

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

Microorganismos solubilizadores de fósforo (P) y potasio (K) como alternativa biotecnológica para una agricultura sustentable.

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Bióloga

Presentado por:

Antonella Palma Terán

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2022

DEDICATORIA

Dedico mi proyecto integrador a mis padres Mirian Terán y Zamir Palma, por la sabiduría de sus consejos, la capacidad brillante de despertar consciencia en un monstruo como yo, e infundir el amor a la vida que son para mí la fuente de inspiración para ser parte del cambio de un futuro libre. A mis queridos tíos Mario, Mirella, Carlos y Leonardo por los recuerdos que tenemos, entre abrazos y lágrimas de una vida feliz, a mis hermanas, por su afecto incondicional. Los amo.

Dedico todo mi esfuerzo a mi lugar favorito, el planeta Tierra. Por todas las maravillas que ha creado para enamorar los sentidos, con sus colores, olores y sonidos. He tratado de aprender más de ti, para tratar de volver al ser humano un ser digno de ti.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos mis docentes desde la Escuela Sarzano, Garaventa, Baliano, Liceo Científico Leonardo da Vinci de Italia, Liceo Cristiano de Guayaquil y de ESPOL de Ecuador. En particular al profesor Milton Barcos porque fue mi guía en este último paso universitario y primer paso de mi vida como bióloga, por la calidad de enseñanza recibida, y la inspiración de sus experiencias que fueron el impulso que transformó mi visión.

Un agradecimiento especial a mi novio Jorge Andrés, por todo su ser y no ser. Por su amor a la literatura y a la vida en todas sus formas. Por cada intento fallido en hacerme reír en los días más desesperante, y por tu terrible ingenio en complicar algo tan sencillo como fue el llegar hasta aquí. Te amo a ti y a Sirius Gorz Mars.

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, me corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *Antonella Palma Terán* y doy mi consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”



Antonella Palma Terán

EVALUADORES



Firmado electrónicamente por:
**DIEGO ARTURO
GALLARDO
POLIT**

Diego Arturo Gallardo Polit

PROFESOR DE LA MATERIA



Firmado electrónicamente por:
**MILTON SENEN
BARCOS ARIAS**

Milton Senen Barcos Arias

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

El Ecuador es el primer país productor de cacao en Latino América y primero a nivel mundial de banano. El problema identificado es que los monocultivos están destinados al empobrecimiento de nutrientes y pérdida de diversidad microbiana, causado por el abuso de fertilizantes químicos. Los daños irreversibles que sufre el suelo bajan la tasa de producción de los cultivos. En este contexto, el uso de complejos microbianos es la principal alternativa ecosostenible para sustituir los fertilizantes sintéticos. Las bacterias solubilizadoras de fósforo (BSP) y potasio (BSK) logran proporcionar a las plantas nutrientes que se encuentran en el suelo en un estado inaccesible, mediante mecanismos químicos de solubilización. El aislamiento de las bacterias fue exitoso gracias al pre-enriquecimiento con fósforo (P) y potasio (K), además de la inoculación en medio específicos: NBRIP y Aleksandrow, para BSP y BSK respectivamente. Los resultados obtenidos fueron sorprendentes, los índices de solubilización fueron altos y las pruebas de compatibilidad en placas positivas entre BSP-BSP, BSK-BSK y BSP-BSK. En conclusión, la formulación de un bio-producto es posible, y siendo la capacidad solubilizadora distinta entre las bacterias, es importante la identificación de las más eficientes. A futuro se podrá expandir los estudios al espectro de diversidad microbiana que poseemos como país. Tenemos los recursos para ser agentes del cambio, hay que tener en cuenta que somos la última generación que puede salvar el planeta.

Palabras Clave: Monocultivo, fertilizante, bacterias, solubilización, bio-producto

ABSTRACT

Ecuador is the first cocoa producing country in Latin America and first in the world for bananas. The identified problem is that monocultures are destined to the impoverishment of nutrients and loss of microbial diversity, caused by the abuse of chemical fertilizers. Irreversible damage to the soil lowers the rate of crop production. In this context, the use of microbial complexes is the main eco-sustainable alternative to replace synthetic fertilizers. Phosphorus (BSP) and potassium (BSK) solubilizing bacteria manage to provide plants with nutrients that are in an inaccessible state in the soil, through chemical solubilization mechanisms. The isolation of the bacteria was successful thanks to the pre-enrichment with phosphorus (P) and potassium (K), in addition to the inoculation in specific media: NBRIP and Aleksandrow, for BSP and BSK respectively. The results obtained were surprising, the solubilization rates were high and the compatibility tests on plates positive between BSP-BSP, BSK-BSK and BSP-BSK. In conclusion, the formulation of a bio-product is possible, and since the solubilizing capacity is different among bacteria, it is important to identify the most efficient ones. In the future, studies may be expanded to the spectrum of microbial diversity that we have as a country. We have the resources to be agents of change, we are the last generation that can save the planet.

Keywords: Monoculture, fertilizer, bacteria, solubilization, bio-product

ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES.....	5
RESUMEN.....	I
<i>ABSTRACT</i>	II
ÍNDICE GENERAL.....	III
ABREVIATURAS	IV
SIMBOLOGÍA	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VII
CAPÍTULO 1	8
1.1 Descripción del problema	9
1.4.6 Microorganismos solubilizadores: BSP y BSK.....	14
CAPÍTULO 2.....	16
2. Metodología	16
2.1 Área de estudio.....	16
CAPÍTULO 3.....	19
3. Resultados y análisis	19
CAPÍTULO 4.....	28
4. Conclusiones y recomendaciones.....	28
Conclusiones	28
Recomendaciones	29
BIBLIOGRAFÍA	29

ABREVIATURAS

BSP	Bacterias solubilizadoras de fósforo
BSK	Bacterias solubilizadoras de potasio
PGPM	Microorganismos promotores de crecimiento vegetal
BPCP	Bacterias promotoras del crecimiento de las plantas
DAP	Fosfato diamónico
CIK	Muriato de potasio

SIMBOLOGÍA

cm	centímetro
mg	miligramo
pH	potencial de Hidrógeno
P	fósforo
K	potasio
N	nitrógeno

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig1. Modelo de negocio propuesto.....	19
--	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Índice de solubilización BSP y BSK.....	20
Tabla 3.2. Capacidad de solubilización BSP.....	21
Tabla 3.3. Capacidad de solubilización BSK.....	21
Tabla 2.7.2.1 Pruebas de compatibilidad: sinergia.....	22
Tabla 2.7.2.2 Pruebas de compatibilidad: lisis.....	24
Tabla 1.1. Presupuesto	¡Error! Marcador no definido.6

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

En Ecuador, el sector bananero y el cacaotero representan ingresos fundamentales económicos de la producción agrícola. En el 2019 y 2020, el primero contribuyó con el 50% del PIB agrícola y con el 30% de las exportaciones mundiales. El sector cacaotero por otra parte, se destaca como productor principal en América y en cuarto lugar en el mundo con el 7% de producción total de grano de cacao (FAO, 2019). El uso indiscriminado de los fertilizantes fosfatados, por ejemplo, provoca una disminución consecutiva de reservas de fósforos y población microbiana, que a su vez se manifiesta como el fenómeno de pérdida de fertilidad en el suelo (Galeana, 2016). El suelo es un organismo vivo y la diversidad microbiana que alberga ha evolucionado en simbiosis con el mundo vegetal. Existen microorganismos que se conocen como bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (BPCP), su participación promotora puede ser en relación con el desarrollo fisiológico de los metabolismos bacterianos y vegetal, o con su capacidad de ejercer un control biológico (De-Bashan et al., 2007). Los microorganismos se clasifican en grupos según el proceso biológico que realizan en el suelo, y es son conjuntos biodiversos entre los cuales están algunos como los proteolíticos, pectinolíticos, solubilizadores (fósforo y potasio) y otros fijadores (nitrógeno) (Torsvik & Ovreas, 2002). En particular, la conexión entre las bacterias y las plantas ha sido objeto de investigación en el campo de biotecnología en las últimas décadas, para cubrir la necesidad de renovar las herramientas de la agricultura. Reducir el impacto ambiental debe considerarse una prioridad para asegurar un cambio en la salud de los agroecosistemas de las actuales y futuras crecientes demandas del mercado (Andrade et al., 2017). El equilibrio de los ciclos biogeoquímicos de los agroecosistemas es alterado por el excesivo uso de insumos químicos: fertilizantes y plaguicidas. El suelo y los cuerpos de agua son las dos matrices ambientales principales que se convierten en pasivos ambientales de la agricultura intensiva (Beltrán, 2014). Este trabajo investigativo tiene como objetivo general caracterizar bacterias solubilizadoras de fósforo (P) y potasio (K) mediante análisis bioquímicos de muestras provenientes de cultivos de banano y cacao, para su aplicación en agroecosistemas.

