

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE
MICROORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE POTASIO
A PARTIR DE MUESTRAS DE SUELO Y RAÍCES DE
CULTIVOS DE ALCACHOFA DE LA LOCALIDAD DE LA
REMONTA, CANTÓN CAYAMBE**

Previa la obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

MARÍA FERNANDA GUEVARA GRANJA

SANGOLQUÍ, 25 de Junio del 2010

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

María Fernanda Guevara Granja

DIRECTOR DE LA CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Ing. Rafael Vargas

SECRETARIO ACADÉMICO

Abg. Vanessa Andrade

Sangolquí, 25 de Junio del 2010.

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. MARÍA FERNANDA GUEVARA GRANJA como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA.

Sangolquí, 25 de Junio del 2010

Dra. Patricia Jiménez
Directora

Ing. Marco Taípe
Codirector

DEDICATORIA

De manera especial este trabajo va dedicado a mis padres, por ser mi fortaleza y mi guía siempre. A mis hermanos y hermana, quienes son mi apoyo constante. Con su amor mi familia ha hecho de mí quien soy, con mis principios, valores, sueños y destrezas.

MARÍA FERNANDA GUEVARA GRANJA

AGRADECIMIENTO

Principalmente quiero agradecer a Dios, por permitirme cursar esta gran etapa en mi vida.

A mi familia, por toda su ayuda brindada a lo largo de mi carrera, por su motivación y aliento.

A los laboratorios Agrodiagnostic, pilares fundamentales de esta investigación. A la Máster Karla Garcés, Lili, Majo y Marquito, gracias por su ayuda y patrocinio.

A todos los profesores de la ESPE que han despejado mis dudas a lo largo de este estudio, en especial a la Doctora Patricia Jiménez A. y al Ingeniero Marco Taipe, quienes han guiado el proceso. Gracias por sus orientaciones y conocimientos compartidos.

Al Ingeniero Francisco Noboa, asesor agrícola de Inaexpo Pronaca, por toda la colaboración prestada.

A mis compañeros y a mis amigos de la Facultad, que han hecho de mi paso por esta Escuela una experiencia inolvidable. A todos quienes han estado a mi lado en épocas de risas y en momentos de lágrimas.

MARÍA FERNANDA GUEVARA GRANJA

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Hoja de Legalización de Firmas	ii
Certificación	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimiento	v
Índice de Contenidos	vi
Listado de Tablas	ix
Listado de Figuras	xi
Listado de Anexos	xii
Resumen	xiii
Abstract	xiv
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del problema	1
1.2 Justificación del problema	2
1.3 Objetivos de la investigación	4
1.3.1 Objetivo General	4
1.3.2 Objetivos Específicos	5
1.4 Marco Teórico	5
1.4.1 Importancia del Potasio	5
1.4.2 Rizosfera y Comunidad Microbiana	14
1.4.3 Microorganismos Solubilizadores de Potasio	16
1.4.4 Agricultura y Microorganismos	19
1.4.5 Biofertilizantes	21
1.4.6 Alcachofa	22
1.4.7 Técnicas Microbiológicas	25
1.5 Hipótesis	30
Capítulo 2. MATERIALES Y MÉTODOS	31
2.1 Participantes	31
2.2 Fase de Campo	31
2.2.1 Área de Muestreo	31

