UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

CARRERA: INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Tesis previa a la obtención del título de: INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:

AISLAMIENTO DE BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE CALCIO DE LA RIZÓSFERA DE CULTIVOS DE ALCACHOFA (CYNARA SCOLYMUS) UBICADOS EN LASO- LATACUNGA- COTOPAXI

AUTORAS:

LUCÍA PAGUAY MOREJÓN

EVELYN ALEXANDRA VASCO CALVACHE

DIRECTORA:

DIANA LUCÍA CALERO CONSUEGRA

Quito, junio del 2013

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Nosotras, Lucía Paguay Morejón y Evelyn Alexandra Vasco Calvache, autorizamos a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de grado y su reproducción sin fines de lucro.

Además declaramos que los conceptos y análisis desarrollados y las conclusiones del presente trabajo son de exclusiva responsabilidad de las autoras.

Quito, junio, del, 2013

Lucía Paguay Morejón

C.I 171647460-4

Evelyn Alexandra Vasco Calvache

CI. 1720194966

DEDICATORIA

A Dios por darnos la oportunidad de fortalecer e iluminar nuestro camino durante el transcurso de nuestros proyectos

A nuestros padres y hermanos quienes han sido nuestro soporte y compañía a lo largo de nuestra vida estudiantil, por enseñarnos a caminar con paso firme , por dejarnos caminar solas pero siempre teniendo la convicción de que estarán ahí para levantarnos. Gracias por su amor incondicional y comprensión

AGRADECIMIENTOS

A los laboratorios AGRODIACNOSTIC y CENTROCESAL por habernos permitido realizar los análisis requeridos para alcanzar los objetivos planteados en la presente investigación.

A nuestra Directora de Tesis, Diana Calero, por su apoyo incondicional y su generosidad al brindarnos la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia en un marco de confianza y afecto, fundamentales para la concreción de este trabajo.

Los docentes y autoridades de la carrera Diana Calero, Ma. Elena Maldonado, Patricio Yánez, Pablo Coba, por su apoyo científico y por sus valiosas sugerencias durante el desarrollo de este trabajo.

A Daniela Espinoza por su apoyo incondicional, valiosas sugerencias y paciencia durante la fase experimental de la presente investigación.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN ---------- 1
CAPÍTULO I ---------- 3
GENERALIDADES ---------- 3
1.1 Tema ---------- 3
1.2 Justificación ---------- 3
1.3 Objetivos e hipótesis ---------- 6
1.3.1 Objetivo general ---------- 6
1.3.2 Objetivos específicos ---------- 6
1.3.3 Hipótesis de trabajo ---------- 6
CAPÍTULO II ---------- 7
MARCO TEÓRICO ---------- 7
2.1 Importancia del calcio ---------- 7
2.1.1 El calcio en la naturaleza ---------- 7
2.1.2 El calcio en el suelo ---------- 7
2.1.3 El calcio en la planta ---------- 9
2.1.4 Ciclo del calcio ---------- 10
2.1.5 Funciones del calcio en la nutrición vegetal ---------- 12
2.1.6 Alteraciones en la planta por deficiencia o exceso de calcio ---------- 14
2.1.7 Calcio en la agricultura ---------- 15
2.1.8 La adición de cal a los suelos ácidos. ---------- 16
2.2 Microorganismos del suelo ---------- 17
2.2.1 Distribución de los microorganismos en el suelo ---------- 17
2.2.2 La rizósfera y los microorganismos ---------- 18
2.2.3 Microorganismos solubilizadores de calcio ---------- 20
2.2.4 Los microorganismos y su relación con la agricultura ---------- 22
2.3 Biofertilizantes ---------- 23
2.3.1 Características de los biofertilizantes ---------- 24
2.3.2 Modo de acción de los biofertilizantes ---------- 25
2.3.3 Funciones que cumplen los biofertilizantes ---------- 25
2.3.4 Biofertilizantes comerciales ---------- 26
2.4 Alcachofa ---------- 28
2.4.1 Importancia Económica ---------- 29
CAPÍTULO III ---------- 31
MATERIALES Y MÉTODOS ---------- 31
3.1 Tipo de investigación ---------- 31
3.2 Fase de campo ---------- 31
3.2.1 Área del lugar de muestreo ---------- 31
3.2.2 Recolección de muestras de suelo en los lotes de alcachofa ---------- 32
3.3 Fase de laboratorio ---------- 33
3.3.1 Aislamiento de bacterias solubilizadoras de calcio insoluble. ---------- 33
3.3.1.1 Técnica de diluciones seriadas (Tortora, Funke, & Case, 2007) ---------- 33
3.3.1.2 Coloración de Gram (Forbes, Sham, & Weissfeld, 2009) ---------- 34

3.3.1.3 Método de siembra por estría (cultivos puros)----------35
3.3.2 Selección de las mejores cepas bacterianas solubilizadoras de calcio-----36
3.3.2.1 Técnica de enriquecimiento selectivo (Tortora, Funke, & Case, 2007)---36
3.3.2.2 Análisis en Espectroscopía de Absorción Atómica. (Skoog, Holler, &Nieman, 2000)) ----------38
3.3.2.3 Pruebas de Antagonismo----------39
3.3.2.4 Establecimiento del Cepario----------40
3.3.3 Identificación de Cepas Bacterianas ----------42
3.3.3.1 Pruebas MICROGEN GN ID. (Microgen GN ID, 2004) ----------42
3.3.4 Producción del biofertilizante ----------47
3.3.4.1 Reactivación de las cepas bacterianas----------47
3.3.4.2 Obtención del pre inóculo ----------47
3.3.4.3 Producción del biofertilizante a escala 10 litros. Fermentación discontinua----------48
3.4 Análisis de Datos----------49
CAPÍTULO IV ----------51
RESULTADOS ----------51
4.1 Aislamiento de bacterias solubilizadoras de calcio ----------51
4.2 Evaluación de la actividad solubilizadora----------54
4.2.1 Evaluación de resultados obtenidos en la medición de halos de solubilización en cajas petri, con ANOVA de una vía y su comparación con la prueba Tukey ----------54
4.2.2 Evaluación de resultados obtenidos en el análisis con espectroscopia de absorción atómica Test de Kolmogorov-Smirnov (K-S)----------58
4.2.3 Análisis multivariado a través del tiempo----------61
4.3 Pruebas de antagonismo ----------65
4.4 Identificación de las cepas con mayor capacidad solubilizadora ----------67
4.5 Producción del biofertilizante líquido a escala 10 litros ----------70
CONCLUSIONES----------71
RECOMENDACIONES----------73
LISTA DE REFERENCIAS ----------74
ANEXOS----------78

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Macronutrientes y la forma que se encuentran en el suelo..... 9

Cuadro 2. Distribución de los microorganismos en un suelo expresado como miles por gramo..... 18

Cuadro 3. Exportaciones ecuatorianas de alcachofa fresca (miles de dólares)..... 30

Cuadro 4. Medio mínimal para aislamiento de microorganismos solubilizadores de calcio. 37

Cuadro 5. Características de las cepas aisladas de los suelos del sector de Lasso.... 52

Cuadro 6. Análisis de Varianza para pruebas de solubilización a las 24 horas de incubación medido en mm. 54

Cuadro 7. Prueba de Tukey para la variable halo de solubilización, medido en mm, a las 24 horas de incubación 55

Cuadro 8. Análisis de Varianza para pruebas de solubilización a las 48 horas de incubación. 56

Cuadro 9. Prueba de Tukey para el variable halo de solubilización, medido en mm, a las 48 horas de incubación 56

Cuadro 10. Interpretación del alfa (p) de los Resultados del Análisis de Kolmogorov-Smirnov para la comparación entre los vectores de solubilización..... 59

Cuadro 11. Resultados de tinción Gram 67

Cuadro 12. Resultados de Prueba Microgen ID..... 67

Cuadro 13. Particularidades de cada una de las bacterias identificadas 68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo del Calcio 11

Figura 2. Regiones de la rizósfera..... 19

Figura 3. Localización del Cultivo de Alcachofa, en el sector de Lasso, Parroquia Tanicuchi, Cantón Latacunga, Provincia de Cotopaxi..... 31

Figura 4. Carta de color para resultados de Tira GN A 44

Figura 5. Carta de color para resultados de Tira GN B..... 45

Figura 6. Carta Hoja de resultados de Microgen GN-ID 46

Figura 7. Gráfico de solubilización de calcio vs tiempo, medido en miligramos..... 60

Figura 8. Clúster obtenido del análisis multivariado de los resultados de calcio soluble alcanzados por cada cepa bacteriana. 61

Figura 9. Tendencias de solubilización de las cepas con los códigos 1.1.1.1; 1.2.2.6; 3.1.5.20; 4.1.7.27; 2.1.3.15; 3.1.5.19; 4.2.8.33, Tiempo (X) vs mg. de solubilización (Y)..... 62

Figura 10. Tendencias de solubilización de las cepas con los códigos 1.1.1.2; 2.1.3.12; y 2.2.4.16, Tiempo (X) vs mg. de solubilización (Y) 64

Figura 11. Tendencias de solubilización de las cepas con los códigos 1.2.2.8; 1.2.2.10; 2.1.3.14; Tiempo (X) vs mg. de solubilización (Y) 65

Figura 12. Fotografía de las pruebas de antagonismo, tras 48 horas de incubación, en los 13 casos observados antagonismo negativo. 66

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A: Composición del medio Pikovskaya (pvk). 78

Anexo B: Establecimiento del cepario 79

Anexo C: Prueba de la oxidasa 80

Anexo D: Diagrama de flujo del proceso de producción del biofertilizante..... 81

Anexo E: Fotografías de las diluciones seriadas realizadas en el presente trabajo.... 82

Anexo F: Resultados de la tinción gram de las cepas aisladas de los suelos del sector de Lasso 83

Anexo G: Muestras evaluadas y diámetro (en mm) de los halos de solubilización de calcio generados por las mismas, a las 24 y 48 horas de incubación con sus respectivas repeticiones..... 84

Anexo H: Resultados del análisis de espectroscopia de absorción atómica de cada bacteria, se presenta los mg de calcio solubilizado en horas establecidas 85

Anexo I: Matriz de resultados de Kolmogorov-Smirnov: (h) es el nivel de significancia y (p) el valor de alfa..... 86

Anexo J: Diámetro de los halos de antagonismo en mm, a las 24 horas de incubación (Guevara 2010) 87

RESUMEN

El calcio es un macronutriente secundario que se encuentra en el suelo en forma de complejos, razón por la cual no se encuentra disponible para las plantas. Para satisfacer las necesidades del cultivo este mineral es suministrado mediante cal aplicada en los suelos. Sin embargo ciertos microorganismos son capaces de solubilizar el calcio del suelo posibilitando a las plantas la asimilación de este macronutriente.

En la presente investigación se aisló e identificó bacterias solubilizadoras de calcio a partir muestras de la rizosfera de cultivos de alcachofa de la localidad de Laso, Latacunga en medio Pikovskaya modificado.

Se evaluó su capacidad solubilzadora por medio del diámetro del halo de solubilización obtenido en el medio mencionado, a las 24 y 48 horas de incubación. Además se realizó un análisis en espectroscopia de absorción atómica para determinar la solubilización in vitro de las bacterias aisladas tomando muestras cada 24, 96 y 144 horas en el medio antes mencionado (liquido). Se realizó un Análisis de Varianza por cada tiempo de incubación, estos valores se analizaron a través de la prueba de Tukey.

Los resultados del análisis de espectroscopia de absorción atómica se analizaron a través de la prueba estadística no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov, a partir de la cual se analizó aquellas cepas bacterianas que muestran similitud en los miligramos de calcio solubilizado.

Se determinaron que las cepas con mejor respuesta solubilizadora de calcio son *Serratia marcescens*, *Pseudomona fluorescens*, *Proteus myxfaciens* y *Acinobacter baumannii*. Estas bacterias se sometieron a pruebas de antagonismo considerando el diámetro del halo de inhibición entre los microorganismos confrontados, en todos los casos se determinó antagonismo negativo.

Con las bacterias aisladas finalmente se procedió a elaborar un biofertilizante solubilizador de calcio, con el cual se busca satisfacer las necesidades sobre todo de Ca que se presentan en un cultivo sostenible de alcachofa.

ABSTRACT

Calcium is a secondary macronutrient found in the soil in the form of complex, why is not available to plants. To meet the growing needs of this mineral is supplied by lime applied in soils.

However, certain microorganisms are capable of solubilizing the soil calcium enabling the assimilation of plants this macronutrient.

In the present investigation was isolated and identified calcium solubilizing bacteria from the rhizosphere samples artichoke crop of the town of Laso, amid Pikovskaya Latacunga modified.

Solubilzadora ability was evaluated through the diameter of the halo of solubilization obtained in said medium, at 24 and 48 hours of incubation. Furthermore an analysis was performed by atomic absorption spectroscopy to determine the *in vitro* dissolution of the bacteria isolated by taking samples every 24, 96 and 144 hours in the above medium (liquid).

We performed a variance analysis for each incubation time, these values were analyzed by the Tukey test. The results of analysis by atomic absorption spectroscopy were analyzed by non-parametric statistical test Kolmogorov-Smirnov, from which analyzed those bacterial strains that show similarity in milligrams of solubilized calcium.

They determined that the best answer solubilizing strains of calcium include *Serratia marcescens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus myxfaciens* and *Acinobacter baumannii*. These bacteria were tested for antagonism considering the inhibition zone diameter between microorganisms confronted, in all cases was determined negative antagonism.

With the isolated bacteria finally proceeded to develop a biofertilizer solubilizing calcium, with which it seeks to meet the needs especially Ca presented in artichoke sustainable farming.

INTRODUCCIÓN

El Ecuador se ha caracterizado por ser un país netamente agrícola, en el siglo XIX y parte del siglo XX la producción de cacao, el café, el arroz y el banano tuvieron auge a gran escala. En años posteriores se fue diversificando la oferta exportable marcada por los productos no tradicionales: flores, las frutas exóticas, las fibras vegetales y otros productos, cuya producción fue la consecuencia de la apertura del comercio exterior y la reducción de aranceles.

Según los censos realizados por el (INEC, 2010), la superficie de labor agrícola en el año 2011 fue de 11.659.087 millones de hectáreas de las cuales el 8,4% es de cultivos transitorios, cabe mencionar que la agricultura en el Ecuador representa el 10.7% del producto interno bruto PIB.

En cuanto a la utilización de agroquímicos en la producción según un estudio realizado por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2007) es de 415,4 T/100 ha de superficie agrícola considerándolo por esta razón como el mayor consumidor de agroquímicos en la región. Cabe mencionar que el uso de agroquímicos es totalmente empírico, los agricultores en su gran mayoría no realizan un estudio de suelos que muestre las verdaderas necesidades del suelo en cuanto a nutrientes, administrando agroquímicos con dosis inadecuadas y en muchas de las ocasiones innecesarias, que se traduce no solo en el deterioro del suelo, sino también en pérdidas económicas.

Una de las prácticas agrícolas más usadas es el encalado que es la adición de cal en los suelos, por medio del cual se ayuda a disminuir la acidez y agregar una fuente de calcio más asimilable la cual será utilizada por los organismos heterótrofos aumentando la mineralización de la materia orgánica.

Existen cultivos como la alcachofa que en su composición tienen un alto contenido de Calcio, motivo por el cual requiere una adecuada y abundante disponibilidad de Ca^{++}, que es el calcio asimilable para la planta, los productores por esta razón encalan los suelos con gran frecuencia, pero por causa de la lixiviación una parte de

la cal añadida se combina formando la calcita, dolomita, fluorapatito, oxiapatito entre otros compuestos que contienen calcio pero en forma no asimilable para la planta.

Tomando en cuenta estos antecedentes, con esta investigación se busca aislar bacterias que tengan la capacidad de solubilizar calcio, y en base a éstas generar un biofetilizante que favorezca la nutrición y el crecimiento de cultivos. (BIOFAG, 2008), aprovechando la simbiosis entre planta, suelo y organismos, siendo precisamente los microorganismos los que fomentan la disponibilidad de ciertos nutrientes como el nitrógeno, fósforo, y por otro lado agua, y otros que generan fitohormonas.

Para seleccionar las bacterias con eficiencia en solubilización de calcio, se realizaron dos tipos de ensayo: el primero que radica en la medición de los halos de crecimiento de cada una de las bacterias, en un medio sólido modificado, y el segundo con un análisis de espectroscopia de absorción atómica, en un medio líquido modificado en este caso las mediciones fueron a las 48, 96 y 144 horas de inoculado el medio con las bacterias aisladas.

Con las bacterias que obtuvieron una mayor eficiencia de solubilización se procedió a la identificación con pruebas de MICROGEN GN-ID, las cuales ayudaron a verificar si estas bacterias eran o no viables para utilizarlas en el biofertilizante, evitando el uso de cepas que puedan ser nocivas para los cultivos; a más de descartar duplicados.

Para la elaboración del biofertilizante se realizó un cultivo mixto y con fermentación discontinua, con duración de 72 horas en la cual se suministró oxígeno constante con un flujo aproximado de $1m^3$ /h.

Cabe mencionar que esta tesis fue financiada por el Laboratorio Agrodiagnostic el cual aportó tanto financieramente como científicamente compartiendo su vasta experiencia en la elaboración de biofertilizantes.

CAPÍTULO I

GENERALIDADES

1.1 Tema

Aislamiento de bacterias solubilizadoras de calcio de la rizósfera de cultivos de alcachofa (*Cynara scolymus*) ubicados en Laso- Latacunga- Cotopaxi.

1.2 Justificación

En el Ecuador la agricultura significa el 10.7% del producto interno bruto PIB, se estima que el 29% del territorio nacional está ocupado por suelos agrícolas. (Banco Mundial, 2011) describe que el Ecuador consume anualmente 100 gramos de fertilizantes por hectárea de tierra cultivable, según sistema internacional, lo que quiere decir que por lo menos el 30% de suelos agrícolas reciben fertilizantes u otros productos químicos.

La fertilidad del suelo en la agricultura es parte de un sistema dinámico que, por un lado, se pierde nutrientes mediante el consumo propio de la planta o por lixiviación, etc, y por otro lado, los gana continuamente por medio de la materia orgánica y los microorganismos que inmovilizan y liberan nutrientes; sin embargo, este sistema no tiene un balance, ya que se realizan aplicaciones desproporcionadas con el fin de aumentar las cosechas. Los agricultores recurren a la fertilización de los suelos utilizando químicos, los cuales en muchos casos pueden ser tóxicos al bioacumularse en la planta o en el suelo (INPOFOS, 1997).

El calcio es considerado un macronutriente secundario de las plantas que por lo general no se encuentra disponible para ellas, debido a que se encuentra en forma de

complejos, y no en forma de catión, que es la forma en que normalmente absorben las plantas los elementos que requieren.

A pesar de ser un elemento secundario, el Ca tiene funciones importantes para la planta entre las cuales se puede mencionar: actúa formando la estructura de la protopectina de la planta (agente que ayuda a mantener las células unidas), es importante en el desarrollo de las raíces, multiplicación celular, crecimiento y neutralización de los hidrogeniones (Navarro & Navarro, 2003).

Como ya se mencionó, el calcio en el suelo está formando compuestos como: carbonatos entre los cuales tenemos, calcita ($CaCO_3$), dolomita [$CaMg\ (CO_3)_2$] y fosfatos como fluorapatito [$Ca_5\ (PO_4)_3F$], oxiapatito [$3(PO4)_2Ca_3.CaO$], entre otros. Todos estos compuestos por efecto de la meteorización, van liberando compuestos intermedios de calcio, como carbonatos de calcio y bicarbonatos, que posteriormente serán solubilizados por los microorganismos, haciéndolos disponibles para las plantas en forma de ión Calcio (Ca^{+2}) (Navarro & Navarro, 2003).

Los microorganismos y la planta establecen relaciones de simbiosis beneficiándose mutuamente, los microorganismos solubilizan nutrientes haciéndolos asimilables los cuales posteriormente nutrirán las plantas, mientras que las plantas por medio de la formación de nódulos bacterianos proporcionan azúcares para las bacterias; un claro ejemplo de este mutualismo es el establecido por bacterias fijadoras de nitrógeno y las leguminosas (fréjol, habas, garbanzo, etc.), las bacterias inducen la formación de un nuevo órgano en la raíz de la leguminosa, denominado nódulo, en el cual viven las bacterias y llevan a cabo el proceso de fijación biológica del nitrógeno atmosférico. Gracias a este proceso, la planta utiliza el amonio sintetizado por los rizobios y así se provee de las fuentes de nitrógeno que requiere para vivir. Los rizobios, a su vez, reciben esqueletos de carbono de la planta para sus funciones vitales (Redondo, Bonilla, & Bolaños, 2013).

En base a estudios realizados en el Ecuador, se han determinado microorganismos solubilizadores de fósforo y potasio con los cuales se han obtenido muy buenos resultados en la solubilización de dichos nutrientes; en cuanto a microorganismos solubilizadores de calcio, no se han dado mayores estudios pero observando la necesidad de disminuir el uso indiscriminado de productos químicos, se buscan bacterias que posibiliten la solubilización de calcio.

Este estudio busca elaborar un nuevo biofertlizante que posea la capacidad de solubilizar calcio, constituido por un cultivo mixto de bacterias, el cual al ser aplicado al suelo incrementara la población microbial que transformaran compuestos no asimilables para las plantas en compuestos asimilables este caso en Ca+2.

1.3 Objetivos e hipótesis

1.3.1 Objetivo general

Aislar bacterias solubilizadoras de Calcio a partir de muestras de la rizósfera de cultivos alcachofa (*Cynara scolymus*) ubicados en Laso- Latacunga- Cotopaxi.

1.3.2 Objetivos específicos

- Identificar bacterias solubilizadoras de calcio obtenidas de la rizósfera de cultivos de alcachofa (*Cynara scolymus*) ubicados en Laso- Latacunga- Cotopaxi.
- Seleccionar las bacterias que tengan mayor eficiencia en la solubilización de calcio.
- Elaborar un biofertilizante a base de bacterias aisladas más eficientes.

