

Contenido

CAPITULO I: Introducción	4
1.1 Objetivos.....	6
1.1.1 Objetivo General	6
1.1.2 Objetivos Específicos.....	6
1.2 Hipótesis de la Investigación	6
1.3 Variables de la Investigación.....	7
1.3.1 Variable independiente	7
1.3.2 Variable dependiente	7
CAPITULO II: Marco Teórico	9
2.1 Fundamento Teórico.....	9
2.1.1 Generalidades de los suelos	9
2.1.2 Generalidades del fósforo en el suelo	10
2.1.2.1 Formas del fósforo	12
2.1.2.2 Pérdidas o ganancias del fósforo.....	15
2.1.2.3 Dinámica del fósforo en el suelo.....	16
2.1.2.4 Factores que afectan la disponibilidad de fósforo en el suelo.....	17
2.1.3 Biosolubilización de fósforo	21
2.1.3.1 Ciclo microbiano para la solubilización de fósforo	21
2.1.3.2 Mecanismos de solubilización de fósforo	22
2.1.3.3 Microorganismos solubilizadores de fósforo	24
2.1.4 Producción de las mejores cepas de microorganismos solubilizadores de fósforo insoluble a nivel de laboratorio.....	25
2.1.4.1 Fundamentos del aislamiento de microorganismos solubilizadores del fósforo.....	25
2.1.4.2 Fundamentos de la selección de microorganismos solubilizadores de fósforo.....	26
2.1.4.3 Fundamentos de la cinética del crecimiento microbiano	27
2.1.5 Parámetros críticos de la biosolubilización.....	28
CAPÍTULO III: Marco Metodológico	30

3.1 Tipo de investigación.....	30
3.2 Diseño de la Investigación en el Laboratorio.	31
3.3 Técnica e instrumentos analíticos.....	32
3.3.1 Métodos Generales de Análisis.....	32
3.3.1.1 Toma de Muestras del Suelo	32
3.3.2 Métodos Específicos de Análisis	34
3.3.2.1 Producción mejores cepas de microorganismos solubilizadores de fósforo insoluble a nivel de laboratorio.....	34
CAPITULO IV: Análisis e Interpretación de resultados	42
4.1 Aislamiento de microorganismos solubilizadores de fósforo.....	42
4.1.2 Aislamiento de microorganismos solubilizadores de fósforo	43
4.2 Selección de las mejores cepas de microorganismos solubilizadores de fósforo	46
4.2.1 Selección por halo de solubilización.....	46
4.2.2 Selección de las mejores cepas solubilizadoras de fósforo por método Mo-Blue	47
4.2.1.1 Cálculo de la concentración de fósforo soluble	49
4.3 Cinética mejores cepas microorganismos solubilizadores de fósforo	54
4.3.1 Determinación de Biomasa (Peso Seco) para la cepa #3	54
4.3.2 Determinación de Biomasa (Peso Seco) para la cepa #10.....	56
4.3.3 Curva de calibración para mediciones de fósforo soluble e insoluble.....	58
4.3.4 Curvas de fósforo soluble e insoluble para cepa #3	59
4.3.5 Curvas de fósforo soluble e insoluble para cepa #10.....	61
CAPITULO V: Conclusiones y Recomendaciones	64
5.1 Conclusiones.....	64
5.2 Recomendaciones	65
6. Referencias Bibliográficas	67

CAPITULO I

Introducción

CAPITULO I: Introducción

El uso de microorganismos para la remediación y tratamiento como solución a problemas de contaminación ambiental, es cada vez una de las opciones más viables tanto técnica como económicamente. Entre las cuales está la aplicación de bacterias u hongos como promotores de crecimiento vegetal y facilitadores de la disposición de los nutrientes esenciales para las plantas.

Estos microorganismos son capaces de establecerse en el suelo, aportando benéficamente en el ciclo del fósforo u otros requerimientos nutricionales; transformando sus formas no asimilables en asimilables para las plantas, generando a la par un control biológico y aportando para que los suelos no sufran la degradación por la aplicación de productos químicos como fertilizantes.

En el Ecuador, las actividades agrícolas son de gran importancia económica, el 47.5% del territorio nacional son suelos agrícolas, se estima que de 12% de ellos recibe fertilizantes u otros productos químicos durante el crecimiento de los cultivos en general (Simbaña, 2010). Con el transcurso del tiempo, la aplicación de dichos productos ha producido erosión, pérdida de nutrientes disponibles para las plantas, salinización en el suelo, etc., dejándolo no apto para la agricultura o infértil. La calidad de los suelos para el cultivo de flores se evalúa principalmente bajo parámetros de fertilidad que involucra propiedades físicas como la textura y propiedades químicas más importantes como: pH, conductividad, bases totales, contenido de carbono orgánico, nitrógeno total, fósforo, acidez, alcalinidad, salinidad y la relación de absorción de sodio. Además cuenta también la presencia de microorganismos que cumplen funciones determinantes en la transformación de los componentes orgánicos e inorgánicos en elementos nutricionales que pueden absorber las plantas (Walsh, 2010). En base a estos parámetros las florícolas pueden evaluar la fertilidad de sus suelos y así determinar cuáles son los requerimientos para sustentarlos, ya sea con productos químicos que no es lo recomendable o con productos biológicos que son de menor costo y mayor efectividad. Esta florícola en Tabacundo realiza este “Asesoramiento para la fertilidad” desde el año de 1999, publicado por el Ministerio de Agricultura Holandés, que ha sido optimizado para el período de cultivo y régimen climático del Ecuador. Los estándares son:

Tabla 1.: Parámetros para control fertilidad suelo florícolas*

Valores Referencia para fertilidad del suelo	
Conductividad (mS/cm)	1.0
pH	6-7
K (ppm)	59
Ca (ppm)	70
Mg(ppm)	29
P (ppm)	4.6
Fe (ppb)	558
Mn (ppb)	110
Zn (ppb)	131
B (ppb)	162
Cu (ppb)	13
Mo (ppb)	19

En toda Latinoamérica se han publicado trabajos donde se identifican especies de bacterias y hongos que al inocularse en el suelo facilitan la disponibilidad de nutrientes como el nitrógeno, el fósforo, el sodio etc., ayudan con el control de patógenos y mejoran el crecimiento vegetal. El fósforo es un nutriente que generalmente es poco soluble pero muy importante, se requiere de 10 a 30 kg por hectárea para cultivos. Cuando se aplican fertilizantes fosfatados estos se acumulan y afectan al fósforo ya presente en el suelo porque provocan cambios de pH. Para el sector agrícola la compra de fertilizantes fosfatados representa gastar entre 2 y 3 veces más que para otros fertilizantes (Simbaña, 2010).

Por esto, esta investigación se planteó como objetivo el aislamiento, selección y estudios cinéticos de microorganismos solubilizadores de fósforo bajo ciertos parámetros. Es necesario el diseño del medio para el crecimiento selectivo de los microorganismos requeridos, para seleccionarlos se medirá cuantitativamente el fósforo solubilizado por cada cepa por el método Murphy y Riley y la determinación de la biomasa y curvas de crecimiento por el peso seco.

*Nota: No se cita el nombre del laboratorio que proporcionó la información debido a políticas de confidencialidad

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo General

Aislar, seleccionar y realizar estudios cinéticos de las mejores cepas de microorganismos autóctonos solubilizadoras de fosforo insoluble en suelos de una florícola (Tabacundo).

1.1.2 Objetivos Específicos

- Aislar microorganismos autóctonos solubilizadores de fósforo de los suelos.
- Seleccionar las mejores cepas de microorganismos autóctonos solubilizadores de fósforo.
- Determinar los tiempos de retención realizando ensayos de cinética de las mejores cepas seleccionadas como solubilizadoras de fósforo.
- Determinar los parámetros críticos (pH, T°, humedad, etc.), para la biosolubilización de fósforo insoluble en suelos.

1.2 Hipótesis de la Investigación

- Hipótesis Nula:

Los métodos diseñados para el aislamiento y los parámetros de selección utilizados no permiten aislar y seleccionar las mejores cepas solubilizadoras de fosforo insoluble a partir de suelos de una florícola (Tabacundo).

- Hipótesis Alternativa:

Los métodos diseñados para el aislamiento y los parámetros de selección utilizados permiten aislar y seleccionar las mejores cepas solubilizadoras de fosforo insoluble a partir de suelos de una florícola (Tabacundo).

1.3 Variables de la Investigación

1.3.1 Variable independiente

Métodos de aislamiento y parámetros de selección de microorganismos solubilizadores de fósforo.

1.3.2 Variable dependiente

Las mejores cepas de microorganismos solubilizadores de fósforo.

CAPITULO II

Marco Teórico

CAPITULO II: Marco Teórico

2.1 Fundamento Teórico

2.1.1 Generalidades de los suelos

El suelo se refiere a un material exterior, formado por cinco componentes principales: materia orgánica, materia mineral, agua, aire y organismos vivos que se desarrollan conjuntamente en varios ciclos. La cantidad de cada uno de estos componentes no es la misma en todos los suelos, sino que varía con su localización. Las cantidades de materia orgánica y materia mineral que forma parte del suelo son relativamente fijas en un determinado lugar, las porciones de agua y aire varían más frecuentemente. La materia orgánica sólo ocupa del 3% al 6% y la porción viviente apenas el 1% siendo esta la porción esencial para la producción de cultivos y fertilidad del suelo. Para el desarrollo de los microorganismos en el suelo, el medio ambiente es único en diferentes aspectos; es uno de los sitios más dinámicos para la interacción entre microorganismos y con la naturaleza. Parte de estos procesos son la cantidad de reacciones bioquímicas que descomponen la materia orgánica, la intemperización de las rocas y nutrición de los cultivos agrícolas. También los compuestos inorgánicos tienen un notable efecto sobre los microorganismos especialmente por la influencia en la disponibilidad de nutrientes, aireación y retención de agua. (Alexander, 1987). Todas estas características también son tomadas en cuenta para el desarrollo de los microorganismos y los ciclos de nutrientes que estos desempeñan. El conocimiento de los suelos y de sus factores en su formación es fundamental, pues nos permitirá actuar de manera que se mejore el uso del mismo y mayor rendimiento agrícola. El estudio del suelo debe permitir:

- Caracterizar: áreas cultivables
- Incrementar: productividad y rendimiento de cultivos
- Prevenir: degradación del suelo
- Proteger: preservar calidad del suelo (Sanz *et al.*, 2006).

2.1.2 Generalidades del fósforo en el suelo

Para poder determinar la fertilidad de un suelo se debe analizar la interacción de las características físicas, químicas y biológicas que cuando se encuentran equilibradas proporcionan un medio adecuado para el desarrollo y crecimiento de las plantas. No todas las condiciones son adecuadas en los suelos, y en nuestro país una de las razones de estudio de fertilidad de los suelos es la disponibilidad del fósforo. Este elemento se origina de la descomposición de la roca madre durante el proceso de la meteorización, solo representa el 0,1% de la corteza terrestre, diferenciándose su contenido en rocas primitivas o sedimentarias en poca concentración de las rocas volcánicas de altas concentraciones (Navarro, 2003).

El fósforo se encuentra en el suelo, plantas y microorganismos en cierto número de compuestos orgánicos e inorgánicos. Después del nitrógeno, es el segundo nutriente más requerido tanto por plantas como microorganismos. La función fisiológica de este elemento radica principalmente en la acumulación y liberación de energía durante el metabolismo celular. Es un elemento fundamental para la nutrición de las plantas, y se considera uno de los parámetros químicos más importantes para determinar la fertilidad de un suelo. Del contenido total de fósforo del suelo una porción que oscila entre 0.03 a 0.3 mg/L se encuentra en solución, por lo cual este nutriente debe ser reemplazado varias veces desde las fracciones lábiles del suelo para asegurar la óptima nutrición de los vegetales. Cuando un suelo es incapaz de suministrar este elemento debe ser adicionado externamente para cubrir los requerimientos de los vegetales en forma de fertilizantes químicos o puede ser incorporado como hojarasca, residuos vegetales o restos animales (Alexander, 1987 y Valenzuela *et. al.*, 2002). Puede presentarse en forma de fósforo orgánico e inorgánico, casi siempre predominante excepto en suelos donde hay altas concentraciones de materia orgánica, además la presencia de estas dos formas depende de si son suelos jóvenes en zonas de poca lluvia. En los suelos cultivados, debido a que poco de este elemento se pierde por lixiviación, y de que las eliminaciones por cosechas son generalmente pequeñas, tiende a acumularse en las capas superficiales (Navarro, 2003).

Tabla 2.: Compuestos más comunes de fósforo en el suelo

Compuestos que contienen calcio	Compuestos que contienen aluminio y hierro
Flúor apatito: $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3.\text{F}_2\text{Ca}$	Variscita: $\text{PO}_4\text{Al}.2\text{H}_2\text{O}$
Carbonato apatito: $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3.\text{CO}_3\text{Ca}$	Stremgita: $\text{PO}_4\text{Fe}.2\text{H}_2\text{O}$
Hidroxi-apatito: $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3.\text{Ca}(\text{OH})_2$	Vivianita: $(\text{PO}_4)_2\text{Fe}_3.8\text{H}_2\text{O}$
Oxi-apatito: $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3.\text{CaO}$	Dufrenita: $\text{PO}_4\text{Fe}_2(\text{OH})_3$
Fosfato tricálcico: $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$	Wavellita: $(\text{PO}_4)_2\text{Al}_3(\text{OH})_3.5\text{H}_2\text{O}$
Fosfato bicálcico: $\text{PO}_4\text{HCa}.2\text{H}_2\text{O}$	Taranakita: $(\text{PO}_4)_8\text{H}_6\text{Al}_5\text{K}_3.18\text{H}_2\text{O}$
Fosfato monocálcico: $(\text{PO}_4\text{H}_2)_2\text{Ca}.2\text{H}_2\text{O}$	

Fuente: Navarro, 2003

Dentro de los compuestos que contienen calcio, el flúor-apatito es el más insoluble del grupo, es decir que es la forma menos aprovechable; mientras que los fosfatos mono y dicálcico son fácilmente asimilables, el problema surge cuando estos compuestos se encuentran en mínimas cantidades, y pueden transformarse fácilmente en compuestos insolubles y por consiguiente no asimilables. Los compuestos que contienen aluminio y hierro son fosfatos hidroxilados insolubles y estable en suelos ácidos (Navarro, 2003).

Los cultivos contienen aproximadamente entre un 0.05% a 0,50% de fósforo en sus tejidos, en las plantas puede estar presente como fitina, fosfolípidos, ácidos nucleicos, azúcares fosforilados, coenzimas y compuestos relacionados; en otra forma menos común como vacuolas y sustancias amortiguadoras internas como ortofosfato inorgánico, por lo que el fósforo se destaca del nitrógeno o el azufre en cuanto a la importancia para el crecimiento vegetal (Navarro, 2003).

En composición total en el suelo, el fósforo orgánico específicamente representa del 15 al 85%, la mayoría de veces está relacionada con la profundidad, mientras más profundidad aumenta en los horizontes inferiores. Por otro lado están los minerales con las formas inorgánicas, los fosfatos insolubles de calcio, hierro o aluminio. Las sales de calcio predominan en condiciones neutras o alcalinas mientras que las sales de hierro y aluminio en ácidas (Alexander, 1987).