2.2.2 Fase de Recolección de Muestras de Suelo de Cultivo de Alcachofa	32
2.2.3 Fase de Recolección de Muestras de Raíz de Alcachofa	33
2.3 Fase de Laboratorio	34
2.3.1 Aislamiento de Microorganismos Solubilizadores de Potasio a partir de las Muestras de Suelo por Dilución Seriada	34
2.3.2 Aislamiento de Microorganismos Solubilizadores de Potasio a partir de las Muestras de Raíz	35
2.3.3 Medio utilizado para Aislamiento	36
2.3.4 Evaluación de la Actividad Solubilizadora de las Cepas Aisladas	37
2.3.5 Identificación de las Cepas Previamente Aisladas	38
2.3.6 Establecimiento del Cepario	39
2.3.7 Desarrollo de las pruebas de antagonismo	39
2.4 Análisis de Datos	41
Capítulo 3. RESULTADOS	42
3.1 Aislamiento	42
3.2 Evaluación de la Actividad Solubilizadora	42
3.3 Identificación de las Cepas con Mejores Características Solubilizadoras ..	50
3.4 Pruebas de Antagonismo	53
Capítulo 4. DISCUSIÓN	56
4.1 Aislamiento	56
4.2 Actividad Solubilizadora	57
4.3 Identificación de las Cepas con Mejores Características Solubilizadoras ..	59
4.4 Pruebas de Antagonismo	60
4.5 Cepario.....	61
Capítulo 5. CONCLUSIONES	63
Capítulo 6. RECOMENDACIONES.....	65
Capítulo 7. BIBLIOGRAFÍA	67

ANEXOS	80
---------------------	----

LISTADO DE TABLAS

TABLA 3.1 Análisis de Varianza para las pruebas de solubilización a las 24 horas de incubación	43
TABLA 3.2 Prueba de rangos múltiples de Duncan para la variable halo de solubilización, medido en mm, a las 24 horas de incubación.....	44
TABLA 3.3 Análisis de Varianza para las pruebas de solubilización a las 48 horas de incubación.	45
TABLA 3.4 Prueba de rangos múltiples de Duncan para la variable halo de solubilización, medido en mm, a las 48 horas de incubación	46
TABLA 3.5 Datos estadísticos descriptivos de los diámetros de halos de solubilización, medidos en mm, para 24 y 48 horas de incubación	47
TABLA 3.6 Tabla de contingencia para la Capacidad Solubilizadora a las 24 horas de incubación, en relación a la procedencia de la muestra.....	47
TABLA 3.7 Tabla de contingencia para la Capacidad Solubilizadora a las 48 horas de incubación, en relación a la procedencia de la muestra	48
TABLA 3.8 Cepas aisladas que presentan las mejores características de solubilización de potasio, con los promedios respectivos del halo de solubilización en mm y su procedencia.....	49
TABLA 3.9 Forma y reacción a la tinción Gram de las bacterias con mejores características solubilizadoras de potasio	50
TABLA 3.10 Características de las colonias formadas por las bacterias con mejores características solubilizadoras de potasio	51

TABLA 3.11 Tabla de contingencia para la morfología de las colonias, en relación a su tamaño.....	51
TABLA 3.12 Resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas a las cepas de interés	52
TABLA 3.13 Géneros de las bacterias seleccionadas con las mejores características solubilizadoras de potasio, con su respectivo código de aislamiento	53
TABLA 3.14 Datos estadísticos descriptivos de los diámetros de largo y ancho de halos de inhibición, medidos en mm	53
TABLA 3.15 Datos estadísticos descriptivos de los diámetros de halos de inhibición, sin contar con el diámetro del contenedor, medidos en mm	54
TABLA 3.16 Análisis de Varianza para las pruebas de antagonismo	54
TABLA 3.17 Prueba de rangos múltiples de Duncan para la variable halo de antagonismo, medido en mm.....	54

LISTADO DE FIGURAS

FIGURA 1.1 Ciclo del Potasio en el Suelo. Modificado de Conti, M. 2006.....	7
FIGURA 2.1 Localización del Cultivo de Alcachofa en La Remonta, ubicado en la parroquia Ayora, Cantón Cayambe de la Provincia de Pichincha. Modificado de Instituto Geográfico Militar (2010), Edufuturo (2010) y Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (2003)	32
FIGURA 2.2 Fotografía del medio Pikovskaya modificado y acción de las colonias solubilizadoras de potasio, señaladas en círculos, tras 48 horas de incubación (Guevara G., 2009)	37
FIGURA 2.3 Fotografía de los halos de solubilización al evaluar la actividad solubilizadora de potasio, en medio Pikovskaya modificado, tras 48 horas de incubación. (Guevara G., 2009)	38
FIGURA 2.4 Fotografía de las pruebas de antagonismo, tras 24 horas de incubación. En los cuatro casos aquí observados se registra antagonismo negativo (Guevara G., 2009).....	40
FIGURA 3.1 Rangos de Significación para la Prueba de Duncan para la variable diámetro de solubilización, a las 24 horas de incubación	44
FIGURA 3.2 Rangos de Significación para la Prueba de Duncan para la variable diámetro de solubilización, a las 48 horas de incubación	46
FIGURA 3.3 Frecuencia de aparición de buenos y malos halos de solubilización, a las 24 y 48 horas de incubación	49
FIGURA 3.4 Rangos de Significación para la Prueba de Duncan para la variable diámetro del halo de antagonismo	55

