



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

PREVIO A LA OBTENCIÓN DE GRADO ACADÉMICO O TÍTULO DE
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: PAMELA ESTEFANÍA CARTUCHE CUVI

TEMA: “OBTENCIÓN DE UN INOCULANTE BACTERIANO A PARTIR DE
MICROORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE HIERRO AISLADOS DEL SUELO DE
CULTIVOS DE BANANO EN LA PROVINCIA DE EL ORO – ECUADOR.

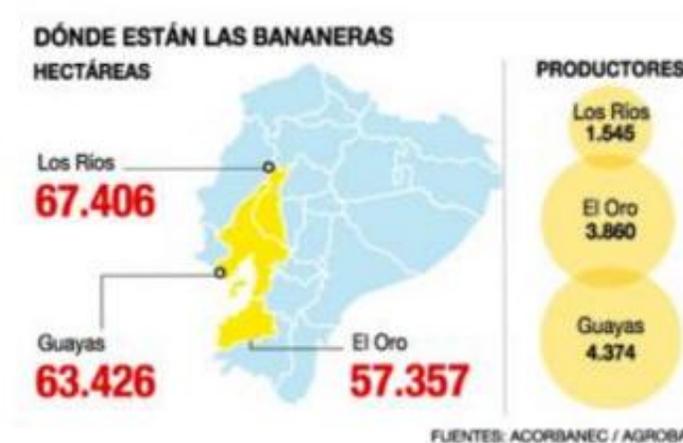
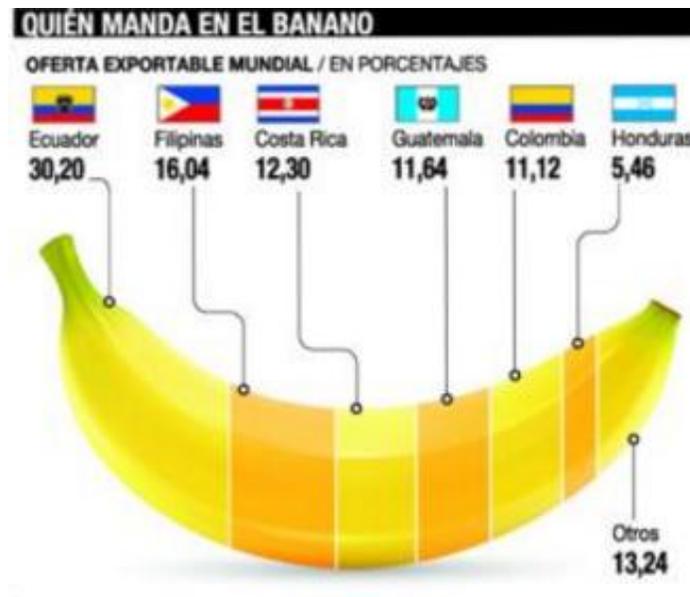
DIRECTOR: MC. ALMA KOCH.



JUSTIFICACIÓN



Cultivo de banano.
El Oro - Ecuador



(Arcobanec, 2014)

30% de la oferta mundial proviene del Ecuador
10% de exportación total del Ecuador

Pro Ecuador, (2013)

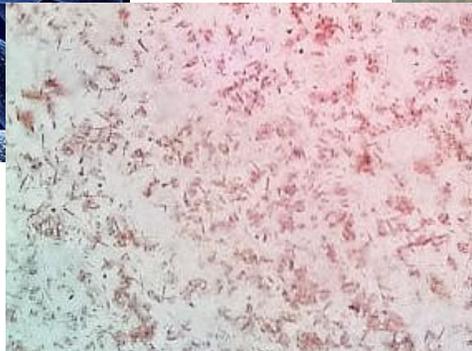
METEORIZACIÓN

↓
Aluvión →



Necrosis marginal

Medina, (2006)



INOCULANTE BACTERIANO

OBJETIVOS

Objetivo General:

- Obtener un inoculante bacteriano a partir de microorganismos solubilizadores de hierro aislados del suelo de cultivos de Banano (*Musa paradisiaca*) en la provincia de El Oro - Ecuador.

Objetivos Específicos:

- Modificar un medio de cultivo selectivo para el aislamiento de microorganismos solubilizadores de hierro.
- Aislar en el medio de cultivo específico microorganismos hierro solubilizadores con un alto grado de eficiencia.
- Determinar las cepas con mayor capacidad de solubilizar el hierro en suelos de cultivo de banano por medio de pruebas de antagonismo.
- Identificar a través de pruebas bioquímicas las cepas compatibles para la solubilización de hierro.
- Realizar un cepario que sea fuente de otras investigaciones y para la elaboración de un biofertilizante.
- Escalar a un volumen de 1 litro las cepas hierro solubilizadoras, con la finalidad de determinar su tiempo de vida celular.

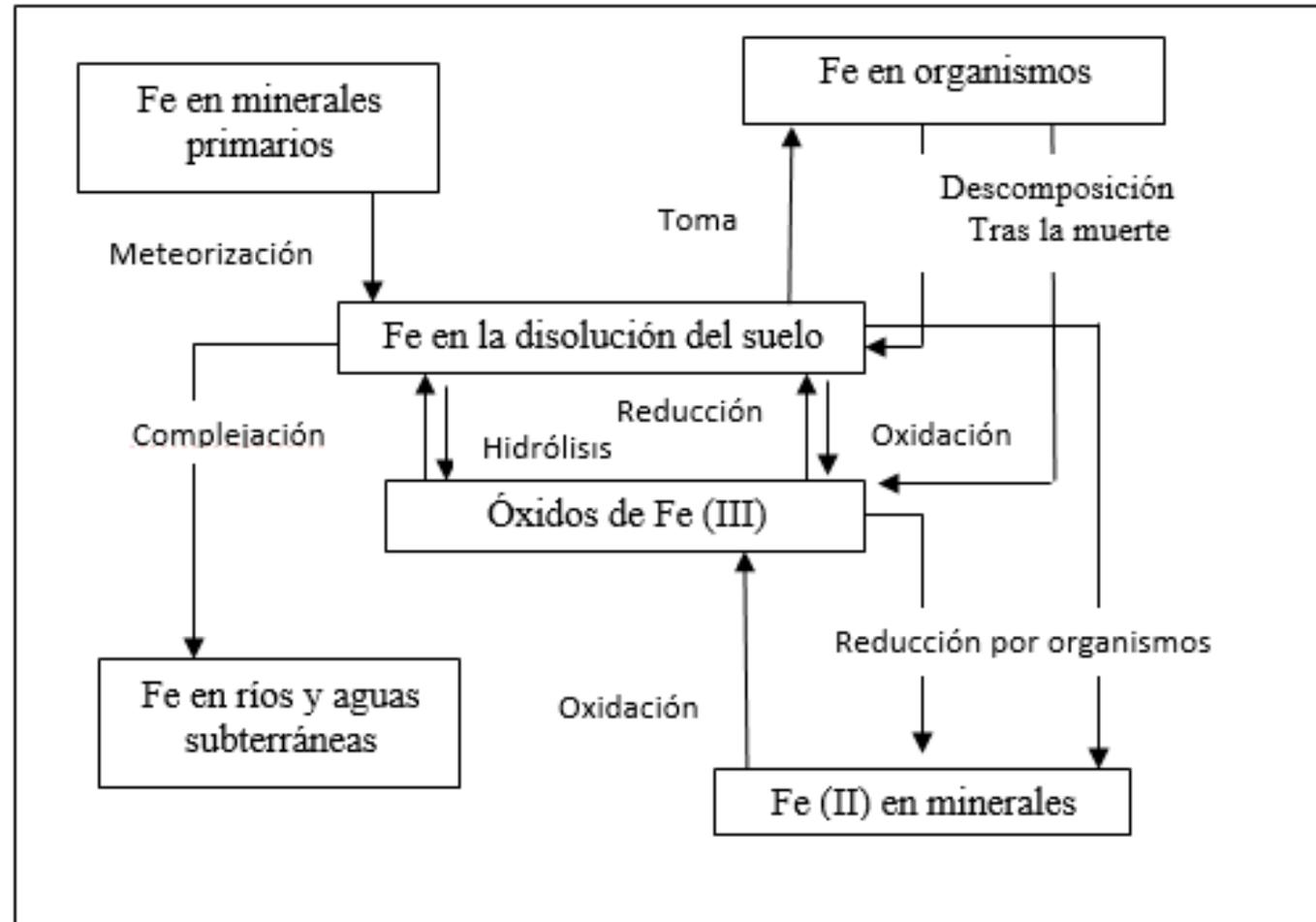
HIPÓTESIS

- Es posible aislar microorganismos solubilizadores de hierro a partir de muestras de suelo de cultivo de Banano (*Musa paradisiaca*) en la Provincia de El Oro – Ecuador.

