



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE GUAYAQUIL
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

TRABAJO EXPERIMENTAL:

**MICROORGANISMOS CON POTENCIAL EN LA SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATO
TRICÁLCICO Y ROCA FOSFÓRICA AISLADOS DE SUELOS DE LA ANTÁRTIDA**

*Trabajo de titulación previo a la obtención del Título de
Ingeniera en Biotecnología*

AUTORES:

ASHLEY GABRIELA BAQUE GUTIÉRREZ
MELANY NICOLE VARGAS RODRIGUEZ

TUTORES:

MSc. CARINA ELIZABETH HIDALGO RAMÍREZ
Mg. MARCOS XAVIER VERA MORALES

GUAYAS – ECUADOR

2023

II. CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotras, Ashley Gabriela Baque Gutiérrez con documento de identificación N° 0942829128 y Melany Nicole Vargas Rodríguez con documento de identificación N° 0954545000; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Guayaquil, 23 de Agosto del año 2023

Atentamente,


Ashley Gabriela Baque Gutiérrez
0942829128


Melany Nicole Vargas Rodríguez
0954545000

**III. CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL
TRABAJO DE TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA
SALESIANA**

Nosotras, Ashley Gabriela Baque Gutiérrez con documento de identificación N° 0942829128 y Melany Nicole Vargas Rodríguez con documento de identificación N° 0954545000, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del proyecto de investigación: **“MICROORGANISMOS CON POTENCIAL EN LA SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATO TRICÁLCICO Y ROCA FOSFÓRICA AISLADOS DE SUELOS DE LA ANTÁRTIDA”**, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniera en Biotecnología*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 23 de Agosto del año 2023

Atentamente,


Ashley Gabriela Baque Gutiérrez
0942829128

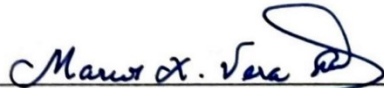

Melany Nicole Vargas Rodríguez
0954545000

II. CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Marcos Xavier Vera Morales con documento de identificación N° 0930412747, investigador del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **“MICROORGANISMOS CON POTENCIAL EN LA SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATO TRICÁLCICO Y ROCA FOSFÓRICA AISLADOS DE SUELOS DE LA ANTÁRTIDA”**, realizado por Ashley Gabriela Baque Gutiérrez con documento de identificación N° 0942829128 y por Melany Nicole Vargas Rodríguez con documento de identificación N° 0954545000, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción *Proyecto de Investigación* que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 23 de Agosto del año 2023

Atentamente,



Blgo. Marcos Xavier Vera Morales, Mg.
CC. 0930412747

III. CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Carina Elizabeth Hidalgo Ramírez con documento de identificación N° 1722655519, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **“MICROORGANISMOS CON POTENCIAL EN LA SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATO TRICÁLCICO Y ROCA FOSFÓRICA AISLADOS DE SUELOS DE LA ANTÁRTIDA”**, realizado por Ashley Gabriela Baque Gutiérrez con documento de identificación N° 0942829128 y por Melany Nicole Vargas Rodríguez con documento de identificación N° 0954545000, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción *Proyecto de Investigación* que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 23 de Agosto del año 2023

Atentamente,



Ing. Carina Elizabeth Hidalgo Ramírez, MSc.
1722655519

II. DEDICATORIA

A mi querida madre, Maricruz Gutiérrez, cuyo amor, paciencia y apoyo inquebrantable han sido el cimiento sobre el cual edificué este logro. Tú has sido mi guía y mi inspiración, llevándome hacia la realización de cada sueño que alguna vez acaricié. Tu cariño es mi refugio, y tus enseñanzas han forjado mi resiliencia.

A mis amados hermanos, Angee, Ángel, Alejandro, Luciana y Santiago, cuya presencia luminosa y afecto incondicional me han impulsado a avanzar en este camino. Sus risas y consejos han sido faros que me han guiado en cada encrucijada. Cada paso que doy en esta jornada también en su logro.

A mis adorados sobrinos, quienes personifican el esfuerzo y el estímulo personal en sus sonrisas y miradas. Son mi fuente de inspiración constante y un recordatorio de la razón por la cual persevero en la búsqueda de la excelencia.

A mis venerados abuelos, Wilson y Marisol, quienes, tras mi madre, han sido guardianes de nuestro bienestar y sabios guías en mi camino. Sus enseñanzas siguen siendo mi brújula y su amor una fuente de fortaleza.

A mis respetados tíos, Wendy, Kelvin y Juan, cuya presencia en la trama de mi vida ha tejido un tapiz de afecto y confianza en mí. Y a la memoria de mi amado tío Marcos, cuyos consejos y cuidado siempre me acompañarán como faros en la oscuridad.

A mi tía, Matilde Asencio, cuya fe inquebrantable en mi potencial y apoyo constante han sido mi guía y mi motivación. Su confianza en mi capacidad es un voto de confianza en el futuro que aspiro a forjar.

A mi amiga, Melany Vargas, con quien compartí alegrías y tristezas, celebraciones y desafíos. Esta victoria es también tuya, pues tu apoyo y aliento han sido un bálsamo en los momentos de adversidad. Espero que nuestra amistad perdure por siempre.

A mis leales compañeros, Botas, Sharlie y Cappuccino, cuya compañía nocturna y cariño incondicional iluminaron mis noches de estudio y soledad. Sus travesuras y ronroneos fueron mi refugio.

Sin dejar de reconocer a todas las personas que depositaron su confianza en mí: mi familia, amigos de la escuela y compañeros universitarios. Sus palabras y consejos han sido los pilares que me han sostenido emocionalmente. Este momento especial no solo pertenece a aquellos a quienes mencioné, sino también a mis tutores que tomaron un momento para explorar mi proyecto de tesis.

Les agradezco de corazón por su tiempo y consideración.

Con amor.

Ashley Baque G.

DEDICATORIA

Con reverente gratitud, brindo mis éxitos a Dios por permitirme cumplir un logro más en mi vida. A mis estimados hermanos, Walter y Vanessa, mi sincero agradecimiento por su constante apoyo y amor en cada encrucijada de decisiones.

A mis adoradas sobrinas, Isabella y Roma, quienes con su afecto genuino me iluminan el camino. Anhele que en sus futuros reflejen la dedicación y pasión que emanan de sus corazones. Que persigan sus sueños con la misma fervorosa determinación que inspiran en mí.

Expreso mi profunda gratitud a mi amada familia. Su amor constante y aliento inmutable han sido la brújula que me orienta en esta travesía repleta de descubrimientos. Esta investigación es el tributo a la devoción y sacrificio que siempre han sostenido.

De manera especial, dedico este logro a aquellos seres que encendieron en mí la llama del esfuerzo diario, los pilares de mi orgullo y la fuente principal de mi dedicación. A mi padre, Walter Vargas, cuya confianza en mí ha sido un faro durante estos cuatro años. Y a mi madre, Rosa María Rodríguez, cuyo inquebrantable respaldo en mis estudios ha sido una inspiración continua. Cada página de esta tesis lleva impreso un fragmento de su sacrificio y esfuerzo. Que este logro los llene de orgullo, así como yo me siento afortunado de tenerlos como guías y ejemplos en mi vida. A ustedes, héroes que lucharon por mí a diario, elevo mi más sincero reconocimiento.

A ti, querida amiga Ashley Baque, extendida es mi gratitud por ser parte de mi porvenir y otorgarme tu entrañable amistad a lo largo de estos años. Tu compañía ha sido el motor que me impulsó a superar desafíos y alcanzar esta cumbre.

Una mención especial va dirigida a mis respetados tutores de tesis, cuya orientación, sabiduría y paciencia han iluminado mi camino durante esta etapa de aprendizaje. Su guía ha sido invaluable y su influencia perdurará en mí.

Con cariño.

Melany Vargas R.

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro sincero agradecimiento a los tutores Carina Elizabeth Hidalgo Ramírez, MSc., y Marcos Vera Morales Mg. por su valiosa orientación durante el desarrollo de nuestra investigación y por ser nuestros guías a lo largo de esta exigente labor de recolección, procesamiento y análisis de datos, lo que nos permitió crear nuestro informe oficial.

Extendemos nuestro agradecimiento al Dr. Juan Manuel Cevallos, director del CIBE, y a la Dra. María Fernanda Ratti, directora del proyecto, por sus esfuerzos en facilitar la realización de esta investigación en las instalaciones del CIBE.

Nuestro reconocimiento también va al Dr. José Ballesteros Lara, director de la carrera, y al Dr. Jaime Naranjo Morán, director del proyecto investigativo, por su orientación en los complejos procesos que conlleva la ejecución de este proyecto, lo que contribuyó al éxito de nuestra educación universitaria.

Agradecemos al Instituto Oceanográfico y Antártico de la Armada del Ecuador (INOCAR) y al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) por su apoyo en esta investigación, identificada con el código CIBE-12-2023 del proyecto "Caracterización de la diversidad biológica de microorganismos asociados a plantas vasculares y no vasculares antárticas con fines de bioprospección". Su patrocinio ha sido fundamental para llevar a cabo este valioso trabajo.

Ashley Baque G. y Melany Vargas R.

RESUMEN

La presente investigación, estuvo encaminada en la determinación de colonias bacterianas psicrófilas capaces de solubilizar fósforos pertenecientes de la Antártida, procesamos muestras de suelos almacenadas al -20°C , de manera que, se logró aislar 47 cepas, mediante técnicas microbiológicas controladas para su obtención, gracias a los resultados en pruebas de solubilización “*in vitro*” con medios de cultivos que contenían fósforo (Fosfato tricálcico y Roca fosfórica), se identificó que 35 de ellas son capaces de solubilizar el mineral de interés para nuestro estudio.

Los aislamientos identificados por la secuenciación del gen del ARNr 16s de ciertas especies, fueron: B6, B11 y B16 *Pseudomonas graminis*, B17, B18, B24, B25 B35, B36, B37 y B38 *Pseudomonadaceae bacterium*, B20 *Arthrobacter* sp. la cuál no mantuvo su capacidad de solubilizar. Las pruebas estadísticas descriptivas se realizó mediante análisis de varianza con un nivel de 95% de confianza y la prueba de Tukey ($p > 0,05$) determina que la cepa B16 en medio PVK (Fosfato tricálcico) presenta mayor índice de solubilización (IS) con un valor de (4,75), menor solubilización en Roca F (2,20), B11 en medio con Roca F (3,17) y FT (4,63) presenta un buen IS para ambos sustratos, con estos valores podemos confirmar sus análisis que van de la mano con las pruebas de solubilización, puesto que se presenta que existen diferencia significativa entre las cepas, pero no existe diferencia significativa en las que solubilizan.

Palabras clave: Biodiversidad; Biotecnología; Genotipo; Identificación; Psicrófilos; Solubilización.

ABSTRACT

The present investigation was aimed at the determination of psychrophilic bacterial colonies capable of solubilizing phosphorus from Antarctica, we processed soil samples stored at - 20°C, so that 47 strains were isolated, Thanks to the results of solubilization tests ''*in vitro*'' with culture media containing phosphorus (tricalcium phosphate and phosphate rock), it was identified that 35 of them are able to solubilize the mineral of interest for our study.

The isolates found by sequencing the 16s rRNA gene of certain species were: B6, B11 and B16 *Pseudomonas graminis*, B17, B18, B24, B25 B35, B36, B37 and B38 *Pseudomonadaceae* bacterium, B20 *Arthrobacter* sp. which did not maintain its ability to solubilize. The descriptive statistical tests were performed by analysis of variance with a 95% confidence level and the Tukey test ($p > 0.05$) determined that strain B16 in PVK medium (tricalcium phosphate) presented a higher solubilization index (SI) with a value of (4.75), lower solubilization in F Rock, B11 in medium with Rock F (3.17) and FT (4.63) presents a good SI for both substrates, with these values we can confirm their analyses that go hand in hand with the solubilization tests, since it is shown that there is a significant difference between the strains, but there is no significant difference in those that solubilize.

Keywords: Biodiversity; Biotechnology; Genotype; Identification; Psychrophiles; Solubilization.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Capítulo 1	18
1.1 Introducción	18
1.2 El problema de investigación	20
1.2.1. Planteamiento del problema	20
1.2.2 Justificación	21
1.2.3 Delimitaciones	22
1.2.4 Pregunta de investigación.....	22
1.3 Objetivos	23
1.3.1 Objetivo general	23
1.3.2 Objetivos específicos.....	23
1.4 Formulación de la hipótesis.....	24
Capítulo 2	25
2.1 Fundamentación teórica	25
2.2 Mecanismo de microorganismos solubilizadores	26
2.2.1 Microbiota Antártica y adaptación a condiciones extremas	26
2.2.2 Biodiversidad microbiana.....	26
2.2.3 Microorganismo Psicrófilos	26
2.3 Fosfato tricálcico	27
2.4 Roca fosfórica	28
2.5 Solubilización de Fosfato	28
2.4 Bioactivos solubilizadores presentes en microorganismos Psicrófilos	28
2.4.1 Adaptación a bajas temperaturas	28
2.4.2 Compuestos bioactivos.....	29
2.4.3 Solubilizadores bioactivos.....	29
2.5 Microorganismos de la Antártida aplicados en la agricultura.....	29
2.5.1 Biodiversidad antártica	29
2.5.2 Bioestimulación	30
2.5.3 Control biológico.....	30
2.5.4 Métodos de aplicación.....	30
2.6 Aplicaciones biotecnológicas en la agricultura de microorganismos solubilizadores	31
2.6.1 Microorganismos solubilizadores.....	31
2.6.2 Beneficios agrícolas.....	31
2.7 Técnicas moleculares para identificación de microorganismos de interés.....	32

2.7.1 Secuenciación de Sanger.....	32
2.7.1.1 Ciclo de secuenciación	32
2.7.1.2 Aplicaciones de la secuenciación de Sanger	32
2.7.2 PCR	33
2.7.3 PCR convencional	33
2.7.4 Electroforesis.....	34
2.7.5 Secuenciación con NanoDrop	34
2.7.6 Construcción de árbol filogenético.....	34
2.7.6.1 Técnicas de reconstrucción de árboles	35
Capítulo 3	36
3.1 Marco metodológico	36
3.1.1 Metodología/Propuesta de desarrollo	36
3.1.2 Diseño experimental	36
3.1.3 Ubicación de estudio	36
3.1.4 Variables de investigación.....	37
3.2 Procedimiento.....	38
3.2.1 Aislamiento de poblaciones microbianas con capacidad solubilizadoras que se encuentran en la rizosfera.	38
3.2.1.1 Procesar muestras de la Antártida.....	38
3.2.1.2. Análisis de la microflora de la rizosfera antártica.	39
3.2.1.3 Siembra por agotamiento y aislamiento de los microorganismos	40
3.2.2 Preparación de medios específicos para aislar bacterias de las muestras provenientes de la Antártida.....	41
3.2.3 Diluciones ajustadas o de concentración ‘‘Mc Farland’’ y evaluación de la capacidad solubilizadoras y valoración de su eficiencia de manera <i>in vitro</i>	42
3.2.3.1 Ecuación de índice de solubilización.....	44
3.2.4 Conservación de las muestras de bacterias en medio LB+Glicerol	44
3.2.5 Identificación molecular y análisis de secuencias ADNr 16S.....	45
3.2.5.1 Extracción de ADN.....	45
3.2.5.2 Amplificación con termociclador PCR convencional	45
3.2.5.3 Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %	46
3.2.6 Análisis filogenéticos moleculares de bacterias psicrófilas	46
3.2.8 Síntesis y análisis de datos estadísticos.....	47
Capítulo 4	48
4.1 Resultados y discusión	48

4.1.1 Aislamiento de poblaciones microbianas con capacidad solubilizadora y evaluación de las pruebas de solubilización de <i>P in vitro</i>	48
4.1.2 Evaluación cualitativa de la actividad solubilizadora	51
4.1.3 Análisis estadístico	53
4.1.4 Identificación molecular y análisis de secuencias ADNr 16S.....	55
4.1.4.1 Validación con NanoDrop para evaluar la calidad y pureza del ADN.....	55
4.1.4.2 Secuenciación del gen ARNr 16s y construcción del árbol filogenético.....	56
Capítulo 5	60
5.1 Conclusiones y recomendaciones.....	60
5.1.1 Conclusiones.....	60
5.1.2 Recomendaciones	61
BIBLIOGRAFÍA.....	62
ANEXOS.....	78

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. El gráfico demuestra ubicación exacta de muestreo: Antártida "Horseshoe Island", en dónde se monitorearon 2 puntos para Muestra "A", y se recolectó 4 muestras de suelo asociado a la rizosfera.	37
Figura 2. A) Siembra de muestras en medio LB para obtención de bacterias y material utilizado. B) Tubos viales procesados que contienen 1g y 9 mL del caldo de cultivo LB.	38
Figura 3. Dilución seriada para el aislamiento de microorganismos Psicrófilos de la Antártida .	39
Figura 4. Incubadora: New Brunswick Innova® 44/44R - Stackable Incubator Shake, en temperatura -10°C específica para crecimiento de microorganismo Psicrófilos.	40
Figura 5. A) Colonias aisladas a partir de siembra por agotamiento. B) Codificación para siembra en la caja con AN de una colonia señalada.	41
Figura 6. A) Materiales usados para diluciones ajustadas (McFarland Turbidity Standard No. 0.5). B) Inoculación de microorganismos solubilizadores en medio que contiene fósforo.	43
Figura 7. Evaluación <i>in vitro</i> de solubilización con bacterias psicrófilas aislados de suelos de la Antártida.....	43
Figura 8. Conservación de bacterias psicrófilas LB+Glicerol.	44
Figura 9. A) Medio PVK + Fosfato tricálcico . B) Medio PVK + Roca fosfórica . C) Cambio de coloración de verde a amarillo, indicando un valor bajo de pH diferente a la inicial.	48
Figura 10. Formación de halos de solubilización; A: B7, B8; B: B15, B16; D: B37, B38; C: Halo de solubilización de fósforo por bacterias antárticas.....	50
Figura 11. Crecimiento de halo de solubilización de bacterias en pruebas <i>in vitro</i>	54
Figura 12. Amplicones ADN 16S obtenidos de los aislamientos, primera columna corresponde al marcador molecular 100 pb.....	55
Figura 13. Árbol filogenético de cepas psicrófilas aisladas pertenecientes de la Antártida.	58

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Coordenadas del sitio de muestreo en la Antártida.	36
Tabla 2. Compuestos en "gramos" para preparar PVK en ensayos de solubilización.	42
Tabla 3. (+) Indica que la bacteria es capaz de solubilizar fósforo , (-) no es capaz de solubilizar, aquellas cepas que no solubilizaron fueron: B1, B9, B10, B12, B14, B19, B40, B42, B44, B46 y B47.	49
Tabla 4. Evaluación de la calidad de ADN y pureza, producto de PCR.	56
Tabla 5. Aislados y sus cepas BLAST estrechamente relacionadas.	57
Tabla 6. Identificación molecular de microorganismos solubilizadores de Fosfato mediante secuenciación.....	59
Tabla 7. Formación de halos de solubilización con bacterias psicrófilas aislados de suelos de la Antártida.....	81
Tabla 8. Cálculos empleados con la fórmula de índice de solubilización, y medición del halo (mm).....	88
Tabla 9. Prueba de Tukey ($p > 0,05$) significancia estadística, para el análisis de cada cepa aislada.....	94
Tabla 10. Gráficas de validación de calidez a productos de PCR de bacterias psicrófilas antárticas aisladas.....	95

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Se reactivaron muestras de suelo que se encontraban en -20°C con medios LB para bacterias.....	78
Anexo 2. Reactivación de muestras de suelo en LB y Glicerol muestras en tiempos diferentes se encubo durante 10 días a -10°C en el equipo New Brunswick Innova® 44/44R - Stackable Incubator Shaker.	78
Anexo 3. Se colocó 50 µL de la dilución en medio de Agar nutritivo (AN) para bacterias. Las muestras se mantuvieron durante 7 días a -10°C (New Brunswick Innova® 44/44R - Stackable Incubator Shake).	79
Anexo 4. Siembra por Agotamiento y aislamiento de los microorganismos.....	79
Anexo 5. Preparación de medios específicos para aislar bacterias de las muestras provenientes de la Antártida.....	80
Anexo 6. Diluciones ajustadas o de concentración “Mc Farland” y evaluación de la capacidad solubilizadoras y valoración de su eficiencia de manera in vitro.....	80
Anexo 7. Primer ensayo donde se colocó 2µL para verificar la capacidad de solubilización de bacterias psicrófilas.	81
Anexo 8. Conservación de bacterias en LB+Glicerol y colocadas a -80°C para criopreservación hasta 3 años.	86
Anexo 9. PCR convencional para amplificar el gen ARNr 16S de bacterias psicrófilas antárticas.	86
Anexo 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% el proceso fue realizado en la cámara de electroforesis horizontal, y sus resultados fueron leídos en el Invitrogen™ Transiluminador de luz azul/blanca de LED doble.	87
Anexo 11. Evaluación y calidad de ADN con NanoDrop 2000 Thermo Scientific.	87

Anexo 12. Evidencia de secuenciación, Laboratorios de Investigación. UDLA.88

Anexo 13. Secuencias alineadas ‘Bacterias antárticas y secuencias obtenidas de la base de datos BLAST en el programa MEGA 11.88

Anexo 14. A) Análisis de varianza para medio con Fosfato tricálcico . B) Análisis de varianza para medio con Roca fosfórica.....93

Capítulo 1

1.1 Introducción

La Antártida es uno de los continentes de mayor interés para diversas investigaciones, esta zona presenta características singulares, entre ellas se resaltan las bajas temperaturas, que pueden ser inferiores a los -80°C , aún en sus condiciones extremas representan un hábitat en el cual se desarrollan comunidades microbianas con adaptaciones únicas en ambientes extremos (Orellana-Saez y cols., 2019). Existen microorganismos Psicrófilos que pueden prosperar en ambientes muy fríos desafiando nuestras nociones tradicionales de los límites de la vida, estas características son de interés para la biotecnología, la investigación astrobiológica y nuestra comprensión de la diversidad y más allá (Rawat y cols., 2020).

Los microorganismos solubilizadores exhiben una capacidad única para liberar nutrientes y minerales esenciales que se presentan inaccesibles que se originan de compuestos insolubles presentes en el suelo o en el entorno circundante (Aguilera, 2021). Esta capacidad radica en secretar una variedad de ácidos orgánicos, enzimas y otros metabolitos que ayudan a disolver y degradar sustancias que resistirían la disolución, esta interacción beneficia tanto a los microorganismos como a las plantas en un proceso simbiótico, aumentando el rendimiento de los cultivos (Kalayu, 2019). Algunas investigaciones permiten identificar los genes y enzimas implicados en la solubilización de nutrientes, lo que permite comprender cómo interactúan estas bacterias en su entorno y su aplicación en la agricultura y la biotecnología (McCullum y cols., 2019).

La deficiencia de fósforo es uno de los problemas que con lleva los suelos ácidos, es por ello, que se utiliza un número cada vez mayor de fertilizantes para satisfacer la gran demanda de este nutriente (Ateş, 2023).

Siendo elementos esenciales en la cadena de abastecimiento de nutrientes cruciales para la agricultura, desempeñan un rol fundamental en el aumento de la fertilidad del suelo y en el estímulo del desarrollo de las plantas, por lo tanto, se emplean como una fuente de fósforo en fertilizantes que resultan beneficiosos para los cultivos autóctonos del Ecuador (Ben Zineb y cols., 2019).