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO A: Muestreo de suelo y de raíces de alcachofa en la localidad de La Remonta, cantón Cayambe	80
ANEXO B: Procedencia de las muestras evaluadas y diámetro (en mm) de los halos de solubilización de potasio generados por las mismas, a las 24 y 48 horas de incubación y sus repeticiones respectivas	81
ANEXO C: Colonias bacterianas en Agar Nutritivo (1) y vista al microscopio de las bacterias con tinción gram (2), identificadas con las mejores características solubilizadoras de potasio	82
ANEXO D: Diámetro de los halos de antagonismo en mm, a las 24 horas de incubación	84

RESUMEN

El potasio es uno de los minerales con requerimientos más altos en la nutrición vegetal, y a pesar de que el suelo presente cantidades suficientes para satisfacer las necesidades de los cultivos, este mineral debe ser suministrado en fertilizantes, debido a que las formas de potasio presentes en mayor cantidad en la solución del suelo, no son asimilables por las plantas. Sin embargo ciertos microorganismos son capaces de solubilizar el potasio del suelo posibilitando a las plantas la asimilación de este mineral. En la presente investigación se aisló e identificó microorganismos solubilizadores de Potasio a partir de muestras de suelo y raíces de cultivos de alcachofa de la localidad de La Remonta, cantón Cayambe, en medio Pikovskaya modificado. Se evaluó su capacidad solubilizadora por medio del diámetro del halo de solubilización obtenido en el medio mencionado, a las 24 y 48 horas de incubación. Se realizó un Análisis de Varianza (ADEVA) para cada tiempo de incubación, estos valores también se analizaron a través de la prueba de rangos múltiples de Duncan. Se determinó que las cepas con mejor respuesta solubilizadora de potasio pertenecen a los géneros *Bacillus sp.*, *Clostridium sp.* y *Pseudomonas sp.* 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. Se conserva un cepario de estos microorganismos con la finalidad de realizar futuras investigaciones que conduzcan a la producción de un biofertilizante solubilizador de potasio, que podría satisfacer las necesidades de la agricultura sostenible.

ABSTRACT

Potassium is a mineral with higher requirements on plant nutrition, and although the soil present sufficient quantities to meet crop needs, this mineral should be supplied in fertilizers, because the forms of potassium present in greater quantity in the soil solution cannot be assimilated by plants. However, some microorganisms are able to solubilize soil potassium to plants enabling the assimilation of this mineral. In the present investigation was isolated and identified potassium solubilizing microorganisms from soil samples and root crops of artichoke from La Remonta - Cayambe, in modified Pikovskaya medium. Solubilizing capacity was evaluated through solubilization of halo's diameter obtained in the medium before mentioned, at 24 and 48 hours of incubation. Was performed an analysis of variance (ANOVA) for each incubation time, these values were also analyzed by Duncan's multiple range tests. It was determined that strains more responsive to solubilize potassium belong to the genera *Bacillus* sp., *Clostridium* sp. and *Pseudomonas* sp. These bacteria were tested for antagonism considering the diameter of halo's inhibition between microorganisms confronted, in all cases it was found a negative antagonism. It keeps a strain bank of these microorganisms with the aim of future investigations, leading to the production of a potassium solubilizing biofertilizer, which could to solve the needs of sustainable agriculture.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

Los proyectos de obtención de fertilizantes requieren la fabricación de compuestos que proporcionen nutrientes para las plantas, tales como nitrógeno, fósforo y potasio. En su mayoría, los fertilizantes de potasio se fabrican en base a salmueras o depósitos subterráneos de potasa. El uso de fertilizantes químicos ha sido tan extendido que las reservas naturales de macronutrientes esenciales empleados para nutrir a los sembríos se están acabando (Sebiot y Eumedia (Eds.), 2000).