INTRODUCCIÓN

IMPORTANCIA DEL HIERRO EN EL SUELO





Ciclo del hierro en el suelo (Murad y Fischer, 1998).

Microorganismos utilizan los óxidos de Fe^{3+} como aceptores finales de electrones para realizar la descomposición oxidativa de la materia orgánica, lo que da lugar a la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+}



Necrosis marginal

TOXICIDAD POR HIERRO

Interferencia en
síntesis de
proteínas



Falta de otros
nutrientes

Transformaciones mediadas por microorganismos

Biolixiviación:
Thiobacillus ferrooxidans

Biosorción:
Microorganismos nativos

Bioacumulación:
Pseudomonas aeruginosa

Biom mineralización:
Bacterias reductoras de
sulfato

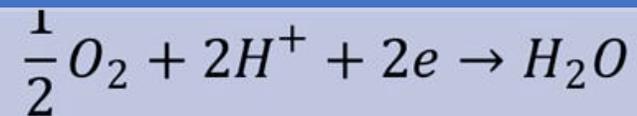
Biotransformación:
Pseudomonas aeruginosa

Microorganismos solubilizadores de hierro

Bacterias quimiolitotróficas



Bacterias oxidadoras a pH ácido de 2,0 – 2,5 (*Thiobacillus*,
ferrooxidans)



INOCULANTES BACTERIANOS

Agricultura orgánica: Biofertilizantes



Evitan putrefacción y mejoran la eficacia del uso de la materia orgánica



Realza la salud de los agro ecosistemas

BANANO



Musa paradisiaca



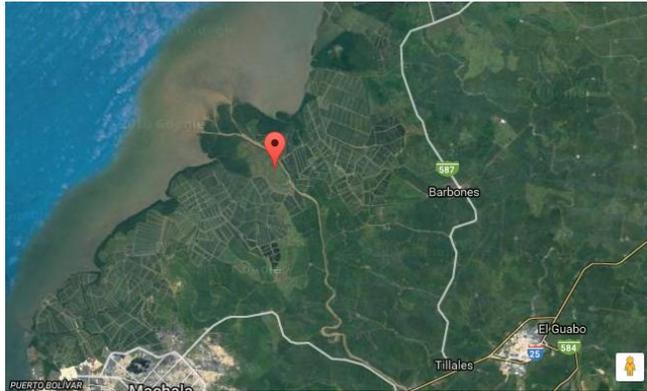
Gros Michel, Cavendish

(Rodríguez, 2009).

MATERIALES Y MÉTODOS

Fase de Campo

Sector de Borbones El Oro - Ecuador



Diluciones seriadas

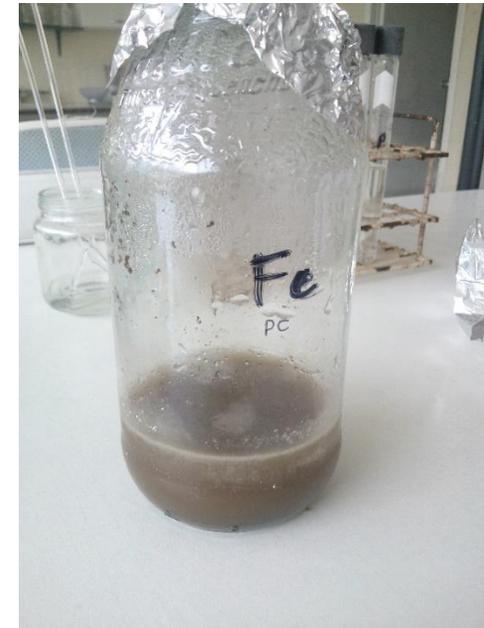
Fase de Laboratorio



90 mL de agua
peptonada estéril al
0.1%



10 g de muestra de suelo



Dilución 10^{-1}

Andrade & Gordillo (2008)

Fase de Laboratorio



1 mL de la
dilución 10^{-1}



9 mL de agua
peptonada estéril al
0,1%

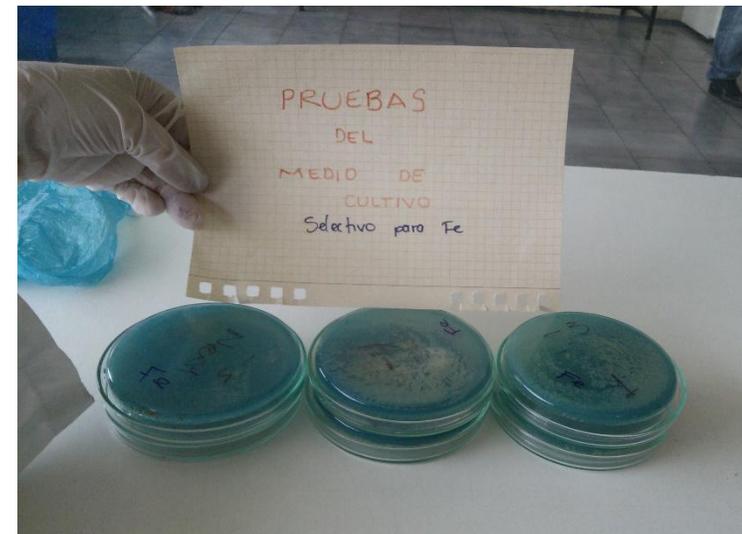
Aislamiento de microorganismos solubilizadores de hierro en medio específico

Medio Pikovskaya
modificado para hierro



Sulfato ferroso 33%

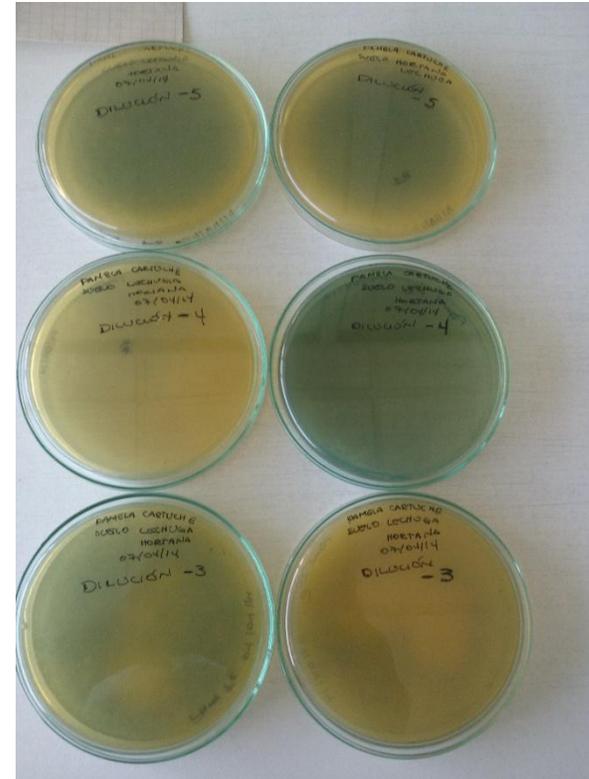
Período de incubación de un agente oxidante es de 24 h – 48 h, mientras que con otros medios puede ser superior a siete días



