

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS



AISLAMIENTO DE RIZOBACTERIAS DEL CULTIVO DE TOMATE

(Solanum lycopersicum L.)

TESIS

Presentada como requisito previo para obtener el título de

INGENIERO AGRÓNOMO

POR:

OSIRIS GABRIELA VÁSQUEZ FLORES

CATACAMAS, OLANCHO

Agosto, 2026

AISLAMIENTO DE RIZOBACTERIAS DEL CULTIVO DE TOMATE

(Solanum lycopersicum L.)

POR:

OSIRIS GABRIELA VÁSQUEZ FLORES

ROY DONALD MENJIVAR BARAHONA Ph.D.

Director de Tesis

TESIS

Presentada como requisito previo para obtener el título de

INGENIERO AGRÓNOMO

CATACAMAS, OLANCHO

Agosto, 2026

DEDICATORIA

A Dios, a quien le entrego este logro con todo mi corazón. A Él, que conoció cada uno de mis sueños mucho antes de que pudiera alcanzarlos, que escuchó mis oraciones y permaneció conmigo incluso en los días en que mi fe y mis fuerzas parecían pequeñas. En Él encontré refugio cuando tuve miedo, fortaleza cuando pensé que no podía más y la certeza de que, aun cuando no comprendía sus planes, su presencia siempre estuvo conmigo.

Hoy entiendo que muchas de las cosas que alguna vez pedí encontraron respuesta a su tiempo y de maneras que jamás habría imaginado. Cada puerta que se abrió y cada dificultad superada me enseñaron a confiar en sus tiempos y en sus propósitos. Hoy mi corazón solo puede decir: gracias, Dios, porque me permitiste llegar hasta donde tantas veces te pedí llegar. En tus manos pongo este logro y todos los sueños que aún me quedan por cumplir.

A mi hermano, Elmer Rafael Vásquez, porque este sueño comenzó primero en tu corazón. Fuiste tú quien sembró en mí el amor por la agronomía y quien, sin saberlo, hizo que aquel sueño tuyo terminara convirtiéndose también en el mío. La vida tomó para ti un rumbo diferente al que alguna vez imaginaste, pero aquel sueño no se perdió. Hoy tengo la dicha de verlo cumplirse y deseo, más que nada, que puedas vivir este momento con alegría y sentirlo también como tuyo. Porque hay una parte de todo esto que siempre te pertenecerá.

No existen palabras que alcancen para decirte cuánto significas para mí. Si pudiera elegir nuevamente a la persona con quien compartir esta historia, volvería a elegirte a ti. Espero que al verme llegar hasta aquí puedas sentirte orgulloso, pero también que sepas lo orgullosa que estoy yo de ti y lo afortunada que me siento de tenerte como hermano. Hoy la vida me permite cumplir el sueño que un día nació en ti, y no podría existir una manera más bonita de hacerlo que llevarte conmigo en él. **Por ti, Elmer, con todo mi amor.**

AGRADECIMIENTO

A Dios, por ser mi guía y mi fortaleza. Por sostenerme cuando sentí que no podía más, levantarme cuando dudé de mis fuerzas y darme la perseverancia necesaria para no rendirme. Gracias por abrir puertas cuando no encontraba una salida y, sobre todo, por poner en mi vida a personas maravillosas que fueron instrumento de su ayuda. Hoy comprendo que nunca estuve sola y que su presencia me acompañó hasta permitirme alcanzar este sueño que tantas veces puse en sus manos.

A mi hermano, Elmer Rafael Vásquez, con todo mi amor y mi más profunda gratitud. Gracias por creer en mí, por hacer de mis sueños también los tuyos y por ser mucho más que un hermano: mi apoyo incondicional, mi ejemplo y una figura paterna para mí. De ti aprendí a amar esta profesión y a comprender el valor de luchar por aquello que anhelamos.

Detrás de cada página de esta tesis están también tus sacrificios, tu confianza en mí y el amor con el que hiciste de mi futuro una de tus prioridades. Hoy culmino esta etapa llevando conmigo una parte de aquel sueño que un día fue tuyo. Espero que al verme llegar hasta aquí sientas que cada esfuerzo valió la pena y que puedas sentirte tan orgulloso como yo me siento agradecida de tenerte en mi vida. Este logro lleva mi nombre, pero también cuenta nuestra historia.

A mis padres, Georgina Oristela Flores y Rafael Vásquez Sevilla, por ser mis raíces y por enseñarme, con su ejemplo, el valor del trabajo, la humildad y la perseverancia. **A mi mamá**, por su apoyo y por estar presente cuando más lo necesité. **A mi papá**, por creer en mí y por el orgullo y la alegría con los que siempre ha celebrado mis pasos. Gracias a ambos por todo lo que hicieron para brindarme las oportunidades que hoy me permiten estar aquí. Todo lo que soy y lo que hoy alcanzo lleva también una parte de ustedes.

Al Dr. Adan Alvarado Ramirez, por haber sido una persona invaluable en esta investigación y alguien a quien hoy agradezco con un cariño muy especial. Gracias por dedicarme su tiempo y compartir conmigo sus conocimientos con una paciencia admirable, aun sin tener ninguna obligación de hacerlo. Siempre encontré en usted la disposición para enseñarme y la confianza de saber que podía acudir a usted cuando lo necesitara.

Admiro su trayectoria, pero aún más la humildad y la enorme calidad humana que lo distinguen. Tuve la fortuna de encontrar en usted no solo a un maestro excepcional, sino también a un amigo a quien quiero, respeto y admiro sinceramente. Gracias por todo lo que aportó a mi formación y por demostrarme, con su ejemplo, que el conocimiento adquiere todavía más valor cuando se comparte con humildad. Espero algún día poder dejar en alguien una huella tan bonita como la que usted ha dejado en mí.

Al MSc. Edwar Rivera Solís, por estar presente desde el inicio y convertirse en uno de los pilares más importantes de este proceso. Gracias por hacer propios muchos de mis retos, por creer en mí incluso cuando yo misma dudaba de mis capacidades y por impulsarme siempre a dar lo mejor de mí. Su confianza, paciencia y cariño hicieron más llevaderos los momentos difíciles y mucho más especiales aquellos en los que había algo que celebrar.

Gracias por estar a mi lado, por cuidar de mis sueños con tanto cariño y por alegrarse de cada avance como si también fuera suyo. Hay personas cuya presencia hace más bonito el camino, y usted ha sido una de ellas. Siempre guardaré un aprecio y una gratitud muy especiales por todo lo que significó para mí durante estos años.

Al Ing. Javier Bú y al Dr. Gustavo Fontecha, por brindarme su tiempo y compartir conmigo sus conocimientos con tanta paciencia y disposición. Gracias por tomarse el tiempo de enseñarme paso a paso aquello que era nuevo para mí y por estar siempre dispuestos a resolver mis dudas. Agradezco sinceramente cada enseñanza y la buena voluntad con la que contribuyeron a esta investigación.

A mis asesores, Dr. Roy Menjívar, MSc. Zamir Erazo y MSc. Israel Rodas, por formar parte de este trabajo y de un momento importante de mi formación profesional. Agradezco su participación como asesores, les guardo mi respeto y gratitud por compartir conmigo la culminación de esta investigación.

A la Universidad Nacional de Agricultura, por abrirme sus puertas y permitirme hacer realidad uno de los sueños que me acompañó desde niña. En sus aulas, módulos y laboratorios aprendí, crecí y reafirmé el amor y compromiso con la profesión que elegí. Hoy me llena de gratitud y orgullo haberme formado en la universidad que un día soñé con llamar mi alma mater. Dondequiera que me lleve mi profesión, siempre llevaré conmigo una parte de la UNAG.

Finalmente, a mí misma, por no rendirme cuando dudé de mis capacidades y por continuar aun cuando confiar en mí no siempre fue fácil. Hoy puedo mirar todo lo realizado con orgullo y reconocer una fortaleza que antes muchas veces no supe ver. Más allá de todo lo aprendido académicamente, me quedo con la certeza de que fui capaz de aquello que tantas veces pensé que no podría lograr. Este no es el final, sino el comienzo de una nueva historia.

A todas las personas que, de alguna manera, contribuyeron a mi formación y al desarrollo de esta investigación, **mi sincero agradecimiento.**

CONTENIDO

RESUMEN	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1 General.....	3
2.2 Específicos.....	3
III. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
3.1 Producción global de hortalizas.....	4
3.2 Impacto de los agroquímicos en la biodiversidad microbiana del suelo	4
3.3 Composición biológica de los suelos	5
3.4 Rizósfera.....	5
3.5 Suelos supresivos.....	6
3.6 Tipos de supresión	7
3.7 Rizobacterias	8
3.8 Bacterias fijadoras de nitrógeno	8
3.9 Bacterias solubilizadoras de fósforo.....	9
3.10 Medios de cultivo selectivos.....	11
3.11 Aislamiento de bacterias rizosféricas.....	12
3.12 Métodos utilizados para la evaluación del crecimiento bacteriano	13
3.13 Identificación de rizobacterias.....	14
3.14 Bioinsumos de uso agrícola.....	15
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
4.1 Ubicación de la investigación.....	16

4.2 Materiales	16
4.3 Equipos	17
4.4 Metodología.....	17
4.4.1 Fase de campo	17
4.4.2 Fase de laboratorio.....	18
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
5.1 Aislamiento y caracterización de los aislados bacterianos	30
5.2 Capacidad de solubilización de fósforo de los aislados bacterianos	31
5.3 Identificación molecular de los aislados bacterianos mediante el gen 16S rRNA y análisis de genes funcionales.....	32
5.4 Selección de aislados con potencial biotecnológico.....	35
5.5 Establecimiento del cepario bacteriano	37
VI. CONCLUSIONES.....	38
VII. RECOMENDACIONES	40
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXOS	49

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Componentes para la preparación del medio Pikovskaya.....	20
Tabla 2. Componentes para la preparación del medio Ashby	20
Tabla 3. Características de las colonias bacterianas aisladas en los medios Ashby y PVK.....	30
Tabla 4. Identificación de los aislados bacterianos mediante el análisis de secuencias del gen 16S rRNA.	32
Tabla 5. Detección de genes y funciones asociadas a nifH, gcd y phoD en los aislados bacterianos.	34
Tabla 6. Aislados bacterianos seleccionados con potencial biotecnológico para continuar su evaluación como posibles bioinoculantes.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Las raíces y su entorno (Rizósfera).....	6
Figura 2. Ubicación de la investigación.	16
Figura 3. Características morfológicas observadas mediante estereoscopio en las colonias de los diez aislados bacterianos.....	31
Figura 4. Índice de solubilización de fósforo de los aislados bacterianos evaluados en medio PVK al día 15.	31
Figura 5. Árbol filogenético de los aislados bacterianos basado en secuencias del gen 16S rRNA y secuencias de referencia.	33

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Recolección de muestras de raíces y suelo rizosférico.	49
Anexo 2. Procesamiento de las muestras y preparación de diluciones seriadas.	49
Anexo 3. Aislamiento y purificación de los aislados bacterianos.	50
Anexo 4. Caracterización morfológica y microscópica de los aislados bacterianos.	51
Anexo 5. Obtención de biomasa bacteriana.	52
Anexo 6. Extracción de ADN genómico bacteriano.	52
Anexo 7. Evaluación de la calidad del ADN y preparación de muestras para secuenciación...53	
Anexo 8. Evaluación de la capacidad de solubilización de fósforo.	54
Anexo 9. Análisis estadístico del índice de solubilización de fósforo de los aislados bacterianos	55
Anexo 10. Evaluación de los cromatogramas de las secuencias del gen 16S rRNA.	56
Anexo 11. Obtención de secuencias consenso del gen 16S rRNA.....	56
Anexo 12. Identificación molecular de los aislados bacterianos mediante BLASTn.	57
Anexo 13. Evidencia complementaria del análisis de genes funcionales asociados al metabolismo de nitrógeno y fósforo.	58

Vásquez Flores, OG. 2026. Aislamiento de rizobacterias del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Trabajo de investigación. Ingeniero Agrónomo. Catacamas, Olancho. Universidad Nacional de Agricultura. 70p.

RESUMEN

Las bacterias asociadas a las plantas desempeñan funciones importantes en la disponibilidad de nutrientes, lo que las convierte en una alternativa con potencial para el desarrollo de bioinoculantes. Esta investigación tuvo como objetivo aislar y caracterizar bacterias rizosféricas y endofíticas de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con potencial de fijación biológica de nitrógeno y solubilización de fósforo. Las muestras de raíces y suelo rizosférico fueron procesadas mediante diluciones seriadas y cultivadas en medios Ashby y Pikovskaya (PVK); los aislados obtenidos se caracterizaron morfológicamente y molecularmente mediante secuenciación del gen 16S rRNA, y se evaluó su capacidad de solubilización de fósforo. Se obtuvieron diez aislados bacterianos, cinco con crecimiento en medio Ashby y cinco con capacidad de solubilización de fósforo en medio Pikovskaya (PVK), los cuales presentaron características morfológicas diferenciadas. La capacidad de solubilización de fósforo difirió significativamente entre los aislados ($P < 0,0001$); BS4, BS1 y BS2 alcanzaron los mayores índices (5,04, 4,27 y 4,04), mientras que BS5 y BS3 registraron 2,54 y 2,33, respectivamente. La identificación mediante secuenciación del gen 16S rRNA permitió asignar los diez aislados a ocho géneros: *Labrys*, *Rhizobium*, *Cronobacter*, *Brevibacillus*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Curtobacterium* y *Enterobacter*. No se confirmó la presencia de *nifH*; nueve aislados presentaron evidencia compatible con *gcd*, mientras que BF1 y BS5 mostraron evidencia compatible con *phoD*. Asimismo, se obtuvieron coincidencias con fosfatasa alcalina, *phoA* y *PhoX*, relacionadas con la movilización de fósforo. De los diez aislados obtenidos, *Cronobacter* y *Enterobacter* fueron excluidos por consideraciones de bioseguridad; los ocho restantes fueron seleccionados por su potencial biotecnológico y utilizados para establecer el primer cepario bacteriano de la UNAG, como base para futuras investigaciones orientadas al desarrollo de bioinoculantes.

Palabras clave: rizobacterias, *Solanum lycopersicum*, solubilización de fósforo, 16S rRNA, bioinoculantes.

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas de mayor importancia económica a nivel mundial debido a su alto valor nutricional. Representa aproximadamente el 16 % de la producción global de hortalizas y alcanza un valor de mercado de 58 000 millones de dólares, lo que evidencia su relevancia para el consumo y el comercio (FAO, 2016).

De acuerdo con datos del Observatory of Economic Complexity (OEC), el comercio de tomate en Honduras ha presentado variaciones a lo largo de los últimos años. En 2024, el país se ubicó aproximadamente en el puesto 38 de 152 países exportadores de tomate a nivel mundial, y durante ese mismo año las exportaciones superaron los 13,1 millones de dólares. Estas cifras evidencian la importancia de este cultivo dentro de la horticultura nacional, especialmente en departamentos como Olancho, Francisco Morazán, El Paraíso, Copán, Comayagua y Choluteca (OEC, 2025).