2.1.2.1 Formas del fósforo

Mientras que para el carbono, nitrógeno y azufre se necesita intercambios de ida y vuelta con la atmósfera, el fósforo solo lo hace en condiciones extremas. La mayor parte del fósforo es depositado en las rocas y en el suelo, una vez que llega al mar se pierde definitivamente, por lo que los depósitos o fuentes de fósforo más saturadas son los sedimentos marinos. En los ambientes terrestres este elemento está presente de diversas formas y concentraciones y generalmente se lo clasifica de acuerdo a su carácter: inorgánico u orgánico; o de acuerdo a su disponibilidad. Se describen sus características y ciclos a continuación (Sanzano, 2003).

2.1.2.1.1 Fósforo inorgánico

En la mayoría de los suelos es el predominante, se encuentra presente del 50% al 75% del fósforo total. Puede estar en forma de iones fosfato H_2PO_4^- en suelos con niveles de pH inferiores a 7,2 (suelos ácidos) y el HPO_4^{2-} en suelos con pH superiores a 7,2 (suelos alcalinos), este se reparte entre la fase acuosa y sólida del suelo, donde se encuentra adsorbido en la superficie del complejo húmico-arcilloso, de coloides de óxido de hierro y aluminio y de algunos carbonatos. La solubilidad de los complejos Al-P y Fe-P disminuye al incrementar el pH, la más alta solubilidad a pH bajo se debe a la acción ácida de disolución. Las principales formas de fósforo inorgánico se muestran en la Tabla 3. La abundancia relativa de cada uno de estos compuestos variará de acuerdo al origen del suelo, a los niveles de materia orgánica y al pH (Sanzano, 2003).

Tabla 3.: Principales formas de fósforo inorgánico en el suelo

Tipo de Fosfato	Denominación	Composición	Características
Fosfatos de Calcio	Hidroxiapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_3 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$	Mayor abundancia
	Oxipatita	$3\text{Ca}(\text{PO}_4)_2\text{CaO}$	
	Fluorapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{CaF}_2$	Mayor abundancia
	Carbonatoapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{CaCO}_3$	
	Fosfato tricálcico	$3\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$	
	Fosfato bicálcico	CaHPO_4	Mayor solubilidad
	Fosfato monocálcico	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	Mayor solubilidad
Fosfatos de Hierro	Vivianita	$\text{Fe}(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	
	Estrengita	$\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	
Fosfatos de Aluminio	Variscita	$\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	

Fuente: Navarro, 2003

Fósforo soluble: formas del fósforo que son aprovechables de forma inmediata para las plantas, pero las concentraciones en las soluciones del suelo es muy baja. Para poder establecer cultivos es necesario que ocurra una renovación del fósforo en solución. El equilibrio entre las distintas formas fosfatadas es la que asegura la nutrición de las plantas. Las formas solubles de fósforo en el suelo son los fosfatos diácidos (H_2PO_4^-) y monoácidos (HPO_4^{2-}). La concentración de los iones fosfatos en solución está relacionada con el pH de la misma. El ión H_2PO_4^- es favorecido por los pH bajos, mientras que el ion HPO_4^{2-} por los pH más altos. Su concentración es muy débil y fluctúa entre 0,2 y 0,5 mg/l, o de 200 a 400 g/ha en 30 centímetros de espesor, en los suelos muy ricos la concentración puede llegar hasta 1 mg/l (1ppm) y en suelos pobres 0,1 mg/l. Generalmente la concentración es constante y permanece así aunque varíe la relación suelo-agua (Sanzano, 2003).

Fósforo intercambiable: se puede llamar también fósforo lábil o adsorbido, y su disponibilidad es más lenta que el fósforo directamente soluble. La adsorción de fosfatos, como ocurre con toda adsorción aniónica en el suelo, es un fenómeno que depende del pH. A pH ácidos aumentan las cargas positivas de los coloides y por lo tanto, aumenta la adsorción. Estos iones forman parte del conjunto de iones que rodean a las partículas coloidales y están en constante movimiento.

Representa del 15 al 30%, es decir una concentración de 800 a 2500 kg de P_2O_5 por hectárea del fósforo inorgánico, este lábil puede estar adsorbido directamente por los bordes de las arcillas (cuando están tienen cargas positivas a bajos valores de pH), o por uniones que usan al calcio como puente. Incluso puede absorberse por óxidos e hidróxidos de hierro y aluminio, que tienen un poder de fijación mucho mayor que el de las arcillas (Sanzano, 2003).

Fósforo insoluble: está formado por minerales primarios y secundarios, y constituye la gran reserva de fósforo inorgánico en el suelo, la más común. La insolubilización puede presentarse debido a la precipitación como fosfato cálcico en medio alcalino (pH alto), o como fosfatos de hierro y aluminio en medio ácido (pH bajo), es por esto que tanto en suelos ácidos como alcalinos, el fósforo tiende a sufrir una cadena de reacciones que producen compuestos fosforados de baja solubilidad. Por lo tanto la mayor parte del tiempo el fósforo permanece en el suelo, en las formas menos solubles o menos disponibles para las plantas. Cuando se agrega fósforo soluble al suelo, usualmente ocurre una rápida reacción (de unas pocas horas) que remueve el fósforo de la solución (fija el fósforo). Lentas reacciones posteriores continúan gradualmente reduciendo la solubilidad durante meses o años, según la edad de los compuestos fosfatados. El fósforo recientemente fijado puede ser débilmente soluble y de algún valor para las plantas. Con el tiempo, la solubilidad del fósforo fijado tiende a decrecer a niveles extremadamente bajos. Este fenómeno se conoce como envejecimiento del fósforo (Sanzano, 2003).

2.1.2.1.2 Fósforo orgánico

Las fuentes de fósforo orgánico en el suelo son los residuos de plantas y animales que generalmente se adicionan como abono al suelo y son degradados por microorganismos, los compuestos fosfatados más importantes de este tipo son las nucleoproteínas, fosfolípidos y fosfoazúcares. Puede presentarse de forma insoluble cuando los microorganismos liberan fosfatos de los compuestos que han transformado (Sanzano, 2003).

Representan del 29 al 65% del fósforo presente en la superficie del suelo (Bobadilla y Rincón, 2008) siempre, adsorbido sobre las arcillas, pueden ser también complejos formados con

minerales como: apatito $3\text{Ca}(\text{PO}_4)\cdot\text{CaX}_2$ otros son aquellos insolubles generados por precipitación de formas solubles constituyendo fosfatos cálcicos cristalizados. La mineralización de la materia orgánica es lenta y por vía microbiana, requiriendo temperaturas de aproximadamente 25 a 30 °C, pH neutro y humedad cercana a capacidad de campo. El proceso está regido por la relación C/P de la materia orgánica, cuyo valor crítico es aproximadamente 200, por encima de este valor se produce depresión del fósforo inorgánico (Alexander, 1987).

2.1.2.2 Pérdidas o ganancias del fósforo

En el suelo está sujeto a pérdidas y ganancias de todos los elementos que constituyen sus ciclos básicos para él como para las plantas, se puede decir que las principales vías de pérdida para suelos cultivados son (Sanzano, 2003):

- La remoción o absorción de las plantas: 5 a 60 kg por hectárea al año en la biomasa cosechada
- La erosión de las partículas del suelo que arrastran fósforo: 0,1 a 10 kg por hectárea al año en partículas minerales y orgánicas
- Fósforo disuelto en agua de escurrimiento superficial: 0,01 a 3 kg por hectárea al año

Estos datos se incrementan sustancialmente cuando se trata de suelos que se usan únicamente para el cultivo, por lo que se deban aplicar fertilizantes fosfatados por la carencia de este elemento importante en el crecimiento de las plantas ya que en pocos años el sistema en sí pierde la mayor parte de fósforo que se ha reciclado entre las plantas y el suelo y todo el fósforo inorgánico que queda en el suelo está en forma insoluble (Sanzano, 2003). Por otro lado, el suelo tiene también sus vías de ganancia del elemento, para suelos cultivados son:

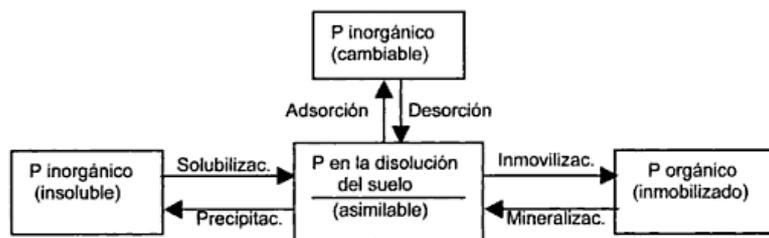
- Desde la atmósfera (casos extremos) absorbido por partículas de polvo: 0,05 a 0,5 kg por hectárea al año.
- Transformaciones microbianas.
- Fertilizantes (Sanzano, 2003).

Una probabilidad calculada es que de 1 a 2 billones de tierras presentan deficiencias de fósforo limitando el crecimiento de cultivos y de la vegetación natural en general, la mayor parte de estas tierras han recibido fertilización saturada y han reducido su productividad (Sanzano, 2003).

2.1.2.3 Dinámica del fósforo en el suelo

La cantidad del fósforo disponible para las plantas, depende de la modificación del equilibrio dinámico que mantiene la disolución con los compuestos inorgánicos insolubles o fijados por una parte, y la formación y descomposición de la materia orgánica por otra. El mantenimiento de una adecuada concentración de fósforo en el suelo es una condición indispensable para que la planta adquiera un desarrollo satisfactorio. Como se ha mencionando, las cantidades asimilables son pequeñas, depende de la modificación del equilibrio dinámico que mantiene la disolución con los compuestos inorgánicos insolubles que contiene, o que lleguen al suelo que son fijados por una parte y la fijación y descomposición de la materia orgánica. El factor que influye directamente en el equilibrio es el pH, ya que condiciona el tipo de reacciones que harán que los compuestos fosfatados lleguen a las plantas (Navarro, 2003).

Figura 1.: Equilibrio de las distintas formas de fósforo en el suelo



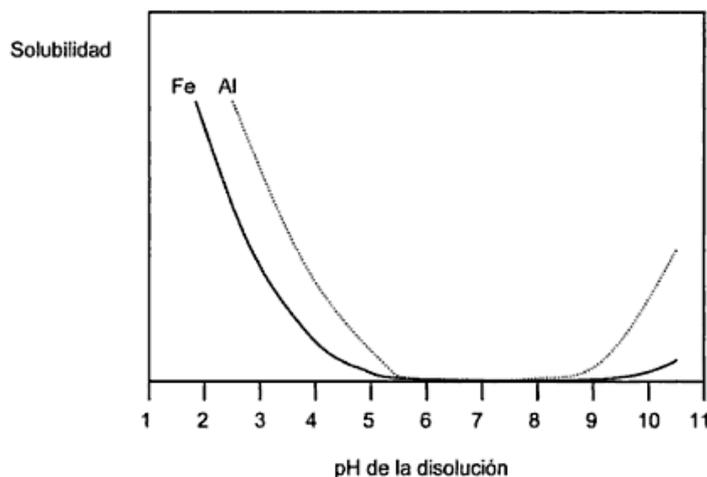
Fuente: Navarro, 2003.

2.1.2.4 Factores que afectan la disponibilidad de fósforo en el suelo

2.1.2.4.1 pH

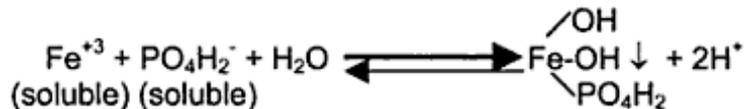
Como se ha ido describiendo; entre las características de las formas de fósforo presentes en el suelo, el pH influye directamente para que este nutriente esté o no disponible para las plantas. La mayor parte de la fijación del fósforo ocurre a muy bajos o muy altos valores de pH. Cuando los valores están entre 5 o 6 los fosfatos de hierro y aluminio se hacen menos solubles, cuando los valores son menores a 6 o mayores a 8 son los fosfatos de calcio los que incrementan su solubilidad. Por lo tanto se puede decir que la fijación de fosfatos es baja y la disponibilidad para la planta es alta cuando los valores de pH se mantienen en rangos neutros de 7 o un poco ácidos de hasta 6. Incluso cuando el suelo alcanza estos valores la disponibilidad puede ser aún un problema y los fosfatos que se adicionen al suelo serán rápidamente fijados. El bajo aprovechamiento por las plantas del fosfato agregado al suelo en una estación dada, es debido parcialmente a esta fijación. Un gran aprovechamiento deberá esperarse en los suelos orgánicos y en las mezclas preparadas de suelo, donde las concentraciones de calcio, hierro, y aluminio no son tan altas como en los suelos minerales (Sanzano, 2003).

Figura 2.: Relación entre el pH y solubilidad de compuestos de hierro y aluminio



Fuente: Navarro, 2003

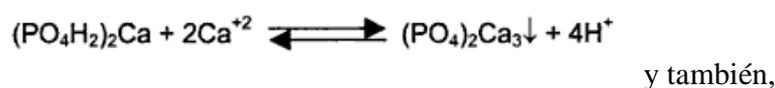
En estas condiciones de alta acidez, tanto los Fe^{+3} como los Al^{+3} precipitan inmediatamente los PO_4H_2^- también presentes en la disolución, originándose compuestos insolubles en los que el fósforo resulta inservible para la planta. En el caso del Fe^{+3} sería: (Navarro, 2003)



Fuente: Navarro, 2003

Evidentemente, el equilibrio de esta reacción tiende a desplazarse ampliamente hacia la derecha, ya que la concentración de Fe^{+3} y Al^{+3} a valores de pH menor de 4 supera de forma notable la de PO_4H_2^- , quedando sólo cantidades ínfimas de fósforo en esta última forma (Navarro, 2003).

Por otro lado en suelos de características alcalinas el fósforo se inmoviliza en forma de fosfatos cálcicos, por lo que estos suelos presentan grandes cantidades de calcio intercambiable y carbonato de calcio. Los valores de pH pueden ser desde 7,5 hasta 8,5 y una concentración de PO_4H_2^- muy reducida y el PO_4H^{2-} a estos valores de pH se forma fácilmente pero precipita por acción del calcio en PO_4HCa que es insoluble en agua. Cuando a estos suelos se les añade fósforo se obtendrá fosfato tricálcico insoluble (Navarro, 2003):



Fuente: Navarro, 2003

Cuando el pH es mayor a 8, el fosfato tricálcico se retrograda originando formas menos solubles (disminución de asimilabilidad) y más cristalinas, esta reacción podría denominarse “retrogradación apatítica” (Navarro, 2003):

Como se muestra en la Figura 3, la precipitación del fósforo bajo de forma de hidroxilados insolubles de hierro y aluminio es máxima cuando los valores de pH que están entre 3 y 4, cuando estos valores aumentan la precipitación disminuye hasta anularse en el valor de 5,5. A partir de 5,5 inicia la precipitación como fosfatos cálcicos, la cual alcanza un máximo en valores de pH que están entre 8 y 9. Entre los dos valores máximos se encuentra el rango de valores de pH entre 3,5 y 7 donde una parte de los coloides del suelo adsorben estas formas utilizables del fósforo, manteniéndolas en formas intercambiables. Cuando el valor de pH es de 6,5 existe conjuntamente la adsorción y la precipitación cálcica mínima por lo que en este valor se puede decir que se tiene la máxima disponibilidad del fósforo para las plantas (Navarro, 2003).