Fase de Laboratorio



Incubación 35°C
durante 24 h



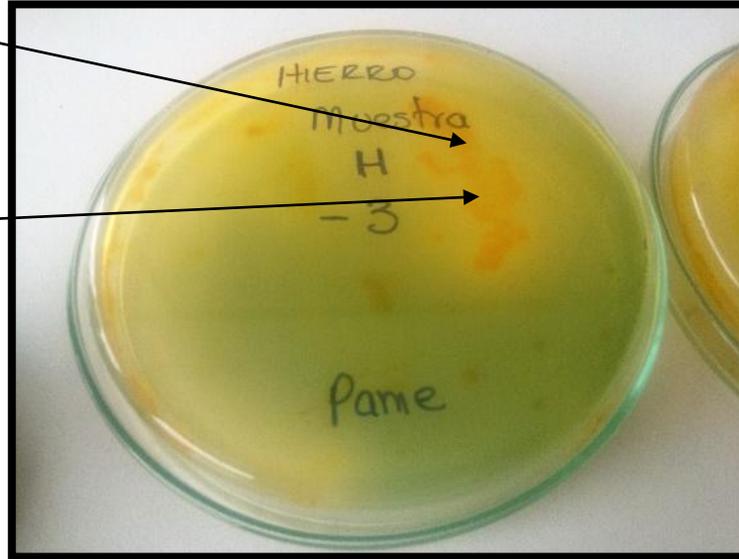
Siembra en Pikovskaya
Dilución 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}

Identificación macroscópica

Fase de Laboratorio

Coloración

Viraje



Codificación:

H 1

Donde:

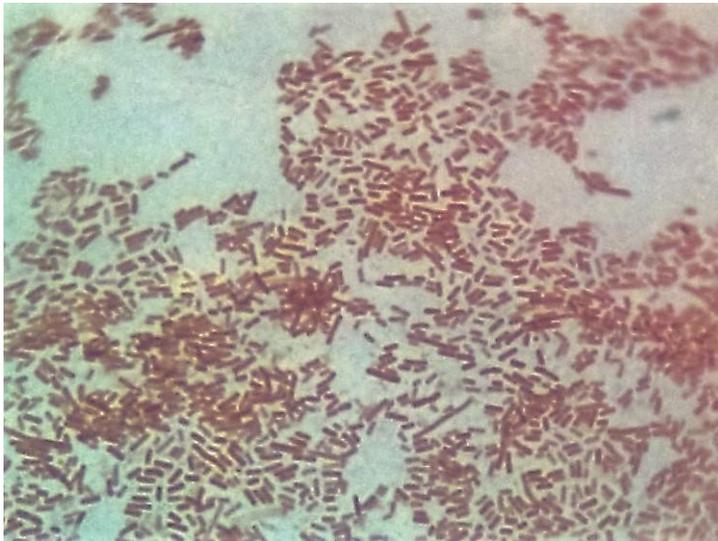
Letra = Nombre de la muestra.

Número = Número de dilución de donde fue obtenida la cepa.

Se trabajó con las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} por tener mejor crecimiento, en donde:

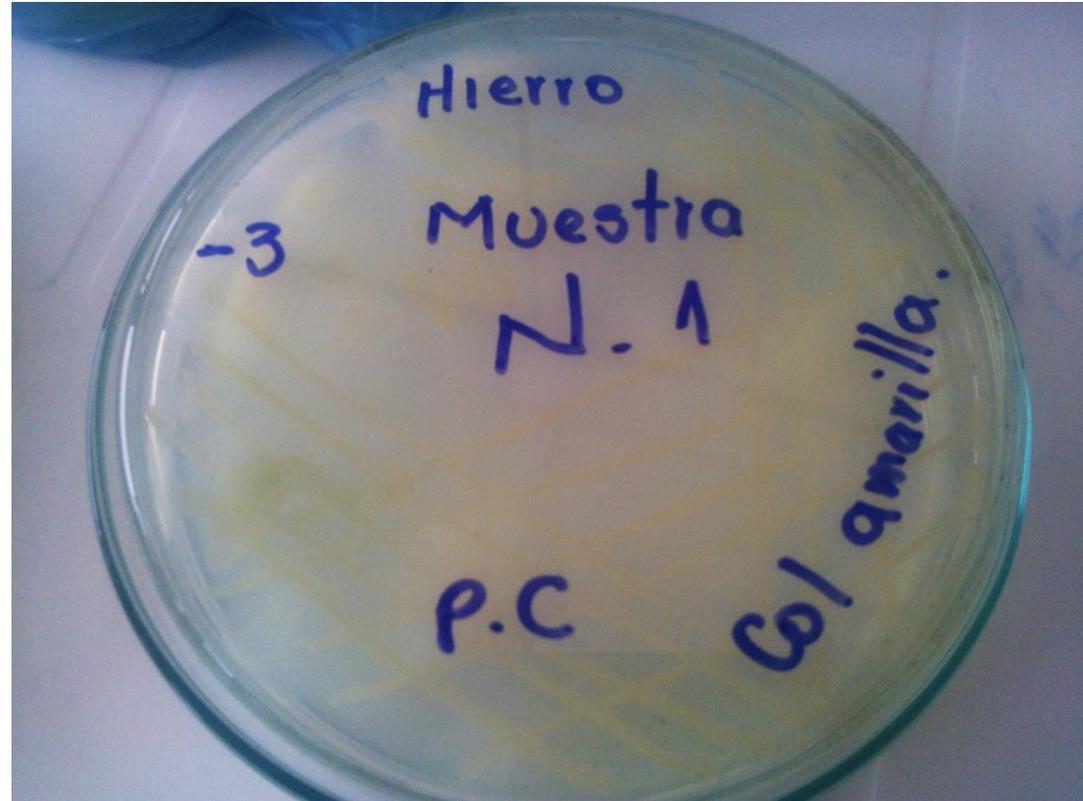
- 1 corresponde a la disolución 10^{-3} y 2 a la 10^{-4}

Tinción Gram



100X

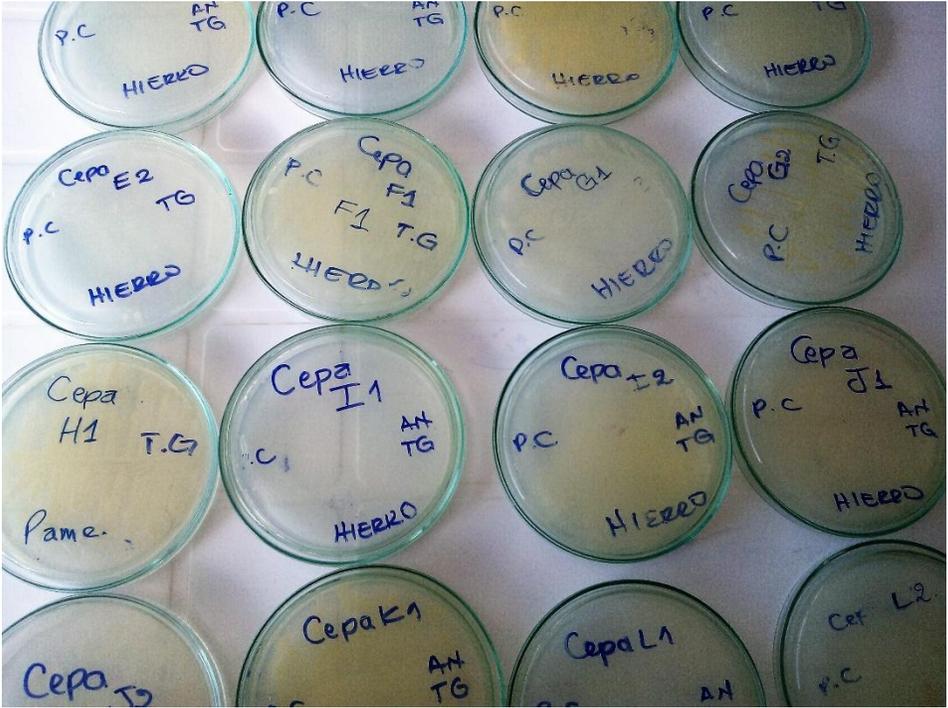
Bacilos Gram negativos



Crecimiento en medio agar nutriente

Aislamiento en cultivo puro (Agar nutriente)

