg gaaaccggag ctaataccgg ataacaccga  
181 agaccgcatg gtctttggtt gaaaggcggc ctttggtgt cacttgcgga tgggccccgcg  
241 gcgcattagc tagttggtga ggtaacggct caccaaggcg acgatgcgta gccggcctga  
301 gagggtgagc ggccacactg ggactgagac acggcccaga ctctacggg aggcagcagt  
361 agggaaatctt ccgcaatggg cgaaagcctg acggagcgcg gccgcgtgag cgaagaaggc  
421 cttcgggtcg taaagctctg ttgtgagggga cgaaggagcg ccgttcgaag agggcgggtc  
481 ggtgacggta cctcacgaga aagccccggc taactacgtg ccagcagccg cggtaatacg  
541 tagggggcga gcgttgctcc gaattattgg gcgtaaagcg cgcgcaggcg gcccttaag  
601 tctgatgtga aagcccacgg ctcaaccgtg gagggtcatt ggaaactggg gggcttgagt  
661 gcaggagagg agagcggaat tccacgtgta gcggtgaaat gcgtagagat gtggaggaac  
721 accagtggcg aaggcggctc tctggcctgt aactgacgct gaggcgcgaa agcgtgggga  
781 gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca cgccgtaaac gatgagtgc aagtgttaga  
841 ggggtcacac cctttagtgc tgcagctaac gcgataagca ctccgcctgg ggagtacggc  
901 cgcaaggctg aaactcaaag gaattgacgg gggcccgcac aagcgtgga gcatgtggtt  
961 taattcgaag caacgcgaag aaccttacca ggtcttgaca tcccctgaca acccaagaga  
1021 ttgggcggtc ccccttcggg gggacagggt gacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg  
1081 tgctcgtgaga tgttggtgta agt**cccgcaa cgagcgc**aac ccttgctct agttgccagc

**16SrRNARC 1114**

1141 attcaggtgg gcaactctaga gggactgccg gctaaaagtc ggaggaaggt ggggatgacg  
1201 tcaaatacatc atgcccctta tgacctgggc tacacacgtg ctacaatggg cggcacaag  
1261 ggctgcgaac ccgcgagggg gagcgaatcc caaaaagccg ctctcagttc ggattgcagg  
1321 ctgcaactcg cctgcatgaa gccggaatcg ctagtaatcg cggatcagca tgccgcggtg  
1381 aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca cgagagcttg caacaccgga  
1441 agtcggtgag gtaaccgca agggagccag ccgccgaagg tggggcaagt gattggggtg  
1501 **aagtcgtaac aaggtagccg tac**cgggaagg atcacctcct t