Sin embargo, la producción de tomate depende en gran medida del uso de fertilizantes sintéticos nitrogenados y fosforados, los cuales incrementan los costos de producción y pueden generar efectos ambientales adversos, como la contaminación del suelo y el deterioro de la microbiota nativa (Nassal *et al.*, 2018; Rajguru *et al.*, 2022).

Ante este panorama, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal constituyen una alternativa sostenible debido a su capacidad para favorecer la disponibilidad de nutrientes esenciales para las plantas, principalmente mediante mecanismos como la fijación biológica de nitrógeno y la solubilización de fósforo (Timofeeva *et al.*, 2023). Estos microorganismos también pueden intervenir en procesos como la síntesis de fitohormonas, la producción de compuestos antimicrobianos y la tolerancia al estrés abiótico, contribuyendo al crecimiento y la resiliencia de los cultivos (Rehan *et al.*, 2023).

Entre los microorganismos de interés agronómico que presentan estas funciones se encuentran géneros como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas*, ampliamente estudiados por su potencial para el desarrollo de bioinsumos en diferentes cultivos, incluido el tomate (Gupta *et al.*, 2022; Bakki *et al.*, 2024). Su aprovechamiento puede contribuir a disminuir la dependencia de fertilizantes de síntesis química y favorecer sistemas de producción agrícola más sostenibles (Haile *et al.*, 2025).

En este contexto, el estudio de bacterias asociadas a las plantas de tomate representa una oportunidad para generar conocimiento local sobre microorganismos con potencial de aplicación agrícola. Por ello, esta investigación tuvo como objetivo aislar y caracterizar bacterias rizosféricas y endofíticas de plantas de tomate con potencial de fijación biológica de nitrógeno y solubilización de fósforo, generando información que contribuya a futuras investigaciones orientadas al desarrollo de bioinoculantes y a una nutrición vegetal más sostenible.

II. OBJETIVOS

2.1 General

Aislar y caracterizar bacterias rizosféricas y endofíticas de plantas de tomate con potencial de fijación biológica de nitrógeno y solubilización de fósforo.

2.2 Específicos

Obtener aislados bacterianos a partir de la rizósfera y tejidos internos de la raíz mediante el uso de medios de cultivo selectivos

Cuantificar la capacidad de solubilización de fósforo de los aislados bacterianos obtenidos en medio Pikovskaya (PVK)

Identificar molecularmente los aislados bacterianos mediante la secuenciación del gen 16S rRNA y la amplificación de los genes *nifH*, *gcd* y *phoD*

Seleccionar los aislados con potencial biotecnológico para su posterior evaluación como posibles bioinoculantes

Establecer el primer cepario bacteriano de la UNAG a partir de los aislados seleccionados

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Producción global de hortalizas

La producción mundial de hortalizas ha mostrado un crecimiento sostenido durante los últimos años. De acuerdo con FAOSTAT (2025) en 2020 se registró una producción aproximada de 690 millones de toneladas a nivel mundial, mientras que para 2023 esta cifra superó los 1,189 millones de toneladas. Dentro de este grupo, el tomate destaca por su importancia productiva y comercial, con una producción mundial estimada en 197 millones de toneladas durante 2024. Estas cifras reflejan la relevancia de este cultivo, cuya demanda global se aproxima al volumen anual producido (FAO, 2025). Sin embargo, diversos organismos internacionales proyectan que para 2050 la población mundial alcanzará aproximadamente 9.7 mil millones de personas, lo que implicará que la producción de alimentos deberá incrementarse entre 50 % y 70 % para satisfacer la demanda global, considerando además cambios en las dietas y el aumento del consumo de proteína animal (FAO, 2009).

3.2 Impacto de los agroquímicos en la biodiversidad microbiana del suelo

El incremento de la demanda mundial de alimentos ha impulsado el uso intensivo de fertilizantes, herbicidas e insecticidas para aumentar la productividad agrícola. Actualmente, se aplican más de 3.5 millones de toneladas de pesticidas al año a nivel mundial, reflejando la alta dependencia de estos insumos en la agricultura moderna. Sin embargo, su uso excesivo puede afectar negativamente la microbiota del suelo, alterando la diversidad y actividad de microorganismos esenciales para los ciclos biogeoquímicos y la fertilidad del suelo. La exposición prolongada a estos compuestos puede reducir la biomasa, modificar la estructura microbiana y comprometer la sostenibilidad de los sistemas agrícolas a largo plazo (Khan, 2025).

3.3 Composición biológica de los suelos

Es un hábitat que alberga una amplia gama de macro y microorganismos dentro de los tres dominios taxonómicos. Sin embargo, cualquiera que sea el sistema de clasificación utilizado, la diversidad de la macro y microbiota del suelo es elevada en todos los niveles de análisis (Rahmadi & Franklin, 2012).

La biota del suelo se divide tradicionalmente en macro, meso y microbiota. En la microbiota la mayoría de los autores incluyen la microfauna y microbiota (bacterias, actinomicetes, hongos y algas) los cuales juegan diferentes roles y sirven para evaluar la calidad del suelo. La microfauna la conforman los protozoarios, nemátodos, rotíferos, tardígrados, colémbolos y ácaros considerándose que su tamaño es menor a 0.2 mm (Castellanos *et al.*, 2021).

Las bacterias del suelo son esenciales en la rizósfera, con unas 30.000 especies estimadas e identificando alrededor del 8%. Estas bacterias participan en la descomposición de materia orgánica y son cruciales en los ciclos biogeoquímicos, transformando los nutrientes para las plantas (De La Rosa, 2024).

Existe una amplia gama de interrelaciones entre especies de microorganismos en los ecosistemas, tales como sinérgicas, antagónicas, de competencia física y bioquímica, moduladas por múltiples y complejos factores bióticos y abióticos. En la rizósfera, uno de los principales sitios donde se presentan microorganismos, específicamente funcionales, como fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fosfatos, promotores del crecimiento vegetal, biocontroladores y especies patogénicas, normalmente, compiten por espacio y nutrientes. Todas estas interacciones tienen efecto en el crecimiento y sanidad de las plantas (Villar, 2024).

3.4 Rizósfera

Según García *et al.* (2013) la rizósfera se define como la franja de suelo directamente influenciada por las raíces, donde se concentra una interacción intensa entre plantas, microorganismos y nutrientes. Coexisten bacterias, hongos, actinobacterias y arqueas que

cumplen funciones ecológicas vitales como: mineralización de compuestos orgánicos, ciclado de nutrientes, degradación de contaminantes y supresión de patógenos. Su relevancia para la agricultura sustentable radica en que una rizósfera diversa y equilibrada favorece la fertilidad natural del suelo. Las prácticas agronómicas inciden directamente en la composición de la microbiota rizosférica.

Los microorganismos que forman el microbioma de las plantas pueden habitar en diferentes ambientes vegetales: las raíces (rizósfera; desde la superficie de la raíz hasta el suelo inmediatamente adyacente a la raíz). Las raíces de las plantas proporcionan uno de los entornos más ricos debido a los exudados producidos para reclutar el microbioma que habita en la rizósfera (Loera & Caamal, 2023), como se muestra en la **Figura 1**.

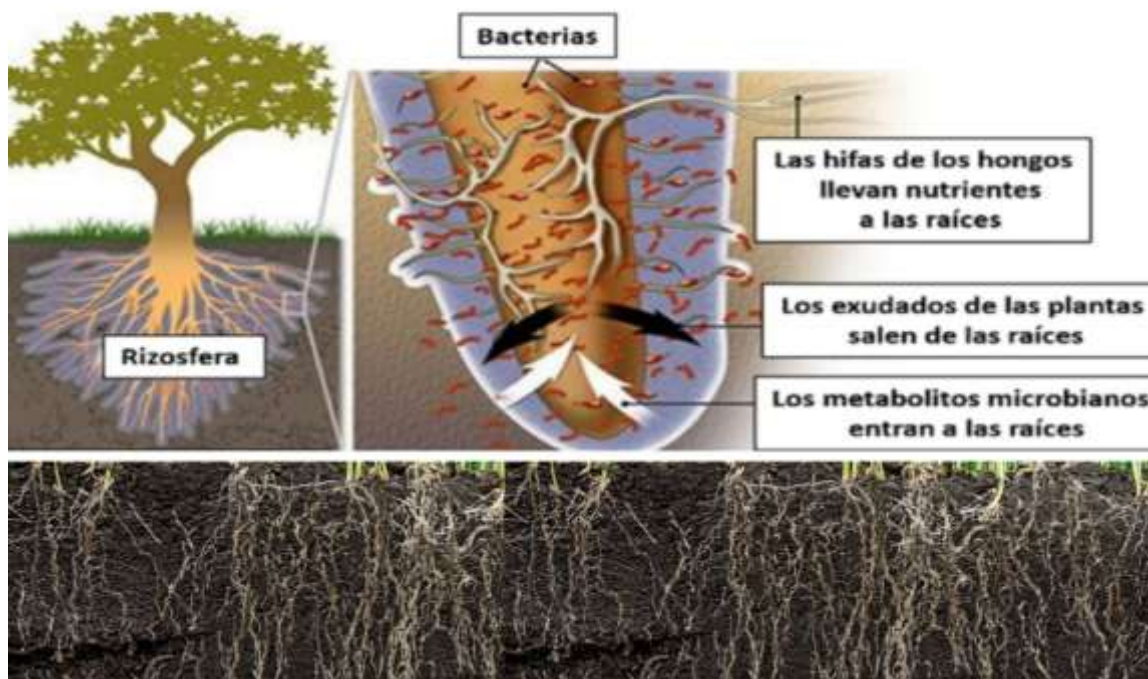


Figura 1. Las raíces y su entorno (Rizósfera)

Fuente: Cuenca (2025).

3.5 Suelos supresivos

Se define como “aquel suelo donde el desarrollo de una enfermedad se presenta en un nivel mínimo, aun en presencia de un patógeno virulento y hospedero susceptible”. En

contraste, a los suelos donde las enfermedades se desarrollan fácilmente, se les denomina conductivos (Barrera *et al.*, 2024).

La supresión edáfica hace referencia fundamental a la salud del suelo y condiciones ecológicas específicas de la comunidad microbiana, de tal forma que los microorganismos fitopatógenos causantes de enfermedades radiculares se mantengan en niveles poblacionales bajos o que no logren expresar su potencial patogénico (Calvo, 2021).

3.6 Tipos de supresión

De forma natural, todos los suelos poseen cierta capacidad para inducir supresión de fitopatógenos. Se ha demostrado que dicha capacidad está asociada a la presencia y actividad de los microorganismos del suelo. En los suelos supresivos (SS) se pueden presentar dos tipos de supresión: i) supresión general, atribuida a la actuación de la comunidad microbiana en conjunto, comúnmente asociada a la competencia por recursos y espacio, y ii) supresión específica, la cual se lleva a cabo por la actividad de taxones microbianos determinados o un grupo selecto de microorganismos antagonistas a un patógeno específico (Mendes *et al.*, 2011).

Al respecto, Mendes *et al.* (2011) observaron la reducción significativa de la infección de plantas de betabel con *Rhizoctonia solani* al transferir una pequeña porción de un SS (10 %), dentro de un suelo conductivo. Existen además en todo el mundo numerosos ejemplos en los cuales una sola especie microbiana antagonista puede iniciar procesos supresivos. La actividad y composición del microbioma rizosférico son influenciadas también por la planta a través de la producción de exudados radiculares, los cuales promueven la incorporación, activación y desarrollo de microorganismos benéficos para protegerse.

Durante el último cuarto de siglo se ha demostrado de forma contundente que además de los sideróforos, otros metabolitos (p. ej. antibióticos, compuestos orgánicos volátiles y enzimas líticas) desempeñan un papel fundamental en la supresión de enfermedades causadas por microorganismos fitopatógenos del suelo (MPS) de varias plantas. Las herramientas ómicas en conjunto con las técnicas de microbiología clásica y biología

molecular, han permitido comenzar a elucidar la complejidad de las interacciones planta-microorganismo (Barrera *et al.*, 2024).

3.7 Rizobacterias

Son capaces de estimular el crecimiento de las plantas mediante mecanismos directos e indirectos. Entre los mecanismos directos se pueden encontrar procesos como la fijación de nitrógeno y solubilización de fosfatos realizados por rizobacterias fitoestimuladoras. Por otro lado, en el efecto indirecto afectan el crecimiento de fitopatógenos, lo que permite un mejor desarrollo de las plantas hospederas (Sánchez *et al.*, 2021).

Los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* se encuentran entre los grupos de PGPR más abundantes y filogenéticamente diversos, los cuales muestran una colonización activa de la rizósfera y presentan un interés considerable en la mejora de la producción y el rendimiento de los cultivos (Gupta *et al.*, 2022).

Se ha informado que diferentes cepas bacterianas como *Bacillus*, *Rhizobium* y *Pseudomonas* son los solubilizadores dominantes de fósforo (Rodríguez & Fraga, 1999). Diversas cepas bacterianas como *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Acetobacter* y *Pseudomonas* incrementan las reacciones de desarrollo dentro de la planta ya sea aumentando la biodisponibilidad de micro y macronutrientes (por ejemplo, hierro, zinc y fósforo), la producción de fitohormonas o fijando nitrógeno atmosférico (Gupta *et al.*, 2022).

3.8 Bacterias fijadoras de nitrógeno

El nitrógeno es un elemento esencial para el desarrollo de los cultivos, debido a su participación en la estructura de las proteínas y, por tanto, en el crecimiento vegetal. Su disponibilidad puede ser favorecida mediante la fijación biológica de nitrógeno, proceso realizado por bacterias de vida libre o en asociación simbiótica con plantas, mediante el cual el nitrógeno atmosférico es transformado a formas aprovechables por estas (Pilatuña *et al.*, 2021).

3.8.1 *Azotobacter*: Es un grupo de bacterias aeróbicas de vida libre, fijadoras de nitrógeno y Gram negativas que habitan en el suelo. Tienen forma ovalada o esférica y forman quistes de pared gruesa (células en estado de latencia resistentes a condiciones perjudiciales) bajo condiciones ambientales desfavorables. Estas aprovechan el nitrógeno atmosférico para la síntesis de proteínas celulares, el cual es mineralizado en el suelo, proporcionando a las plantas cultivadas una parte considerable del nitrógeno disponible en el suelo (Sumbul *et al.*, 2020).

3.8.2 *Azospirillum*: Género importante entre las bacterias que promueven el crecimiento vegetal. La mayoría se describieron a partir de raíces de plantas y muestras de suelo. Algunos miembros del género son reconocidos como biofertilizantes debido a sus actividades, como la fijación biológica de nitrógeno, producción de hormonas, solubilización en fosfato y producción de sideróforos. Además, tiene actividad de biocontrol de los fitopatógenos (Pedraza *et al.*, 2020).