2.1.2.4.2 Humedad

Cuando la cantidad de agua, o humedad, aumenta en el suelo ocurre un incremento de iones fosfato en solución, generalmente después de que se presentan precipitaciones o por efectos del riego. Esto está íntimamente ligado con las formas inorgánicas del fósforo presentes en el suelo: P-Ca, P-Fe y P-Al de naturaleza cristalina relativamente insoluble. Solo cierta cantidad del compuesto se disuelve alrededor de las partículas cristalinas, sin embargo, aunque la concentración se mantiene relativamente constante, la cantidad de iones fosfato solubles aumenta si se incrementa la cantidad de agua en la solución. Se puede decir que las condiciones de absorción de fósforos solubles en estaciones secas es mucho más dificultosa que cuando se agrega agua (Undurranga, 2003).

2.1.2.4.3 Textura

Afecta principalmente a la disponibilidad de agua en el suelo (humedad), ya que determina cuanto puede retener para que el fósforo se encuentre presente en solución. Los suelos de texturas gruesas tienen menor contenido de agua que los de texturas finas, por lo que las cantidades de fósforo soluble son menores para suelos con texturas gruesas, en texturas finas existe la característica de la adsorción de aniones (Sanzano, 2003).

2.1.2.4.4 Materia Orgánica

Como la materia orgánica contiene en su mayoría cargas negativas, los ácidos orgánicos conforman cationes hidroxilados que atrapan a elementos como el aluminio o el hierro en $\text{Al}(\text{OH})_2$ ó $\text{Fe}(\text{OH})_2$ dejando libres a los iones fosfatos, por lo que los abonos favorecen la disponibilidad del fósforo de los suelos (Undurranga, 2003).

2.1.2.4.5 Fertilizantes fosfatados

Cuando se adicionan fertilizantes fosfatados en el suelo, la fijación del fósforo soluble ocurre rápidamente después de la aplicación homogénea. Cuando transcurren varios días desde la aplicación ocurrirán solo cambios mínimos debido al equilibrio alcanzado entre fosfatos solubles y fósforo fijado, los efectos directos en los suelos es que la disponibilidad de fósforo incrementa porque este se adiciona y la remoción de fósforo de la solución propia del suelo que naturalmente lo efectúan las plantas es reemplazado rápidamente por el fósforo fertilizante (Sanzano, 2003).

2.1.3 Biosolubilización de fósforo

2.1.3.1 Ciclo microbiano para la solubilización de fósforo

Los ciclos microbianos que se dan en los suelos implican la transformación de este nutriente en los depósitos orgánicos e inorgánicos, así como en las formas solubles e insolubles. Los microorganismos intervienen en los procesos de la solubilización, inmovilización y mineralización. Se estima que las cosechas requieren de 10 a 30 kg. de fósforo por hectárea. Aproximadamente el 10% de la población microbiana del suelo solubiliza activamente el fósforo y se tratan fundamentalmente de organismos de la rizósfera como: *Bacillus*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* y algunos hongos. Existen 3 mecanismos básicos para solubilizar el fósforo mineral y hacer que resulte disponible: la quelación, la reducción de hierro y la

acidificación. Todos estos mecanismos desestabilizan los minerales en los que se encuentra el fósforo (Coyne, 2000).

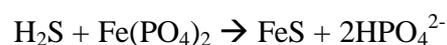
2.1.3.2 Mecanismos de solubilización de fósforo

La disponibilidad de fósforo está ligada a varios factores, el principal: el pH. En los suelos ácidos el fósforo se fija en forma de fosfatos de hierro y aluminio por lo que la acidez favorece la formación de iones de Fe^{3+} y Al^{3+} de coloides aumentando la reactividad que en presencia de fosfatos solubles reaccionan y forman fosfatos insolubles, en circunstancias alcalinas precipita en forma de fosfato cálcico insoluble. Los procesos de solubilización de fósforo funcionan mejor en medios con pH bajo, alto contenido de materia orgánica y otras condiciones (Coyne, 2000).

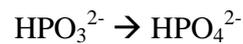
2.1.3.2.1 Solubilización por producción de ácidos orgánicos

La solubilización ocurre gracias a la producción de ácidos orgánicos tales como el ácido nítrico (producido por agentes nitrificantes), el ácido sulfúrico (producido por los tiobacilos) y el ácido carbónico (H_2CO_3) por acción microbiana, estos productos actúan sobre los compuestos insolubles de fosfato inorgánico: fosfato tricálcico, fosfato dicálcico, hidroxiapatita y roca fosfórica. Ácidos orgánicos de bajos pesos moleculares como el oxálico, cítrico, láctico, succínico y acético se producen en los suelos gracias a la descomposición de la materia orgánica, cada microorganismo degradará un tipo y una cantidad de estos ácidos; cuando estos están presentes en el suelo disminuye el pH hasta valores aproximados a 2 (Coyne, 2000)

El ácido oxálico puede unir (quelación) Ca^{2+} , Mg^{2+} y Fe^{3+} , desestabilizando los minerales fosfato dándose el proceso de la solubilización. El hierro ferroso Fe^{2+} es más soluble que el hierro férrico Fe^{3+} , en consecuencia aquellos minerales con contenidos de Fe^{2+} se disuelven y están disponibles para la absorción de las plantas. Por ejemplo desde un punto de vista anaerobio (Coyne, 2000):



El fósforo disponible está en mayor porcentaje en suelos secados al aire que en suelos anegados por agua, con una excepción: cuando se examinan los compuestos de fosfato de hierro. Ninguno de los otros compuestos que contenga fósforo, pueden someterse a reacciones de reducción que si ocurren con el hierro. Esta es la razón por la cual el fósforo resulta más disponible cuando al agua es abundante porque el hierro se reduce y desestabiliza al mineral. Otros microorganismos pueden degradar el fosfito (Coyne, 2000):



Pero no existen pruebas de que la reacción de oxidación produzca energía para el metabolismo de los microorganismos (Coyne, 2000).

2.1.3.2.2 Inmovilización

La concentración de fósforo en una solución de suelo puede ser de 0,1 a 1,0 ppm, posterior a que las bacterias lo ha inmovilizado dejando de estar disponible para las plantas. Este proceso depende de las demandas de crecimiento de los microorganismos presentes en el suelo, a bajas concentraciones de microorganismos acumulan un exceso de fósforo para cubrir con sus necesidades (Alexander, 1987).

2.1.3.2.3 Mineralización

El fósforo orgánico se encuentra en el suelo en porciones de 30 a 50% del fósforo total, pero para poder estar disponible como nutriente debe mineralizarse. Los Fosfolípidos y los ácidos nucleicos se degradan rápidamente, pero el inositol fosfato se mineraliza lentamente (Alexander, 1987).

Hay ciertas condiciones que favorecen el proceso, el primer lugar temperaturas termófilas, un pH de niveles neutro a alcalino y materia orgánica necesariamente rica en fósforo. Las enzimas principales que intervienen son las fitasas y las fosfatasas, si bien las primeras están ampliamente extendidas entre los organismos, están limitadas por la pequeña cantidad de fitina en el suelo;

esta es absorbida por el suelo cuando el pH es ácido. Por su parte, las fitasas eliminan un grupo fosfato cada vez de los compuestos fitílicos. Un suministro inadecuado de fósforo estimula la producción de fosfatasa y la mineralización del fósforo orgánico lábil (Alexander, 1987).

Estas enzimas pueden ser extracelulares. Así los fosfato monoesterasas (un fosfato monoéster R-O-PO₃⁻) presentan distintos grados de alcalinidad óptimos (el ácido a un pH 6,5 y el alcalino a un pH 11). Una sola fosfatasa puede tener múltiples sustratos. Los fosfato diésteres (R-O-P-O-R) requieren de varias enzimas para mineralizarse por completo. Los suelos con elevados niveles de fósforo inorgánico inhiben la actividad de la fosfatasa y de la mineralización del fósforo orgánico (Alexander, 1987).

2.1.3.2.4 Reacciones de Oxidación y Reducción

El fósforo goza de varios estados de oxidación posibles, desde PO₄³⁻ hasta la fosfita PH₃ de valencia⁻³. Muchos microorganismos como de los géneros *Pseudomonas* y *Clostridium* hacen este tipo de reducciones. Ni las plantas, ni los microorganismos reducen el fósforo cuando lo incorporan a la materia orgánica. De esta manera tiene lugar las reacciones de oxido-reducción resultando posible reducir HPO₄²⁻ a HPO₃²⁻ y más, pero este proceso no suele ser importante, al tiempo que el papel de los microorganismos en las reacciones redox no resulta claro (Alexander, 1987).

2.1.3.3 Microorganismos solubilizadores de fósforo

Todos los suelos, especialmente los cultivados son un conjunto con millones de microorganismos vivientes; estos pueden ser bacterias, algas, hongos, actinomicetos, etc. Lo que pone en ventaja a las bacterias sobre los otros grupos de organismos micro celulares es su capacidad de reproducirse y crecer rápidamente, y su función descomponedora de una gran variedad de sustratos naturales (Navarro, 2003). Su número en el suelo es variable y depende de las condiciones en las que se encuentren, casi siempre la mayor porción se encuentra en horizontes

superficiales en cantidades de 3 y 4 billones por un gramo de suelo, y entre 450 y 560 kg de peso de tejido bacteriano viven en una hectárea. Las poblaciones de especies nativas son las más resistentes y perduran por largos períodos sin tener actividad metabólica (Navarro, 2003 y Alexander, 1987).

Algunos microorganismos como parte de sus funciones en la transformación de nutrientes como el fósforo, pueden convertir a los compuestos de fósforo insoluble para la planta en formas disponibles como monofosfato y difosfatos, por el proceso de la producción de ácidos orgánicos anteriormente mencionado (Simbaña, 2010).

Cuando se utiliza la inoculación microbiana como el principal método de fertilización de los suelos los resultados son eficientes y de bajos costos, además movilizan a los fertilizantes anteriormente usados y que se ha inmovilizado por el tiempo. La microflora que realiza esta proceso representa entre el 10 al 15% de la microflora total del suelo, que puede ser mayor en la rizósfera de entre 26 y 39 % (Novos, 2002).

Muchas investigaciones se han realizado en base a las facultades de los microorganismos para solubilizar los fosfatos; pueden clasificarse en: *Enterobacterias*, *Pseudomonas*, *Alcaligenaceae*, *Rhizobiaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Bacillus* y algunos hongos como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trochoderma* entre otros (Simbaña, 2010).

2.1.4 Producción de las mejores cepas de microorganismos solubilizadores de fósforo insoluble a nivel de laboratorio

2.1.4.1 Fundamentos del aislamiento de microorganismos solubilizadores del fósforo

El aislamiento de los microorganismos solubilizadores de fosfatos insolubles a partir del suelo, se fundamenta en el método de enriquecimiento selectivo, utilizando los nutrientes indispensables para su crecimiento, esto se consigue al confeccionar un medio de cultivo minimal que contenga fosfato tricálcico como fuente inorgánica de fósforo que permitirá el crecimiento de tan solo los

microorganismos que solubilicen el fosforo insoluble. Además el medio contiene los compuestos descritos en la Tabla 4 para completar los requerimientos nutricionales de los microorganismos, y las condiciones de incubación y atmosféricas, temperatura, pH que les otorgue ventajas de crecimiento frente a los otros.

Tabla 4.: Composición del medio minimal

Medio Minimal: PVK	
Fuente	Compuesto
Fuente de Carbono y Energía	Glucosa
Fuente de Fósforo inorgánico	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_4$
Fuente de nitrógeno	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Regulador presión osmótica	NaCl
Cofactor enzimático	$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
Regulador de la presión osmótica	KCl
Fuente de nitrógeno	Extracto de levadura
Cofactor enzimático	$\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Fuente: Del Hierro, 2010

Para la obtención de cultivos puros se hacen varias transferencias en el medio diseñado, seguidas por siembras por agotamiento en placas de Agar, las cepas responsables de la solubilización se detectan por una zona clara alrededor de la colonia conocida como el halo de solubilización (Del Hierro, 2010).

2.1.4.2 Fundamentos de la selección de microorganismos solubilizadores de fósforo

La selección de las mejores cepas de microorganismos solubilizadores de fósforo es un proceso en el que aquellos individuos que son los más dotados para sobrevivir en su entorno generan el mayor número de descendientes, llevando a cabo sus reacciones bioquímicas y manteniendo su herencia genética. Los microorganismos seleccionados son aquellos que mejor solubilizan el fosforo insoluble y esto se detecta utilizando un método colorimétrico. (Rittman, 2001).

Este método es el de Molibdato o Mo-Blue, se utiliza para la determinación de fosforo soluble en solución acuosa, con el principio de la formación del ácido fosfoantimolibdeno azul en la presencia de ácido ascórbico (Murphy y Riley, 1962); en solución sulfúrica los iones ortofosfato (fósforo soluble) reaccionan con los iones molibdato, dando como resultado ácido molibdofosfórico, el cual se reduce por el ácido ascórbico a fosfomolibdeno presentando al cabo de 5 minutos una coloración azul en la solución. Es con esta solución con la que se puede cuantificar el fósforo solubilizado en solución, en el espectrofotómetro a 660nm (Del Hierro, 2010).

Una de las ventajas del método es que se necesita de pequeñas cantidades de muestra para el análisis, una desventaja es que cuando existen concentraciones muy bajas de fósforo en la solución no llega a cuantificarse por la baja sensibilidad del mismo (Simbaña, 2010).

2.1.4.3 Fundamentos de la cinética del crecimiento microbiano

Para el estudio cuantitativo de la cinética de procesos de fermentación, es necesario disponer de métodos experimentales adecuados para determinar el crecimiento de poblaciones microbianas. Estos métodos deben considerar el modo de reproducción de las células procariotas de interés y las condiciones generales del cultivo. Los métodos que determinan número de células son en general preferidos en trabajos de orientación básica, mientras que en el área aplicada resulta más adecuada la cuantificación de la masa. (Acevedo 2006).

El conocimiento de la cinética de un cultivo permite la predicción del transcurso del crecimiento, la evaluación de velocidades, entrega de información útil para establecer estrategias de optimización de procesos, y detección de tiempos de retención (Acevedo 2006).

2.1.5 Parámetros críticos de la biosolubilización

Es necesario considerar algunos parámetros críticos en el proceso de biosolubilización de fósforo a nivel de laboratorio, estos permitirán que las cepas de microorganismos reciban las condiciones necesarias para completar un proceso de forma rápida y efectiva.

Temperatura: La temperatura influye en la velocidad de la transformación de nutrientes, la velocidad del metabolismo microbiano es proporcional a este parámetro. Se considera tanto la temperatura ambiental, como la temperatura de incubación que es la que tendrá que ver directamente con el crecimiento de colonias de microorganismos.

pH: característica química del medio de crecimiento de los microorganismos, cada organismo tiene un rango de pH dentro del cual es posible el crecimiento y normalmente posee un pH óptimo bien definido. La mayoría crece en un margen de pH de 2- 3 unidades (Rittman, 2001). Este influye directamente en la solubilización de fosfatos, los valores no pueden ser ni muy ácidos, ni muy alcalinos. Incluso es recomendable que el pH intracelular permanezca próximo a la neutralidad.

Humedad: la cantidad de agua no afecta a las pruebas de solubilización a nivel de laboratorio, es un parámetro que afecta directamente a los ensayos en suelos.

Presencia de oxígeno (O₂): estos microorganismos son de tipo aerobio, es decir necesitan la presencia de oxígeno para que puedan crecer y realizar su metabolismo para solubilizar fosfatos.