1.3.3 Hipótesis de trabajo

Hipótesis alternativa:

Es posible aislar y seleccionar bacterias solubilizadores de calcio a partir de la rizósfera de cultivo de alcachofa (*Cynara scolymus*) ubicados en Laso- Latacunga- Cotopaxi

Hipótesis Nula:

No es posible aislar y seleccionar bacterias solubilizadores de calcio a partir de la rizósfera de cultivo de alcachofa (*Cynara scolymus*) ubicados en Laso- Latacunga- Cotopaxi

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Importancia del calcio

2.1.1 El calcio en la naturaleza

El calcio (del latín *calx, calis, cal*) fue descubierto en 1808 por Humphry Davy mediante electrólisis de una amalgama de mercurio y cal. Tiene como símbolo Ca, basado en el latín científico *calcium*.

Se encuentra en el grupo I de la tabla periódica (metales alcalinos), además de estar entre los más abundantes de la corteza terrestre y a pesar de su abundancia, no se descomponen fácilmente (Petrucci, Harwood, & Herring, 2003)

En la estructura humana es un componente esencial en el esqueleto óseo y el consumo de calcio por diferentes fuentes serán determinantes para tener una buena salud (Martinez, De Arpe, & Villarino, 2012).

2.1.2 El calcio en el suelo

El calcio en el suelo se puede encontrar en diferentes concentraciones que varían de acuerdo al tipo de suelo; por ejemplo suelos no calizos contienen calcio entre el 0,1 y 0,2%, mientras que en suelos calizos puede alcanzar valores hasta de 25% (Navarro & Navarro, 2003).

Todas estas concentraciones de calcio presentes en el suelo, proceden de rocas, minerales de los que el suelo está formado y fertilizantes añadidos por el hombre.

El calcio en el suelo en si es no se encuentra disponible para la planta ya que, siempre está formando compuestos como carbonatos entre los cuales los más importantes son la calcita (CO_3Ca) y dolomita ($CO_3Ca.CO_3Mg$), después se tiene a los fosfatos entre los más importantes: fluorapatito [$3(PO_4)2Ca3.F_2Ca$], oxiapatito [$3(PO4)_2Ca_3.CaO$], y por último al sulfato cálcico (SO_4Ca).

Todos estos compuestos por efecto de la meteorización (proceso de desintegración física y química de los materiales sólidos), van liberando calcio, que posteriormente son solubilizados, es decir transformados químicamente desde formas insolubles a formas solubles. Esta fracción de calcio soluble, tiene varios destinos: pérdida por lixiviación, absorbido por los organismos del suelo, adsorbidos por el complejo coloidal, reprecipitado como compuestos cálcicos secundarios, razones por la cuales disminuyen las cantidades de calcio soluble para las plantas.

El calcio se encuentra también en el suelo formando parte de la materia orgánica o combinado con los ácidos húmicos y fosfóricos (Navarro & Navarro, 2003).

La cantidad de calcio en los suelos también depende de la pluviometría de la zona, por ejemplo en regiones donde ésta es débil, el contenido de calcio en el suelo será alto, ya que la lixiviación en esta condición, es poca; en suelos ácidos, normalmente situados en zonas sometidas a una alta pluviometría, el calcio se moverá más ampliamente, será adsorbido por los coloides en forma intercambiable y como minerales no descompuestos, el contenido de calcio en este tipo de condiciones es bajo, ya que está sometido a un continuo lavado, el agua disuelve las bases solubles que se pierde por lixiviación (Urbano, 2003).

La forma en que el calcio es asimilable, es en forma de catión Ca^{+2}, la pérdida o equilibrio del catión en el suelo dependerá de la mayor o menor facilidad de liberación de calcio adsorbido. Si disminuye el contenido de calcio en la disolución, como puede ocurrir por lixiviación o consumo de la planta, parte del calcio adsorbido tiende a pasar a la disolución para restablecer el equilibrio; y si la concentración en el suelo aumenta debido a la aplicación de fertilizantes, una fracción de este se unirá electrostáticamente a los materiales coloidales (Thompson & Troeh, 2002).

En el Cuadro 1 se presenta los macronutrientes y la forma en que se encuentran en el suelo.

Cuadro 1. Macronutrientes y la forma que se encuentran en el suelo.

NOMBRE	FORMA EN EL SUELO
Fósforo	Forma orgánica: en ácidos nucleicos, fosfolípidos y fosfato de miosita en la fracción orgánica del suelo. No aprovechable, debe ser descompuesto. Forma inorgánica: como iones fosfato H_2PO_4 y HPO_4 (solubles).
Calcio	Es el catión intercambiable más dominante en el suelo fértil. La mayor parte se encuentra como forma no intercambiable unida a otros minerales como la amortita. Por medio de la cal, se puede regular el pH del suelo. Un suelo ácido contiene gran cantidad de H^+ que pueden ser intercambiables por iones Ca^{++}, aumenta el pH. Como Ca^{++} se encuentra adsorbido a las micelas de arcilla.
Potasio	Se encuentra en forma no intercambiable: en las rocas, el K es liberado a medida que los minerales se intemperizan pero esto es muy lento. Poco disponible: se encuentra fijado entre las capas de ciertas arcillas del suelo. Disponible lentamente. Soluble: es el K disponible en la solución del suelo. Potasio intercambiable de las arcillas y materia orgánica.
Nitrógeno	Orgánico: en restos orgánicos, no disponible para las plantas. Se debe reducir a amoníaco. Nitrógeno amoniacal: fijado en minerales. Disponible lentamente. En forma de iones de amonio y nitrato o compuestos solubles que las plantas utilizan. Es absorbido como nitrato por lo tanto los compuestos nitrogenados deben ser reducidos a amoníaco.
Azufre	Orgánico: en restos orgánicos del suelo. Sufre oxidación biológica a través de microorganismos. Inorgánico: en minerales como pirita, yeso, alumbre. En la solución del suelo como ion sulfato. Disponible para la planta. Puede pasar al suelo algo de azufre de la atmósfera.
Magnesio	En minerales primarios: magnetita, dolomita, debe sufrir intemperización para ser liberado. Disponible en forma hidrosoluble e intercambiable. Elemento menos abundante que el Calcio.

Elaborado por: Paguay, Vasco 2012.

2.1.3 El calcio en la planta

Absorbido fundamentalmente bajo la forma de Ca^{+2} es, después del potasio, el elemento básico más abundante que existe en las plantas. El calcio varia en base al peso entre 0,1 al 7%, respecto al potasio que puede absorber hasta el 1% en peso seco.

Este elemento se encuentra presente en mayor proporción en las hojas y tallos que en semillas. Según (Navarro & Navarro, 2003) en las plantas jóvenes se encuentran preferentemente en el protoplasma y en las membranas celulares, mientras que en plantas adultas se halla en las vacuolas. En diferentes muestras de una misma especie vegetal el contenido de calcio es variable, ya que depende mucho de la cantidad de calcio asimilable presente en el suelo.

El calcio se encuentra en la planta tanto en forma mineral soluble: sulfato cálcico (SO_4Ca), como insoluble: [$(PO_4)_2Ca_3$] y carbonatos cálcicos (CO_3Ca). Asimismo, se le encuentra bajo forma orgánica especialmente en plantas como leguminosas, crucíferas y remolacha azucarera, como oxalatos y pectinatos cálcicos (Navarro & Navarro, 2003).

En proporciones mucho menores, también es absorbido mediante un intercambio directo entre los pelos radiculares y el complejo coloidal al que se encuentra adsorbido.

2.1.4 Ciclo del calcio

No todos los elementos químicos tienen la misma movilidad a través del ecosistema. Algunos se desplazan muy poco, mientras que otros viajan prácticamente alrededor de todo el planeta. El ciclo del calcio es un ciclo bioquímico sedimentario sin fase gaseosa. Según (Valverde , Meave, Carabias, & Cano , 2005), los ciclos sedimentarios o también conocidos como ciclos locales, son aquellos en los cuales sus elementos se acumulan principalmente en el suelo, y no poseen la capacidad de moverse a través de la atmósfera.

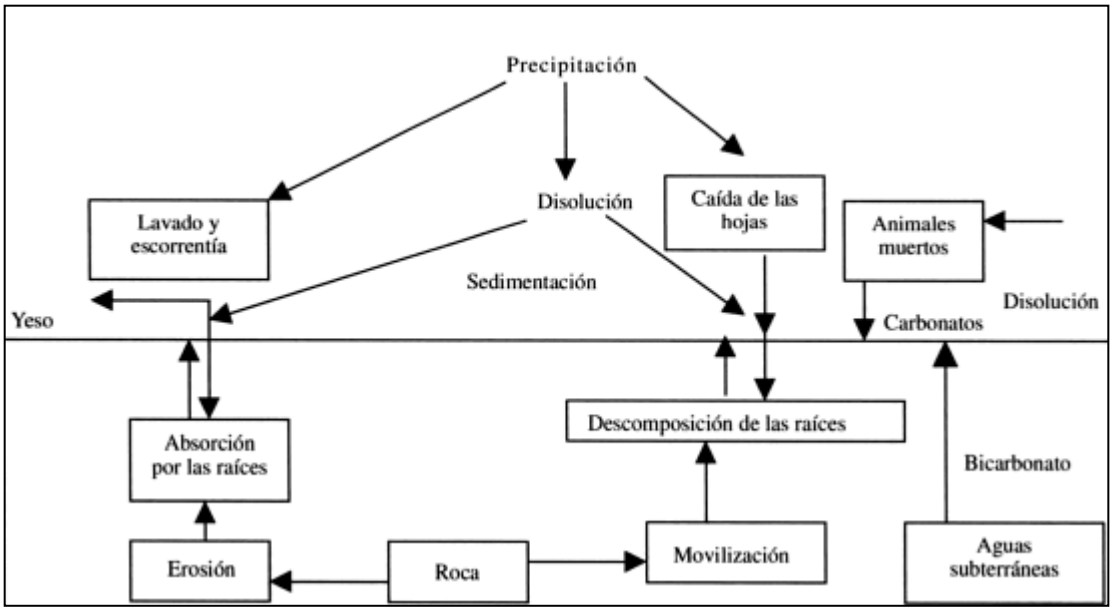
El ciclo del calcio se encuentra muy relacionado con los ciclos de fósforo y del carbono. En la tierra se acumula unos $7x10^{15}$ millones de toneladas de calcio, de los cuales 10^{13} toneladas están en la materia viva y $6x10^{8}$ se depositan anualmente como carbonatos en los fondos oceánicos. Esta acumulación de material calcáreo no implica la falta de calcio ionizado en el agua de mar, lo que explica los depósitos de yeso en muchas lagunas litorales (Seoanez, Bellas, Landaria, & Seoanez, 2000).

El calcio es desplazado de sus combinaciones con cierta facilidad por otros metales Fe, Mg, Zn, Mn. El Fe y el Mn se oxidan y liberan CO_2 (Seoanez, Bellas, Landaria, & Seoanez, 2000).

La dinámica del calcio es muy similar a la del potasio, se diferencia únicamente en que no presenta calcio fijado. Los procesos de meteorización de minerales cálcicos especialmente anfíboles y piroxenos llevan a la liberación de Ca estructural. El Ca en la solución del suelo se encuentra en equilibrio con el Ca intercambiable, la magnitud de ambas formas varia constantemente a través de la absorción de Ca por las plantas y las pérdidas por percolación. Encontrándose el Ca en cantidades mayores en el complejo de cambio y en la solución del suelo (Fassbender & Bornemisza, 1987).

El calcio predomina generalmente entre las bases cambiables en la cubierta iónica del complejo coloidal del suelo. El contenido en Ca cambiable depende del material parental y del grado de evolución de los suelos. A través de la meteorización y del lavado del Ca su cantidad disminuye bastante en los suelos (Fassbender & Bornemisza, 1987)

Figura 1. Ciclo del Calcio



FUENTE: Seoanez (2000).

Existen reservas de esta sustancia en la roca calcárea. Es absorbido del suelo por las plantas; la lluvia puede lavar algo de calcio que se encuentra en la roca calcárea; los insectos y en general los herbívoros lo obtienen de las plantas; llega a los pájaros por los insectos los cuales obtuvieron Ca de las plantas; cuando los animales y los pájaros mueren, el calcio regresa a la tierra por la descomposición natural y la mineralización; los carnívoros lo obtienen al comer los huesos de sus presas; el hombre lo ingiere por los productos lácteos, legumbres y frutas. En el mar, el fitoplancton absorbe mucho calcio que pasa luego al zooplancton, a los peces, al hombre y a las aves marinas; una vez muertos los seres marinos, se forman los enormes depósitos calcáreos los que, por la evolución geológica, emergerán al cabo de millones de años (Mata & Quevedo, 2005).

2.1.5 Funciones del calcio en la nutrición vegetal

La fertilidad del suelo en la agricultura es parte de un sistema dinámico, el cual pierde nutrientes por diferentes factores como el consumo propio de la planta, por lixiviación, erosión o al ser retenidos por ciertas arcillas, y gana nutrientes por medio de la materia orgánica y los microorganismos que inmovilizan dichos nutrientes para luego ser liberados al suelo; todas estas pérdidas y ganancias no siempre se encuentran en un balance provocando que la cantidad de nutrientes estén disponibles para la planta no sea suficiente afectando su crecimiento y rendimiento (INPOFOS, 1997).

Se conocen 16 nutrientes esenciales para el crecimiento de la planta los cuales se encuentran divididos entre los minerales y los no minerales; el calcio se encuentra entre los 13 nutrientes minerales y en la sub clase se los macro nutrientes secundarios. Se los denomina así porque la planta los utiliza en menor cantidad pero no por eso dejan de ser importantes. El calcio que la planta absorbe por medio radicular es el Ca^{+2} (INPOFOS, 1997)Debido a la interrelación entre el calcio, potasio y magnesio, la velocidad de absorción puede disminuir ya que empieza un antagonismo entre estos compuestos. El calcio en su mayoría dentro de las plantas, se encuentra en forma soluble o asociado a coloides citoplasmáticos, como los carboxilos fosforilos, y es un elemento relativamente inmóvil dentro de la planta (Donald, 1996)

El Ca participa en las siguientes funciones:

- El calcio es importante en el desarrollo de las raíces, debido a que está presente en procesos como la multiplicación celular, crecimiento celular y neutralización de los hidrogeniones. Es por esto que muchos investigadores consideran que la alteración del sistema radicular es un síntoma de deficiencia de calcio. (Navarro & Navarro, 2003)

- El calcio está involucrado en la división y elongación celular por lo que es muy importante en el desarrollo de las raíces.

- Regula la absorción ya que el calcio es transportado de forma pasiva por el xilema. De esta manera contrarresta efectos perjudiciales debidos al exceso o acumulación de otros nutrientes, por ejemplo la falta de calcio se le atribuye el peligro de toxicidad de aluminio. (Thompson & Troeh, 2002).

- Su acción se desarrolla fundamentalmente en las paredes celulares y membranas plasmáticas, dicha función es muy importante ya que si se reemplazara por otros elementos esenciales los compuestos orgánicos y sales minerales no se detendrían.

- Actúa sobre la translocación de los hidratos de carbono y proteínas en el interior de la planta; activa algunas enzimas como la amilasa, fosfolipasa, NAD-quinasas, deshidrogenasas, polimerasas y ATPasas en general enzimas asociadas a las membranas.

- Neutraliza los ácidos orgánicos evitando la presencia de oxalatos. (Navarro & Navarro, 2003).

2.1.6 Alteraciones en la planta por deficiencia o exceso de calcio

La deficiencia en general se manifiesta desde la germinación, provoca clorosis la cual es una alteración fisiológica anormal, el follaje produce insuficiente clorofila provocando colores verde pálidos.

Dicha clorosis es causada debido a una baja disponibilidad del calcio o debido a un estrés hídrico que tiene como resultado bajas tasas de transpiración.

Los síntomas de deficiencia del calcio aparecen primero en las hojas y tejidos jóvenes e incluyen hojas pequeñas y deformadas, manchas cloróticas, hojas ajadas y partidas, crecimiento deficiente, retraso en el crecimiento de raíces y daños a la fruta (Cadenas, 2011).

Las raíces deficientes en calcio a menudo se ponen negras y se pudren fundamentalmente debido a la elevación del pH en suelos calizos. Se detiene el desarrollo radicular, originando raíces cortas gruesas y con una coloración parda. Las hojas se desarrollan y se forma necrosis en los bordes. Todos estos síntomas aparecen siempre en las hojas jóvenes y la planta en si disminuye su crecimiento (Navarro & Navarro, 2003).

Las hojas jóvenes y otros tejidos desarrollan síntomas debido a que el calcio no se transloca dentro de la planta. Los tejidos nuevos necesitan pectato de calcio para la formación de la pared celular. De ahí que la deficiencia de calcio ocasiona que las puntas y los ápices de las hojas sean gelatinosos (IPNI, 2004)

En suelos calizos con elevado pH, por ejemplo el exceso de carbonato de calcio puede provocar deficiencia de potasio motivada por una insuficiente absorción de éste, debido al antagonismo produce clorosis férrica o inmovilizar el zinc, cobre y fósforo; no se considera que exista un exceso de calcio, pero si pueden presentarse consecuencias indirectas derivadas del uso excesivo de cal (Thompson & Troeh, 2002)

2.1.7 Calcio en la agricultura

La adición de cal en el suelo con el fin de reducir la acidez es una práctica común que consigue un aporte simultáneo de calcio. La palabra cal debería llamarse al óxido cálcico, pero en términos agrícolas incluye a otros elementos como: hidróxido cálcico, carbonato cálcico, entre otros que tienen como base de su composición los silicatos de calcio. El carbonato de calcio es el más usado, selección que depende mucho del precio, la pureza, manejo y rapidez de reacción del suelo.

En la cal agrícola existen dos tipos de óxido de calcio y magnésico, para determinar el valor neutralizante de los compuestos, el cual es un equivalente del carbonato de calcio que se expresa al sumar el porcentaje de óxido de magnesio, expresado en óxido de calcio y el porcentaje de óxido de calcio presente (Navarro & Navarro, 2003).

Debido a que el calcio existe como un catión, este nutriente está gobernado por los fenómenos del intercambio catiónico, es una característica del suelo que describe la cantidad total de cationes intercambiables que el suelo puede retener.

Si la Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) está neutralizada principalmente por calcio, magnesio, potasio y sodio, se dice que está saturada de bases. Sin embargo, si los cultivos o el lixiviado han removido la mayor parte de los cationes básicos, el suelo está en saturación ácida. Las cantidades totales de cationes ácidos relativas a la CIC son una medida de la saturación ácida.

Una mayor proporción de carbonato de calcio muestra una mayor capacidad del suelo para absorber y retener el calcio por lo tanto una disponibilidad mayor de calcio, manteniéndose adherido como calcio intercambiable en la superficie de los coloides cargados negativamente. Generalmente, el ión Ca es el catión dominante en el suelo, aun a valores de pH bajos, y ocupa normalmente el 70 % o más de los sitios en el complejo de intercambio. Al igual que otros cationes, el calcio también está presente en la solución del suelo.

Las sustancias que se utilizan como fertilizantes proporcionan un aporte simultáneo de calcio, el cual tiende a solubilizarse y cambiar a la forma bicarbonatada, debido al

contenido de ácido carbónico del suelo, simultáneamente los coloides del suelo comienza a fijar los iones Ca^{+2}, que serán asimiladas por las plantas. (Donald, 1996)

2.1.8 La adición de cal a los suelos ácidos.

Según (Donald, 1996), encalar es la acción de aplicar cal en los suelos para lograr que el suelo no sea muy ácido, para realizar esta práctica agrícola se debe tomar en cuenta la finura de cal pues de esta dependerá de la existencia de varias formas de calcio: como catión disociado en la solución, como base intercambiable adsorbida al coloide y como calcio en forma de carbonato sólido.

Es por esto que estas formas de calcio proporcionan continuamente Ca^{+2} a la disolución del suelo por cambio catiónico. Los compuestos solubles de calcio son eliminados por lixiviación, la saturación de bases disminuye y el pH es alterado por lo cual será necesario otra aplicación de cal (Thompson & Troeh, 2002).

La adición de cal en los suelos no es solo importante para el pH, si no también es muy beneficioso en la absorción y asimilación de diversos elementos esenciales. La cal hace más eficiente al potasio en la nutrición de la planta, cuando éste se halla en exceso las plantas absorben más de lo necesario; la cal reduce la absorción excesiva (Donald, 1996).

La cal estimula el metabolismo de los organismos heterótrofos, con lo cual se obtiene una mayor rapidez de mineralización de la materia orgánica. Para que las bacterias realicen la conversión de la nitrificación necesitan grandes cantidades de calcio activo y como consecuencia, el proceso del nitrógeno, tanto simbiótico como no simbiótico, se favorece con una correcta adición de cal. En ambos casos, los microorganismos fijadores requieren cantidades altas de calcio para el desarrollo de su actividad.

Es muy importante tomar en cuenta que no se puede adicionar cal por adicionar, sino que se debe tener un previo conocimiento de las cantidades existentes en el suelo, así como la composición del producto y los cultivos que se desarrollaran ahí. Si se

exagera en la adición de cal en suelos de textura gruesa pueden presentar deficiencia de hierro, manganeso, cinc, cobre y fosforo (Navarro & Navarro, 2003).

Si se utiliza caliza en suelos de alta acidez, puede adicionarse entre 3 y 4 t/ha, para los de textura gruesa y entre 6 y 8 t/ha para textura fina. Para suelos de acidez moderada las cifras disminuyen entre 2 - 2,5 y 3-4 t/ha respectivamente. Si se utiliza oxido o hidróxido se debe realizar los cálculos correspondientes (Donald, 1996).

2.2 Microorganismos del suelo

2.2.1 Distribución de los microorganismos en el suelo

El número, la diversidad, y la distribución de los microorganismos en el suelo reflejan la productividad general de éste.

Los microorganismos forman parte de la biota del suelo, si desaparecen los microorganismos es señal de que las condiciones ambientales no son las óptimas. Una característica que presenta un buen suelo es la diversidad de microorganismos (Coyne, 2000)

Cabe mencionar también que la distribución de los microorganismos depende también de la profundidad del suelo, esto quiere decir que a mayor profundidad los organismos son menos numerosos, esto se debe a la disponibilidad menor de materia orgánica; se debe tomar en cuenta que existe un sin número de microorganismos en el suelo en una sola muestra, en la cual se puede encontrar 400 especies diferentes, es decir en una profundidad mayor la diferenciación de microorganismos sería mucho más fácil (Donald, 1996).