En el ámbito de la investigación científica, se analiza el aprovechamiento de microorganismos solubilizadores en la generación de productos agrícolas, esto puede tener implicaciones para la reducción de la contaminación ambiental y la administración sostenible de recursos naturales en el rendimiento de los cultivos, así mismo, podría disminuir gastos y asegurar el crecimiento de los cultivos, en consecuencia, el propósito de este estudio fue evaluar la capacidad *in vitro* de bacterias aisladas de suelos en las cercanías de la Isla Horseshoe, en la Antártida, para solubilizar Fosfato tricálcico y Roca fosfórica (Silva y cols., 2023).

1.2 El problema de investigación

1.2.1. Planteamiento del problema

El fósforo (*P*), es un macronutriente de mayor importancia en la agricultura, se caracteriza por ser el actor principal en procesos como la fotosíntesis, transferencia de energía, síntesis de material genético y el transporte de nutrientes en los cultivos, siendo un elemento muy reactivo en el suelo, es de difícil absorción para las plantas, esto se debe a su tendencia de formar compuestos insolubles con varios minerales e iones presentes, por lo que gran parte de la superficie agrícola mantiene un alto porcentaje de retención del mismo (Tang y cols., 2021).

Algunos estudios demuestran que más del 80% de productos aplicados al suelo que contienen este mineral crean diversos problemas, puesto que no se produce la absorción vegetal debido a fenómenos de fijación, precipitación y conversión a la forma orgánica, limitando el desarrollo de los cultivos (Penn y Camberato, 2019). El P está controlado por material parental y el clima, por lo que, del contenido total en el suelo solo pequeñas fracciones orgánicas solubles e inorgánicas son aprovechadas por las plantas durante el cultivo, la mayor parte del suelo está en formas insolubles como Fosfatos de calcio y Roca fosfórica (Liu y cols., 2019).

Cuando el nivel de fósforo en las plantas es igual o mayor al 0.2%, es posible que se observen deficiencias visibles, lo que resulta en la desaceleración de su crecimiento y desarrollo, las hojas maduras adquieren una tonalidad verde más intensa, se acumulan pigmentos en ellas, su tamaño disminuye y se vuelven más delgadas, lo que ralentiza su proceso de maduración, la función del fósforo dentro de la planta es esencial, desempeñando un papel crítico en todos los procesos metabólicos fundamentales, como hemos mencionado, su falta de absorción conlleva daños significativos para los cultivos. (Herrera Méndez, 2020).

1.2.2 Justificación

Evaluar la capacidad que mantienen los microorganismos Psicrófilos como estimuladores de solubilización de Fosfato en la rizosfera de plantas vasculares y no vasculares de zonas templadas resulta crucial en estudios sostenibles para la producción de cultivos nativos, al demostrar la actividad metabólica de los microorganismos nos permite descubrir nuevas técnicas de mejoramiento, aumentando el valor de eficacia para laboreo de zonas frías (Vargas-Barrante y cols., 2019).

La identificación microbiana de estas especies es importante para estudiar su interacción simbiótica el crecimiento vegetal y sus nutrientes necesarios, el potencial biotecnológico de estos microorganismos nos otorga información necesaria en cuanto a su uso en técnicas aplicadas que pueden ser eficaces en sus procesos, y la solubilización de P es uno de los temas más importantes que abarca estos microorganismos Psicrófilos (Kumari y cols., 2021a).

Se propone estudiar el efecto de solubilización en temperaturas bajas de microorganismos Psicrófilos provenientes de la Antártida la eficacia de las cepas aisladas, posterior a estos procesos se realizarán métodos moleculares para su identificación y conocer aquellas especies que posean las características de interés investigativo, los microorganismos Psicrófilos solubilizadores de fósforo tienen el potencial de promover la movilización del P en el sustrato, la acidificación y quitamiento de aniones orgánicos ácidos, extendiendo el alcance del sistema de raíces aumentando el acceso a los nutrientes, de manera que incrementa el crecimiento de plantas en zonas templadas (Adhikari y cols., 2021).

Cabe mencionar que el estudio radica en identificar nuevas especies solubilizadoras de Fosfato provenientes de la Antártida, con el objeto de generar un producto derivado de estos microorganismos ya sea con mejores características, gen o metabolitos de interés para diferentes líneas de investigación que beneficie a cultivos nativos del Ecuador en zonas templadas, para ello,

se validará mediante pruebas de solubilización que nos confirmé el potencial de estos microorganismos Psicrófilos (Soumare y cols., 2021).

1.2.3 Delimitaciones

Existe una gran diversidad microbiana en la Antártida, las condiciones extremas dan lugar a una gran oportunidad para realizar investigaciones científicas brindando información significativa en el desarrollo de productos de interés en agricultura tropical, no obstante, resulta complejo que en un solo estudio se puedan identificar variedades de especies que habitan en el ecosistema antártico (Ortiz y cols., 2021).

Para el estudio de microorganismos solubilizadores se muestrearon las zonas de interés con características específicas, como es de nuestro conocimiento este continente se encuentra en la décima parte de la superficie de la tierra, por lo que es lógico elegir una zona de estudio , aunque en estos espacios habiten un sin número de microorganismos, por el tiempo de investigación que se reduce a tres meses, es posible solo la evaluación de biodiversidad bacteriana, aplicando técnicas adecuadas para su aislamiento e identificación (Ji y cols., 2022). Por el tiempo estimado, nos delimitamos a evaluar colonias de hongos, dado que su aislamiento resulta un poco crítico, se deben aplicar técnicas adecuadas en un tiempo determinado para obtener resultados positivos, el mayor problema dentro del aislamiento de hongos se basa en bacterias resistentes a antibióticos, varios estudios demuestran que dentro de la diversidad microbiana en la Antártida existen estos microorganismos por lo que su análisis debe ser constante y de mayor tiempo (Marcoleta y cols., 2022).

1.2.4 Pregunta de investigación

¿Las bacterias aisladas de suelos de la Antártida provenientes de la Horseshoe Island cultivadas en condiciones controladas inciden en la solubilización de Fosfato tricálcico y Roca fosfórica ?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad *in vitro* de bacterias aisladas de suelos de la Antártida procedentes de las inmediaciones de la Horseshoe Island capaces de solubilizar fósforo (Fosfato tricálcico y Roca fosfórica).

1.3.2 Objetivos específicos

- ✓ Aislar bacterias psicrófilas cultivables en medios de específicos.
- ✓ Caracterizar mediante técnicas moleculares, *PCR convencional*, *electroforesis con gel de agarosa 1.5 %* y *secuenciación ADNr 16s*, las bacterias cultivables asociadas a suelos de la Antártida.
- ✓ Evaluar de manera cualitativa el potencial de las bacterias psicrófilas capaces de solubilizar fósforo (Fosfato tricálcico y Roca fosfórica) en condiciones controladas de laboratorio.

1.4 Formulación de la hipótesis

H₀: Las bacterias aisladas de suelos de la Antártida de la Horseshoe Island no son capaces en condiciones de laboratorio de solubilizar Fosfato tricálcico y Roca fosfórica .

H₁: Las bacterias aisladas de suelos de la Antártida de la Horseshoe Island son capaces en condiciones de laboratorio de solubilizar Fosfato tricálcico y Roca fosfórica .

Capítulo 2

2.1 Fundamentación teórica

La solubilización de fósforo es muy difundida en el mundo, investigaciones sobre sus procesos nos dan bases biológicas para desarrollar biotecnologías sostenibles para nutrir los cultivos, este nutriente se convierte en un compuesto necesario para la agricultura, el problema se basa en cuando este no se solubiliza en la rizosfera, llevando de la mano graves repercusiones en los niveles de productividad, para resolver esta condición se han empleado métodos de síntesis química en fertilizantes o energéticos, no obstante, estas técnicas aplicadas mantienen una baja eficiencia (Elhaisoufi y cols., 2022)

Los microorganismos que promueven la solubilización del fósforo son responsables de impulsar el ciclo del fósforo mediante los procesos de mineralización, inmovilización y solubilización, estos procesos están vinculados a su metabolismo nutricional, es relevante señalar que no solo aumentan la solubilidad del fósforo, sino que también representan una valiosa reserva de fósforo en el suelo (Kour y cols., 2021).

Estudios relacionados a estos procesos aportan en la agricultura no solo de la Costa, más bien en zonas templadas “Sierra”, dado que hemos extendido nuestra investigación en microorganismos Psicrófilos solubilizadores de Fosfato extraídos de la Antártida, el proyecto investigativo pretende brindar información importante sobre aquellos capaces de solubilizar el P en la rizosfera de plantas no vasculares, promoviendo la mejora de cultivos en plantas nativas (López y Bacilio, 2020).

Existen diversos estudios mencionando la importancia de estos microorganismos, la solubilización del fósforo etc., pero no muestran información reciente de estos procesos aplicados en zonas templadas, dejando a un lado la agricultura en este tipo climas que posee una gran

diversidad de especies importantes para investigaciones generales y sus usos (López y Bacilio, 2020).

2.2 Mecanismo de microorganismos solubilizadores

2.2.1 Microbiota Antártica y adaptación a condiciones extremas

2.2.2 Biodiversidad microbiana

La variedad de microorganismos que habitan en la Antártida incluye bacterias, hongos, algas y otros que se caracterizan por soportar ambientes diversos con una alta resistencia al clima extremo de esta zona, existen diferentes investigaciones que permiten centrarse en la identificación y caracterización de estas especies (Shintani y cols., 2021).

Toda la vida en la Antártida está expuesta a condiciones extremas que afectan la evolución y adaptación de diferentes especies, esto da como resultado un ecosistema con una diversidad de especies reducida y una estructura trófica simplificada, sin embargo, existen argumentaciones que la menor biodiversidad y las adaptaciones específicas de las especies se explican mejor por la imprevisibilidad del clima antártico que por su severidad, existen argumentaciones que la menor biodiversidad y las adaptaciones específicas de las especies se explican mejor por la imprevisibilidad del clima antártico que por su severidad (Doytchinov y Dimov, 2022).

2.2.3 Microorganismo Psicrófilos

Tienen una temperatura de crecimiento de menos de 0 °C y una temperatura máxima de alrededor de 20 °C, otros investigadores han especificado otros valores de temperatura, para este grupo, con una temperatura máxima de crecimiento de unos 15 °C o menos (Kumari y cols., 2021).

En la gran mayoría de los ambientes terrestres, los Psicrófilos y las comunidades microbianas son actores biogeoquímicos importantes, se encuentran presentes en numerosas características

moleculares que permiten la funcionalidad a bajas temperaturas y son filogenéticamente diversas (Junge y cols., 2019).

Las bacterias Gram negativas de los géneros *Moraxella*, *Molitella*, *Pararomonas*, *Polaribacter*, *Pseudoaltheromonas*, *Pseudomonas*, *Cyclobacter*, *Cycloflexus*, *Vibrio* y *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, entre otros el género, y algunas bacterias Gram positivas del género *Planococcus*, constituyen parte del género de bacterias Psicrófilos existentes (Amarelle Larrosa y cols., 2021).

2.3 Fosfato tricálcico

La presencia de cantidades significativas de fósforo es esencial para todos los organismos vivos, se trata de un componente indispensable para nuestro funcionamiento biológico, por ejemplo, el fósforo desempeña un rol esencial en los ácidos nucleicos y en las membranas de todas las formas de vida, además de tener una función crucial en los procesos metabólicos energéticos (Naranjo Torres, 2019).

En el contexto de las plantas, el fósforo inorgánico o sus derivados orgánicos actúan como catalizadores para los procesos bioquímicos esenciales de la fotosíntesis y la respiración, este elemento se obtiene a partir de la reacción entre la Roca fosfórica y un ácido (como el sulfúrico o el clorhídrico), neutralizándose luego con carbonato de calcio, de esta manera, se convierte en uno de los nutrientes primordiales para el desarrollo de las plantas (Souto, 2020).

Involucrándose en varios procesos como en la transferencia de energía formando parte de compuestos que son conocidos como ATP, ADP, ADM, siendo la fuente de varias reacciones que ocurren en la naturaleza, se asocia en la división celular y al transporte de nutrientes que son parte de su factor de crecimiento siendo necesaria la formación de aminoácidos, proteínas, enzimas, etc., utilizándose en cantidades adecuadas para una mayor proporción de proteína en granos, por otra parte, la disposición de calcio mejora la absorción de nutrientes (Chauhan y cols., 2017).

2.4 Roca fosfórica

Es una roca sedimentada que contiene grandes cantidades de minerales de Fosfato en forma de fluorapatita, siendo un fertilizante fosfatado simple extraído de sedimentos que contienen fósforo en forma de Fosfato tricálcico (Vadivel y cols., 2021). Durante los últimos años el uso de RF se ha llevado la atención de América Latina dando resultado positivo en la agricultura (Beltrán y cols., 2019).

Durante los últimos años el uso de RF se ha llevado la atención de América Latina dando resultado positivo en la agricultura, parece ser una alternativa interesante para aumentar el contenido de fósforo del suelo y complementar el uso anual de fertilizantes solubles (Beltrán y cols., 2019).

2.5 Solubilización de Fosfato

Los microorganismos solubilizadores tienen la capacidad de liberar Fosfato a partir de formas insolubles, como la Roca fosfórica, estos microorganismos producen ácidos orgánicos y enzimas que descomponen el Fosfato y lo convierten en compuestos solubles (Gálvez Córdova, 2022). La disolución de ácidos orgánicos producidos por microorganismos ayuda a bajar el pH del ambiente y facilita la disolución del Fosfato en las Rocas, la eliminación de Fosfato de las Rocas incrementa la disponibilidad de fósforo para los vegetales, lo que resulta en un mejor crecimiento y desarrollo (Beltrán-Morales y cols., 2019).

2.4 Bioactivos solubilizadores presentes en microorganismos Psicrófilos

2.4.1 Adaptación a bajas temperaturas

Explicación de las estrategias y los mecanismos utilizados por los microorganismos clorofílicos para sobrevivir y prosperar en el frío extremo, incluidas las membranas celulares, las proteínas y la termorregulación (Wei y cols., 2016).

2.4.2 Compuestos bioactivos

Es cualquier sustancia que contiene actividad biológica que puede causar efectos positivos o negativos, la liberación estos bioactivos permiten que el cultivo obtenga vitaminas, hormonas y enzimas que van a potenciar el crecimiento en los cultivos (Ahangari y cols., 2021). Las propiedades biológicas únicas de estos compuestos, funciona como potencial bioquímico para la aplicación en diferentes investigaciones (Cechinel-Zanchett y cols., 2021).

2.4.3 Solubilizadores bioactivos

Describe las enzimas bioactivas y los compuestos secretados por microorganismos Psicrófilos que pueden solubilizar nutrientes y compuestos en su entorno (Yadav y cols., 2019). Estos bioactivos solubles, donde las enzimas termoestables pueden ser muy útiles para el uso de técnicas utilizadas para el aislamiento, cultivo y caracterización de microorganismos Psicrófilos, así como la identificación y purificación de enzimas y compuestos activos biológicos (Barrera, 2022).

2.5 Microorganismos de la Antártida aplicados en la agricultura

2.5.1 Biodiversidad antártica

En la Antártida, donde las condiciones extremas han llevado a la evolución de microorganismos únicos con adaptaciones especiales, que han desarrollado mecanismos de adaptación para sobrevivir en ambientes fríos y hostiles, como la producción de enzimas y compuestos protectores teniendo potencial en agricultura siendo promotores del crecimiento vegetal, biofertilizantes y agentes de control biológico, gracias a su capacidad para mejorar la dilución de nutrientes, la fijación al estrés y la protección contra patógenos (Papale y cols., 2023). La interacción describe cómo los microorganismos antárticos pueden establecer relaciones simbióticas con las plantas, como la fijación de nitrógeno, que mejora la productividad de los cultivos (Edwards y cols., 2020).

2.5.2 Bioestimulación

Los microorganismos provenientes de la Antártida pueden ser empleados como agentes bioestimulantes con el propósito de potenciar el desarrollo de las plantas y fortalecer su capacidad de enfrentar condiciones desfavorables, los compuestos bioactivos que poseen tienen la capacidad de activar rutas metabólicas que mejoran la absorción de nutrientes y la resistencia al estrés en las plantas (Augelletti y cols., 2020).

2.5.3 Control biológico

Algunos microorganismos antárticos pueden tener propiedades antibacterianas y antifúngicas. Se pueden usar en agricultura como representante de control biológico para reducir el uso de pesticidas químicos (Adamiak y cols., 2021).

Los microorganismos antárticos han desarrollado enzimas y proteínas que les permiten sobrevivir en ambientes salados y secos. La investigación actual está investigando cómo se pueden transferir estos genes a los vegetales para potenciar su permisividad a la sal y la sequía (Hamdan, 2018). Algunos microorganismos antárticos pueden fijar nitrógeno atmosférico, lo que puede contribuir a la fertilidad del suelo en áreas agrícolas degradadas (Wu y cols., 2020).

2.5.4 Métodos de aplicación

Aplicar los microorganismos antárticos en la agricultura, tales como la inoculación de semillas, la incorporación al suelo y la producción de productos biotecnológicos, así como las posibles áreas de desarrollo futuro en la aplicación de microorganismos antárticos a la agricultura, incluidas las pruebas de campo, la optimización de cepas y las técnicas de fabricación (Giovanella y cols., 2020).

2.6 Aplicaciones biotecnológicas en la agricultura de microorganismos solubilizadores

2.6.1 Microorganismos solubilizadores

Tienen la capacidad de liberar nutrientes que por lo general se encuentran insolubles en el suelo, los cuales en ocasiones se transforman en compuestos inaccesibles para las plantas, esto lo logran mediante la producción de ácidos orgánicos y enzimas degradantes, a través de este proceso, suministran los nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo de las plantas, incluyendo nutrientes esenciales como el fósforo, que suele existir en forma insoluble en el suelo de manera común (Hamdan, 2018).

2.6.2 Beneficios agrícolas

En cuanto a los beneficios agrícolas, el aumento de la capacidad de las plantas para absorber nutrientes mejora la productividad de los cultivos al reducir la necesidad de fertilizantes químicos y al mismo tiempo aumentar la sostenibilidad, dado que existen grupos de microorganismos solubilizadores, como bacterias y hongos, capaces de disolver estos minerales estimulando el crecimiento, su aplicación tiene un amplio alcance y diversas aplicaciones en la agricultura (Rana y cols., 2019).

La aplicación de estos microorganismos solubilizadores puede realizarse mediante la inoculación en el suelo, la producción de biofertilizantes o su incorporación en sistemas de manejo de cultivos (Kour y cols., 2020). Al considerar su utilización y reconocer su efecto positivo en la reducción de la lixiviación de nutrientes y la contaminación del agua, se reduce la dependencia de fertilizantes químicos, lo que a largo plazo puede impactar de manera positiva en el ecosistema (Rana y cols., 2019b).

2.7 Técnicas moleculares para identificación de microorganismos de interés

Las técnicas tradicionales para identificar organismos involucran la comparación de características morfológicas, fisiológicas o bioquímicas, sin embargo, existen técnicas alternativas que resultan más específicas, como las técnicas moleculares las cuales analizan las secuencias de genes permitiendo conocer la identidad de los organismos o la presencia de secuencias específicas (Matthijs y cols., 2016).

2.7.1 Secuenciación de Sanger

Es una técnica pionera que determina secuencias de ADN, se basa en la síntesis de cadenas de ADN complementarias utilizando didesoxinucleótidos marcados con fluorescencia y cómo se obtienen lecturas de longitud variable que representan la secuencia del fragmento de ADN original (Arteche-López y cols., 2021).

2.7.1.1 Ciclo de secuenciación

El ciclo de secuenciación de Sanger, incluida la desnaturalización del ADN, la síntesis de cadenas complementarias, la detección de bases de nucleótidos y la generación de lectura, es utilizada para ensamblar la secuencia completa describiendo cómo separar las lecturas de secuenciación de Sanger en función del tamaño mediante electroforesis capilar, que puede determinar el orden de las bases de nucleótidos (Fida y cols., 2021).

2.7.1.2 Aplicaciones de la secuenciación de Sanger

La secuenciación de Sanger permite realizar análisis en diferentes áreas incluyendo secuenciación de genes, diagnóstico de enfermedades hereditarias, genotipado y caracterización de muestras biológicas, brindando resultados con precisión, confiabilidad y limitaciones a una velocidad de lectura en comparación con otras tecnologías (Villegas Castagnasso y cols., 2021).

Permite el análisis simultáneo de secuencias múltiples y la generación de datos más grandes en una sola experimentación, así como las técnicas básicas de identificación convencional, la secuenciación de Sanger ha impactado la investigación en genética, microbiología, taxonomía y otras áreas de la biología (Gomes y Korf, 2018).

Proporciona una comprensión integral de las técnicas de identificación convencionales, destacando su importancia histórica y su contribución al avance de la biología molecular y la investigación científica (Zhang y cols., 2014).

2.7.2 PCR

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por sus siglas en inglés, es una herramienta sensible y valiosa para obtener múltiples copias de una secuencia de ADN específica a partir de una muestra de ADN compleja que exhibe diversidad y variabilidad de secuencia, este procedimiento, conocido como amplificación de ADN, implica el uso de la enzima Taq polimerasa, una variante empleada en estos métodos, que proporciona pautas para asegurar el éxito de la PCR (Pekosz y cols., 2021).

2.7.3 PCR convencional

Es un método de laboratorio común permite replicar segmentos particulares de ADN a través de la amplificación mediante electroforesis de ADN. El objetivo principal de la PCR es generar suficiente ADN de una región de interés para su posterior análisis o uso. Por ejemplo, se puede secuenciar el ADN amplificado por PCR, visualizarlo utilizando electroforesis en gel o clonarlo en plásmidos para experimentos adicionales (Feng y Zhu, 2019). Diversos campos de la biología, como la investigación de biología molecular, el diagnóstico médico e incluso ciertos aspectos de la ecología, se benefician de su aplicación. Los componentes esenciales de las reacciones de PCR

incluyen la polimerasa Taq, los cebadores, el ADN molde y los nucleótidos (Montalvo Navarro y Lugo Flores, 2019).

2.7.4 Electroforesis

La electroforesis en gel es una técnica que emplea una corriente eléctrica para dirigir fragmentos de ADN a través de una matriz de gel, permitiendo su separación basada en su tamaño. Con frecuencia, se utilizan patrones o marcadores de peso molecular para determinar las dimensiones de los fragmentos presentes en las muestras de PCR (Paz y cols., 2023).

Cuando el gel es teñido con un colorante que se adhiere al ADN, los fragmentos de igual longitud forman una "banda" en el gel, en contraste con contener una o unas pocas copias de la región de ADN de interés, estas bandas de ADN engloban numerosas copias, debido al tamaño minúsculo del ADN, se requieren múltiples copias para que se vuelva visible (Montalvo Navarro y Lugo Flores, 2019).

2.7.5 Secuenciación con NanoDrop

Se utiliza para medir y evaluar la concentración de ácidos nucleicos como ADN y ARN, así como proteínas en una muestra biológica, el espectrofotómetro NanoDrop mide la absorción de la muestra de luz ultravioleta y visible (Cumpa Velásquez, 2021). Esto permite evaluar la pureza utilizando la relación de absorbancia a diferentes longitudes de onda y determinar la concentración de ADN o ARN en la muestra. Sin embargo, no se usa para secuenciar el ADN en términos de obtener la secuencia de bases (Esfandani-Bozchaloyi y cols., 2019).