La capacidad de *Azospirillum* de multiplicarse dentro de la rizósfera del cultivo sugiere su habilidad para mejorar la disponibilidad de nutrientes para las plantas y poder optimizar el uso de fertilizantes inorgánicos y orgánicos costosos (Suhameena *et al.*, 2020).

3.9 Bacterias solubilizadoras de fósforo

El fósforo (P) es uno de los elementos más importantes en la producción agrícola, ya que después del nitrógeno, es el nutriente inorgánico más requerido por plantas y microorganismos; además, es el factor limitante del desarrollo vegetal a pesar de ser abundante en el suelo tanto en formas inorgánicas como orgánicas (García de Salamone *et al.*, 2013).

Los microorganismos solubilizadores de fósforo (PSM) son aquellos capaces de transformar P inorgánico insoluble en ortofosfato soluble, en una manera que contribuye significativamente al estado nutricional de una planta específica. La solubilización por los microorganismos del suelo es una alternativa fundamental para incrementar la cantidad de P disponible para las plantas (García de Salamone *et al.*, 2013).

Según Bakki *et al.* (2024) el P representa entre el 0,2 y el 0,8 % del peso seco de las plantas, y se requiere una disponibilidad adecuada de este nutriente en muchas actividades fisiológicas y bioquímicas de las plantas.

3.9.1 *Pseudomonas fluorescens*: es una especie bacteriana, Gram-negativa, con forma de bacilo, ubicua e incapaz de formar esporas, tiene dimensiones que están entre 0.5-1.0 x 1.5-5 μm , presentan movilidad debido a que poseen varios flagelos polares, tienen un metabolismo energético estrictamente aerobio y nutrición quimiorganótrofa que no requiere factores de crecimiento. Sintetizan gránulos de polihidroxialcanatos que sirven de reserva de material celular. Una de las características de esta especie es la producción de compuestos fluorescentes, de ahí el origen de su nombre (Palleroni, 2005).

La colonización en la rizosfera está influenciada por los exudados radicales, entre ellos iones, oxígeno libre, agua, enzimas, aminoácidos, mucílago y compuestos fenólicos. *P. fluorescens* y *P. putida* pueden quelar el hierro del medio mediante la síntesis de sideróforos y, por lo tanto, limitar su disponibilidad para otros microorganismos, incluidos potenciales patógenos. Por esta razón, se consideran antagonistas de diferentes hongos fitopatógenos presentes en el suelo, como *Fusarium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia* y *Sclerotium* (Santoyo & Rocha, 2020).

3.9.2 *Bacillus megaterium*: tiene la capacidad de soportar condiciones ambientales extremas, como la desecación, las fluctuaciones de temperatura y el agotamiento de nutrientes (Stanislav, 2024). Se ha utilizado en diversos estudios como solubilizador de fósforo. Giovelli y Tabaldi (2022) mencionan que los parámetros fisiológicos, morfológicos y de productividad fueron influenciados por los niveles de fósforo en los tratamientos inoculados con *B. megaterium* y *Bacillus subtilis*. Jiménez *et al.* (2022) confirman que el uso de estas bacterias como biofertilizantes es una alternativa prometedora para sustituir el uso de fertilizantes químicos en la agroindustria.

3.9.3 *B. subtilis*: es una bacteria Gram positiva que forma biopelículas en superficies inertes y posee muchos factores de transcripción. Diferentes cepas sintetizan una variedad de enzimas hidrolíticas, incluyendo, por ejemplo, celulasas, proteasas y β -glucanasas. También tiene la capacidad de secretar antibióticos, puede modificar su entorno de

manera autobeneficiosa y también producir endosporas resistentes para mantenerse en condiciones adversas (Hashem *et al.*, 2019). Por su parte, Swain *et al.* (2012) mencionan que son bacterias versátiles con múltiples actividades beneficiosas, como el biocontrol contra patógenos vegetales, la producción de un regulador del crecimiento (ácido indol-3-acético) y solubilización de P.

3.10 Medios de cultivo selectivos

Existen varias definiciones explicando qué es un medio de cultivo; a continuación se mencionan algunas:

En microbiología, un medio de cultivo es una preparación sólida, líquida o semisólida que contiene los nutrientes y condiciones necesarias para el crecimiento y mantenimiento de microorganismos (Puruncajas & Endara, 2013).

Por su parte Torres (2018) menciona que un medio de cultivo es el material nutritivo preparado para el aislamiento e identificación de microorganismos (bacterias y hongos), proporcionando condiciones apropiadas de pH, nutrientes, temperatura y humedad para su crecimiento.

3.10.1 Medio NFb (Nitrogen-free semisólido) Es un medio semisólido libre de nitrógeno combinado, diseñado específicamente para el aislamiento y detección de rizobacterias diazotróficas, especialmente del género *Azospirillum*, aunque también permite el crecimiento de otros microorganismos fijadores de nitrógeno asociados a la rizósfera (García *et al.*, 2025).

3.10.2 Agar Ashby-2 (manitol o sacarosa) El agar Ashby-2 es un medio selectivo libre de nitrógeno combinado, formulado para el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, principalmente del género *Azotobacter*. Es una modificación del medio Ashby clásico, en la cual se emplea manitol o sacarosa como fuente de carbono y una base mineral definida. La ausencia de nitrógeno inorgánico obliga a los microorganismos a utilizar el nitrógeno atmosférico (N₂) como única fuente nitrogenada,

favoreciendo el crecimiento de bacterias con actividad nitrogenasa (Suricallo *et al.*, 2023).

3.10.3 Agar LB + Rojo Congo: Es un **medio diferencial semiselectivo**, utilizado para el aislamiento y reconocimiento presuntivo de ciertas rizobacterias, particularmente *Azospirillum*, por su capacidad de absorber el colorante. El rojo Congo se une a **polisacáridos extracelulares** producidos por determinadas bacterias rizosféricas. La absorción del colorante produce colonias rojizas o rosadas, permitiendo distinguirlas de otros microorganismos del suelo (García *et al.*, 2025).

3.10.4 Agar Pikovskaya: Para la detección de microorganismos solubilizadores de fosfato del suelo, un medio elaborado a base de extracto de levadura que provee nutrientes esenciales para las bacterias y de dextrosa como fuente de carbono para el crecimiento bacteriano, benéficos para los suelos de cultivos vegetales (Suricallo *et al.*, 2023).

3.11 Aislamiento de bacterias rizosféricas

Uno de los desafíos más grandes en los trabajos de investigación es la obtención de cultivos puros de microorganismos y para esto es necesario separar el microorganismo de interés de los demás, a esto se le conoce como aislamiento. Existen diversas técnicas para el aislamiento microbiano. Entre las más utilizadas para separar microorganismos a partir de una población mixta se encuentran las siguientes:

3.11.1 Aislamiento por estría en superficie, En este procedimiento, el medio de cultivo agarizado fundido se vuelca asépticamente en una placa Petri y una vez solidificado se inocula introduciendo el ansa en la suspensión microbiana de la cual se parte, distribuyendo este material sobre la superficie del medio sólido.

Las células quedarán fijas en distintos puntos del medio sólido y luego de la incubación de la caja sembrada, se observarán las colonias. Si se parte de un cultivo mixto muy concentrado. Conviene descargar el inóculo realizando varias pasadas sucesivas (estrías) sobre uno de los bordes de la placa, luego quemar el ansa, tomar material de las últimas

estrías realizadas y continuar la siembra sobre el resto de la superficie del medio teniendo cuidado de no pasar dos veces el ansa por el mismo lugar. Luego se procede a la incubación a una temperatura adecuada para la especie que se quiere aislar (Soria *et al.*, 2016).

Con esta metodología se obtendrán zonas en la placa donde las colonias estén bien separadas. Se toma material de una de estas colonias y se repite todo el procedimiento hasta obtener una placa que contenga sólo colonias de igual aspecto. Muchas de las colonias que aparecen en la primera placa son colonias mixtas formadas por dos o más tipos de bacterias que crecen juntas. Por este motivo resulta fundamental repetir el proceso de aislamiento (Soria *et al.*, 2016).

3.12 Métodos utilizados para la evaluación del crecimiento bacteriano

El crecimiento bacteriano puede evaluarse mediante diferentes métodos que permiten estimar los cambios en el número de células o en la biomasa de una población a lo largo del tiempo. Estas técnicas proporcionan información sobre la dinámica de crecimiento de los microorganismos y su respuesta a diferentes condiciones ambientales y nutricionales.

3.12.1 Método de determinación del número de células o de la masa de una población bacteriana:

Según O'Connor y Páramo (2019), la determinación del crecimiento bacteriano comprende técnicas cuantitativas que permiten estimar el tamaño de una población, ya sea mediante el número de células o la cantidad de biomasa presente en un cultivo. Estos métodos son utilizados para estudiar la dinámica poblacional y evaluar la respuesta de los microorganismos ante diferentes condiciones de crecimiento. Los autores señalan que el crecimiento bacteriano puede abordarse desde dos perspectivas complementarias:

- a) Determinación del número de células:** este enfoque permite estimar cuántas células bacterianas están presentes en una población en un momento determinado, considerando células viables, capaces de dividirse, o células totales, tanto vivas como muertas.

- b) Determinación de la masa bacteriana:** permite estimar la cantidad total de material celular producido por una población bacteriana, independientemente del número exacto de células. Para ello, pueden considerarse parámetros como el incremento de peso, el aumento de la turbidez y la concentración de componentes celulares.

3.12.2 Método de recuento en placa:

Según Soria *et al.* (2016), el recuento en placa es un método que permite cuantificar las células viables presentes en una población bacteriana. Se basa en la capacidad de una célula viable, colocada en un medio agarizado con nutrientes apropiados, para formar una colonia. Por esta razón, el recuento se realiza a partir de las colonias desarrolladas, bajo el supuesto de que cada una se origina a partir de una célula viable. Para obtener un número adecuado de colonias que permita realizar el recuento, es necesario emplear diluciones apropiadas de la muestra. Los autores describen dos modalidades principales de recuento en placa:

- a) Siembra por extensión con espátula de Drigalski o distribución con perlas de vidrio:** consiste en distribuir un pequeño volumen de la muestra sobre la superficie de un medio sólido utilizando una espátula de Drigalski o perlas de vidrio. Después de la incubación, se realiza el recuento de las colonias desarrolladas a partir de las diluciones seriadas.
- b) Siembra en profundidad (mezcla con agar fundido):** consiste en mezclar la suspensión bacteriana con agar fundido antes de su solidificación. Las colonias pueden desarrollarse tanto en el interior como en la superficie del medio, permitiendo realizar el recuento de las bacterias viables presentes en la muestra.

3.13 Identificación de rizobacterias

Según Madigan *et al.* (2021), el gen 16S rRNA (~1 500 pb) presenta regiones conservadas e hipervariables (V1–V9), lo que permite la identificación taxonómica y filogenética de bacterias, incluidas rizobacterias de interés agrícola.

3.14 Bioinsumos de uso agrícola

Los bioinsumos agrícolas son productos de origen biológico utilizados para mejorar la productividad de los cultivos y favorecer la salud del agroecosistema. Pueden elaborarse a partir de microorganismos, extractos vegetales, compuestos orgánicos o minerales naturales y se emplean para mejorar la nutrición vegetal, estimular el crecimiento y contribuir al control de plagas y enfermedades. Entre ellos se encuentran los biofertilizantes, bioestimulantes, biocontroladores y enmiendas orgánicas, considerados alternativas sostenibles frente a los agroquímicos convencionales (Rosales-Castillo *et al.*, 2025; Colina Sifontes, 2025).

Los bioinsumos basados en microorganismos rizosféricos incluyen bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), como *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas*. Estos microorganismos pueden favorecer procesos como la fijación biológica de nitrógeno, solubilización de fósforo, producción de fitohormonas y supresión de patógenos, contribuyendo a mejorar la disponibilidad y eficiencia en el uso de nutrientes y a promover sistemas agrícolas más sostenibles (Cassan & Diaz-Zorita, 2016; Coniglio *et al.*, 2019; Singh & Kumar, 2024).

En Honduras, el uso y producción de bioinsumos se encuentra en crecimiento, impulsado por la necesidad de reducir el uso de agroquímicos y promover prácticas agrícolas sostenibles. Aunque la SAG y la FAO han promovido iniciativas en esta área, persisten desafíos relacionados con la regulación, transferencia tecnológica y adopción por los productores, por lo que su desarrollo representa una oportunidad para fortalecer la sostenibilidad de los sistemas productivos del país (SAG, 2021).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación de la investigación

Se realizó en la Universidad Nacional de Agricultura (UNAG), ubicada en la carretera que va hacia Dulce Nombre de Culmi Kilómetro 215, Barrio El Espino, en la ciudad de Catacamas, departamento de Olancho, con coordenadas 14°49'47"N, 85°50'40"O/ 14.829813,- 85.8444326, a una altitud de 350 msnm, con temperaturas que oscilan en los 24.2 a 24.7 °C y precipitación anual de 845 mm



Figura 2. Ubicación de la investigación.

4.2 Materiales

Se utilizaron los siguientes materiales: bandejas para semillero, semillas, raíces con rizósfera, pala, piocha, bolsas plásticas estériles, hielera, botas de hule, marcador permanente, placas Petri, tubos de ensayo, beaker, matraces Erlenmeyer, probetas

graduadas, portaobjetos, cubreobjetos, asa bacteriológica, puntas estériles para micropipeta de diferentes capacidades, bisturí, mortero y pistilo, espátulas de acero inoxidable, papel Parafilm, papel toalla, cinta masking tape, mascarillas quirúrgicas, guantes, hojas de registro, libreta de apuntes, lápiz grafito, lápiz tinta y borrador.

Asimismo, se utilizaron alcohol al 70 y 95 %, agua destilada, cloruro de sodio, hipoclorito de sodio, gel de manos, detergente, medio de cultivo Ashby, medio de cultivo PVK, cristal violeta, Lugol, safranina y aceite de inmersión.

4.3 Equipos

Cámara de flujo laminar, autoclave, microscopio, balanza digital, agitador orbital, hot plate, mechero Bunsen, refrigeradora, pie de rey (calibrador Vernier), micropipetas de volumen variable, computadora, memoria USB y grabadora.

4.4 Metodología

El estudio se desarrolló en dos fases: campo y laboratorio.

4.4.1 Fase de campo

Comprendió desde la realización del semillero hasta la recolección de raíces con suelo rizosférico.

El establecimiento de los semilleros se realizó bajo la metodología y supervisión de los técnicos de la sección de hortalizas. La siembra se efectuó utilizando sustrato estéril en bandejas de 200 alveolos, previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 5 %. Las bandejas se colocaron en cámaras oscuras de germinación y, transcurridos tres días, fueron trasladadas al invernadero de plántulas, donde recibieron los cuidados necesarios hasta alcanzar la etapa de trasplante, la cual se realizó en el momento de la aparición de la segunda hoja verdadera de las plantas.