1.1 Descripción del problema

El problema identificado pertenece a los cultivos de banano y de cacao, que son monocultivos destinados al empobrecimiento de nutrientes y pérdida de diversidad microbiana. La adición de fertilizantes sintéticos es una solución temporal que no satisface a los productores por la consecuente: erosión del suelo, pérdida de raíces, contaminación de agua y suelo además de exponer a las plantas a una mayor susceptibilidad a enfermedades y plagas (Cedeño, 2022). El movimiento de los elementos en la rizosfera es un factor que se relaciona con su capacidad de absorción. Los elementos esenciales para un desarrollo fisiológico vegetal son: el nitrógeno (N), el fósforo (P) y el potasio (K), más conocidos como los 'NPK'. El abuso de los fertilizantes fosfatados y potásicos no cambia la disponibilidad del elemento (Fernández, 2007). La interacción fósforo-suelo no es inerte y también se relaciona con la matriz del agua, cuando altos niveles de fósforo ingresan a los cuerpos de agua, provocando el fenómeno de eutrofización (Hernández, 2022). En un agroecosistema con altas concentraciones de fósforo, las plantas también pueden manifestar su deficiencia, y este fenómeno se produce por varios factores ambientales. Por otra parte, la interacción potasio-suelo en un agroecosistema determina la calidad del rendimiento de la biomasa de producción de estos monocultivos de tal forma que su aporte llega a la percepción del cliente mediante el sabor del fruto (Gutiérrez, 2020). Las estructuras de los ecosistemas poseen propiedades químicas, físicas y microbiológicas del suelo que están estrictamente relacionadas con las proporciones de sus componentes. La dinámica del suelo-microorganismos es frágil, todo cambio fisicoquímico genera una alteración en todo el ecosistema (Forero & Mora, 2010).

1.2 Justificación del tema

El banano y el cacao pertenecen a los principales productos que oferta el Ecuador al mundo. En la actualidad, los suelos de los monocultivos son expuestos al abuso de fertilizantes y a largo plazo este tratamiento provoca consecuencias irreversibles en los agroecosistemas. La pérdida de diversidad microbiana se refleja en la infertilidad de los suelos. La fertilización de macro y micronutrientes en los cultivos necesita la intervención de complejos microbianos específicos para cada nutriente (Gutiérrez, 2020). Los estudios del suelo se enfocan en los microorganismos promotores de crecimiento vegetal (PGPM), las bacterias solubilizadoras de fósforo y potasio pertenecen al grupo de las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (BPCP). Estas bacterias liberan elementos como el fósforo, el potasio y productos esenciales mediante mecanismos bioquímicos específicos. Los microorganismos también son bio-indicadores de la calidad del suelo y a futuro se convertirán en la mejor alternativa ecosostenible a la aplicación de fertilizantes minerales.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Caracterizar bacterias solubilizadoras de fósforo (BSP) y potasio (BSK) mediante análisis bioquímicos de muestras provenientes de cultivos de banano y cacao, para su aplicación en agroecosistemas.

1.3.2 Objetivos específicos

- Aislar cepas bacterianas en medios específicos para la selección de los grupos más eficientes solubilizadores de fósforo (P) y potasio (K).
- Caracterizar las cepas aisladas BSP y BSK mediante técnicas bioquímicas y colorimétricas para cuantificar la eficiencia de solubilización.
- Realizar pruebas de compatibilidad mediante bioensayos para la comprobación de su capacidad de coexistir en un mismo medio.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Los cultivos comerciales: banano y cacao

El banano y el cacao son los principales productos exportados en Ecuador. En el 2020, el 41% de la producción del sector bananero fue cosechada en la provincia de Los Ríos, el 26% en el Guayas y el 25% en El Oro. Aportando con un 92% de producción en una superficie cosechada total respectiva de 53 220.17 ha, 41 631.32 ha y 43 344.34 ha. En el 2019, el 31% de la producción del sector cacaotero fue cosechada en la provincia del Guayas, el 24% en Los Ríos y el 14% en Manabí. Aportando con un 69% de producción en una superficie cosechada total respectiva de 115 933 ha, 116 898 ha y 110 446 ha (INEC, 2020). El crecimiento del sector bananero exportador no ha sido alterado negativamente ni durante ni después de la pandemia mundial provocada por COVID-19. Esto se debe a que las potencias mundiales se encuentran en una posición geográfica donde el clima frío desfavorece la producción de frutos como banano y cacao, lo cual genera para los países tropicales una fortaleza que Ecuador ha aprovechado desde los inicios de los intercambios comerciales internacionales (Gutiérrez & Cevallos, 2021).

1.4.2 NPK: elementos vitales en los cultivos de banano y cacao

La presencia de macromoléculas del suelo en los cultivos de banano y cacao es fundamental porque en el caso del banano, el ritmo de crecimiento es alto y posee limitaciones de longitud en su sistema radicular, por lo cual necesita la disponibilidad del fósforo desde las primeras etapas de vida hasta los cinco meses. La deficiencia de fósforo en el suelo desacelera el proceso de crecimiento. La demanda de potasio incrementa cuando las plantas entran en el proceso de floración. La absorción del potasio se dirige directamente al fruto, porque es parte de los pigmentos fotosintéticos. Este elemento es parte de procesos celulares como la división celular, respiración y es un componente estructural de las biomoléculas. En la naturaleza, el nitrógeno orgánico se libera de la descomposición de materia orgánica, pero para ser absorbido tiene que cambiar forma a inorgánico (Azucena, 2020). En el cultivo de cacao se presentan consecuencias similares a las del banano. La deficiencia de nitrógeno produce primero una decoloración en las hojas y también conduce a la planta a una prematura floración. Cuando en cambio el fósforo no supe las demandas nutricionales del desarrollo fisiológico la planta desacelera el ritmo del crecimiento. Por otra parte, la falta de potasio en el aporte nutricional afecta directamente a la calidad del fruto, el cual no desarrolla ni una estructura robusta ni el sabor característico (Vivar, 2013).

1.4.3 Fertilizantes minerales

Los fertilizantes minerales son productos sintéticos que se producen a nivel mundial a escala industrial para suplir las demandas de los suelos sobreexplotados, como los monocultivos. Los fertilizantes minerales en esta industria se agrupan en simples si su composición es nitrogenada, fosfatada o potásica y en compuestos si contienen mezclas de estos, como el fosfato diamónico (DAP). Los fertilizantes más vendidos en el mercado agrícola son: urea, superfosfato triple y el muriato de potasio (CIK). El CIK es el fertilizante más consumido en el sector bananero no solo por su composición sino por el bajo precio en el mercado ecuatoriano e internacional. Los fertilizantes nitrogenados se aplican por lo general, por vía foliar (Boyd, 2018). El potasio (K) es absorbido en forma de ion y es la forma disponible, porque mientras se encuentra en su forma mineral es potasio no disponible. Este elemento determina la biomasa del racimo (López & Espinosa, 1995). En cambio, el tiempo de crecimiento para los cultivos de cacao es más largo, y esto hace que los ciclos del uso de fertilizantes sean más prolongados.