Nutrientes: Son sustancias químicas muy necesarias para el desarrollo de los microorganismos y se pueden dividir en cuatro grupos: fuentes de Carbono, Fósforo, Nitrógeno y oligoelementos o elementos minoritarios (micronutrientes). La fuente de macro nutrientes se describe en el medio de cultivo que se utiliza, principalmente la glucosa como fuente de carbono, y el sulfato de amonio como la fuente de nitrógeno. La fuente de micronutrientes u oligoelementos, comprende un conjunto variado de elementos como el hierro, cobre, zinc, azufre, cobalto, manganeso, magnesio, calcio y otros compuestos, que depende en gran medida del proceso que se está realizando y del tipo de microorganismo que lo está utilizando. Requiriendo una concentración de menos 1ppm en total (Rittman, 2001).

CAPITULO III

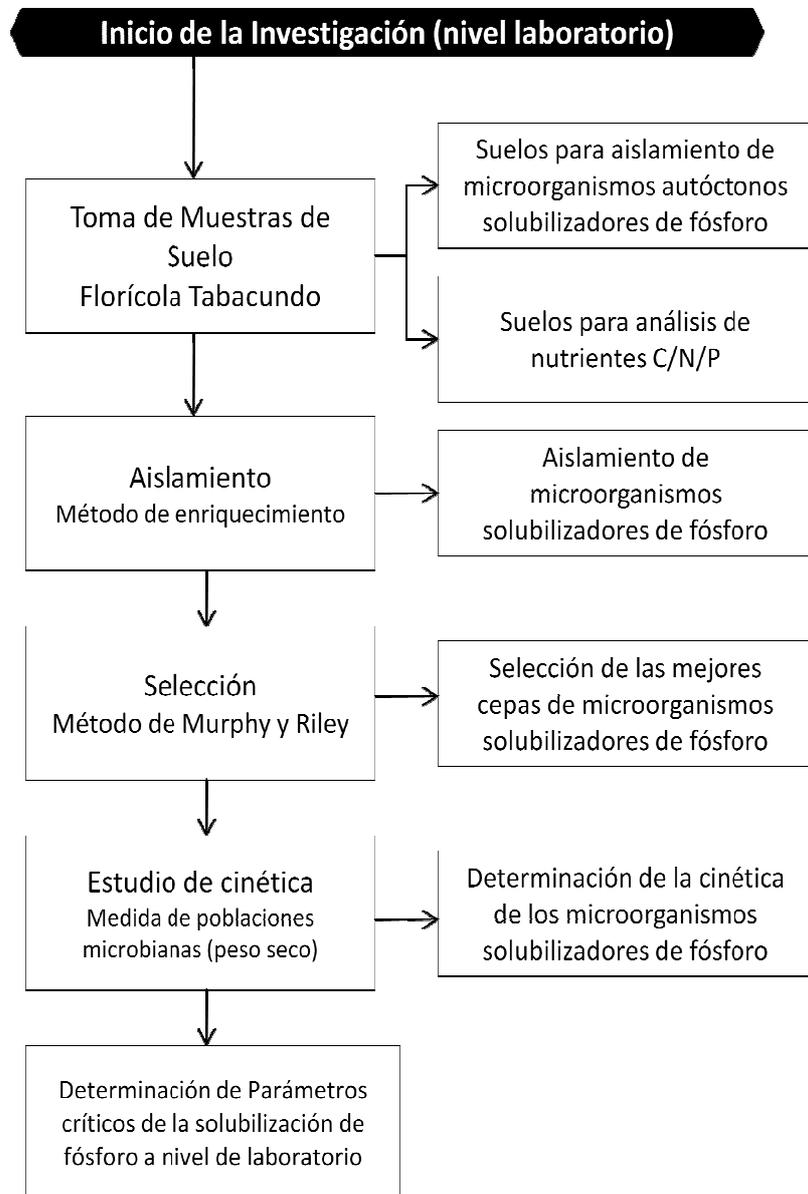
Marco Metodológico

CAPÍTULO III: Marco Metodológico

3.1 Tipo de investigación

El presente proyecto de investigación es de tipo experimental, se realizó en condiciones de laboratorio. La aplicación de los métodos, técnicas y procedimientos determinados permitieron aislar, seleccionar, las mejores cepas de microorganismos solubilizadores de fosforo insoluble y los estudios de cinética que se fundamentan en el crecimiento de los microorganismos facilitaron la determinación de ciertos parámetros críticos que facilitarían la tecnología de solubilización en estudios posteriores.

3.2 Diseño de la Investigación en el Laboratorio.



Elaborado por: Cristina Larrea. Facultad Ciencias Ambientales. UISEK

3.3 Técnica e instrumentos analíticos

3.3.1 Métodos Generales de Análisis

3.3.1.1 Toma de Muestras del Suelo

El tipo de muestreo que se realizó fue al azar. Para conocer los niveles de fósforo total, fósforo asimilable y fósforo no asimilable en el suelo se tomaron muestras de tres puntos diferentes en una finca en Tabacundo, para la determinación de estos puntos se tomaron como referencia análisis de laboratorio que se han realizado anteriormente en la finca como rutina de control de calidad de suelo y fertilidad. Así se seleccionaron los tres bloques que presentan excesos de fósforo referentes a los valores presentados por el mismo laboratorio y en cada uno también una variedad de rosas diferente como referencia.

Cada muestra fue rotulada por de acuerdo al número de bloque, el número de muestra, el número de nave y el número de cama.

Ej.:

Bloque 7

Muestra: 4

Nave: 6

Cama: 20

Muestra: 7.4.6.20

Tabla 5.: Valores de fósforo total (ppm) de los tres bloques seleccionados para el muestreo*

Bloque	Valores Referencia (ppm) De acuerdo a Blgg Naaldwijk para control de fertilidad	Resultados Fósforo (ppm)	Variedad de rosa
Bloque 6	4,6	16	Vendela
Bloque 7		17	Freedom
Bloque 14		21	High Magic

Tabla 6.: Tipo de suelo y variedad de rosa sembrada en los sitios de muestreo*

# de Muestra	Bloque	Variedad	Tipo de suelo
1	6	Vendela	Franco-limoso
2	7	Freedom	Franco-arenoso
3	14	High magic	Franco-areno-limoso

3.3.1.1.1 Toma de Muestras del Suelo para análisis de nutrientes C/N/P

Cada 15 o 30 pasos, se tomó una sub-muestra, limpiando la superficie del terreno y depositándola en el balde para homogenización. Las sub-muestras se tomaron entre 20 y 30 cm. De profundidad. Se tomó 1 kg. aproximadamente. El muestreo fue realizado con un barreno para obtener muestras cercanas a las raíces de las rosas. Las muestras se envían a un laboratorio especializado para hacer análisis de suelos para la florícola.

*Nota: No se cita el nombre del laboratorio que proporcionó la información debido a políticas de confidencialidad

3.3.1.1.2 Toma de Muestras del Suelo para aislamiento de microorganismos

Se hizo un muestreo aleatorio, con un distancia de 10 pasos aproximadamente, en los sitios seleccionados, la profundidad de toma de muestra es a 25cm. Se introdujeron jeringuillas de 60mL para poder obtener muestras cercanas a las raíces (zonas de mayor crecimiento microbiano) se obtuvieron las sub-muestras que fueron homogenizadas. Se tomó 500 g. de suelo en fundas de plástico bien cerradas, para evitar ingreso de humedad.

3.3.2 Métodos Específicos de Análisis

3.3.2.1 Producción mejores cepas de microorganismos solubilizadores de fósforo insoluble a nivel de laboratorio

Para la producción de las mejores cepas de microorganismos solubilizadores de fósforo, obtenidas a partir de los suelos de los sitios seleccionados en una florícola en el sector de Tabacundo, se aplicará la técnica de aislamiento selectivo utilizando un medio minimal para el enriquecimiento de las cepas requeridas, es decir obtener solo cepas con las características para solubilizar fosfatos, es por esto que se agregó una fuente de fósforo inorgánico. Posteriormente se seleccionaron las mejores cepas por el método colorimétrico de Murphy y Riley (1962) que medirá el fósforo en solución acuosa.

3.3.2.1.1 Aislamiento de microorganismos solubilizadores de fósforo

Técnica de disoluciones seriadas (Brock *et al*, 2004)

Para el aislamiento de los microorganismos solubilizadores de fósforo de los suelos de los sitios seleccionados se utilizó la técnica de las diluciones seriadas, donde se preparan series de diluciones (1:10): para obtener 1/10, 1/100, 1/1000 etc.

- Equipos y materiales

- Balanza analítica (P.:0.0001g y Máx.: 220g)
- Matraces de 500 ml
- Pipetas de 10, 1 y 0,1 ml.
- Tubos de ensayo
- Fundas estériles

(Todo el material de vidrio que se utilizó durante la práctica es esterilizado por aproximadamente 6 horas en autoclave)

- Reactivos

- Agua de Peptona
- Agua destilada

- Procedimiento

Se toma inicialmente 10 g. de cada una de las 24 muestras de suelos. Se colocó en las fundas estériles, se adicionó 90 ml de agua de peptona estéril para comenzar con la dilución 10^{-1} , para obtener la carga microbiana deseada. Si no se aplicarían las disoluciones es poco probable obtener los microorganismos específicos requeridos.

Enriquecimiento selectivo (Brock *et al*, 2004)

Después de obtener la dilución necesaria, se aplica la Técnica de enriquecimiento selectivo, donde se confecciona un medio de cultivo minimal que contenga fosfato tricálcico como la fuente principal inorgánica de fósforo.

- Equipos y materiales

- Balanza analítica (P.:0.0001g y Máx.: 220g)
- Mechero
- Incubadora (30 °C)
- Incubadora orbital (30°C y 180rpm)
- Matraces de 1000 y 500 ml
- Cajas Petri desechables
- Tubos de ensayo
- Asas de inoculación

- Reactivos

- Medio Minimal (referirse a la Tabla 7)
- Agar-Agar Type I (HIMEDIA)

Tabla 7.: Medio para aislamiento de microorganismos solubilizadores de fósforo

Medio Pikovskaya (PVK)		
Para preparar en 1000ml de Agua destilada		
Fuente	Compuesto	Cantidad (g.)
Fuente de Carbono y Energía	Glucosa	10
	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_4$	5
Base Mineral	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5
	NaCl	0.2
	$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.7
	KCl	0.12
	Extracto de levadura	0.5
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.002
	$\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.002
	Para medio sólido	Agar

Fuente: Del Hierro, 2010

- Procedimiento

De las disoluciones de 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} , y con un asa de inoculación se pasaron inóculos al medio sólido por el método de estriación en placa en cada caja petri. Se colocaron en la incubadora durante 7 días a 30 °C. Las cepas de bacterias fósforo solubilizadoras se caracterizan porque su colonia tiene un halo blanco alrededor.

Después de la observación de las colonias microbianas en las cajas, se seleccionan las cepas con los halos de solubilización más grandes; estas se transfirieron a un medio minimal líquido y se dejó nuevamente en la incubadora orbital para el crecimiento durante 2 días, a 30 °C. en agitación constante a 180 rpm.

3.3.2.1.2 Selección de microorganismos solubilizadores de fósforo

Prueba cuantitativa: Método Murphy y Riley (1962) o Azul de Molibdato

Para evaluar la capacidad solubilizadora de las cepas aisladas se aplica el Método de Murphy y Riley, también conocido como el Método de Mo-Blue o Método de Molibdato. Se determina la cantidad de fósforo en solución acuosa, basándose en la formación de ácido fosfoantimolibdeno azul en la presencia de ácido ascórbico.

- Equipos y materiales

- Balanza analítica (P.:0.0001g y Máx.: 220g)
- Mechero
- Autoclave
- Incubadora
- Incubadora orbital
- Matraces de 1000 y 500 ml
- Frascos plásticos estériles
- Tubos de ensayo
- Asas de inoculación

- Reactivos

- Medio Minimal (referirse a la Tabla 7)
- Agar-Agar Type I (HIMEDIA)
- Fosfato hidrógeno mono potásico
- Molibdato de amonio
- Tartrato de antimonio y potasio
- Acido sulfúrico concentrado
- Acido Ascórbico

- Procedimiento

De cada una de las cajas Petri que presenta crecimiento microbiano, se separo de acuerdo a la presencia del halo de solubilización, característica propia de microorganismos solubilizadores de fósforo, sólo aquellas que presentaron resultados positivos con respecto al halo fueron sometidas a la prueba cuantitativa. Esta prueba cualitativa consiste en:

Solución A: Se pesó 1 g de molibdato de amonio y colocó en un balón de 1000 ml y agregó 250 ml de agua destilada, se agitó hasta tener una solución homogénea. Se añadió 24 mg de tartrato de amonio y potasio, 16 ml de ácido sulfúrico concentrado y se aforó hasta 1000 ml.

Solución B: Se pesó 0,88 g de ácido ascórbico y se disolvió en 1000 ml de la solución A. Esta solución se prepara el día del ensayo.

Se tomó una muestra de cada una de las bacterias con el mejor halo de solubilización con azas de inoculación, se colocó en 5 ml de agua de peptona. Se dejó en la incubadora orbital durante 3 días, a 30 °C, y 180 rpm. Concluido este tiempo, de cada uno de los tubos se tomó una muestra de 1 ml y se pasa a frascos estériles con 70 ml de caldo PVK.

Nuevamente van a la incubadora orbital por un lapso de 7 días a las mismas condiciones. Durante cada uno de estos 7 días, se sacan muestras de 5 ml del caldo a tubos estériles. Los tubos se centrifugaron a 10000 rpm por 10 minutos.

En otros tubos estériles se colocó 9 ml de agua de peptona y se añadió 1 ml del sobrenadante de los tubos centrifugados y se conservaron en el refrigerador. Después de tomar las muestras por los 7 días, se preparó: las soluciones A y B.

En tubos de cultivo se colocaron 5ml de sobrenadante de las muestras tomadas por los 7 días y se agregó 20ml de la solución B y se aforó hasta 50ml con agua destilada. Se esperó por unos minutos que cada tubo obtenga un color azul y se realizó la lectura en el espectrofotómetro UV-Vis con una longitud de onda de 660 nm.

Se preparó la curva de calibración a partir de una solución de fosfato de hidrógeno monopotásico de 100 ppm un set de soluciones con diferentes concentraciones: 0; 1; 2; 3 y 5 ppm. (Del Hierro, 2010).

3.3.2.1.3 Cinética del crecimiento microbiano de microorganismos solubilizadores de fósforo

- Equipos y materiales

- Embudo de filtración Buchner.
- Filtros Whatman N°2.
- Pinzas metálicas.
- Balanza analítica (P.:0.0001g y Máx.: 220g)
- Estufa a 105 °C.
- Incubadora orbital.
- Desecador.
- Sistema de vacío.
- Cajas Petri de vidrio
- Erlenmeyer 250 ml
- Tubos de ensayo
- Pipetas 5 ml

- Procedimiento

Se podrá obtener datos de biomasa de las cepas solubilizadoras, en dos erlenmeyer se colocaron la solución de Cepa #3 y Cepa #10 (entre 10^2 y 10^4 x ml) junto con el medio minimal diseñado (PVK). Se lleva a incubación en las mismas condiciones anteriores. Cada día de medición 5 ml de suspensión microbiana homogénea, se pone en un papel filtro y se filtra con bombas al vacío en embudo Buchner. Es necesario lavar los filtros previamente marcados, no tocarlos con las manos directamente para no afectar al peso final de los mismos. Se colocaron en una estufa a 105 °C durante aproximadamente 4 horas, al sacarlos se dejan reposar en un desecador. Se pesó exactamente cada uno de los filtros.