Cuadro 2. Distribución de los microorganismos en un suelo expresado como miles por gramo

Profundidad cm	Bacterias aerobias	Bacterias anaerobias	Hongos	Algas
3-8	7.800	1.950	119	25
20-25	1.800	379	50	5
35-40	472	98	14	0,5
65-75	10	1	6	0,1
135-145	1	0,4	3	…

Fuente: Carrillo L. (2003)

2.2.2 La rizósfera y los microorganismos

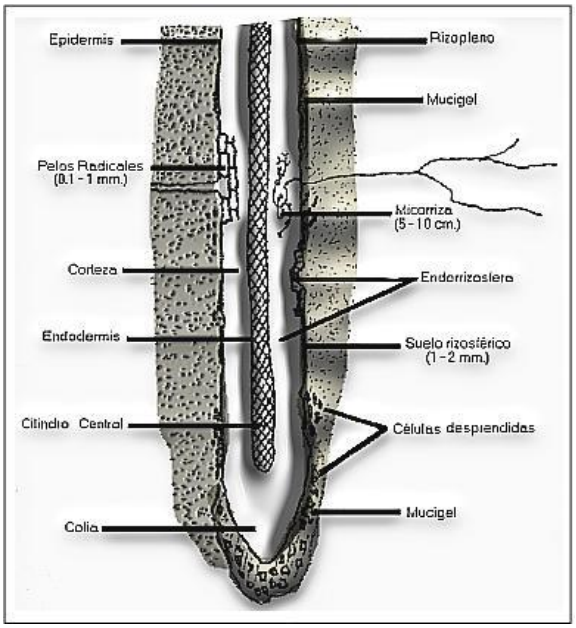
La población microbial del suelo es altamente alterada por la presencia de las raíces. La parte del suelo donde se presenta la alteración se denomina rizósfera, según (Fuentes , 2007), se define como el volumen interfacial entre las raíces de la planta y el suelo en el que se desarrolla una población microbiana muy superior a la del resto del suelo.

Existen a la vez vínculos importantes entre el suelo, la planta y microorganismos como: hongos, bacterias, protozoos y nemátodos. Es muy interesante el estudio de esta población en cuanto a las relaciones más o menos simbióticas con el sistema radicular (Sànchez, 2007).

En la rizósfera (Figura 2), se pueden distinguir tres regiones:

- Rizósfera: Es la región más extensa, se encuentra en relación directa con la interfaz raíz-suelo;
- El suelo de la rizósfera es el área alrededor de las raíces de las plantas afectadas por la actividad metabólica de la planta, se trata esencialmente al suelo que se adhiere a la raíz.
- El rizoplano es el área en el que se interacciona la planta y el suelo (Donald, 1996)

Figura 2. Regiones de la rizósfera



Fuente: Carrillo L. (2003)

Según (Fuentes , 2007), en un estudio realizado de la raíz, después de haber sido extraída del suelo muestra que los ápices del crecimiento radicular están libres de microorganismos, pero en la elongación después del ápice, se encuentra una importante población microbiana.

Las raíces viejas tienen una considerable población microbiana y va aumentando según la podredumbre de la raíz. Esto es muy importante tomar en cuenta para determinar la relación raíz-suelo (R/S), que se refiere a la relación entre los microorganismos de la rizósfera frente a los microorganismos que existen en la masa de suelo. Todas las especies microbianas tienen su propia relación R/S que varía por el ambiente y las condiciones del suelo. La relación suele situarse entre 10 y 50 lo que significa que existe entre 10 y 50 veces más microorganismos en el área que rodea la raíz, que en el suelo circundante (Coyne, 2000).

Las relaciones simbióticas son muy importantes tanto para el microorganismo como para la planta, un ejemplo de esto lo constituyen las micorrizas, que consisten en la relación de simbiosis entre hongo y la raíz de la planta, el hongo forma estructuras cortas que ocupan el lugar de los pelos absorbentes ayudando a aumentar la

resistencia de la planta frente a la sequía. Otro ejemplo muy importante es la nitrificación simbiótica (Alonso, 2011).

2.2.3 Microorganismos solubilizadores de calcio

La actividad de ciertos microorganismos que habitan en el suelo es de vital importancia en los ciclos de carbono, nitrógeno, azufre y fósforo; debido a que estos microorganismos ocupan el 10% de la población del suelo, y son usados para la movilización de potasio, calcio, magnesio y otros minerales para ser aprovechados por las plantas (Soto & Melèndez, 2003).

No se han realizado muchos estudios sobre el tema de microorganismos solubilizadores de calcio en sí, pero se han realizado investigaciones de otros componentes que contienen calcio en su estructura. El calcio es un componente de varios minerales primarios y secundarios en el suelo, que son esencialmente insolubles por motivos agrícolas. Estos materiales son las fuentes originales de las formas solubles o disponibles de Ca. El calcio también está presente en formas relativamente solubles, como un catión (carga positiva de Ca^{2+}) adsorbida a los complejos coloidales del suelo. La forma iónica es considerada como disponible para los cultivos (Navarro & Navarro, 2003).

Por medio de experimentación en laboratorio se ha podido determinar cómo los ácidos producidos por distintos microorganismos originan la disolución o solubilización de diferentes compuestos. Según, (Delvasto, y otros, 2002) la bacteria *Burkholderia caribiensis* y del hongo *Aspergillus niger* HNA-1 utilizados para investigar la disminución del contenido de fósforo de hematita (Fe_2O_3) un mineral de hierro, producen ácido glucónico y ácido cítrico según el estudio estos ácidos permite el ataque de la superficie del mineral para favorecer la solubilización del fósforo.

El potasio en el suelo, junto con otros elementos, puede ser liberado debido a la erosión. Los minerales feldespáticos tienen origen ígneo y son fácilmente erosionados, aunque también pueden intervenir algunos ácidos orgánicos y ácidos polisacáridos de origen microbiológico. Estos ácido pueden ser también de origen

abiótico, sin embargo, la mayoría son bióticos, siendo orgánicos o inorgánicos. Muchos de estos ácidos orgánicos capaces de erosionar feldespatos se producen de forma anaerobia por fermentación bacteriana. (Sugumaran & Janarthanam, 2007).

Varios estudios de laboratorio sugieren que los ácidos producidos por distintos microorganismos pueden promover la disolución de diferentes tipos de minerales. En la investigación realizada por (Sugumaran & Janarthanam, 2007) un mecanismo empleado por las bacterias analizadas para disolver feldespato, fue la oxidación parcial de glucosa a ácidos orgánicos. De forma directa, los ácidos orgánicos pueden incrementar la disolución mediante un mecanismo de protones o de ligandos. De manera indirecta son capaces de mejorar la disolución a través de la formación de complejos que reaccionan en la solución, cuyos productos incrementan la afinidad química de la reacción general de disolución de feldespato. Terminado este proceso liberan el potasio que puede ser asimilado por la planta.

Los microorganismos capaces de destruir las estructuras minerales que contienen potasio son diversos. Entre los que se encuentran bacterias de los generos *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Clostridium*; hongos tales como *Aspergillus*, *Penicillum*, y *Mucor*. Otro microorganismo que se destaca en la solubilización de potasio es *Pseudomonas fluorescens*. Estos microorganismos actúan de varias formas solubilizando el potasio de distintos minerales. (Delgado, 2004)

Aquellos microorganismos que tienen esta capacidad de solubilizar fosfatos se encuentran en la rizósfera. Esta solubilización consiste en que algunas clases de microorganismos pueden solubilizar compuestos inorgánicos insolubles de fósforo. El principal mecanismo para la solubilización es la producción de ácidos orgánicos, mediante la quelación (formación de complejos órgano-metálico) del calcio, hierro, aluminio. La formación de complejos fosfohumicos, dan como resultado un aumento en la disponibilidad del elemento para las plantas (ASOINCO, 2002)

Según (Montoya, Màrquez, Lòpez, & Cuervo, 2005) en su estudio realizado con *Bacillus subtilis*, pudieron observar una disolubilidad del ($CaCO_3$) de un 20%, liberando calcio capaz de ser asimilado por las plantas.

2.2.4 Los microorganismos y su relación con la agricultura

En contraposición a una agricultura denominada convencional ha surgido una agricultura más amigable desde el punto de vista social, económico y ecológico. En el año 1927 Selman A. de la Universidad de Rutgers, anunció que en un futuro no muy lejano una de las tendencias más promisoras seria el uso y manejo de microorganismos con dos objetivos fundamentales: 1) potenciar la fertilidad de los suelos y 2) mantener o incrementar el rendimiento de las cosechas (CORPOICA, 2001).

En nuestros días el uso de microorganismos en modelos de agricultura sostenible es una realidad palpable con la factibilidad de uso de biofertilizante en los cultivos (CORPOICA, 2001).

Ante la destrucción de los recursos naturales, el peligro para la salud humana y el medio ambiente causado por la agricultura industrial se retorna otra vez como alternativa viable a la agricultura orgánica, la cual se define como una visión sistémica de la producción agrícola que usa como modelos los procesos bilógicos de los ecosistemas naturales, proponiendo alimentar los microorganismos del suelo para que estos a su vez alimenten indirectamente a las plantas (Rogg, 2000).

Se debe tomar en cuenta que los microorganismos nativos del suelo son los responsables del mejoramiento de las propiedades físicas y químicas de los suelos y de la nutrición de los cultivos, esto ocurre por medio de procesos como la fijación del nitrógeno atmosférico; la degradación de substratos de difícil descomposición que hacen más eficiente la solubilización de los fertilizantes; y la absorción y translocación de los nutrimentos (Garcìa, Ferrera, Alvaràz, & Rodrìguez, 2000).

En los sistemas de agricultura sostenible los microorganismos en el suelo ejercen un papel importante en la dinámica de la materia orgánica y en el reciclado de nutrimentos mediante su intervención en los procesos de inmovilización y mineralización (Amezquita, 1998).

2.3 Biofertilizantes

Son llamados también abonos biológicos y son productos obtenidos a partir de microorganismos que favorecen la nutrición y el crecimiento de los cultivos. La Red Iberoamericana de Biofertilizantes Microbianos para la Agricultura (BIOFAG, 2008), muestra que por lo general se emplean microorganismos como hongos o bacterias, aunque también se pueden emplear macro organismos como lombrices.

Los microorganismos se asocian de manera benéfica a las raíces de las plantas, proporcionando nutrientes como nitrógeno, fósforo, potasio, agua o dotando a las plantas de factores de crecimiento. Otra forma de actuar de los microorganismos es en forma combinada, produciendo sinergismo, es decir que se complementan para que los microorganismos utilizados sean más eficaces actuando en conjunto, que al ser usados cada uno por separado (BIOFAG, 2008).

Es necesario buscar nuevas alternativas que suministren un control efectivo de enfermedades de las plantas por falta de nutrientes como el calcio, a la vez que minimizan las consecuencias negativas para la salud y medio ambiente, disminuyendo el uso de productos químicos. Los biofertilizantes son entidades biológicas bien definidas o productos obtenidos a partir de la actividad de organismos vivos, aprovechando las simbiosis entre plantas, suelo, organismos y microorganismos (Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria, 1998) .

La utilización de los biofertilizantes es viable ya que proveen y mejoran la disponibilidad de nutrientes a los sistemas productivos, promoviendo el desarrollo de agricultura ecológica y amigable con el ambiente (BIOFAG, 2008). Los microorganismos promotores del crecimiento y nutrición vegetal facilitan, de manera directa o indirecta, la disponibilidad de determinados nutrientes para las plantas, tales como el nitrógeno, el fósforo o el agua, aunque también los hay que producen sustancias (fitohormonas) promotoras del crecimiento vegetal.

Desde el punto de vista de una agricultura sostenible y respetuosa con el medio ambiente, el uso de biofertilizantes representa una importante alternativa para limitar el uso de abonos químicos, reduciendo su negativo impacto ambiental y económico, y mejorando la productividad de los cultivos (Bruneton, 2001)

El uso de biofertilizantes en sustitución de fertilizantes químicos, menos rentables económicamente, constituye una forma de aumentar la productividad de los cultivos, reduciendo al mismo tiempo los efectos perversos de la fertilización química sobre el medio ambiente y la salud (BIOFAG, 2008).

2.3.1 Características de los biofertilizantes

Son elaborados con diferentes microorganismos que tienen un efecto tangible sobre algunos procesos de descomposición y síntesis que se dan en el suelo, para su crecimiento se colocan en medios de cultivo específicos para luego adicionarlos a un soporte o sustrato inerte que aporta la fuente energética para la sobrevivencia y multiplicación de los microorganismos.

Dichos productos pueden ser líquidos o sólidos, los cuales, una vez aplicados al suelo o a las plantas, incrementan su actividad y ejercen el efecto esperado de acuerdo a su naturaleza (mayor velocidad de descomposición de sustratos, reducción de enfermedades, aporte de nutrientes, etc.).

Muchos de estos productos pueden contener uno o más microorganismos, de tal forma que se mantengan los principios básicos de ecosistemas naturales, los cuales son sostenibles por sus componentes, la calidad y cantidad de sus poblaciones. (Garcìa R. , 2001)

Otro aspecto importante es que los suelos presentan grandes variaciones con respecto al tipo y número de microorganismos. Generalmente los suelos más fértiles, menos degradados, con más contenido de materia orgánica y menos contaminada con productos químicos permiten mantener altas poblaciones de microorganismos, con una mayor diversidad de especies, por lo cual se podrían obtener microorganismos autóctonos que evite la posible incompatibilidad de los microorganismos que se pueden dar al introducir especies extrañas, de esta manera se puede obtener mejores resultados del producto.

Generalmente el éxito en la aplicación de inoculantes (concentrado de bacterias específicas), dependerá del conocimiento de sus requerimientos nutricionales y

ambientales, así como de su interacción con otros microorganismos, incluyendo su habilidad para coexistir en cultivos mezclados con otros microorganismos, tanto antes como después de su aplicación al suelo (BIOFAG, 2008).

2.3.2 Modo de acción de los biofertilizantes

Se clasifican en dos grupos:

- **Acción directa:** Agrupan microorganismos que habitan en algún componente de los tejidos vegetales, y por ello la acción benéfica se realiza en la planta y no en su medio circundante, es el caso de la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) y las micorrizas.

- **Acción indirecta:** La biofertilización es aprovechada primero por el suelo y lo transmite hacia los cultivos, pertenecen a este grupo los mecanismos de acción que trabajan en la solubilización de nutrientes como el fósforo, potasio, calcio entre otros (Gonzàles, 2011).

2.3.3 Funciones que cumplen los biofertilizantes

Se trata de productos que no contaminan ni degradan la capacidad productiva del suelo, por el contrario, son regeneradores de la población microbiana; así mismo, estos productos tienen una función protectora del sistema radicular de la planta contra microorganismos patógenos.

La nutrición biológica de la planta es la forma más eficiente y económica de la alimentación vegetal, ya que permite el aprovechamiento de manera más intensiva de los nutrientes disponibles en el suelo, estimulan el desarrollo del sistema radicular, permiten mayor solubilidad y conductividad de nutrientes.

Los efectos de los biofertilizantes en el desarrollo radicular son mayor solubilidad, mayor conductividad de nutrientes se traducen en un mayor aprovechamiento de la

humedad del suelo y, por lo tanto, en el uso más racional del agua y una mayor resistencia a la sequía.

En relación con el uso de fertilizantes químicos cabe mencionar que se tiene un alto residuo, debido a que la planta sólo utiliza un 30 a 40%, provoca la eliminación de los microorganismos del suelo, además de contaminar aire, suelo y agua debido a su mala utilización (Gonzàles, 2011).

2.3.4 Biofertilizantes comerciales

En términos generales, los biofertilizantes comercialmente más difundidos son inoculados por hongos micorrícicos y bacterias. Entre los más significativos tenemos los siguientes:

- Hongos formadores de micorrizas vasculares: El término micorriza significa asociación hongo-raíz, es una asociación entre los pelos de la raíz de una planta y el hongo especifico de la micorriza. Existen varios tipos de asociación, siendo la más popular la micorriza vesículo-arbuscular.

  Funcionan como un sistema de absorción que se extiende por el suelo y es capaz de proporcionar agua y nutrientes (nitrógeno y fósforo principalmente) a la planta y proteger las raíces contra algunas enfermedades. El hongo por su parte recibe de la planta azúcares provenientes de la fotosíntesis, básicamente almidón.

  Los mayores beneficios de esta asociación son el incremento de la longevidad de los pelos de la raíz, aumentando con ello no sólo el tiempo sino también el área de absorción de nutrientes tanto mayores como menores.

  Las micorrizas son capaces de absorber, acumular y transferir los principales macro y micro nutrientes y el agua a la planta, más rápidamente que las raíces sin micorrizas.

Mediante la red de micelio externo, pueden translocar de forma más efectiva los productos de la actividad de las rizobacterias cuando se encuentran juntas en la rizósfera de los cultivos, por lo que las inoculaciones mixtas pueden crear interacciones sinérgicas entre los microorganismos biofertilizantes. (Siqueira & Franco, 1998)

Décadas de investigación muestran que las micorrizas incrementan la tolerancia de las plantas a la sequía, compactación, altas temperaturas del suelo, metales pesados, salinidad, toxinas orgánicas e inorgánicas y extremos de pH del suelo. Estos hongos también prolongan la vida, viabilidad y productividad del sistema radicular de la planta (Biofabrica, 2008).

- Género *Azospirillum:* Se caracteriza por su motilidad y respuesta a factores quimiotácticos y por permanecer durante un largo período en la rizósfera de los cultivos.

  Es un género de bacterias fijadoras de nitrógeno que viven sobre las raíces de las plantas y es capaz de beneficiar diversos cultivos de importancia agrícola, tales como trigo, maíz, sorgo, arroz, cebada, avena, y en cultivos perenne como café y cítrico, tanto en vivero como en plantaciones comerciales directamente en campo.
  Existen 5 especies que componen este género, y son: *Azospirillum brasilense, Azospirillum lipoferum, Azospirillum amazonense, Azospirillum halaproeferens y Azospirillum irakense.* (Hernàndez & Chailloux, 2011).

  Además de fijar nitrógeno, esta bacteria es capaz de producir hormonas de crecimiento vegetal (ácido indol acético), generando un crecimiento importante del sistema radicular, lo que permite mayor capacidad de absorción de agua nutrientes disponibles en el suelo, incluyendo su mayor absorción y de los propios fertilizantes químicos aplicados (Biofabrica, 2008)

- Género *Rhizobium:* Es una bacteria fijadora de nitrógeno del medio ambiente, específica para cultivos de leguminosas, en particular el frejol, que permite reducir al 100% el uso de fertilizantes químicos nitrogenados.

Esta bacteria ha sido mejorada para incrementar la producción de la enzima nitrogenasa, responsable de la fijación de nitrógeno, permitiendo una fijación tres veces superior a la de otros tipos de *Rhizobium*.

Esta mayor capacidad de fijación de nitrógeno permite incrementos significativos en rendimientos de frejol, a la vez, el producto obtenido contiene entre 20 y 30% más proteína, respecto a las plantas en donde no se aplica esta bacteria.

Con el uso de este biofertilizante se incrementa la presencia de microorganismos benéficos que se asocian a las raíces de las plantas, son excelentes mejoradores de suelo y contribuyen al combate de microorganismos patógenos (Biofabrica, 2008).

2.4 Alcachofa

Las alcachofas son los frutos de las alcachoferas de nombre científico *Cynara scolymus* y que pertenece a la familia de las Asteráceas (Compuestas), subfamilia: Carduoideae. La alcachofa es una planta herbácea de gran tamaño, con hojas pinnatisecdas (con nerviación pinnada, con margen tan profundamente dividido que los segmentos resultantes alcanzan el nervio medio), no espinosas. Las flores que aparecen en el segundo año, se encuentran agrupadas en capítulos gruesos de 10-15 cm de diámetro, insertadas sobre tallos fuertes, ramificados, acanalados, con hojas sénsiles, casi enteras. De color violeta, estas flores son tubulosas y se encuentran insertadas en un receptáculo carnoso rodeado de brácteas, también carnosas en su base que no terminan en punta. El receptáculo y la base de las brácteas constituyen la parte comestible de esta hortaliza (Bruneton, 2001).

Fueron los árabes, durante la Edad Media, quienes extendieron el cultivo por Europa, mejoraron las variedades y sus cualidades gastronómicas. Los griegos y también los romanos propagaron su fama como alimento afrodisíaco, lo que favoreció e incrementó su empleo culinario. En la actualidad, la alcachofa es un alimento habitual en todos los hogares (Faveri & Larbaletrier, 2008).

Es muy importante tomar en cuenta que la alcachofa tiene además de sus propiedades culinarias y nutritivas, propiedades farmacéuticas ya que es utilizado como un excelente adelgazante (Mejìas, 2008)

2.4.1 Importancia Económica

Se trata de una planta oriunda del norte de África, lo que explica que su cultivo está muy localizado en países de la cuenca mediterránea como Italia, España (los mayores productores), Francia o países del Norte de África, donde se concentra el 80% de la producción mundial. España es el segundo productor mundial después de Italia, con cerca del 30% de la producción, y el primer exportador. El 40% de las alcachofas españolas son transformadas en la industria. En la actualidad, California, en Estados Unidos, también tiene amplias zonas de cultivo de alcachofas (Faveri & Larbaletrier, 2008).

En el Ecuador según datos del Banco Central, en el 2000, Ecuador exportó apenas 22 millones de kilos de alcachofa partida en conserva, mientras que en 2007 esta cifra creció a 114 millones de kilos, producto de la demanda de países como España, uno de los que fue principal productor en el mundo. Durante los últimos cuatro años, Inaexpo filial de Pronaca empezó a desarrollar este cultivo para exportación. En un principio se importaba 100 libras de semilla, ahora se compra unas 1 000 libras anuales.

Esta filial compra toda la producción, el 99% se exporta y el restante se comercializa en el país. En el 2007 el consumo a nivel mundial fue de 21 mil contenedores, de los cuales apenas 166 pertenecieron a Inaexpo, el país tiene la oportunidad de aprovechar esta gran demanda. Según Fernando Freile, de Inaexpo, un agricultor que produzca al año 21 mil kilos de alcachofa podría ganar $3 000 por ha (Hoy, 2008).