2.7.6 Construcción de árbol filogenético

La construcción de árboles filogenéticos es una técnica importante en biología evolutiva y genética para caracterizar las relaciones evolutivas entre especies y taxones basándose en el hecho

de que todas las especies comparten un ancestro común y han evolucionado a partir de diferentes especies a lo largo del tiempo (Hu y cols., 2020). La concepción filogenética para la elaboración de árboles incorpora numerosos conceptos y enfoques que pueden modelar la trayectoria evolutiva de las especies, a medida que los organismos experimentan cambios a lo largo del tiempo debido a la selección natural y otros elementos, surgen nuevas especies a partir de las diversas formas en que los individuos se diferencian y evolucionan, generando variabilidad (Bhattacharjee y Bayzid, 2020).

2.7.6.1 Técnicas de reconstrucción de árboles

Existen varias técnicas para construir árboles filogenéticos, como máxima consistencia y mínimo espaciado, la máxima verosimilitud es encontrar el valor que maximiza la probabilidad de observar una secuencia, teniendo en cuenta la evolución (Doadrio Villarejo, 2019).

La evolución mínima busca el árbol con la menor cantidad de cambios necesarios para explicar los cambios observados, estos modelos tienen en cuenta mutaciones, cambios de nucleótidos, eligiendo el método correcto es muy importante para obtener los resultados específicos (Escudero Leyva y cols., 2020).

Los árboles filogenéticos deben validarse y compararse con datos conocidos para garantizar la consistencia y la confiabilidad, esto puede implicar usar un método de fabricación diferente y verificar que los resultados sean los mismos, para construir árboles filogenéticos se deben tomar en cuenta conceptos de biología evolutiva, genética molecular y análisis matemático, los árboles no son solo una instantánea de la historia evolutiva, sino también una herramienta importante para comprender la biodiversidad y las relaciones entre las especies (Alcántara y cols., 2022).

Capítulo 3

3.1 Marco metodológico

3.1.1 Metodología/Propuesta de desarrollo

3.1.2 Diseño experimental

Al ser una investigación en condiciones controladas se utilizó el diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones.

3.1.3 Ubicación de estudio

Zona de muestreo, suelos pertenecientes de la Antártida ‘‘Horseshoe Island’’. CIBE muestreó 2 lugares diferentes monitoreando 4 puntos con dos muestras por cada uno ‘‘A, B, C, D’’ de suelos pertenecientes de la Antártida, de las cuáles para nuestro estudio procesamos muestras ‘‘A’’.

Recolección de muestras ‘‘*in situ*’’, coordenadas:

Tabla 1. Coordenadas del sitio de muestreo en la Antártida.

Punto	Muestra	Latitud	Longitud	Fecha de colecta
1	4	67°49'51.9''	67°14'05.0''	12/02/2023

Se recolectaron muestras de suelo y rizosfera de plantas no vasculares, que se rotularon y transportaron en refrigeración a -20°C para su análisis.

Una gran variedad de bacterias nativas se encuentra en la Antártida, por lo que se tomó este lugar como fuente de estudios, INOCAR (Instituto Oceanográfico de la Armada) en conjunto con el laboratorio CIBE perteneciente de la ESPOL, extrajeron microorganismos para su evaluación e identificación (Figura 1).

Figura 1: Punto de muestreo para aislamiento de microorganismos Psicrófilos.

Elaborado por: (Baque y Vargas, 2023).

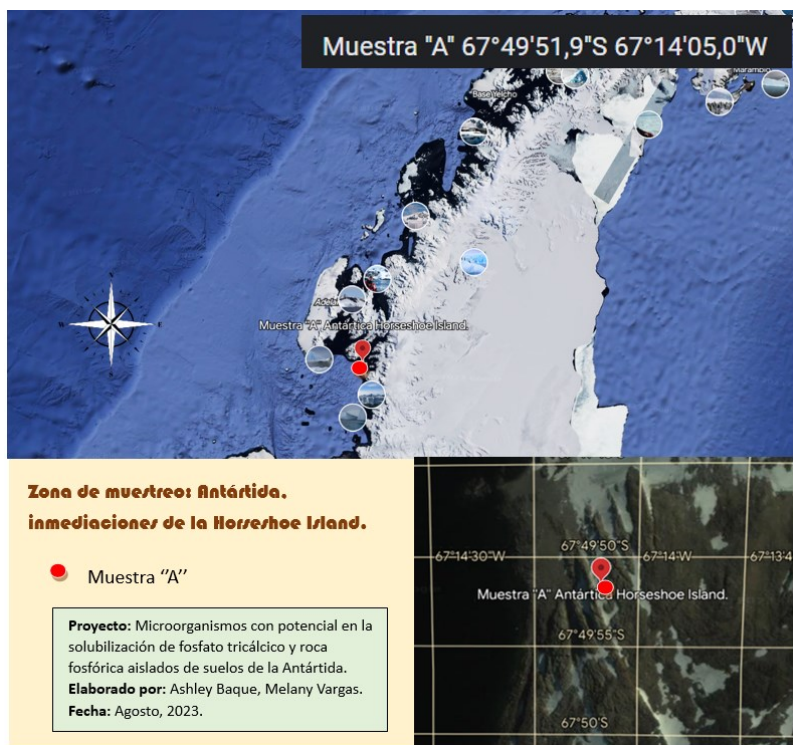


Figura 1. El gráfico demuestra ubicación exacta de muestreo: Antártida "Horseshoe Island", en dónde se monitorearon 2 puntos para Muestra "A", y se recolectó 4 muestras de suelo asociado a la rizosfera.

3.1.4 Variables de investigación

Variable Independiente: Diversidad Bacteriana aisladas de la Antártida ‘Horseshoe Island’.

Variable Dependiente: Capacidad de bacterias identificadas para solubilizar fósforo.

3.2 Procedimiento

3.2.1 Aislamiento de poblaciones microbianas con capacidad solubilizadoras que se encuentran en la rizosfera.

3.2.1.1 Procesar muestras de la Antártida

Las muestras conservadas en -20°C se reactivaron previo al inicio de las actividades en una *Cabina de Flujo Laminar Horizontal con Luz UV – Clean Bench Purifier* (Anexo 1), se utilizó medios líquidos Luria Bertani (LB) 25g/L para bacterias (Boinovich y cols., 2019).

Reactivamos muestras “A1A, A2A, A1B, A2B” en tiempos diferentes, 9 mL del caldo de cultivo y 1g de la muestra del suelo para cada tubo vial (Boinovich y cols., 2019). De manera que queden 1 tubo para cada muestra procesada, incubamos durante 10 días a -10°C en el equipo *New Brunswick Innova® 44/44R - Stackable Incubator Shaker* (Anexo 2), para obtener crecimiento de bacterias (Figura 2).

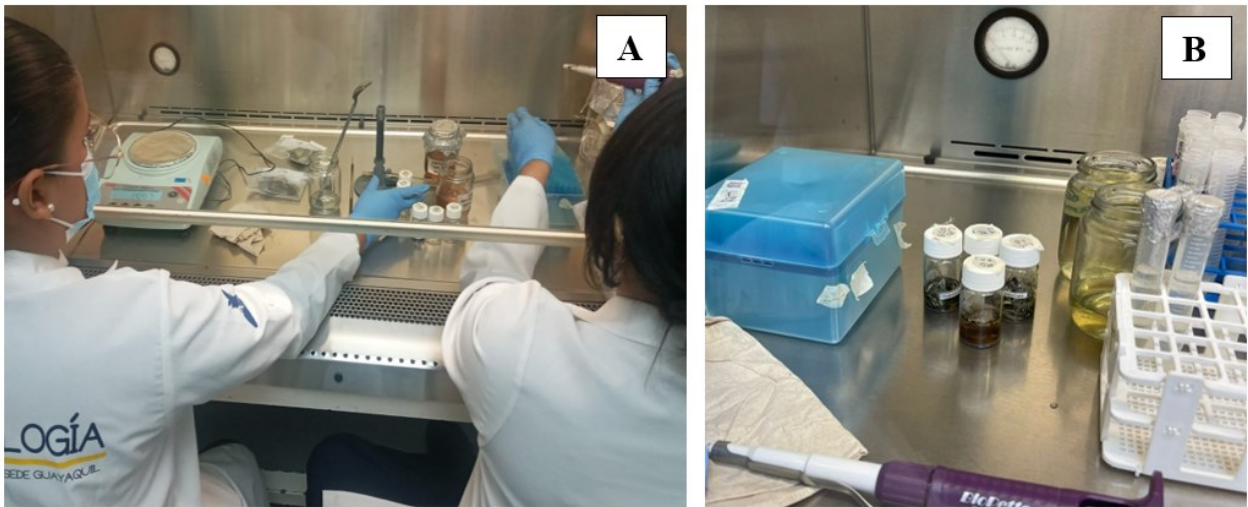


Figura 2. A) Siembra de muestras en medio LB para obtención de bacterias y material utilizado.

B) Tubos viales procesados que contienen 1g y 9 mL del caldo de cultivo LB.

3.2.1.2. Análisis de la microflora de la rizosfera antártica.

Diluciones seriadas

En una *Cabina de Flujo Laminar Horizontal con Luz UV – Clean Bench Purifier*, se procedió a aislar microorganismos de la rizosfera realizamos diluciones seriadas hasta 10^{-4} (Figura 3), la muestra madre 1mL se toma del caldo de cultivo preparado con anterioridad, de manera que se obtengan colonias aisladas (Chen y cols., 2020). Se colocó 50 μ L de la dilución en medio de Agar nutritivo (AN) para bacterias (Anexo 3). Las muestras se mantuvieron durante 7 días a -10°C (*New Brunswick Innova® 44/44R - Stackable Incubator Shake*) esperando el crecimiento de microorganismos Psicrófilos que posean rasgos diferentes y a su vez señalar aquellas colonias que se consideren para aislar (Figura 4).

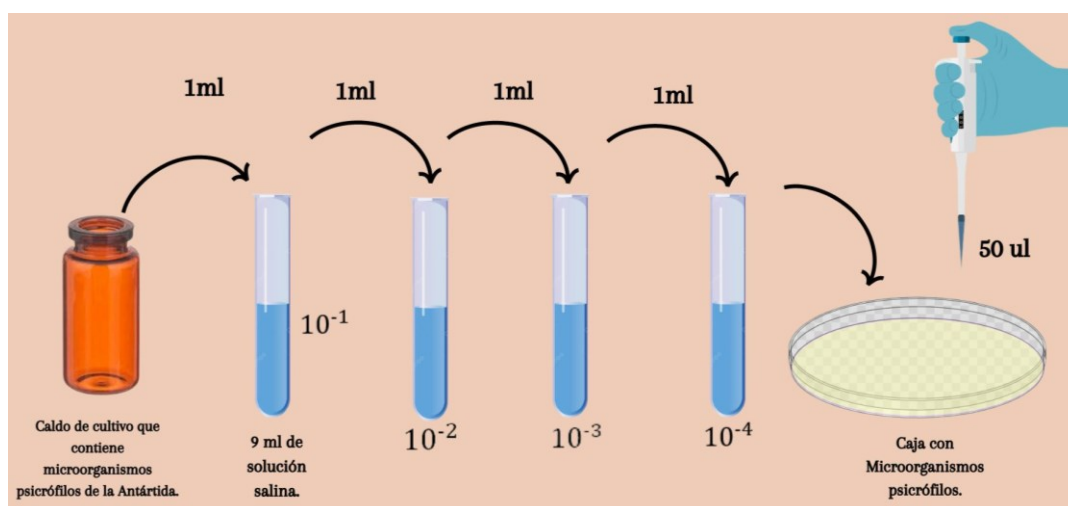


Figura 3. Dilución seriada para el aislamiento de microorganismos Psicrófilos de la Antártida.

Elaborado por: (Baque y Vargas, 2023).

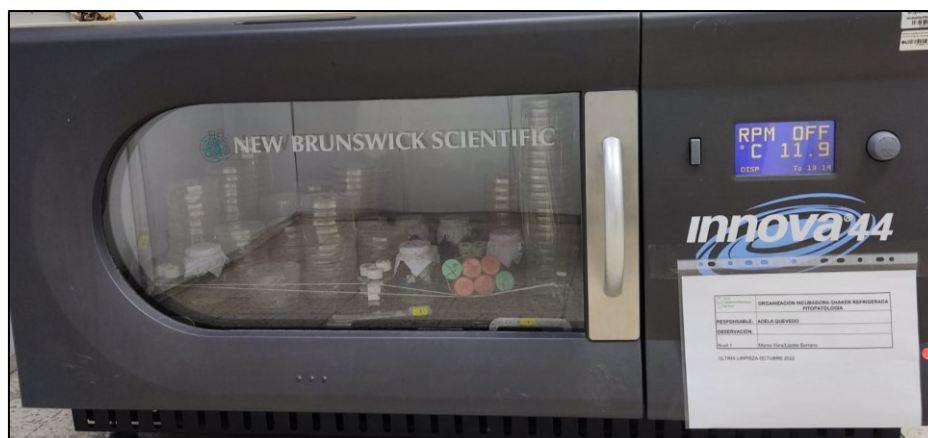


Figura 4. Incubadora: New Brunswick Innova® 44/44R - Stackable Incubator Shake, en temperatura -10°C específica para crecimiento de microorganismo Psicrófilos.

3.2.1.3 Siembra por agotamiento y aislamiento de los microorganismos

Una vez obtenido el crecimiento 10^{-4} de las cajas plaqueadas, aislamos los microorganismos de las colonias que se señalaron para sembrar en una *Cabina de Flujo Laminar Horizontal con Luz UV – Clean Bench Purifier*, y sembramos en estría por agotamiento (Figura 5A), siendo indispensable para aislar colonias que se encuentren en el medio (Castillo y cols., 2021). Señalamos aquellas colonias con mejor características en cada caja (Anexo 4), con medidas de esterilización sembramos en AN con el fin de aislar una cepa específica e incubamos durante 5 días a -10°C (*New Brunswick Innova® 44/44R - Stackable Incubator Shake*) hasta su crecimiento (Castillo y cols., 2021).

Realizamos la inoculación de la colonia más aislada de bacterias, numeramos la caja con AN, de manera que aislamos 4 a 5 cepas por separado en 1 caja (Figura 5B), para este procedimiento es importante la codificación de cada cepa, por lo que rotulamos la caja con el código de cada una (Anexo 5), incubamos por 5 días a -10°C (*New Brunswick Innova® 44/44R - Stackable Incubator Shake*) (Castillo y cols., 2021).

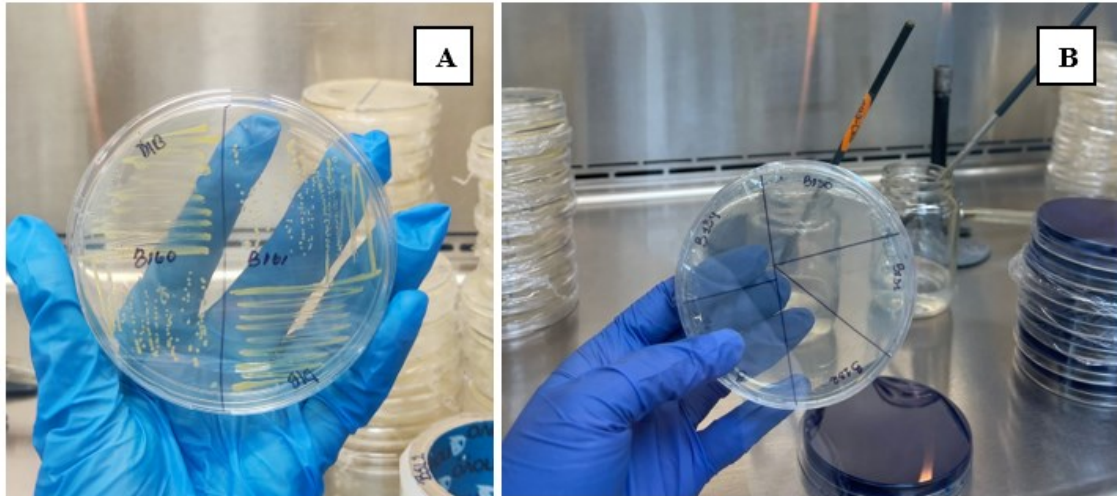


Figura 5. A) Colonias aisladas a partir de siembra por agotamiento. B) Codificación para siembra en la caja con AN de una colonia señalada.

3.2.2 Preparación de medios específicos para aislar bacterias de las muestras provenientes de la Antártida

Para la preparación de medios específicos utilizamos Agar Pikovskaya's, puesto que se utiliza para la detección de microorganismos del suelo que solubilizan Fosfatos, se ha planteado los reactivos para la preparación de 500ml (mililitros) del medio PVK que contiene Fosfato tricálcico y medio ROCA que contiene Roca fosfórica (Anexo 5):

Tabla 2. Compuestos en "gramos" para preparar PVK en ensayos de solubilización.

Reactivos usados	Medio PVK + Ca3 (g)	Medio PVK + Roca F(g)
GLUCOSA	5	5
CA3	2.5	-
(NH4)2SO4	0.25	0.25
NACL	0.1	0.1
MGSO4 + H2O	0.05	0.05
KCL	0.1	0.1
ROCA FOSFÓRICA	-	2.5
MNSO4 + H2O	0.001	0.001
FESO4 + H2O	0.001	0.001
EXTRACTO DE LEVADURA	0.25	0.25
AGAR PVK	7.5	7.5
COLORANTE	0.2	0.2

El medio se dispensó en una *Cámara flujo laminar vertical esco airstream® gen 3, modelo lvg*, con medidas estériles adecuadas para evitar contaminación.

3.2.3 Diluciones ajustadas o de concentración ‘‘Mc Farland’’ y evaluación de la capacidad solubilizadoras y valoración de su eficiencia de manera *in vitro*.

Luego de lograr aislar las cepas de estudio realizamos diluciones ajustadas con el fin de determinar la concentración en que la bacteria solubiliza Fosfato tricálcico y Roca fosfórica , para ello utilizamos el equipo *McFarland Turbidity Standard No. 0.5* el cual indica el patrón de turbidez correspondiente de una suspensión homogénea colocada en tubos estériles la cual contiene solución salina y la bacteria inoculada (Anexo 6), es indispensable que el rango este en un 0.5 siendo la norma adecuada en preparación de inóculos (García-Pedroza y cols., 2022).

Cuando mantenemos el rango específico tomamos 2 μL de cada tubo con técnicas de esterilización adecuadas en una cámara de flujo (Figura 6) y colocamos en 3 medios por duplicado (Anexo 7): AN para control de colonias, PVK + CO_3 y PVK + Roca fosfórica, e incubamos durante 10 días a -10°C para obtener crecimiento (Anexo 7.1), previo al proceso evaluamos la presencia y medida de halos de solubilización alrededor de la colonia (Figura 7).

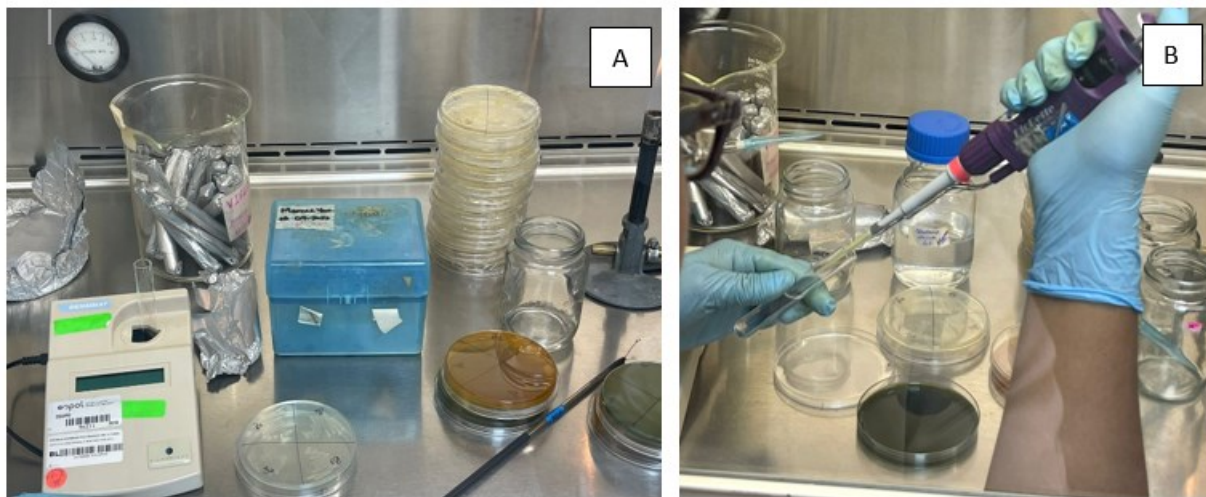


Figura 6. A) Materiales usados para diluciones ajustadas (McFarland Turbidity Standard No. 0.5).
B) Inoculación de microorganismos solubilizadores en medio que contiene fósforo.

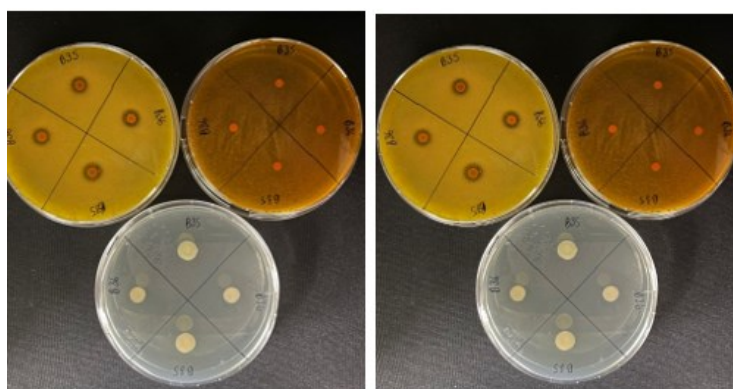


Figura 7. Evaluación *in vitro* de solubilización con bacterias psicrófilas aislados de suelos de la Antártida.

3.2.3.1 Ecuación de índice de solubilización

El índice de solubilización de fósforo de los aislados se determinó mediante la ecuación (Kiprotich y cols., 2023):

$$\text{Eficiencia de solubilización} = \frac{\text{Diámetro de la colonia (mm)} + \text{Diámetro del halo (mm)}}{\text{Diámetro de la colonia (mm)}}$$

3.2.4 Conservación de las muestras de bacterias en medio LB+Glicerol

Dentro del proceso de conservación de microorganismos realizamos técnicas adecuadas y estériles en una *Cabina de Flujo Laminar Horizontal con Luz UV – Clean Bench Purifier* (Anexo 8), tomamos muestra de las cepas aisladas que se encuentran en AN, inoculamos en un microtubo de 600 mL que contiene LB + Glicerol (Figura 7), suspendemos para que la muestra quede homogénea y llevamos a refrigeración a -20°C, luego la llevamos a criogenizar a -80°C para su conservación (Fadanka y cols., 2022).

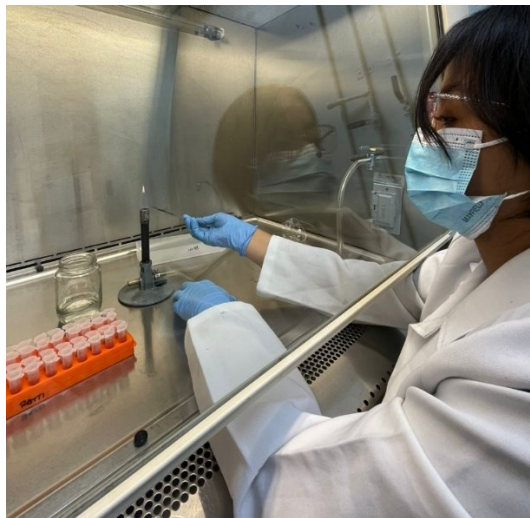


Figura 8. Conservación de bacterias psicrófilas LB+Glicerol.