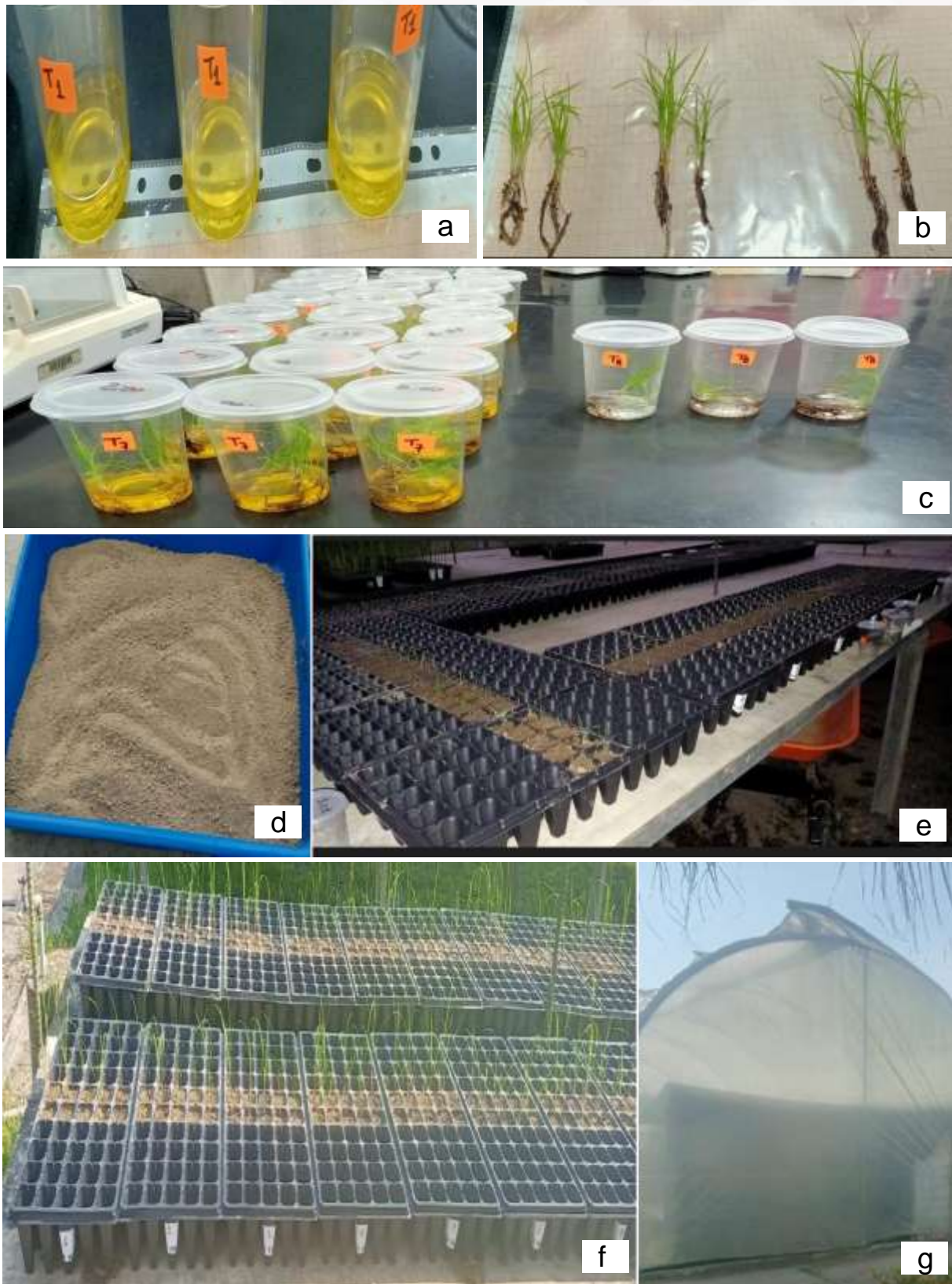
**16SrRNARC1492**

**Figura 27.** Secuencia de nucleótidos acceso numérico al Genbank GQ180113 considerando la subunidad 16S del RNA ribosómico, participación de dos iniciadores forward y un iniciador rever. La flecha roja indica la posición del iniciador 16SrRNAFC27 (nucleótidos 1 → 20), flecha azul indica la posición del iniciador 16SrRNARC1492 (nucleótidos 1492 → 1471) y la flecha negra indica la posición del iniciador 16SrRNARC 1114 (nucleótidos 1097 → 1111).



**Figura 28.** Diagrama del largo total del ADN 1520 pb a nivel del gen 16SrRNA proveniente del número de acceso del Genbank GQ180113. Obteniendo un primer fragmento de 1491 pb con el primer juego de iniciador 16SrRNAFC27 / 16SrRNARC1492; y un segundo fragmento de 395pb con el segundo juego de iniciadores 6SrRNARC1114/ 16SrRNARC1492; los números inferiores indican la posición de los iniciadores en la secuencia de nucleótidos.





**Figura 29.** Proceso de inoculación bacteriana de *Gluconacetobacter spp.* a) concentración bacteriana, b) medición de plantulas sanas, c) inoculación por inmersión por 1 hora, d) suelo s-F1, e) primer día de inoculación en 24 bandejas, f) 30 días de inoculación, g) invernadero de fitopatología donde se llevo a cabo el ensayo de inoculación.