Igualmente se toma 5 ml para las mediciones de fósforo insoluble en el espectrofotómetro, siguiendo el procedimiento de selección.

CAPITULO IV

Análisis e Interpretación de Resultados

CAPITULO IV: Análisis e Interpretación de resultados

4.1 Aislamiento de microorganismos solubilizadores de fósforo

De acuerdo a los resultados de los análisis que se realizan en la florícola en el sector de Tabacundo de las cantidades de los nutrientes básicos para el control de la fertilidad de los suelos, se escogieron los tres bloques donde se presentaban los valores de fósforo más altos en relación a los demás bloques, estos valores presentaban cierto incremento con respecto al tiempo.

Los resultados se obtienen de un análisis realizado en un laboratorio, donde las muestras se envían trimestralmente, se comparan con el estándar de calidad que sigue la florícola desde su funcionamiento determinado por los estudios realizados en el exterior para el control de la fertilidad y producción de los suelos de los cultivos de rosas.

Tabla 8.: Valores de fósforo (ppm) de los tres bloques seleccionados para el muestreo*

Bloque	Valores Referencia (ppm) De acuerdo a Blgg Naaldwijk para control de fertilidad	Valores Referencia (ppm) De acuerdo al INIAP para la provincia de Pichincha	Resultados Fósforo (ppm)	Variedad de rosa
Bloque 6	4,6	10-20	16	Vendela
Bloque 7			17	Freedom
Bloque 14			21	High Magic

*Nota: No se cita el nombre del laboratorio que proporcionó la información debido a políticas de confidencialidad.

4.1.2 Aislamiento de microorganismos solubilizadores de fósforo

De cada bloque se sacaron 8 muestras, de cada una de ellas para el aislamiento se trabajó en triplicado. Muestreo en orden de bloque, muestra, nave y cama. Se presentan en orden de recolección:

Tabla 9.: Muestras obtenidas de cada bloque de una florícola sector Tabacundo

BLOQUE 6	BLOQUE 7	BLOQUE 14
6.5.5.25	7.5.6.32	14.2.1.3
6.4.4.17	7.8.3.48	14.1.1.2
6.8.3.35	7.6.6.33	14.3.3.11
6.7.3.34	7.7.3.47	14.4.3.12
6.3.4.16	7.1.2.7	14.5.4.23
6.2.2.5	7.2.2.8	14.7.3.33
6.1.2.6	7.3.6.13	14.6.4.24
6.6.5.26	7.4.6.20	14.8.2.34

Elaborado por: Cristina Larrea. Facultad Ciencias Ambientales. UISEK

En la Tabla 9 se presentan los 24 puntos de muestreo para los suelos con altos valores de fósforo de acuerdo a la rotulación mencionada en la metodología de muestreo: bloque, muestra, nave y cama. Esta rotulación se mantiene por procedimientos internos de la florícola.

Tabla 10.: Características de cepas aisladas en los suelos analizados

Bloque 6			Bloque 7			Bloque 14		
Muestras	Características		Muestras	Características		Muestras	Características	
6.5.5.25	1	No hubo crecimiento microbiano	7.5.6.32	1	Halos de solubilización pequeños	14.2.1.3	1	No hubo crecimiento microbiano
	2	No hubo crecimiento microbiano		2	Halos de solubilización pequeños		2	Halos de solubilización pequeños
	3	Colonias blancas		3	Halos de solubilización pequeños		3	No hubo crecimiento microbiano
6.4.4.17	1	No hubo crecimiento microbiano	7.8.3.48	1	Halo de solubilización	14.1.1.2	1	Halos de solubilización pequeños
	2	No hubo crecimiento microbiano		2	Halo de solubilización		2	Halos de solubilización pequeños
	3	No hubo crecimiento microbiano		3	Halos de solubilización pequeños		3	Halos de solubilización pequeños
6.8.3.35	1	Colonias blancas	7.6.6.33	1	Halo de solubilización	14.3.3.11	1	No hubo crecimiento microbiano
	2	Colonias blancas		2	Halo de solubilización		2	Halos de solubilización pequeños
	3	Colonias blancas		3	Halo de solubilización		3	Halos de solubilización pequeños
6.7.3.34	1	Mejor halo de solubilización	7.7.3.47	1	Halos de solubilización pequeños	14.4.3.12	1	No hubo crecimiento microbiano
	2	No hubo crecimiento microbiano		2	Halo de solubilización		2	Halos de solubilización pequeños
	3	No hubo crecimiento microbiano		3	Halo de solubilización		3	Halos de solubilización pequeños
6.3.4.16	1	No hubo crecimiento microbiano	7.1.2.7	1	Halos de solubilización pequeños	14.5.4.23	1	Halos de solubilización pequeños
	2	No hubo crecimiento microbiano		2	Halos de solubilización pequeños		2	Halo de solubilización
	3	No hubo crecimiento microbiano		3	Halo de solubilización		3	Halo de solubilización
6.2.2.5	1	No hubo crecimiento microbiano	7.2.2.8	1	Halos de solubilización pequeños	14.7.3.33	1	No hubo crecimiento microbiano
	2	No hubo crecimiento microbiano		2	Halos de solubilización pequeños		2	Halos de solubilización pequeños
	3	No hubo crecimiento microbiano		3	Halos de solubilización pequeños		3	No hubo crecimiento microbiano
6.1.2.6	1	Colonias blancas	7.3.6.13	1	Halo de solubilización	14.6.4.24	1	No hubo crecimiento microbiano
	2	Halo de solubilización		2	Halos de solubilización pequeños		2	Halos de solubilización pequeños
	3	No hubo crecimiento microbiano		3	Halos de solubilización pequeños		3	Halos de solubilización pequeños
6.6.5.26	1	Colonias blancas	7.4.6.20	1	No hubo crecimiento microbiano	14.8.2.34	1	No hubo crecimiento microbiano
	2	No hubo crecimiento microbiano		2	Halo de solubilización		2	No hubo crecimiento microbiano
	3	No hubo crecimiento microbiano		3	No hubo crecimiento microbiano		3	No hubo crecimiento microbiano
Total de cepas aisladas: 2			Total de cepas aisladas: 10			Total de cepas aisladas: 2		

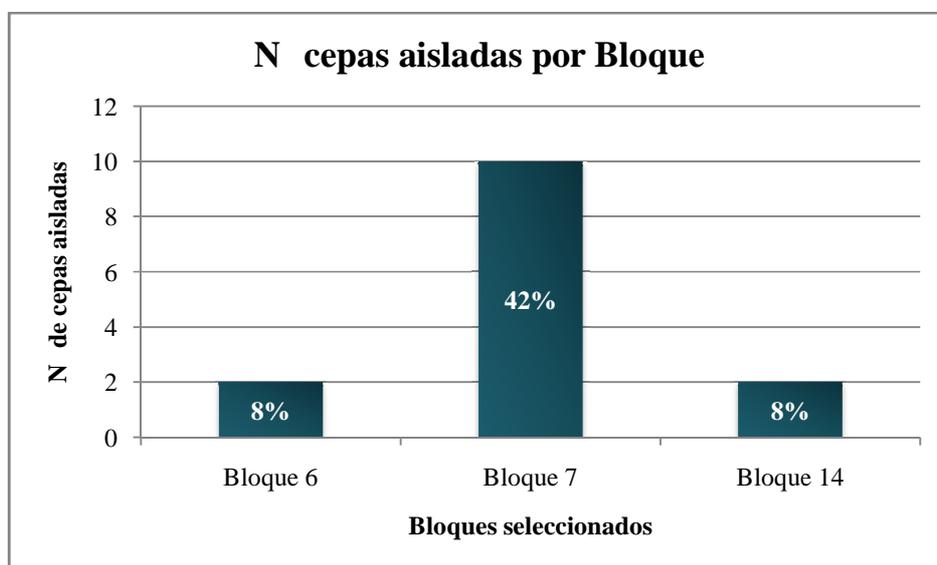
Elaborado por: Cristina Larrea. Facultad Ciencias Ambientales. UISEK.

En la Tabla 10 se presenta los resultados del aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosforo, realizado utilizando la técnica de enriquecimiento selectivo de 24 cepas, que por triplicado se sumaron a 72 aislamientos, se puede ver en detalle las 14 cepas que tenían resultados favorables, estos resultados fueron únicamente evaluados por observación del tamaño del halo de solubilización, característica clave de estas cepas. Es de los suelos con los mayores valores de fósforo de donde se obtuvo en mayor número de cepas; es decir de los bloques 7 y 14. Los aislamientos en suelos de este tipo de microorganismos en los suelos presentan mucha dificultad debido que cuando hay altas cantidades de fósforo soluble o aportes del mismo por fertilizantes (práctica común para el tipo de cultivo: rosas) se pierde la capacidad solubilizadora por el efecto conocido como Feed-Back (citado por Del Hierro, 2010).

Se realizan las siguientes observaciones con respecto a las características de los aislamientos de los suelos seleccionados:

- **No hubo crecimiento microbiano:** significa que no se logró aislamiento de bacterias solubilizadoras de fósforo insoluble.
- **Halo de solubilización:** significa que hay aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosforo insoluble
- **Colonias blancas:** significa que hay crecimiento de bacterias, pero no son solubilizadoras de fósforo insoluble.

Grafico 1.: Número de cepas aisladas por bloque en una florícola sector Tabacundo



De acuerdo al Gráfico 1, del bloque 7 se obtuvo el 42% de resultados favorables de crecimiento de cepas solubilizadoras de fósforo por la observación del halo de solubilización, Este bloque corresponde a uno de los sitios identificados con excesos de fósforo.(análisis físico-químico).

4.2 Selección de las mejores cepas de microorganismos solubilizadores de fósforo

4.2.1 Selección por halo de solubilización

Primeramente, para proceder con la selección cuantitativa, se hizo la observación del crecimiento de cada una de las cepas aisladas para determinar cuáles de ellas presentaban la característica morfológica principal de las bacterias solubilizadoras de fósforo: el halo de solubilización. En la Tabla 11 se presentan las 10 cepas con los halos de solubilización más grandes.

Tabla 11.: Cepas seleccionadas por Halo de solubilización para Método Colorimétrico

Cepas Seleccionadas por Halo de Solubilización	
Cepa #1	6.1.2.6.2
Cepa #2	7.6.6.33.2
Cepa #3	7.1.2.7.3
Cepa #4	7.6.6.33.1
Cepa #5	14.5.4.23.3
Cepa #6	6.7.3.34.1
Cepa #7	7.6.6.33.3
Cepa #8	7.8.3.48.1
Cepa #9	7.8.3.48.2
Cepa #10	7.36.1.3.1

Elaborado por: Cristina Larrea. Facultad Ciencias Ambientales. UISEK.

4.2.2 Selección de las mejores cepas solubilizadoras de fósforo por método Mo-Blue

Para realizar la cuantificación de los iones ortofosfato producidos en la actividad metabólica de los microorganismos solubilizadores de fósforo se aplicó el método Colorimétrico de azul de molibdeno Mo-Blue. (Murphy y Riley, 1962), donde se puede determinar la concentración de fósforo soluble en ppm.

Primeramente se obtuvo una curva de calibración a partir de una solución estándar de fosfato de hidrógeno mono potásico KH_2PO_4 a 100 ppm y un conjunto de soluciones con concentraciones que comprenden los valores: 0; 0.4; 1; 2; 3 y 5 ppm de fósforo, utilizando la ecuación $C_1V_1=C_2V_2$.

El fundamento de la técnica consiste en la determinación de fósforo soluble en una solución acuosa por el método de colorimetría utilizado un espectrofotómetro. Se forma ácido fosfoantimolibdeno azul en la presencia del ácido ascórbico; en esta solución también se agregó

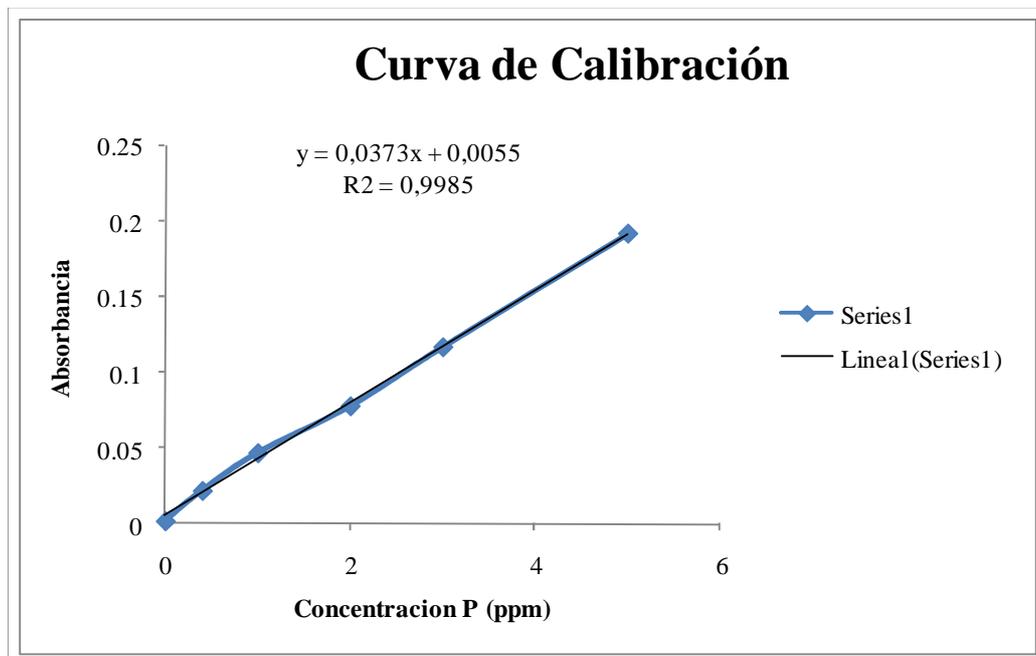
el ácido sulfúrico concentrado que provoca que los iones ortofosfato reaccionen con los iones molibdato formando el ácido ascórbico, se reduce a azul de fosfomolibdeno al cabo de 5 minutos. Esta prueba nos permitió tener una selección más clara de los microorganismos a los que se les realizó las pruebas de la curva de crecimiento, es la manera más exacta de cuantificar las concentraciones de fósforo soluble.

Tabla 12.: Resultados de la curva de calibración

Concentración de Fósforo (ppm)	Absorbancia (A) 660nm
0	0.002
0.4	0.022
1	0.047
2	0.078
3	0.117
5	0.192

Elaborado por: Cristina Larrea. Facultad Ciencias Ambientales. UISEK.

Gráfico 2.: Curva de calibración de fósforo



Elaborado por: Cristina Larrea. Facultad Ciencias Ambientales. UISEK.

Estándar: Fosfato decálcico de potasio 100mg/l

Concentraciones: 0 a 5

Técnica Murphy y Riley: Solución A + Solución B y lectura en el espectrofotómetro

b: Pendiente

y: Medida de Absorvancia de c/muestra

x: Concentración en ppm Fósforo

R2: Linealidad

En el Gráfico 2 se presenta la curva entre las lecturas de Absorvancia y la concentración conocida de cada solución de fósforo, para luego determinar la regresión lineal encontrando la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación lineal.