Para el trasplante se seleccionaron parcelas previamente utilizadas en estudios de biofertilización, las cuales habían sido inoculadas con microorganismos de interés agrícola, entre ellos bacterias fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fósforo y endofíticas.

4.4.1.1 Muestreo de plantas y recolección de raíces

Se realizó 80 días después del trasplante, tiempo suficiente para que las plantas expresaran su potencial de crecimiento. Para la selección de las plantas se consideraron dos categorías de vigor vegetativo: **vigor mayor e intermedio aparente**.

Se recolectó un total de ocho plantas (cuatro por parcela/categoría), distribuidas de la siguiente manera:

- a) 4 plantas con vigor mayor.
- b) 4 plantas con vigor intermedio.

Las raíces con suelo rizosférico adherido fueron extraídas cuidadosamente con la ayuda de piocha y pala, evitando daños en las estructuras radiculares. Cada muestra fue colocada en bolsas estériles y rotulada con la información correspondiente (código de muestra, parcela, categoría de vigor vegetativo y fecha de colecta). Finalmente, las muestras se transportaron en una hielera con acumuladores de frío hacia el Laboratorio de Entomopatógenos (LEP) de la UNAG, donde se dio inicio el proceso de aislamiento (**Anexo 1**).

4.4.2 Fase de laboratorio

Las actividades se realizaron en el LEP de la UNAG, siguiendo los protocolos establecidos para el control de contaminación. Durante esta fase se llevaron a cabo procedimientos de desinfección, esterilización de materiales y manejo aséptico, con el propósito de garantizar condiciones adecuadas para el aislamiento y manipulación de las bacterias rizosféricas.

4.4.2.1 Desinfección de infraestructura y superficies

La infraestructura, superficies, equipos y materiales de trabajo fueron desinfectados utilizando hipoclorito de sodio al 5 %. Este procedimiento se complementó con el uso de agua destilada y detergente, con el fin de eliminar residuos de materia orgánica que pudieran interferir con los resultados.

4.4.2.2 Desinfección de la cabina de flujo laminar

Fue desinfectada antes y después de cada procedimiento de aislamiento mediante la aplicación de alcohol al 70 %, tanto en las superficies internas como externas del área de trabajo. Asimismo, previo a la ejecución de cualquier procedimiento de aislamiento, se realizó la desinfección personal, que incluyó el lavado de manos con abundante agua y jabón, secado correspondiente y posterior aplicación de alcohol al 70 %. Durante todo el proceso se utilizó el equipo de protección personal necesario, incluyendo gabacha, guantes y mascarilla.

4.4.2.3 Esterilización de materiales

Los materiales y cristalería, una vez lavados y secos, fueron esterilizados en autoclave mediante vapor de agua a presión, utilizando una presión de 15 libras por pulgada cuadrada (psi) hasta alcanzar una temperatura de 121 °C durante 30 minutos.

4.4.2.4 Preparación de medios de cultivo

Para el aislamiento bacteriano se emplearon medios de cultivo selectivos destinados a favorecer la recuperación de microorganismos con características de interés agronómico. Para la preparación de los medios se siguió lo propuesto por Timofeeva et al. (2023), como se detalla a continuación:

A) Pikovskaya (PVK): Estos medios son utilizados para el aislamiento y selección de bacterias solubilizadoras de fósforo y tienen la siguiente composición química.

Tabla 1. Componentes para la preparación del medio Pikovskaya

COMPONENTES	NOMBRE QUÍMICO	CANTIDAD (g·L ⁻¹)
Ca ₃ (PO ₄) ₂	Fosfato tricálcico (insoluble)	5.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amonio	0.5
KCl	Cloruro de potasio	0.2
MgSO ₄	Sulfato de magnesio	0.1
MnSO ₄	Sulfato de manganeso	0.0001
FeSO ₄	Sulfato ferroso	0.0001
Extracto de levadura	Fuente de nutrientes	0.5
Dextrosa (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Fuente de carbono	10.0
Agar	Agente solidificante	20.0

Fuente: Timofeeva *et al.* (2023).

B) Ashby (sin nitrógeno): Este medio es utilizado para el aislamiento y selección de bacterias fijadoras de nitrógeno, ya que carece de fuentes de nitrógeno mineral. Su composición típica se detalla en la siguiente tabla.

Tabla 2. Componentes para la preparación del medio Ashby

COMPONENTES	NOMBRE QUÍMICO	CANTIDAD (g·L ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	Fosfato dipotásico	0.2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	0.2
NaCl	Cloruro de sodio	0.2
FeSO ₄ ·7H ₂ O	Sulfato ferroso heptahidratado	0.01
CaCO ₃	Carbonato de calcio	5.0
Manitol (C ₆ H ₁₄ O ₆)	Fuente de carbono	10.0
Agar	Agente solidificante	20.0

Fuente: Timofeeva *et al.* (2023).

La preparación se realizó mediante el pesado de las cantidades correspondientes de cada componente, de acuerdo con las especificaciones indicadas por el fabricante. Los insumos se disolvieron en agua destilada respetando el orden de incorporación recomendado, el cual consistió en disolver inicialmente las sales minerales y posteriormente, adicionar las fuentes de carbono.

Durante este proceso, la mezcla se mantuvo bajo agitación constante en una placa agitadora magnética con calentamiento (hot plate), a una temperatura aproximada de 70-100 °C; y una velocidad de 1,200 revoluciones por minuto (rpm), con una duración estimada de 15 a 30 minutos, sujeto al volumen de la preparación, hasta lograr la completa disolución y homogenización de los componentes del medio de cultivo. El calentamiento se controló para evitar la ebullición del medio, ya que esta puede provocar pérdida de volumen por evaporación y alterar la concentración de los componentes antes del proceso de esterilización.

Una vez obtenida una mezcla homogénea, los medios fueron sometidos a esterilización en autoclave a 121 °C durante 30 minutos, con el objetivo de eliminar microorganismos contaminantes y esporas.

Una vez finalizado el proceso de esterilización, los medios de cultivo fueron vertidos en placas Petri estériles bajo condiciones asépticas dentro de una cabina de flujo laminar. Durante el procedimiento se trabajó en presencia de un mechero Bunsen con el fin de disminuir el riesgo de contaminación. En cada placa se dispensaron aproximadamente 15 mL de medio de cultivo, permitiendo posteriormente su solidificación a temperatura ambiente. Una vez solidificado el medio, las placas fueron almacenadas en bolsas plásticas estériles hasta su utilización, como medida adicional para preservar esterilidad del material (Rajguru & Bhatt, 2022).

4.4.2.5 Procesamiento de muestras de raíces con suelo rizosférico para el aislamiento microbiano

Previamente, se preparó la solución fisiológica al 0,9 %, mediante la disolución de 9 g de cloruro de sodio (NaCl) en un litro de agua destilada. La mezcla fue sometida a agitación en una placa agitadora magnética (hot plate) hasta lograr la completa disolución del soluto. Posteriormente, la solución fue esterilizada para su uso en los procedimientos microbiológicos (Rehan *et al.*, 2023).

En el laboratorio, el exceso de suelo adherido a las raíces fue removido cuidadosamente, conservando únicamente la fracción de suelo rizosférico. Se pesaron 10 g de raíces más

rizósfera, las cuales fueron maceradas bajo condiciones estériles con el objetivo de liberar tanto los microorganismos adheridos a la superficie radicular como aquellos endofíticos presentes en los tejidos internos. El macerado obtenido fue transferido a matraces Erlenmeyer que contenían 90 mL de solución fisiológica estéril. La suspensión resultante fue colocada en un agitador orbital a 150 rpm durante 30 minutos, con el propósito de favorecer la liberación y homogenización de los microorganismos presentes en la muestra.

4.4.2.6 Preparación de diluciones seriadas a partir de la suspensión inicial

A partir de la suspensión obtenida del macerado radicular y suelo rizosférico, se realizaron diluciones seriadas con el fin de reducir la concentración bacteriana y facilitar la obtención de colonias aisladas en los medios de cultivo.

Para ello, se prepararon tubos de ensayo estériles con 9 mL de solución fisiológica como diluyente. Se transfirió 1 mL de la suspensión inicial al primer tubo para obtener la dilución 10^{-1} y se homogeneizó en vórtex durante aproximadamente 10 segundos. Posteriormente, se tomó 1 mL de esta dilución y se transfirió a un segundo tubo con 9 mL del diluyente para obtener la dilución 10^{-2} . El procedimiento se repitió sucesivamente, homogeneizando cada tubo antes de realizar la siguiente transferencia, hasta alcanzar la dilución 10^{-5} (Rehan *et al.*, 2023) (**Anexo 2**).

4.4.2.7 Siembra de diluciones y aislamiento de bacterias rizosféricas

El aislamiento de bacterias rizosféricas se realizó mediante técnica de siembra en superficie, propuesta por Gupta *et al.* (2022). Para ello, se tomaron 50 μ L de las diluciones seleccionadas (10^{-2} a 10^{-5}) utilizando una micropipeta con puntas estériles, se depositaron en el centro de cada placa Petri que contenían los medios de cultivo selectivos previamente preparados.

El inóculo se distribuyó uniformemente sobre la superficie del medio utilizando espátulas de Drigalski estériles de acero inoxidable, con el fin de lograr una distribución homogénea de la muestra sobre toda la superficie del medio. Durante el proceso de siembra se utilizaron dos espátulas, las cuales se alternaron entre cada placa. Después de cada uso,

la espátula se desinfectó con alcohol al 95 % y se flameó en la llama de un mechero Bunsen, permitiendo su enfriamiento durante unos segundos antes de entrar nuevamente en contacto con el medio de cultivo y así evitar contaminación cruzada entre las diferentes diluciones.

Una vez finalizada la siembra, cada placa fue rotulada con el código correspondiente de la muestra, dilución evaluada y tipo de medio de cultivo. Las placas se sellaron con papel parafilm para reducir el riesgo de contaminación externa y pérdida de humedad del medio. Seguidamente, se colocaron en bolsas plásticas estériles y organizaron en un estante previamente identificado con los códigos y fechas correspondientes.

Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente del laboratorio, aproximadamente entre 24 y 30 °C, rango que corresponde a las condiciones ambientales. Durante este periodo se realizaron las observaciones periódicas de las placas para detectar el inicio del crecimiento bacteriano, el cual pudo evidenciarse en algunos casos antes de las 24 horas, aunque las colonias continuaron desarrollándose con el tiempo hasta permitir una mejor visualización y posterior selección.

4.4.2.8 Purificación de los aislamientos bacterianos en medio PVK

Las colonias obtenidas fueron observadas mediante un estereoscopio para evaluar sus características morfológicas y la presencia de halos de solubilización. Se seleccionaron aquellas que presentaban halos claros en medio PVK, los cuales corresponden a zonas de solubilización de fosfatos insolubles presentes en el medio.

A partir de las colonias seleccionadas se tomó el inóculo bacteriano utilizando un asa bacteriológica previamente esterilizada en la llama de un mechero Bunsen, el cual fue transferido a nuevas placas Petri. Posteriormente, el inóculo se distribuyó sobre la superficie del medio mediante la técnica de estriado por agotamiento en tres sectores, con el fin de reducir progresivamente la densidad bacteriana y favorecer la obtención de colonias aisladas. Este procedimiento se repitió mediante repiques sucesivos, realizándose observaciones periódicas de las placas para evaluar el crecimiento bacteriano y presencia de halos de solubilización.

4.4.2.9 Purificación de los aislamientos bacterianos en medio Ashby

Se realizó a partir de colonias que mostraron crecimiento en este medio libre de nitrógeno. La selección de colonias se basó en su desarrollo sobre el medio.

El proceso de purificación se llevó a cabo mediante la técnica de estriado previamente descrita, realizándose repiques sucesivos para continuar con el proceso de aislamiento. Durante este procedimiento se evaluó periódicamente el crecimiento bacteriano en las placas (**Anexo 3**).

4.4.2.10 Determinación de pureza de los aislamientos bacterianos

A partir de las placas de purificación se seleccionaron colonias bien definidas y representativas, las cuales fueron transferidas utilizando un asa bacteriológica estéril a tubos de ensayo que contenían 6 mL de medio de cultivo Ashby o PVK, según la procedencia de cada aislado. La inoculación se realizó mediante estría sobre la superficie del medio, y los tubos se incubaron hasta observar crecimiento bacteriano.

Una vez desarrollado el crecimiento bacteriano en los tubos, se procedió a verificar la pureza de los aislamientos mediante tinción de Gram, siguiendo la metodología descrita por Reyes *et al.* (2019). Para ello, se tomó una pequeña cantidad de inóculo bacteriano desde el tubo de cultivo utilizando un asa bacteriológica estéril, la cual se suspendió en una gota de solución fisiológica estéril colocada sobre un portaobjetos limpio y previamente rotulado, obteniendo una extensión bacteriana fina y homogénea.

La preparación se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se realizó la fijación por calor, pasando el portaobjetos suavemente sobre la llama de un mechero Bunsen. Seguidamente, se aplicó cristal violeta como colorante primario durante un minuto, seguido de un enjuague con agua destilada para retirar el exceso de colorante. Posteriormente se adicionó lugol durante un minuto como mordiente y se realizó un nuevo lavado con agua.

La decoloración se efectuó mediante la aplicación de alcohol al 96 % durante 15-20 segundos; deteniéndose inmediatamente el proceso con un lavado suave con agua destilada. A continuación, se aplicó safranina como colorante de contraste durante un minuto, seguido de un enjuague final con agua destilada.

Una vez seca la preparación, las muestras fueron observadas utilizando un microscopio óptico con objetivo de inmersión 100x, empleando aceite de inmersión. Durante la observación microscópica se evaluaron características como la coloración de Gram, forma celular y uniformidad morfológica de las células bacterianas, con el propósito de confirmar la pureza de los aislamientos. Los cultivos que presentaron uniformidad morfológica celular fueron considerados aislamientos puros y se conservaron para los análisis posteriores. Finalmente, la información correspondiente a cada aislamiento, incluyendo origen de la muestra, medio de cultivo, características morfológicas y resultados de la tinción, fue registrada en fichas técnicas, con el fin de garantizar la trazabilidad y control de los aislamientos bacterianos obtenidos (**Anexo 4**).

4.4.2.11 Obtención de biomasa bacteriana

Los aislamientos conservados en tubos de ensayo fueron resembrados en placas Petri mediante la técnica de estriado previamente descrita. Las placas permanecieron a temperatura ambiente hasta evidenciar un crecimiento adecuado de las colonias. A continuación, se rotularon tubos Eppendorf de 2 mL y se adicionó 1 mL de solución fisiológica estéril en cada uno. A partir de las colonias frescas se recolectó biomasa bacteriana, la cual fue transferida a su respectivo tubo (**Anexo 5**).

Las muestras preparadas se trasladaron al Laboratorio de Biotecnología de la UNAG, donde se realizó la extracción de ADN genómico mediante el protocolo basado en el método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) descrito por Doyle y Doyle (1990), adaptado y estandarizado por dicho laboratorio.