El potasio es uno de los minerales que se requiere en mayor cantidad en la nutrición vegetal. A pesar de que el suelo presente cantidades suficientes para satisfacer las necesidades de las plantas, este mineral debe ser suministrado en fertilizantes, debido a que las formas de potasio presentes en mayor cantidad en la solución del suelo, no son asimilables por los cultivos. Los fertilizantes con mayor aceptación por los agricultores son de origen químico tales como: cloruro de potasio (KCl), sulfato de potasio y magnesio ($K_2SO_4 \cdot 2MgSO_4$) (International Plant Nutrition Institute (IPNI), 2008).

Sin embargo, existen otras maneras de proveer el potasio necesario a los cultivos, mejorando la productividad y sin ocasionar los daños ambientales que producen los fertilizantes químicos. Es así que el empleo de biofertilizantes producidos en base a microorganismos propios de la tierra y reproducidos in vitro, son una alternativa para ejecutar agricultura sostenible. La creciente investigación biotecnológica en el Ecuador ha solucionado problemas en el sector agroproductivo, y continúa haciéndolo, como es el caso de la fertilización.

Hoy por hoy, el área de microbiología es un gran aliado para la agrobiotecnología en los países latinoamericanos, varios estudios trabajan con biofertilización mixta para proporcionar diversos nutrientes como fijadores de nitrógeno y solubilizadores de fósforo y de potasio (Intélite, 2006).

1.2 Justificación del problema

La producción agrícola en la actualidad se sostiene gracias a la aplicación, cada vez mayor, de fertilizantes químicos, con graves consecuencias en cuanto a salud y calidad del suelo. En forma general, los agricultores no tratan al suelo como un ecosistema con todas las interacciones que esto implica, sino únicamente se lo ve como el medio de cultivo para las plantas (Rodas, 2006).

El potasio es ampliamente requerido para la nutrición vegetal, es uno de los tres minerales que se demandan en mayor cantidad. Diversos cultivos como por ejemplo tomate, banano o papa, requieren potasio más que cualquier otro sustento mineral (IPNI, 2008).

Para mejorar la productividad agrícola se ha venido incorporando, de diversas maneras potasio al suelo, entre estas se incluye la adición de residuos animales y vegetales, estiércoles, y lo que más ampliamente se encuentra distribuido es la aplicación de fertilizantes químicos.

Es así que las prácticas agrícolas de alto rendimiento se han asociado al uso indiscriminado de fertilizantes, contaminando las aguas que provienen del riego de los cultivos. Dada la masiva administración de fertilizantes, se consideró resuelto el problema de la nutrición vegetal; sin embargo, en los últimos 50 años la contaminación por fertilizantes ha aumentado de manera extraordinaria y su empleo ha sido tan extendido que las reservas de macronutrientes esenciales empleadas para sustentar a los cultivos se están agotando (Sebiot y Eumedia (Eds.), 2000).

A pesar de que los suelos ecuatorianos presentan niveles relativamente altos de potasio, este mineral debe ser adicionado a los cultivos debido a la ineficiente utilización del potasio retenido en el suelo, que se pierde por lixiviación, y por la inoperante manera de recuperar el potasio que se halla en formas no disponibles en la solución del suelo, para ser asimilado por las plantas. Resulta imperativa una revolución agrícola que permita acrecentar la producción actual basándose en la mejor utilización de recursos que consientan heredar suelos saludables a las generaciones futuras. (Sebiot y Eumedia (Eds.), 2000).