4.2.1.1 Cálculo de la concentración de fósforo soluble

Para el cálculo de la concentración del Fósforo soluble, o lo que es lo mismo la capacidad solubilizadoras de cada cepa expresada en ppm se calcula con los datos obtenidos de la curva de calibración, y el último dato de la Absorvancia medida (Día 4), de la siguiente manera:

Ejm.: Cálculo concentración Fósforo soluble en ppm de Ceba # 1

Datos:

Abs (Blanco) = 0.041

Abs (Ceba #3) = 0.135

Señal corregida = Abs (Ceba #3) - Blanco

$$x = \frac{y - a}{b}$$

$$x = \frac{0.094 - 0.0055}{0.0373}$$

$$x = 2.37 \text{ ppm P soluble}$$

Tabla 13.: Resultados de absorbancia de las cepas seleccionadas

Cepa #1		
Día 1	6.1.2.6/2.1	0.018
Día 2	6.1.2.6/2.2	0.021
Día 3	6.1.2.6/2.3	0.059
Día 4	6.1.2.6/2.4	0.094

Cepa #2		
Día 1	7.6.6.33/2.1	0.052
Día 2	7.6.6.33/2.2	0.068
Día 3	7.6.6.33/2.3	0.094
Día 4	7.6.6.33/2.4	0.128

Cepa #3		
Día 1	7.1.2.7/3.1	0.056
Día 2	7.1.2.7/3.2	0.094
Día 3	7.1.2.7/3.3	0.112
Día 4	7.1.2.7/3.4	0.147

Cepa #4		
Día 1	7.6.6.33/1.1	0.036
Día 2	7.6.6.33/1.2	0.056
Día 3	7.6.6.33/1.3	0.098
Día 4	7.6.6.33/1.4	0.112

Cepa #5		
Día 1	14.5.4.23/3.1	0.025
Día 2	14.5.4.23/3.2	0.044
Día 3	14.5.4.23/3.3	0.057
Día 4	14.5.4.23/3.4	0.074

Cepa #6		
Día 1	6.7.3.34/1.1	0.058
Día 2	6.7.3.34/1.2	0.116
Día 3	6.7.3.34/1.3	0.144
Día 4	6.7.3.34/1.4	0.138

Cepa #7		
Día 1	7.6.6.33/3.1	0.015
Día 2	7.6.6.33/3.2	0.041
Día 3	7.6.6.33/3.3	0.081
Día 4	7.6.6.33/3.4	0.102

Cepa #8		
Día 1	7.8.3.48/1.1	0.460
Día 2	7.8.3.48/1.2	0.079
Día 3	7.8.3.48/1.3	0.105
Día 4	7.8.3.48/1.4	0.117

Cepa #9		
Día 1	7.8.3.48/2.1	0.036
Día 2	7.8.3.48/2.2	0.056
Día 3	7.8.3.48/2.3	0.086
Día 4	7.8.3.48/2.4	0.114

Cepa #10		
Día 1	7.36.1.3/1.1	0.041
Día 2	7.36.1.3/1.2	0.940
Día 3	7.36.1.3/1.3	0.121
Día 4	7.36.1.3/1.4	0.145

Elaborado por: Cristina Larrea. Facultad Ciencias Ambientales. UISEK

Tabla 14.: Capacidad de solubilización de cada cepa expresada en ppm

# Cepa	Valor de Absorbancia	Concentración (ppm)
1	0.094	2.37
2	0.128	3.28
3	0.147	3.79
4	0.112	2.86
5	0.074	1.84
6	0.138	3.55
7	0.102	2.59
8	0.117	2.99
9	0.114	2.91
10	0.145	3.74

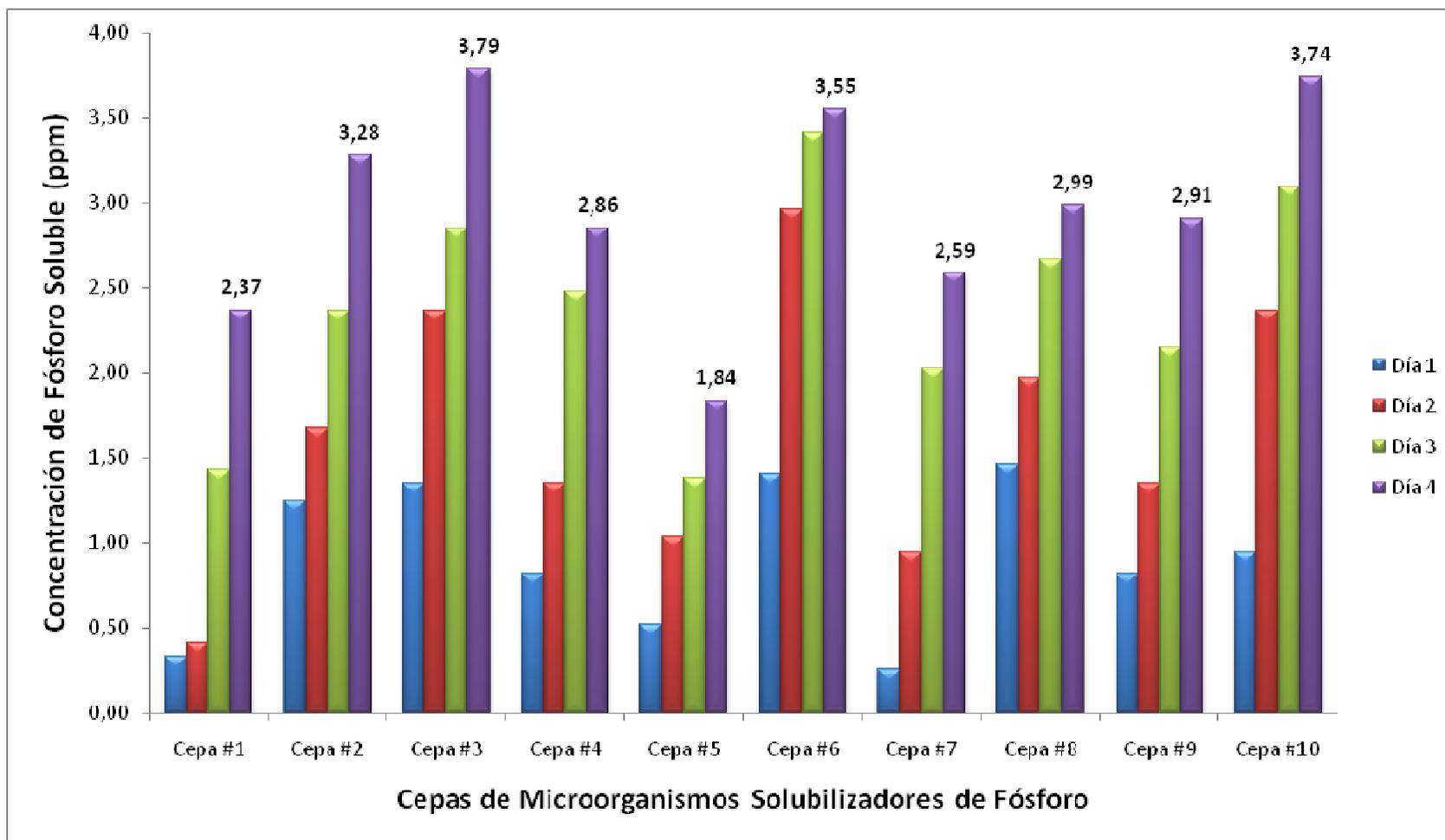
Elaborado por: Cristina Larrea. Facultad Ciencias Ambientales. UISEK

En la Tabla 14 se muestra el resultado de la selección de los mejores microorganismos solubilizadores de fósforo mediante una cuantificación del Fósforo Soluble, cuando se forma ácido fosfoantimolibdeno azul en presencia de ácido ascórbico, el cual se observó claramente en todas las muestras analizadas. De las 24 cepas que inicialmente se tomaron para el aislamiento se separaron 10 cepas en base al tamaño de su halo de solubilización, de estas; 4 cepas presentaron los mejores valores de solubilización de fósforo en la concentración en ppm. Representan aproximadamente el 16% del total de microorganismos analizados.

La Cepa #3: 7.1.2.7.3 presenta el resultado más alto con 3.79 ppm de Fósforo al cuarto día con respecto a las otras cepas.

En el Gráfico 3 se muestra los valores de cada cepa durante los 4 días en los que se realizó la lectura con el espectrofotómetro, el 75% son microorganismos aislados del Bloque 7. La mayor actividad empieza durante el 4 día, comparando esto con los resultados de Del Hierro, 2010; Simbaña, 2010 y Bobadilla, 2008 se puede concluir que los puntos más altos de fósforo solubles empiezan entre el cuarto y quinto día, dependiendo del tipo de microorganismo.

Gráfico 3.: Concentración de Fósforo Soluble de las mejores cepas Solubilizadoras de Fósforo



Elaborado por: Cristina Larrea. Facultad Ciencias Ambientales. UISEK

4.3 Cinética mejores cepas microorganismos solubilizadores de fósforo

Se escogieron dos cepas para la determinar las curvas de crecimiento y los valores de fósforo tanto soluble como insoluble hasta obtener el tiempo de retención. Estas dos cepas corresponden a Cepa # 3: 7.2.2.7 y la Cepa #10: 7.36.1.3 que provienen de las muestras tomadas del suelo del bloque 7.

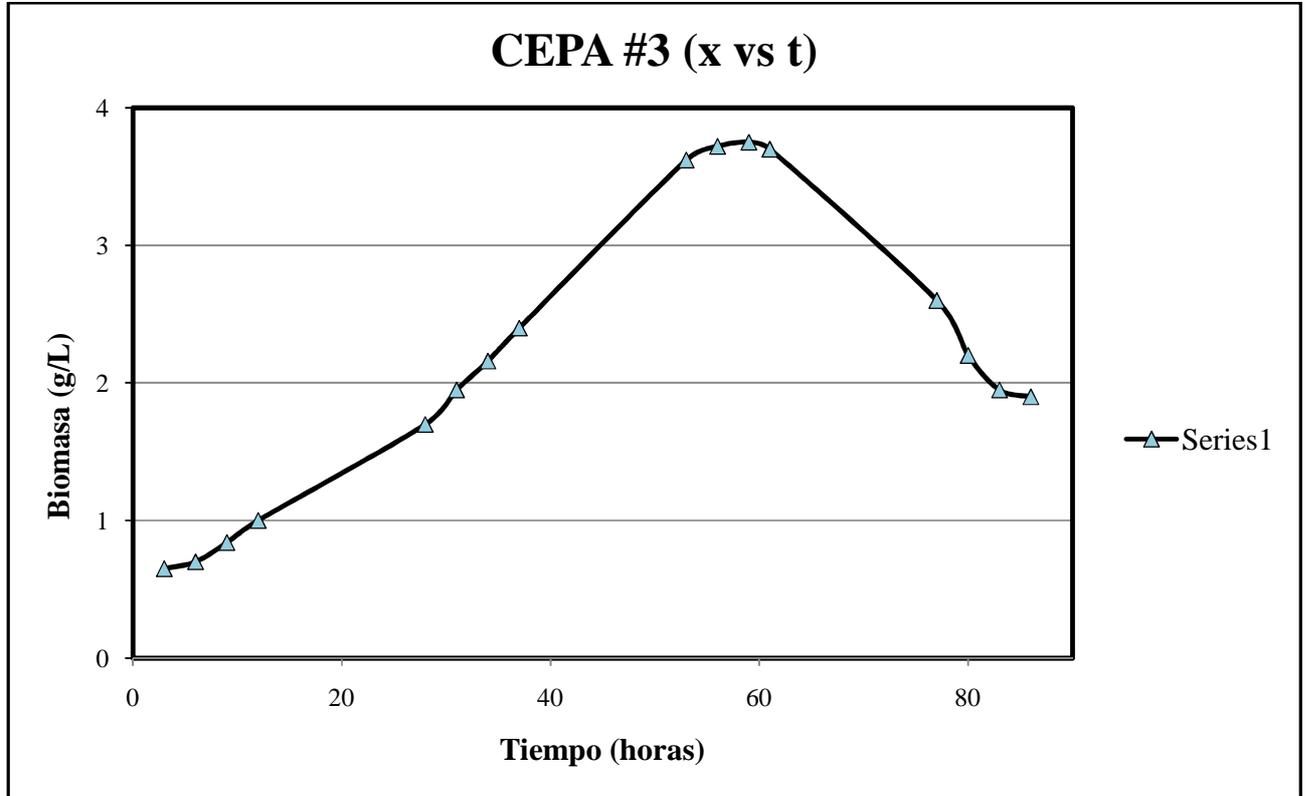
4.3.1 Determinación de Biomasa (Peso Seco) para la cepa #3

Tabla 15.: Resultados de Biomasa para cepa #3

Tiempo (h)	Peso (g) Caja Vacía	Peso (g) Caja vacía + Papel	Peso (g) Caja Vacía + Papel + Muestra	Diferencia	X (Biomasa) (g/L)
3	79,8590	79,9868	79,9933	0,0065	0,65
6	76,0604	76,1870	76,1940	0,0070	0,70
9	82,8084	82,9348	82,9432	0,0084	0,84
12	90,6023	90,7298	90,7398	0,0100	1,00
28	85,0414	85,1687	85,1857	0,0170	1,70
31	75,5683	75,6962	75,7157	0,0195	1,95
34	70,1545	70,2815	70,3031	0,0216	2,16
37	66,2359	66,3628	66,3868	0,0240	2,40
53	71,2689	71,3954	71,4316	0,0362	3,62
56	82,3645	82,4925	82,5297	0,0372	3,72
59	93,2503	93,3786	93,4161	0,0375	3,75
61	76,2596	76,3866	76,4236	0,0370	3,70
77	83,4578	83,5860	83,6120	0,0260	2,60
80	87,6523	87,7790	87,8010	0,0220	2,20
83	90,5620	90,6889	90,7084	0,0195	1,95
86	76,2596	76,385	76,4040	0,0190	1,90

Elaborado por: Cristina Larrea. Facultad Ciencias Ambientales. UISEK.

Gráfico 4.: Curva de crecimiento para Cepa #3



Elaborado por: Cristina Larrea. Facultad Ciencias Ambientales. UISEK

En el Gráfico 4 se presenta la curva de crecimiento de la Cepa #3, en donde se obtiene el valor más alto de la biomasa de bacterias solubilizadoras (X) en g/L aproximadamente a las 60 horas. Es decir cuando hay el mayor número de estos microorganismos. Se puede observar claramente las fases de crecimiento microbiano, la fase LAG o de adaptación, la fase de crecimiento o logarítmica que es cuando las poblaciones crecen aceleradamente, la fase estacionaria cuando mantiene un nivel estable de crecimiento y metabolismo y por último la fase de muerte que ocurre por el agotamiento de nutrientes y el aumento de sustancia tóxicas.