3.2.5 Identificación molecular y análisis de secuencias ADNr 16S.

3.2.5.1 Extracción de ADN

Preparamos NaOH 20 mM con agua desionizada, una vez lista se filtra o autoclava para mayor uniformidad, colocamos 20 μ L en microtubos de 600 mL y enumeramos los tubos con la codificación correspondiente de cada bacteria, con ayuda de una punta tomamos un poco de bacteria y colocamos dentro del tubo, disolvemos con ayuda de la misma punta o en un vortex, llevamos al microondas por 3 veces por 30 segundos y conservamos a -20°C , para llevar a PCR o conservar la extracción durante 6 meses (Wang y cols., 2020).

3.2.5.2 Amplificación con termociclador PCR convencional

Para identificar los componentes bacterianos de microorganismos solubilizadores de Fosfato, se amplificó un fragmento de ADN de la región codificante para el ARNr de la subunidad pequeña del ribosoma (16S ADNr) (Özdoğan y cols., 2022).

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 25 μ L conteniendo 1 μ l de los cebadores PF 27F y PR 1492R, 12,5 μ L de Dream Taq , 10,5 μ L de H₂O destilada estéril, 1 μ L de ADN (50 ng μ L⁻¹) (Anexo 9). En todas las reacciones se incluyó 2 controles y 1 positivo (Özdoğan y cols., 2022).

La amplificación se realizó en un termociclador *AirClean 600 PCR Workstation – AirClean Systems*, con un programa que consistió en una desnaturalización inicial a 96°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 96°C por 1 min, 55°C (para 16S) por 1 min, 72°C por 1 min; y una extensión final a 72°C por 3 min, con un total 2h 22 min (Özdoğan y cols., 2022).

3.2.5.3 Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %

Se preparó el gel de agarosa al 1,5% en 90 mL de buffer TAE 0,5X adicionando 8 µL de SYBR Green, siguiendo los parámetros del protocolo realizando los cálculos respectivos (Yepes-Pérez y cols., 2022). Una vez solidificado se cargó 5 µL del producto de PCR, se empleó el marcador molecular de 100 pb, y la corrida se llevó a cabo bajo el siguiente carácter: 150 V durante 45 minutos, posterior se observó el revelado en el *Invitrogen™ Transiluminador de luz azul/blanca de LED doble* (Anexo 10).

3.2.5.4 Medición de cantidad y calidad de ADN con NanoDrop

La calidad y cantidad de ADN se evaluó utilizando *NanoDrop 2000 Thermo Scientific* (Anexo 11), midiendo la absorbancia a longitudes de onda 260 y 280 nm colocando 1 µL de producto de PCR de las bacterias psicrófilas aisladas (Mattei y cols., 2019).

3.2.3.5 Secuenciación para identificación de bacterias aisladas

Una vez valorados los productos PCR de los aislados, se enviaron a secuenciar en Laboratorios pertenecientes de la Universidad de las Américas (UDLA) (Anexo 12), los cuáles utilizaron el método de Sanger (Alejandro y Carrera, 2019).

3.2.6 Análisis filogenéticos moleculares de bacterias psicrófilas

Se llevó a cabo una asignación taxonómica de las secuencias examinadas empleando la distancia evolutiva en comparación con secuencias de microorganismos registradas en las bases de datos del NCBI (*NCBI Blast:Nucleotide Sequence*, s. f.). En este proceso, comparamos las secuencias del estudio con la base de datos BLAST para identificar aquellas que presentaran una similitud más

destacada, después de esta comparación, se eligieron tres nuevas secuencias que mostraban una relación filogenética con las secuencias de interés (Medici y cols., 2019).

Todas fueron analizadas y alineadas con el programa MEGA11 (Anexo 13), utilizando la extensión *Clustal W Multiple Alignment*, una vez alineadas las secuencias se construyeron los árboles filogenéticos, que contienen secuencias de bacterias solubilizadoras de Fosfato del gen ARNr 16S y secuencias con alta similitud de la base de datos GeneBank, con el programa MEGA11 utilizando el método *Neighbor-joining tree* con prueba Bootstrap (100 réplicas) calculando las distancias evolutivas entre bacterias solubilizadoras identificadas y del material disponible en BLAST (Medici y cols., 2019).

3.2.8 Síntesis y análisis de datos estadísticos

Para el análisis cualitativo de microorganismos solubilizadores se realizó en el software InfoStat-Statistical Software, se hizo una prueba paramétrica con ANOVA evaluando la homogeneidad y normalidad de los datos obtenidos de IS, para identificar la significancia estadística se empleó la prueba: Tukey ($p > 0,05$), midiendo el grado de diferencia entre las variables (Cárdenas-Castro y cols., 2019).

Capítulo 4

4.1 Resultados y discusión

4.1.1 Aislamiento de poblaciones microbianas con capacidad solubilizadora y evaluación de las pruebas de solubilización de P *in vitro*.

De la zona de muestreo antártico, se obtuvieron 47 cepas aisladas y 35 de ellas con capacidad de solubilizar Fosfato tricálcico y Roca fosfórica en condiciones *in vitro* (Tabla 3), evaluamos la capacidad en el cambio de coloración del medio, como consecuencia de un cambio de pH, los medios preparados contienen azul de bromotimol como indicador de pH, es color verde con pH de 7 y cambia a amarillo por debajo del valor oscilado indicando un medio ácido (Figura 9).

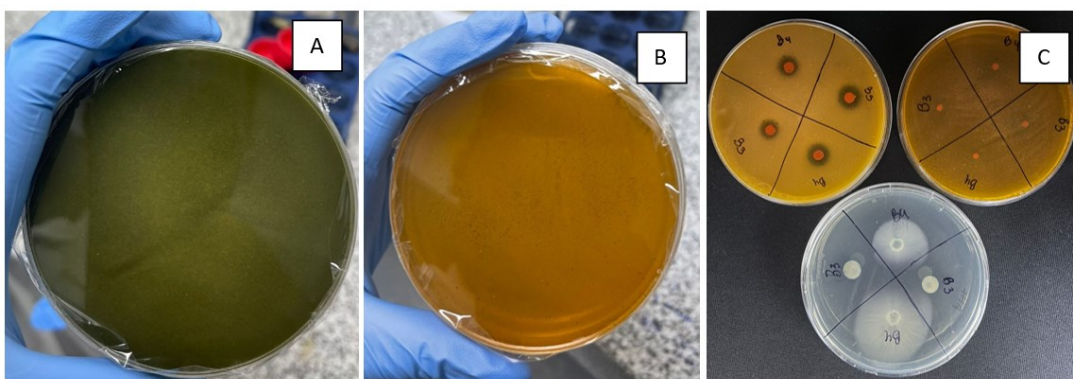


Figura 9. A) Medio PVK + Fosfato tricálcico . B) Medio PVK + Roca fosfórica . C) Cambio de coloración de verde a amarillo, indicando un valor bajo de pH diferente a la inicial.

Las bacterias solubilizadoras de fósforo ponen a disposición este mineral que no se encuentra disponible en cultivos, produciendo ácidos orgánicos a partir de su metabolismo al consumir glucosa, Mei y colaboradores obtuvieron resultados similares, según su estudio demuestra que en cuanto mayor sea la producción de ácido orgánico, mayor era el P liberado por las bacterias de estudio, sugiriendo que la acidificación es un mecanismo importante para aquellos microorganismos solubilizadores de Fosfato (Mei y cols., 2021).

Joshi y colaboradores en su análisis utilizaron el mismo medio de cultivo para la caracterización de bacterias solubilizadoras pertenecientes a la rizosfera, los autores mencionan el cambio de coloración que se presentaba alrededor del halo, indicando la capacidad potencial de mantenían aquellas cepas que identificaron (Joshi y cols., 2023).

Tabla 3. (+) Indica que la bacteria es capaz de solubilizar fósforo , (-) no es capaz de solubilizar, aquellas cepas que no solubilizaron fueron: B1, B9, B10, B12, B14, B19, B40, B42, B44, B46 y B47.

Cepa	Fosfato tricálcico	Roca fosfórica	Cepa	Fosfato tricálcico	Roca fosfórica
B2	+	+	B26	+	+
B3	+	+	B27	+	+
B4	+	+	B28	+	+
B5	+	+	B29	+	+
B6	+	+	B30	+	+
B7	+	+	B31	+	+
B8	+	+	B32	+	+
B11	+	+	B33	+	+
B13	+	+	B34	+	+
B15	+	-	B35	+	+
B16	+	+	B36	+	+
B17	+	+	B37	+	+
B18	+	+	B38	+	+
B21	+	+	B39	+	+
B22	+	+	B41	+	+
B23	+	+	B43	+	+
B24	+	+	B45	+	+
B25	+	+			

La formación de halo alrededor de la colonia indica la solubilización de Fosfato de las cepas bacterianas psicrófilas de la Antártida (Figura 10C). La cepa B16 mostró el índice más alto con un promedio de 4,75 solubilización en medio PVK con Fosfato tricálcico (Figura 10B), y la cepa B11 mostró el índice más alto de solubilización con un promedio de (3,17) en medio PVK con Roca fosfórica, B20 logró solubilizar al inicio, pero no mantuvo su potencial luego de varios ensayos (Figura 10D).

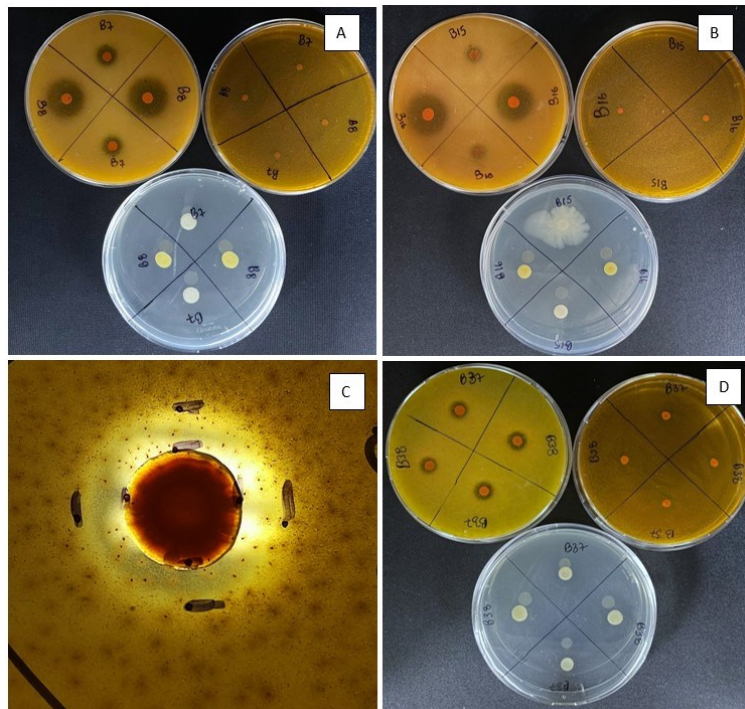


Figura 10. Formación de halos de solubilización; A: B7, B8; B: B15, B16; D: B37, B38; C: Halo de solubilización de fósforo por bacterias antárticas.

Se observó un crecimiento paulatino del halo de solubilización de los microorganismos, fueron seleccionados aquellos con mejor características de solubilización para identificar su genoma, una investigación de parte de Elhassoufi mencionan que obtuvieron buenos resultados en sus ensayos con cepas de la misma especie de nuestro estudio *Pseudomonas* sp., sin embargo, menciona que la

cepa de la familia de *Arthrobacter* sp., no mantuvo su capacidad de solubilizar luego de algunos ensayos, lo que nos confirma que esta bacteria no posee esta capacidad (Elhaisoufi y cols., 2023).

Realizamos los cálculos respectivos de los diámetros de colonias que solubilizaron fósforo para ello empleamos la ecuación respectiva del índice de solubilización (Anexo 14). Kiprotich y colaboradores emplearon la fórmula de índice de solubilización obteniendo los resultados importantes para el análisis estadístico de sus muestras aisladas (Kiprotich y cols., 2023).

4.1.2 Evaluación cualitativa de la actividad solubilizadora

En el presente ensayo se evaluaron los valores máximos en el halo de solubilización después de los 10 días de incubación y el índice de eficiencia para cada una de las cepas aisladas (Tabla 4), cabe mencionar que algunas de las bacterias aisladas al momento de reactivarlas no presentaron la misma capacidad de solubilización que presentaron al principio en los mismos medios de cultivos corresponde a aislamiento en Roca F B15 sólo en Roca F, B10, B19, B20, B40, B46, B47 en ambos medios con fósforo.

No obstante, fueron descartadas para siguientes pruebas, aunque al inicio una de ellas fuera cuantificada, conocemos que en ocasiones se puede presentar inestabilidad de la capacidad en solubilización que poseen algunas bacterias, como mencionan Fitriatin e investigadores, en su evaluación de solubilización de bacterias de la rizosfera, demostrando que al realizar 4 repeticiones de la pruebas no todas mantienen su potencial esto dependerá a diversos factores como la adaptación de la bacteria, competencia entre otros microorganismos, variabilidad genética o estrés bacteriano (Fitriatin y cols., 2022).

Tabla 4. Diámetro de halo y eficiencia en valores promedios de solubilización por parte de las bacterias solubilizadoras de fósforo.

Código de aislamiento	Diámetro de la colonia (mm)		Diámetro del halo de solubilización (mm)		Índice de eficiencia (%)	
	PVK	ROCA	PVK	ROCA	PVK	ROCA
B2	5,5	3	11,25	5	3,25	2,54
B3	4,75	3	9	5,5	2,66	3,11
B4	5	2	10	5,5	2,83	2,96
B5	6,25	3,5	11,75	4,5	3,64	2,25
B6	7	4	20,75	5	5,26	1,99
B7	5,5	3	10,5	6,75	2,57	3,65
B8	5,5	3	15,75	6,5	3,44	2,91
B11	5,25	3	19	6,5	3,93	2,66
B13	5,25	3,5	9,75	7	2,39	3,92
B15	5	NS	8,5	NS	2,7	NS
B16	4,75	3,5	17,5	4	5,37	1,75
B17	4,25	3,25	8,75	5	2,75	2,82
B18	5,25	2	9,75	4	3,44	2,2
B21	5,21	3,5	10,25	5,5	2,95	2,58
B22	5	3	9,75	7	2,95	3,4
B23	4,5	3	10	7	3,3	3,3
B24	4,5	3	9,25	6,75	3,1	3,3
B25	5,25	3	9,5	7	2,82	3,3
B26	5	3	10,3	6,3	3,1	3,1
B27	5,3	3,3	9,8	6	2,86	2,93
B28	5,3	3,8	10,1	6,8	2,96	2,83
B29	5,3	3,5	9,8	6,5	2,8	2,8
B30	5	3	9,8	8	3,1	3,6
B31	4,8	4	9,5	8	3,1	3,6
B32	4,8	4	9,5	8,5	3,01	3,12
B33	4,5	4	8,7	8,5	2,9	3,12
B34	5	4	8,3	8	2,7	3
B35	4	4	8	8	3	3
B36	4	4	9,5	9	3,8	3,3
B37	5	4	7,3	6	2,5	2,5
B38	5	4	7,5	6,5	2,5	2,6
B39	5,5	4,8	9,7	10,3	2,8	3,9
B41	8,3	4,5	12,3	9,5	2,48	3,13
B43	5	4,5	9,5	9	2,9	3,03
B45	5,3	4,5	9	9	2,72	3,03

Elaborado por: (Baque y Vargas, 2023)

4.1.3 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos de varianza demostraron nivel de significancia a un 95% de las 13 bacterias potenciales para solubilizar fósforo las cuáles fueron tomadas para su análisis (Anexo 15), se calculó la desviación estándar para analizar la dispersión de los valores de datos en conjunto, se presenta el valor promedio de índice de solubilización de cada cepa (Tabla 5) .

Tabla 5. Valor promedio de solubilización y desviación estándar.

Cepa	Índice de solubilización (IS)	Desviación	Índice de solubilización (IS)	Desviación
	PVK	estándar	Roca	estándar
B6	4,05	0,58	2,26	0,06
B11	4,63	0,26	3,17	0,19
B13	2,87	0,16	3,10	0,47
B16	4,75	0,87	2,20	0,27
B17	3,08	0,22	2,56	0,21
B18	2,87	0,16	3,00	0,00
B24	3,08	0,22	3,25	0,17
B25	2,83	0,24	3,33	0,00
B35	3,00	0,00	3,00	0,00
B36	3,38	0,14	3,25	0,00
B37	2,45	0,10	2,50	0,00
B38	2,50	0,12	2,63	0,14

Para el análisis del nivel de significancia se utilizó la prueba de Tukey ($p > 0,05$), que demostró que hay diferencia significativa entre las cepas , indicando cómo las bacterias aisladas solubilizan dependiendo del medio (Anexo 16).

Podemos observar mediante la figura 11, análisis sobre el radio de crecimiento del halo de solubilización de las bacterias psicrófilas aisladas de suelos asociados a la rizosfera pertenecientes a la Antártida, probadas de manera *in vitro* en 2 medios diferentes, la cepa B16

en medio PVK con Fosfato tricálcico presenta mayor índice de solubilización (IS) con un valor de (4,75), no obstante, se muestra que es de menor solubilización en Roca fosfórica , B11 en medio con Roca fosfórica (3,17) y Fosfato tricálcico (4,63) presenta un buen índice de solubilización para ambos sustratos, para análisis de las otras cepas los análisis demuestran que en medio con Roca fosfórica las cepas B24, B36, B25 son óptimas para solubilizar en el mismo, mientras que en Fosfato tricálcico las cepas B16, B11 tienen mayor capacidad para solubilizar el medio, con estos valores podemos confirmar sus análisis que van de la mano con las pruebas de solubilización, puesto que se presenta que existen diferencia significativa entre las cepas, pero no existe diferencia significativa en las que solubilizan.

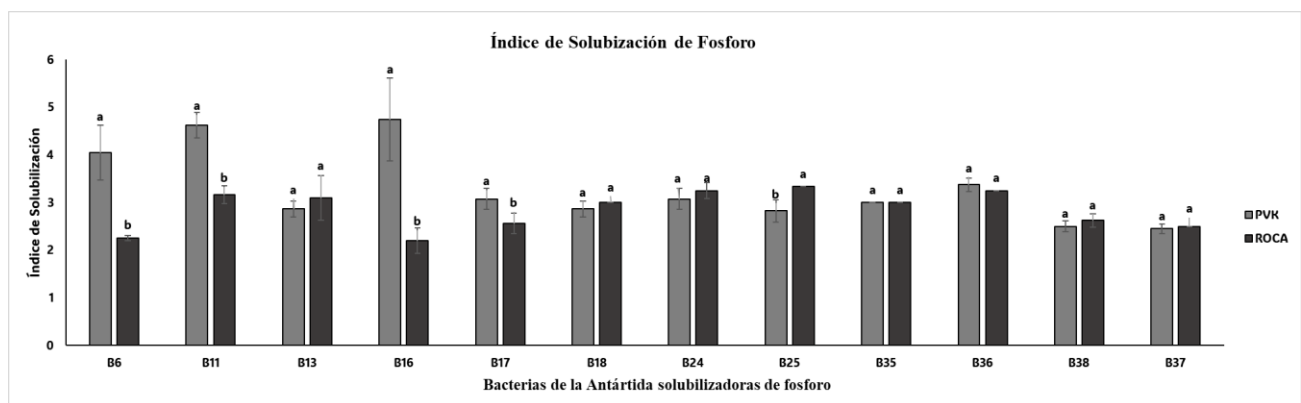


Figura 11. Crecimiento de halo de solubilización de bacterias en pruebas *in vitro*.

Letras distintas indican que no hay diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las columnas.

Según ensayos de solubilización de Fosfato en plantas los autores demostraron que no existió diferencia significativa entre sus medias, mencionando que las bacterias que solubilizan en medios diferentes dependen mucho de la composición química y la accesibilidad de fuentes de Fosfatos (Ait-Ouakrim y cols., 2023).

4.1.4 Identificación molecular y análisis de secuencias ADNr 16S

Los análisis de las secuencias de ADNr 16S (Figura 12) muestra alta similitud entre las cepas aisladas B6, B11, B16 y B13, B17, B17, B18, B25, B38, el fragmento que se ilumina indica el lugar de pares de bases (pb), donde se encuentra el ADN de cada cepa, esto nos confirma la similitud del tamaño del fragmento que mantienen los microorganismos aislados.

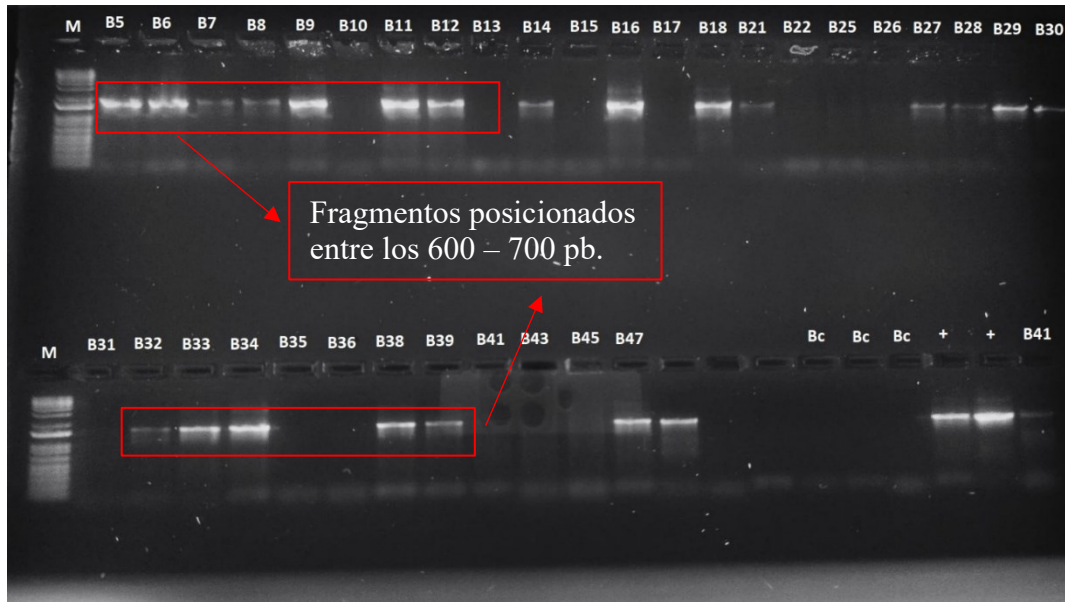


Figura 12. Amplicones ADN 16S obtenidos de los aislamientos, primera columna corresponde al marcador molecular 100 pb.

4.1.4.1 Validación con NanoDrop para evaluar la calidad y pureza del ADN.

Se obtuvieron los resultados esperados en la calidad y pureza del ADN extraído (Tabla 4), demostrando que todos los procedimientos realizados obtuvieron resultados positivos, la cantidad de ADN se encuentra entre el valor estándar según la literatura de NanoDrop. Los datos que arroja la lectura por NanoDrop se presentan en gráficas (Anexo 17).

Tabla 4. Evaluación de la calidad de ADN y pureza, producto de PCR.

Codificación	Ácido nucleico ng/μL	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230
B6	551.4	11.027	5.290	2.08	2.17
B11	220.5	4.410	2.648	1.67	1.14
B13	1254.9	25.098	12.525	2.00	2.24
B16	179.1	3.581	2.131	1.68	1.22
B17	487.9	9.758	4.749	2.05	2.47
B18	169.6	3.393	1.987	1.71	1.2
B20	1099.2	21.983	12.569	1.75	1.02
B24	511.7	10.235	5.037	2.03	2.33
B25	599.1	11.982	5.837	2.05	2.54
B35	527.4	10.547	5.195	2.03	2.33
B36	552.5	11.050	5.447	2.03	2.32
B37	431.8	8.637	4.209	2.05	2.58
B38	454.7	9.094	4.442	2.05	2.355

Este procedimiento nos permitió confirmar que la calidad del ADN fue realizada de manera adecuada. La viabilidad de la extracción de ADN menciona que el proceso es indispensable para poder secuenciar, ellos hacen uso del espectrofotómetro UV.VIS NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific), un equipo que brinda resultados específicos (Liu y cols., 2020).