Fase de Laboratorio



Elaboración de cepario

Inoculación Cepas Gram Negativas



Incubación
24 h



+ 30% de glicerina estéril

70% caldo nutritivo estéril



10 viales/cepa con 1 mL
de solución

Agrodiagnostic S.A

Fase de Laboratorio

Antagonismo

Activación de cepario a °T ambiente
15 – 20 min

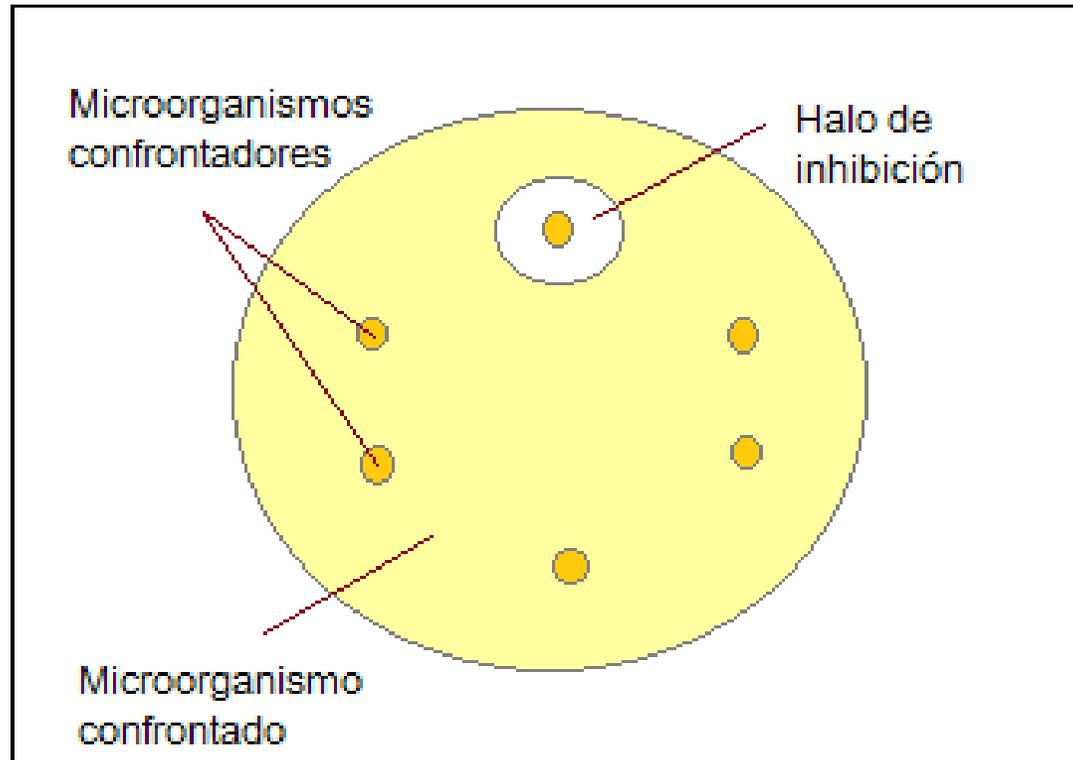
Las cepas se sembraron en agar nutriente
Incubación durante 24 h

Inoculación de las cepas en tubos de ensayo con caldo nutriente

Incubación durante 24 h



Fase de Laboratorio



Incubación



24 h
35 ° C.

Medición del diámetro
de halos de inhibición.

Identificación Bioquímica

Fase de Laboratorio

PRUEBA BIOQUIMICA	RESULTADO
TSI	A/A
GAS	NEGATIVO
H ₂ S	NEGATIVO
INDOL	NEGATIVO
UREA	NEGATIVO
CITRATO	NEGATIVO
MOTILIDAD	POSITIVO
ROJO DE METILO	NEGATIVO
VOGES PROSKAUER	POSITIVO
OXIDASA	POSITIVO
CATALASA	POSITIVO

(Khan, Haq, Hasan, & Saeed, 2012)

Escalamiento

Fase de Laboratorio

Bacterias solubilizadoras de
hierro

Activación de las cepas

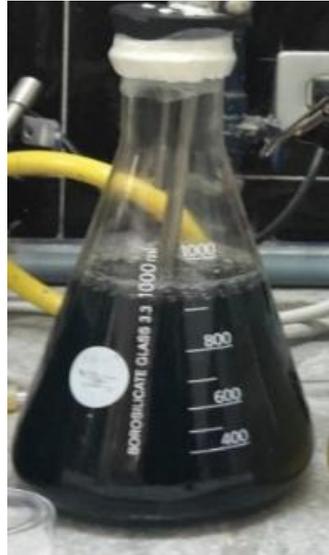
Pre – inóculo 2%.
20 mL de medio Pikovskaya
0,4 mL/cepa



Agrodiagnostic S.A

Fase de Laboratorio

Pre - inóculo



1 L de medio Pikovskaya
modificado hierro.

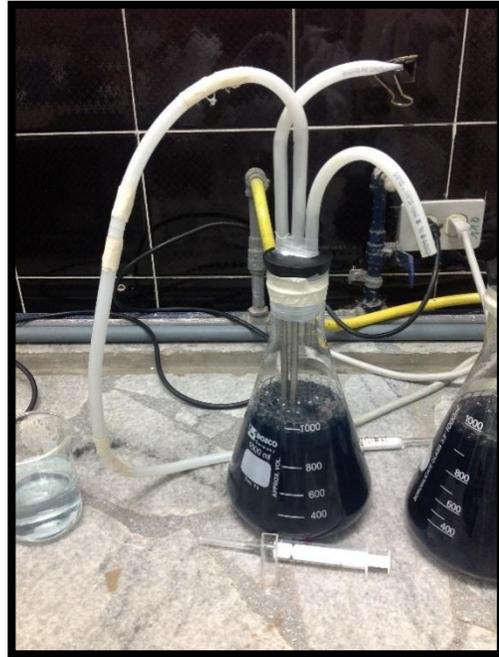


Calibración del espectrofotómetro a 650 nm

Medición de absorbancia del Patrón

Escalamiento

Fase de Laboratorio



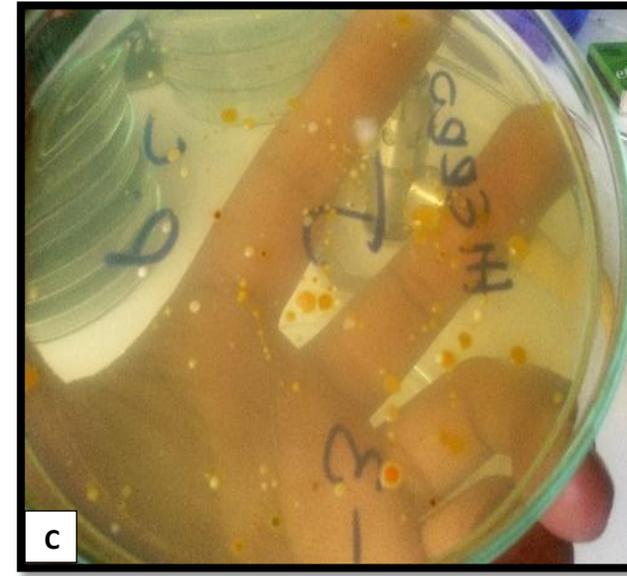
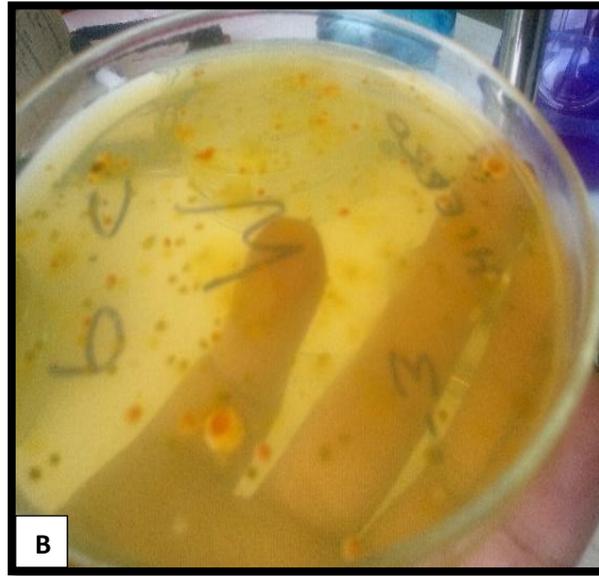
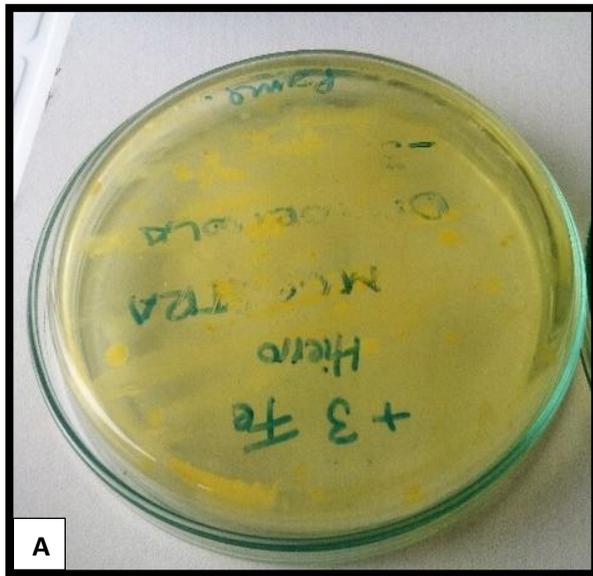
Medición absorbancia
Medio con pre - inóculo