4.4.2.12 Extracción de ADN

Inicialmente, las células bacterianas fueron sometidas a un proceso de lisis mediante la acción del buffer CTAB y proteinasa K, con el propósito de romper la pared y membrana celular, degradar proteínas y liberar el ADN contenido en las células bacterianas.

A continuación, se realizó la purificación del ADN mediante extracción con una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico, permitiendo la separación del ADN de proteínas, lípidos y otros componentes celulares. La fase acuosa que contenía el ADN fue recuperada y sometida a precipitación con isopropanol al 100 % frío para favorecer su concentración. Posteriormente, el precipitado se lavó con etanol al 70 % para eliminar impurezas y restos de sales, y se dejó secar a temperatura ambiente. El ADN purificado fue resuspendido en buffer TE, obteniéndose ADN genómico (**Anexo 6**) apto para la evaluación de su calidad mediante electroforesis en gel de agarosa.

4.4.2.13 Evaluación de la calidad del ADN

Se cargaron alícuotas del ADN mezcladas con buffer de carga y depositadas en los pocillos de un gel de agarosa, junto con un marcador de peso molecular para la estimación del tamaño de los fragmentos de ADN. La corrida electroforética se realizó en una cámara de electroforesis utilizando un buffer de corrida, a 75 V y 86 mA durante 40 minutos, permitiendo la separación de los fragmentos según su tamaño.

Al concluir la corrida, el gel fue visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta para observar las bandas de ADN. La presencia de bandas definidas y sin evidencia de degradación confirmó la obtención de ADN genómico de calidad, apto para continuar con el proceso de secuenciación y los análisis moleculares posteriores.

Las muestras que presentaron ADN genómico de calidad fueron seleccionadas para su secuenciación. Los crioviales fueron debidamente rotulados y enviados a Psomagen Inc. (Rockville, Maryland, Estados Unidos), empresa especializada en servicios de genómica, secuenciación de ADN y análisis moleculares para investigación científica, donde se

realizó la secuenciación del gen 16S rRNA y el análisis de los genes funcionales *nifH*, *gcd* y *phoD* (**Anexo 7**).

4.4.2.14 Evaluación de la capacidad de solubilización de fósforo

Para evaluar la capacidad de solubilización de fósforo, se utilizaron los cinco aislados bacterianos obtenidos en medio PVK: BS1, BS2, BS3, BS4 y BS5. A partir de cultivos puros, se tomó inóculo de cada uno con un asa bacteriológica estéril y se realizó una inoculación puntual en el centro de placas Petri con medio PVK. Se establecieron tres repeticiones por aislado, para un total de 15 unidades experimentales.

Las placas fueron evaluadas diariamente durante 15 días, mediante la medición del diámetro de la colonia y del halo claro de solubilización formado alrededor de esta. Las mediciones se realizaron con un pie de rey (calibrador Vernier). A partir de los valores obtenidos se calculó el índice de solubilización (IS), de acuerdo con la relación descrita por Edi-Premono *et al.* (1996):

$$IS: \frac{(\text{Diámetro de la colonia} + \text{Diámetro del halo de solubilización})}{\text{Diámetro de la colonia}}$$

Durante el período de evaluación se realizó la toma de datos correspondiente al diámetro de las colonias y de los halos de solubilización. Como evidencia visual complementaria del ensayo, se tomaron fotografías de las placas en los días 1, 5, 10 y 15 (**Anexo 8**).

4.4.2.15 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizaron los datos correspondientes al día 15 de evaluación, obtenidos de las réplicas de cada aislado. Previamente, se verificó el supuesto de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilks modificada. Posteriormente, los valores del índice de solubilización de fósforo fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) para determinar la existencia de diferencias significativas entre los aislados. Se aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey, con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$. Los análisis se realizaron mediante el programa InfoStat (**Anexo 9**).

4.4.2.16 Análisis bioinformático de las secuencias

Las secuencias obtenidas mediante secuenciación Sanger fueron analizadas utilizando el software Geneious Prime. Inicialmente, se importaron las lecturas forward y reverse de cada aislado y se inspeccionaron visualmente los cromatogramas para evaluar la calidad de las secuencias (**Anexo 10**).

Se recortaron los extremos de baja calidad utilizando un límite de probabilidad de error (Error Probability Limit) de 0,05 y se eliminaron las bases ambiguas (N) y las regiones con señales superpuestas. Antes del ensamblaje, las secuencias fueron revisadas manualmente para verificar la calidad de las bases. La lectura reverse se convirtió en su complemento inverso y se ensambló con la lectura forward mediante el algoritmo De Novo Assemble, obteniéndose una secuencia consenso para cada aislado (Kearse et al., 2012) (**Anexo 11**).

Las secuencias consenso fueron comparadas con la base de datos de nucleótidos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante la herramienta BLASTn integrada en Geneious Prime. La identificación taxonómica de los aislados se realizó considerando el porcentaje de identidad, la cobertura de la consulta (Query Cover), el valor esperado (E-value), la puntuación (Bit Score) y la longitud de la secuencia alineada. En los casos en que no fue posible obtener una secuencia consenso de calidad, las lecturas forward y reverse fueron analizadas de forma independiente. Los resultados con mayor similitud fueron utilizados para la identificación de los aislados bacterianos hasta el nivel de género (Altschul et al., 1990) (**Anexo 12**).

Para el análisis de los genes funcionales *nifH*, *gcd* y *phoD*, las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante BLAST y comparadas con secuencias disponibles en la base de datos. A partir de las coincidencias obtenidas, se revisó la anotación de los genes identificados con el propósito de determinar su correspondencia con los genes de interés o con genes relacionados con funciones asociadas a la fijación biológica de nitrógeno y al metabolismo del fósforo (**Anexo 13**).

4.4.2.17 Análisis filogenético

Para complementar la identificación molecular de los aislados bacterianos, se realizó un análisis filogenético a partir de las secuencias del gen 16S rRNA. Las secuencias de los aislados y las secuencias de referencia relacionadas taxonómicamente con los géneros identificados fueron alineadas mediante el programa ClustalX versión 2.1 (Larkin *et al.*, 2007).

A partir del alineamiento obtenido, el árbol filogenético se construyó en el programa MEGA 11 mediante el método de Máxima Verosimilitud, utilizando el modelo de sustitución Tamura-Nei. La confiabilidad de los agrupamientos fue evaluada mediante un análisis bootstrap con 500 réplicas, cuyos valores de soporte fueron expresados como porcentajes en los nodos del árbol.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Aislamiento y caracterización de los aislados bacterianos

El procesamiento de las muestras de raíces de plantas de tomate con rizósfera adherida permitió obtener diez aislados bacterianos, distribuidos equitativamente entre los medios Ashby y PVK. Los aislados presentaron variaciones en la forma, coloración y características estereoscópicas de las colonias, evidenciando diferencias morfológicas entre ellos. La caracterización de cada aislado se detalla en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Características de las colonias bacterianas aisladas en los medios Ashby y PVK.

AISLADO	MEDIO	MUESTRA	VIGOR DE LA PLANTA	DILUCIÓN	FORMA	COLOR	CARACTERÍSTICAS ESTEREOSCÓPICAS
BF1	Ashby	M1	Intermedio	10^{-4}	Circular	Blanco cremoso	Centro oscuro con periferia más clara.
BF2	Ashby	M3	Intermedio	10^{-5}	Circular	Blanco cremoso	Centro oscuro con periferia más clara.
BF3	Ashby	M1	Intermedio	10^{-5}	Circular	Blanco cremoso	Aspecto oscuro y uniforme.
BF4	Ashby	M4	Intermedio	10^{-3}	Irregular	Amarillo	Superficie homogénea con tonalidad amarilla clara.
BF5	Ashby	M3	Intermedio	10^{-5}	Circular	Blanco cremoso	Superficie granular, tonalidad más intensa hacia el centro.
BS1	PVK	M3	Mayor	10^{-3}	Irregular	Amarillo	Aspecto oscuro y uniforme.
BS2	PVK	M3	Mayor	10^{-3}	Irregular	Blanco cremoso	Tonalidad amarilla clara.
BS3	PVK	M3	Mayor	10^{-3}	Irregular	Blanco cremoso	Superficie estriada con patrón radial marcado.
BS4	PVK	M1	Intermedio	10^{-3}	Irregular	Blanco cremoso	Centro oscuro con periferia más clara.
BS5	PVK	M1	Intermedio	10^{-3}	Circular	Blanco cremoso	Superficie plegada, con elevación central y patrón radial.

El registro fotográfico permitió complementar la caracterización de los aislados y documentar las diferencias morfológicas observadas entre las colonias. En la **Figura 3**, se muestran las características estereoscópicas de los diez aislados bacterianos.

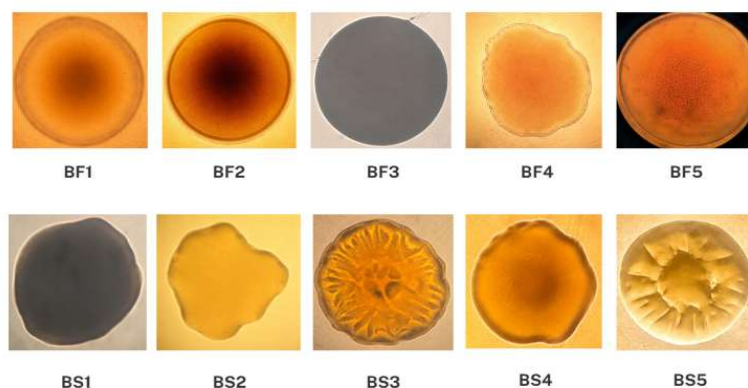


Figura 3. Características morfológicas observadas mediante estereoscopia en las colonias de los diez aislados bacterianos.

5.2 Capacidad de solubilización de fósforo de los aislados bacterianos

La capacidad de solubilización de fósforo de los aislados bacterianos se evaluó mediante el cálculo del índice de solubilización (IS) en medio PVK. Los datos cumplieron el supuesto de normalidad según la prueba de Shapiro-Wilks modificada ($W^* = 0,90$; $p = 0,1678$). El análisis de varianza evidenció diferencias altamente significativas entre los aislados ($F = 27,27$; $p < 0,0001$), y la prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0,05$) permitió establecer dos grupos estadísticos, como se muestra en la **Figura 4**.

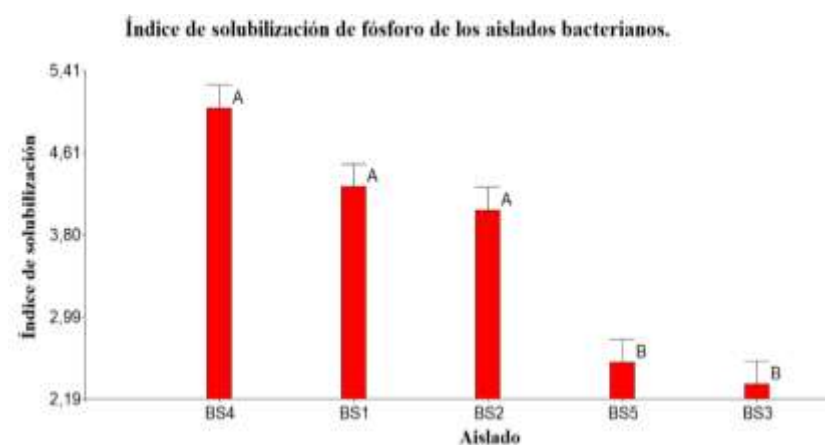


Figura 4. Índice de solubilización de fósforo de los aislados bacterianos evaluados en medio PVK al día 15.

BS4 presentó el mayor índice de solubilización (5,04), seguido de BS1 (4,27) y BS2 (4,04), sin diferencias significativas entre ellos, por lo que conformaron el grupo A. En contraste, BS5 (2,54) y BS3 (2,33) registraron los valores más bajos y conformaron el grupo B, diferenciándose significativamente de los aislados del grupo A.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Kirui *et al.* (2022), quienes registraron índices de solubilización de 4,20 para *Enterobacter* y de hasta 5,83 para *Burkholderia*, valores comparables con los obtenidos en la presente investigación. En contraste, para *Curtobacterium* los autores reportaron un índice de 3,20, superior a los valores registrados para los aislados de este género en el presente estudio (2,33–2,54).

5.3 Identificación molecular de los aislados bacterianos mediante el gen 16S rRNA y análisis de genes funcionales

La identificación taxonómica se realizó considerando principalmente los porcentajes de identidad y cobertura obtenidos en el alineamiento. El análisis permitió identificar ocho géneros bacterianos: *Labrys*, *Rhizobium*, *Cronobacter*, *Brevibacillus*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Curtobacterium* y *Enterobacter*, con porcentajes de identidad entre 97,6 y 99,9 % y coberturas entre 97,9 y 100 % (Tabla 4).

Tabla 4. Identificación molecular de los aislados bacterianos mediante el análisis de secuencias del gen 16S rRNA.

CÓDIGO	GÉNERO IDENTIFICADO	COBERTURA (%)	IDENTIDAD (%)	Nº DE ACCESO
BF1	<i>Labrys</i>	98,86	99,2	LS999501
BF2	<i>Rhizobium</i>	99,86	99,9	CP071311
BF3	<i>Cronobacter</i>	100,00	99,3	KT933253
BF4	<i>Brevibacillus</i>	98,90	97,6	KU362810
BF5	<i>Agrobacterium</i>	99,72	99,9	CP143886
BS1	<i>Burkholderia</i>	100,00	99,4	EU826644
BS2	<i>Burkholderia</i>	100,00	99,4	CP013375
BS3	<i>Curtobacterium</i>	100,00	99,5	JQ660282
BS4	<i>Enterobacter</i>	97,90	99,3	CP123598
BS5	<i>Curtobacterium</i>	100,00	99,8	JQ660282

El análisis filogenético mostró el agrupamiento de los aislados con secuencias de referencia relacionadas con los géneros identificados mediante el análisis del gen 16S rRNA. Los aislados BF1, BF2, BF3 y BF5 mostraron afinidad filogenética con *Labrys*, *Rhizobium*, *Cronobacter* y *Agrobacterium*, respectivamente; BS1 y BS2 se agruparon con *Burkholderia*, BS3 y BS5 con *Curtobacterium*, y BS4 con *Enterobacter*. Los agrupamientos presentaron diferentes niveles de soporte bootstrap, evidenciando variación en la robustez de las relaciones filogenéticas inferidas. En general, la distribución de los aislados en el árbol respaldó la asignación taxonómica obtenida mediante el análisis de las secuencias del gen 16S rRNA (**Figura 5**).