1.4.4 El fósforo (P): su importancia en el desarrollo fisiológico vegetal y participación en los ciclos biogeoquímicos del suelo

El fósforo es un elemento importante en la matriz del suelo. Su importancia cubre un funcionamiento generalizado en los procesos fisiológicos que abarca desde las estructuras de las biomoléculas, al almacenamiento y transferencias de energía celular. La intervención del fósforo en los ciclos biogeoquímicos juega un papel fundamental en el suelo debido a sus características elementales (Fernández, 2007). El fósforo posee una baja movilidad en el suelo, con respecto a otros nutrientes libres en la matriz. La concentración del fósforo en el suelo es de aproximadamente 0,02-0,05 ppm lo cual es una concentración muy baja (Banerjee et al., 2010). El mecanismo de solubilización del fósforo inorgánico puede ocurrir por acidificación por H^+ , se liberan H^+ o por la asimilación de NH_4^+ , de los cuales no se produce, ácidos orgánicos (Beltrán, 2014). El fósforo orgánico, por otra parte, se almacena en la materia orgánica animal o vegetal, y se libera a través de la descomposición microbiana. De esta descomposición, la forma presente en mayor cantidad en el suelo es el fosfato inotisol. El fosfato inotisol posee una alta capacidad de acumulación que se obtiene de la unión química con: aluminio, hierro y calcio, (formas insolubles). Cuando ocurre esta transformación convierte el fósforo inorgánico disponible en una forma orgánica no aprovechable para las plantas, se dice que el fósforo se ha inmovilizado, y el proceso inverso se denomina mineralización. Además, es la razón principal, por la cual los organismos compiten para este recurso.

En estas reacciones se involucran las presencias de enzimas que desfosforilan los enlaces fósforo-éster, fosfatasas acidas no específicas, las fosfatasas (NSAP) y las fitasas. Este fenómeno de mineralización produce los ortofosfatos (Oliviera et al., 2008). Los ácidos orgánicos son sintetizados por bacterias pueden generar la liberación de fósforo soluble por su estructura molecular. La eficiencia del proceso de solubilización depende del número de grupos carboxilo (-COOH) e hidroxilo (OH⁻) y la posición del ligando (Trivedi & Sa, 2008). Por ejemplo, el ácido glucónico es el agente solubilizador más común del grupo fosfato y como este se han reportado otros ácidos con capacidades solubilizadoras como: 2-cetoglucónico, cítrico, oxálico, propiónico, láctico, valérico, succínico entre otros (Paul et al., 1971). Los mecanismos de solubilización del fósforo ocurren mediante la producción de ácidos orgánicos y la biosíntesis de enzimas especializadas, las fosfatasas (Chang & Yang, 2009).

1.4.5 El potasio (K): su importancia en el desarrollo fisiológico vegetal y participación en los ciclos biogeoquímicos del suelo

El potasio es un nutriente importante en las actividades celulares para el desarrollo fisiológico vegetal y participa en la activación de más de 80 enzimas distintas de reacciones biológicas. Su aporte en el metabolismo, tanto animal como vegetal es vital durante el crecimiento y esencial cuando los organismos vegetales se enfrentan a algún tipo de estrés abiótico, ya que, por ejemplo, fortalece el sistema de resistencia en presencia de un patógeno. La corteza terrestre es rica de potasio, sin embargo, el tipo de intervención del potasio en los ciclos biogeoquímicos depende de la forma que tenga en la matriz del suelo. El potasio se puede encontrar disponible en forma de solución y no disponible, cuando su forma química es mineral. Los más comunes son los feldespato y mica. La solución de potasio es absorbida por el sistema radicular vegetal y por microorganismos que viven en la rizosfera. (Moreno & Moreno, 2020).

1.4.6 Microorganismos solubilizadores: BSP y BSK

En base a todos los fenómenos bioquímicos descritos anteriormente, los investigadores durante las últimas dos décadas han estudiado los microorganismos promotores del crecimiento vegetal (MGPM), en particular, un grupo en particular parece ejercer mecanismos interesantes en el suelo. Las bacterias solubilizadoras de fósforo y potasio pertenecen a las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (BPCP) y su capacidad asombrosa consiste en aumentar la biodisponibilidad de los elementos en estado soluble, es decir, accesible para las plantas. La presencia de las bacterias solubilizadoras en la rizosfera beneficia la biodisponibilidad de P y K, estimula el desarrollo fisiológico de raíces y brotes, aumentando también sus volúmenes en peso fresco y peso seco. Además, del efecto sinérgico relacionado al crecimiento de los cultivos, estos microorganismos ejercen un biocontrol ya que existe una producción de compuestos antifúngicos como fenoles y flavonoides, sideróforos o enzimas entre otros que inhibe el crecimiento de patógenos en las plantas (Richardson & Simpson, 2011).

La transformación del fósforo y del potasio a través de mecanismos de solubilización y de mineralización es un proceso bioquímico que ocurre en función a dos aspectos fundamentales: la riqueza nutricional del suelo y el estado de desarrollo fisiológico de la planta. Existen factores que influyen durante la solubilización y que intervienen entre las BSP y BSK y las plantas, los más relevantes son las interacciones con otros microorganismos, la extensión radicular, las condiciones ecológicas del suelo, las características fisicoquímicas del suelo (Zhang et al., 2014).

1.4.7 BSP y BSK: como microorganismos promotores de la producción de fitohormonas

Las bacterias solubilizadoras de fósforo (BSP) y las bacterias solubilizadoras de potasio (BSK) se caracterizan también por promover el crecimiento vegetal a través de fitohormonas como: auxina (ácido indol-3-acético, ácido indol-3-butiírico, entre otros), giberelina y citoquinas, cuyos efectos se reflejan en la elongación radicular, división celular, diferenciación celular y dominancia apical (González, 2016). Las auxinas se sintetizan mediante la vía triptófano. Los beneficios de manejar complejos microbianos en las plantaciones, además de mejorar la biodisponibilidad de P y K incluyen el refuerzo del sistema radicular y en el crecimiento de brotes, incremento en la biomasa de los frutos. Todo eso es posible gracias al efecto sinérgico entre las actividades microbianas y las fitohormonas sintetizadas (Alori et al., 2017). Las reacciones de solubilización de los elementos cambian según las condiciones del suelo, es esta la razón por la que existe una amplia variedad de especiación entre los microorganismos. La intervención de las bacterias solubilizadoras favorece la fertilidad del suelo (Etesami et al., 2017).

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

2.1 Área de estudio

El área de estudio fueron plantaciones de banano y cacao ubicadas en tres provincias del Ecuador: Los Ríos (Vinces: Fca. Solanda, Fca. Caicedo, Fca. Ramilla), Guayas (Balao: Fca. Colón, Fca. Matanegro) y El Oro (Pasaje: Fca. Los Ángeles, Fca. Calicachima). Se analizaron 9 muestras de cultivos de banano y cacao y 2 muestras combinadas, para un total de 11 muestras. La recolección de muestras fue aleatoria en cada plantación, escogiendo áreas cerca de raíces jóvenes y plantas adultas (Fig1). Se excavó con una pala a 15 cm de profundidad para obtener 1Kg de suelo que fue sucesivamente colocado en un frasco rotulado. Las muestras se conservaron en laboratorio a temperatura ambiente y antes de cualquier tipo de manipulación se homogeneizó el grupo de muestras de cada cultivo, despojando el suelo de raíces, hojas y de piedras que pudieran interferir a futuro.

2.2. Pre-enriquecimiento de medios

El pre-enriquecimiento de medios es un paso fundamental ya que se desprenden los microorganismos del suelo. La fuente de enriquecimiento para las BSP es el fosfato tricálcico y el agua peptonada se agregaron para la activación de microorganismo. En agua destilada se disolvieron 1,80g de agua peptonada y 0,09g de fosfato tricálcico. Por otra parte, como fuente de enriquecimiento para las BSK se usaron 2.7 g/L de tripticasa soya broth y 0.5 g de fosfato dipotásico. Se añadieron 10g de muestra de suelo, en la incubadora shaker a 28°C a 150rpm por 48 horas.