La alcachofa se exporta fresca o en conservas además de que Ecuador es reconocido por exportar alcachofas en su estado natural. Por ello las exportaciones de alcachofas se han ido incrementando paulatinamente, además de que los exportadores han enviado muestras a los mercados internacionales ya que se trata de un producto

nuevo en el rubro de las exportaciones del Ecuador y que apenas se está introduciendo en el mercado internacional (Camacho, 2009).

En el Cuadro 3 se encuentran las exportaciones de alcachofa según el año, las toneladas exportadas y el precio de las toneladas en miles de dólares.

Cuadro 3. Exportaciones ecuatorianas de alcachofa fresca (miles de dólares)

Exportaciones Ecuatorianas de Alcachofa Fresca (Miles de dólares)			
Año	**Ton.**	**Valor / FOB**	**Precio / Ton.**
1998	32.42	56,39	1,74
1999	4.48	9,11	2,03
2000	29,06	52,32	1,80
2001	16,36	15,48	0,95
2002	36,59	54.35	1,49
2003	25,80	37,76	1,46
2004	26,48	37,84	1,43
2005	27,15	37,91	1,40
2006	27,83	37,99	1,37
2007	28,50	38,06	1,34
2008	29,17	38,14	1,31

Fuente: Camacho, 2009

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Tipo de investigación

La investigación que se realizó fue de tipo experimental, ya que se provocó gracias a la acción de ciertas bacterias el paso de calcio insoluble a soluble, controlando el aumento o disminución de dicha variable, lo que permitió obtener resultados, que ayudaron a seleccionar las mejores cepas bacterianas solubilizadoras de calcio.

3.2 Fase de campo

3.2.1 Área del lugar de muestreo

Las muestras fueron tomadas en una plantación de alcachofa (*Cynara scolymus*) ubicada en el sector de Lasso, Parroquia Tanicuchi, Cantón Latacunga, provincia de Cotopaxi, la extensión de la plantación fue de 4 ha (hectáreas), divididas en 8 bloques de aproximadamente 5000 m^2 cada uno.

Figura 3. Localización del Cultivo de Alcachofa, en el sector de Lasso, Parroquia Tanicuchi, Cantón Latacunga, Provincia de Cotopaxi.

Fuente: Google 2012.

3.2.2 Recolección de muestras de suelo en los lotes de alcachofa

Para la recolección de muestras, se tomó en cuenta el método descrito por (Coraspe & Tejera , 1996), el cual puntualiza que se debe recoger una muestra (de 1kg) por hectárea en base a 30 submuestras; en el caso puntual de esta tesis se redujo el área de muestreo se tomaron las mismas 30 submuestras pero en este caso en la mitad de la extensión, es decir 5000 m^2 y el procedimiento que se siguió fue el siguiente:

a) Recorrida y medida la plantación fue delimitada en 8 lotes de 5.000 m^2 cada uno, los cuales se encontraron con plantas de alcachofa de 9 meses de edad.
b) Se tomaron totalmente al azar submuestras de aproximadamente 60g recorriendo en zigzag, y entre la toma de una muestra y otra un espacio cerca de 30 pasos aproximadamente.
c) Se limpió la superficie del suelo para evitar cualquier material vegetal.
d) Se tomó la submuestra con la ayuda de un barreno muy cerca de la raíz con una profundidad de aproximadamente de 20 a 30 cm.
e) Se colocó en un recipiente desinfectado con anterioridad la parte media de la tajada.
f) Se repitió el procedimiento en la totalidad de la plantación hasta obtener todas las submuestras.
g) Se mezclaron las submuestras obtenidas para homogenizar.
h) Se preparó la muestra con aproximadamente 1 kg de la mezcla y se colocaron en fundas estériles.
i) Se etiquetó tomando en cuenta el número de invernadero, bloque, y el número de muestra, ejemplo:

Invernadero: 1

Bloque: 2 **Muestra: 1.2.1**

Muestra: 1

j) Se repitió todo el procedimiento en los 8 lotes tomando en cuenta que terminado el muestreo de cada lote se lavó y desinfectó el barreno, para evitar la contaminación cruzada.
k) Al terminar con los 8 lotes se obtuvieron 8 muestras compuestas por 30 submuestras, las cuales se transportaron en una caja térmica.

l) En los laboratorios de Agrodiagnostic se refrigeraron las 8 muestras a 4ºC hasta el siguiente día.

3.3 Fase de laboratorio

3.3.1 Aislamiento de bacterias solubilizadoras de calcio insoluble.

3.3.1.1 Técnica de diluciones seriadas (Tortora, Funke, & Case, 2007)

Se prepararon series de diluciones (1:10), (1:100), (1:1000), (1:10000), (1:100000).

De esta manera se buscó aislar las bacterias que se encontraban en las muestras obtenidas del suelo de plantaciones de alcachofa.

- *Equipos y materiales*

- Balanza analítica
- Matraces de 500 mL
- Pipetas de 10, 1 y 0,1 mL
- Tubos de ensayo
- Frascos de 150 mL
- Incubadora

- *Reactivos*

- Agua de peptona
- Agua destilada

- *Procedimiento: Homogenización de las muestras*

a) Se pesaron de cada una de las 8 muestras de suelos 10 g.
b) Se colocaron en los frascos de 150 mL que contenían 90 mL de agua peptonada estéril, se agitó y obtuvo la primera dilución 10-1.
c) Se prepararon diluciones seriadas a partir de la primera dilución, se tomó 1 mL y se colocó en un tubo que contenía 9 mL de agua peptonada y de esta nueva dilución se preparó la siguiente, siguiendo el mismo patrón hasta obtener la dilución 10^{-5}.

d) De cada uno de los tubos que contenían las diluciones se tomó 1 mL y se colocó en cajas petri, las mismas que contenían agar nutritivo (no se debe exceder 30 minutos después de las diluciones para realizar la siembra).
e) Se incubaron las cajas petri a 30ºC por 48 horas.
f) Las colonias que se obtuvieron se aislaron por el método de agotamiento en superficie, (consiste en tomar una pequeña muestra del inóculo con la ayuda de un asa estéril y se procede a realizar una estría por toda la caja petri que contiene agar nutritivo).
g) Se codificaron las unidades formadoras de colonias con los tres primeros números que son la codificación según el muestreo (ítem 3.2.2) y un cuarto número que corresponde a las UFC unidades formadoras de colonias que se aislaron, tomando en cuenta un análisis organoléptico (color y forma).

3.3.1.2 Coloración de Gram (Forbes, Sham, & Weissfeld, 2009)

De las cajas petri preparadas se realizó una codificación de las unidades formadoras de colonia UFC, las cuales tenían características organolépticas distintas; tomando en cuenta que los tres primeros números son de la codificación del muestreo y el cuarto número es el orden de aislamientos de unidades formadoras de colonias, posteriormente se procedió a realizar la coloración Gram para identificar las colonias Gram positivas o negativas.

- *Equipos y materiales*
  - Asa de inoculación
  - Mechero de Bunsen
  - Porta objetos
  - Microscopio

- *Reactivos*
  - Azul violeta
  - Lugol
  - Alcohol- Cetona
  - Safranina

- *Procedimiento*

a) Con el asa de inoculación estéril se recogió un inóculo de las unidades formadoras de colonia, procedentes de las cajas petri que se prepararon en el anterior procedimiento.
b) Se realizó el extendido en forma de espiral en el porta objetos. Previamente se colocó una gota de agua para ayudar el extendido.
c) Se fijó flameando en el mechero de Bunsen.
d) Se dejó secar a temperatura ambiente.
e) Se agregó azul violeta y esperó por un minuto.
f) Se enjuagó con agua de grifo.
g) Se agregó el lugol y se esperó un minuto.
h) Se enjuagó con agua de grifo.
i) Se agregó el alcohol-cetona y se esperó 30 segundos
j) Se enjuagó con agua de grifo.
k) Se agregó safranina y se esperó 30 segundos
l) Se enjuagó con agua de grifo.
m) Se dejó secar y posteriormente se observó en el microscopio con el lente de inmersión 100x.

3.3.1.3 Método de siembra por estría (cultivos puros)

Para un manejo adecuado de las bacterias estudiadas se realizó cultivos puros de las mismas, usando el método de siembra por estría.

- *Equipos y materiales*

- Asa de inoculación
- Mechero de Bunsen
- Cajas Petri (estériles)
- Incubadora

- *Reactivos*

- Nutri Agar

- Agua destilada

- *Procedimiento*

a) Codificadas e identificadas las bacterias (Gram negativas-positivas), se realizó una nueva siembra de aquellas cepas que no estaban puras, se consideran cepas puras aquellas poblaciones que al analizar en microscopio presentan morfológicamente similitud y no se encuentra con un microrganismo diferente.
b) Se realizó el rayado en las cajas petri, preparadas con anterioridad que contenían agar nutritivo.
c) Se esterilizó el asa en la flama del mechero de bunsen.
d) Se repitió el procedimiento de los ítems b y c, con cada una de las bacterias.
e) Todo el proceso se realizó en mesas debidamente desinfectadas, lo más cerca posible del mechero de bunsen para evitar contaminación y con el uso de mascarilla, guantes y cofia.
f) Una vez terminado el proceso se incubó a 30ºC por 24 horas.
g) Después de las 24 horas de incubación, se realizó la tinción de Gram de cada una de las cepas, las que se encontraron sin contaminación (cultivo puro) se sometieron a refrigeración a -20º C y con las que se encontraron contaminadas se repitió el proceso hasta lograr el cultivo puro.

3.3.2 Selección de las mejores cepas bacterianas solubilizadoras de calcio

3.3.2.1 Técnica de enriquecimiento selectivo (Tortora, Funke, & Case, 2007)

Los cultivos puros ya preparados fueron sometidos a la técnica de enriquecimiento selectivo, que consiste en diseñar un medio de cultivo mínimal (esential médium), el cual contiene nutrientes esenciales, vitaminas, aminoácidos.

En este caso se adaptó una modificación de la composición del Medio Pikovskaya (Ver Anexo A), añadiendo fosfato tricálcico y carbonato de calcio, los cuales son los compuestos más comúnmente presentes en el suelo agrícola para de esta manera

asegurar que el medio tenga un gran contenido de calcio. En el Cuadro 4, se especifica los componentes del medio modificado que se utilizó para aislar microorganismos solubilizadores de calcio.

Con este método se logró observar el desarrollo de bacterias solubilizadores de calcio. Dicha sugerencia fue realizada por la Lic. Garcés K, propietaria del Laboratorio Agrodiagnostic y Docente de la Universidad Internacional SEK Ecuador.

Cuadro 4. Medio mínimal para aislamiento de microorganismos solubilizadores de calcio.

MEDIO PIKOVSKAYA MODIFICADO	
Compuesto	**Cantidad**
Glucosa	10 g/L
Fosfato tricálcico	2.5 g/L
Carbonato de calcio	2.5 g/L
Sulfato de amonio	0.5 g/L
Cloruro de sodio	0.2 g/L
Sulfato de magnesio	0.1 g/L
Cloruro de potasio	0.2 g/L
Extracto de levadura	0.5 g/L Fuente de aminoácidos
Sulfato de manganeso	0.1 g/L Fuente de manganeso
Agar	20 g/L
El pH debe de ser de 7.0 ± 1	

Elaborado por: Paguay, Vasco 2012.

- *Equipos y materiales*

- Balanza analítica
- Mechero de bunsen
- Incubadora
- Matraces de 1000 y 500 mL
- Cajas Petri
- Asa de inoculación

- *Reactivos*

- Medio Mínimal (Cuadro 4)
- Agar-Agar Type I

- Procedimiento

a) Se sacó del congelador un criotubo de cada una de las bacterias, para descongelarlos.
b) Con el asa de inoculación se transfirió el inoculo a cajas petri que contenían el medio, utilizando el método de estriación.
c) Se incubaron durante 48 horas a 30ºC en una estufa bacteriológica.
d) Se midieron aquellas cepas bacterianas que presentaron halos de crecimiento para lo cual se colocó una solución de lugol para diferenciar los halos de crecimiento del medio selectivo, ya que ambos tenían una coloración blanquecina.
e) Se seleccionaron aquellas cepas que presentaron halos de crecimiento más grandes.
f) Con dichas cepas se inocularon frascos de 500 mL que contenían el medio al cual no se adicionó agar para hacerlo un medio líquido.
g) Se incubaron durante 144 horas a 30 °C.
h) Se tomaron muestras cada 48, 96 y 144 horas.

3.3.2.2 **Análisis en Espectroscopía de Absorción Atómica.** (Skoog, Holler, & Nieman, 2000)**)**

Se utilizó la técnica de *Análisis en Espectroscopia de Absorción Atómica* para determinar la concentración de calcio insoluble en una muestra de medio de cultivo líquido mínimal.

- *Equipos y materiales*

- Balones aforados
- Pipetas de 10, 5, 3, 2,1 mL
- Frasco lavador
- Muestras
- Espectrofotómetro

- *Reactivos*

- Agua destilada

- *Preparación de la muestra*

a) Las muestras anteriormente obtenidas (medio mínimal líquido) se filtraron al vacío con una membrana de 0.4µm para asegurar que únicamente se pueda medir el calcio presente en las muestras.

- *Preparación del equipo y análisis de la muestra*

b) Se encendió el equipo 15 minutos antes de iniciar la práctica.
c) Se lavó y secó cuidadosamente la celda con agua destilada y papel de arroz, para evitar dejar huellas digitales.
d) Se seleccionó la longitud de onda para calcio que es 422.7 nm
e) Con el porta celda vacío se ajustó 0.0 % de transmitancia, para bloquear el haz de luz y evitar que llegue radiación al detector.
f) Con la celda a tres cuartas partes de agua destilada se ajustó el 100.0 % de transmitancia para eliminar interferencias debido al blanco.
g) Se realizaron las mediciones empezando con la muestra preliminar que será nuestro comparativo.
h) Se realizó la medición de las otras muestras problema en porcentaje de transmitancia.
i) Se elaboró una gráfica de absorbancia vs concentración.
j) Las concentraciones que se obtuvieron de calcio soluble están expresadas en mg/L.

3.3.2.3 Pruebas de Antagonismo

El objetivo fue detectar entre los géneros de bacterias encontradas en el estudio, la actividad de inhibición del crecimiento, es decir, el posible antagonismo entre los géneros de bacterias encontradas en el estudio. Se eliminó de la mezcla aquellos microorganismos que inhibían el crecimiento de las demás.

- *Equipos y Materiales*

- Cajas petri

- Mechero de bunsen
- Asa
- Incubadora

- *Reactivos*
- Agar nutritivo.

- *Procedimiento.*

a) Se sembró de forma masiva cada cepa bacteriana de manera individual en agar nutritivo.
b) Se colocó un fragmento de sorbete estéril de longitud próxima a 1 cm y 0.5 cm de diámetro.
c) Se dispensó 100 µl del caldo nutritivo en cada sorbete conteniendo el microorganismo a ser confrontado con el microorganismo presente en el agar.
d) Se inoculó a 31ºC por un periodo de 24 horas en una estufa microbiológica.
e) En caso de existir antagonismo negativo se observó crecimiento masivo alrededor del sorbete (microorganismo confrontador).
f) El antagonismo positivo se determinó por el crecimiento limitado del microorganismo alrededor del sorbete, dando como resultado un halo transparente al contorno del sorbete.

3.3.2.4 Establecimiento del Cepario

Con las cepas obtenidas se realizó un cepario para una conservación óptima de las bacterias sin riesgo de contaminación. Para esto se utilizó la técnica empleada por Laboratorios Agrodiagnostic misma que se describe brevemente a continuación:

- *Equipos y materiales*
- Asa de inoculación.
- Mechero de Bunsen
- Tubos de tapa rosca

- Incubadora
- Criotubos
- Micro pipeta
- Puntas azules capacidad 1000 µL
- Frascos estériles
- Cámara de flujo laminar
- Fundas estériles
- Balanza analítica
- Pipetas de 10mL
- Probeta de 50mL.

- *Reactivos*

- Caldo nutritivo
- Glicerol

- *Procedimiento*

a) Se pesó Nutri Brown (caldo nutritivo) y se mezcló con agua.
b) Se dispensó la mitad de caldo nutritivo en los 33 tubos de tapa rosca de 5mL.
c) La otra mitad de caldo nutritivo 82.5 mL se mezcló con 82,5 mL de glicerol y se dispensó 5 mL en otros 33 tubos de tapa rosca.
d) Los tubos se pusieron a esterilizar en un autoclave a 120ºC por 20 minutos.
e) Los tubos que contenían caldo nutritivo se inocularon con una asada de la bacteria en la cámara de flujo laminar para evitar contaminación.
f) Se incubaron los tubos inoculados en una estufa bacteriológica, a 30ºC por 4 horas hasta obtener turbidez comparada con un tubo sin inocular que sirvió como blanco.
g) Se mezclaron los tubos que contenían el cultivo microbiano preparado en el anterior ítem y los 5mL de emulsión de caldo nutritivo y glicerol preparados en el tercer ítem en frascos estériles.
h) Se dispensó en 10 criotubos con 1 mL de la mezcla en cada uno, se congeló a -20ºC. Los criotubos que contenían el cultivo microbiano tienen una vida óptima de tres meses dato otorgado por Laboratorios Agrodiagnostic. (Ver Anexo B)

3.3.3 Identificación de Cepas Bacterianas

3.3.3.1 Pruebas MICROGEN GN ID. (Microgen GN ID, 2004)

Esta prueba ayudó a identificar las cepas bacterianas seleccionadas con anterioridad las cuales presentan las mejores capacidades de solubilizar calcio.

- *Materiales*
  - Mechero de bunsen
  - Asas bacteriológicas
  - Pipetas pasteur estériles
  - Tabla de identificación
  - Carta de color para leer los resultados

- *Reactivos*
  - Tiras oxidasas
  - Aceite mineral
  - Reactivos VP I y VP II (7)
  - Reactivos Nitrato A&B (8)
  - Reactivo TDA (9)
  - Reactivo Kovac's (10)
  - Solución salina estéril 0.85%
  - Parafina
  - Agua estéril

- *Equipos*
  - Incubadora
  - Flujo laminar

- *Procedimiento*

a) Se realizó un test oxidasa del organismo aislado. Los organismos oxidasa (Ver Anexo C) si en el resultado del test de oxidasa fueron positivos solo se pueden identificar inoculando tanto las tiras del GN A como GN B.

b) Se emulsificó una colonia totalmente purificada durante 18-24 horas en 3mL de solución salina estéril 0.85% para la tira GN A. Si se van a inocular ambas tiras, GN A y GN B, la colonia se debe emulsificar en 3-5mL de solución salina estéril 0.85%. Mezclar bien.

c) Se quitó la lámina adhesiva que sella los pocillos de las pruebas GN A y GN B cuidadosamente. NO tirar la tira adhesiva, que a posteriori se volverá a necesitar.

d) Usando una pipeta pasteur estéril, se añadió 3-4 gotas (aproximadamente 100µL) de la suspensión bacteriana preparada en el ítem 1 a cada pocillo de la tira(s).

e) Después de la inoculación, se recubrió los pocillos 1,2 y 3 (numerar la tira GN A empezando por el final de la etiqueta) y pocillos 20 y 24 (tira GN B el pocillo 13 es al final de la etiqueta) con 3-4 gotas de aceite mineral (NO añadir aceite en el pocillo 20 si el organismo aislado es oxidasa positivo).

f) Estos pocillos están marcados con un círculo Negro alrededor para facilitar su identificación.

g) Se selló la parte superior de la tira(s) con la cinta adhesiva que se había retirado antes.

h) Se incubó a 35-37°C. Asegurarse que los "agujeros" de la cinta adhesiva están sobre los pocillos 7, 11 y 12 en la tira GN A strip y sobre el pocillo 14 en la tira GN B.

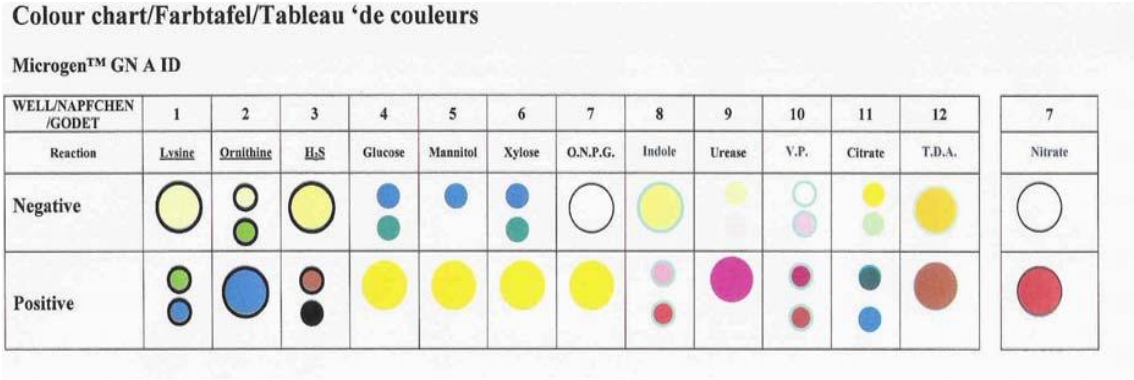
i) Las tiras GN A t GN B se leyeron después de 18-24 horas de incubación para las *Enterobacteriaceae*, y tras 48 horas para las aisladas oxidasas positivos.

- *Procedimiento: Lectura y adición de reactivos Tira GN A*

j) Se quitó la cinta adhesiva y se anotó todas las reacciones positivas con la ayuda de la carta de color (incluida).

k) Se anotó los resultados en la hoja de resultados

Figura 4. Carta de color para resultados de Tira GN A



Fuente: Manual Microgen GN ID

l) Se añadieron los reactivos apropiados a los siguientes micropocillos:
   a. 2 gotas de reactivo Kovac's al pocillo 8. Se leyó y anotó los resultados después de 60 segundos. Formación de color rojo indica un resultado positivo.
   b. 1 gota del reactivo VP I y 1 gota del reactivo VP II al pocillo 10 y se leyó y anotó los resultados tras 15-30 minutos. La formación de un color rosa / rojo indica un resultado positivo.
   c. 1 gota del reactivo TDA al pocillo 12 y se leyó después de 60 segundos. La formación de un color rojo cereza indica un resultado positivo.

m) Se realizó el test de reducción de nitrato al pocillo 7 se leyó y anotó
   a. Se añadió 1 gota del reactivo Nitrato A y una gota del reactivo Nitrato B al pocillo y leyó después de 60 segundos. El desarrollo de color rojo indica que el nitrato ha sido reducido a nitrito. Si el pocillo 7 se mantiene amarillo o incoloro después de la adición del reactivo nitrato, se añadió una pequeña cantidad de polvo de zinc. Esto indico si el nitrato ha sido completamente reducido a nitrógeno gas.