Una de las soluciones que se plantea es la de potenciar y favorecer las capacidades de los microorganismos que de manera directa o indirecta aportan nutrientes o factores de crecimiento a las plantas (Rodas, 2006).

En el Ecuador los recursos agrícolas representan una parte importante del potencial económico. El III Censo Agrícola llevado a cabo en el año 2006 como una iniciativa del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, reporta que en el 2005 el producto interno bruto para la agricultura representó más de 1 746 millones de dólares. El cloruro de potasio es uno de los principales insumos en la agricultura local (Diario El Comercio, 2007).

El empleo de biofertilizantes que sustituyan a los fertilizantes químicos, establece una manera de aumentar la productividad agrícola y reducir los efectos atroces de la fertilización química. Los esfuerzos mancomunados de distintas especialidades deben emplearse para el adecuado desarrollo de biofertilizantes que estén dirigidos a solucionar problemas propios de la región, como señala la Red Iberoamericana de Biofertilizantes Microbianos para la Agricultura - BIOFAG (2008).

Estos biofertilizantes son generados con microorganismos que habitan en el suelo, involucrados en la nutrición y crecimiento de las plantas. En la actualidad se ha extendido ampliamente el uso de biofertilizantes a partir de microorganismos solubilizadores de fosfatos, otros que promueven el crecimiento vegetal, así como también los biofertilizantes fijadores de

nitrógeno. Sin embargo, la biofertilización de potasio es un tema poco desarrollado; a pesar de que no es reciente el conocimiento de la existencia de los microorganismos solubilizadores de este elemento, los estudios relacionados a la biofertilización de potasio son escasos. Sería una gran ventaja poder emplear estos microorganismos en suelos de origen volcánico como los ecuatorianos, ricos en potasio en formas no asimilables por las plantas, debido a que la fertilización con potasio es uno de los principales costos para estos cultivos. Adicionalmente, la utilización de cepas nativas permite mantener el equilibrio ecológico de la región.

El desarrollo exitoso de esta tecnología, debe ir ligado a la generación de conocimientos básicos, iniciándose por aislar las cepas nativas solubilizadoras de potasio, investigar su actividad solubilizadora e identificarlas para posteriormente aplicar diversas pruebas que puedan conducir al desarrollo del mencionado biofertilizante.

Los laboratorios de Agrodiagnostic, empresa ecuatoriana, dirigen su investigación al aislamiento de microorganismos autóctonos. Mantienen de manera constante estudios de nuevos bienes para control biológico y fertilización, con miras biotecnológicas aplicadas al desarrollo de insumos que benefician la nutrición vegetal, empleando conceptos de agricultura sostenible. El aislamiento e identificación de los microorganismos nativos, capaces de solubilizar potasio, presentarán resultados que en fases posteriores conducirán a la fabricación, por parte de Agrodiagnostic, de un biofertilizante que puede sustituir a los fertilizantes químicos de potasio, en la agricultura local.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo General

Aislar e identificar microorganismos solubilizadores de Potasio a partir de muestras de suelo y raíces de cultivos de alcachofa de la localidad de La Remonta, cantón Cayambe.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Determinar las cepas que presenten la mejor respuesta solubilizadora de potasio.
- Realizar pruebas de antagonismo entre las cepas que muestren las mejores características de solubilización de potasio.
- Establecer un cepario con los microorganismos identificados con las mejores características de solubilización de potasio y que no presenten antagonismo entre ellos, para realizar futuras investigaciones.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Importancia del Potasio

1.4.1.1 Potasio en el Suelo

El potasio en el suelo se halla ampliamente distribuido y representa el 2.6% en peso, de la corteza terrestre (Moscatelli, Lutens y Gómez, 2001).

En el suelo el potasio puede encontrarse de dos formas, la primera está representada por las formas iónicas libres en la solución del suelo, compuestas por las fijadas superficialmente sobre el complejo adsorbente y por las que se hallan en el interior de la red cristalina de determinadas arcillas (Urbano, 2003).