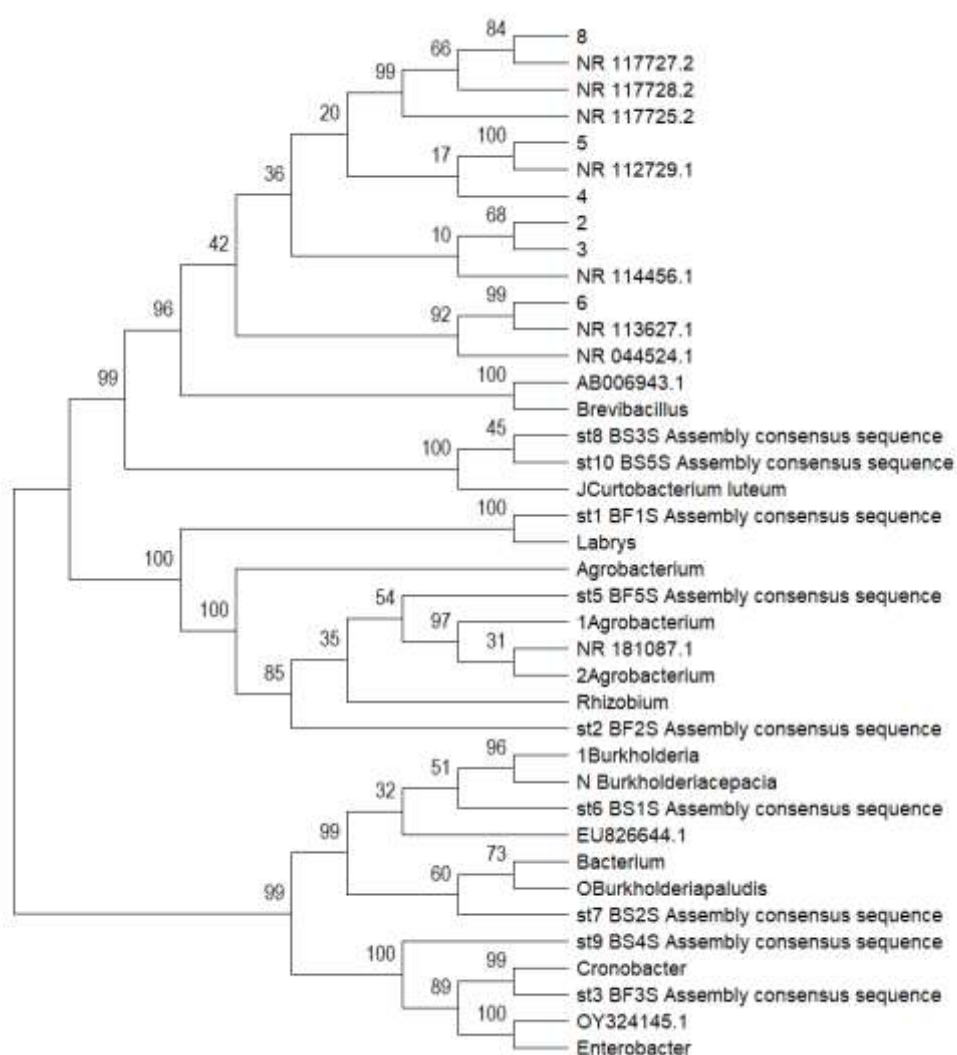


Figura 5. Árbol filogenético de los aislados bacterianos basado en secuencias del gen 16S rRNA y secuencias de referencia.

5.3.1 Análisis de los genes funcionales *nifH*, *gcd* y *phoD*

El análisis de los genes funcionales se orientó a determinar la presencia de funciones relacionadas con la fijación biológica de nitrógeno y la solubilización de fósforo en los diez aislados bacterianos. Para ello, se analizaron las secuencias correspondientes a los genes *nifH*, asociado con el sistema nitrogenasa; *gcd*, relacionado con mecanismos de solubilización de fósforo inorgánico; y *phoD*, vinculado con la mineralización de fósforo orgánico. La interpretación de las secuencias permitió identificar tanto coincidencias específicas como proteínas y genes funcionalmente relacionados con estos procesos. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Detección de genes y funciones asociadas a *nifH*, *gcd* y *phoD* en los aislados bacterianos.

AISLADO	<i>nifH</i>	HALLAZGO MOLECULAR	<i>gcd</i>	HALLAZGO MOLECULAR	<i>phoD</i>	HALLAZGO MOLECULAR
BF1	NC	Proteínas relacionadas con metabolismo y regulación de N	EC	Deshidrogenasa dependiente de PQQ	EC	<i>phoD</i>
BF2	NC	X	EC	Deshidrogenasa dependiente de PQQ	NC	X
BF3	NC	X	EC	Deshidrogenasa de azúcares dependiente de PQQ	NC	Fosfatasa alcalina
BF4	NC	<i>glnK</i> , <i>amtB</i> , <i>nac</i>	EC	Deshidrogenasa de glucosa/quinato/shikimat o dependiente de PQQ asociada a membrana	NC	Fosfatasa alcalina
BF5	NC	X	NC		NC	Phox
BS1	NC	X	EC	Deshidrogenasa de glucosa/quinato/shikimat o dependiente de PQQ	NC	Fosfatasa alcalina
BS2	NC	X	EC	Deshidrogenasa dependiente de PQQ	NC	Fosfatasa alcalina
BS3	NC	<i>PtsN</i> , <i>GlnL</i> , <i>GlnG</i> , <i>GlnK</i> , <i>AmtB</i>	EC	Deshidrogenasa de glucosa/quinato/shikimat o dependiente de PQQ	NC	<i>phoA</i> + Fosfatasa alcalina
BS4	NC	X	EC	Deshidrogenasa de glucosa/quinato/shikimat o dependiente de PQQ asociada a membrana	NC	X
BS5	NC	X	EC	Deshidrogenasa de glucosa/quinato/shikimat o dependiente de PQQ asociada a membrana	EC	<i>phoD</i>

Nota. NC: presencia del gen no confirmada; EC: evidencia compatible con la función evaluada a partir de la identificación de genes o proteínas funcionalmente relacionadas. El símbolo (x) indica que no se registraron hallazgos moleculares relacionados.

En relación con la fijación biológica de nitrógeno, no se confirmó la presencia del gen *nifH* en ninguno de los aislados. Sin embargo, BF1, BF4 y BS3 presentaron proteínas o genes relacionados con el metabolismo, regulación y asimilación del nitrógeno, aunque estos hallazgos no confirman específicamente la capacidad de fijación de nitrógeno.

Para la solubilización de fósforo inorgánico, nueve de los diez aislados (90 %) presentaron evidencia compatible con *gcd*, mediante la identificación de deshidrogenasas dependientes de PQQ relacionadas con la oxidación de glucosa. BF5 fue el único aislado en el que no se obtuvo evidencia compatible con esta función.

En cuanto a la mineralización de fósforo orgánico, BF1 y BS5 presentaron evidencia compatible con *phoD*. Adicionalmente, se detectaron otras fosfatasa relacionadas con este proceso: fosfatasa alcalinas en BF3, BF4, BS1 y BS2, *phoA* en BS3 y *PhoX* en BF5. En conjunto, los resultados mostraron un predominio de funciones potencialmente relacionadas con la movilización de fósforo entre los aislados evaluados.

5.4 Selección de aislados con potencial biotecnológico

La selección de los aislados se realizó considerando su identificación molecular, las características benéficas observadas y los antecedentes de cada género en aplicaciones agrícolas. Los aislados pertenecientes a *Labrys*, *Rhizobium*, *Brevibacillus*, *Agrobacterium*, *Burkholderia* y *Curtobacterium* se consideraron candidatos para continuar su evaluación. Entre ellos, *Rhizobium* cuenta con amplio respaldo como microorganismo promotor del crecimiento vegetal y su utilización en biofertilizantes se encuentra ampliamente establecida, como señalan Mowafy *et al.* (2023).

La identificación a nivel de especie es necesaria para lograr una caracterización taxonómica más precisa de todos los aislados bacterianos obtenidos. Sin embargo, esta determinación adquiere especial relevancia en *Agrobacterium*, *Burkholderia* y

Curtobacterium, debido a que estos géneros comprenden especies y cepas con características benéficas, así como otras con potencial patogénico. En el presente estudio, los aislados pertenecientes a *Burkholderia* y *Curtobacterium*, obtenidos en medio PVK, demostraron capacidad de solubilización de fósforo, mientras que el aislado identificado como *Agrobacterium* fue obtenido en medio Ashby. Estos resultados evidencian características de interés agronómico; sin embargo, no son suficientes para establecer su idoneidad como bioinoculantes.

Como antecedente, Chen *et al.* (2022) reportaron especies benéficas dentro de estos géneros, entre ellas *Burkholderia stabilis*, asociada con solubilización de fósforo, fijación de nitrógeno y producción de ácido indolacético (AIA), y *Curtobacterium luteum*, con capacidad de solubilización de fósforo y promoción del crecimiento vegetal.

Debido a que en la presente investigación la identificación alcanzó el nivel de género, estas características no pueden atribuirse directamente a los aislados obtenidos, por lo que se requiere profundizar en su identificación taxonómica y evaluar su inocuidad antes de considerar su posible aplicación como bioinoculantes.

Por otra parte, *Enterobacter* y *Cronobacter* fueron descartados como candidatos para el desarrollo de bioinoculantes debido a sus implicaciones de bioseguridad. Aunque ambos géneros incluyen cepas con características benéficas para las plantas, también comprenden patógenos oportunistas humanos, por lo que su utilización requiere evaluaciones más exhaustivas, incluyendo análisis genómicos y de inocuidad.

En particular, *Cronobacter*, especialmente *C. sakazakii*, ha sido asociado con enfermedades graves en humanos, lo que limita su aplicación como bioinoculante (Gonzalez-Escalona *et al.*, 2024; Jordan *et al.*, 2026). Los aislados seleccionados con potencial biotecnológico para continuar su evaluación como posibles bioinoculantes se presentan en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Aislados bacterianos seleccionados con potencial biotecnológico para continuar su evaluación como posibles bioinoculantes.

AISLADO	GÉNERO IDENTIFICADO
BF1	<i>Labrys</i>
BF2	<i>Rhizobium</i>
BF4	<i>Brevibacillus</i>
BF5	<i>Agrobacterium</i>
BS1 y BS2	<i>Burkholderia</i>
BS3 y BS5	<i>Curtobacterium</i>

5.5 Establecimiento del cepario bacteriano

A partir de los resultados obtenidos, se estableció el primer cepario bacteriano de la UNAG, conformado por ocho aislados pertenecientes a seis géneros bacterianos: *Labrys*, *Rhizobium*, *Brevibacillus*, *Agrobacterium*, *Burkholderia* y *Curtobacterium*. La selección se realizó considerando de manera conjunta las características observadas en los medios de cultivo, la identificación molecular mediante el gen 16S rRNA y la revisión de literatura sobre el potencial biotecnológico y las consideraciones de bioseguridad de los géneros identificados.

Los ocho aislados seleccionados fueron conservados en tubos de ensayo con medio sólido Ashby o PVK, según el medio de procedencia, con tres réplicas por aislado y almacenados a una temperatura de 4 a 8 °C, estableciéndose un total de 24 tubos de conservación para futuras evaluaciones.

VI. CONCLUSIONES

Se caracterizaron diez aislados bacterianos asociados a raíces de plantas de tomate y su rizósfera, los cuales presentaron diversidad morfológica en cuanto a la coloración, forma y características estereoscópicas de las colonias. Esta variabilidad permitió diferenciar fenotípicamente los aislados obtenidos y evidenció la diversidad bacteriana recuperada de las muestras evaluadas.

Se obtuvieron cinco aislados para bacterias con crecimiento en medio Ashby y cinco para bacterias con capacidad de solubilización de fósforo en medio PVK, logrando obtener cultivos puros y morfológicamente uniformes.

Los aislados evaluados presentaron diferencias altamente significativas en su capacidad de solubilización de fósforo ($P < 0,0001$). BS4, BS1 y BS2 alcanzaron los mayores índices de solubilización, con valores de 5,04, 4,27 y 4,04, respectivamente, sin diferencias significativas entre ellos; mientras que BS5 y BS3 presentaron los menores índices, con 2,54 y 2,33, respectivamente, evidenciando diferencias en la eficiencia de solubilización entre los aislados.

La identificación molecular mediante el gen 16S rRNA permitió asignar los diez aislados a ocho géneros bacterianos: BF1, *Labrys*; BF2, *Rhizobium*; BF3, *Cronobacter*; BF4, *Brevibacillus*; BF5, *Agrobacterium*; BS1 y BS2, *Burkholderia*; BS3 y BS5, *Curtobacterium*; y BS4, *Enterobacter*. No se confirmó la presencia del gen *nifH* en los aislados; sin embargo, nueve presentaron evidencia compatible con funciones asociadas a *gcd*, mientras que BF1 y BS5 mostraron evidencia compatible con *phoD*, además de detectarse otras fosfatasa relacionadas con la movilización de fósforo.

Se seleccionaron los géneros *Labrys*, *Rhizobium*, *Brevibacillus*, *Agrobacterium*, *Burkholderia* y *Curtobacterium*, considerando conjuntamente las características observadas en los medios de cultivo, la identificación molecular mediante el gen 16S rRNA y los antecedentes reportados en la literatura sobre su interés agrícola y

bioseguridad. Aunque el aislado identificado como *Enterobacter* presentó el mayor índice de solubilización de fósforo, tanto *Cronobacter* como *Enterobacter* fueron excluidos como candidatos para el desarrollo de bioinoculantes debido a consideraciones de bioseguridad.

Con los resultados obtenidos se estableció el primer cepario bacteriano de la UNAG, conformado por ocho aislados pertenecientes a seis géneros con potencial biotecnológico.

VII. RECOMENDACIONES

Se recomienda emplear medios de cultivo selectivos comerciales certificados, con el fin de reducir la variabilidad asociada a la preparación manual de los medios y garantizar una mayor reproducibilidad y confiabilidad en el aislamiento de microorganismos.

Se recomienda reactivar los aislamientos bacterianos cada seis meses mediante resiembra en medios de cultivo y posteriormente realizar una nueva conservación en tubos de ensayo, ya que el método de preservación empleado corresponde a una conservación de corto a mediano plazo.

Se recomienda establecer un protocolo institucional para el mantenimiento del cepario bacteriano, que incluya el registro, seguimiento y conservación periódica de los aislamientos, garantizando su disponibilidad para futuras investigaciones.

Se recomienda evaluar el potencial de los aislados bajo condiciones controladas, con el propósito de validar su capacidad para promover el crecimiento del cultivo de tomate antes de su utilización como bioinoculantes.

Se recomienda dotar al Laboratorio de Entomopatógenos de la UNAG con al menos un extintor de incendios debidamente señalizado, accesible y con mantenimiento vigente, con el fin de fortalecer las medidas de seguridad y garantizar una respuesta oportuna ante posibles emergencias durante las actividades de laboratorio.