   Ej. Después de la adición del Nitrato A + B:

Rojo = Positivo

Incoloro / amarillo = Negativo

Después de la adición de polvo de zinc:

Incoloro / amarillo = Positivo

Rojo = Negativo

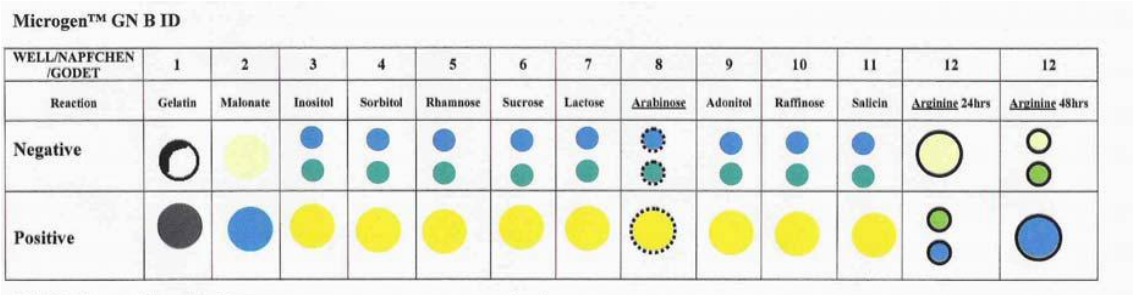
n) Se anotaron estos resultados adicionales en la hoja de resultados proporcionada.

- *Procedimiento: Lectura y adición de reactivos Tira GN B*

o) Se quitó la cinta adhesiva y anotó todas las reacciones positivas con la ayuda de la carta de color.

p) Se anotaron los resultados en la hoja de resultados

Figura 5. Carta de color para resultados de Tira GN B



Fuente: Manual Microgen GN ID

q) La lectura de los pocillos específicos se realizó según se indica:

a. El pocillo de gelatina (13) se leyó tras 18-24 horas para *Enterobacteriaceae* y tras 48 horas para los aislados oxidasa positivos.

b. El pocillo de la arginina se interpreta diferente tras 24 y 48 horas de incubación:

24 horas (*Enterobacteriaceae*)

Amarillo = Negativo

Verde/Azul = Positivo

48 horas (Organismos Oxidasa positivos)

Amarillo / verde = Negativo

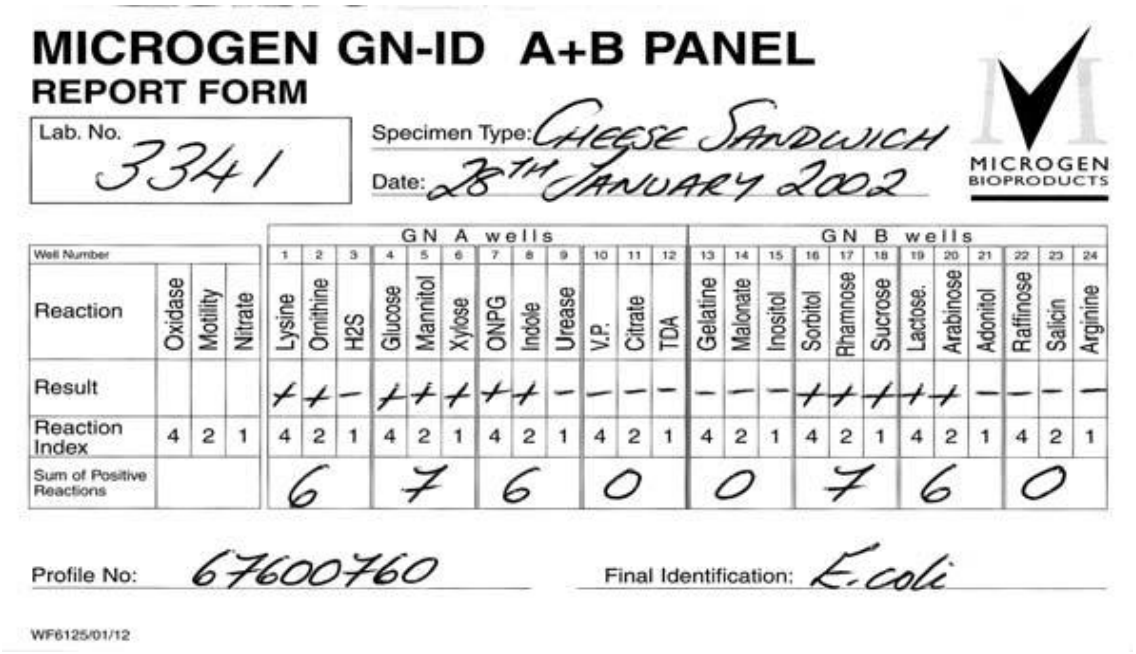
Azul = Positivo

- *Identificación*

En la hoja de resultados de Microgen GN-ID A+B, los substratos se han organizado en tripletes (sets de 3 reacciones) y se ha asignado un valor numérico a cada substrato (1, 2 o 4).

La suma de las reacciones positivas para cada triplete da lugar a un único dígito, el Perfil numérico, que se utilizó para determinar la identidad del organismo aislado se introduce en el Software Microgen Identification System (MID-60), que generó un informe.

Figura 6. Carta Hoja de resultados de Microgen GN-ID



MICROGEN GN-ID A+B PANEL
REPORT FORM

Lab. No. 3341

Specimen Type: CHEESE SANDWICH

Date: 28TH JANUARY 2002

MICROGEN BIOPRODUCTS

				GN A wells												GN B wells											
Well Number				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H2S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	TDA	Gelatine	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose.	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
Result				+	+	−	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	−	−	−	−
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions				6			7			6			0			0			7			6			0		

Profile No: 67600760

Final Identification: E. coli

WF6125/01/12

Fuente: Manual Microgen GN ID

3.3.4 Producción del biofertilizante

3.3.4.1 Reactivación de las cepas bacterianas

Se realizó la siembra en medio del cultivo, de las cepas bacterianas que tuvieron la mejor eficacia para solubilizar calcio, y que fueron congeladas con anterioridad para mantenerlas y evitar en lo posible su contaminación.

- *Equipos y Materiales*

- Colonias aisladas de microorganismos.
- Cajas Petri.
- Asa de inoculación.
- Mechero de bunsen.

- *Reactivos*

- Agar nutritivo.

- *Procedimiento*

a) Se realizó la tinción Gram de cada una de las cepas para verificar la ausencia de bacterias contaminantes.
b) Se preparó las cajas con agar mínimal (Ver Cuadro 4)
c) Se inocularon las cepas almacenadas en el banco por medio de rayado o estriado.
d) Se incubó por 24h a 30º C en una incubadora microbiológica.

3.3.4.2 Obtención del pre inóculo

Con las cepas reactivadas anteriormente se realizó un pool bacteriano que consiste en una mezcla concentrada de todas las cepas bacterianas solubilizadoras de calcio.

- *Equipos y Materiales*

- Matraces de 250 mL
- Pipetas
- Mechero de bunsen
- Incubadora

- *Reactivos*

- Medio enriquecido

- *Procedimiento*

a) Se mezclaron las bacterias reactivadas preliminarmente en un caldo nutritivo de 50mL.
b) Se tomó una asada de cada bacteria, para evitar contaminación fue realizado en la cámara de flujo laminar.
c) Se tomó 10 mL del pool y se inoculó en 90 mL del medio enriquecido (Ver Cuadro 4) eliminando el agar para evitar la solidificación.
d) Se incubó por 24h a 30 ºC y se suministró oxigeno con un flujo aproximado de $1m^3$ /h.

3.3.4.3 Producción del biofertilizante a escala 10 litros. Fermentación discontinua

Con el pre inoculo obtenido se obtendrá 10L del biofertilizante utilizando la técnica de fermentación discontinua. (Ver Anexo D)

- *Equipos y Materiales*

- Matraces de 2000 mL
- Pipetas
- Mechero de bunsen
- Aireador para pecera
- Incubadora

- *Reactivos*

- Medio enriquecido

- *Procedimiento*
- Se preparó el medio enriquecido líquido (Ver Cuadro 4) eliminando el agar para evitar la solidificación.
- Se inoculó el pre-inóculo obtenido con anterioridad en 900 mL del medio enriquecido líquido.
- Se incubó a 28°C por 72h.
- Se suministró oxigeno con un flujo aproximado de $1m^3$ /h.

3.4 Análisis de Datos

Los criterios para la selección de las cepas bacterianas que presentaron las mejores características solubilizadoras de calcio, se basaron en la medición de halos de crecimiento producidos por cada cepa en el medio Pikoskaya modificado que se encuentra detallado en el Cuadro 4.

Estimando el diámetro de este halo se aceptan como buenas cepas solubilizadoras aquellas que presentan halos iguales o mayores que 10 mm.

La prueba se elaboró por triplicado y se tomaron medidas a dichos halos de crecimiento a las 24 y 48 horas de incubación.

Se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) para cada tiempo de incubación, tomándose como variable dependiente el diámetro del halo y como factor las cepas evaluadas.

Los valores tomados en las pruebas de solubilización también se analizaron a través de la prueba de rangos múltiples de Tukey, que permitió determinar aquellas las cepas con mejores características de solubilización de calcio.

El siguiente criterio de selección, fue un análisis de Espectroscopia de Absorción Atómica la cual nos facultó el determinar cuáles cepas solubilizaron más calcio insoluble. Se analizaron en el espectrofotómetro las muestras obtenidas en 48, 96 y 144 horas.

Se realizó un Test de Kolmogorov-Smirnov (K-S), para determinar las similitudes de cada una de las cepas en el momento de solubilizar calcio, posteriormente mediante la Prueba de Análisis Multivariado se determinaron los brazos de similitud, y con este criterio eliminar aquellas cepas con una menor capacidad de solubilización.

Para analizar las pruebas de antagonismo se consideró el diámetro del halo de inhibición para designar con antagonismo positivo a halos iguales o mayores que 14 mm. Las pruebas se realizaron por triplicado con un tiempo de 48 horas.

Los datos obtenidos fueron analizados con la ayuda de los programas Microsoft Office Excel 2007 y Stastix 8 para Windows.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Aislamiento de bacterias solubilizadoras de calcio

El aislamiento de microorganismos solubilizadores de calcio se realizó a partir de suelos cultivados con alcachofa, ubicados en Laso- Latacunga- Cotopaxi. Dentro de la presente investigación el objetivo general plantea el aislamiento únicamente de bacterias solubilizadoras de calcio para la posterior elaboración de un biofertilizante, por lo cual se utilizó como medio selectivo el agar nutritivo, ya que posee la característica de que solo permite el crecimiento de bacterias, evitando el crecimiento de otros microorganismos.

Se consideró sólo el uso de bacterias (combinado diferentes géneros), ya que en estudios realizados se ha comprobado que cuando las bacterias se asocian con hongos, la población bacteriana tiende a disminuir ya que el hongo obtiene ganancias por las relaciones de parasitismo o depredación, haciendo que la interacción sea negativa para las bacterias (Rivera, y otros, 2006).

En el Cuadro 5 se muestras las 36 cepas obtenidas con sus características organolépticas (color y forma), a más de dos códigos el primero que es el código de la muestra (detallado en el numeral 3.2.3 del Capítulo 3), y el segundo código denominado código de aislamiento, que consta de los tres primeros números del código de muestra y el cuarto número que codifica el orden de las unidades formadoras de colonias aisladas en las diferentes diluciones, (Ver Anexo E)

Según la Tinción Gram realizada en cada bacteria aislada y purificada, se obtuvieron 10 cepas Gram Positivas las cuales equivalen al 27.77% y 26 cepas que representan el 72.77 % son Gram negativas. Dichos resultados se encuentra detallados en el Anexo F. La desventaja del método que se utilizó para rescatar las bacterias, es que sólo permite rescatar un porcentaje limitado de la población bacteriana total presente, logrando aislar bacterias de crecimiento rápido, que representa el 1% de la población total bacteriana presente en el suelo (Valderrama & Tèllez, 2000).

Se han realizado estudios de microorganismos solubilizadores de diferentes compuestos como por ejemplo fósforo, potasio entre otros pero no en relación al calcio; en cuanto al estudio realizado por (Guevara, 2010) que buscó obtener bacterias solubilizadoras de potasio, consiguió aislar 18 cepas de las cuales 14 que representan el 77.78% eran Gram negativas y 4 cepas que representan el 22.22% eran Gram positivas.

Cabe mencionar que el cultivo de donde se obtuvieron tanto las muestras del citado estudio y el realizado en esta tesis fue de alcachofa pero de distintas localidades, el número de bacterias obtenidas son distintas pero el porcentaje son afines tanto de Gram negativas y Gram positivas.

Cuadro 5. Características de las cepas aisladas de los suelos del sector de Lasso

CODIGO DE MUESTRAS	DILUCIONES EMPLEADAS EN CADA MUESTRA	CARACTERISTICAS DE LAS COLONIAS		CODIGOS DE AISLAMIENTO
		COLOR	FORMA	
1.1.1	-2	No resultados	No resultados	
	-3	No resultados	No resultados	
	-4	Blanca-Rosácea	Redonda bordes irregulares	1.1.1.1
		Blanca	Redonda	1.1.1.2
		Amarilla	bordes Irregulares	1.1.1.3
		Blanca	Redonda forma interna con aspecto a red	1.1.1.4
	-5	Amarillo	Bordes irregulares aspecto interno de una red	1.1.1.5
1.2.2	-2	No resultados	No resultados	
	-3	No resultados	No resultados	
	-4	Blanca	Redonda	1.2.2.6
		Cafè	Redonda	1.2.2.7
		Amarillo	Bordes Irregulares	1.2.2.8
		Blanca	Redonda forma interna con aspecto a red	1.2.2.9
		Cafè palido	Redonda	1.2.2.10
	-5	Blanca	Redonda	1.2.2.11
2.1.3	-2	No resultados	No resultados	
	-3	No resultados	No resultados	
	-4	Blanca	Sin forma concreta aspecto interno lleno de puntos pequeños	2.1.3.12
	-5	Blanca	Bordes irregulares aspecto interno de una red	2.1.3.13
		Blanca	Redonda bordes marcados	2.1.3.14

		Cafè palido	Redonda	2.1.3.15
2.2.4	-2	No resultados	No resultados	
	-3	No resultados	No resultados	
	-4	Cafè	redonda	2.2.4.16
	-5	Amarillo	Bordes irregulares aspecto interno de una red	2.2.4.17
3.1.5	-2	No resultados	No resultados	
	-3	No resultados	No resultados	
	-4	Blanca	Bordes irregulares aspecto interno de una red	3.1.5.18
		Blanca	Sin forma concreta	3.1.5.19
		Amarillo palido	Redonda	3.1.5.20
	-5	Blanca	Bordes irregulares aspecto interno asteriscos	3.1.5.21

3.2.6	-2	No resultados	No resultados	
	-3	No resultados	No resultados	
	-4	Amarilla	Bordes irregulares	3.2.6.22
		Blanca	Bordes irregulares aspecto interno de una red	3.2.6.23
		Amarillo pálido	Redonda	3.2.6.24
	-5	Blanca	Bordes irregulares aspecto interno de una red	3.2.6.25
4.1.7	-2	No resultados	No resultados	
	-3	No resultados	No resultados	
	-4	Blanca	Redonda	4.1.7.26
		Café claro	Redonda	4.1.7.27
		Café	Redonda	4.1.7.28
	-5	Amarilla	bordes irregulares	4.1.7.29
		Blanca	Bordes irregulares aspecto interno de una red	4.1.7.30
4.2.8	-2	No resultados	No resultados	
	-3	No resultados	No resultados	
	-4	Amarilla	Bordes irregulares	4.2.8.31
		Blanca	Bordes irregulares aspecto interno de una red	4.2.8.32
		Blanca semi-transparente	Redonda	4.2.8.33
	-5	Blanca	Redonda	4.2.8.34
		Amarilla	Bordes irregulares	4.2.8.35
		Blanca	Bordes irregulares aspecto interno con muchos puntos	4.2.8.36

Elaborado por: Paguay, Vasco 2012.

4.2 Evaluación de la actividad solubilizadora

Cada cepa bacteriana fue evaluada organolépticamente y con tinción Gram; con las bacterias elegidas se realizó la evaluación de la actividad solubilizadora a través de dos tipos de ensayo, el primero que radica en la medición cualitativa de los halos de crecimiento de cada una de las bacterias, en un medio sólido modificado (Ver Cuadro 4), en la cual se trabajó con 36 cepas bacterianas.

El segundo de forma cuantitativa, con un análisis de espectroscopia de absorción atómica, en un medio líquido modificado (Ver Cuadro 4) eliminado el agar para evitar solidificación, en el cual únicamente su utilizaron 13 cepas bacterianas.

4.2.1 Evaluación de resultados obtenidos en la medición de halos de solubilización en cajas petri, con ANOVA de una vía y su comparación con la prueba Tukey

El Análisis de Varianza realizado a las 24 horas de incubación, muestra alta significancia estadística en los tratamientos o cepas bacterianas evaluadas, lo que significa que difieren en su capacidad solubilizadora. (Ver Cuadro 6)

Cuadro 6. Análisis de Varianza para pruebas de solubilización a las 24 horas de incubación medido en mm.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Estadístico F	Significancia (p)
Tratamientos (entre grupos)	35	1804.52	51.5577	72.3	0.0000
Error (dentro de grupos)	72	51.33	0.7130		
Total	107	1855.85			

Elaborado por: Paguay, Vasco 2012.

Los halos de solubilización evaluados no formaron círculos exactos, por lo que se tomaron las medidas de cada halo, los promedios junto con la procedencia de cada muestra constan en el Anexo G. El promedio de solubilización a las 24 horas fue de 3,04 mm.

Al realizar la prueba de Tukey se encontró que a las 24 horas de incubación, las cepas formaron 4 grupos, como muestra el Cuadro 7, en donde los subconjuntos A y B exhibieron más similitud entre sí, y el subconjunto C no presentó ninguna similitud entre los subconjuntos.

Cuadro 7. Prueba de Tukey para la variable halo de solubilización, medido en mm, a las 24 horas de incubación

CÓDIGO DE CEPAS	ÍNDICE DE SOLUBILIZACIÓN	NIVEL DE SIGNIFICANCIA			
1.2.2.6	10.000	a			
2.1.3.12	9.3333	a	b		
2.1.3.15	9.3333	a	b		
4.2.8.33	9.3333	a	b		
2.1.3.14	9.0000	a	b	c	
3.1.5.19	9.0000	a	b	c	
1.1.1.2	8.3333	a	b	c	
4.1.7.27	8.3333	a	b	c	
2.2.4.16	8.0000	a	b	c	
3.1.5.20	8.0000	a	b	c	
1.1.1.1	7.6667	a	b	c	
1.2.2.8	6.6667		b	c	
1.2.2.10	6.3333			c	
1.1.1.3	0.0000				d
1.1.1.4	0.0000				d
1.1.1.5	0.0000				d
1.2.2.7	0.0000				d
1.2.2.9	0.0000				d
1.2.2.11	0.0000				d
2.1.3.13	0.0000				d
2.2.4.17	0.0000				d
3.1.5.18	0.0000				d
3.1.5.21	0.0000				d
3.2.6.22	0.0000				d
3.2.6.23	0.0000				d
3.2.6.24	0.0000				d
3.2.6.25	0.0000				d
4.1.7.26	0.0000				d
4.1.7.28	0.0000				d
4.1.7.29	0.0000				d

4.1.7.30	0.0000	d
4.2.8.31	0.0000	d
4.2.8.32	0.0000	d
4.2.8.34	0.0000	d
4.2.8.35	0.0000	d
4.2.8.36	0.0000	d

Elaborado por: Paguay, Vasco 2012.

La capacidad solubilizadora analizadas a las 48 horas de incubación presenta alta significancia estadísticas evaluada para las cepas bacterianas. (Ver Cuadro 8).

Cuadro 8. Análisis de Varianza para pruebas de solubilización a las 48 horas de incubación.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Estadístico F	Significancia (p)
Tratamientos (entre grupos)	35	28944.3	826.981	184	0.0000
Error (dentro de grupos)	72	324.0	4.500		
Total	107	29268.3			

Elaborado por: Paguay, Vasco 2012.

Al igual que ocurrió a las 24 horas de incubación, los halos de solubilización formados a las 48 horas de incubación no generaron círculos perfectos, se tomaron las medidas de cada halo y el valor promedio de estos (Ver Anexo G), los que se utilizaron en las pruebas estadísticas. El promedio de la solubilización a las 48 horas de incubación fue de 11,843.

La prueba de Tukey señala que a las 48 horas de incubación, las cepas evaluadas establecieron 4 grupos (Ver Cuadro 9), de los cuales los grupos A y B tuvieron mayor similitud entre sí, mientras que el grupo C no presentó ninguna similitud con los otros grupos.

Cuadro 9. Prueba de Tukey para el variable halo de solubilización, medido en mm, a las 48 horas de incubación

CÓDIGO DE CEPAS	ÍNDICE DE SOLUBILIZACIÓN	NIVEL DE SIGNIFICANCIA
1.2.2.6	40.333	a
2.1.3.12	40.000	a
2.1.3.15	39.000	a
4.2.8.33	39.000	a
2.1.3.14	38.667	a b
3.1.5.19	38.000	a b

1.1.1.2	38.000	a b
4.1.7.27	32.000	b
2.2.4.16	32.000	b
3.1.5.20	23.333	c
1.1.1.1	22.333	c
1.2.2.8	22.333	c
1.2.2.10	21.333	c
1.1.1.3	0.0000	d
1.1.1.4	0.0000	d
1.1.1.5	0.0000	d
1.2.2.7	0.0000	d
1.2.2.9	0.0000	d
1.2.2.11	0.0000	d
2.1.3.13	0.0000	d
2.2.4.17	0.0000	d
3.1.5.18	0.0000	d
3.1.5.21	0.0000	d
3.2.6.22	0.0000	d
3.2.6.23	0.0000	d
3.2.6.24	0.0000	d
3.2.6.25	0.0000	d
4.1.7.26	0.0000	d
4.1.7.28	0.0000	d
4.1.7.29	0.0000	d
4.1.7.30	0.0000	d
4.2.8.31	0.0000	d
4.2.8.32	0.0000	d
4.2.8.34	0.0000	d
4.2.8.35	0.0000	d
4.2.8.36	0.0000	d

Elaborado por: Paguay, Vasco 2012.