4.1.4.2 Secuenciación del gen ARNr 16s y construcción del árbol filogenético

La secuenciación del gen ARNr 16S permitió identificar las cepas B6, B11 y B16 como *Pseudomonas graminis*, las cepas B17, B18, B24, B25 B35, B36, B37 y B38 como *Pseudomonadaceae bacterium* y la cepa B20 como *Arthrobacter* sp., las mismas capaces de solubilizar fósforo (Tabla 6).

La base de datos BLAST mostró que los aislados pertenecen a dos géneros *Pseudomonas* sp. y *Arthrobacter* sp., mostrando similitud entre secuencias de GenBank (Tabla 5).

Tabla 5. Aislados y sus cepas BLAST estrechamente relacionadas.

CEPA AISLADA	MEJOR ALINEACIÓN	VALOR E	IDENTIDAD NUCLEÓTIDA (%)	BASE DE DATOS
B6	<i>Pseudomonas baltica</i> strain MBT-2	0.0	91,98%	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NR_181571.1
	<i>Pseudomonas graminis</i> strain DSM 11363	0.0	92,20%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_219846803
	<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> strain IH5	0.0	91,76%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_265678758
B11	<i>Pseudomonas baltica</i> strain MBT-2	0.0	97,91%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_2363086629
	<i>Pseudomonas graminis</i> strain DSM 11363	0.0	98,62%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_219846803
	<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> strain IH5	0.0	97,68%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_265678758
B13	<i>Pseudomonas fildesensis</i> strain KG01	0.0	98,75%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_1909404385
	<i>Pseudomonas veronii</i> strain CIP 104663	0.0	98,75%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_631250879
	<i>Pseudomonas antarctica</i> strain CMS	0.0	98,75%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_219878447
B16	<i>Pseudomonas baltica</i> strain MBT-2	0.0	98%	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NR_181571.1
	<i>Pseudomonas graminis</i> strain DSM 11363	0.0	98%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_219846803
	<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> strain IH5	0.0	98%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_265678758
B17	<i>Pseudomonas fildesensis</i> strain KG01	0.0	98%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_1909404385
	<i>Pseudomonas veronii</i> strain CIP 104663	0.0	98%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_631250879
	<i>Pseudomonas antarctica</i> strain CMS	0.0	98%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_219878447
B18	<i>Pseudomonas fildesensis</i> strain KG01	0.0	100%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_1909404385
	<i>Pseudomonas veronii</i> strain CIP 104663	0.0	100%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_631250879
	<i>Pseudomonas antarctica</i> strain CMS	0.0	100%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_219878447
B20	<i>Arthrobacter psychrochitiniphilus</i> strain	0.0	98%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_559795116
	<i>Arthrobacter glacialis</i> strain HLT2-12-2	0.0	98%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_2363080629
	<i>Arthrobacter alpinus</i> strain S6-3	0.0	98%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_645319922
B24	<i>Pseudomonas fildesensis</i> strain KG01	0.0	100%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_1909404385
	<i>Pseudomonas veronii</i> strain CIP 104663	0.0	100%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_631250879
	<i>Pseudomonas antarctica</i> strain CMS	0.0	100%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_219878447
B25	<i>Pseudomonas fildesensis</i> strain KG01	0.0	99%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_1909404385
	<i>Pseudomonas veronii</i> strain CIP 104663	0.0	99%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_631250879
	<i>Pseudomonas antarctica</i> strain CMS	0.0	99%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_219878447
B35	<i>Pseudomonas fildesensis</i> strain KG01	0.0	97%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_1909404385
	<i>Pseudomonas veronii</i> strain CIP 104663	0.0	97%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_631250879
	<i>Pseudomonas antarctica</i> strain CMS	0.0	97%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_219878447
B36	<i>Pseudomonas fildesensis</i> strain KG01	0.0	100%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_1909404385
	<i>Pseudomonas veronii</i> strain CIP 104663	0.0	100%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_631250879
	<i>Pseudomonas antarctica</i> strain CMS	0.0	100%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_219878447
B37	<i>Pseudomonas fildesensis</i> strain KG01	0.0	100%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_1909404385
	<i>Pseudomonas veronii</i> strain CIP 104663	0.0	100%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_631250879
	<i>Pseudomonas antarctica</i> strain CMS	0.0	100%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_219878447
B38	<i>Pseudomonas fildesensis</i> strain KG01	0.0	100%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_1909404385
	<i>Pseudomonas veronii</i> strain CIP 104663	0.0	100%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_631250879
	<i>Pseudomonas antarctica</i> strain CMS	0.0	100%	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_219878447

Una vez obtenido los resultados del porcentaje de similitud entre las cepas aisladas psicrófilas, se construyó el árbol filogenético (Figura 13), el cuál mostró la relación filogenética entre los aislamientos confirmando que las cepas B6, B11, B16 mantienen un 98% de similitud con *Pseudomonas graminis strain DSM 11363*, aunque en los datos de secuencia se llegó a la familia, no se identificó la especie, por lo que el árbol filogenético nos ayuda a determinar la especie en cada una de las cepas, de modo que: B13 y B17 con un porcentaje de 98,75%, B25 con un porcentaje de 99%, B35 con un porcentaje de 97%, B18, B24, B38, B37, B38 con un porcentaje de 100%, de similitud con *Pseudomonas antártica strain CSM 35* y la cepa B20 demuestra relación con *Arthrobacter alpinus strain S6-3*, según los análisis.

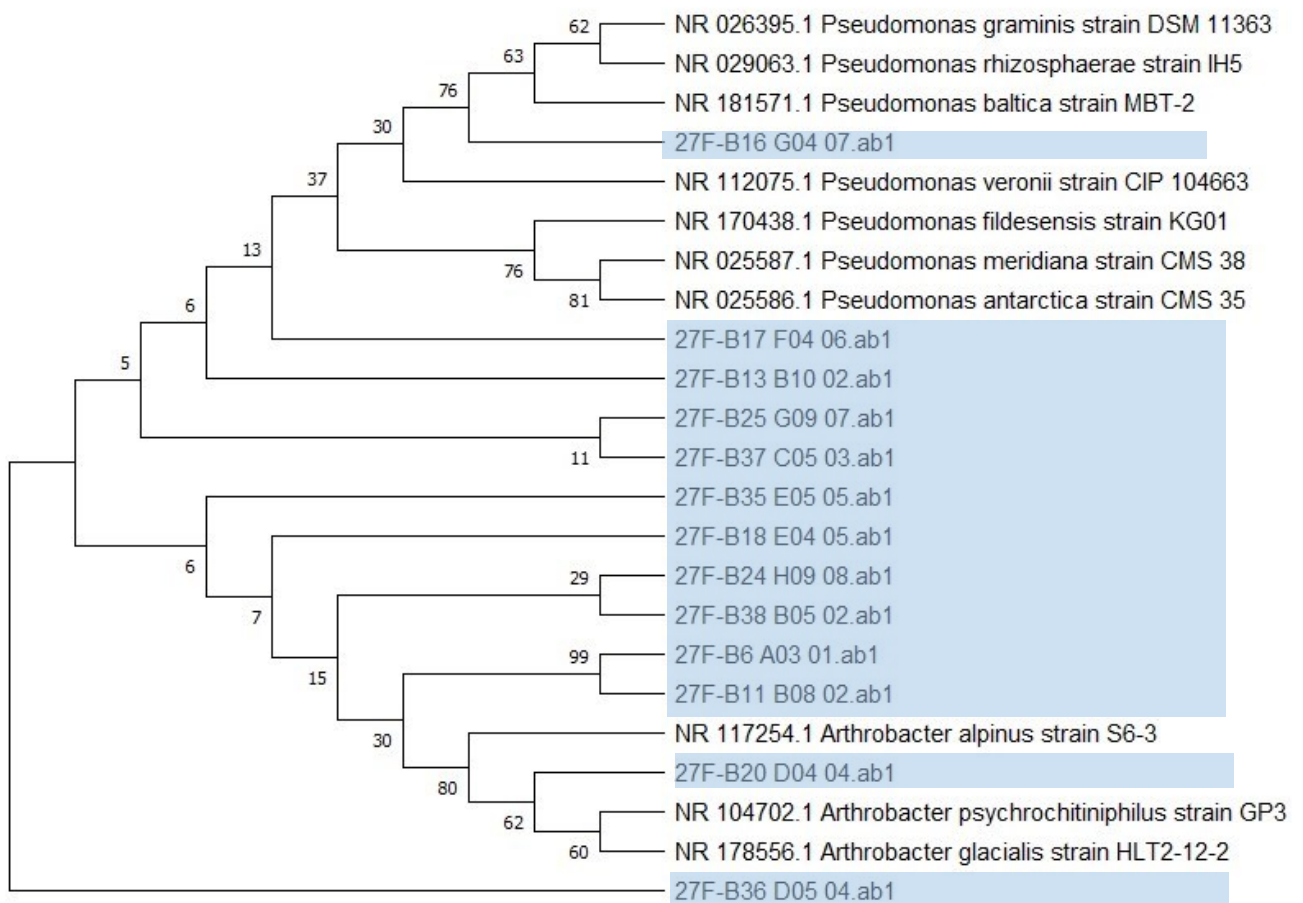


Figura 13. Árbol filogenético de cepas psicrófilas aisladas pertenecientes de la Antártida.

Tabla 6. Identificación molecular de microorganismos solubilizadores de Fosfato mediante secuenciación.

Codificación de secuencia	Similitud %	Observaciones
B6	99.7	<i>Pseudomonas graminis</i>
B11	99.5	<i>Pseudomonas graminis</i>
B13	99.9	<i>Pseudomonadaceae bacterium</i>
B16	99.1	<i>Pseudomonas graminis</i>
B17	99.3	<i>Pseudomonadaceae bacterium</i>
B18	98.6	<i>Pseudomonadaceae bacterium</i>
B20	97.4	<i>Arthrobacter</i> sp.
B24	96.2	<i>Pseudomonadaceae bacterium</i>
B25	97.6	<i>Pseudomonadaceae bacterium</i>
B35	97.7	<i>Pseudomonadaceae bacterium</i>
B36	99.1	<i>Pseudomonadaceae bacterium</i>
B37	99.3	<i>Pseudomonadaceae bacterium</i>
B38	99.6	<i>Pseudomonadaceae bacterium</i>

En un estudio en el cuál compararon la capacidad solubilizadora de microorganismos, lograron aislar cepas similares a nuestra investigación, en dónde se determina *que Pseudomonas* sp., son cepas potenciales para la solubilización del fósforo productoras de ácidos orgánicos, de esta manera podemos comentar que existe relación entre la capacidad solubilizadora y la especies identificadas de las cepas aisladas del estudio en mención y las cepas aisladas en la presente investigación (Ait-Ouakrim y cols., 2023) .

Capítulo 5

5.1 Conclusiones y recomendaciones

5.1.1 Conclusiones

- En esta investigación se logró evaluar la capacidad *in vitro* de microorganismos aislados de suelos de la Antártida procedentes de la Horseshoe Island que fueron capaces de solubilizar en Fosfato tricálcico y Roca fosfórica, se aislaron en total 47 bacterias psicrófilas que se cultivaron en medios específicos, de las cuales 35 bacterias solubilizaron de forma inicial las fuentes de fósforo.
- La secuenciación mediante la técnica de Sanger, con ayuda de herramientas bioinformáticas y análisis en BLAST del NCBI permitió distinguir cepas de especies relacionadas, de las cuales 11 pertenecen a las especies *Pseudomonas graminis*, *Pseudomonadaceae bacterium*, *Arthrobacter* sp. En la base de resultados obtenidos se demuestra la gran eficacia de técnicas moleculares en la identificación de microorganismos solubilizadores.
- Las bacterias evaluadas presentaron diferencias significativas en la solubilización de las fuentes de fósforo. Las mejores cepas para solubilizar Fosfato tricálcico fueron *Pseudomonas graminis* con códigos B11 y B16 frente a la cepa *Pseudomonas antártica strain* con código B37 que presentó menor eficiencia. Por otro lado, las mejores cepas que solubiliaron Roca fosfórica fueron *Pseudomonas graminis* (B11) y *Pseudomonas antártica strain* (B24, B36 y B25) frente a la cepa que menos solubilizó que fue la cepa B16.

5.1.2 Recomendaciones

- Para futuras investigaciones, se recomienda el aislamiento de hongos, puesto que son microorganismos que presentan mecanismos para solubilizar nutrientes que pueden ser de gran importancia para los cultivos agrícolas, dentro del laboratorio de Fitopatología del “CIBE”, se han llevado a cabo diversas investigaciones con hongos Psicrófilos capaces de solubilizar fósforo, lo que contrarresta la importancia de su identificación.
- Es importante conocer con mayor profundidad la diversidad total de microorganismos aplicando técnicas de secuenciación masiva de nueva generación.
- Se recomienda evaluar la capacidad de microorganismos solubilizadores en la producción de biofertilizantes o bioestimulantes en cultivos, determinando el fósforo disponible en el suelo y analizando los beneficios sobre el crecimiento vegetal de los cultivos de zonas templadas del Ecuador.

BIBLIOGRAFÍA

- Elianeth Romero, J. C. (2016). Sucre: Microbiología Genral.
- Rosa María Oliart-Ros, Á. M.-P.-O. (2016). *Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico*. Victoria: Scielo.
- Icaza, J. S. (2008). *Correlación entre bacterias psicrófilas, psicrótrofas y colsiformes totales en leche semi-descremada y chocolatada de la planta de lácteos Zamorano*. Zamorano, Honduras: Carrera de agroindustria alimentaria .
- Rodríguez Meza, C. A. (2013). Ambato: Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería Bioquímica.
- Dávalos, L. H. (2020). *Caracterización y evaluación del potencial PGPR de la microflora asociada al cultivo de Tarwi (Lupinus mutabilis Sweet)*. Lima: Ecología Aplicada.
- Lucero Huasasquiche Sarmiento, P. M. (2020). *Caracterización y evaluación del potencial PGPR de la microflora asociada al cultivo de Tarwi (Lupinus mutabilis Sweet)*. Lima: Scielo.
- Violeta C. Anguloa, E. A. (2014). *Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de Eucalyptus nitens*. Forestal Mininco, Los ángeles, Región del Bío-Bío, Chile: - Revista Argentina de Microbiología.
- Fernández, M. D. (2012). *La conservación de cepas microbianas*. Valencia: Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).
- Ian M. Mackay, K. E. (2002). *Real-time PCR in virology* . Nucleic Acids Research, Volume 30.
- Laura Patricia Alejos Velázquez, M. D. (2014). *Extracción y purificación de ADN*. Mexico: Unidad de Biotecnología y Prototipos. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Velasco Mosquera, R. (2005). *Marcadores moleculares y la extracción de ADN*. Cauca: Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial BSAA ISSN-e 1909-9959, ISSN 1692-3561, Vol. 3, N°. 1.

- Yenney Hernández, E. L. (2009). Habana: Rev Salud Anim. V.31 n.2 La Habana.
- CASTAÑO, D. M. (2009). *Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras*. Colombia: Revista Colombiana de Biotecnología.
- Ana Maria Bolivar, A. R.-L. (2013). *PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización*. Merida- Venezuela: Avances en Biomedicina Publicación Oficial del Instituto de Inmunología Clínica.
- Mark A. Valasek, a. J. (2005). *The power of real-time PCR*. Advances in Physiology education vol. 29, No. 3.
- Eva Mas, J. P. (2001). *Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)*. Núm. 15, Revista aquatic nº15.
- G.C. Baker, J. S. (2003). *Review and re-analysis of domain-specific 16S primers*. of Microbiological Methods Volume 55, Issue 3.
- Long-Cheng Li, R. D. (2002). *Methprimer: designing primers for methylation pcrs*. Bioinformatics, Volume 18, Issue 11 : Pages 1427–1431,.
- N Moreno, P. A.-F. (2010). *Aplicación de las pruebas de PCR convencional simple y múltiple para la identificación de aislamientos de Leptospira spp*. São Paulo SP - Brazil: scielo - Scientific Electronic Library Online.
- María Yepes-Pérez, K. C. (2022). *Validación de PCR convencional para detectar E. Coli O157*. Medellín- Colombia: Scielo.
- Fierro, F. (2014). *Extracción y purificación de ADN*. Delegación Tlalpan, México DF: Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa.

- Jonathan J Magaña, M. D.-S. (2009). *La electroforesis capilar como una nueva estrategia en la medicina y el diagnóstico clínico*. Santiago - Chile: Rev. Méd. Chile v.137 n.7 Santiago; 137: 946-956 .
- Jorge A. Pino Alea, A. G. (1996). *Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de Lippia alba (Mill.) N. E. Brown*. Habana: Rev Cubana Farm v.30 n.1 Ciudad de la Habana .
- Moya, G. S. (2014). *Aislamiento de cepas de Trichoderma de suelos, sustratos y raíces de plantas en en la República Dominicana*. . República Dominicana. APF, 3(2), 11-16.
- Moreno, J. R., y Albarracín, V. H. (2012). *Aislamiento, cultivo e identificación de microorganismos ambientales a partir de muestras naturales*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; Reduca (Biología); 5; 79-93.
- Plazas Ávila, M. A. (2023). *Introducción alas nuevas tecnologías: minion, secuenciación en tiempo real* Plazas Ávila, MDLO.; Arrones Olmo, A.; Vilanova Navarro, S. (2. Valencia: Universitat Politècnica de València. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural - Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural Universitat Politècnica de València. Departamento de Biotecnología - Departamen.
- Belkis Corona González, A. D. (2016). *Análisis de la secuencia de la proteína principal de superficie Ia en aislados cubanos de Anaplasma marginale*. Cuba: Rev Salud Anim. Vol.38 no.1 La Habana.
- Tania I. Hernández–Leal, G. C. (2011). *Solubilización in vitro de por una cepa de Paecilomyces lilacinus (Thom) Samson*. Veracruz, México: Agrociencia vol.45 no.8 Texcoco .
- Nelson Valero, L. N. (2012). Cesar, Colombia: Acta biol. Colomb., Vol. 17 n.º 2, 2012 335 - 348.
- Eduardo Santambrosio, M. O. (2009). *Siembra y recuento de microorganismos.* ”. .

- Costa, J. (2004). *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo realreal-time pcrss*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica Volume 22, Issue 5,.
- Carlos Patiño Torres, M. S. (2014). *Efecto de la aplicación de y la inoculación con bacterias solubilizadoras de sobre el crecimiento del ají (Capsicum annum L.)*. Palmira : Acta Agron. Vol.63 no.2 .
- S. (2012). *Gassipaes Kunth*). Popayán : Rev.Bio.Agro vol.10 no.2 .
- Claudia Álvarez-López, W. O.-V.-G.-M. (2014). *Caracterización bioquímica de microorganismos rizosféricos de plantas de vainilla con potencial como biofertilizantes* . San Pedro : Agron. Mesoam vol.25 n.2 .
- Patiño torres, C., y Sanchez de Prager, M. (2012). *Aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de , habitantes de la rizósfera de chontaduro (b. Gassipaes kunth)*. Colombia: Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. BSAA Vol. 10 Núm. 2 Pág. 177-187.
- Adhikari, P. y Jain, R. y Sharma, A. y Pandey, A. (2021). Plant Growth Promotion at Low Temperature by Phosphate-Solubilizing Pseudomonas Spp. Isolated from High-Altitude Himalayan Soil. *Microbial Ecology*, 82(3), 677–687. <https://doi.org/10.1007/S00248-021-01702-1/FIGURES/5>
- Aguilera, L. A. P. (2021). Identificación molecular de microorganismos aislados en planteles mineros artesanales de Nicaragua. *I+D Tecnológico*, 17(1), 54–64. <https://doi.org/10.33412/IDT.V17.1.2921>
- Ahangari, H. y Yazdani, P. y Ebrahimi, V. y Soofiyan, S. R. y Azargun, R. y Tarhriz, V. y Eyvazi, S. (2021). An Updated review on production of food derived bioactive peptides;

- focus on the psychrotrophic bacterial proteases. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 35, 102051.
- Ait-Ouakrim, E. H. y Chakhchar, A. y El Modafar, C. y Douira, A. y Amir, S. y Ibsouda-Koraichi, S. y Belkadi, B. y Filali-Maltouf, A. (2023). Valorization of Moroccan Phosphate Sludge Through Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing Bacteria and Assessment of Their Growth Promotion Effect on *Phaseolus vulgaris*. *Waste and Biomass Valorization* 2023 14:8, 14(8), 2673–2690. <https://doi.org/10.1007/S12649-023-02054-2>
- Alcántara, H. y González, M. y Cruz, M. y Silva, R. y Vilchis Landeros, L. (2022). *Comité Editorial: González Andrade Análisis filogenético de Proteínas: Una herramienta básica para la Medicina Evolutiva o Filomedicina. Phylogenetic analysis of Proteins: A basic tool for Evolutionary Medicine or Phylomedicine.* <https://www.ebi.ac.uk/uniprot/TrEMBLstats>
- Alejandro, D. y Carrera, F. (2019). *Identificación y diferenciación molecular por la técnica de la Reacción de la Cadena Polimerasa (PCR) múltiple de subgéneros de Leishmania (Viannia y Leishmania) en el Ecuador.* <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/11044>
- Amarelle Larrosa, V. y Fabiano González, E. y Roldán Revuelta, D. M. (2021). *Informe final del proyecto: Diseño racional de vectores para la implementación de Pseudomonas y Arthrobacter psicrófilas en la construcción de bibliotecas metagenómicas funcionales especialmente diseñadas para la identificación de enzimas psicrófilas.*
- Arteche-López, A. y Ávila-Fernández, A. y Romero, R. y Riveiro-Álvarez, R. y López-Martínez, M. A. y Giménez-Pardo, A. y Vélez-Monsalve, C. y Gallego-Merlo, J. y García-Vara, I. y Almoguera, B. y Bustamante-Aragonés, A. y Blanco-Kelly, F. y Tahsin-Swafiri, S. y Rodríguez-Pinilla, E. y Mínguez, P. y Lorda, I. y Trujillo-Tiebas, M. J. y Ayuso, C. (2021). Sanger sequencing is no longer always necessary based on a single-center validation of 1109 NGS variants in 825 clinical exomes. *Scientific Reports* 2021 11:1, 11(1), 1–7.