Se recomienda gestionar la adquisición de equipos e insumos especializados para microbiología y biología molecular, con el propósito de fortalecer la capacidad de investigación de los laboratorios de la UNAG y reducir la dependencia de laboratorios externos para la realización de análisis moleculares.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Bakki, M., Banane, B., Marhane, O., Esmaeel, Q., Hatimi, A., Ait Barka, E., Azim, K., & Bouizgarne, B. (2024). Phosphate solubilizing *Pseudomonas* and *Bacillus* combined with rock phosphates promoting tomato growth and reducing bacterial canker disease. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1289466. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1289466>
- Calvo Araya, J. A. (2021). Suelos supresivos y su papel en el manejo de enfermedades. *Revista Environment & Technology*, 2(1), 48–63. <https://doi.org/10.56205/ret.2-1.3>
- Cassán, F., & Diaz-Zorita, M. (2016). *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. *Soil Biology and Biochemistry*, 103, 117–130. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.08.020>
- Castellanos González, L., Capacho Mogollón, A. E., & Castellanos Hernández, L. (2021). Abundancia y diversidad de la mesofauna del suelo en seis municipios de Norte de Santander, Colombia. *INGE CUC*, 17(1), 303–314. <https://doi.org/10.17981/ingecuc.17.1.2021.22>
- Chen, R.-B., Zuo, Z.-Y., Huang, B.-H., Li, L.-L., & Mei, Y.-H. (2022). Screening and identification of a *Burkholderia* strain and optimization of its phosphate-solubilizing capacity. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 33(6), 1669–1678.

- Colina Sifontes, E. (2025). Bioinsumos agrícolas para los sistemas agroecológicos de producción de musáceas. *Revista Crítica Con Ciencia*, 2(Esp. 1), 236–253. <https://doi.org/10.62871/rccc.v2i3.112>
- Coniglio, A., Mora, V., Puente, M. L., & Cassán, F. (2019). *Azospirillum* as biofertilizer for sustainable agriculture: *Azospirillum brasilense* Az39 as a model of PGPR and field traceability. En D. Zúñiga-Dávila, F. González-Andrés, & E. Ormeño-Orrillo (Eds.), *Microbial probiotics for agricultural systems: Advances in agronomic use* (pp. 45–70). Springer International Publishing.
- Covarrubias, S. A., Barrera-Galicia, G. C., Martínez-Acuña, M. I., Cardoso-Ortiz, J., & Flores de la Torre, J. A. (2024). Poblaciones microbianas y su contribución en la generación de suelos supresivos. *ECOAgropecuaria. Revista Científica Ecológica Agropecuaria*, 3(1), 1–12. <https://doi.org/10.53591/recoa.v3i1.1704>
- Cuenca, C. (2025). *Importancia de las rizobacterias en la producción agrícola*. Agribusiness Ecuador.
- De La Rosa Parrales, A. A. (2025). *Identificación de microorganismos de la rizósfera de plantas leguminosas en Manglaralto, provincia de Santa Elena* [Tesis, Universidad Estatal Península de Santa Elena].
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(1), 13–15.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2009). *La agricultura mundial en la perspectiva del año 2050*. FAO.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2025a). *Datos oficiales de producción de tomate*. FAO.

- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2025b). *FAOSTAT* [Base de datos]. FAO.
- García de Salamone, I. E., Funes, J. M., Di Salvo, L. P., Escobar-Ortega, J. S., D'Auria, F., Ferrando, L., & Fernández-Scavino, A. (2013). Inoculation of paddy rice with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact of plant genotypes on rhizosphere microbial communities and field crop production. *Applied Soil Ecology*, 61, 196–204.
- García-Salamanca, A., Molina-Henares, M. A., van Dillewijn, P., Solano, J., Pizarro-Tobías, P., Roca, A., Duque, E., & Ramos, J. L. (2013). Bacterial diversity in the rhizosphere of maize and the surrounding carbonate-rich bulk soil. *Microbial Biotechnology*, 6(1), 36–44. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2012.00358.x>
- Giovelli, J., & Tabaldi, L. A. (2022). Níveis de fósforo e inoculação de sementes por *Bacillus megaterium* (CNPMS B119) e *Bacillus subtilis* (CNPMS B2084) no crescimento e desenvolvimento de plantas de soja. *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*, 26(4), 451–458.
- Gonzalez-Escalona, N., Kwon, H.-J., & Chen, Y. (2024). Nanopore sequencing allows recovery of high-quality completely closed genomes of all *Cronobacter* species from powdered infant formula overnight enrichments. *Microorganisms*, 12(12), 2389. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12122389>
- Gupta, R., Kumari, A., Sharma, S., Alzahrani, O. M., Noureldeen, A., & Darwish, H. (2022). Identification, characterization and optimization of phosphate solubilizing rhizobacteria (PSRB) from rice rhizosphere. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(1), 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.09.075>
- Haile, D., Tesfaye, B., & Assefa, F. (2025). Selected phosphate-solubilizing bacteria from tomato rhizosphere as plant growth promoter to improve tomato's

growth and production. *International Journal of Agronomy*, 2025, 6746599. <https://doi.org/10.1155/ioa/6746599>

Hashem, A., Tabassum, B., & Abd Allah, E. F. (2019). *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(6), 1291–1297. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004>

Jiménez-Mejía, R., Medina-Estrada, R. I., Carballar-Hernández, S., Orozco-Mosqueda, M. del C., & Santoyo, G. (2022). Teamwork to survive in hostile soils: Use of plant growth-promoting bacteria to ameliorate soil salinity stress in crops. *Microorganisms*, 10(1), 150. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010150>

Jordan, S., de Maayer, P., Smits, T. H. M., & Coutinho, T. A. (2026). *Enterobacter* species: Opportunistic human and plant pathogens with plant-beneficial traits. *Molecular Plant Pathology*, 27(3), e70231. <https://doi.org/10.1111/mpp.70231>

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>

Khan, M. F. (2025). Microbial remediation of agrochemical-contaminated soils: Enzymatic mechanisms, quorum sensing, and emerging opportunities. *Integrated Environmental Assessment and Management*. <https://doi.org/10.1093/inteam/vjaf167>

Kirui, C. K., Njeru, E. M., & Runo, S. (2022). Diversity and phosphate solubilization efficiency of phosphate solubilizing bacteria isolated from semi-arid

agroecosystems of eastern Kenya. *Microbiology Insights*, 15, 11786361221088991. <https://doi.org/10.1177/11786361221088991>

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947–2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>

Loera-Muro, A., & Caamal-Chan, M. G. (2023). Biopelículas en la rizósfera y su papel en la producción de compuestos antimicrobiales en el suelo. *Terra Latinoamericana*, 41, e1733. <https://doi.org/10.28940/terra.v41i0.1733>

Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2021). *Brock biology of microorganisms* (16th ed.). Pearson.

Mendes, R., Kruijt, M., de Bruijn, I., Dekkers, E., van der Voort, M., Schneider, J. H. M., Piceno, Y. M., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., Bakker, P. A. H. M., & Raaijmakers, J. M. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, 332(6033), 1097–1100. <https://doi.org/10.1126/science.1203980>

Mowafy, A. M., Khalifa, S., & Elsayed, A. (2023). *Brevibacillus* DesertYSK and *Rhizobium* MAP7 stimulate the growth and pigmentation of *Lactuca sativa* L. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21, 17. <https://doi.org/10.1186/s43141-023-00465-1>

Nassal, D., Spohn, M., Eltlbany, N., Jacquioid, S., Smalla, K., Marhan, S., Kandeler, E., & Neumann, G. (2018). Effects of phosphorus-mobilizing bacteria on tomato growth and soil microbial activity. *Plant and Soil*, 427, 17–37. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3528-y>

- O'Connor, J., & Páramo, L. (2019). *Descifrando el contenido microbiano de bioinsumos comerciales para el diseño de un consorcio con potencial biofertilizante* [Tesis, Universidad Nacional de Ingeniería].
- Observatory of Economic Complexity. (2025). *Tomatoes in Honduras*. OEC.
- Palleroni, N. J. (2005). Genus I. *Pseudomonas*. En D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley, & G. M. Garrity (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2nd ed., Vol. 2). Springer.
- Pedraza, R. O., Filippone, M. P., Salazar, S. M., Fontana, C., Ramírez-Mata, A., Sierra-Cacho, D., & Baca, B. E. (2020). *Azospirillum*. En *Beneficial microbes in agro-ecology*. Academic Press.
- Pilatuña Quishpe, M. F., González-Parra, M. M., Mero García, M. E., & Risco Arias, D. (2021). Evaluación agronómica de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de suelos andinos en plántulas de lechuga y tomate. *Investigación Agraria*, 23(1), 47–52.
- Puruncajas, L., & Endara, I. (2013). *Identificación de bacterias benéficas mediante cultivos microbiológicos para el tratamiento de aguas residuales en el sector La Calzada (Humedal) del cantón Saquisilí, provincia de Cotopaxi* [Tesis, Universidad Técnica de Cotopaxi].
- Rahmadi, C., & Franklin, E. (2012). *Manual de biología de suelos tropicales*. Instituto Nacional de Ecología.
- Rajguru, B. R., & Bhatt, V. D. (2022). Review on mechanism of mineral phosphate solubilization in fast-growing rhizobia based on sugar utilization. *Plant Breeding and Biotechnology*, 10(4), 203–211. <https://doi.org/10.9787/PBB.2022.10.4.203>
- Rehan, M., Al-Turki, A., Abdelmageed, A. H. A., Abdelhameid, N. M., & Omar, A. F. (2023). Performance of plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR)

isolated from sandy soil on growth of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plants*, 12(8), 1588. <https://doi.org/10.3390/plants12081588>

Reyes-Castillo, A., Gerding, M., Oyarzúa, P., Zagal, E., Gerding, J., & Fischer, S. (2019). Plant growth-promoting rhizobacteria able to improve NPK availability: Selection, identification and effects on tomato growth. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 79(3), 473–485. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392019000300473>

Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4–5), 319–339. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2)

Rosales-Castillo, R., Velázquez-de Lucio, B. S., Hernández-Domínguez, E. M., & Álvarez-Cervantes, J. (2025). Bio-inputs: An alternative to achieve sustainable agriculture. *Terra Latinoamericana*, 43, e2045. <https://doi.org/10.28940/terra.v43i.2045>

Sánchez-Navarrete, E. T., Castañeda-Antonio, M. D., Baez, A., & Morales-García, Y. E. (2021). Rizobacterias para el mejoramiento del cultivo de maíz (*Zea mays*). Una tecnología prometedora para la producción de maíces criollos. *Alianzas y Tendencias BUAP*.

Santoyo, G., & Rocha, C. (2020). *Pseudomonas fluorescens*: Mecanismos y aplicaciones en la agricultura sustentable. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*.

Secretaría de Agricultura y Ganadería. (2021). *Lineamientos para la promoción de bioinsumos en sistemas agrícolas sostenibles en Honduras*. SAG.

Singh, V., & Kumar, B. (2024). A review of agricultural microbial inoculants and their carriers in bioformulation. *Rhizosphere*, 29, 100843.

Soria, M. C., Audisio, M. C., et al. (2016). *Manual de técnicas microbiológicas*.

- Stanislav, M. (2024). *Bacillus megaterium: Importancia industrial, agrícola y ambiental*. Universidad Nacional de Colombia.
- Suhameena, B., Uma Devi, S., Shyamala Gowri, R., & Kumar, S. D. (2020). Utilization of *Azospirillum* as a biofertilizer—An overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 62(2), 141–145.
- Sumbul, A., Ansari, R. A., Rizvi, R., & Mahmood, I. (2020). *Azotobacter*: A potential bio-fertilizer for soil and plant health management. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(12), 3634–3640.
- Suricallo Menendez, K. P., Mendoza-Atahuachi, M. A., Valderrama-Maquera, N. F., Yucra-Ayma, N. A., Arocotipa-Phatti, G. M., & Velásquez Gómez, A. A. (2023). Medios alternativos para el aislamiento de *Azotobacter* nativos de Calana–Tacna. *Revista Ciencias Biológicas y Ambientales*, 46–53.
- Swain, M. R., Laxminarayana, K., & Ray, R. C. (2012). Phosphorus solubilization by thermotolerant *Bacillus subtilis* isolated from cow dung microflora. *Agricultural Research*, 1(3), 273–279. <https://doi.org/10.1007/s40003-012-0022-x>
- Timofeeva, A. M., Galyamova, M. R., & Sedykh, S. E. (2023). Plant growth-promoting soil bacteria: Nitrogen fixation, phosphate solubilization, siderophore production, and other biological activities. *Plants*, 12(24), 4074. <https://doi.org/10.3390/plants12244074>
- Torres, M. (2018). *Manual de microbiología: Medios de cultivo y técnicas de aislamiento*.
- Villar, I. (2024). *Hongos endófitos en Chile, una fuente natural de metabolitos secundarios bioactivos para uso en medicina y agricultura* [Tesis, Universidad de Concepción].

ANEXOS

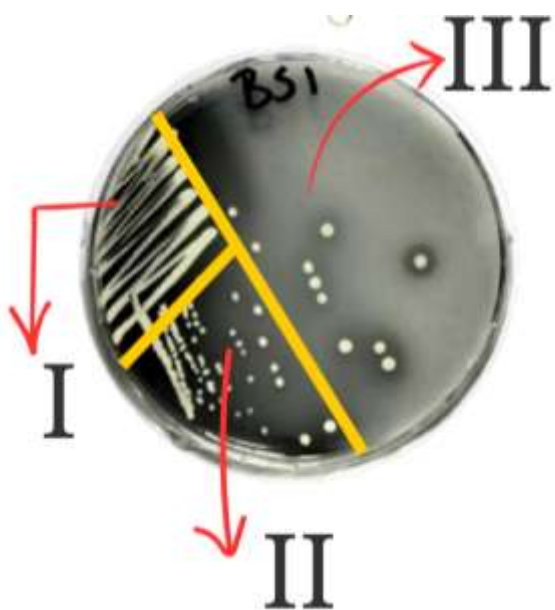
Anexo 1. Recolección de muestras de raíces y suelo rizosférico.



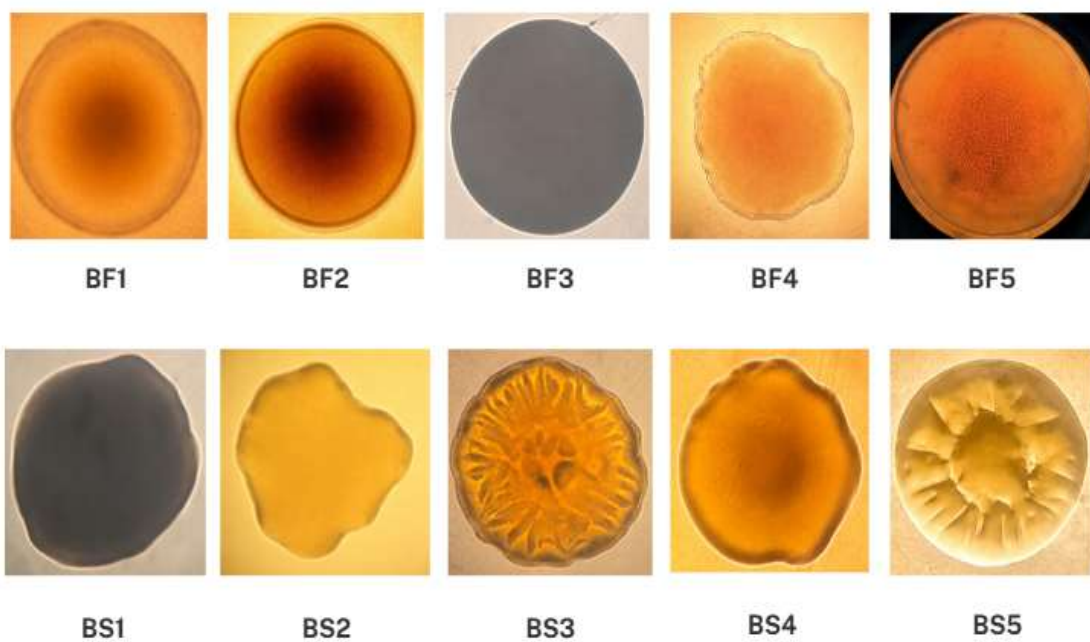
Anexo 2. Procesamiento de las muestras y preparación de diluciones seriadas.