2.3. Preparación de medios solidos

Medio NBRIP: BSP

Según la bibliografía revisada la preparación de medios se realizó en agua destilada agregando en un matraz, el mismo orden descrito a continuación: glucosa (1,0 g/L), cloruro de potasio (0,3 g/L), cloruro de sodio (0,3 g/L), sulfato férrico (0,030 g/L), sulfato de magnesio (0,030 g/L), sulfato de amonio (0,5 g/L), fosfato tricálcico (1,0 g/L), agar (15 g/L) y azul de bromotimol (BTB) (0.1 g/L) (Bolaño et al., 2018). Se realizaron 3 placas control y las muestras fueron analizadas por triplicado.

Medio Aleksandrow: BSK

Según la bibliografía revisada la preparación de medios se realizó: glucosa (5,0 g/L), cloruro férrico (0,1 g/L), carbonato cálcico (2,0 g/L), sulfato de magnesio hepta-hidratado (0,005 g/L), fosfato de calcio (2,0 g/L), agar (20 g/L), fosfato de potasio dibásico (2,0 g/L) y azul de bromotimol (BTB) (0.08 g/L) (Norzilawati & Norhayati, 2021). También, se realizaron 3 placas control y las muestras fueron analizadas por triplicado.

2.4. Dilución seriada

Para cada muestra de suelo el medio NBRIP y del medio Aleksandrow se prepararon los tubos de ensayo con agua destilada para obtener 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} . Mediante la técnica de agotamiento por superficie se consideraron las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , con el uso de asa, micropipeta se plaqueó el medio sólido, dentro de la cámara de flujo. Las placas del medio se incubaron en la Incubadora a 30°C por 148h (5 días) como se recomienda Saxena et al, 2020.

2.5. Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fósforo y potasio

En la cámara de flujo se realizó el aislamiento de bacterias solubilizadoras de fósforo y potasio mediante la técnica por estría. De cada placa del medio NIBRP y Aleksandrow se seleccionaron las placas que presentaron una colonia definida tanto en su forma como en color diferentes, para obtener una mayor diversidad de cepas bacterianas (Fig2 y Fig3). Luego del análisis, todos los medios se dejaron en reposo en la refrigeradora a 3°C. Después de 48 h del aislamiento, se procedió a incubar en el centro de cada placa una colonia purificada del aislamiento de BSP y BSK para la medición del crecimiento del halo durante un periodo de tiempo de 7 días, y se anotaron dichos valores en una tabla para posteriores análisis.

2.6 Cuantificación del índice solubilizador de BSP y BSK

Se calculó el índice solubilizador (IS) de cada placa inoculada con colonias de BSP y BSK, mediante la fórmula reportada por Galeana, 2016.

$$IS = \frac{(\text{diámetro de la colonia} + \text{diámetro del halo})}{\text{diámetro de la colonia}}$$

El índice solubilizador es uno de los parámetros considerados durante la selección de las mejores cepas solubilizadoras de BSP y BSK. Por lo tanto, los valores obtenidos se registraron en una tabla hasta su posterior análisis.

2.7 Pruebas bioquímicas y colorimétricas

2.7.1 Tinción de Gram

El proceso de identificación bioquímica de las cepas bacterianas aisladas se realizó mediante la tinción de Gram, se escogieron colonias de los medios SMRS y Aleksandrov que presentaron el cambio de coloración. En la cámara de flujo se procedió a fijar las colonias en portaobjeto con una gota de agua destilada y flameando hasta que la muestra se haya secado completamente. Para la tinción se cubrió primero las muestras fijadas con cristal violeta por 1min, y se lavaron con agua destilada. Segundo, se cubrieron con Lugol por 1min y se lavaron con agua destilada. Tercero, se lavaron las muestras con alcohol de 5 a 8 segundos y se enjuagan con agua destilada. Por último, se tiñe con safranina 30 segundos y se enjuaga. Se espera que las muestras se sequen para la sucesiva identificación. Cada muestra fue observada al microscopio en 10X 40X y 100X, como se observa en la Figura10. Se puede concluir que la microbiota identificada es uniforme, es decir que la tinción de Gram, en todos los casos: Gram negativas. La morfología observada es características de *Bacillus*, *Streptobacillus* y *Micrococcus*, según la bibliografía revisada de (Bolaño et al., 2018).

2.7.2 Prueba de compatibilidad

Las pruebas de compatibilidad son la fase más importante del proyecto ya que no es suficiente solo con aislar las bacterias. Si a futuro se las quiere enfrascar en un bio-producto hay que comprobar que entre ellas exista sinergia (Cisnero et al., 2015). Si las bacterias aisladas y colocadas en un medio de cultivo pueden crecer juntas se dice que hay sinergia, por otra parte, las bacterias inoculas en una placa muestran una reacción destructiva en su relación se dice que ocurre lisis. En este último caso no es posible formular un bio-producto con esa combinación de bacterias.

2.7.3 Conservación de bacterias aisladas

La conservación de cepas es la fase que permite a futuro reactivar los complejos bacterianos aislados. Se sigue para ello el protocolo de Grauer et al. 2015, con glicerol al 25% y medio TSB, un medio de cultivo universal (Fig5).

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1. Modelo de negocio propuesto

Para mostrar una idea general de la viabilidad económica del presente proyecto se presenta la Fig1. donde se puede observar el modelo de negocio propuesto, el cual representa el proceso general a seguir para su ejecución. El modelo de negocio parte del diseño y levantamiento de una unidad piloto donde se llevará a cabo la fase laboratorio para la producción de microorganismos (BSP y BSK) y la fase invernadero para la validación de los resultados, sucesivamente sigue la negociación con el cliente, entrega del producto y administración de los primeros ingresos. En la parte izquierda, por otra parte, se muestran las etapas principales de la fase laboratorio: recolección de muestras, aislamiento de BSP y BSK, caracterización de las bacterias y prueba de compatibilidad en placas.

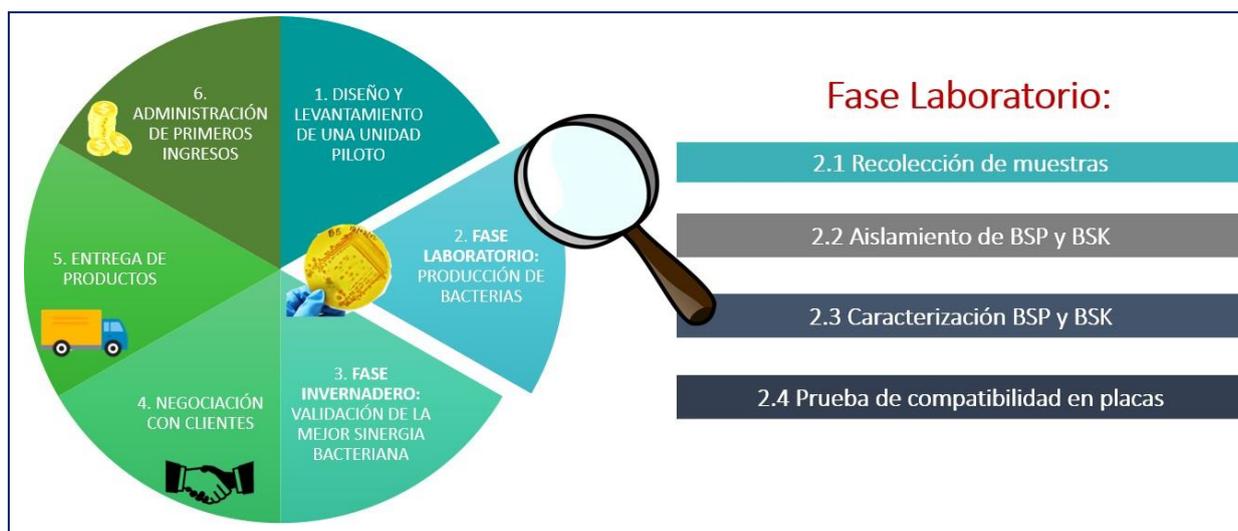


Fig1. Modelo de negocio propuesto

Los resultados del aislamiento de las bacterias solubilizadoras se muestra en la Tabla 3.1, donde a cada una se le ha calculado su índice solubilizador, en otras palabras, su capacidad de absorber los elementos P y K presente en los medios de cultivos. Los resultados obtenidos son sorprendentes considerando que hay una gran diferencia entre los valores, lo cual también significa que existen bacterias más eficientes que otras. Las mismas están resaltadas con un círculo color rojo.