Toma medidas
pH y temperatura

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

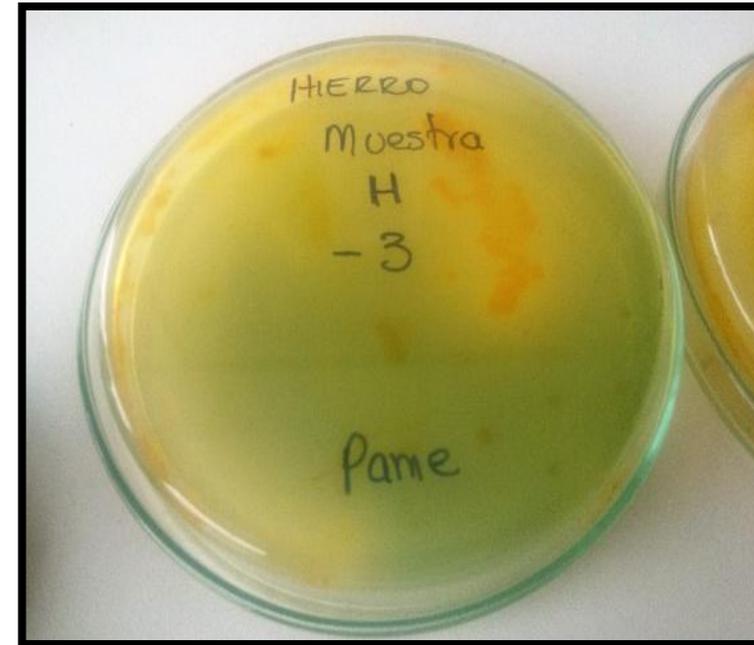
Aislamiento de microorganismos solubilizadores de hierro en medio Pikovskaya modificado hierro



20 cepas fueron seleccionadas según color de la cepa
A) amarillas, B) naranjas y C) blancas

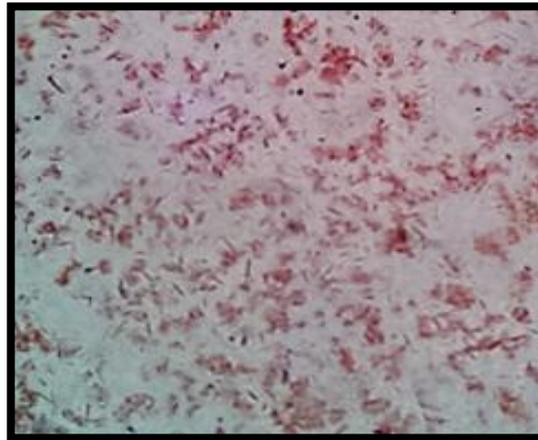
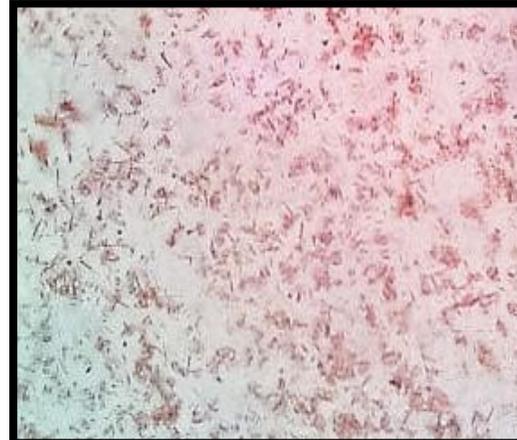
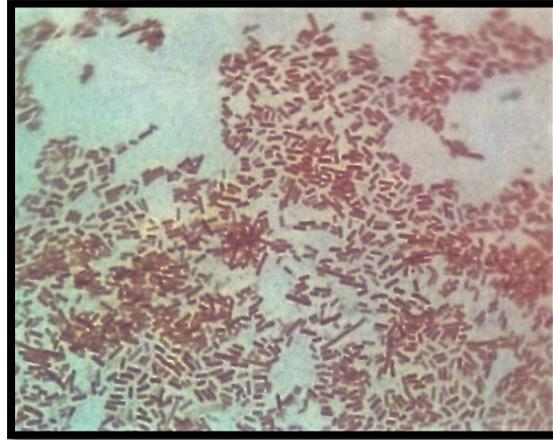
COLOR DE CEPA	CANTIDAD	PORCENTAJE
AMARILLO	10	38.5
NARANJA	10	38.5
BLANCO	6	23.0
TOTAL CEPAS	26	100

Porcentaje de cepas asiladas según su color de crecimiento en medio Pikovskaya modificado para hierro.



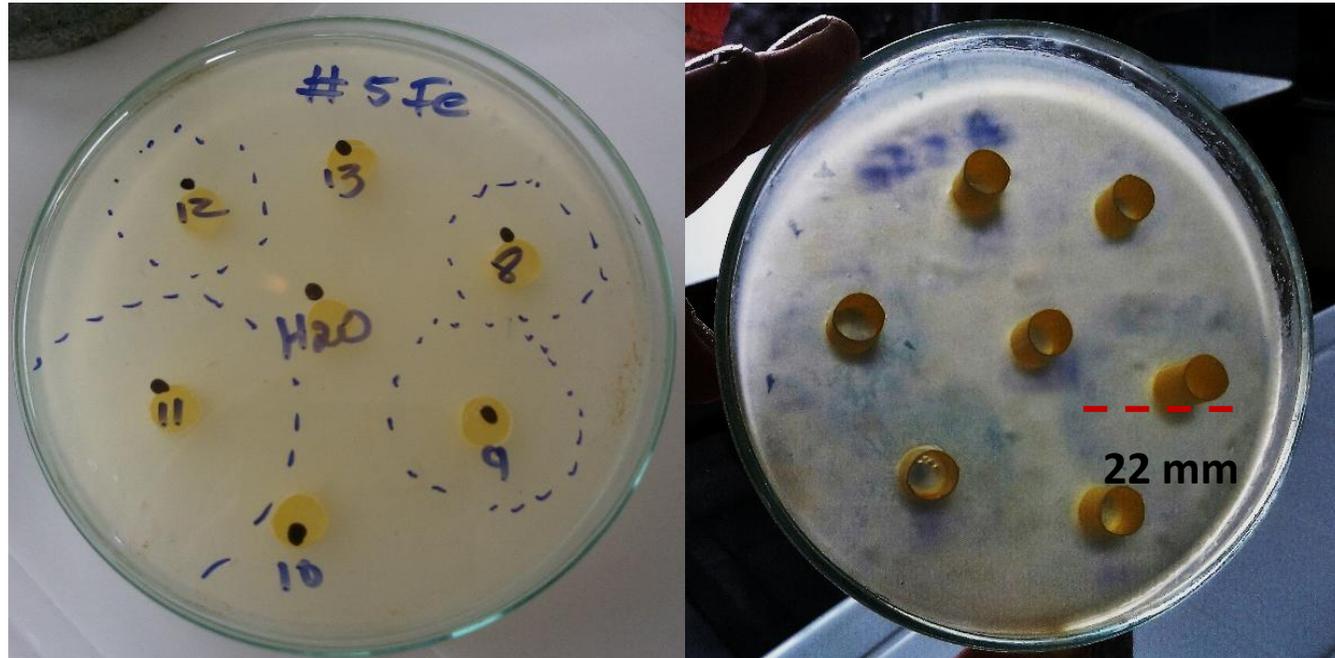
Viraje del medio Pikovskaya modificado de verde a amarillo.

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA



Observación microscópica de bacilos Gram negativos no esporulados aislados en agar nutriente (100x).