Las 13 cepas evaluadas registraron alta significancia estadística, que demuestra que las cepas tienen diferentes capacidades solubilizadoras de calcio, cabe destacar que cada una de ellas responde de una manera distinta a dicha solubilización debido a que solubilizan el calcio en distintos tiempos y cantidades. Por esta razón se puede apreciar diferencias notables en el incremento de los diámetros de solubilización desde las 24 horas de incubación hasta las 48 horas.

En el estudio realizado por (Guevara, 2010), se mostró un mayor promedio de solubilización, el cual a las 24 horas fue de 18 mm, cabe mencionar que las bacterias aisladas en este estudio se tomaron en suelos y raíces, en una localidad distinta. De igual manera en dicho estudio se mostró un incremento del promedio de solubilización a las 48 horas, llegando a un diámetro máximo de 40 mm, este promedio del halo de solubilización fue mayor que el presentado en la actividad solubilizadora de calcio. En las prueba de Tukey tanto a 24 horas y 48 horas se

determinó como mejores cepas solubilizadoras de potasio a aquellas que forman parte del grupo a que presentaron mayores promedios.

4.2.2 Evaluación de resultados obtenidos en el análisis con espectroscopia de absorción atómica Test de Kolmogorov-Smirnov (K-S)

Analizando los datos obtenidos se decidió el uso de la prueba estadística no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov. (K-S), ya que se obtuvo una escala de intervalos de tiempo aceptables para dicha prueba y los cuales también se puede considerar como continua, únicas premisas que se necesita para la utilización de este tipo de test.

El test de Kolmogorov-Smirnov fue aplicado a cada uno de los resultados obtenidos en el análisis de espectroscopia de absorción atómica de las 13 bacterias dichos resultados se presentan en el Anexo H utilizando como variables el tiempo de la toma de muestras y la cantidad de calcio solubilizado.

En el Anexo I**,** se exponen las 78 razones (datos conseguidos en mg de calcio soluble por medio del Análisis en Espectroscopía de Absorción Atómica), obtenidas después de aplicar el test de K-S presentando los niveles de significancia (H) y el alfa obtenido (p).

Interpretando dichos datos, se presenta en la Cuadro 10 el análisis del Alfa (p), en las casillas de color celeste con las siglas NS, muestra los vectores que presentan los resultados del alfa mayores que 0.05, vectores que estadísticamente evolucionan de manera similar en el momento de solubilizar calcio.

Mientras que las casillas que están de color blanco con la sigla S, muestra los vectores que presenta los resultados del alfa menores que 0.05, sabiendo que los vectores que tienen esta característica, estadísticamente evolucionan de manera diferente en el momento de solubilizar calcio.

El test de Kolmogorov-Smirnov compara dos vectores calculando la distancia vertical que los separa, si la distancia vertical es superior a la tabulada, se concluye que las dos distribuciones no son similares (Fariñas, 1997)

Cuadro 10. Interpretación del alfa (p) de los Resultados del Análisis de Kolmogorov-Smirnov para la comparación entre los vectores de solubilización.

Vectores de solubilización	1.1.1.1	1.1.1.2	1.2.2.6	1.2.2.8	1.2.2.10	2.1.3.12	2.1.3.14	2.1.3.15	2.2.4.16	3.1.5.19	3.1.5.20	4.1.7.27	4.2.8.33
1.1.1.1	---	S	NS	S	S	S	S	NS	S	NS	NS	S	S
1.1.1.2		---	S	S	S	NS	NS	S	NS	S	S	S	S
1.2.2.6			---	S	S	S	S	NS	S	NS	NS	S	S
1.2.2.8				---	NS	S	NS	S	NS	S	S	S	S
1.2.2.10					---	S	S	S	S	S	S	S	S
2.1.3.12						---	NS	S	NS	S	S	S	S
2.1.3.14							---	S	NS	S	S	S	S
2.1.3.15								---	S	NS	NS	S	S
2.2.4.16									---	S	S	S	S
3.1.5.19										---	NS	NS	NS
3.1.5.20											---	S	S
4.1.7.27												---	NS
4.2.8.33													---

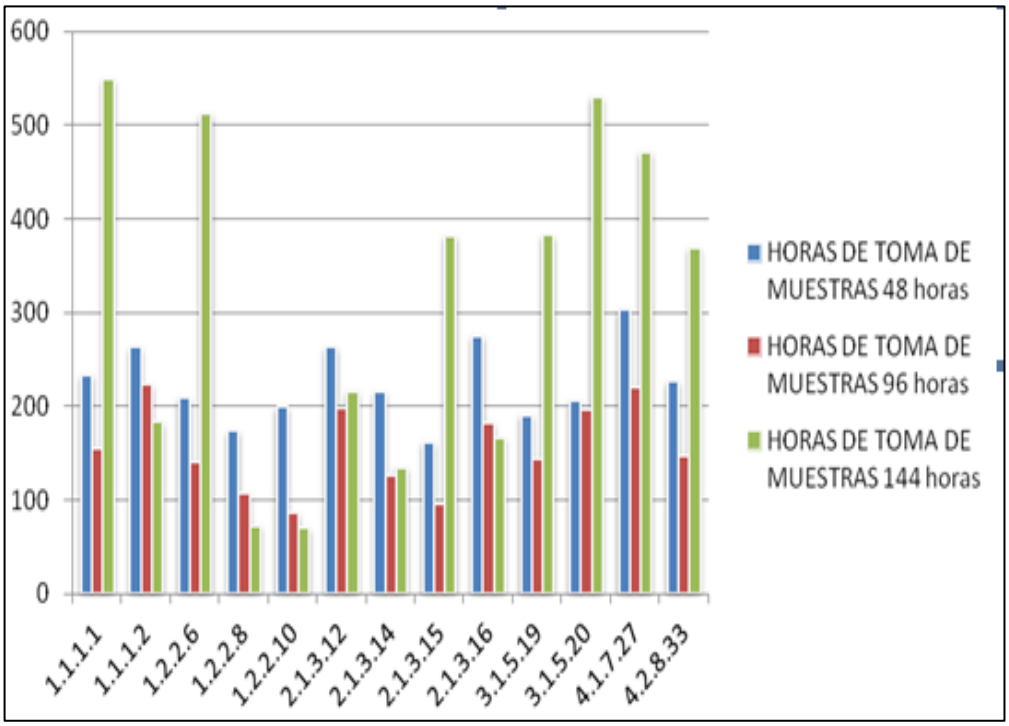
Elaborado por: Paguay, Vasco 2012.

De una manera gráfica se puede observar en la Figura 7, de qué manera disminuye o aumenta la solubilización de calcio en relación al tiempo. Comparando las cepas con los código 1.1.1.1 y 1.2.2.6 que en el Cuadro 10 está pintado de celeste con las siglas NS (vectores que estadísticamente evolucionan de manera similar en el momento de solubilizar calcio), se puede observar en la Figura 7, cómo dichas cepas a las 144 horas de experimento tienden a aumentar los miligramos de calcio soluble.

Por el contrario la comparación de las cepas con los códigos 1.1.1.1 y 2.1.3.14 vectores presentan que estadísticamente evolucionan de manera muy diferente la primera muestra a las 144 horas de experimentación, alcanzando un aumento muy

significativo de solubilización, mientras que la segunda a ese mismo tiempo de experimentación disminuye la solubilización siendo inclusive menor que a las 48 horas del experimento.

Figura 7. Gráfico de solubilización de calcio vs tiempo, medido en miligramos.



Elaborado por: Paguay, Vasco 2012.

Las 13 cepas evaluadas mostraron evoluciones estadísticamente distintas entre sí, demostrando que todas las cepas tienen disímiles capacidades solubilizadoras de calcio, indicando que cada una de ellas responde de manera diferente, incluyendo a aquellas que por similitudes morfológicas de las colonias, podrían estar duplicadas.

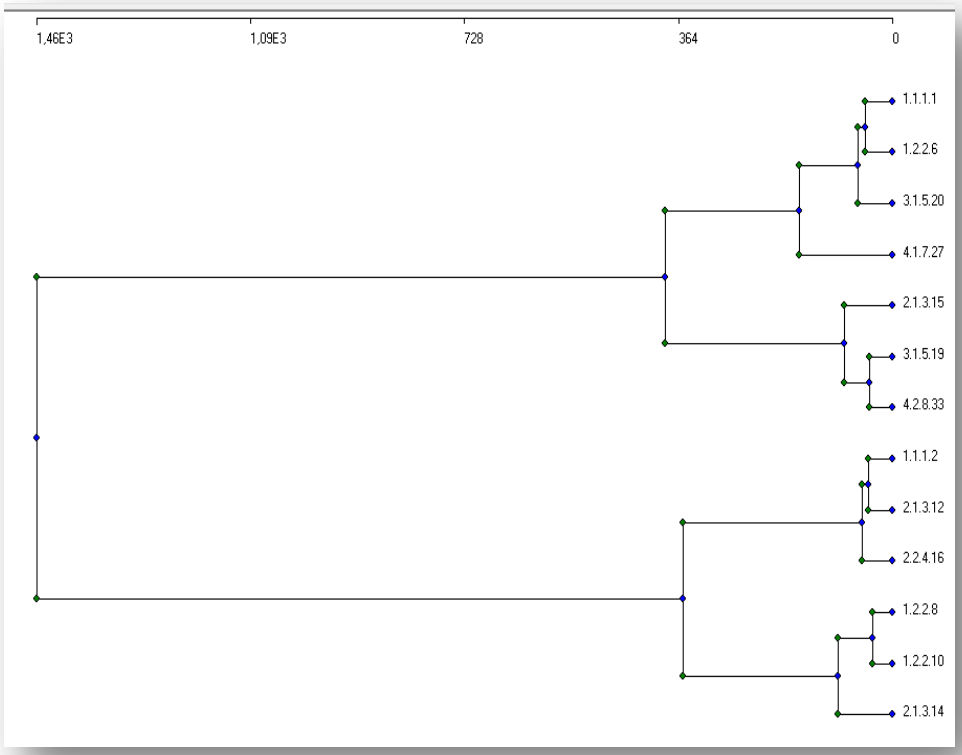
Cabe mencionar que después de la selección de las mejores cepas solubilizadoras y la identificación de las mismas se identificaron duplicados, los mismos que al analizarlos según la tabla del análisis de K-S son casos bastante especiales, por ejemplo: los códigos 1.1.1.1 y 1.1.1.2 son *Serratia marcescens* a pesar de ser las mismas su solubilización fueron totalmente distintas, la primera a las 144 horas del

experimento solubilizo 548,9 mg de Ca, mientras que la segunda en el mismo tiempo de la experimentación solubilizo 183 mg de Ca. Los códigos 2.1.3.12 y 3.1.5.19 son *Proteus myxofaciens* tienen el mismo caso que el anterior la primera tiene una solubilización a las 144 horas del experimento de 216,05 mg de Ca y la segunda 382,5 mg, es importante mencionar que en el momento de la purificación no todas las cepas se lograron purificar rápidamente por lo cual se considera el agotamiento de la cepa como un causal de estas diferencias.

4.2.3 Análisis multivariado a través del tiempo

Utilizando el programa Community Analysis Packge se realizó un análisis multivariado a través del tiempo, con el cual se establecieron dos ramificaciones que expresan la similitud que muestran las cepas bacterianas en referencia a los miligramos (mg) de calcio solubilizado a través del tiempo; se demuestra en el siguiente Clúster de análisis:

Figura 8. Clúster obtenido del análisis multivariado de los resultados de calcio soluble alcanzados por cada cepa bacteriana.

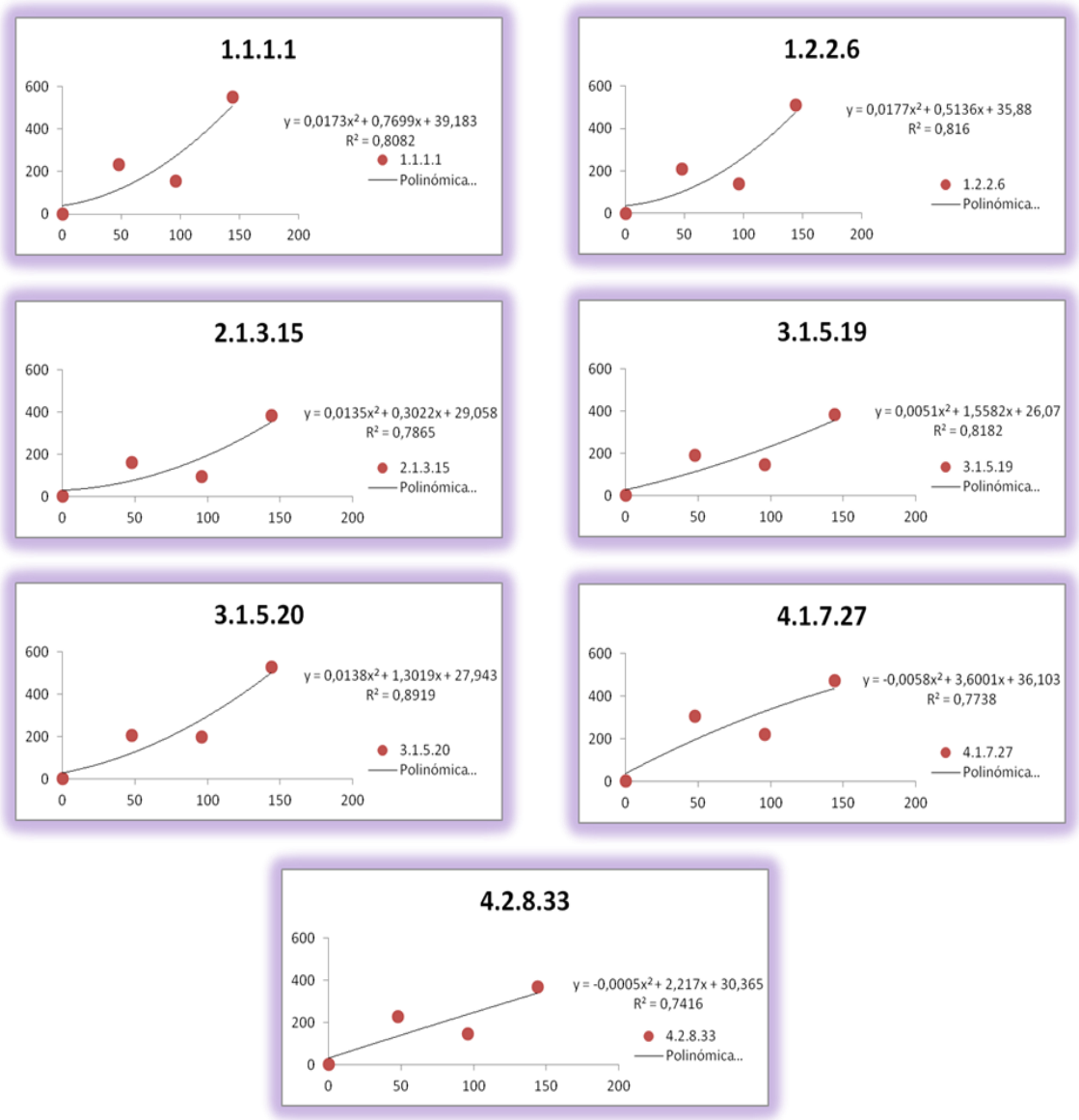


Elaborado por: Paguay, Vasco 2012.

En la Figura 8 se presenta un clúster en el que se pueden diferenciar dos ramificaciones, la superior agrupa las cepas bacterianas que mayor cantidad de calcio soluble presentaron en el experimento y en el segundo brazo se encuentran las de menor cantidad de calcio soluble, el cual a su vez se encuentra fraccionado en dos, el de mayor y menor cantidad.

En el primer brazo del clúster se encentran las cepas con los códigos: 1.1.1.1; 1.2.2.6; 3.1.5.20; 4.1.7.27; 2.1.3.15; 3.1.5.19; 4.2.8.33, en el análisis multivariado que considera como variables medidas el tiempo y los miligramos de calcio soluble, presentes en el primer brazo de clúster (Ver Figura 8) son las que presentan una mejor tendencia de solubilización, en el lapso de 144 horas del experimento sobrepasaron los 300 miligramos de calcio soluble; en la Figura 9 se puede apreciar las tendencias de solubilización individuales de las cepas antes indicadas.

Figura 9. Tendencias de solubilización de las cepas con los códigos 1.1.1.1; 1.2.2.6; 3.1.5.20; 4.1.7.27; 2.1.3.15; 3.1.5.19; 4.2.8.33, Tiempo (X) vs mg. de solubilización (Y)



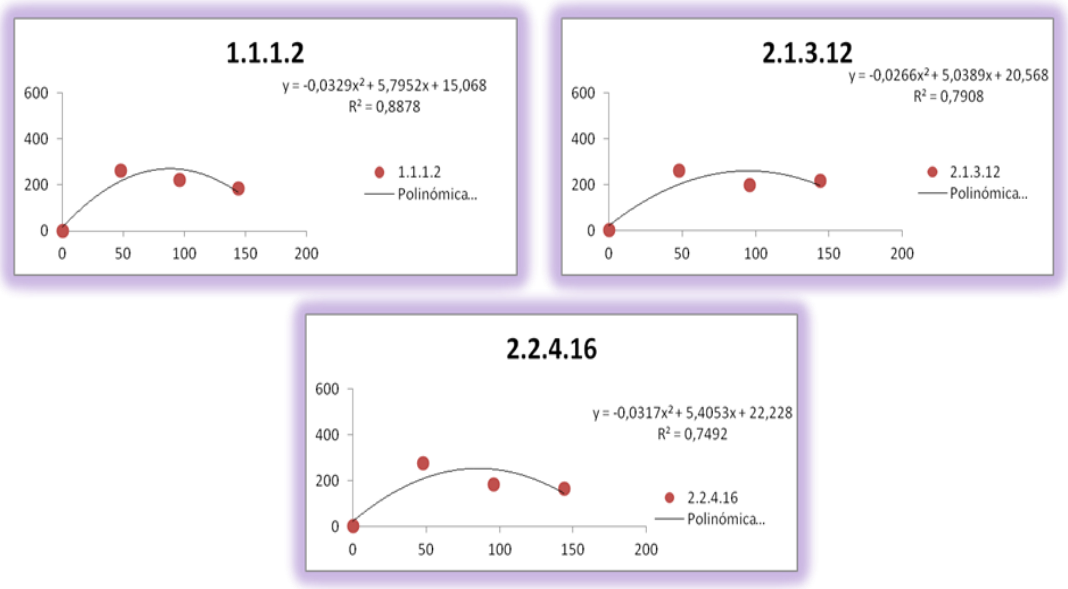
Elaborado por: Paguay, Vasco 2012.

El segundo brazo del clúster que es el que presenta las cepas con la menor capacidad solubilizadora de calcio, en el análisis multivariado que considera como variables medidas el tiempo y los miligramos de calcio soluble se dividió en dos sub-brazos, el primero que considera los códigos de las cepas siguientes: 1.1.1.2; 2.1.3.12; y 2.2.4.16, estas bacterias tienen una característica significativa a las 24 horas del experimento tienen una importante solubilización que es superior a los 200 miligramos pero en las horas 96 y 144 tiende a disminuir pero aun así la tasa de solubilización es aceptable (Ver Figura 10).

En el caso de la bacteria de código 2.2.4.16 se tomó la decisión de eliminarla después de realizadas las pruebas de espectroscopía y analíticas se estimó que presenta una

baja tasa de solubilización y una mayor pérdida de calcio soluble tomando en cuenta al tiempo.

Figura 10. Tendencias de solubilización de las cepas con los códigos 1.1.1.2; 2.1.3.12; y 2.2.4.16, Tiempo (X) vs mg. de solubilización (Y)



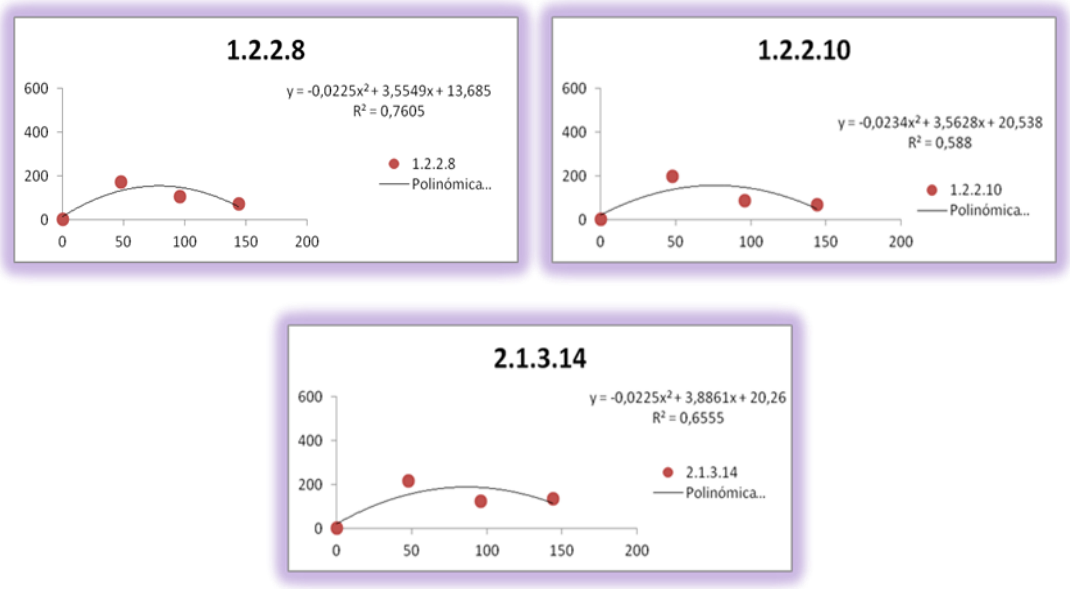
Elaborado por: Paguay, Vasco 2012.