3.2 Caracterización de bacterias BSP y BSK

Para la medición del índice de solubilización se renombraron las bacterias aisladas (Fig4) donde a continuación se especifica el origen de las bacterias: BSP 2 en Fca. Caicedo-banano, BSP 3 en Fca. Calicachima-cacao, BSP 4, 6 y 7 en Fca. Solanda-cacao, BSP 9 en Fca. Solanda-banano y BSP 10 y 11 en Fca. Colón-cacao. Mientras que para BSK fue la siguiente: BSK 20 y 21 en Fca. Ramilla-cacao, BSK 21 es la combinación de Fca. Ramilla-Solanda-cacao, BSK 14 en Fca. Calicachima-cacao, BSK 19 en Fca. Colón-cacao, BSK 16 en Fca. Caicedo-banano y BSK 17 y 18 en Fca. Solanda-cacao.

Tabla 3.1. Índice de solubilización BSP y BSK

Aisladas	Índice de solubilización	Aisladas	Índice de solubilización
BSP 7	0,625	BSK 20	0,8
BSP 6	0,8	BSK 21	0,55
BSP 3	0,72	BSK 22	0,65
BSP 4	0,75	BSK 14	0,75
BSP 2	0,69	BSK 19	0,8
BSP 11	0,8	BSK 16	0,68
BSP 10	0,7	BSK 17	0,74
BSP 9	0,81	BSK 18	0,71

A continuación, se muestra a detalle el análisis de los resultados:

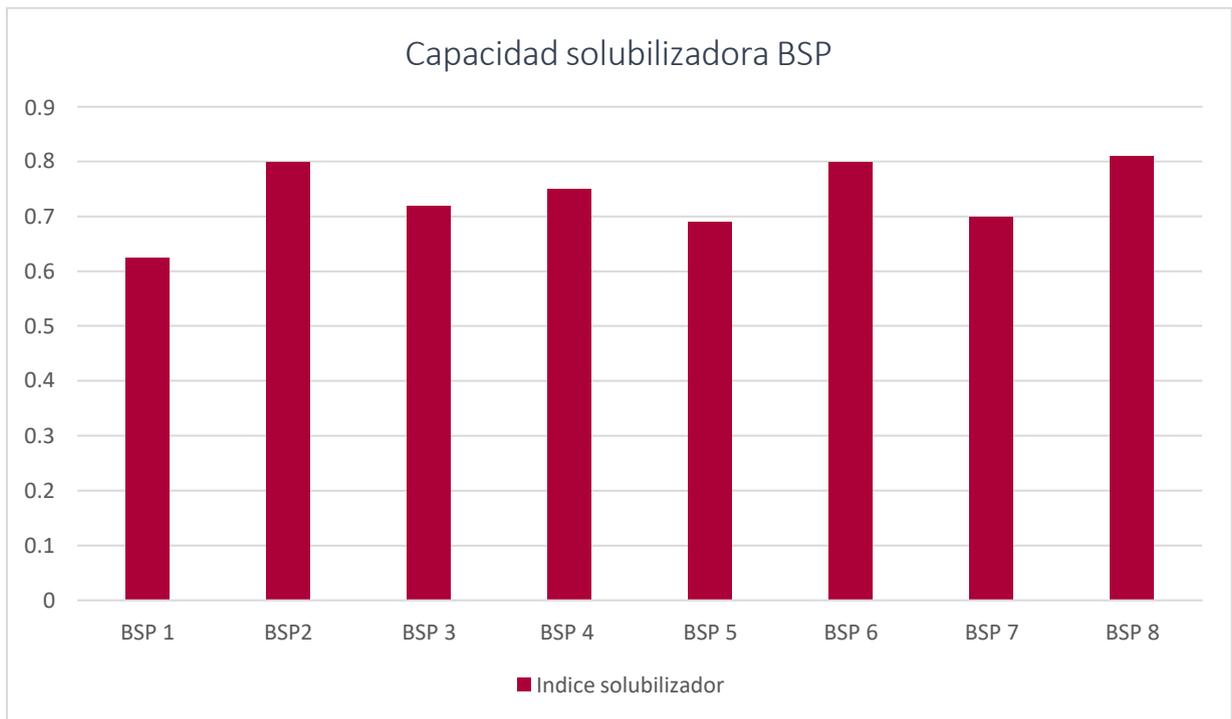


Fig1A. Capacidad de solubilización BSP

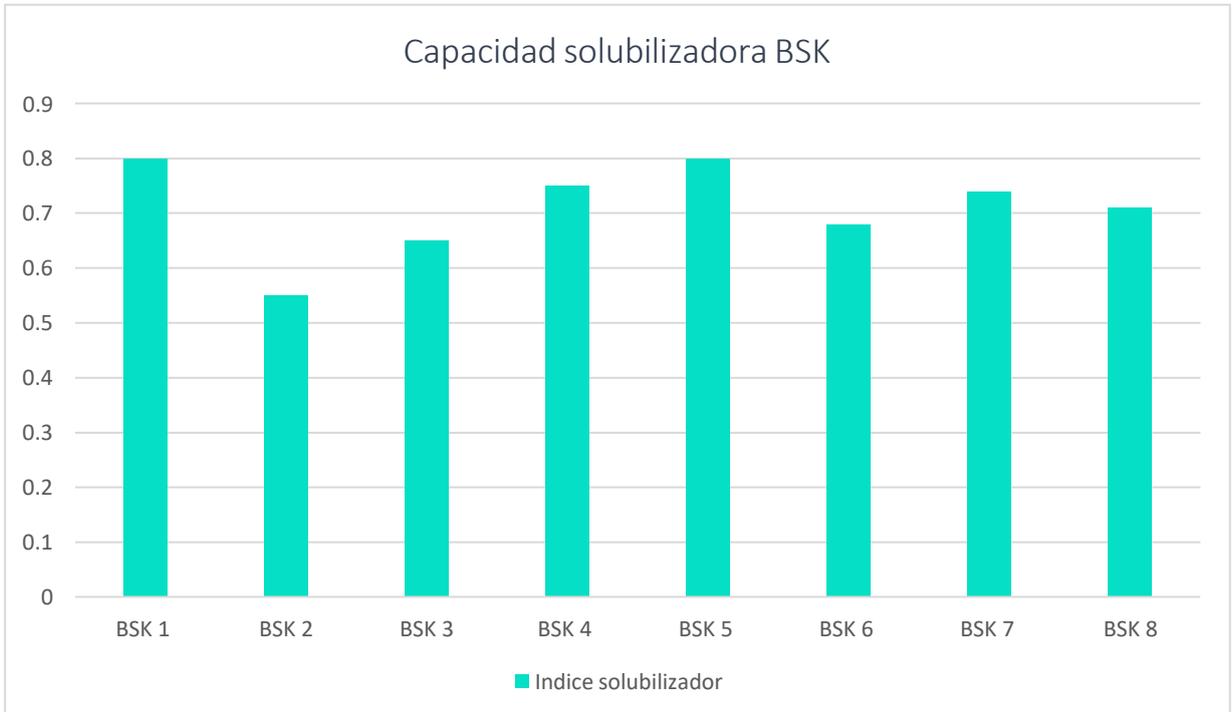
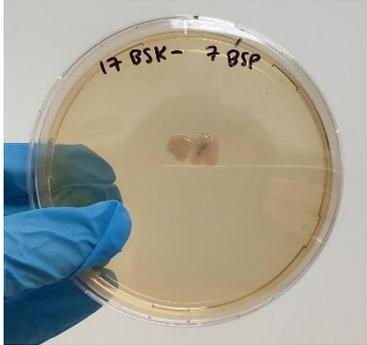
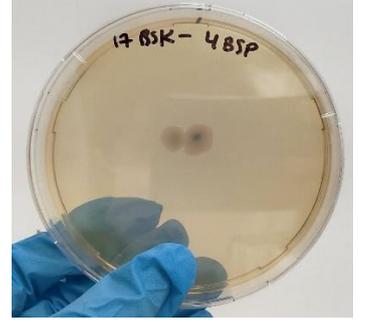
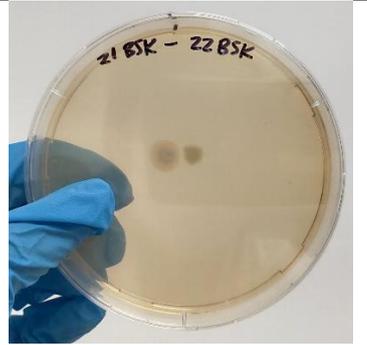