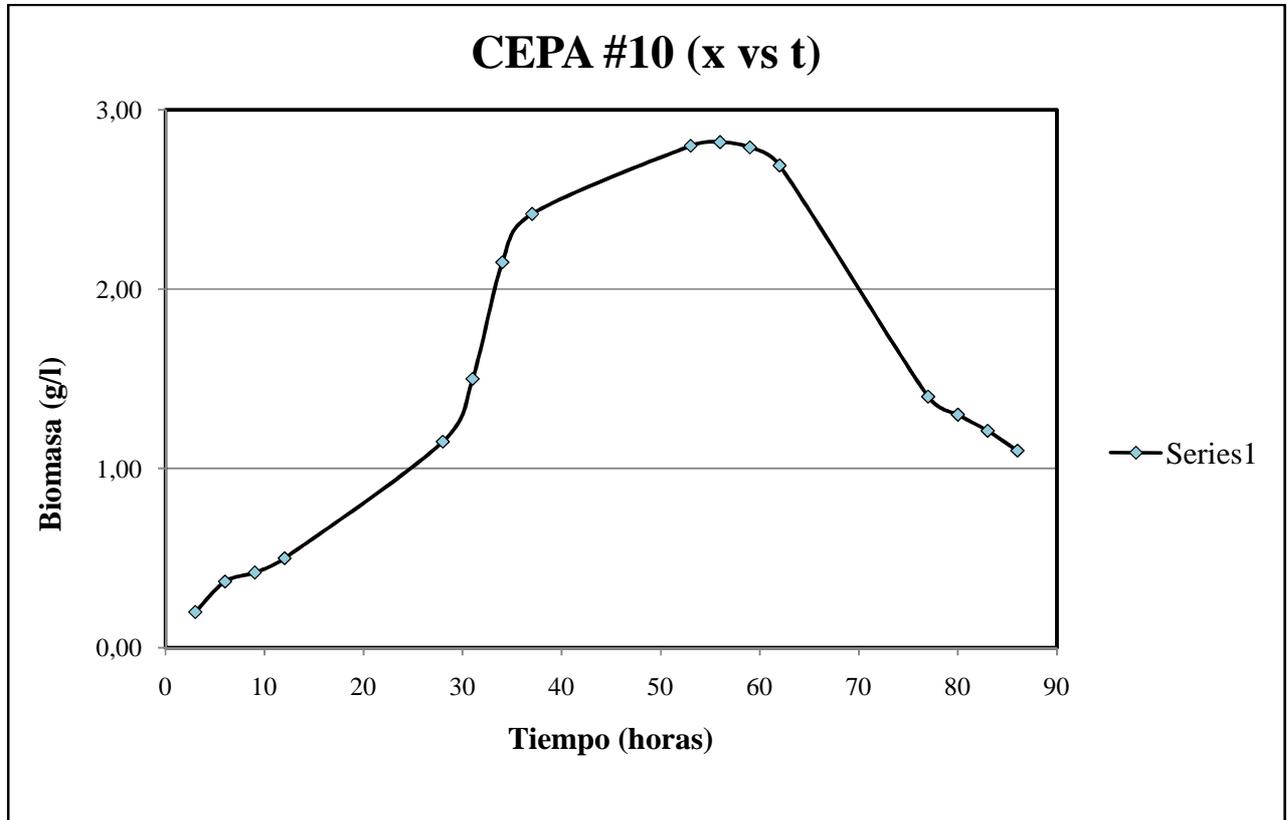
4.3.2 Determinación de Biomasa (Peso Seco) para la cepa #10

Tabla 16.: Resultados de Biomasa para cepa #10

Tiempo (h)	Peso (g) Caja Vacía	Peso (g) Caja vacía + Papel	Peso (g) Caja Vacía + Papel + Muestra	Diferencia	X (Biomasa) (g/l)
3	78,3817	78,5070	78,5090	0,0020	0,20
6	84,3170	84,4441	84,4478	0,0037	0,37
9	87,1724	87,2990	87,3032	0,0042	0,42
12	77,5276	77,6541	77,7041	0,0500	0,50
28	91,3592	91,4865	91,4980	0,0115	1,15
31	76,1756	76,3018	76,3168	0,0150	1,50
34	80,2412	80,3687	80,3902	0,0215	2,15
37	90,2113	90,3386	90,3628	0,0242	2,42
53	75,1547	75,2805	75,3085	0,0280	2,80
56	86,2589	86,3867	86,4149	0,0282	2,82
59	83,9856	84,1116	84,1395	0,0279	2,79
61	74,8568	74,9833	75,0102	0,0269	2,69
77	82,4569	82,5829	82,5969	0,0140	1,40
80	81,2152	81,3430	81,3560	0,0130	1,30
83	85,2615	85,3900	85,4021	0,0121	1,21
86	94,8574	94,9837	94,9947	0,0110	1,10

Elaborado por: Cristina Larrea. Facultad Ciencias Ambientales. UISEK

Gráfico 5.: Curva de crecimiento para Cepa #10



Elaborado por: Cristina Larrea. Facultad Ciencias Ambientales. UISEK

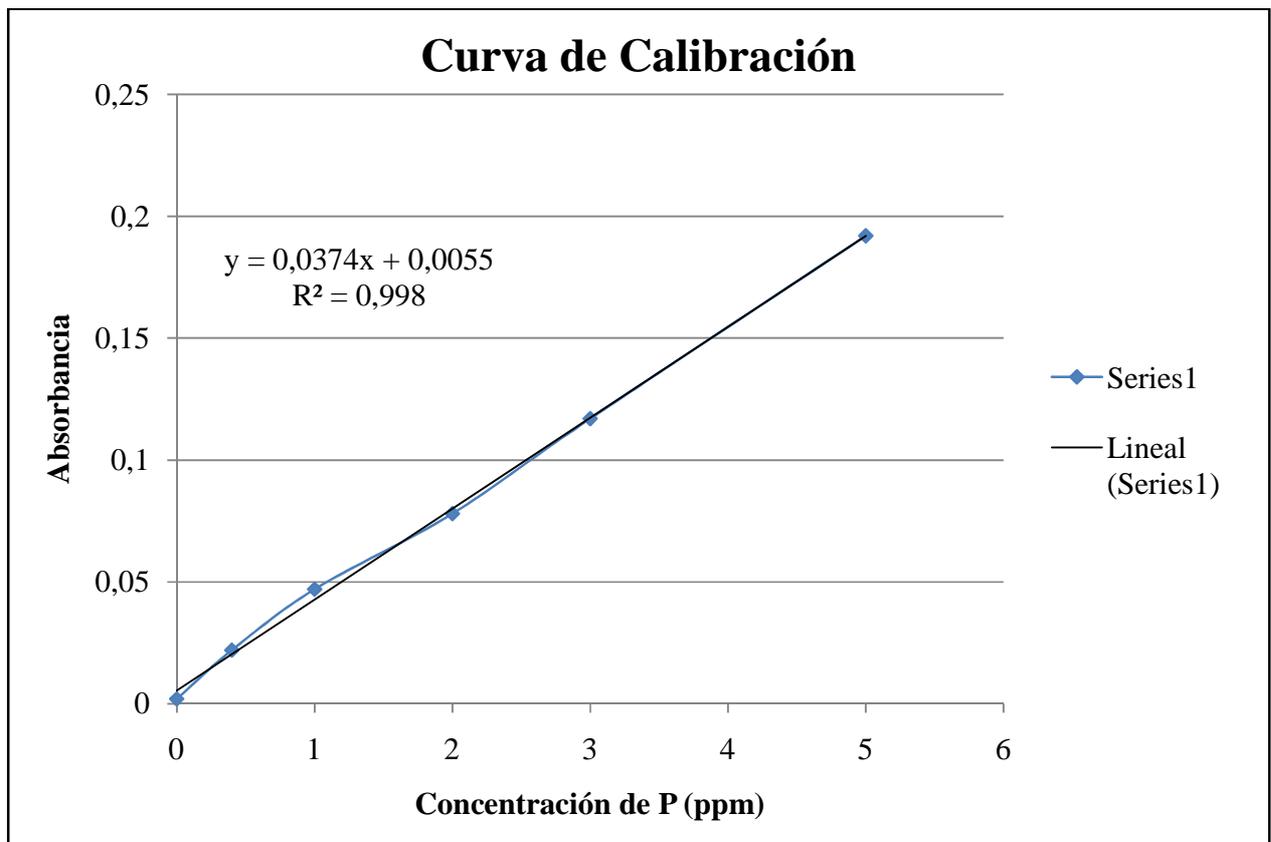
En el Gráfico 5 se presenta la curva de crecimiento de la Cepa #10, en donde se obtiene el valor más alto de la biomasa de bacterias solubilizadoras (X) en g/L aproximadamente entre las 50 y 60 horas. Es decir cuando hay el mayor número de estos microorganismos. Se puede observar claramente las fases de crecimiento microbiano, la fase LAG o de adaptación, la fase de crecimiento o logarítmica que es cuando las poblaciones crecen aceleradamente, la fase estacionaria cuando mantiene un nivel estable de crecimiento y metabolismo y por último la fase de muerte que ocurre por el agotamiento de nutrientes y el aumento de sustancia tóxicas.

4.3.3 Curva de calibración para mediciones de fósforo soluble e insoluble

Concentración (ppm)	Absorbancia
0	0,002
0,4	0,022
1	0,047
2	0,078
3	0,117
5	0,192

a	0,0055
b	0,0374
r	
y=a+bx	

Gráfico 6.: Curva de calibración para determinación de fósforo en solución acuosa

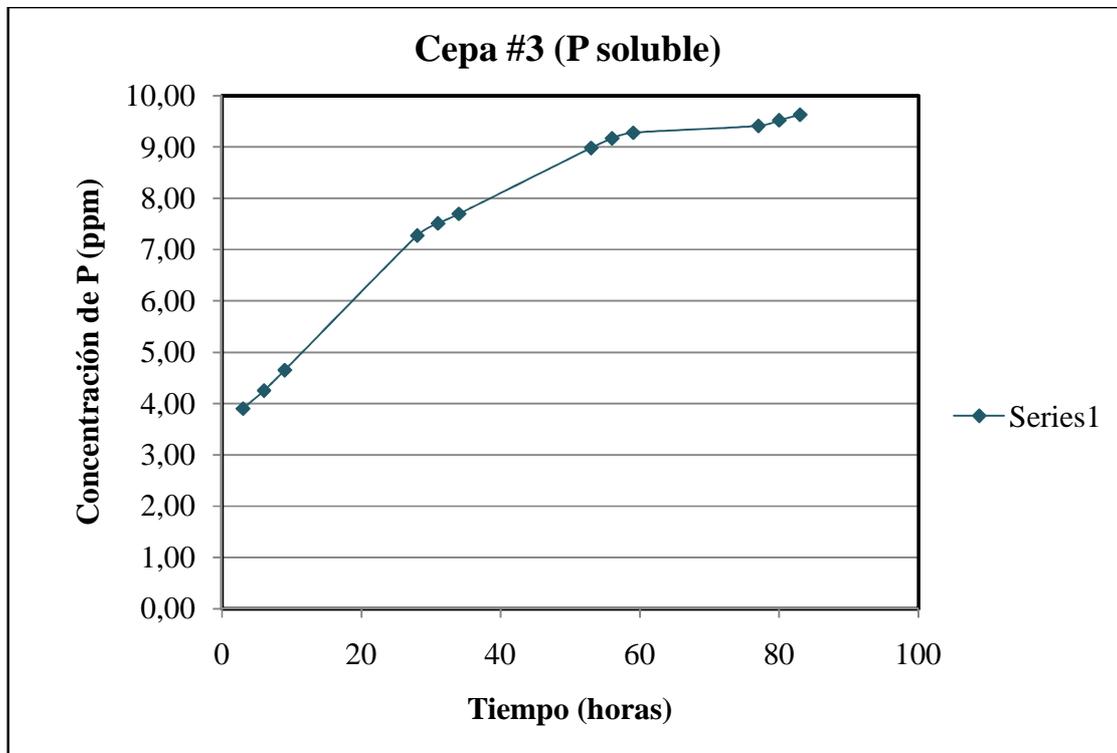


4.3.4 Curvas de fósforo soluble e insoluble para cepa #3

Tabla 17.: Resultados de Fósforo Soluble e Insoluble para la cepa #3

Tiempo (horas)	Abs (660nm)	P soluble (ppm)	P insoluble (ppm)
3	0,151	3,90	6,10
6	0,164	4,25	5,75
9	0,179	4,65	5,35
28	0,277	7,27	2,73
31	0,286	7,51	2,49
34	0,293	7,70	2,30
53	0,341	8,98	1,02
56	0,348	9,17	0,83
59	0,352	9,28	0,72
77	0,357	9,41	0,59
80	0,361	9,52	0,48
83	0,365	9,63	0,37

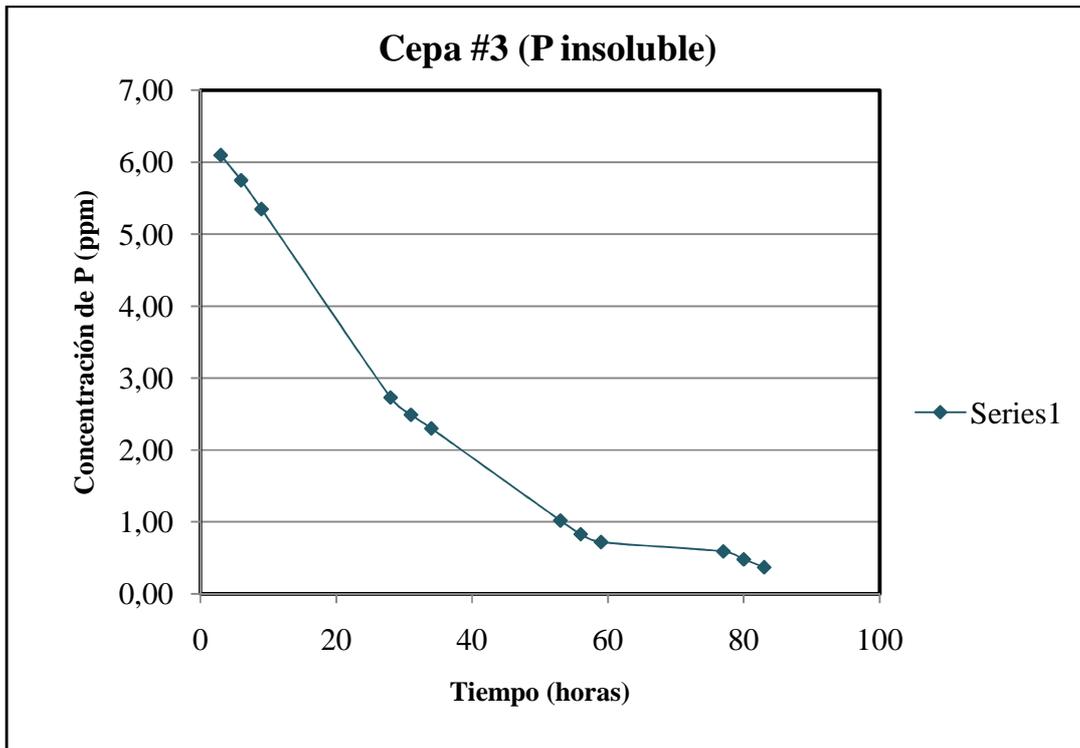
Gráfico 7.: Concentración de Fósforo soluble vs Tiempo Cepa #3



Elaborado por: Cristina Larrea. Facultad Ciencias Ambientales. UISEK

El Gráfico 7 nos indica el aumento de la concentración (ppm) de fósforo soluble en función del tiempo, producido por la actividad solubilizadora la cepa 1 de transformar el fósforo insoluble en soluble por la producción de ácidos orgánicos realizado en condiciones de laboratorio.

Gráfico 8.: Concentración de Fósforo insoluble vs Tiempo Cepa #3



Elaborado por: Cristina Larrea. Facultad Ciencias Ambientales. UISEK

El Gráfico 8, nos indica el descenso de la concentración (ppm) de fósforo insoluble en función del tiempo, producido por la capacidad solubilizadora de la cepa 1 de convertir formas no asimilables en asimilables.