- Ateş, Ö. (2023). Phosphate Solubilizing Bacteria Isolation Medium: Rock Phosphate or Tricalcium Phosphate?
- Augelletti, F. y Jousset, A. y Agathos, S. N. y Stenuit, B. (2020). Diversity Manipulation of Psychrophilic Bacterial Consortia for Improved Biological Treatment of Medium-Strength Wastewater at Low Temperature. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 545218.
- Barrera Fuentes, J. C. y Gonzales Rodríguez, L. M. (2022). *Bacterias endófitas de Prosopis limensis Benth. como potenciales promotores de crecimiento en Zea mays L. bajo condiciones de estrés por salinidad y sequía.*
- Beltrán, M. J. y Romaniuk, R. I. y Herrmann, C. y Mousegne, F. y Jecke, F. (2019). y yeso agrícola: complemento a la fertilización tradicional en el cultivo de soja. *Ciencia del suelo*, *37*(1), 180–185.
- Beltrán-Morales, F. A. y Nieto-Garibay, A. y Murillo-Chollet, J. S. A. y Ruiz-Espinoza, F. H. y Troyo-Dieguez, E. y Alcala-Jauregui, J. A. y Murillo-Amador, B. (2019). Inorganic nitrogen, phosphorus, and potassium content of natural fertilizers for use in organic agriculture. *Terra Latinoamericana*, *37*(4), 371–378.
- Ben Zineb, A. y Trabelsi, D. y Ayachi, I. y Barhoumi, F. y , R. y Mhamdi, R. (2019). Inoculation with Elite Strains of Phosphate-Solubilizing Bacteria Enhances the Effectiveness of Fertilization with Rock Phosphates.
- Bhattacharjee, A. y Bayzid, M. S. (2020). Machine learning based imputation techniques for estimating phylogenetic trees from incomplete distance matrices. *BMC Genomics*, *21*(1), 1–
- Boinovich, L. B. y Kaminsky, V. V. y Domantovsky, A. G. y Emelyanenko, K. A. y Aleshkin, A. V. y Zulkarneev, E. R. y Kiseleva, I. A. y Emelyanenko, A. M. (2019). Bactericidal Activity of Superhydrophobic and Superhydrophilic Copper in Bacterial Dispersions. *Langmuir*, *35*(7), 2832–2841.

- Cárdenas-Castro, E. y Sánchez-Espinosa, J. y Ariel Barrera-Cárdenas, F. y Isabel Tenjo-Morales, A. y Edilson Espitia-Barrera, J. y Tomás Bogotá cardenasvuad, S. D. y educu, usantotomas. (2019). Efecto de la renovación de praderas con gramíneas y leguminosas sobre la concentración de microorganismos funcionales en suelos ácidos. *Suelos Ecuatoriales*, ISSN- e 2665-6558, ISSN 0562-5351, Vol. 49, N°. 1-2, 2019 (Ejemplar dedicado a: Suelos Ecuatoriales), págs. 1-8, 49(1), 1–8.
- Carlos Omar Patiño-Torres. (2018). Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una biotecnológica para una agricultura sostenible. *scielo*.
- Castillo, M. y Sánchez-Giler, S. y Sánchez, N. (2021). Validación de un modelo educativo, basado en estilos de aprendizaje, para microbiología práctica en medicina. *Ciencia Ecuador*, 3(2), 1–23.
- Cechinel-Zanchett, C. C. y Bolda Mariano, L. N. y Schlickmann, F. y Cechinel-Filho, V. y de Souza, P. (2021). Efecto *in vitro* de 2 compuestos bioactivos, el ácido gálico y el galato de metilo, sobre la urolitiasis. *Actas Urológicas Españolas*, 45(9), 604–608.
- Chauhan, A. y Guleria, S. y Balgir, P. P. y Walia, A. y Mahajan, R. y Mehta, P. y Shirkot, C. K. (2017). Tricalcium phosphate solubilization and nitrogen fixation by newly isolated *Aneurinibacillus aneurinilyticus* CKMV1 from rhizosphere of *Valeriana jatamansi* and its growth promotional effect. *Brazilian of Microbiology*, 48(2), 294.
- Chen, J. y Kawamura, S. y Koseki, S. (2020). Effect of d-tryptophan on the psychrotrophic growth of *Listeria monocytogenes* and its application in milk. *Food Control*, 110, 107048.
- Cumpa Velásquez, L. M. S. (2021). *Adaptación de rizobios y bacterias solubilizadoras de a condiciones salino-alcálicas para el desarrollo de biofertilizantes eficientes para Lotus tenuis e identificación de genes bacterianos implicados en la tolerancia a dicha condición.*

- Doadrio Villarejo, I. A. R. S. A. J. I. (2019). *Las colecciones del Museo Nacional de Ciencias Naturales : investigación y patrimonio*. 1–558.
- Doytchinov, V. V. y Dimov, S. G. (2022). Microbial Community Composition of the Antarctic Ecosystems: Review of the Bacteria, Fungi, and Archaea Identified through an NGS-Based Metagenomics Approach. *Life*, 12(6).
- Edwards, A. y Cameron, K. A. y Cook, J. M. y Debbonaire, A. R. y Furness, E. y Hay, M. C. y Rassner, S. M. E. (2020). Microbial genomics amidst the arctic crisis. *Microbial Genomics*, 6(5), 1–20.
- Elhaissofi, W. y Ghoulam, C. y Barakat, A. y Zeroual, Y. y Bargaz, A. (2022). Phosphate bacterial solubilization: A key rhizosphere driving force enabling higher P use efficiency and crop productivity. *of Advanced Research*, 38, 13–28.
- Elhaissofi, W. y Ibnasser, A. y Haddine, M. y Zeroual, Y. y Ghani, R. y Barakat, A. y Rchiad, Z. y Ghoulam, C. y Bargaz, A. (2023). Screening of potential phosphate solubilizing bacteria inoculants should consider the contrast in phosphorus bio-solubilization rate along with plant growth promotion and phosphorus use efficiency. *of Applied Microbiology*, 134(2).
- Escudero Leyva, E. y Chaverri Echandi, P. y Montero Vargas, M. y Umaña Jiménez, J. C. (2020). Análisis filogenético de secuencias ITS provenientes de hongos endófitos utilizando Inferencia Bayesiana Paralela de Árboles con Exabayes. *Tecnología en Marcha, ISSN 0379-3962, ISSN-e 2215-3241, Vol. 33, Nº. Extra-5, 2020 (Ejemplar dedicado a: CARLA 2019), págs. 74-79, 33(5), 74–79*. <https://doi.org/10.18845/tm.v33i5.5079>
- Esfandani-Bozchaloyi, S. y Sheidai, M. y Hassanzadeh Kalalegh, M. (2019). Comparison of extraction methods from Geranium (Geraniaceae). *Acta Botanica Hungarica*, 61(3–4), 251–266. <https://doi.org/10.1556/034.61.2019.3-4.3>

- Fadanka, S. y Minette, S. y Mboalab, N. M. y Bio, B. (2022). Preparation of Bacteria Glycerol Stocks V.1. *JUN 14*, 2022.
- Feng, C. y Zhu, X. (2019). Signal Amplification. *Nano-inspired Biosensors for Protein Assay with Clinical Applications*, 287–312.
- Fida, M. y Khalil, S. y Saleh, O. A. y Challener, D. W. y Sohail, M. R. y Yang, J. N. y Pritt, B. S. y Schuetz, A. N. y Patel, R. (2021). Diagnostic Value of 16S Ribosomal Gene Polymerase Chain Reaction/Sanger Sequencing in Clinical Practice. *Clinical Infectious Diseases*, 73(6), 961–968.
- Fitriatin, B. N. y Mulyani, O. y Herdiyantoro, D. y Alahmadi, T. A. y Pellegrini, M. (2022). Metabolic characterization of phosphate solubilizing microorganisms and their role in improving soil phosphate solubility, yield of upland rice (*Oryza sativa* L.), and phosphorus fertilizers efficiency. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6, 1032708.
- Gálvez Córdova, M. J. (2022). Efecto de la sobre algunos parámetros biométricos de los plantones de cuatro especies forestales producidos utilizando como sustrato un suelo degradado. *Universidad Nacional Agraria de la Selva*.
- García-Pedroza, P. y Valdez-Rodríguez, D. y Vázquez-Hernández, J. (2022). *Control biológico de los hongos fitopatógenos y Fusarium con Bacillus subtilis y Bacillus pumilus in vitro e in vivo en plantas de jitomate*.
- Giovanella, P. y Vieira, G. A. L. y Ramos Otero, I. V. y Pais Pellizzer, E. y de Jesus Fontes, B. y Sette, L. D. (2020). Metal and organic pollutants bioremediation by extremophile microorganisms. *of Hazardous Materials*, 382, 121024.
- Hamdan, A. (2018). Psychrophiles: Ecological significance and potential industrial application. *South African of Science*, 114(5–6), 1–6.

- Herrera Méndez, M. del P. (2020). *Importancia del Fósforo en el incremento de la producción, en cultivos de ciclo corto.*
- Hu, D. y Liu, B. y Wang, L. y Reeves, P. R. (2020). Living Trees: High-Quality Reproducible and Reusable Construction of Bacterial Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*, 37(2), 563–575.
- Ji, M. y Kong, W. y Jia, H. y Delgado-Baquerizo, M. y Zhou, T. y Liu, X. y Ferrari, B. C. y Malard, L. y Liang, C. y Xue, K. y Makhalanyane, T. P. y Zhu, Y. G. y Wang, Y. y Pearce, D. A. y Cowan, D. (2022). Polar soils exhibit distinct patterns in microbial diversity and dominant phylotypes. *Soil Biology and Biochemistry*, 166, 108550.
- Joshi, S. y Gangola, S. y Jaggi, V. y Sahgal, M. (2023). Functional characterization and molecular fingerprinting of potential phosphate solubilizing bacterial candidates from Shisham rhizosphere. *Scientific Reports 2023 13:1*, 13(1), 1–12.
- Junge, K. y Cameron, K. y Nunn, B. (2019). Diversity of Psychrophilic Bacteria in Sea and Glacier Ice Environments—Insights Through Genomics, Metagenomics, and Proteomics Approaches. *Microbial Diversity in the Genomic Era*, 197–216.
- Kalayu, G. (2019). Phosphate solubilizing microorganisms: Promising approach as biofertilizers. *of Agronomy*, 2019.
- Kiprotich, K. y Muoma, J. y Omayio, D. O. y Ndombi, T. S. y Wekesa, C. (2023). Molecular Characterization and Mineralizing Potential of Phosphorus Solubilizing Bacteria Colonizing Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Rhizosphere in Western Kenya. *of Microbiology*, 2023.
- Kour, D. y Kaur, T. y Devi, R. y Rana, K. L. y Yadav, N. y Rastegari, A. A. y Yadav, A. N. (2020). Biotechnological applications of beneficial microbiomes for evergreen agriculture and human health. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and*

Bioengineering: Trends of Microbial Biotechnology for Sustainable Agriculture and Biomedicine Systems: Perspectives for Human Health, 255–279.

- Kumari, M. y Padhi, S. y Sharma, S. y Phukon, L. C. y Singh, S. P. y Rai, A. K. (2021a). Biotechnological potential of psychrophilic microorganisms as the source of cold-active enzymes in food processing applications. *3 Biotech 2021 11:11*, 11(11), 1–18.
- Kumari, M. y Padhi, S. y Sharma, S. y Phukon, L. C. y Singh, S. P. y Rai, A. K. (2021b). Biotechnological potential of psychrophilic microorganisms as the source of cold-active enzymes in food processing applications. *3 Biotech 2021 11:11*, 11(11), 1–18.
- Liu, J. y Macrae, M. L. y Elliott, J. A. y Baulch, H. M. y Wilson, H. F. y Kleinman, P. J. A. (2019). Impacts of Cover Crops and Crop Residues on Phosphorus Losses in Cold Climates: A Review. *of Environmental Quality*, 48(4), 850–868.
- Liu, J. y Qi, W. y Li, Q. y Wang, S. G. y Song, C. y Yuan, X. zheng. (2020). Exogenous phosphorus-solubilizing bacteria changed the rhizosphere microbial community indirectly. *3 Biotech*, 10(4), 1–11.
- Lopez, B. R. y Bacilio, M. (2020). Weathering and soil formation in hot, dry environments mediated by plant–microbe interactions. *Biology and Fertility of Soils*, 56(4), 447–459.
- Marcela L. Rorig. (2023). Análisis y caracterización de poblaciones bacterianas solubilizadoras de P en un ensayo de larga duración con diferentes secuencias de cultivo. *Ecología Austral*.
- María, I. A. y Di Barbaro, G. (2021). *Interacción de Azospirillum brasilense (Tarrand, Krieg & Döbereiner) y hongos micorrícicos del suelo en Helianthus tuberosus L. y Smallanthus sonchifolius [(Poeppig & Endlicher) H. Robinson]*.
- Mattei, V. y Murugesan, S. y Al Hashmi, M. y Mathew, R. y James, N. y Singh, P. y Kumar, M. y Prasath Lakshmanan, A. y Terranegra, A. y Al Khodor, S. y Tomei, S. (2019). Evaluation

- of methods for the extraction of microbial from vaginal swabs used for microbiome studies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(JUN), 450584.
- Matthijs, G. y Souche, E. y Alders, M. y Corveleyn, A. y Eck, S. y Feenstra, I. y Race, V. y Sistermans, E. y Sturm, M. y Weiss, M. y Yntema, H. y Bakker, E. y Scheffer, H. y Bauer, P. (2016). Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *Eur. J. Hum. Genet.*, 24(1), 2–5.
- McCullum, C. y David, P. y Paoletti, M. G. (2019). Biotechnology in Agriculture and the Environment: Benefits and Risks. *Biotechnology and Safety Assessment*, 177–217.
- Medici, A. y Szponarski, W. y Dangeville, P. y Safi, A. y Dissanayake, I. M. y Saenchai, C. y Emanuel, A. y Rubio, V. y Lacombe, B. y Ruffel, S. y Tanurdzic, M. y Rouached, H. y Krouk, G. (2019). Identification of molecular integrators shows that nitrogen actively controlsthephosphatestarvationresponseinplants. *Plant Cell*, 31(5), 1171–1184.
- Mei, C. y Chretien, R. L. y Amaradasa, B. S. y He, Y. y Turner, A. y Lowman, S. (2021). Characterization of Phosphate Solubilizing Bacterial Endophytes and Plant Growth Promotion *In Vitro* and in Greenhouse. *Microorganisms 2021, Vol. 9, Page 1935*, 9(9), 1935.
- Montalvo Navarro, C. A. y Lugo Flores, M. A. (2019). Electrophoresis: fundamentals, advances and applications. *EPISTEMUS; Vol. 13 No. 26 (2019): Science does not stop; 48-54*, 13(26), 48–54.
- Naranjo Torres, H. E. (2019). *Evaluación de bacterias solubilizadoras de fósforo en la aclimatización de plantas in vitro de banano Musa sp. Var. Williams en condiciones de . NCBI Blast:Nucleotide Sequence.* (s. f.). Recuperado 21 de agosto de 2023, de
- Orellana-Saez, M. y Pacheco, N. y Costa, J. I. y Mendez, K. N. y Miossec, M. J. y Meneses, C. y Castro-Nallar, E. y Marcoleta, A. E. y Poblete-Castro, I. (2019). In-depth genomic and

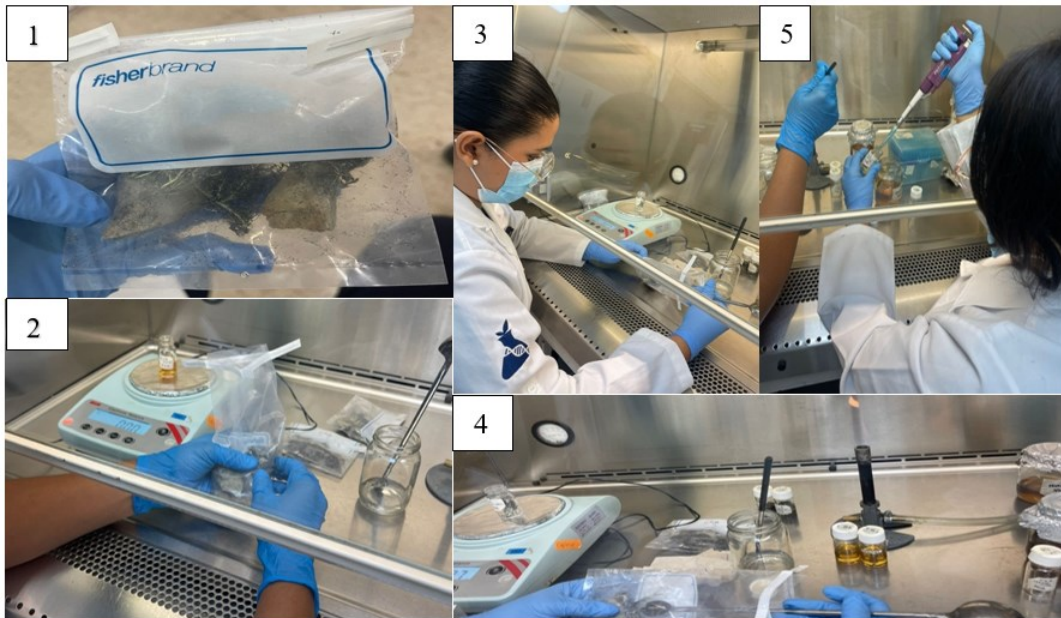
- phenotypic characterization of the antarctic psychrotolerant strain pseudomonas sp. MPC6 reveals unique metabolic features, plasticity, and biotechnological potential. *Frontiers in Microbiology*, 10, 453423.
- Ortiz, M. y Leung, P. M. y Shelley, G. y Jirapanjawat, T. y Nauer, P. A. y Van Goethem, M. W. y Bay, S. K. y Islam, Z. F. y Jordaan, K. y Vikram, S. y Chown, S. L. y Hogg, I. D. y Makhalanyane, T. P. y Grinter, R. y Cowan, D. A. y Greening, C. (2021). Multiple energy sources and metabolic strategies sustain microbial diversity in Antarctic desert soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(45), e2025322118.
- Özdoğan, D. K. y Akçelik, N. y Akçelik, M. (2022). Genetic Diversity and Characterization of Plant Growth-Promoting Effects of Bacteria Isolated from Rhizospheric Soils. *Current Microbiology*, 79(5), 1–11.
- Papale, M. y Caruso, G. y Maimone, G. y La Ferla, R. y Lo Giudice, A. y Rappazzo, A. C. y Cosenza, A. y Azzaro, F. y Ferretti, R. y Paranhos, R. y Cabral, A. S. y Caccia, M. y Odetti, A. y Zappalà, G. y Bruzzone, G. y Azzaro, M. (2023). Microbial Community Abundance and Metabolism Close to the Ice-Water Interface of the Blomstrandbreen Glacier (Kongsfjorden, Svalbard): A Sampling Survey Using an Unmanned Autonomous Vehicle. *Water (Switzerland)*, 15(3). <https://doi.org/10.3390/W15030556>
- Paz, F. A. y Parellada, E. A. y Mónica, ; y y Palma, G. A. y Coria, M. S. (2023). Análisis comparativo de métodos de extracción de ADN en semillas de algodón (*Gossypium hirsutum*). *Revista Agronómica del Noroeste Argentino*, 43(1), 56–62.
- Pekosz, A. y Parvu, V. y Li, M. y Andrews, J. C. y Manabe, Y. C. y Kodsí, S. y Gary, D. S. y Roger-Dalbert, C. y Leitch, J. y Cooper, C. K. (2021). Antigen-Based Testing but Not Real-Time Polymerase Chain Reaction Correlates with Severe Acute Respiratory Syndrome

- Coronavirus 2 Viral Culture. *Clinical Infectious Diseases*, 73(9), e2861–e2866.
<https://doi.org/10.1093/CID/CIAA1706>
- Penn, C. J. y Camberato, J. J. (2019). A Critical Review on Soil Chemical Processes that Control How Soil pH Affects Phosphorus Availability to Plants. *Agriculture 2019*, Vol. 9, Page 120, 9(6), 120. <https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE9060120>
- Ramiro, S. y Teresa, E. y Wladimir, V. y Miguel, L. (2021). *Ediciones INCA*.
<http://ediciones.inca.edu.cu>
- Rana, K. L. y Kour, D. y Sheikh, I. y Yadav, N. y Yadav, A. N. y Kumar, V. y Singh, B. P. y Dhaliwal, H. S. y Saxena, A. K. (2019a). *Biodiversity of Endophytic Fungi from Diverse Niches and Their Biotechnological Applications*. 105–144. https://doi.org/10.1007/978-3-030-03589-1_6/COVER
- Rana, K. L. y Kour, D. y Sheikh, I. y Yadav, N. y Yadav, A. N. y Kumar, V. y Singh, B. P. y Dhaliwal, H. S. y Saxena, A. K. (2019b). *Biodiversity of Endophytic Fungi from Diverse Niches and Their Biotechnological Applications*. 105–144. https://doi.org/10.1007/978-3-030-03589-1_6
- Rawat, P. y Das, S. y Shankhdhar, D. y Shankhdhar, S. C. (2020). Phosphate-Solubilizing Microorganisms: Mechanism and Their Role in Phosphate Solubilization and Uptake. *of Soil Science and Plant Nutrition 2020 21:1*, 21(1), 49–68. <https://doi.org/10.1007/S42729-020-00342-7>
- Silva, L. I. da y Pereira, M. C. y Carvalho, A. M. X. de y Buttrós, V. H. y Pasqual, M. y Dória, J. (2023). Phosphorus-Solubilizing Microorganisms: A Key to Sustainable Agriculture. *Agriculture 2023*, Vol. 13, Page 462, 13(2), 462.
<https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE13020462>
- Souto, L. A. (2020). *Microrganismos solubilizadores de : Usos e potencialidades na agricultura*.