Fig1B. Capacidad de solubilización BSK

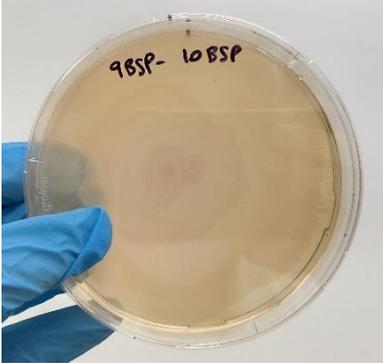
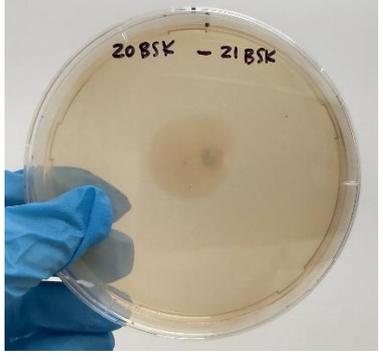
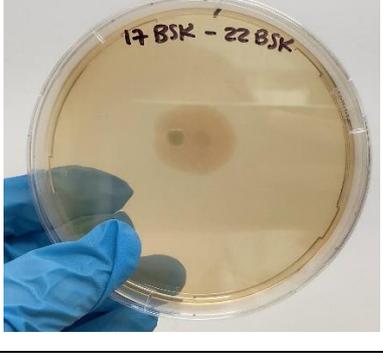
Para este proyecto se intentaron 17 combinaciones. Se obtuvieron 9 resultados de sinergia de los cuales 2 mostraron un cambio de color a rojo. Por otra parte, en 8 casos ocurrió lisis de los cuales 2 también mostraron un cambio de color a rojo. En la tabla 2.7.2.1 y 2.7.2.2 se recopilaron los datos obtenidos en un medio universal: TSB.

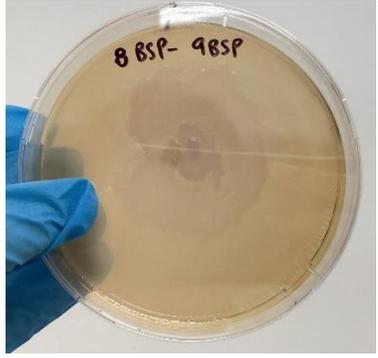
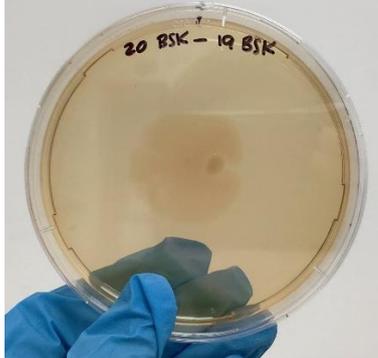
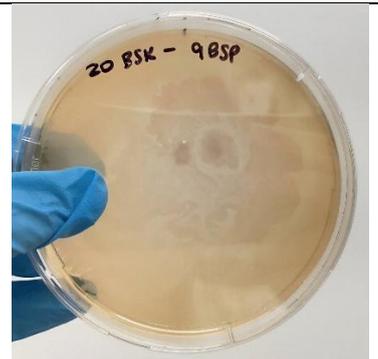
Tabla 2.7.2.1 Pruebas de compatibilidad: sinergia (5 días)

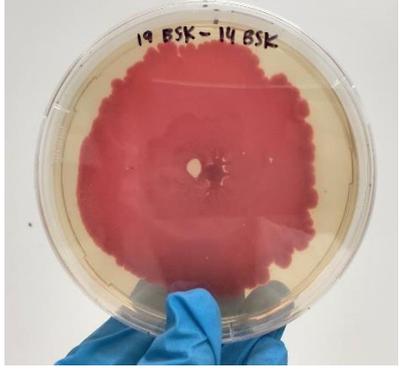
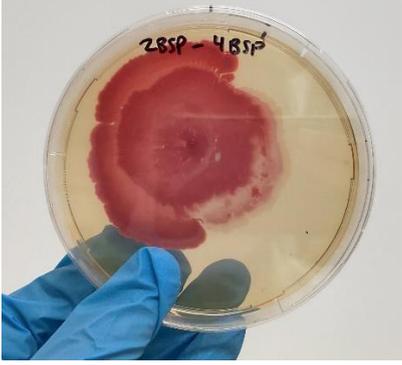
# combinación	Combinación bacteriana	Compatibilidad	Placa
1	17 BSK – 7 BSP	Sinergia	
2	19 BSK – 8 BSP		
3	17 BSK – 4 BSP		
4	21 BSK – 22 BSK		

5	4 BSP – 7 BSK		 <p>A petri dish containing a yellowish agar medium. Two small, dark brown spots are visible in the center. The dish is labeled "4BSP - 7BSP" at the top. A hand in a blue glove is holding the edge of the dish.</p>
6	7 BSP – 8 BSP		 <p>A petri dish containing a yellowish agar medium. Two small, dark brown spots are visible in the center. The dish is labeled "7BSP - 8BSP" at the top. A hand in a blue glove is holding the edge of the dish.</p>
7	2 BSP – 3 BSP		 <p>A petri dish containing a red agar medium. A large, circular, dark red area is visible in the center, surrounded by a lighter red ring. The dish is labeled "2BSP - 3BSP" at the top. A hand in a blue glove is holding the edge of the dish.</p>

Tabla 2.7.2.2 Pruebas de compatibilidad: lisis (5 días)

# combinación	Combinación bacteriana	Compatibilidad	Placa
8	14 BSK – 17 BSK	Lisis	
9	9 BSP – 10 BSP		
10	20 BSK – 21 BSK		
11	17 BSK – 22 BSK		

12	8 BSP – 9 BSP	Lisis	
13	20 BSK – 19 BSK		
14	20 BSK – 9 BSP		
15	21 BSK – 10 BSP		

16	19 BSK – 14 BSK		
17	2 BSP – 4 BSP		

3.2 Análisis de costo- beneficio

3.2.1 Análisis de costo

El presupuesto invertido incluye los materiales de la fase laboratorio para el proyecto se muestra a continuación:

Tabla 3.4.1 Presupuesto para el aislamiento de BSP y BSK

Cantidad	Descripción	Valor
1	Medio NBRIP	\$200,00
1	Medio Aleksandrov	\$250,00
80	Placas Petri (5\$ cada una)	\$400,00
1	Cilindro volumétrico	\$20,00
1	Matraz Erlenmeyer 1000ml	\$10,50
1	Marcador permanente punta fina	\$ 1,00
1	Cinta transparente de embalaje	\$ 10,00
	Total, gastos	\$891,50

En la Tabla 3.4.1 se omiten los gastos para los equipos de trabajo necesarios para un laboratorio, ya que estos instrumentos pertenecen a los gastos de la fase laboratorio.

Beneficios de la propuesta del proyecto

Los biofertilizantes a futuro reemplazarán los fertilizantes sintéticos. Las consecuencias irreversibles que se desencadenan en el suelo y que se transmiten a los cuerpos de agua son problemas actuales que se están enfrentando. En el 2020, la provincia de los Ríos, Ecuador, encabezó el sector bananero y cacaotero. De otra perspectiva, esto también sugiere que su suelo necesita ser tratado porque el ser humano no puede seguir explotando los recursos de la Tierra sin reponer nada. El suelo posee recursos limitados. Hoy en día, mejorar la calidad del suelo mediante la fertilización orgánica es posible (Espinosa et al., 2019).