ANTAGONISMO



Cepas compatibles y antagónicas, mediante la medición del diámetro del halo de inhibición

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	PR > F
CEPA A	19	5418,38	285,17	7,00	< 0,0001
CEPA B	19	5117,08	269,32	6,57	< 0,0001
ERROR	1120	45909,57	40,99		
TOTAL	1139	51026,66			
CORREGIDO					

ANOVA altamente significativo Pr valor <0,0001

Análisis de varianza de las cepas enfrentadas a pruebas de antagonismo.

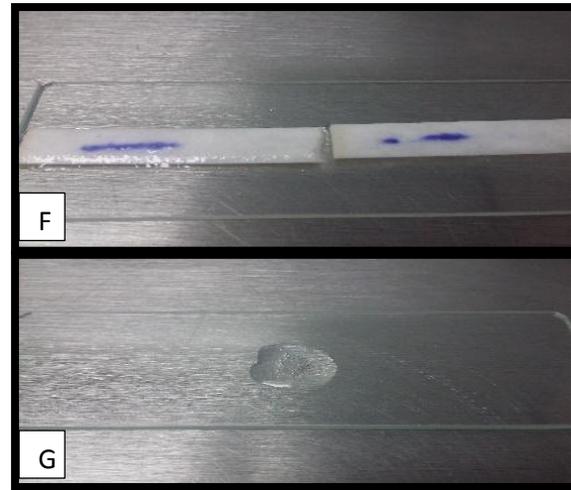
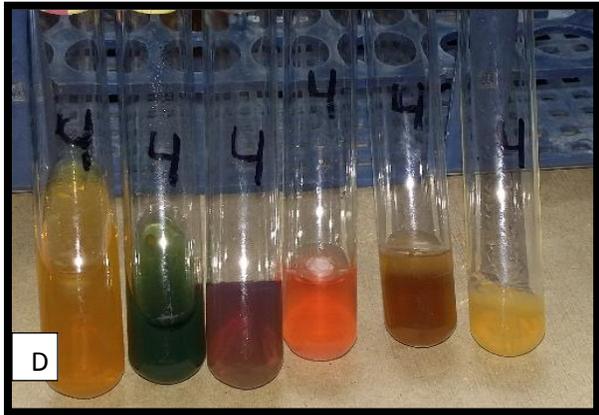
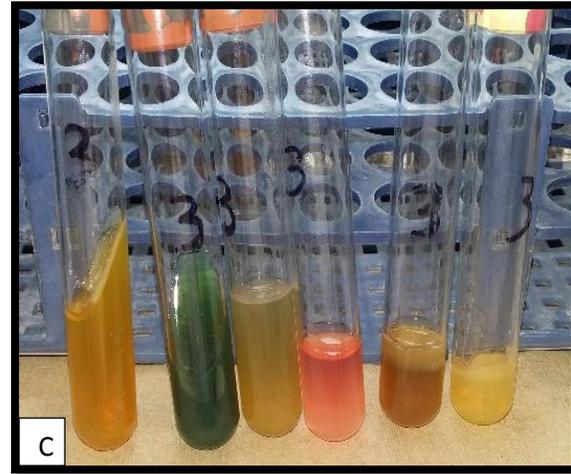
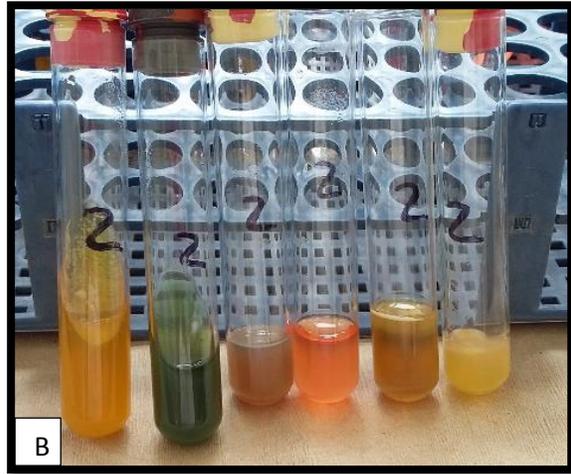
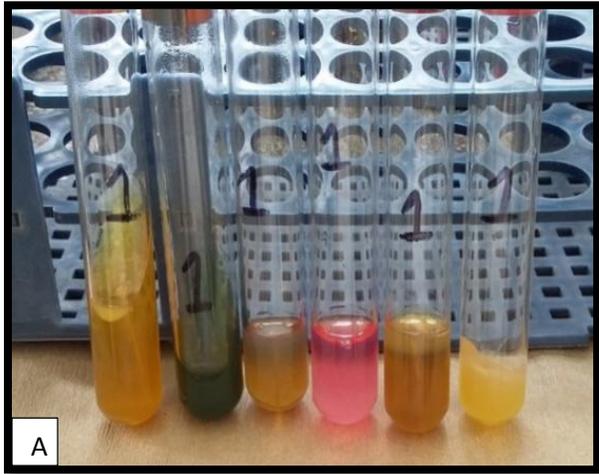
Categoría	Medias LS	Grupos			
CEPA D1	8,930	A			
CEPA D2	8,825	A			
CEPA G1	8,825	A			
CEPA L1	8,754	A			
CEPA M1	8,175	A			
CEPA M2	7,860	A			
CEPA F1	7,754	A			
CEPA A2	7,421	A			
CEPA L2	7,018	A	B		
CEPA H1	6,930	A	B		
CEPA K1	6,105	A	B	C	
CEPA I2	4,509		B	C	D
CEPA G2	4,386			C	D
CEPA J1	4,158			C	D
CEPA N1	3,895			C	D
CEPA J2	3,860			C	D
CEPA E1	3,667				D
CEPA E2	3,649				D
CEPA O2	3,421				D
CEPA O1	3,228				D

Test de Duncan al 5%, pruebas de antagonismo de las cepas solubilizadoras de hierro.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