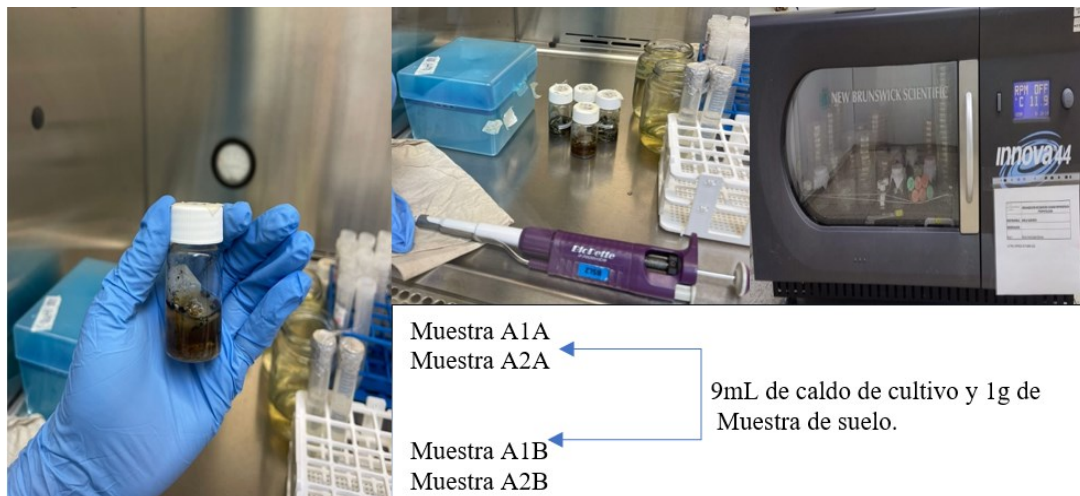
- Tang, X. y Zhang, C. y Yu, Y. y Shen, J. y van der Werf, W. y Zhang, F. (2021). Intercropping legumes and cereals increase phosphorus use efficiency, a meta-analysis. *Plant and Soil*, 460(1–2), 89–104. <https://doi.org/10.1007/S11104-020-04768-X/FIGURES/10>
- Universidad de Chile. (2020). *Descubren en la Antártica bacterias hiper resistentes que podrían significar un riesgo para la salud global*. <https://uchile.cl/noticias/186801/chilenos-descubren-bacterias-hiper-resistentes-en-la-antartica>
- Vadivel, R. y Nirmala, M. y Anbukumaran, K. (2021). Commonly available, everyday materials as non-conventional powders for the visualization of latent fingerprints. *Forensic Chemistry*, 24. <https://doi.org/10.1016/j.forc.2021.100339>
- Vargas-Barrante, P. y Castro-Barquero, L. y Vargas-Barrante, P. y Castro-Barquero, L. (2019). Aislamiento y evaluación de microorganismos solubilizadores de fósforo de Andisoles de Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 43(1), 47–68. <https://doi.org/10.15517/RAC.V43I1.35649>
- Villegas Castagnasso, E. E. y Posik, D. M. y Crespi, J. A. y Catanesi, C. I. y Villegas Castagnasso, E. E. (2021). Marcadores genéticos: Introducción al análisis y su aplicación en diversas áreas biológicas. *Elementos De Genética Para Estudiantes De Ciencias Biológicas*, 151–170.
- Wang, S. y Zhu, Y. y Yang, Y. y Li, J. y Hoffmann, M. R. (2020). Electrochemical cell lysis of gram-positive and gram-negative bacteria: extraction from environmental water samples. *Electrochimica Acta*, 338, 135864. <https://doi.org/10.1016/J.ELECTACTA.2020.135864>
- Wei, Y. y Wei, Z. y Cao, Z. y Zhao, Y. y Zhao, X. y Lu, Q. y Wang, X. y Zhang, X. (2016). A regulating method for the distribution of phosphorus fractions based on environmental parameters related to the key phosphate-solubilizing bacteria during composting. *Bioresource Technology*, 211, 610–617. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.03.141>

- Wu, Z. y Wei, W. y Zhou, Y. y Guo, H. y Zhao, J. y Liao, Q. y Chen, L. y Zhang, X. y Zhou, L. (2020). Integrated Quantitative Proteomics and Metabolome Profiling Reveal MSMEG_6171 Overexpression Perturbing Lipid Metabolism of *Mycobacterium smegmatis* Leading to Increased Vancomycin Resistance. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01572/FULL>
- Yadav, A. N. y Kour, D. y Sharma, S. y Sachan, S. G. y Singh, B. y Chauhan, V. S. y Sayyed, R. Z. y Kaushik, R. y Saxena, A. K. (2019). *Psychrotrophic Microbes: Biodiversity, Mechanisms of Adaptation, and Biotechnological Implications in Alleviation of Cold Stress in Plants*. 219–253. https://doi.org/10.1007/978-981-13-6536-2_12
- Yepes-Pérez, M. y Carrero, K. y Vásquez, N. y Correa, E. y Yepes-Pérez, M. y Carrero, K. y Vásquez, N. y Correa, E. (2022). Validación de PCR convencional para detectar *E. coli* O157. *Información tecnológica*, 33(2), 3–12. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642022000200003>
- Zhang, P. y Seth, A. y Fernández, H. (2014). Other Post-PCR Detection Technologies. *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms*, 4074–4088. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.07707-8>

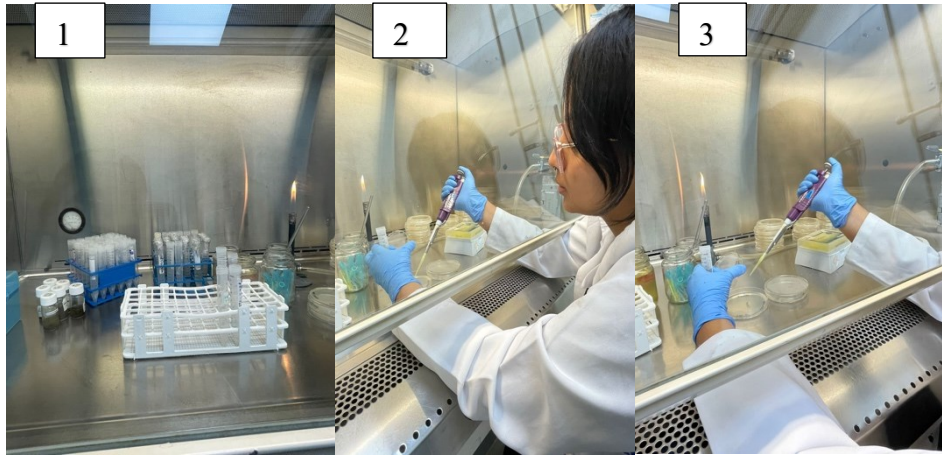
ANEXOS



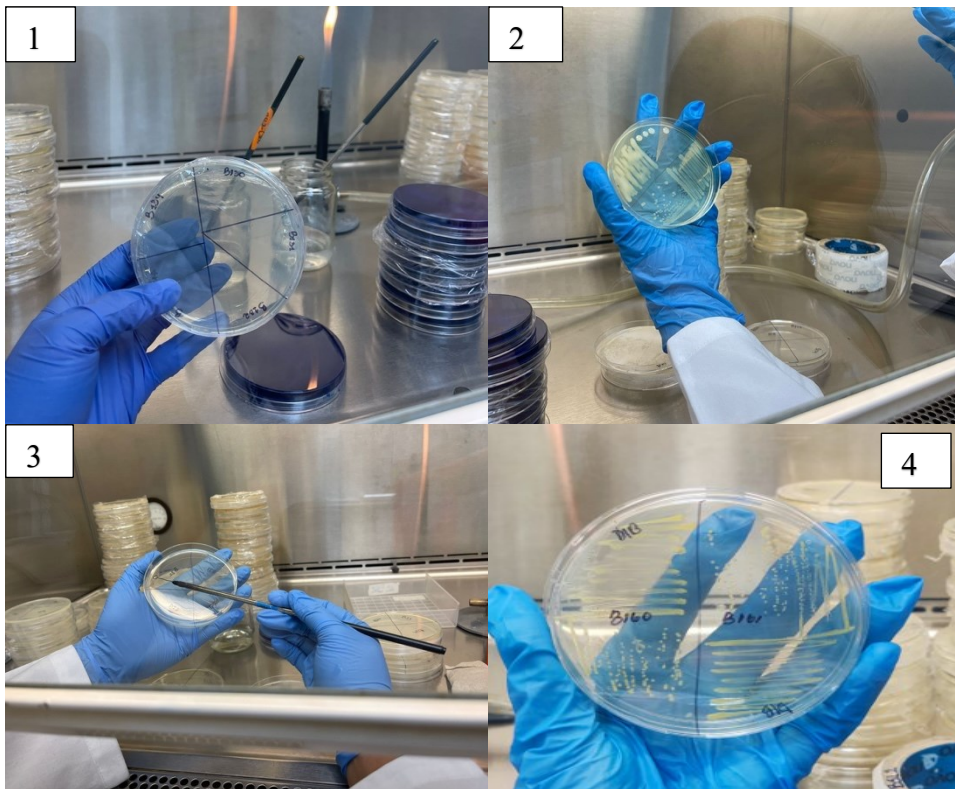
Anexo 1. Se reactivaron muestras de suelo que se encontraban en -20°C con medios LB para bacterias.



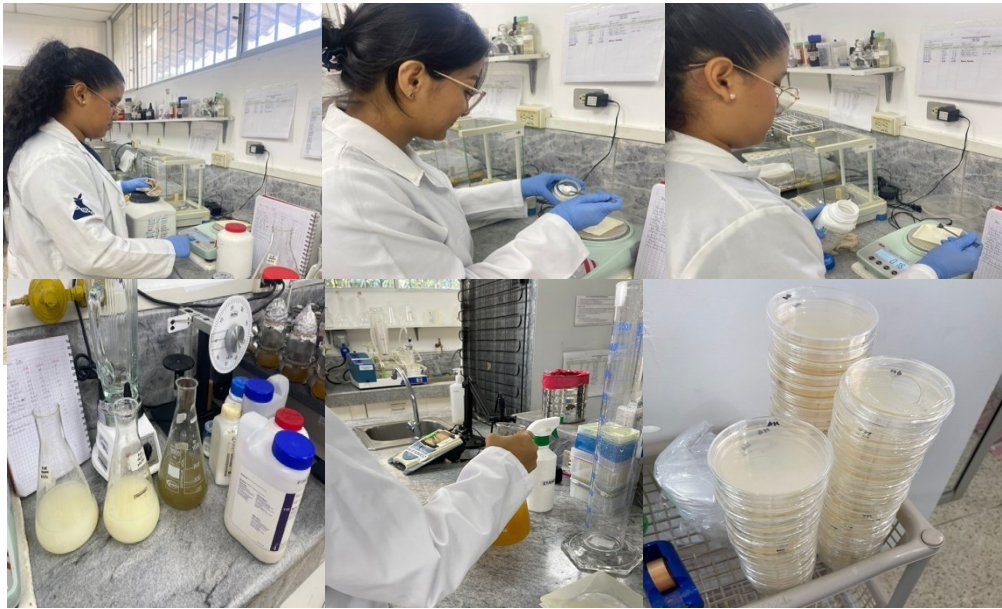
Anexo 2. Reactivación de muestras de suelo en LB y Glicerol muestras en tiempos diferentes se encubo durante 10 días a -10°C en el equipo New Brunswick Innova® 44/44R - Stackable Incubator Shaker.



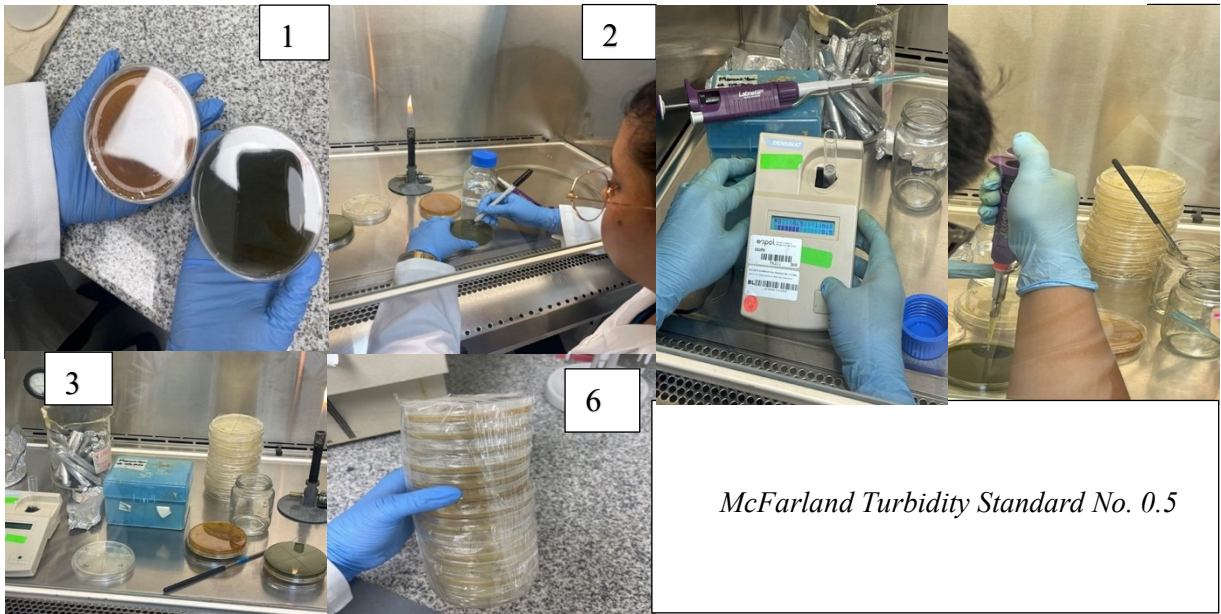
Anexo 3. Se colocó 50 μ L de la dilución en medio de Agar nutritivo (AN) para bacterias. Las muestras se mantuvieron durante 7 días a -10°C (New Brunswick Innova® 44/44R - Stackable Incubator Shake).



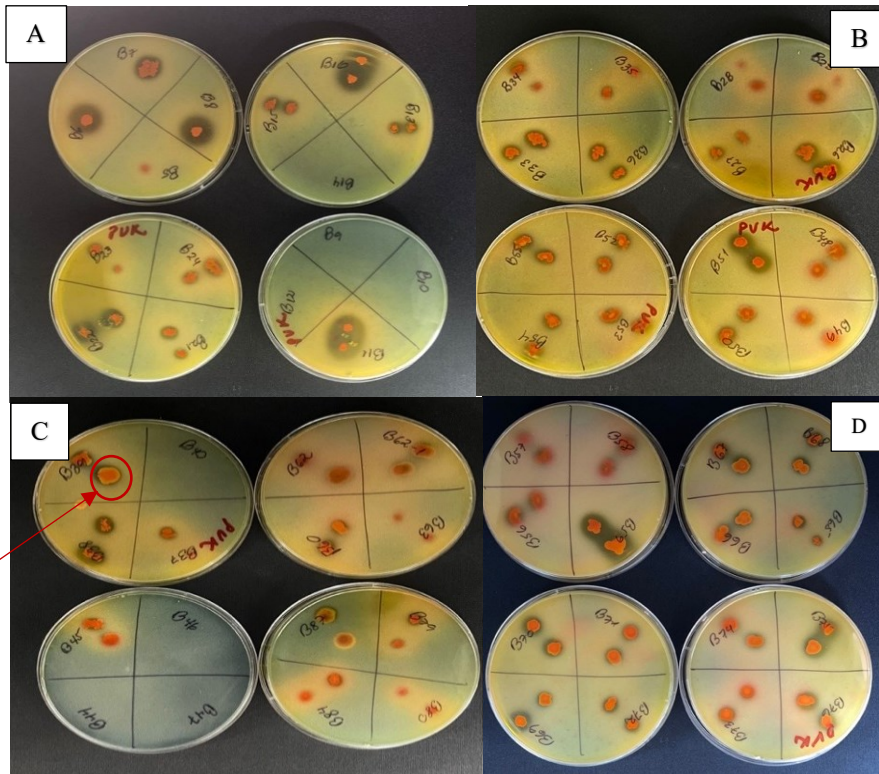
Anexo 4. Siembra por Agotamiento y aislamiento de los microorganismos.



Anexo 5. Preparación de medios específicos para aislar bacterias de las muestras provenientes de la Antártida.



Anexo 6. Diluciones ajustadas o de concentración “Mc Farland” y evaluación de la capacidad solubilizadoras y valoración de su eficiencia de manera *in vitro*.

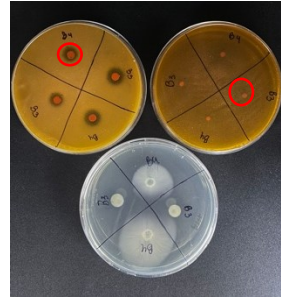


Anexo 7. Primer ensayo donde se colocó 2 μ L para verificar la capacidad de solubilización de bacterias psicrófilas.

Tabla 7. Formación de halos de solubilización con bacterias psicrófilas aislados de suelos de la Antártida.

BACTERIAS SOLUBILIZADORAS	IMAGEN
B2- ROCA	
B2- PVK	

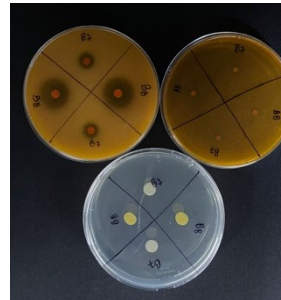
B3 - PVK
B3 - ROCA
B4 - ROCA
B4 - PVK



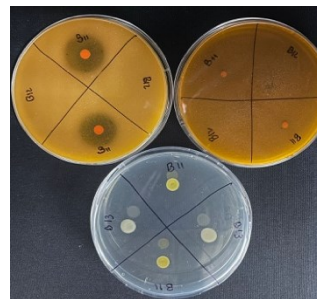
B5 - PVK
B5 - ROCA
B6 - ROCA
B6 - PVK



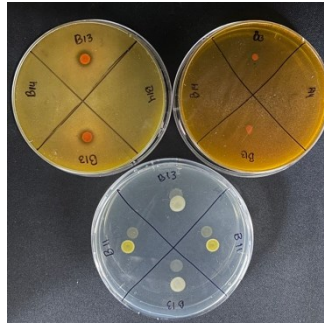
B7 - PVK
B7 - ROCA
B8 - ROCA
B8 - PVK



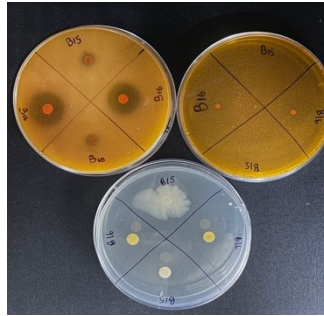
B11 - PVK
B11 - ROCA



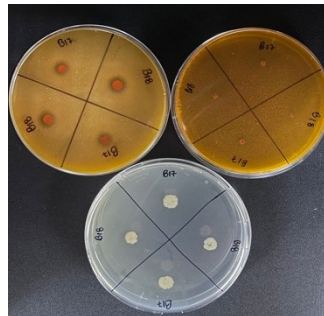
B13 - PVK
B13 - ROCA



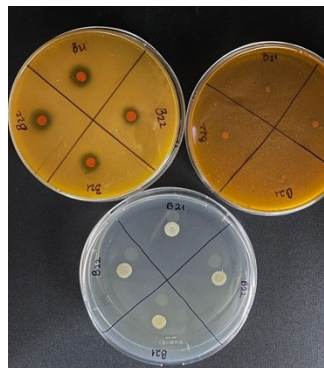
B15 - PVK
B16 - PVK
B16 - ROCA



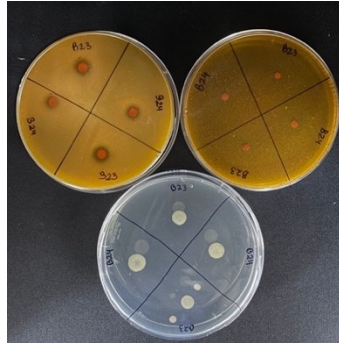
B17 - PVK
B17 - ROCA
B18 - ROCA
B18 - PVK



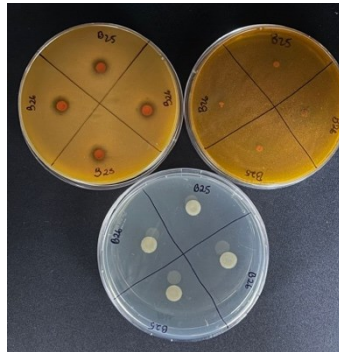
B21 - PVK
B21 - ROCA
B22 - ROCA
B22 - PVK



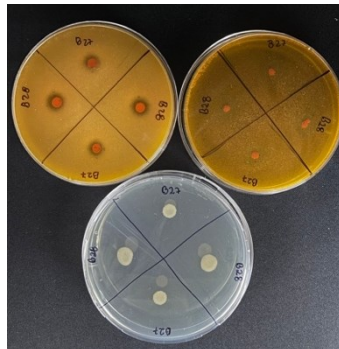
B23 - PVK
B23 - ROCA
B24 - ROCA
B24 - PVK



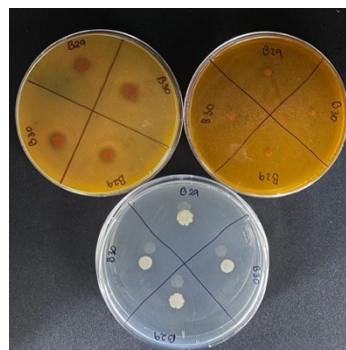
B23 - PVK
B23 - ROCA
B24 - ROCA
B24 - PVK



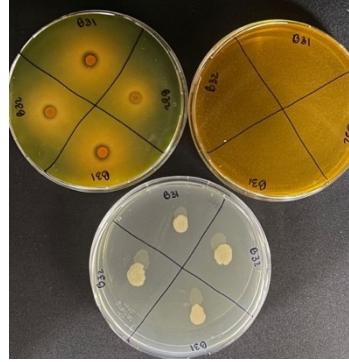
B27 - PVK
B27 - ROCA
B28 - ROCA
B28 - PVK



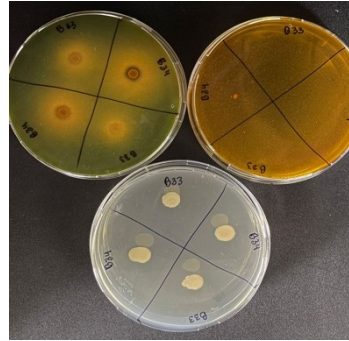
B29 - PVK
B29 - ROCA
B30 - ROCA
B30 - PVK



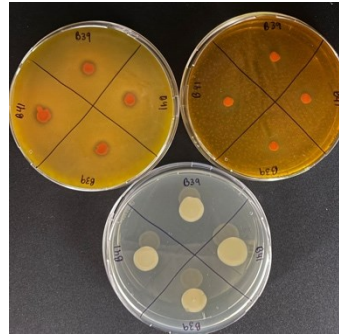
B31 - PVK



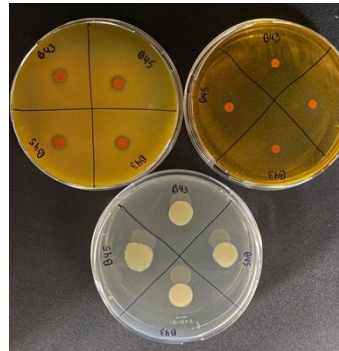
**B33 - PVK
B34 - PVK
B34 - ROCA**

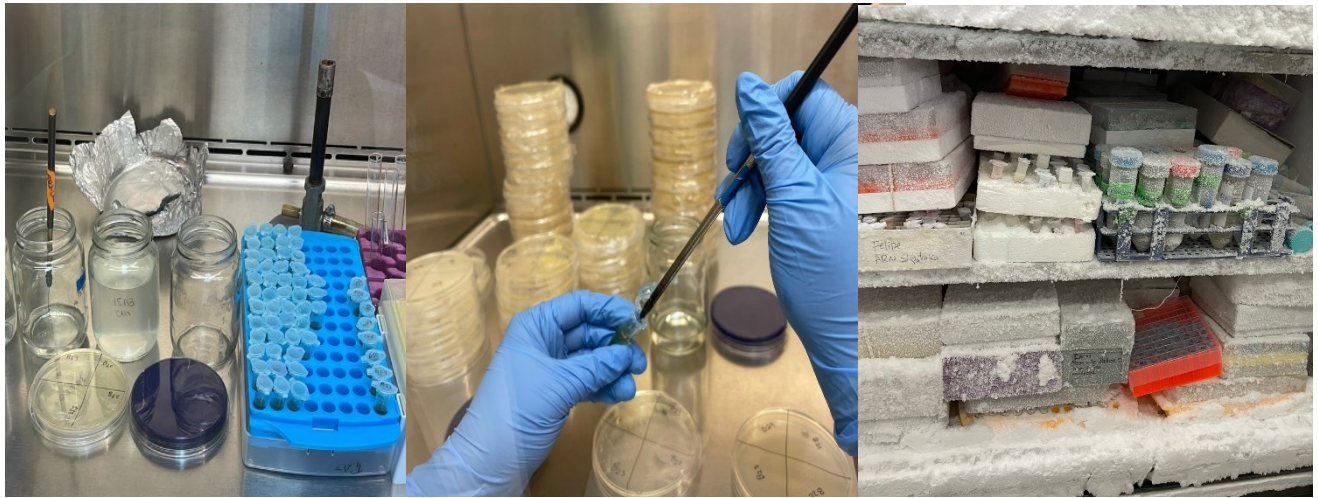


**B41 - PVK
B41 - ROCA
B39 - PVK
B39 - ROCA**



**B43 - PVK
B43 - ROCA
B45 - PVK
B45 - ROCA**





Anexo 8. Conservación de bacterias en LB+Glicerol y colocadas a -80°C para criopreservación hasta 3 años.



Anexo 9. PCR convencional para amplificar el gen ARNr 16S de bacterias psicrófilas antárticas.



Anexo 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% el proceso fue realizado en la cámara de electroforesis horizontal, y sus resultados fueron leídos en el Invitrogen™ Transiluminador de luz azul/blanca de LED doble.