Las tres últimas cepas con códigos 1.2.2.8; 1.2.2.10; 2.1.3.14; que se encuentran en el segundo sub-brazo, las de menor solubilización según el análisis multivariado que considera como variables medidas el tiempo y los miligramos de calcio soluble son las que estadísticamente presentan la menor capacidad solubilizadora.

En la Figura 11 se pueden apreciar las tendencias de solubilización de las mencionadas cepas, las cuales mostraron un índice de solubilización bastante bajo con respeto al tiempo y la cantidad de calcio solubilizado, por ejemplo la cepa con el código 1.2.2.8 muestra a las 144 horas del experimento una disminución de la cantidad de calcio solubilizado con 72,4 mg de calcio, que comparándola con la cepa de mayor solubilización (1.1.1.1) la cual presenta a las 144 horas del experimento una cantidad de calcio solubilizado de 548.9 mg es decir, la cepa 1.2.2.8 tiene una capacidad solubilizadora muy baja. Lo mismo sucede con la cepa del código 1.2.2.10 la cual presenta una cantidad de calcio solubilizado de 69.8 mg a las 144 horas del experimento, y la cepa del código 2.1.3.14 a ese mismo tiempo del experimento su cantidad de calcio solubilizado es de 134,6. Estas tres cepas tienden a disminuir lo

solubilizado concierne pasan las horas, por lo cual se tomó la decisión de eliminarlas del experimento.

Figura 11. Tendencias de solubilización de las cepas con los códigos 1.2.2.8; 1.2.2.10; 2.1.3.14; Tiempo (X) vs mg. de solubilización (Y)



Elaborado por: Paguay, Vasco 2012.

4.3 Pruebas de antagonismo

Las pruebas de antagonismo se realizaron con las 13 cepas aisladas para determinar si entre ellas existía antagonismo. Todos los tratamientos presentaron diámetros con medidas inferiores a los planteados. Como se muestra en la Figura 12 no se presentaron halos de solubilización en el contorno de los sorbetes de las cajas petri inoculadas.

Puesto que un halo menor no es tomado como actividad antagónica significativa, siendo 0, 00 mmm el diámetro presente en todos los tratamientos, como una actividad antagónica no significativa. De manera que se consideró antagonismo negativo entre todas las cepas analizadas.

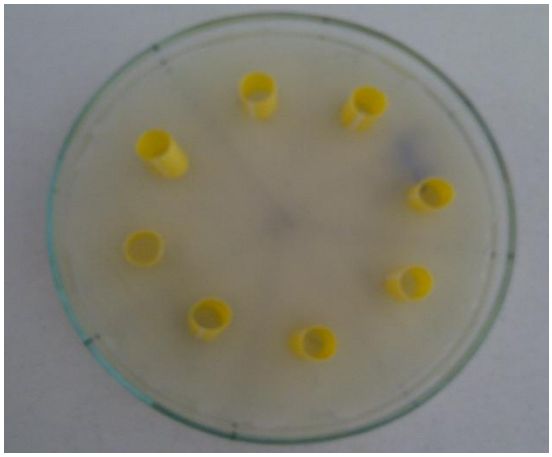
En las 13 cepas bacterianas aisladas se realizaron pruebas para determinar si entre ellas existía antagonismo. Se observó antagonismo negativo, es decir que no existió presencia del halo en el contorno del sorbete en ninguna de las cajas petri inoculadas como muestra la Figura 12.

Todas las cajas petri inoculadas no presentaron diámetros a los planteados para antagonismo positivo (14 mm valor establecido en referencia otros estudios), al no presentarse ningún halo el resultado es tomado como una activad antagónica no significativa y en todos los casos la medida fue 0,00 mm de manera que se consideró antagonismo negativo entre todas las cepas analizadas.

La no existencia de antagonismo entre las cepas aisladas se debería al hecho que fueron aisladas de un mismo lugar y de un mismo cultivo de alcachofa. Además es un indicativo que las cepas aisladas y confrontadas se pueden utilizar en un cultivo mixto para la producción del biofertilizante.

En el estudio realizado por (Guevara, 2010) confrontando 6 cepas bacterianas obtuvo diámetros inferiores a su indicador (20mm), consiguió medidas marcadamente bajas (Ver Anexo J) el mayor halo fue de 9.15 mm por lo cual consideró el antagonismo negativo, y la utilización de las 6 bacterias en el cultivo mixto.

Figura 12. Fotografía de las pruebas de antagonismo, tras 48 horas de incubación, en los 13 casos observados antagonismo negativo.



Fotos tomadas por: Paguay, Vasco 2012

4.4 Identificación de las cepas con mayor capacidad solubilizadora

Después de haber realizado las pruebas tanto experimentales como estadísticas se seleccionaron las cepas con las mejores capacidades solubilizadoras, se realizó una determinación inicial utilizando la tinción Gram dichos resultados se muestran el Cuadro 11.

Cuadro 11. Resultados de tinción Gram

CÓDIGOS DE CEPAS	RESULTADO TINCIÓN GRAM
1.1.1.1	Negativa
1.1.1.2	Negativa
1.2.2.6	Negativa
2.1.3.12	Negativa
2.2.4.15	Negativa
3.1.5.19	Negativa
3.1.5.20	Negativa
4.1.7.27	Negativa
4.2.8.33	Negativa

Elaborado por: Paguay, Vasco 2012.

Al aplicar la prueba de identificación "MICROGEN ID" se obtuvieron los resultados del Cuadro 12, en dicha prueba se utilizaron las nueve bacterias aisladas, de las cuales se identificaron 4 especies bacterianas y las sobrantes fueron duplicados.

Cuadro 12. Resultados de Prueba Microgen ID

CÓDIGOS DE CEPAS	RESULTADO PRUEBA MICROGEN ID
1.1.1.1	*Serratia marcescens*
1.1.1.2	*Serratia marcescens*
1.2.2.6	*Pseudomona fluorescens*
2.1.3.12	*Proteus myxofaciens*
2.1.3.15	*Pseudomona fluorescens*
3.1.5.19	*Proteus myxofaciens*
3.1.5.20	*Acinobacter baumannii*
4.1.7.27	*Pseudomona fluorescens*
4.2.8.33	*Pseudomona fluorescens*

Elaborado por: Paguay, Vasco 2012.

En el siguiente Cuadro 13 se realiza un análisis de cada una de las bacterias utilizadas, tomando en cuenta la morfología, patología clínica y el uso biotecnológico que se les está dando actualmente.

Cuadro 13. Particularidades de cada una de las bacterias identificadas

BACTERIAS	*Acinetobacter baumanni*	*Pseudomona fluorescens*	*Proteus myxofaciens*	*Serratia marcescens*
GENERO	Gram negativa	Gram negativa	Gram negativa	Gram negativa
FAMILIA	*Moraxellaceae*	*Pseudomonadaceae*	*Enterobacteriaceae*	*Enterobacteriaceae*
CARACTERÍSTICAS	Aerobios estrictos. Oxidadores de glucosa	Saprofita. Crece aeróbicamente	Saprófitos	
UBICACIÓN B.	Distribuyen ampliamente en la naturaleza, son importantes en el suelo y contribuyen a su mineralización	Suelo (superficie de raíces) y agua	Agua y suelo. flora intestinal normal	Flora intestinal del hombre y animales, en el ambiente.
PATOLOGÍA	No patogénicas para individuos sanos.	No patogénicas para individuos sanos.	No patogénicas para individuos sanos.	No patogénicas para individuos sanos.
USOS BIOTECNOLOGÍA	Biodegradación y biorremediación, la producción de lípidos y péptidos, ingeniería de enzimas, producción de biosurfactantes y biopolímeros y la ingeniería de nuevos productos derivados de estos productos.	Actúan sobre el pH del suelo favoreciendo la solubilización del fósforo inorgánico y liberando el fosfato a la solución del suelo. Producir ciertas sustancias que actúan limitando el crecimiento y desarrollo de los patógenos fúngicos que pueden afectar al cultivo.		Estudios en degradación de hidrocarburos

Elaborado por: Paguay, Vasco 2012.

En cuanto a las cepas con códigos 1.1.1.1 y 1.1.1.2 pertenecientes a *Serratia marcescens* cabe mencionar que en el momento de solubilización tienen una

diferencia bastante marcada, la primera a las 144 horas del experimento solubilizó 548,9 miligramos de Calcio, mientras que la otra cepa a las 24 horas de solubilización es su mayor pico con 262,7 miligramos pero tiende a disminuir conforme pasa el tiempo, esto se pude deber a que no todas las bacterias se lograron purificar rápidamente, lo que puedo ocasionar un agotamiento de la cepa disminuyendo su capacidad solubilizadora. Según un estudio de (Liba, y otros, 2006), se han encontrado en asociación *Serratia marcescens* con cianobacterias formadoras de líquenes; estas bacterias se encuentran fijando nitrógeno y produciendo aminoácidos y fitohormonas.

Las cepas con los códigos 1.2.2.6; 2.1.3.15; 4.1.7.27 y 4.2.8.33 duplicados, pertenecen a *Pseudomona fluorescens* muestran una muy buena solubilización mayor a 300 miligramos a las 144 horas del experimento en todas las cepas. Según (Delgado, 2004) destaca entre sus resultados la solubilización exitosa de potasio utilizando *Pseudomonas fluorescens,* lo que quiere decir que esta bacteria puede destruir estructuras minerales que contengan no solo potasio si no calcio también solubilizando exitosamente.

Las cepas con los códigos 2.1.3.12 y 3.1.5.19 pertenecen a *Proteus myxofaciens* la primera tiene un pico de solubilización 262,95 a las 24 horas del experimento después de eso tiende a disminuir concierne pasa el tiempo, en cambio la segunda cepa a las 144 horas de solubilización es su mejor pico solubilizando 382,5 miligramos de calcio, al igual que las cepas pertenecientes *Serratia marcescens* se toma en cuenta el agotamiento como peculiaridad para que ocurra este fenómeno.

La cepa con el código 3.1.5.20 pertenece *Acinetobacter baumanni* la cual tiene un pico de solubilización de 529,9 miligramos de calcio.

Después de realizar la investigación bibliográfica de las cepas identificadas (Ver cuadro 11) se toma la decisión de utilizar el pool bacteriano con las 4 cepas ya que no muestran peligro para el ser humano.

4.5 Producción del biofertilizante líquido a escala 10 litros

Se realizó la producción del biofertilizante líquido con un cultivo mixto de las cepas bacterianas aisladas anteriormente.
En la identificación se demostró la presencia de duplicados pero al comparar la eficiencia de solubilización de calcio de cada bacteria aislada, se observó que no tuvieron un mismo comportamiento, razón por la cual en la producción del biofertilizante se utilizaron las nueve bacterias analizadas

Se determinó el pH del cultivo cada 3 horas y siempre se mantuvo constante en un rango de 7, lo cual se encuentra entre el rango ideal para su crecimiento (6.5 a 7.5) debido a que es un pH neutro en suelos.
Se realizó conteo en placa de las muestras del producto escalado a 10 litros, con lo que se intentó desarrollar una curva de crecimiento con el fin de determinar el tiempo ideal de producción del biofertilizante.

Para realizar la curva de crecimiento se tomaron en consideración tres técnicas, la primera, un conteo directo en placa, la segunda por medio de diluciones seriadas, pero al existir un crecimiento muy fuerte del biofertilizante imposibilitó el conteo, dichas técnicas no pudieron ser determinantes para realizar la curva de crecimiento; la tercera técnica considerada, fue la utilización de espectrofotómetro pero en este caso al tener un medio líquido totalmente blanquecino por los componentes (Ver Cuadro 4) utilizados imposibilitó la lectura por medio de esta técnica. Cabe mencionar que al momento de realizar la purificación de cada bacteria se estableció un índice de crecimiento por horas, por ejemplo la bacteria *Pseudomona fluorescens* tiene un crecimiento optimo a las 24 horas , *Proteus myxofaciens a las* 48 horas, *Serratia marcescens* a las 72 horas , y *Acinobacter baumannii a las* 24 horas. Considerando esto la producción del biofertilizante duró 72 horas.

CONCLUSIONES

- A partir de muestras de la rizósfera de cultivos alcachofa (*Cynara scolymus)* ubicados en Laso- Latacunga- Cotopaxi, y mediante la técnica de aislamiento selectivo fue posible aislar 36 cepas bacterianas.

- Mediante la prueba de absorción atómica se seleccionaron 9 cepas con mejor eficiencia al momento de solubilizar calcio las cuales presentan un valor de calcio fueron: 1.1.1.1, 1.1.1.2, 1.2.2.6, 2.1.3.12, 2.1.3.15, 3.1.5.19, 3.1.5.20, 4.1.7.27, 4.2.8.33, las cuales presentan a las 144 horas un valor de Ca de 548.9, 183, 511.8, 216.05, 382.1, 382.5, 529.9, 471.25, 369.4 respectivamente.

- Después de la identificación realizadas con la prueba de Micreogen GN-ID A+B las cepas aisladas que presentaron las mejores características solubilizadoras de calcio, fueron cuatro pertenecientes a *Pseudomona fluorescens,* dos a *Proteus myxofaciens,* dos a *Serratia marcescens,* y una perteneciente a *Acinobacter baumannii,* presentándose duplicados.

- Las pruebas de antagonismo realizadas entre las nueve cepas que mostraron las mejores características de solubilización de calcio, fueron en todos los casos negativas, lo que podría interpretarse como ausencia de competencia entre sí para su desarrollo, por dicha razón no se descartó ninguna bacteria para la realización del pool bacteriano.

- Las cepas de las bacterias aisladas reposan en ceparios de AGRODIACNOSTIC laboratorio auspiciante del presente estudio, para realizar futuras investigaciones.

- Se elaboró un biofertilizante con las cuatro cepas bacterianas identificadas, incluyendo sus duplicados, ya que presentaron diferentes tendencias de solubilización.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda investigar los procesos bioquímicos que intervienen en la solubilización de calcio, por medio de los microorganismos aislados, además es oportuno analizar el comportamiento de los mismos en relación directa en los suelos agrícolas.

- Se debe prolongar este estudio con etapas consecutivas en las que se analicen todas las variables pertinentes para crear un biofertilizante solubilizador de calcio con las cepas bacterianas aisladas en la investigación, analizando diferentes sustratos, concentraciones de microorganismos, su efecto y aplicación en campo.

- Sería conveniente realizar un biofertilizante con cepas específicas pertenecientes a las zonas y cultivos en los cuales se planea la utilización del producto, con el fin de no introducir especies bacterianas extrañas o la producción de metabolitos que se puedan generar que pudieran ser nocivos para otros microorganismos propios del suelo u otros organismos mayores.

LISTA DE REFERENCIAS

Alonso, J. (2011). *Manual de histología vegetal.* Madrid, España: Mundi Prensa.

Amezquita, E. (1998). *Propiedades físicas de los suelos de los Llanos Orientales de Colombia. En: Encuentro Nacional de Labranza, Universidad del Llano.* Villavicencio, Colombia: Universidad del Llano.

ASOINCO. (2002). *Curso Internacional de Microbiologìa del suelo: Biofertilizantes y la Biofertilizaciòn.* Quito, Ecuador.

Banco Mundial. (2011). *El grupo del Banco Mundial.* Recuperado el Septiembre de 2012, de http://www.bancomundial.org

Biofabrica. (2008). *Biofabrica Siglo XXI.* Recuperado el 21 de Diciembre de 2012, de http://www.biofabrica.com.mx

BIOFAG. (2008). *Red Iberoamericana de Fertilizantes Biològicos para la Agricultura y el Medio Ambiente.* Recuperado el 8 de Septiembre de 2012, de http://www.biofag.org.ar

Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia, Fotoquímica y Plantas Medicinales.* Zaragoza, España: ACRIBIA.

Cadenas, M. (2011). *Universidad Nacional Agraria La Molina.* Recuperado el 19 de Octubre de 2012, de http://www.lamolina.edu.pe/

Camacho, B. (2009). *Proyecto de Factibilidad para la exportación de alcachofas al.* Quito, Ecuador.

Coraspe, H., & Tejera , S. (Diciembre de 1996). *Sistema de Informaciòn Agricola Nacional.* Recuperado el 5 de Enero de 2013, de http://sian.inia.gob.ve

CORPOICA. (2001). *CORPOICA.* Recuperado el 2 de Diciembre de 2012, de http://www.corpoica.org.co

Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria. (1998). *Compendio de Productos y Procesos de Investigación y Desarrollo Tecnológico.* Santa Fè de Bogota, Colombia: Corporaciòn Colombiana de Investigaciòn Agropecuaria.

Coyne, M. (2000). *Microbiologìa del Suelo: un enfoque exploratorio.* Madrid, España: Paraninfo.

Delgado, M. (2004). *Oriusbiotecnologia.* Recuperado el 16 de Noviembre de 2012, de http://www.oriusbiotecnologia.com

Delvasto, P., Ballester, A., Garcìa, C., Igual, J., Muños , J., Gonzàles, F., y otros. (2002). *Scielo.* Recuperado el 9 de Noviembre de 2012, de http://www.scielo.org.ve

Donald, K. (1996). *Fertilidad de Suelos* (Primera ed.). San Jòse, Costa Rica: EUNED.

FAO. (2007). *Organizaciòn de las Naciones Unidas para la Amimentaciòn y la Agricultura.* Recuperado el 19 de Octubre de 2012, de http://www.fao.org

Fariñas, M. (1997). *Análisis de la vegetación y de sus relaciones con el ambiente mediante métodos de ordenamiento.* Caracas, Venezuela: Universidad de los Andes.

Fassbender, H., & Bornemisza, E. (1987). *Quìmica de suelos cn ènfasis en los suelos de Amèrica Latina* (Quinta ed.). San Jòse, Costa Rica: IICA.

Faveri, R., & Larbaletrier, A. (2008). *Manual del Hortelano.* Madrid, España: MAXTOR.

Forbes, B., Sham, D., & Weissfeld, A. (2009). *Diagnostico Microbiologico* (Doceava ed.). Buenos Aires, Argentina: Medica Panamericana.

Fuentes , R. (2007). *Agrosistemas Sosteniblres y Ecològicos.* Santiago de Compostela, España: Ediciones Universidad de Compostela.

Garcìa, E., Ferrera, R., Alvaràz, J., & Rodrìguez, R. (2000). *Colonización de micorrizica arbuscular en gramíneas crecimiento en un suelo contaminado con hidrocarburos.* Mèxico DF, Mèxico: Mundi prensa.

Garcìa, R. (2001). *Servidor Educativo.* Recuperado el 4 de Diciembre de 2012, de http://coli.usal.es

Gonzàles, F. (1 de Enero de 2011). *Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible.* Recuperado el 8 de Diciembre de 2012, de http://fgonzalesh.blogspot.com

Guevara, M. (2010). *Aislamiento e Identificaciòn de Microorganismos Solubilizadores de Potasio a partir de muestras de alcachofa de la localidad de la Remonta cantòn Cayambe.* Quito, Ecuador: ESPE.

Hernàndez, M., & Chailloux, M. (2011). *Universidad Tecnològica de la Mixteca.* Recuperado el 25 de Diciembre de 2012, de http://www.utm.mx/

Hoy, D. (Febrero de 2008). Alcachofas Ganan Mercado. *Diario Hoy*.

INEC. (09 de 2010). *Instituto Nacionla de Estadistica y Censos.* Recuperado el 22 de Septiembre de 2012, de http://www.inec.gob.ec

INFOCUS. (1997). *Manual Internacional de fertilidadde Suelos.* Quito.

INPOFOS. (1997). *Manual Internacional de Fertilidad de Suelos.* Quito, Ecuador.

IPNI. (2004). *International Plant Nutrition Insitute.* Recuperado el 29 de Octubre de 2012, de http://www.ipni.net/

Liba, C., Ferrana, F., Mantio, G., Garboggini, F., Alburquerque, R., Pavan, C., y otros. (Noviembre de 2006). *The National Center for Biotechnology Information* . Recuperado el 19 de Febrero de 2012, de http://www.ncbi.nlm.nih.gov

Martinez, J., De Arpe, C., & Villarino, A. (2012). *Avances en Alimentaciòn, Nuticiòn y Dietètica.* Madrid, España: Nemira .

Mata, A., & Quevedo, F. (2005). *Diccionario didàctico de ecologìa* (Segunda ed.). San Josè, Costa Rica: Universidad de Costa Rica.

Mejìas, M. (2008). *Tolo lo que deberìas saber sobre plantas adelgazantes.* Madrid, España: Edaf.

Microgen GN ID. (Diciembre de 2004). *Medica Tec.* Recuperado el 22 de Enero de 2013, de http://www.medica-tec.com

Montoya, C., Màrquez, M., Lòpez, J., & Cuervo, C. (2005). *Caracterización de cristales de calcita bioprecipitada por un aislamiento nativo de Bacillus subtilis.* Bogotà, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.

Navarro, S., & Navarro, G. (2003). *Quìmica Agrìcola* (Segunda ed.). Madrid, España: Mundi Prensa Libros.

Petrucci, R., Harwood, W., & Herring, G. (2003). *Qumìmica General* (Octava ed.). Madrid, España: Prenace Hall.

Redondo, M., Bonilla, I., & Bolaños, L. (2013). *Universidad Autònoma de Madrid.* Recuperado el 8 de Enero de 2013, de http://www.uam.es

Rivera, C., Trujillo, A., Ferrera, R., Rodrìguez, R., Vàzquez, R., Volke, V., y otros. (Junio de 2006). *Redalyc.* Recuperado el 26 de Enero de 2013, de http://www.redalyc.org

Rogg, H. (2000). *Manejo integrado y control biológico de plagas y enfermedades.* Quito, Ecuador: ABYA-YALA.

Sànchez, J. (2007). *Potencial Biotecnològico de plagas en Ecosistemas Naturales y Agroecosistemas.* Bogotà, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.

Seoanez, M., Bellas, E., Landaria, P., & Seoanez, P. (2000). *Tratado de reciclado y recuperaciòn de productos de los residuos.* Barcelona, España: Mundi Presa.