Anexo 3. Aislamiento y purificación de los aislados bacterianos.



Anexo 4. Caracterización morfológica y microscópica de los aislados bacterianos.



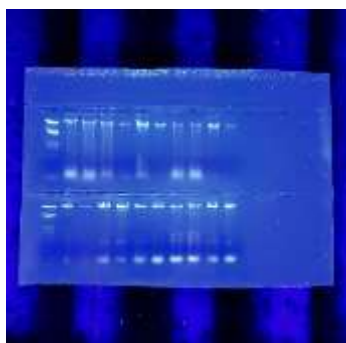
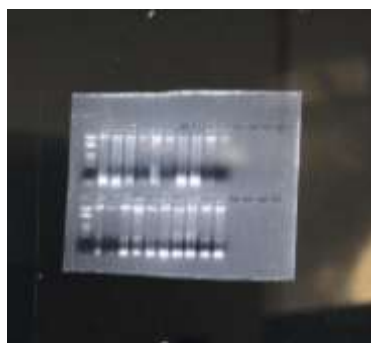
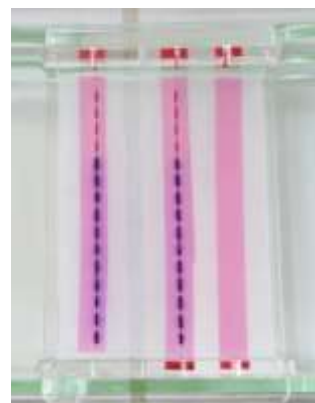
Anexo 5. Obtención de biomasa bacteriana.



Anexo 6. Extracción de ADN genómico bacteriano.



Anexo 7. Evaluación de la calidad del ADN y preparación de muestras para secuenciación.



Anexo 8. Evaluación de la capacidad de solubilización de fósforo.



8.1 Día 1



8.2 Día 5



8.3 Día 10



8.4 Día 15

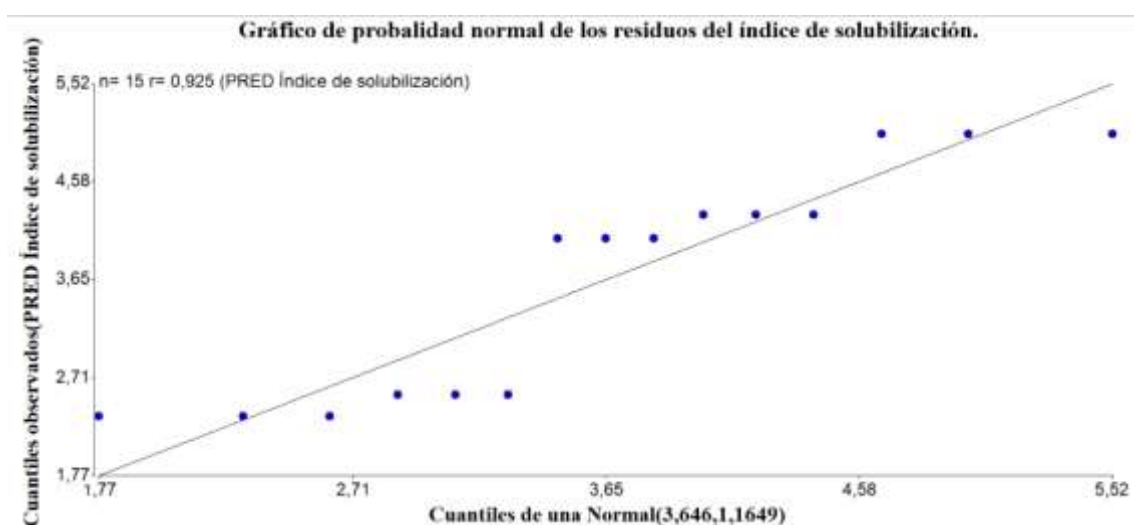


Anexo 9. Análisis estadístico del índice de solubilización de fósforo de los aislados bacterianos

Nueva tabla : 06/08/2026 - 16:39:54 - [Versión : 30/04/2020]

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Índice de solubilización	15	3,65	1,13	0,90	0,1678



Nueva tabla : 06/08/2026 - 16:40:24 - [Versión : 30/04/2020]

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Índice de solubilización	15	0,92	0,88	10,60

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	16,31	4	4,08	27,27	<0,0001
Aislado	16,31	4	4,08	27,27	<0,0001
Error	1,50	10	0,15		
Total	17,80	14			

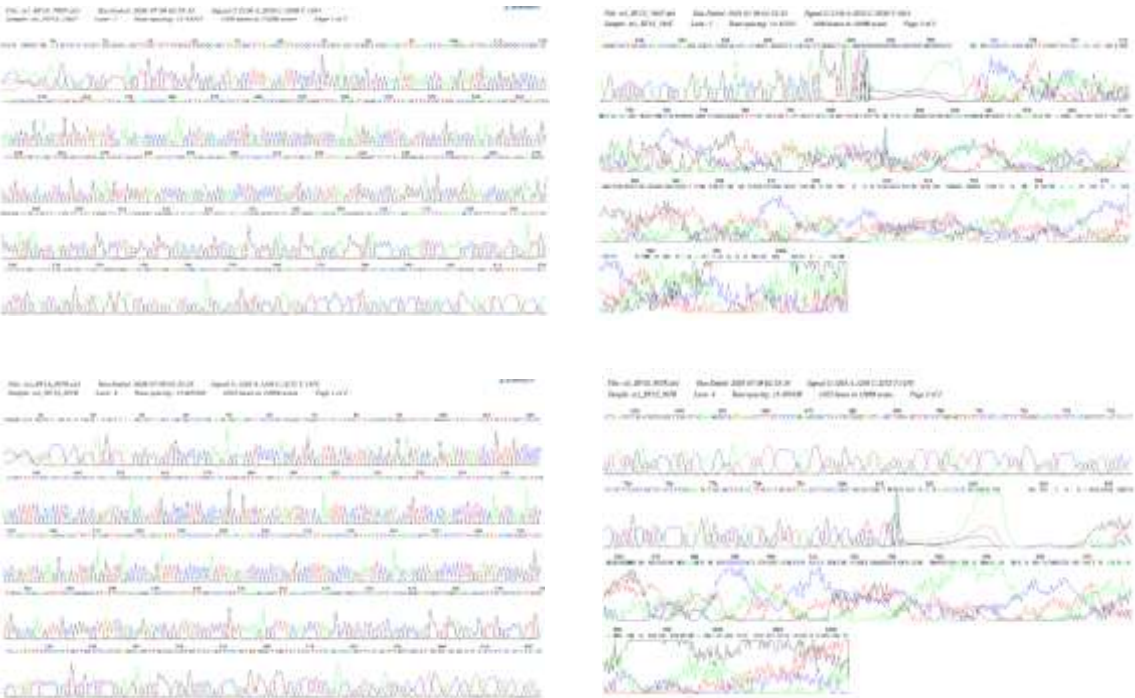
Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,03900

Error: 0,1495 gl: 10

Aislado	Medias	n	E.E.
BS4	5,04	3	0,22 A
BS1	4,27	3	0,22 A
BS2	4,04	3	0,22 A
BS5	2,54	3	0,22 B
BS3	2,33	3	0,22 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

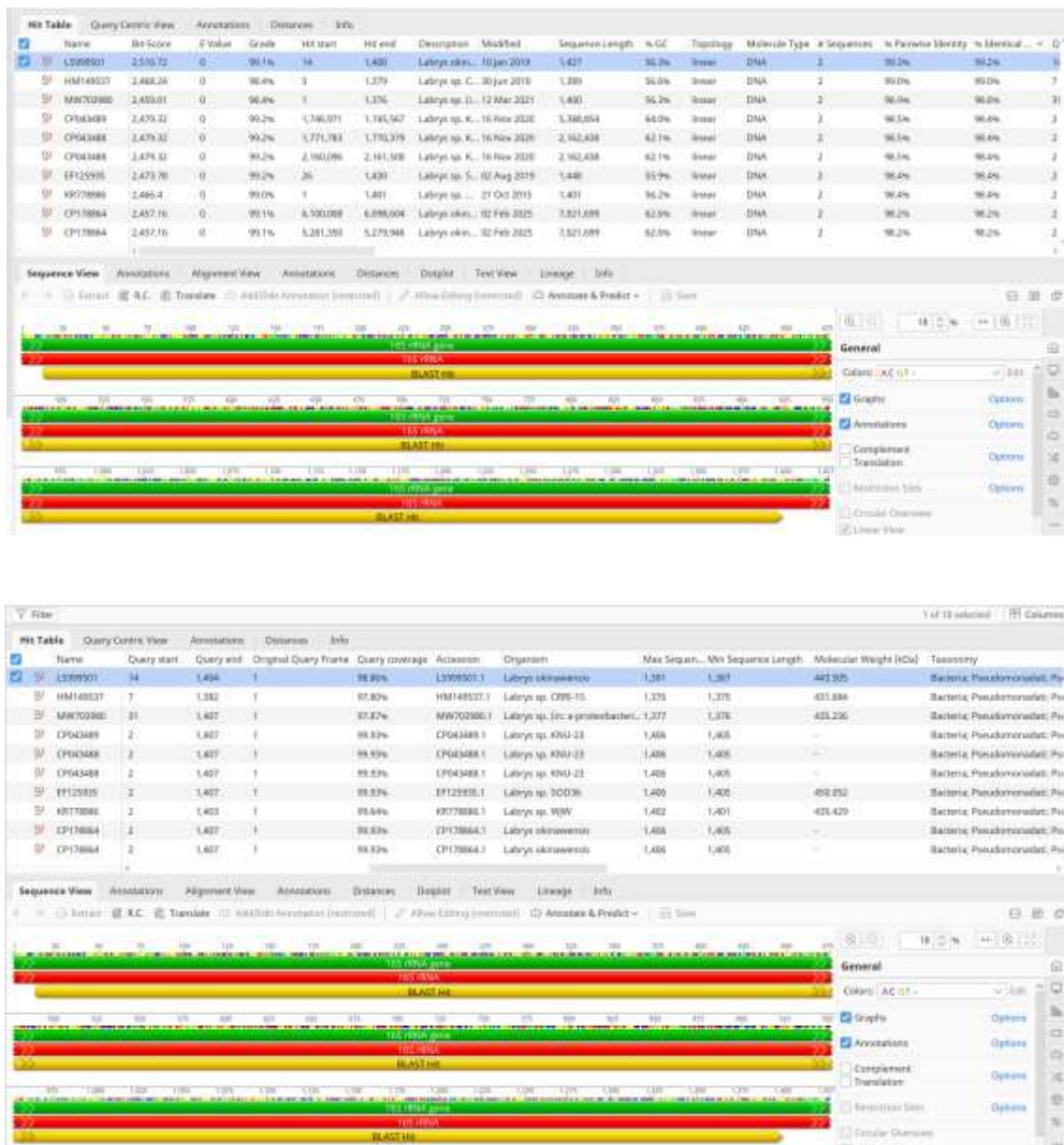
Anexo 10. Evaluación de los cromatogramas de las secuencias del gen 16S rRNA.



Anexo 11. Obtención de secuencias consenso del gen 16S rRNA.



Anexo 12. Identificación molecular de los aislados bacterianos mediante BLASTn.



Anexo 13. Evidencia complementaria del análisis de genes funcionales asociados al metabolismo de nitrógeno y fósforo.

```

gene      KYWQMYQLQLAGEELAASVREESLSA
          1048256..1048594
          /locus_tag="AI2999V1_0956"
mRNA      1048256..1048594
          /locus_tag="AI2999V1_0956"
          /note="AI2999v1_0956.mrna"
CDS       1048256..1048594
          /locus_tag="AI2999V1_0956"
          /note="long variant;
          AI2999v1_0956.mrna"
          /codon_start=1
          /transl_table=11
          /product="Nitrogen regulatory protein P-II 2"
          /protein_id="CAH5518680.1"
          /translation="MKLVTVVIKPFKLEDVREALSSMGIQGLTVTEVKGFGGRQKGHAE
          LYRGAEYSVNF LPKVKIDVAIADDQLDEVIDVISKAAYTGKIGDGKIFVAELQRVIRI
          RTGESDEAAL"

```

```

gene      <1..>293
          /locus_tag="FZC33_05705"
CDS       <1..>293
          /locus_tag="FZC33_05705"
          /inference="COORDINATES: similar to AA
          sequence:RefSeq:WP_012227759.1"
          /note="Derived by automated computational analysis using
          gene prediction method: Protein Homology."
          /codon_start=1
          /transl_table=11
          /product="glucose/quinic/shikimate family membrane-bound
          PQQ-dependent dehydrogenase"
          /protein_id="QEN85727.1"
          /translation="MHQRRGLLLTITWIVFAIIGLALGGGGIWLILGGSPYYVVAGL
          LMLVTAFLLARRRPSALVYVALLLGLTIWAVWESGDFWLLAPRGDILAPLGLWLLL
          .....

```

```

gene      DGRLIWNVEFERQMSKITVNGQSFPGTRQ"
          4344260..4345840
          /locus_tag="ACIGJE_20275"
CDS       4344260..4345840
          /locus_tag="ACIGJE_20275"
          /inference="COORDINATES: similar to AA
          sequence:RefSeq:WP_019997549.1"
          /note="Derived by automated computational analysis using
          gene prediction method: Protein Homology."
          /codon_start=1
          /transl_table=11
          /product="alkaline phosphatase D family protein"
          /protein_id="YEJ70811.1"
          /translation="MRFIERPLSRRRFLTATAATGLLGATGTFAMPGLSRAADRPEVT
          AGLQSGDVAGDRAVLWSRTDRPANAI FEWSTTESFKTVNRLPTVTASPETDYTVKILA
          EGLPADQIEIFYRVRFQDLAHTSVESEVVTGHLRSAPAGLRDVSFVWSGDTAGQGWDID
          ADRGGMKIYSAMLKHNPDFFIHSGDNIYADGVKPEVKLPDGTWVKNIPTPEKSKVAE

```