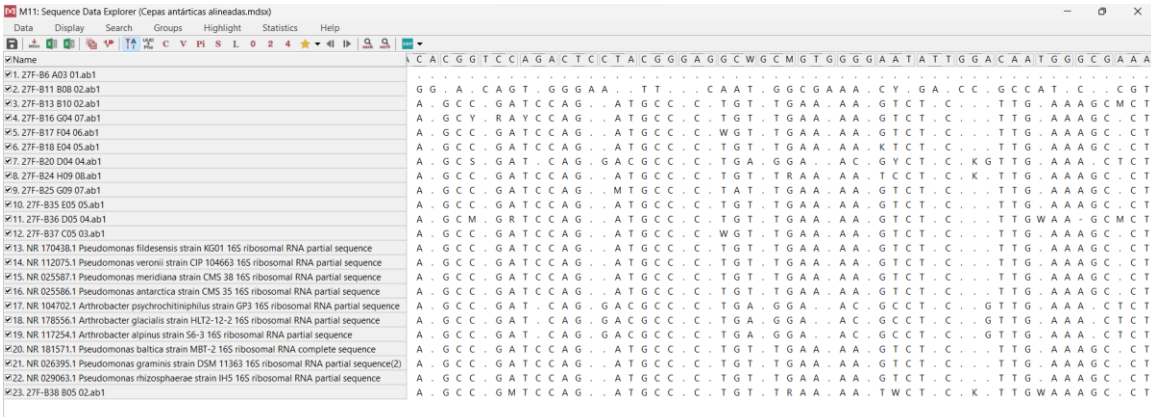


Anexo 11. Evaluación y calidad de ADN con NanoDrop 2000 Thermo Scientific.

COTIZACIÓN #: LINV-C-BM-SEC-22-265
FECHA: 18 julio 2022
VALIDEZ: 30 días

CLIENTE: ESPOL
ATENCIÓN: Maria Fernanda Ratti Torres
E-MAIL: mratti@espol.edu.ec

Anexo 12. Evidencia de secuenciación, Laboratorios de Investigación. UDLA.



Anexo 13. Secuencias alineadas ‘Bacterias antárticas y secuencias obtenidas de la base de datos BLAST en el programa MEGA 11.

Tabla 8. Cálculos empleados con la fórmula de índice de solubilización, y medición del halo (mm).

	PVK			ROCA			CONTROL	
	CEPAS	B (mm)	A (mm)	IS	B (mm)	A (mm)	IS	A (mm)
B1	NO SOLUBILIZA							
B2								
	1	12	6	3	5	3	2,66666667	10
	2	12	5	3,4	5	3	2,66666667	8
	1	10	6	2,66666667	5	3	2,66666667	8
	2	11	5	3,2	5	3	2,66666667	8
B3								
	1	10	5	3	5	3	2,66666667	8
	2	8	5	2,6	6	3	3	8
	1	9	4	3,25	6	3	3	8
	2	9	5	2,8	5	3	2,66666667	8
B4								
	1	10	5	3	5	2	3,5	7

2	9	5	2,8	5	2	3,5	6
1	10	5	3	6	2	4	7
2	11	5	3,2	6	2	4	6
B5							
1	11	6	2,83333333	4	3	2,33333333	6
2	12	7	2,71428571	4	3	2,33333333	6
1	11	6	2,83333333	5	4	2,25	6
2	13	6	3,16666667	5	4	2,25	6
B6							
1	20	7	3,85714286	6	5	2,2	7
2	22	6	4,66666667	4	3	2,33333333	7
1	21	9	3,33333333	5	4	2,25	7
2	20	6	4,33333333	5	4	2,25	7
B7							
1	11	5	3,2	7	3	3,33333333	8
2	10	6	2,66666667	7	3	3,33333333	8
1	10	5	3	7	3	3,33333333	8
2	11	6	2,83333333	6	3	3	8
B8							
1	15	5	4	7	3	3,33333333	8
2	18	5	4,6	6	3	3	8
1	16	6	3,66666667	7	3	3,33333333	8
2	14	6	3,33333333	6	3	3	8
B9							
NO SOLUBILIZA							
B10							
NO SOLUBILIZA							
B11							
1	20	5	5	6	3	3	7
2	21	6	4,5	7	3	3,33333333	7
1	17	5	4,4	6	3	3	7
2	18	5	4,6	7	3	3,33333333	7
B12							
NO SOLUBILIZA							
B13							
1	10	5	3	7	3	3,33333333	8
2	9	5	2,8	7	3	3,33333333	8
1	10	6	2,66666667	7	5	2,4	9
2	10	5	3	7	3	3,33333333	9
B14							
NO SOLUBILIZA							
B15							
1	8	5	2,6	NO SOLUBILIZA			7
2	7	5	2,4				6
1	9	5	2,8				5
2	10	5	3				5
B16							
1	20	4	6	4	3	2,33333333	6

2	15	5	4	4	3	2,33333333	6
1	17	5	4,4	4	5	1,8	6
2	18	5	4,6	4	3	2,33333333	6
B17							
1	9	5	2,8	5	4	2,25	8
2	9	4	3,25	5	3	2,66666667	8
1	8	4	3	5	3	2,66666667	8
2	9	4	3,25	5	3	2,66666667	7
B18							
1	10	6	2,66666667	4	2	3	7
2	9	5	2,8	4	2	3	7
1	10	5	3	4	2	3	7
2	10	5	3	4	2	3	7
B19							
NO SOLUBILIZA							
B20							
NO SOLUBILIZA							
B21							
1	10	5	3	5	3	2,66666667	7
2	11	6	2,83333333	5	3	2,66666667	7
1	10	5	3	6	4	2,5	7
2	10	5	3	6	4	2,5	7
B22							
1	10	5	3	7	3	3,33333333	7
2	10	5	3	7	3	3,33333333	7
1	10	5	3	7	3	3,33333333	7
2	9	5	2,8	7	3	3,33333333	7
B23							
1	10	4	3,5	7	3	3,33333333	8
2	9	5	2,8	7	3	3,33333333	8
1	10	5	3	7	3	3,33333333	7
2	11	4	3,75	7	3	3,33333333	7
B24							
1	9	4	3,25	7	3	3,33333333	9
2	9	4	3,25	6	3	3	9
1	10	5	3	7	3	3,33333333	8
2	9	5	2,8	7	3	3,33333333	8
B25							
1	9	5	2,8	7	3	3,33333333	8
2	9	6	2,5	7	3	3,33333333	8
1	10	5	3	7	3	3,33333333	8
2	10	5	3	7	3	3,33333333	8
B26							
1	10	5	3	7	3	3,33333333	8
2	10	5	3	7	3	3,33333333	8
1	10	5	3	6	3	3	8

2	11	5	3,2	5	3	2,6666667	9
B27							
1	9	5	2,8	7	3	3,3333333	7
2	10	6	2,6666667	3	4	1,75	7
1	10	5	3	7	3	3,3333333	7
2	10	5	3	7	3	3,3333333	7
B28							
1	11	5	3,2	10	6	2,6666667	8
2	10	5	3	5	3	2,6666667	10
1	10	5	3	6	3	3	9
2	10	6	2,6666667	6	3	3	9
B29							
1	10	6	2,6666667	6	3	3	9
2	10	5	3	6	3	3	8
1	9	5	2,8	7	4	2,75	8
2	10	5	3	7	4	2,75	8
B30							
1	10	5	3	6	3	3	7
2	11	5	3,2	6	3	3	7
1	10	5	3	6	4	2,5	7
2	11	5	3,2	6	4	2,5	7
B31							
1	10	5	3	8	3	3,6666667	7
2	9	5	2,8	8	3	3,6666667	7
1	10	5	3	8	3	3,6666667	7
2	10	5	3	8	3	3,6666667	10
B32							
1	10	5	3	9	4	3,25	11
2	10	5	3	9	4	3,25	8
1	9	4	3,25	8	4	3	10
2	9	5	2,8	8	4	3	8
B33							
1	9	5	2,8	9	4	3,25	10
2	9	5	2,8	9	4	3,25	8
1	9	4	3,25	8	4	3	10
2	8	4	3	8	4	3	8
B34							
1	6	5	2,2	8	4	3	8
2	9	5	2,8	8	4	3	10
1	9	5	2,8	8	4	3	8
2	9	5	2,8	8	4	3	10
B35							
1	8	4	3	8	4	3	10
2	8	4	3	8	4	3	9
1	8	4	3	8	4	3	10

2	8	4	3	8	4	3	9
B36							
1	10	4	3,5	9	4	3,25	7
2	10	4	3,5	9	4	3,25	7
1	9	4	3,25	9	4	3,25	7
2	9	4	3,25	9	4	3,25	7
B37							
1	7	5	2,4	6	4	2,5	7
2	8	5	2,6	6	4	2,5	7
1	7	5	2,4	6	4	2,5	8
2	7	5	2,4	6	4	2,5	6
B38							
1	7	5	2,4	7	4	2,75	10
2	7	5	2,4	7	4	2,75	9
1	8	5	2,6	6	4	2,5	9
2	8	5	2,6	6	4	2,5	8
B39							
1	9	6	2,5	10	5	3	13
2	10	5	3	11	4	3,75	13
1	10	5	3	10	5	3	14
2	10	6	2,66666667	10	5	3	13
B40 NO SOLUBILIZA							
B41							
1	12	9	2,33333333	9	4	3,25	13
2	15	9	2,66666667	9	4	3,25	13
1	10	7	2,42857143	10	5	3	16
2	12	8	2,5	10	5	3	16
B42 NO SOLUBILIZA							
B43							
1	9	5	2,8	9	4	3,25	13
2	9	5	2,8	9	4	3,25	13
1	10	5	3	9	5	2,8	13
2	10	5	3	9	5	2,8	12
B44 NO SOLUBILIZA							
B45							
1	9	5	2,8	9	4	3,25	16
2	9	5	2,8	9	4	3,25	14
1	9	5	2,8	9	5	2,8	14
2	9	6	2,5	9	5	2,8	14
B46 NO SOLUBILIZA							
B47 NO SOLUBILIZA							

Análisis de la varianza

FUENTE DE FOSFORO	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
EVK	LN IS	48	0,89	0,86	7,22

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2,07	11	0,19	26,64	<0,0001
CEPA	2,07	11	0,19	26,64	<0,0001
Error	0,25	36	0,01		
Total	2,32	47			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,20741

Error: 0,0071 gl: 36

CEPA Medias n E.E.

B37	0,90	4	0,04	A
B38	0,92	4	0,04	A B
B25	1,04	4	0,04	A B C
B13	1,05	4	0,04	A B C
B18	1,05	4	0,04	A B C
B35	1,10	4	0,04	A B C
B24	1,12	4	0,04	B C
B17	1,12	4	0,04	B C
B36	1,22	4	0,04	C D
B6	1,39	4	0,04	D E
B11	1,53	4	0,04	E
B16	1,55	4	0,04	E

A

B

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

FUENTE DE FOSFORO	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ROCA	LN IS	48	0,84	0,79	6,86

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,96	11	0,09	17,19	<0,0001
CEPA	0,96	11	0,09	17,19	<0,0001
Error	0,18	36	0,01		
Total	1,14	47			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,17558

Error: 0,0051 gl: 36

CEPA Medias n E.E.

B16	0,78	4	0,04	A
B6	0,81	4	0,04	A B
B37	0,92	4	0,04	A B
B17	0,94	4	0,04	A B C
B38	0,96	4	0,04	B C D
B35	1,10	4	0,04	C D E
B18	1,10	4	0,04	C D E
B13	1,12	4	0,04	D E
B11	1,15	4	0,04	E
B24	1,18	4	0,04	E
B36	1,18	4	0,04	E
B25	1,20	4	0,04	E

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

Anexo 14. A) Análisis de varianza para medio con Fosfato tricálcico . B) Análisis de varianza para medio con Roca fosfórica.

Tabla 9. Prueba de Tukey ($p > 0,05$) significancia estadística, para el análisis de cada cepa aislada.

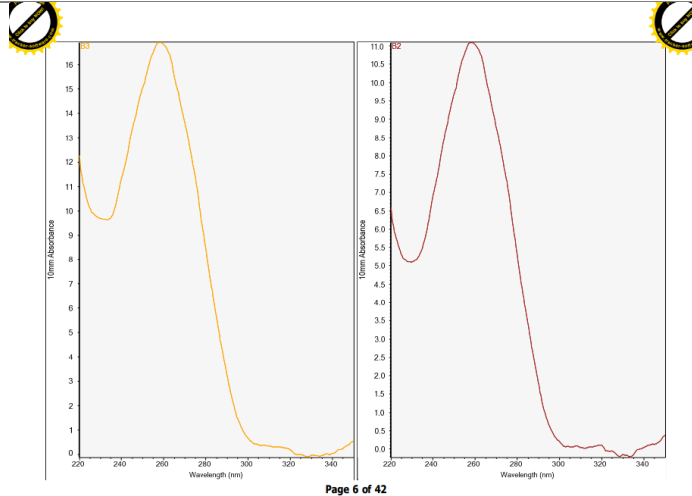
CEP	SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA										
A											
B6	<p>Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,71547 Error: 0,1710 gl: 6 FUENTE DE FOSFORO Medias n E.E.</p> <table border="1"> <tr> <td>ROCA</td> <td>2,26</td> <td>4</td> <td>0,21</td> <td>A</td> </tr> <tr> <td>PVK</td> <td>4,05</td> <td>4</td> <td>0,21</td> <td>B</td> </tr> </table> <p>Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)</p>	ROCA	2,26	4	0,21	A	PVK	4,05	4	0,21	B
ROCA	2,26	4	0,21	A							
PVK	4,05	4	0,21	B							
B11	<p>Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,10047 Error: 0,0034 gl: 6 FUENTE DE FOSFORO Medias n E.E.</p> <table border="1"> <tr> <td>ROCA</td> <td>1,15</td> <td>4</td> <td>0,03</td> <td>A</td> </tr> <tr> <td>PVK</td> <td>1,53</td> <td>4</td> <td>0,03</td> <td>B</td> </tr> </table> <p>Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)</p>	ROCA	1,15	4	0,03	A	PVK	1,53	4	0,03	B
ROCA	1,15	4	0,03	A							
PVK	1,53	4	0,03	B							
B13	<p>Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,21212 Error: 0,0150 gl: 6 FUENTE DE FOSFORO Medias n E.E.</p> <table border="1"> <tr> <td>PVK</td> <td>1,05</td> <td>4</td> <td>0,06</td> <td>A</td> </tr> <tr> <td>ROCA</td> <td>1,12</td> <td>4</td> <td>0,06</td> <td>A</td> </tr> </table> <p>Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)</p>	PVK	1,05	4	0,06	A	ROCA	1,12	4	0,06	A
PVK	1,05	4	0,06	A							
ROCA	1,12	4	0,06	A							
B16	<p>Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,26468 Error: 0,0234 gl: 6 FUENTE DE FOSFORO Medias n E.E.</p> <table border="1"> <tr> <td>ROCA</td> <td>0,78</td> <td>4</td> <td>0,08</td> <td>A</td> </tr> <tr> <td>PVK</td> <td>1,55</td> <td>4</td> <td>0,08</td> <td>B</td> </tr> </table> <p>Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)</p>	ROCA	0,78	4	0,08	A	PVK	1,55	4	0,08	B
ROCA	0,78	4	0,08	A							
PVK	1,55	4	0,08	B							
B17	<p>Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,13673 Error: 0,0062 gl: 6 FUENTE DE FOSFORO Medias n E.E.</p> <table border="1"> <tr> <td>ROCA</td> <td>0,94</td> <td>4</td> <td>0,04</td> <td>A</td> </tr> <tr> <td>PVK</td> <td>1,12</td> <td>4</td> <td>0,04</td> <td>B</td> </tr> </table> <p>Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)</p>	ROCA	0,94	4	0,04	A	PVK	1,12	4	0,04	B
ROCA	0,94	4	0,04	A							
PVK	1,12	4	0,04	B							
B18	<p>Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,06969 Error: 0,0016 gl: 6 FUENTE DE FOSFORO Medias n E.E.</p> <table border="1"> <tr> <td>PVK</td> <td>1,05</td> <td>4</td> <td>0,02</td> <td>A</td> </tr> <tr> <td>ROCA</td> <td>1,10</td> <td>4</td> <td>0,02</td> <td>A</td> </tr> </table> <p>Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)</p>	PVK	1,05	4	0,02	A	ROCA	1,10	4	0,02	A
PVK	1,05	4	0,02	A							
ROCA	1,10	4	0,02	A							
B24	<p>Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,10867 Error: 0,0039 gl: 6 FUENTE DE FOSFORO Medias n E.E.</p> <table border="1"> <tr> <td>PVK</td> <td>1,12</td> <td>4</td> <td>0,03</td> <td>A</td> </tr> <tr> <td>ROCA</td> <td>1,18</td> <td>4</td> <td>0,03</td> <td>A</td> </tr> </table> <p>Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)</p>	PVK	1,12	4	0,03	A	ROCA	1,18	4	0,03	A
PVK	1,12	4	0,03	A							
ROCA	1,18	4	0,03	A							

B25	<p>Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,10527 Error: 0,0037 gl: 6 FUENTE DE FOSFORO Medias n E.E.</p> <table border="1"> <tr> <td>PVK</td> <td>1,04</td> <td>4</td> <td>0,03</td> <td>A</td> </tr> <tr> <td>ROCA</td> <td>1,20</td> <td>4</td> <td>0,03</td> <td>B</td> </tr> </table> <p>Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)</p>	PVK	1,04	4	0,03	A	ROCA	1,20	4	0,03	B
PVK	1,04	4	0,03	A							
ROCA	1,20	4	0,03	B							
B36	<p>Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,05235 Error: 0,0009 gl: 6 FUENTE DE FOSFORO Medias n E.E.</p> <table border="1"> <tr> <td>ROCA</td> <td>1,18</td> <td>4</td> <td>0,02</td> <td>A</td> </tr> <tr> <td>PVK</td> <td>1,22</td> <td>4</td> <td>0,02</td> <td>A</td> </tr> </table> <p>Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)</p>	ROCA	1,18	4	0,02	A	PVK	1,22	4	0,02	A
ROCA	1,18	4	0,02	A							
PVK	1,22	4	0,02	A							
B37	<p>Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,04896 Error: 0,0008 gl: 6 FUENTE DE FOSFORO Medias n E.E.</p> <table border="1"> <tr> <td>PVK</td> <td>0,90</td> <td>4</td> <td>0,01</td> <td>A</td> </tr> <tr> <td>ROCA</td> <td>0,92</td> <td>4</td> <td>0,01</td> <td>A</td> </tr> </table> <p>Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)</p>	PVK	0,90	4	0,01	A	ROCA	0,92	4	0,01	A
PVK	0,90	4	0,01	A							
ROCA	0,92	4	0,01	A							
B38	<p>Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,08792 Error: 0,0026 gl: 6 FUENTE DE FOSFORO Medias n E.E.</p> <table border="1"> <tr> <td>PVK</td> <td>0,92</td> <td>4</td> <td>0,03</td> <td>A</td> </tr> <tr> <td>ROCA</td> <td>0,96</td> <td>4</td> <td>0,03</td> <td>A</td> </tr> </table> <p>Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)</p>	PVK	0,92	4	0,03	A	ROCA	0,96	4	0,03	A
PVK	0,92	4	0,03	A							
ROCA	0,96	4	0,03	A							

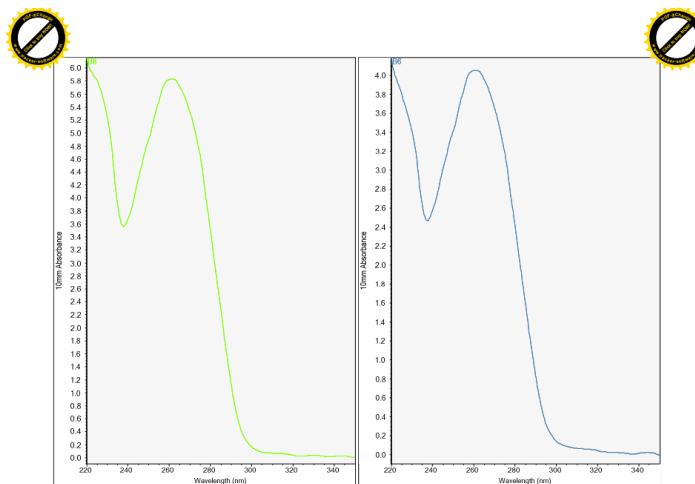
Tabla 10. Gráficas de validación de calidez a productos de PCR de bacterias psicrófilas antárticas aisladas.

**CEPA
B2, B3**

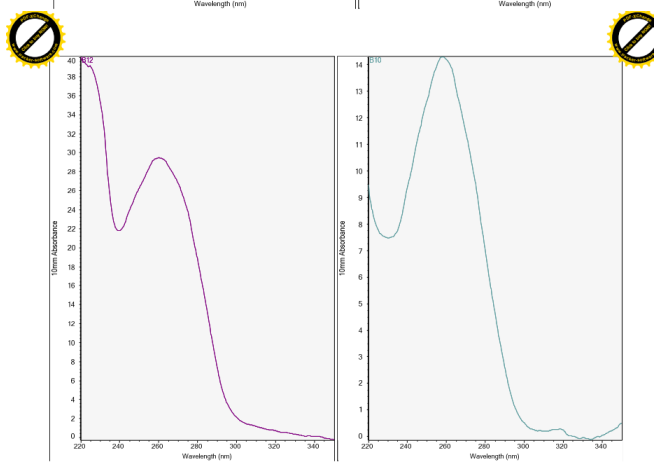
CANTIDAD Y CALIDEZ DE ADN



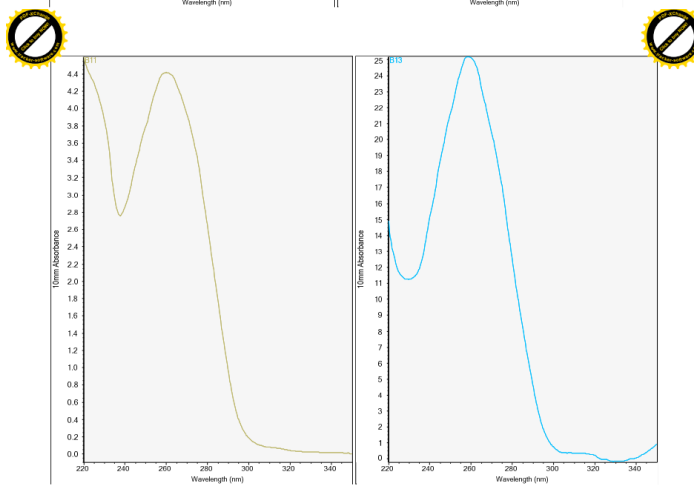
B6, B8



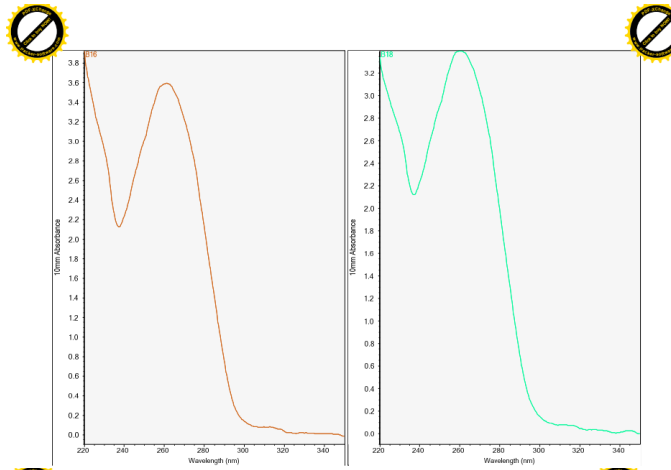
B10, B12



B11, B13



B16, B18



B35, B38