Siqueira, J., & Franco, A. (1998). *Biotecnologia do solo: Fundamento e perspectivas.* Brasilia, Brasil: MEC.

Skoog, D., Holler, J., & Nieman, T. (2000). *Principios de Aalisis Instrumental.* Madrid: Interamericanda de España.

Soto, G., & Melèndez, G. (2003). *Taller de abonos orgánico.* Sabanilla, Costa Rica.

Sugumaran, P., & Janarthanam, B. (2007). *IDOSI.* Recuperado el 12 de Noviembre de 2012, de http://idosi.org

Thompson, L., & Troeh, F. (2002). *Los Suelos y su Fertilidad* (Cuarta ed.). Barcelona, España: Reverte.

Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducciòn a la Microbiologìa* (Novena ed.). Buenos Aires, Argentina: Mèdica Panamericanda .

Urbano, P. (2003). *Tratado de Fitotecnia General.* Bilbao, España: Mundi Prensa Libros.

Valderrama, B., & Tèllez, J. (2000). *Docstoc.* Recuperado el 2 de Febrero de 2013, de http://www.docstoc.com

Valverde , T., Meave, J., Carabias, J., & Cano , Z. (2005). *Ecologìa y medio ambiente* (Primera ed.). Naucalpan de Juarèz, Mexico: Pearson .

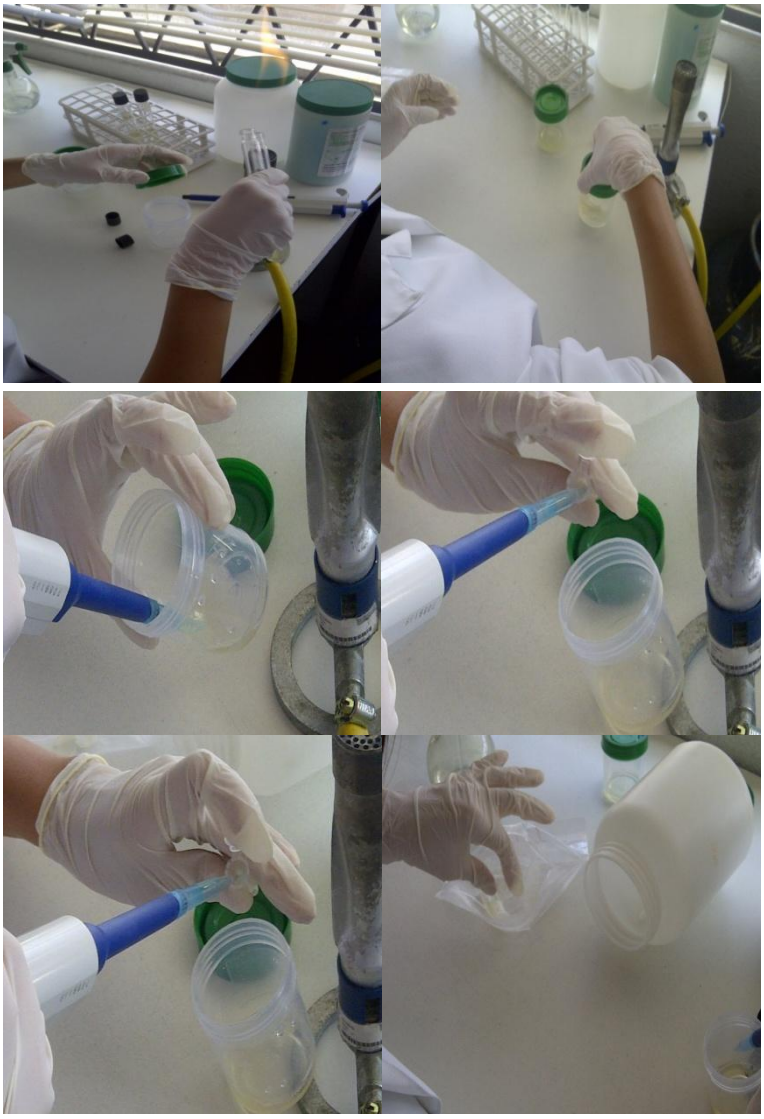
ANEXOS

Anexo A: Composición del medio Pikovskaya (pvk).

CANTIDAD	COMPUESTO
10 g	Glucosa
5 g	Ca3(PO4)2
0,5 g	(NH4)2SO4
0,2 g	NaCl
0,1 g	MgSO4*7H2O
0,2 g	KCl
0,5 g	Extracto de levadura
0,002 g	MnSO4*H2O
0,002 g	FeSO4*7H2O
15 g	Agar-agar
1 L	Agua

Elaborado por Guevara 2010

Anexo B: Establecimiento del cepario



Fotografías del proceso para colocar el cultivo microbiano en los criotubos

Elaborado por: Paguay, Vasco 2012.

Anexo C: Prueba de la oxidasa

El objetivo de la prueba “Oxidasa” es buscar la presencia de la enzima Citocromo C oxidasa.

Se trata de un enzima que oxida el citocromo C de la cadena transportadora de electrones. Se detecta utilizando el tetra para fenilendiamina: el reactivo de oxidasa contiene este compuesto que va a ser oxidado por la citocromo C oxidasa. En estado reducido es incolora, pero cuando se oxida vira a púrpura.

Procedimiento:

Con un pequeño papel de filtro añadimos reactivo de Kovacs, lo impregnamos y a partir del tubo con la bacteria problema tomamos un poco con el asa de platino y ponemos en el papel. Tras unos 30 segundos, observamos si ha ocurrido algún cambio.

Las bacterias que dan positivo a esta prueba tienen generalmente un ciclo respiratorio oxidativo.

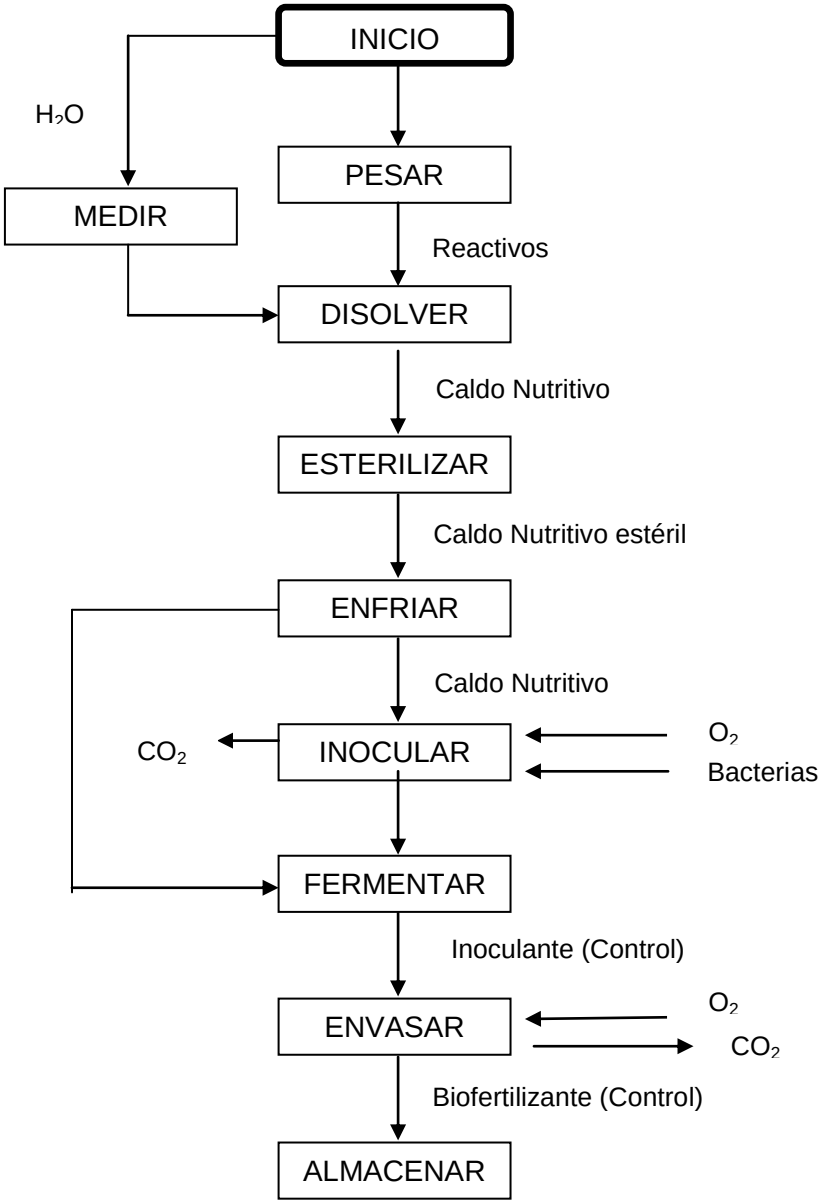
Se considera positiva esta prueba cuando toma un color púrpura la muestra.

Resultados:

(+) *Pseudomonas aeruginosa*

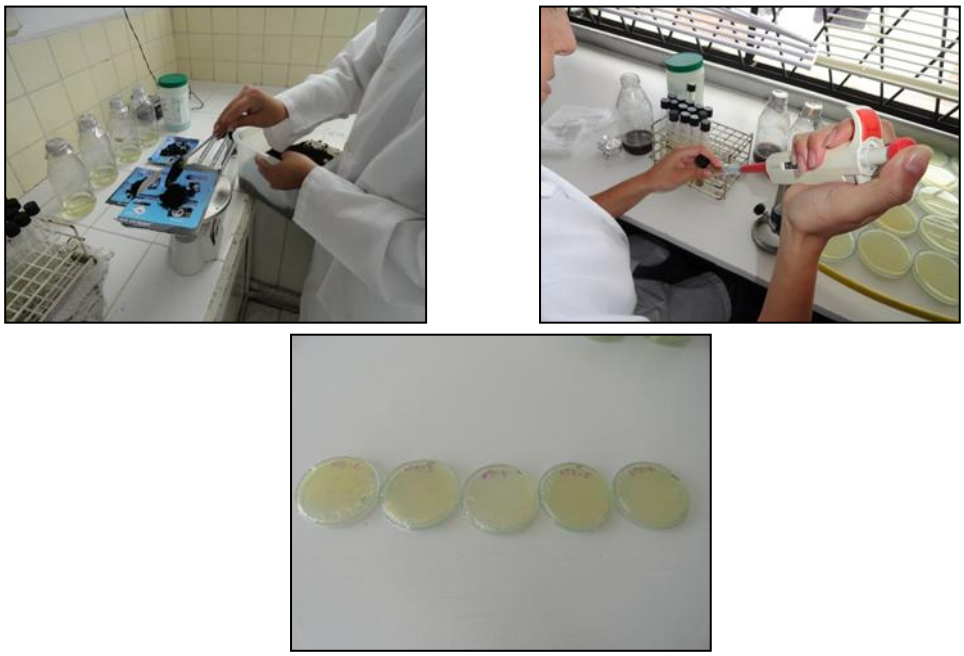
(-) *Escherichia coli*

Anexo D: Diagrama de flujo del proceso de producción del biofertilizante



Elaborado por: Paguay, Vasco 2012.

Anexo E: Fotografías de las diluciones seriadas realizadas en el presente trabajo



Elaborado por: Paguay, Vasco 2012.

Anexo F: Resultados de la tinción gram de las cepas aisladas de los suelos del sector de Lasso

CÓDIGO DE MUESTRAS	CÓDIGOS DE CEPAS	RESULTADO TINCIÓN
1.1.1	1.1.1.1	Negativa
	1.1.1.2	Negativa
	1.1.1.3	Positiva
	1.1.1.4	Positiva
	1.1.1.5	Negativa
1.2.2	1.2.2.6	Negativa
	1.2.2.7	Positiva
	1.2.2.8	Negativa
	1.2.2.9	Negativa
	1.2.2.10	Positiva
	1.2.2.11	Negativa
2.1.3	2.1.3.12	Negativa
	2.1.3.13	Positiva
	2.1.3.14	Negativa
	2.1.3.15	Negativa
2.2.4	2.2.4.16	Positiva
	2.2.4.17	Negativa
3.1.5	3.1.5.18	Negativa
	3.1.5.19	Negativa
	3.1.5.20	Negativa
	3.1.5.21	Positiva
3.2.6	3.2.6.22	Negativa
	3.2.6.23	Negativa
	3.2.6.24	Positiva
	3.2.6.25	Negativa
4.1.7	4.1.7.26	Negativa
	4.1.7.27	Negativa
	4.1.7.28	Negativa
	4.1.7.29	Positiva
	4.1.7.30	Negativa
4.2.8	4.2.8.31	Negativa
	4.2.8.32	Negativa
	4.2.8.33	Negativa
	4.2.8.34	Negativa
	4.2.8.35	Positiva
	4.2.8.36	Negativa

Elaborado por: Paguay, Vasco 2012.

Anexo G: Muestras evaluadas y diámetro (en mm) de los halos de solubilización de calcio generados por las mismas, a las 24 y 48 horas de incubación con sus respectivas repeticiones

CÓDIGO DE MUESTRA	CÓDIGO DE CEPAS	RESULTADOS HALOS S.	24 HORAS			48 HORAS		
			R1	R2	R3	R1	R2	R3
1.1.1	1.1.1.1	POSITIVO	7	8	8	26	21	20
	1.1.1.2	POSITIVO	8	9	8	35	40	39
	1.1.1.3	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0
	1.1.1.4	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0
	1.1.1.5	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0
1.2.2	1.2.2.6	POSITIVO	10	9	11	42	38	41
	1.2.2.7	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0
	1.2.2.8	POSITIVO	5	7	8	21	24	25
	1.2.2.9	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0
	1.2.2.10	POSITIVO	6	5	8	20	19	25
	1.2.2.11	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0
2.1.3	2.1.3.12	POSITIVO	11	7	10	25	34	37
	2.1.3.13	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0
	2.1.3.14	POSITIVO	9	8	10	39	36	42
	2.1.3.15	POSITIVO	10	11	7	34	39	43
2.2.4	2.2.4.16	POSITIVO	7	8	9	21	27	19
	2.2.4.17	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0
3.1.5	3.1.5.18	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0
	3.1.5.19	POSITIVO	11	7	9	43	32	39
	3.1.5.20	POSITIVO	10	8	6	32	34	30
	3.1.5.21	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0
3.2.6	3.2.6.22	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0
	3.2.6.23	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0
	3.2.6.24	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0
	3.2.6.25	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0
4.1.7	4.1.7.26	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0
	4.1.7.27	POSITIVO	8	9	8	39	37	41
	4.1.7.28	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0
	4.1.7.29	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0
	4.1.7.30	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0
	4.2.8.31	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0
	4.2.8.32	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0
4.2.8	4.2.8.33	POSITIVO	10	9	9	41	40	39
	4.2.8.34	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0
	4.2.8.35	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0
	4.2.8.36	NEGATIVO	0	0	0	0	0	0

Elaborado por: **Paguay, Vasco 2012**

Anexo H: Resultados del análisis de espectroscopia de absorción atómica de cada bacteria, se presenta los mg de calcio solubilizado en horas establecidas

CODIGO DE MUESTRA	HORAS DE TOMA DE MUESTRAS		
	48 horas	**96 horas**	**144 horas**
1.1.1.1	233,65	155,4	548,9
1.1.1.2	262,7	223,25	183
1.2.2.6	208,85	140,25	511,8
1.2.2.8	173,5	106,4	72,4
1.2.2.10	199,35	85,7	69,8
2.1.3.12	262,95	197,85	216,05
2.1.3.14	215,85	125,65	134,6
2.1.3.15	161,9	95,55	382,1
2.1.3.16	275,4	182,6	166,15
3.1.5.19	190,85	144,55	382,5
3.1.5.20	206,1	196,45	529,9
4.1.7.27	303,95	220,35	471,25
4.2.8.33	226,7	147,4	369,4

Elaborado por: **Paguay, Vasco 2012**

Anexo I: Matriz de resultados de Kolmogorov-Smirnov: (h) es el nivel de significancia y (p) el valor de alfa

	1.1.1.1	1.1.1.2	1.2.2.6	1.2.2.8	1.2.2.10	2.1.3.12	2.1.3.14	2.1.3.15	2.2.4.16	3.1.5.19	3.1.5.20	4.1.7.27	4.2.8.33
1.1.1.1	---	H = 0,31 `P= 0,00	H= 0,01 `P=1,00	H= 0,38 `P=0,00	H= 0,39 `P=0,00	H= 0,27 `P=0,00	H= 0,30 `P=0,00	H= 0,1 `P=1,00	H= 0,32 `P=0,00	H= 0,05 `P=0,22	H= 0,03 `P=0,97	H= 0,11 `P=0,00	H= 0,09 `P=0,0032
1.1.1.2		---	H= 0,32 `P=0,00	H= 0,10 `P=0,018	H= 0,17 `P=0,00	H= 0,05 `P=0,48	H= 0,06 `P=0,24	H= 0,32 `P=0,00	H= 0,05 `P=0,42	H= 0,26 `P=0,00	H= 0,29 `P=0,00	H= 0,17 `P=0,0	H= 0,22 `P=0,00
1.2.2.6			---	H= 0,39 `P=0,00	H= 0,40 `P=0,00	H= 0,27 `P=0,00	H= 0,31 `P=0,00	H= 0,01 `P=1,00	H= 0,33 `P=0,00	H= 0,06 `P=0,11	H= 0,03 `P=1,00	H= 0,12 `P=0,00	H= 0,10 `P=0,0010
1.2.2.8				---	H= 0,07 `P=0,34	H= 0,11 `P=0,004	H= 0,08 `P=0,17	H= 0,39 `P=0,00	H= 0,06 `P=0,369	H= 0,33 `P=0,00	H= 0,36 `P=0,00	H= 0,27 `P=0,00	H= 0,29 `P=0,00
1.2.2.10					---	H= 0,18 `P=0,00	H= 0,11 `P=0,01	H= 0,40 `P=0,00	H= 0,12 `P=0,002	H = 0,34 `P = 0,00	H= 0,37 `P=0,00	H= 0,28 `P=0,00	H= 0,30 `P=0,00
2.1.3.12						---	H= 0,07 `P=0,1842	H= 0,28 `P=0,00	H= 0,05 `P=0,312	H= 0,21 `P=0,00	H= 0,25 `P=0,00	H= 0,15 `P=0,00	H= 0,18 `P=0,00
2.1.3.14							---	H= 0,32 `P=0,00	H= 0,02 `P=1,00	H= 0,25 `P=0,00	H= 0,29 `P=0,00	H= 0,19 `P=0,00	H= 0,21 `P=0,00
2.1.3.15								---	H= 0,33 `P=0,00	H= 0,07 `P=0,11	H= 0,03 `P=0,96	H= 0,12 `P=0,00	H= 0,10 `P=0,0017
2.2.4.16									---	H= 0,27 `P=0,00	H= 0,30 `P=0,00	H= 0,21 `P=0,00	H= 0,23 `P=0,00
3.1.5.19										---	H= 0,04 `P=0,41	H= 0,06 `P=0,10	H= 0,04 `P=0,65
3.1.5.20											---	H= 0,09 `P=0,0004	H= 0,08 `P=0,0065
4.1.7.27												---	H= 0,02 `P=1,00
4.2.8.33													---

Elaborado por: **Paguay, Vasco 2012**

Anexo J: Diámetro de los halos de antagonismo en mm, a las 24 horas de incubación (Guevara 2010)

CONFRONTADO	CONFRONTADOR	REPETICIÓN	LARGO	ANCHO
Re	Sc	1	0.00	0.00
		2	6.65	6.10
		3	0.00	6.10
	Sr2	1	0.00	0.00
		2	0.00	0.00
		3	0.00	0.00
	Ss	1	0.00	0.00
		2	0.00	0.00
		3	0.00	6.35
	Sk	1	0.00	5.30
		2	0.00	0.00
		3	7.35	6.10
	Sy	1	5.05	5.05
		2	6.60	8.00
		3	5.05	5.75
Sc	Re	1	6.25	6.00
		2	6.25	6.25
		3	0.00	0.00
	Sr2	1	0.00	0.00
		2	5.60	5.80
		3	5.50	5.75
	Ss	1	0.00	6.10
		2	0.00	0.00
		3	0.00	0.00
	Sk	1	0.00	7.00
		2	5.80	5.80
		3	0.00	6.80
	Sy	1	6.65	6.10
		2	6.10	6.35
		3	6.10	6.15
Sr2	Re	1	0.00	5.10
		2	0.00	0.00
		3	5.95	5.55
	Sc	1	0.00	0.00
		2	0.00	0.00
		3	5.40	5.59
	Ss	1	0.00	0.00
		2	0.00	0.00
		3	0.00	5.50
	Sk	1	0.00	0.00
		2	0.00	0.00
		3	0.00	0.00
	Sy	1	0.00	0.00
		2	0.00	0.00
		3	5.75	5.50
Ss	Re	1	9.15	7.10
		2	0.00	0.00
		3	0.00	0.00
	Sc	1	0.05	7.25
		2	0.00	0.00
		3	0.00	0.00
	Sr2	1	7.00	7.51
		2	0.00	0.00
		3	6.20	0.00
	Sk	1	0.00	0.00
		2	0.00	0.00
		3	0.00	0.00
	Sy	1	7.20	7.50
		2	5.40	5.30

		3	6.10	5.60
Sk	Re	1	0.00	0.00
		2	0.00	0.00
		3	0.00	5.20
	Sc	1	0.00	0.00
		2	0.00	0.00
		3	0.00	0.00
	Sr2	1	0.00	0.00
		2	0.00	0.00
		3	0.00	5.10
	Ss	1	0.00	0.00
		2	6.70	7.85
		3	6.75	0.00
	Sy	1	6.10	5.60
		2	5.15	6.40
		3	5.50	5.10
Sy	Re	1	0.00	0.00
		2	0.00	0.00
		3	5.75	5.20
	Sc	1	0.00	0.00
		2	0.00	0.00
		3	0.00	0.00
	Sr2	1	0.00	0.00
		2	0.00	0.00
		3	0.00	0.00
	Ss	1	5.60	0.00
		2	0.00	0.00
		3	5.40	5.10
	Sk	1	5.10	5.30
		2	0.00	0.00
		3	5.95	6.20

Elaborado por: **Guevara 2010**