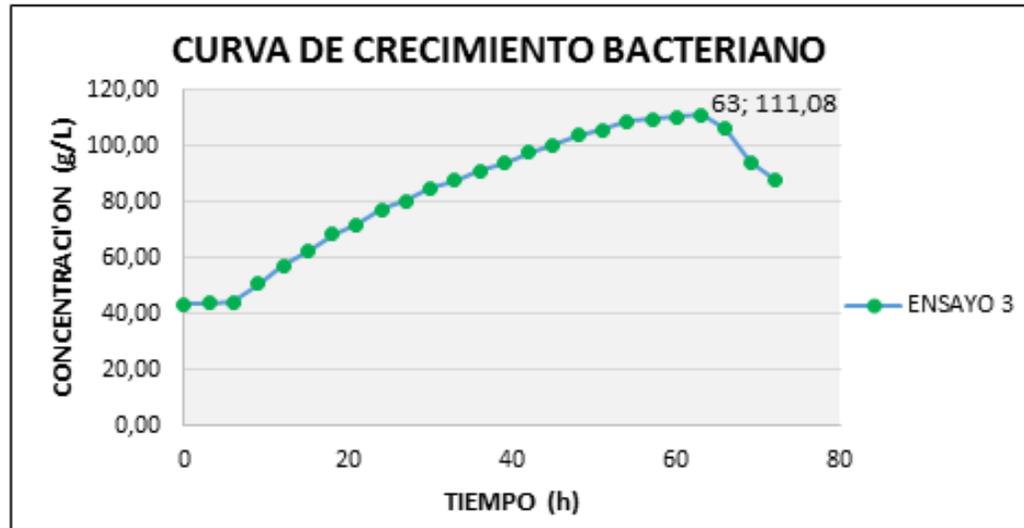
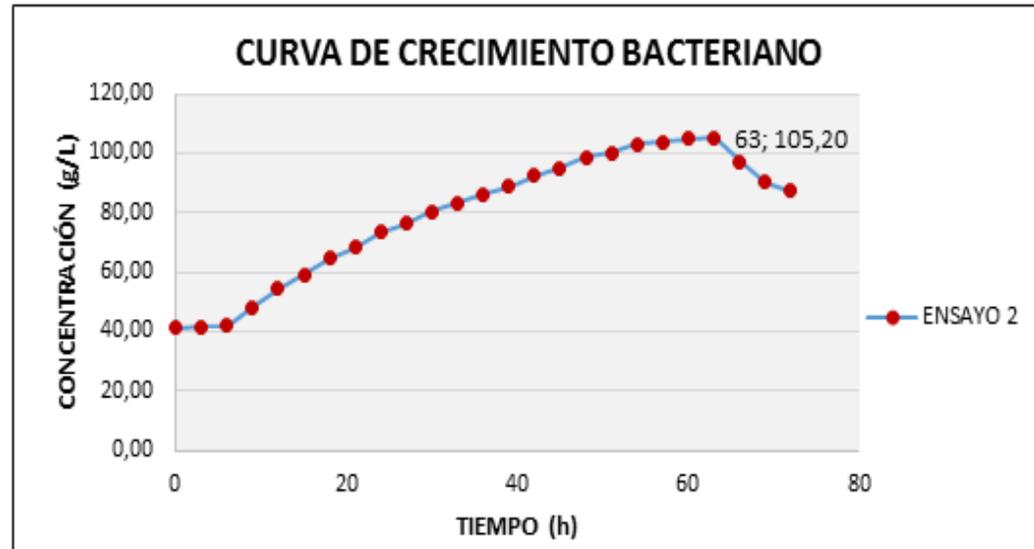
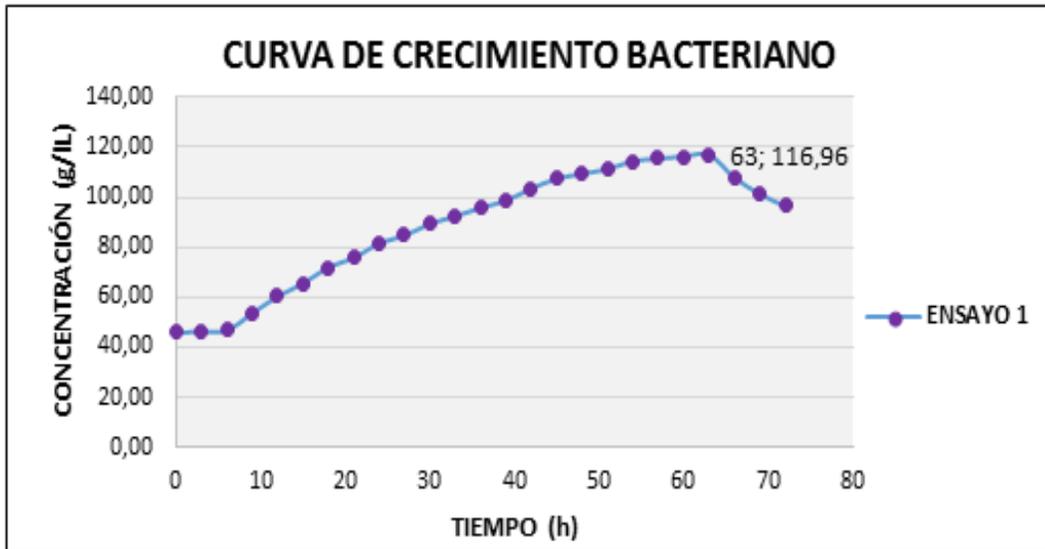
CEPA	TSI		GAS	H2S	CITRATO	INDOL	MOTILIDAD	UREA	VOGES PROSKAUER	ROJO DE METILO	OXIDASA	CATALASA
	PICO	FONDO										
CLAVE	A	A	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
E1	A	A	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
E2	A	A	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
G2	K	K	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+
I2	A	A	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
J1	K	K	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+
J2	A	A	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
L2	A	A	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
N1	A	A	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
O1	A	A	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
O2	A	K	+	-	-	-	+/-	+	+	-	-	+

Resultado de las pruebas bioquímicas de las cepas no antagónicas.

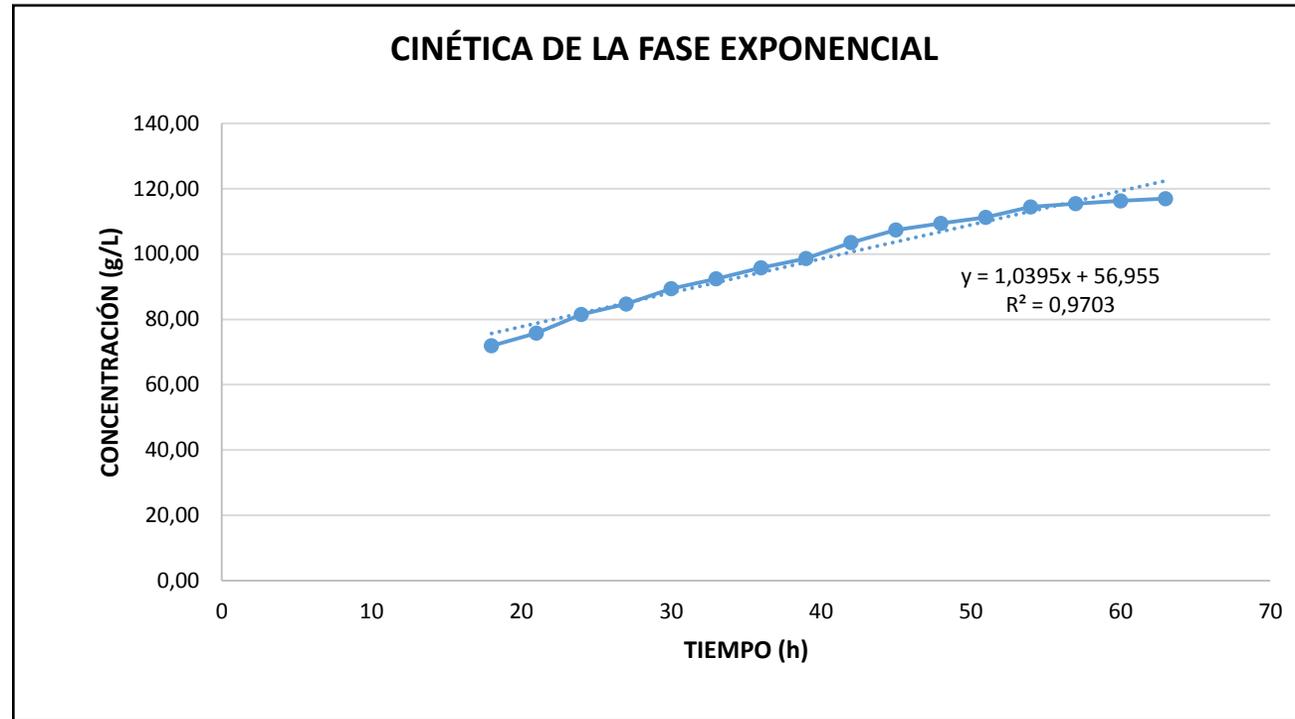


Pruebas bioquímicas de *Thiobacillus ferrooxidans* para las cepas A) E1, B) E2, C) I2, D) N1, E) O1, F) Reacción oxidasa y G) Reacción catalasa

ESCALAMIENTO



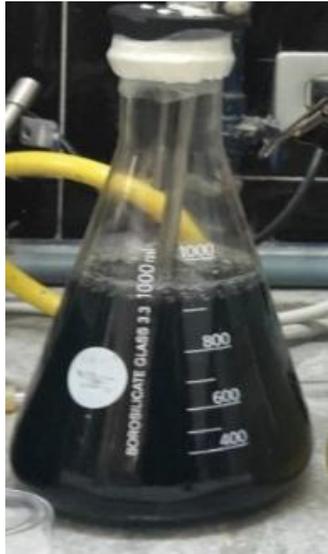
Curvas de crecimiento bacteriano de los tres ensayos realizados, número de bacterias vs tiempo.



Línea de tendencia para *Thiobacillus ferrooxidans* en la fase de crecimiento exponencial.