El beneficio principal de esta investigación serán las cepas aisladas y los resultados de las pruebas de compatibilidad, las cuales podrán ser la base para los efectos promotores del crecimiento de plantas en condiciones controladas. Se podrá además seguir con los aislamientos de las bacterias ya que se seguirá ampliando el levantamiento de información, tanto para la identificación como para la compatibilidad. El valor económico no es significativo si se piensa que esta investigación podrá mejorar la calidad de vida del suelo y recuperar la microbiota afectada por la explotación de los monocultivos en Ecuador.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El suelo es la fuente de los recursos que el ser humano sigue extrayendo sin reponer a cambio nada. El planeta posee recursos limitados hay que protegerlo y remediar a los impactos ambientales que está causando el impacto antropogénico.

Conclusiones

En conclusión, el número de las bacterias aisladas BSP y BSK fueron 16, de un total de 11 muestras de suelo extraídas a 15 cm de profundidad en los monocultivos de banano y cacao de tres provincias de Ecuador: Los Ríos, El Guayas y El Oro.

- Se puede concluir que, la capacidad solubilizadora de las bacterias aisladas es distinta entre ellas y es importante la identificación de las más eficientes. Su característica de ser nativas permitiría la adaptabilidad en nuestros suelos con una eficacia del 100%, además que seríamos independiente de compras internacionales. En total se aislaron 18 bacterias de las cuales 9 BSP y 9 BSK.
- El índice solubilizador se promedia para las BSP de 0.74 y para BSK de 0.71, siendo para las primeras 0.625 el valor mínimo y 0.81 el valor más alto. Mientras que para el valor mínimo fue 0.55 y el más alto 0.8. Fueron valores muy buenos considerando que de 9 BSP aisladas 4 fueron más eficientes que el promedio y de 9 BSK aisladas 5. Las aisladas mostraron uniformidad ya que todas fueron Gram negativas.
- Además, se demostró que existe sinergia entre las bacterias aisladas, de las 18 combinaciones de pruebas de compatibilidad realizadas 7 mostraron sinergia y 7 lisis, mientras que 4 de ellas mostraron un cambio de color de medio rojo, donde solo una de ellas mostró sinergia.

Recomendaciones

- Es recomendable, a futuro dirigir estudios de investigación para medir los efectos promotores del crecimiento de plantas en condiciones controladas (*invernadero*), para encontrar el mix biológico más eficiente.
- La microbiota de nuestro país es rica de diversidad biológica que aún no ha sido explorada, las investigaciones que se recomiendan para expandir para este proyecto se enfocan en no limitar el mix biotecnológico a BSP y BSK, si no en encontrar mejores combinaciones microbianas.
- Además, se incentiva la formulación de biofertilizantes como remplazo de los fertilizantes sintéticos que tanto daño están causando al suelo. Hay que tener presente que somos la última generación que puede salvar el planeta.

ANEXOS



Fig1. Recolección de muestras



Fig2. Aislamiento de BSK en medio Aleksandrov

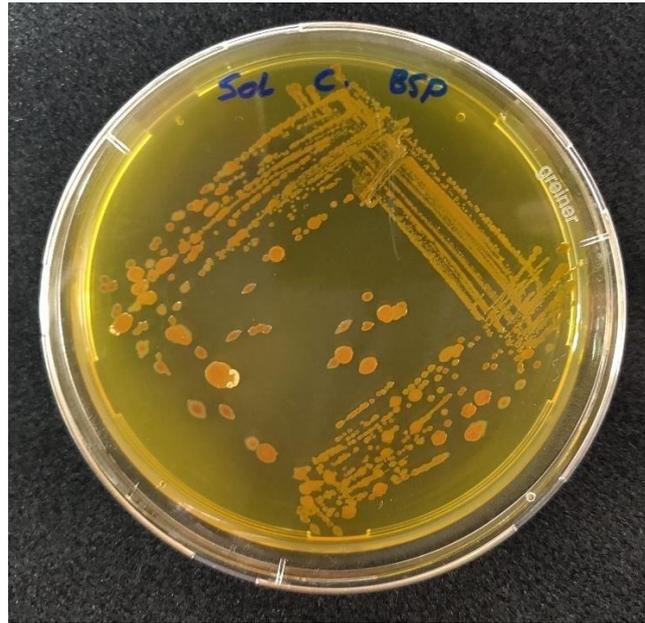


Fig3. Aislamiento de BSP en medio SMRS

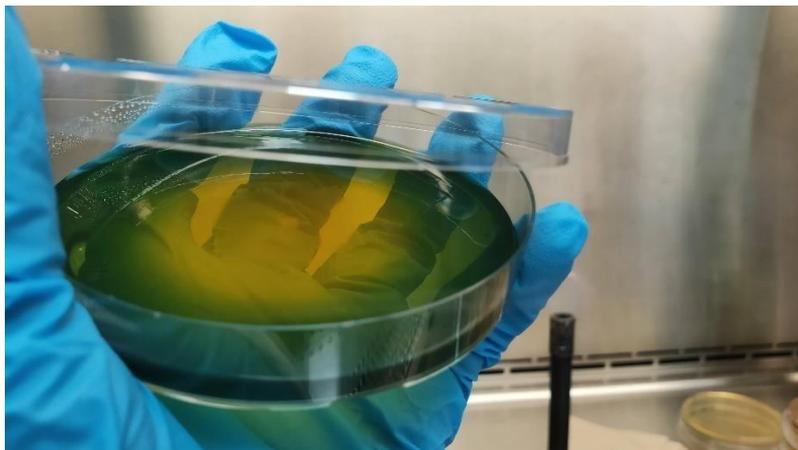


Fig4. BSK aislada

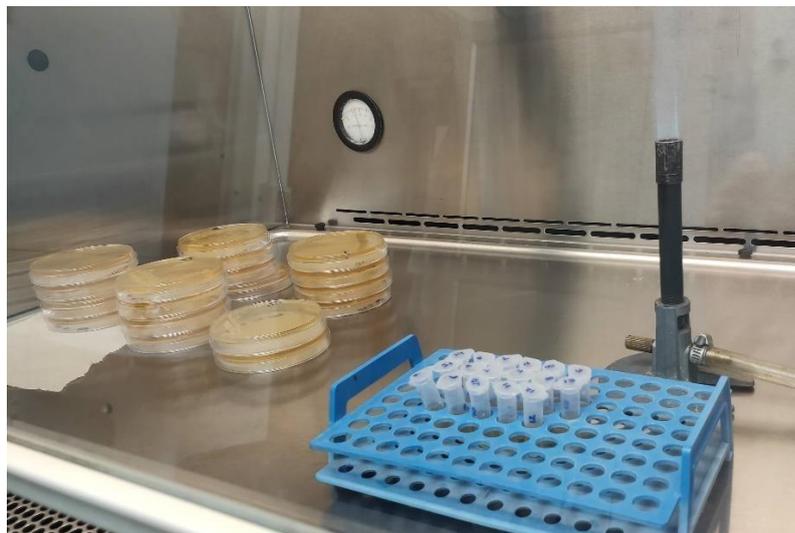


Fig5. Conservación de 17 bacterias aisladas

BIBLIOGRAFÍA

- De-Bashan, L. E., Holguin, G., Glick, B. R., & Bashan, Y. (2007). Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. *Microbiología agrícola. Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo. México: Editorial Trillas*, 170-224.
- Andrade, F. H., Taboada, M. A., Lema, R. D., Maceira, N. O., Echeverria, H. E., Posse Beaulieu, G., ... & Mastrangelo, M. E. (2017). *Los desafíos de la agricultura argentina: satisfacer las futuras demandas y reducir el impacto ambiental*. Ediciones INTA.
- Food and Agriculture Organization (2019). *Banana Exportation Statistics*. www.fao.org
- Beltrán Pineda, M. E. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 101-113.
- Galeana, J. A. I. (2016). Caracterización de bacterias solubilizadoras de fósforo nativas de los suelos de Sinaloa con potencial para incrementar el crecimiento y mejorar la nutrición fosforada del maíz (*Zea mays* L.).
- Mera Cedeño, Á. F. (2022). *Respuesta agronómica a un plan de fertilización del cultivo de café (Coffea) en el sector Sacha Wiwa, parroquia Guasaganda, cantón La Maná* (Bachelor's thesis, Ecuador: La Mana: Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC)).
- Shen, J., Yuan, L., Zhang, J., Li, H., Bai, Z., Chen, X., ... & Zhang, F. (2011). Phosphorus dynamics: from soil to plant. *Plant physiology*, 156(3), 997-1005.
- Banerjee, S., Palit, R., Sengupta, C., & Standing, D. (2010). Stress induced phosphate solubilization by 'Arthrobacter' Sp. And 'Bacillus' sp. isolated from tomato rhizosphere. *Australian Journal of crop science*, 4(6), 378-383.
- Fernández, M. T. (2007). Fósforo: amigo o enemigo. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 41(2), 51-57.
- Oliviera C, Alves V, Marriel I, Gómez E, Scotti M, Carneiro M, Guimaraes M, Schaffert R, Sa N. (2008). Phosphate solubilizing microorganisms isolated from

rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil. Biol. Biochem.*

- Paul N, Sundara W. (1971). Phosphate-dissolving bacteria in the rhizosphere of some cultivated legumes. *Plant and Soil* 35: 127-132.
- Chang, C. H., & Yang, S. S. (2009). Thermo-tolerant phosphate-solubilizing microbes for multi-functional biofertilizer preparation. *Bioresource Technology*.
- Trivedi, P., & Sa, T. (2008). *Pseudomonas corrugata* (NRRL B-30409) mutants increased phosphate solubilization, organic acid production, and plant growth at lower temperatures. *Current Microbiology*, 56(2), 140-144.
- Forero Rubio, L. F., & Pérez Mora, L. S. (2010). Efecto de la restauración vegetal sobre bacterias solubilizadoras de fósforo y potasio (PNN los nevados).
- Torsvik, V., & Ovreas, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current opinion in microbiology*, 5(3), 240-245.
- Alori, E. T., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in microbiology*, 8, 971.
- Richardson, AE y Simpson, RJ (2011). Microorganismos del suelo que median en la disponibilidad de fósforo. *Fisiol vegetal*. 156, 989–996. doi: 10.1104/pp.111.175448
- Zhang, L., Ding, X., Chen, S., He, X., Zhang, F. y Feng, G. (2014). La reducción de la relación carbono:fósforo puede mejorar la mineralización de fitina microbiana y disminuir la competencia con el maíz por el fósforo. *J. Planta Interactuar*. 9, 850–856. doi: 10.1080/17429145.2014.977831
- Azziz, G., Bajsa, N., Haghjou, T., Taulé, C., Valverde, A., Igual, J., et al. (2012). Abundancia, diversidad y prospección de bacterias solubilizadoras de fosfato cultivables en suelos bajo rotación cultivos-pastos en régimen de labranza cero en Uruguay. 320–326. doi: 10.1016/j.apsoil.2011.10.004
- Hernández, R. E. (2022). *Estudio comparativo de alternativas de fertilizantes para los cultivos de Colombia a partir de la aplicación de la biotecnología* (Bachelor's thesis, Fundación Universidad de América).
- Gutiérrez Avellán, K. A. (2020). *Importancia del potasio en el crecimiento y desarrollo en el cultivo de banano (Musa AAA* (Bachelor's thesis, BABAHOYO: UTB, 2020).

- Ecuador. Corporación Financiera Nacional. (2020). CFN.Ficha Sectorial: Bananos y Platanos. <https://www.cfn.fin.ec>
- Ecuador. Instituto Nacional de Estadística y Censos. (2020). Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua-espac 2019. INEC.
- Gutiérrez, S. J. G., & Cevallos, H. V. (2021). Análisis comparativo de las exportaciones bananeras del Ecuador entre el primer semestre 2019 Vs el primer semestre 2020 post Covid-19. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 4(S1), 194-201.
- Boyd, C. (2018). Propiedades de fertilizantes comerciales comunes. Obtenido de Global aquaculture Alliance: <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/propiedades-de-fertilizantes-comerciales/>
- Arata-Rodríguez, J. J. (2020). Relación de las condiciones climáticas y el manejo de la fertilización con el estado nutritivo y el rendimiento del cultivo de banano (Musa AAA cv Cavendish) en el cantón de Parrita, Puntarenas, Costa Rica.
- López, M., & A Espinosa, J. (1995). *Manual de nutrición y fertilización del banano: una visión práctica del manejo de la fertilización* (No. C018. 084). Instituto de la Potasa y el Fósforo.
- Vivar, F. (2013). Requerimientos nutricionales del cultivo de cacao en Ecuador. Memorias Congreso Mundial del Cacao.
- Suárez, Y. Y. J., Castañeda, G. A. A., Daza, E. Y. B., Estrada, G. A. R., & Molina, J. R. (2021). Modelo Productivo para el Cultivo de Cacao (*Theobroma cacao* L.) en el Departamento de Santander.
- Sánchez, L. E., Parra, D., Gamboa, E., & Rincón, J. (2005). Rendimiento de una plantación comercial de cacao ante diferentes dosis de fertilización con NPK en el sureste del estado Táchira, Venezuela. *Bioagro*, 17(2), 119-122.
- Moreno Benavides, D. A., & Moreno Londoño, M. F. (2020). Evaluación del potencial de bacterias promotoras de Crecimiento vegetal PGPR, aplicadas a cultivos de papa en Condiciones de invernadero.
- Alori, E. T., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in microbiology*, 8, 971.

- Etesami, H., Emami, S., & Alikhani, H. A. (2017). Potassium solubilizing bacteria (KSB): Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects A review. *Journal of soil science and plant nutrition*, 17(4), 897-911.
- Romero, E., Melendres, K. P., & Polo, L. Á. T. (2015) PRUEBAS BIOQUÍMICAS.
- Llanos Machaca, M. Y. (2017). Bacterias solubilizadoras de fosfato del género Bacillus en suelos de la provincia de El Collao (Puno) y su efecto en la germinación y crecimiento de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) en condiciones de invernadero.
- Bolaño, J., Fontalvo, J., Aranguren, Y., & Machado, E. (2018). Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfato.
- Eugui Arrizabalaga, D. (2018). Estudio del efecto promotor del crecimiento de plantas de diferentes levaduras.
- González Mancilla, A. (2016). Interacción entre bacterias promotoras de crecimiento y hongos micorrízicos en el crecimiento de chile poblano (*Capsicum annuum* L).
- Daza-Martínez, Y. M., Almaraz-Suarez, J. J., Rodríguez-Mendoza, M. N., Angulo-Castro, A., & Silva-Rojas, H. V. Aislamiento de rizobacterias asociadas a tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y su potencial para promover crecimiento vegetal.
- León-Fajardo, M., Mancilla-Felipez, J. D., & Ortuño-Castro, F. N. (2019). Evaluación de bacterias endófitas promotoras de crecimiento en el cultivo de quinua. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 7(2), 88-99.
- Restu, M., Bachtiar, B., & Larekeng, S. H. (2019, May). Gibberellin and IAA production by rhizobacteria from various private forest. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 270, No. 1, p. 012018). IOP Publishing.
- Norzilawati, P., & Norhayati, N. (2021). Isolation and characterization of effective microorganism from fermented fruit juice.
- Saxena, S., Kumar, R., Tomar, A., Singh, J., & Purushottam, D. B. P. (2020). Isolation, Biochemical Characterization and Potassium Solubilization Efficiency of Different Microbial Isolates. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 9(6), 2667-2680.
- Grauer Liurner, A., Grunberg Eskenazi, K., & Zardo Vila, S. I. (2015). Puesta a punto de un protocolo de liofilización para la creación de bancos bacterianos.

- Cisneros-Reyes, C. I., del Carmen Martínez-Rodríguez, J., de la Mora Amutio, M., & Ogura, T. Desarrollo de una bioformulación con actividad promotora del crecimiento a base de endófitos bacterianos de papa (*Solanum tuberosum*) var. Fiana.
- Espinosa, M. F. O., Calderón, A. D. A., Salazar, S. F. M., Herrera, E. F., & Meza, A. O. (2019). Fertilización orgánica y su impacto en la calidad del suelo. *Biotecnia*, 21(1), 87-92.