**Tabla 16.** Resultados del análisis fisicoquímico del suelo utilizado s-F1 en el ensayo de Invernadero de Fitopatología.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE LA CAÑA DE AZÚCAR DEL ECUADOR LABORATORIO QUÍMICO Reporte de Análisis de Suelo				REPORTE N°: S24 MV			
ÁREA: VARIEDADES				Realizado Tcnlga. Karina Fajardo			
Fecha recepción muestra: 2024-02-09				Aprobado Dr. Bolívar Aucatoma MSc			
Fecha de emisión de informe: 2024-02-16				Proforma: N/A			
RESPONSABLE: Bлга. Mayra Valdez							
Correo: mvaldez@cinciae.org							
Determinaciones Analíticas	Método de extracción y lectura	Unidad de expresión	Niveles de referencia*	s-F1 ✓	s-F2	s-F3	s-F4
				Suelo comedor	Suelo Variedades	Suelo cubículo	Promix-tamis
pH	Agua (1:2,5) Potenciometro	-	5,6 - 6,5	7,61	7,16	7,10	6,37*
C.E.	Agua (1:2,5) Conductímetro	us/cm	-	60	346	406	786
Materia Orgánica	Walkley-Black Espectrofotómetro UVIS	%	3,0 - 5,0	0,60	1,46	1,31	56,97
Carbono Orgánico	Walkley-Black	%	1,7 - 2,9	0,350	0,846	0,764	33,123
Nitrógeno total (N)	Método Kjeldahl	%	-	0,190	0,430	0,410	2,750
Relación C/N	-	%	-	1,84	1,97	1,86	12,04
Fósforo (P)	Olsen Modificado Espectrofotómetro UVIS	mg/kg	8,0 - 14,0	7,25	6,62	6,77	66,40
Potasio (K)	Olsen Modificado Espectrofotómetro de absorción atómica	meq/100gr	0,20 - 0,38	0,206	0,354	0,325	6,426
Calcio (Ca)		meq/100gr	5,1 - 8,9				
Magnesio (Mg)		meq/100gr	1,7 - 2,3	16,25	9,45	9,41	15,85
Relación Ca/Mg		-	-				
Relación (Ca+Mg)/K		-	-				
Σ Bases Disponibles		-	-				
Zinc (Zn)		mg/kg	3,1 - 7,0				
Cobre (Cu)		mg/kg	1,1 - 4,0	2,20	5,50	4,96	0,65
Manganeso (Mn)		mg/kg	5,1 - 15,0				
Hierro (Fe)		mg/kg	20,0 - 40,0	13,1	43,3	33,3	NC

Los resultados están reportados en base seca del suelo

\* Valores proporcionados por INIAP.

#### Preparación de la muestra

El suelo inmediatamente a su llegada al laboratorio es colocado en bandejas de acero inoxidable e ingresadas en una estufa con corriente de circulación de aire forzado a 60°C por 4 días, posteriormente se muele en un molino tipo triturador de mandíbulas y pasa por un tamiz de 500 um de tamaño de abertura, la muestra se preserva en fundas ziploc.

#### Metodologías de análisis:

pH: Determinación por método potenciométrico, suelo-agua relación 1:2,5

\* muestra-agua relación 1:10

Conductividad Eléctrica (CE): Determinación por Conductivimetría, suelo-agua relación 1:2,5

Materia Orgánica (MO) y Carbono Orgánico: Digestión húmeda (Walkley-Black). Determinación en espectroscopia Uv/Vis por colorimetría.

Nitrógeno total: Método Kjeldahl. Determinación por Titulación con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Fósforo: Extracción con Olsen modificado. Determinación por método colorimétrico de azul de molibdeno. Lectura por espectrofotómetro UVIS.

K, Ca, Mg, Zn, Cu, Fe y Mn: Extracción con Olsen modificado. Para evitar interferencias entre Ca y Mg se utiliza una solución de lantano, los microelementos se leen directamente. Lectura por espectrofotómetro de absorción atómica.

**Tabla 17.** Distribución de tratamientos y resultados de crecimientos de plantas por parcelas dentro de invernadero del área de Fitopatología.

Parcela	Repetición	Tratamiento	Altura - tallo (mm)	Longitud - raíz (mm)	Peso - parte aérea (mg)	Peso - raíz (mg)
1	1	8	58	100	1280	100
2	1	1	22	40	280	40
3	1	3	14	10	180	10
4	2	8	46	40	1050	40
5	2	1	34	70	450	70
6	2	3	41	70	800	70
7	1	6	29	40	430	40
8	3	1	51	60	920	60
9	1	4	35	30	520	30
10	1	2	40	70	610	70
11	1	5	32	50	600	50
12	1	7	25	20	310	20
13	2	4	42	50	540	50
14	2	7	25	20	100	20
15	3	4	35	30	480	30
16	2	2	55	80	980	80
17	3	2	47	130	1250	130
18	3	7	41	30	390	30
19	2	6	31	20	320	20
20	3	6	46	50	680	50
21	3	8	54	50	1030	50
22	2	5	-	-	-	-
23	3	5	38	40	550	40
24	3	3	37	20	620	20

# UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

*¡Evolución académica!*

@UNEMIEcuador