Parámetro	Valores	Fórmula
Velocidad	1.0395 g/h	Pendiente línea de tendencia
Generación	0.96 h	Velocidad ⁻¹

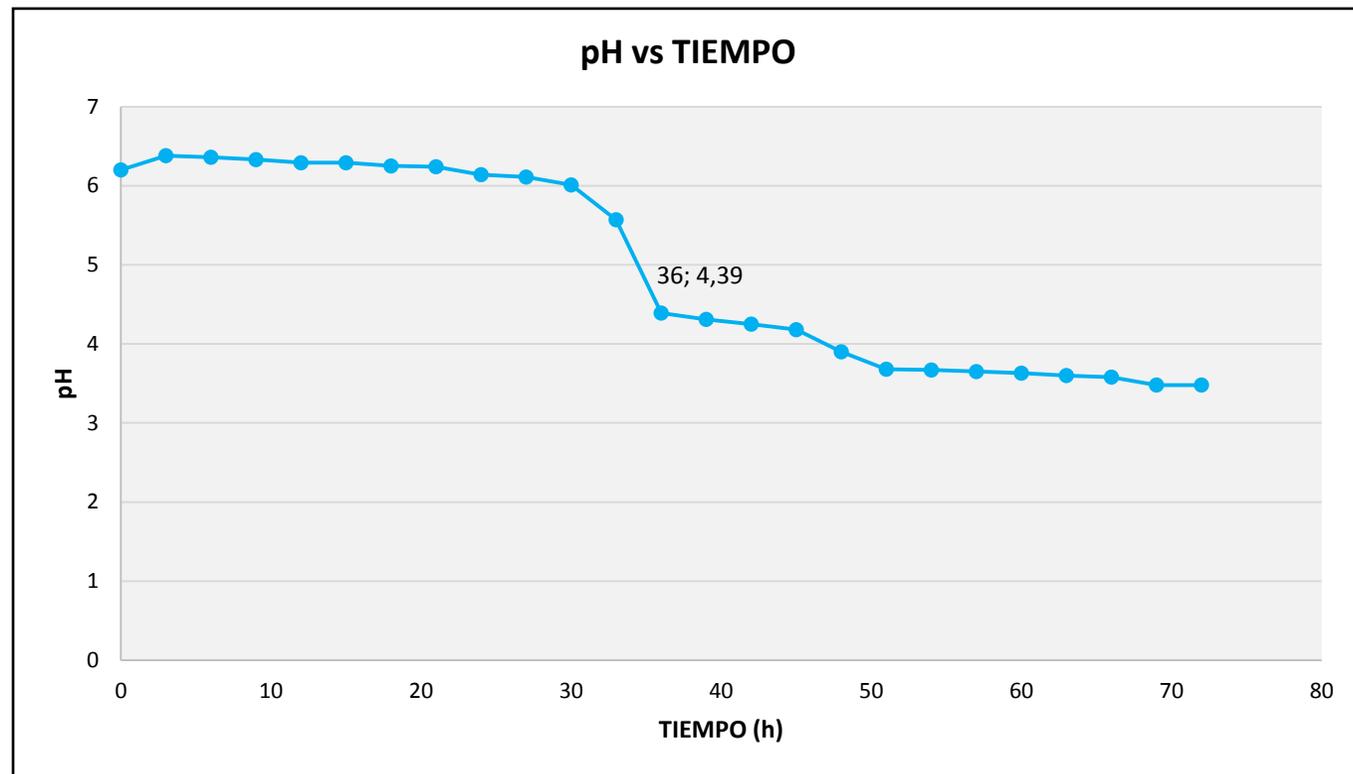
Parámetros cinéticos de la fase exponencial.



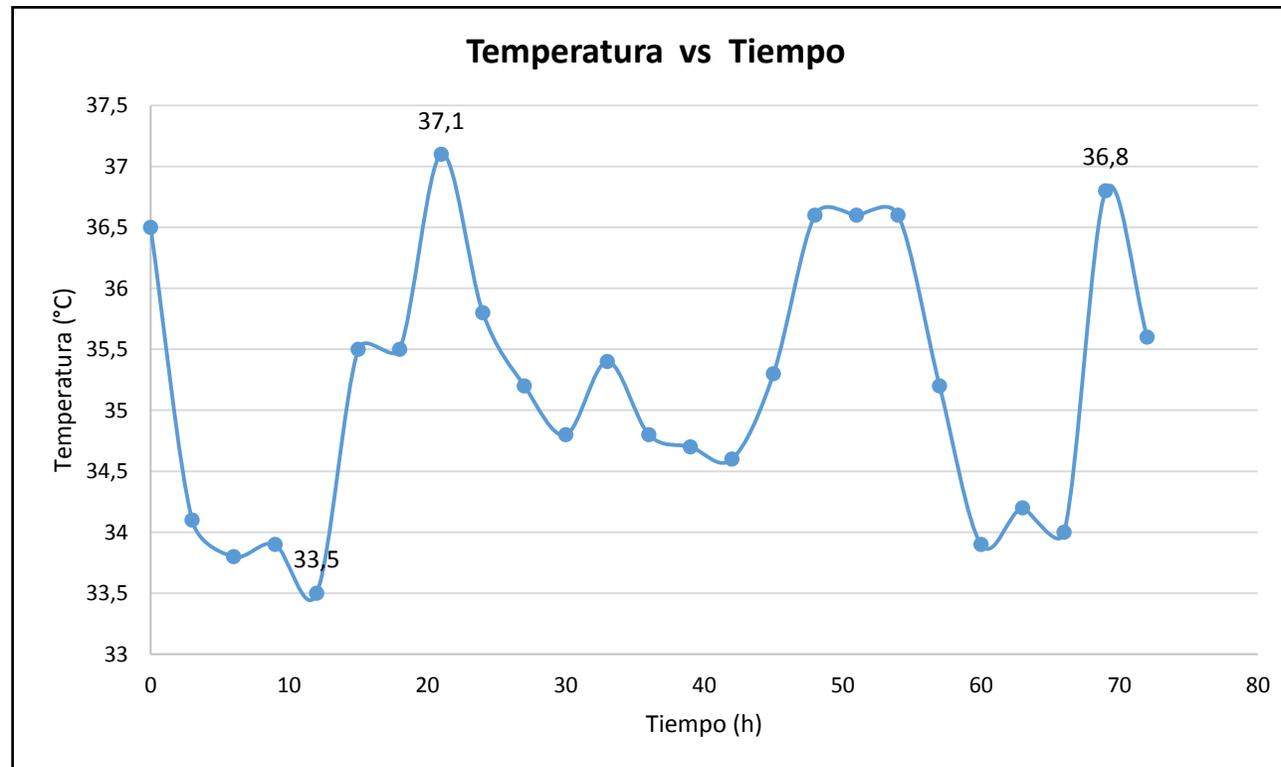
36 h



Viraje del medio de verde a amarillo



Curva de pH vs tiempo en el transcurso de 72 h de incubación.



Curva de pH vs temperatura en el transcurso de 72 h de incubación.

CONCLUSIONES

- Se obtuvo cinco cepas correspondientes a la especie *Thiobacillus ferrooxidans*, dos fueron *Pseudomonas sp.*, y tres *Thiobacillus thiooxidans*, pertenecientes a la microflora de suelos de cultivos de banano del sector de Borbones en la provincia de El Oro.
- Durante el escalamiento se determinó la curva de crecimiento y se evidenció viraje del medio a las 36 horas debido a la disminución de pH a 4.39, pH en el cual las bacterias *Thiobacillus ferrooxidans* pueden reproducirse; con un punto máximo de crecimiento a las 66 horas a un pH de 3.48.

CONCLUSIONES

- La cinética exponencial en el proceso de fermentación arrojó una velocidad de crecimiento microbiano $k=1.0395$ g/h, con un tiempo de generación $g =0.96$ horas, que es el tiempo aproximado de duplicación de las bacterias del género *Thiobacillus ferrooxidans*.
- El inoculante se elaboró con cinco cepas de *Thiobacillus ferrooxidans*. El inoculante está listo para ser utilizado para pruebas de laboratorio y de campo.

RECOMENDACIONES

- Hacer un estudio de la remoción de hierro mediado por *Thiobacillus ferrooxidans* en el suelo de cultivo de banano en el sector de Borbones evaluando su capacidad de biosolubilización de hierro.
- Realizar la caracterización molecular de las cepas aisladas de *Thiobacillus ferrooxidans* para obtener datos más exactos para una comprobación de la identificación de los microorganismos aislados.

RECOMENDACIONES

- Elaborar pruebas de invernadero y de campo para comprobar la capacidad de solubilización de hierro del inoculante en plantaciones de banano y determinar la cantidad de inoculante que deberá a ser usada en el cultivo.

AGRADECIMIENTO



AGRODIAGNOSTIC®
Soluciones Biológicas Agro-Ambientales.