Los datos se obtienen en relación al análisis de la florícola de 10 ppm de fósforo insoluble en el suelo para el bloque 7. El fósforo soluble se saca con el cálculo de acurdo a dato de absorvancia realizado anteriormente y el valor de fósforo insoluble se obtiene por diferencia.

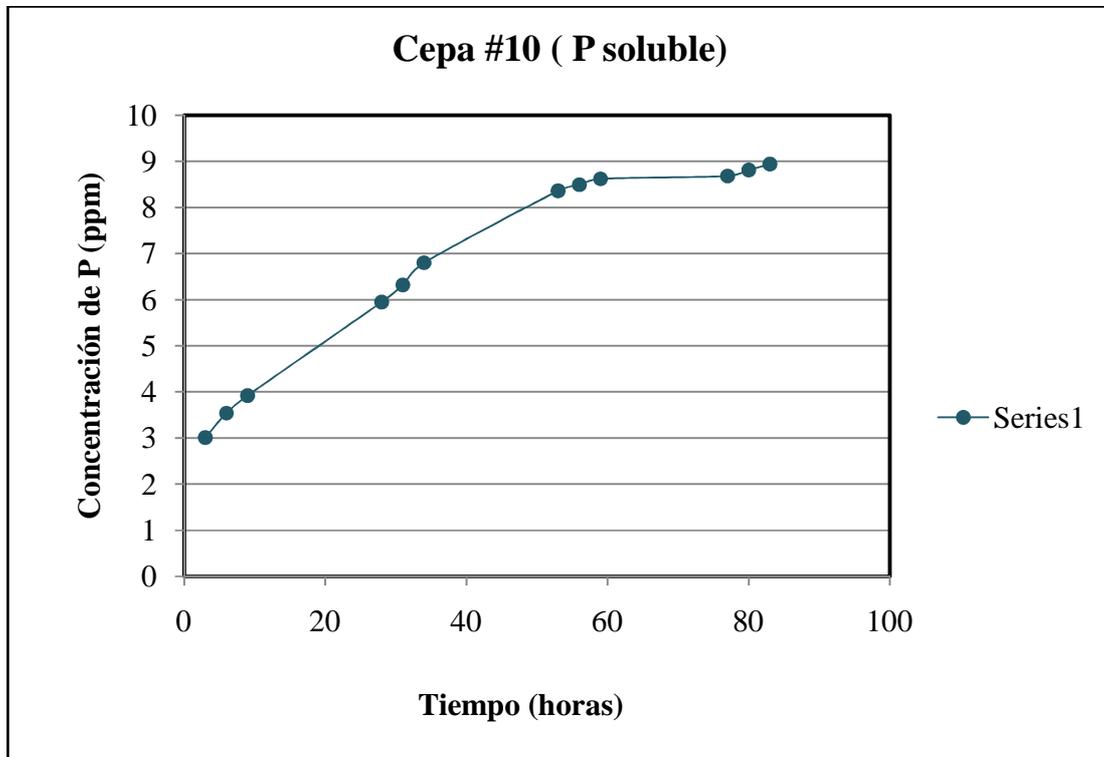
4.3.5 Curvas de fósforo soluble e insoluble para cepa #10

Tabla 18.: Resultados para Cepa #10 de Fósforo Soluble e Insoluble

Tiempo (h)	Abs (660nm)	P soluble (ppm)	P insoluble (ppm)
3	0,118	3,01	6,99
6	0,138	3,54	6,46
9	0,152	3,92	6,08
28	0,228	5,95	4,05
31	0,242	6,32	3,68
34	0,260	6,8	3,2
53	0,318	8,36	1,64
56	0,323	8,49	1,51
59	0,328	8,62	1,38
77	0,330	8,68	1,32
80	0,335	8,81	1,19
83	0,340	8,94	1,06

Elaborado por: Cristina Larrea. Facultad Ciencias Ambientales. UISEK

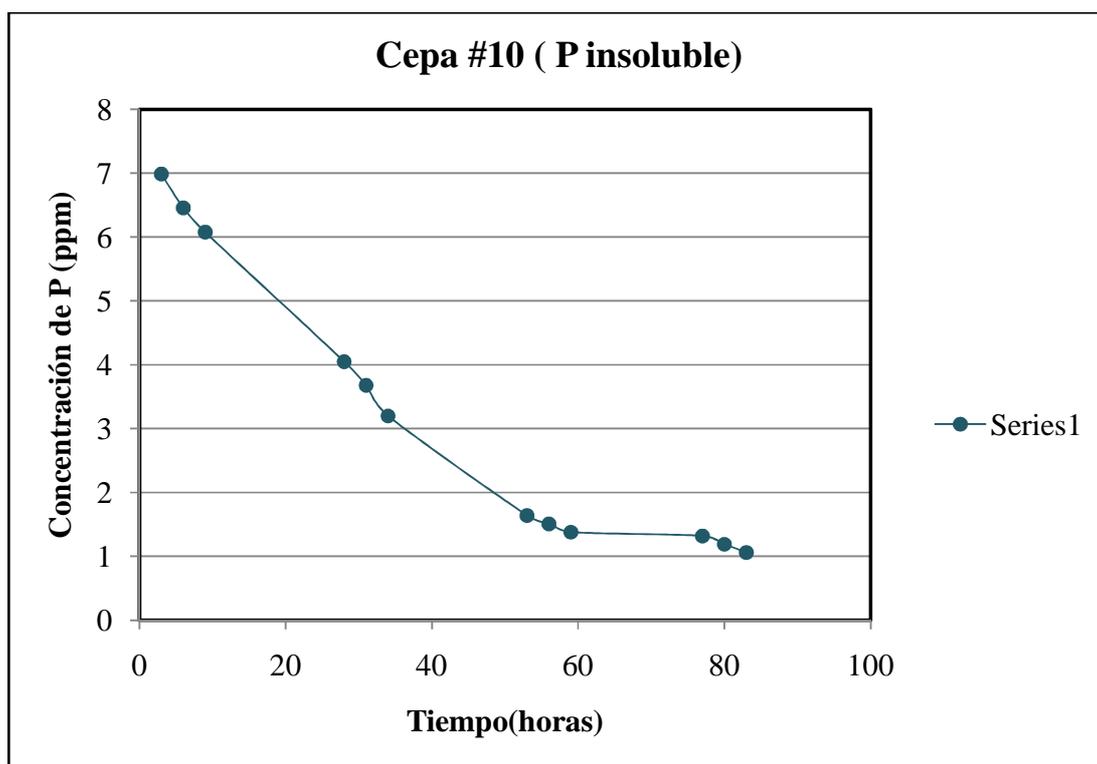
Gráfico 9.: Concentración de Fósforo soluble vs Tiempo Cepa #10



Elaborado por: Cristina Larrea. Facultad Ciencias Ambientales. UISEK

El Gráfico 9, nos indica el aumento de la concentración (ppm) de fósforo soluble en función del tiempo, producido por la actividad solubilizadora la cepa 2 de transformar el fósforo insoluble en soluble por la producción de ácidos orgánicos realizado en condiciones de laboratorio.

Gráfico 10.: Concentración de Fósforo insoluble vs Tiempo Cepa #10



Elaborado por: Cristina Larrea. Facultad Ciencias Ambientales. UISEK

El Gráfico 10, nos indica el descenso de la concentración (ppm) de fósforo insoluble en función del tiempo, producido por la capacidad solubilizadora de la cepa 2 de convertir formas no asimilables en asimilables.

Los datos se obtienen en relación al análisis de la florícola de 10 ppm de fósforo insoluble en el suelo para el bloque 7. El fósforo soluble se saca con el cálculo de acuerdo a dato de absorvancia realizado anteriormente y el valor de fósforo insoluble se obtiene por diferencia.

CAPITULO V

Conclusiones y Recomendaciones

CAPITULO V: Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Conclusiones

- Se comprobó la hipótesis alternativa de que los métodos diseñados y parámetros seleccionados para el aislamiento de los microorganismos solubilizadores de fosforo insoluble son efectivos, porque se aislaron exitosamente diez cepas de microorganismos solubilizadores de fósforo.
- En la selección de las mejores cepas se utilizó la prueba cuantitativa por el método colorimétrico de Molibdato o Mo-Blue que cuantifica iones ortofosfato, es decir el fósforo soluble; en una solución acuosa y se seleccionó las cuatro mejores cepas solubilizadoras de fósforo.
- Los estudios cinéticos permitieron determinar los tiempos de retención o solubilización del fosforo insoluble, se utilizó como medida de poblaciones microbianas la técnica de peso seco, con los datos resultantes se graficó la curva de crecimiento para dos de las mejores cepas aisladas y seleccionadas solubilizadoras de fósforo, y se determinó los tiempos de retención entre 60 y 90 horas (3 días) para las dos cepas en mención.
- Con la técnica de Molibdato o Mo.-Blue se pudo medir la cantidad de fósforo soluble e insoluble relacionado con las horas de crecimiento para dos de las mejores cepas aisladas y seleccionadas, aproximadamente a las 80 horas (3días) se tienen los valores más altos en la medida de poblaciones microbianas solubilizadoras.
- Los parámetros críticos de la biosolubilización de fósforo se determinaron teóricamente y estos son: pH, temperatura, cantidad de agua, oxígeno y nutrientes, con todos los parámetros y los tiempos de retención es posible ya diseñar un bioproceso de biosolubilización en suelos de una Florícola de Tabacundo.

5.2 Recomendaciones

- Se recomienda, escalar la investigación a prueba piloto de campo, con los resultados de la prueba piloto de laboratorio utilizando las dos mejores cepas que solubilizan el fosforo insoluble, se diseñe, ejecute y controle el bioproceso de solubilización y se utilice los tiempos de retención o tiempos de solubilización.
- A través de los estudios de selección es posible realizar una investigación de los ácidos orgánicos producidos por estas cepas, con estos se tendría datos exactos de los ácidos necesarios para la solubilización y cuál de ellos sería el más eficiente.
- Realizar los estudios de costo beneficio para las especies de flores más comunes en la producción nacional, empezando por estudios de crecimiento de dichas plantas.

Referencias Bibliográficas

6. Referencias Bibliográficas

- Acevedo F, Gentina J. y Illanes A. (2006). Fundamentos de Ingeniería Bioquímica. Ediciones Universitarias de Valparaiso. Santiago de Chile. Chile.
- Alexander, M. 1980. Introducción a la Microbiología del Suelo. Wiley. Estados Unidos.
- Babadilla C. y Rincón S. (2008). Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de Compost obtenido de Residuos de Plaza. PUJ. Facultad de Ciencias. Bogotá. Colombia.
- Banco Central del Ecuador. (2007). Exportaciones por Actividad Económica, Información de Cartera.
- Brook D.T. y T.M. Madigan. (2004). Microbiología. 6ta. Edición. Prentice Hall Hispanoamérica S.A. México D.F., México.
- Castillo F. (2005). Biotecnología Ambiental. Editorial Tébar. Madrid. España.
- Coyne M. (2000). Microbiología del suelo: Un enfoque exploratorio. Editorial Parainfo. Madrid. España
- Del Hierro P. (2010). Aislamiento y selección de los mejores microorganismos fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fósforo y antagonistas, a partir de suelos, raíces y de un bioinoculante aplicado en los cultivos de una florícola. UCE. Facultad de Ciencias Químicas. Quito. Ecuador.

- Murphy y Riley. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters.
- Navarro G. (2003). Química agrícola: el suelo y los elementos químicos esenciales para la vida. Ediciones Mundi Prensa. Madrid. España.
- Novos R., (2002). Biofertilizantes y Biofertilización. Curso Internacional de Microbiología del suelo. ASOINCO
- Rittman B. (2001). Biotecnología del Medio Ambiente. 1era. Edición. Mc Graw Hill. Madrid. España.
- Sanzano A. (2003). El fósforo en el suelo. Facultad de agronomía y zootecnia. UNT. Buenos Aires. Argentina.
- Sanz M. Sánchez J. y Sánchez A. (2006). 1era. Edición. Química del suelo y Medio Ambiente. Universidad de Alicante. España.
- Saña J., Moré J.C., Ramón A. (1995). La Gestión de la fertilidad de los suelos. Fundamentos para la interpretación de los análisis de suelos y la recomendación de abonado. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. España.
- Simbaña B. (2010). Aislamiento, selección, adaptación, preservación de microorganismos solubilizadores de fosfatos insolubles. UCE. Facultad de Ciencias Químicas. Quito. Ecuador.

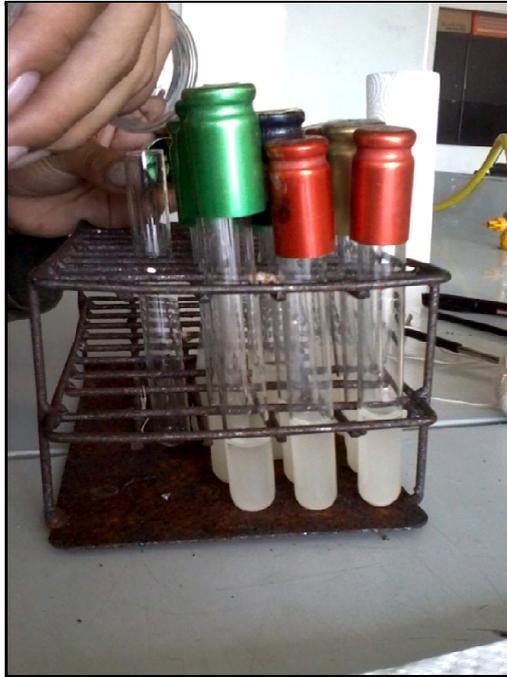
- Undurranga P. (2003). Conceptos de fertilidad fosfatada en suelos volcánicos. INIA. Chile. [Artículo electrónico] Disponible en: www.inia.cl/medios/biblioteca/serieactas/NR25013.pdf
- Valenzuela E., Barrera S., Pinochet D. (2002). Solubilización de Roca Fosfórica Carolina del Norte con cepas de *Aspergillus Niger* aisladas desde un suelo trumao. [Artículo electrónico] Disponible en: http://www.uv.cl/servicios/externos/lab_micologia/boletines/micologia%202002/4.4%20roca_fosforica.pdf
- Vera D., Pérez H. y Valencia H. (2002). Distribución de hongos solubilizadores de fosfatos en dos microhábitats de suelo con dos unidades fisiológicas de Guaviare. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Bogotá. Colombia. [Artículo electrónico] Disponible en: <http://www.virtual.unal.edu.co/revistas/actabiol/PDF's/V7N1/Art2V7N1.pdf>
- Walsh E. (2010). Estudio de la productividad del cultivo de Delphinium, variedad Sea Waltz, con la aplicación de microorganismos benéficos (*Trichoderma harzianum*, *Gliocladium spp.*, *Bacillus subtilis*, *Azospirillum spp.* Y *Azotobacter spp.*). Escuela Politécnica Nacional. Quito. Ecuador. [Artículo electrónico] Disponible en: <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/1658/1/CD-2687.pdf>

Anexos



Anexo 1: Fotos de las Cepas Solubilizadoras de Fósforo.

Medio PVK líquido para aislamiento de cepas a partir de suelos



Medio PVK sólido para aislamiento de cepas a partir de suelos



Cepa 6.7.3.34.1 seleccionada por halo de solubilización



Selección, solución acuosa para método colorimétrico Murphy y Riley 1962