La segunda forma de potasio en el suelo es en la que este se halla combinado en diferentes compuestos minerales y orgánicos (Urbano, 2003). Los más representativos pertenecen a los grupos detallados a continuación. En el grupo de origen magmático se hallan los feldespatos potásicos ($\text{Si}_3\text{O}_8\text{AlK}$), las micas como la moscovita ($(\text{SiO}_4)_3\text{H}_2\text{Al}_3\text{K}$), y la biotita ($(\text{SiO}_4)_3\text{Al}_2(\text{MgFe})_2(\text{HK})_2$). Dentro del grupo de origen sedimentario se

encuentran la silvinita ($\text{ClK}\cdot\text{ClNa}$), carnalita ($\text{ClK}\cdot\text{Cl}_2\text{Mg}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$), y la kainita ($\text{ClK}\cdot\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (Navarro y Navarro, 2003).

En cuanto a la evolución del potasio en el suelo, el mencionado elemento es liberado de los silicatos muy lentamente mediante meteorización de estos minerales o por acción microbiana. La dureza y mayor solubilidad de los compuestos de origen sedimentario se alteran más fácilmente que los silicatos (Urbano, 2003).

El potasio que forma parte de la materia orgánica, derivado de la descomposición de restos vegetales o animales (Navarro, y Navarro, 2003), por medio de mineralización puede liberarse y aparecer en forma de K^+ , este puede encontrarse en la solución del suelo en forma libre o fijada en el complejo adsorbente, fijada en formas fácilmente intercambiables, o en formas difícilmente intercambiables en el interior de los espacios interlaminares de determinadas arcillas (Urbano, 2003).

Los suelos arcillosos y limo-arcillosos presentan mayor contenido de potasio que los suelos limo-arenosos y arenosos (Navarro y Navarro, 2003). El potasio es empleado para la nutrición de plantas y microorganismos y también parte de este potasio se pierde por lixiviación (Urbano, 2003) y erosión. En los cultivos la concentración de potasio dependerá de la fertilización que se aplique (Navarro y Navarro, 2003).

El potasio presente en la solución del suelo es empleado precipitadamente por las plantas para su crecimiento, este potasio absorbido y extraído es renovado inmediatamente desde formas menos accesibles en las zonas de adsorción de los coloides minerales y orgánicos que se encuentran en el suelo. De tal forma que el proceso de adsorción-desorción se encarga de reponer y mantener el equilibrio de los niveles de potasio en la solución del suelo (Conti, 2006).

El potasio intercambiable es el que se halla en forma iónica (K^+) unido de manera electrostática a los materiales de la fase sólida coloidal mineral y

orgánica. Este K^+ permite el equilibrio de potasio en la solución del suelo. Cuando la concentración de K^+ disminuye, es liberado el K^+ adsorbido; 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 de la fase sólida (Conti, 2006).

Cabe mencionar que se denomina “potasio disponible” a la suma del potasio en la solución del suelo y el intercambiable, este es medido en los análisis de suelos para valorar su fertilidad (Conti, 2006).

El potasio de reserva o no-intercambiable, es el que se halla fuertemente pegado a la fase sólida mineral, constituyendo el potasio de reserva. Existen dos tipos, el potasio fijado se encuentra en la zona hexagonal de las láminas de silicio y el potasio estructural está combinado de manera química con los elementos de los minerales de la solución de suelo (Conti, 2006).

Marta Elvira Conti (2006) muestra la siguiente relación para interpretar el equilibrio que se da:

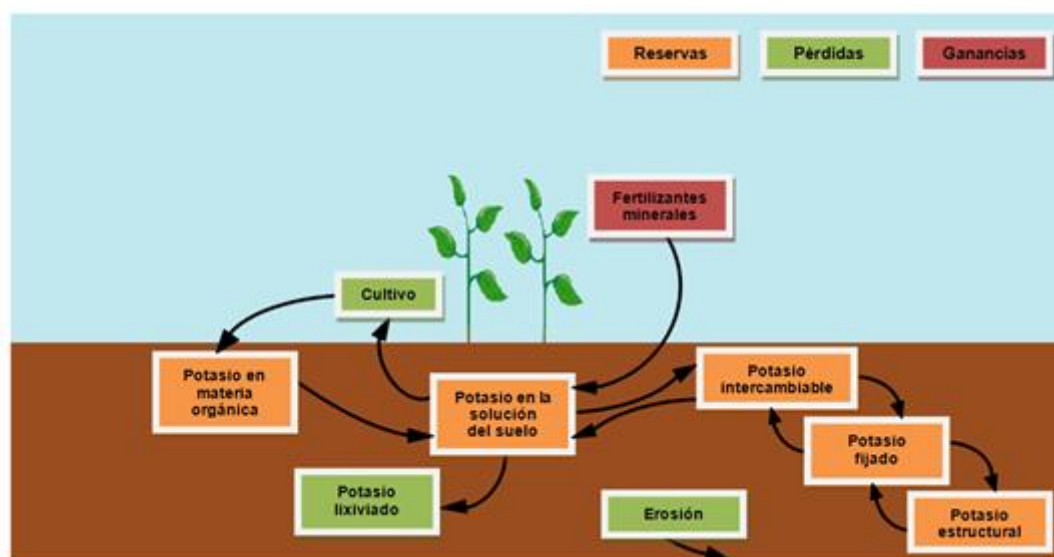
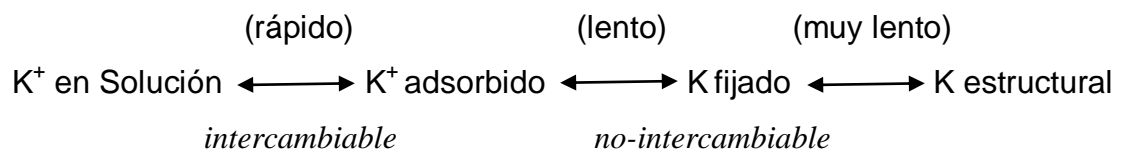


Figura 1.1 Ciclo del Potasio en el Suelo. Modificado de Conti, M. 2006

La velocidad de reposición de potasio en la solución del suelo para ser absorbido por las raíces depende del total de potasio intercambiable, no-intercambiable, y por supuesto de la velocidad con la que este elemento se movilice a través del suelo. Es así que al ser absorbido por las raíces este se reduce o se agota, disminuyendo la cantidad de potasio intercambiable, por lo que este se trasladará de zonas distantes de la raíz devolviendo el equilibrio. La velocidad con la que el potasio se traslada obedece a los materiales que constituyen el suelo y del ambiente, de tal manera que es más alta en los suelos húmedos (Conti, 2006).

Para expresar el contenido de potasio en el suelo puede pronunciarse como elemento K o en óxido de potasio (K_2O). El contenido de potasio en las soluciones del suelo se halla entre 5 y 15 ppm de K_2O lo que representa de 5 a 15 mg de K_2O/L . Cabe recalcar que aunque se exprese el contenido de potasio en K_2O , en la solución del suelo se encuentra únicamente en forma iónica (Urbano, 2003).

1.4.1.2 Potasio en la Nutrición Vegetal

Es necesario que el suelo posea suficientes nutrientes para garantizar el crecimiento sano de las plantas y la buena producción de los cultivos. Oportunamente se debe mantener un balance equilibrado de estos nutrientes a fin de satisfacer las necesidades agrícolas, la escasez de uno de ellos podría afectar seriamente su rendimiento (Suquilanda y Manuel, 1995).

Este mineral se encuentra dentro de la clasificación de los nutrientes como macroelemento primario, junto con el nitrógeno y el fósforo (Suquilanda y Manuel, 1995). El potasio absorbido por la planta es el que se halla en forma iónica (K^+) en las soluciones de suelo o fijado sobre el complejo adsorbente. Mediante mecanismos de difusión se produce su absorción por medio radicular, facilitado por su baja carga y pequeño radio iónico. La planta puede absorber cantidades importantes de potasio, hasta el 1% de su peso seco (Urbano, 2003). El potasio es el catión que prevalece en las plantas y hay pruebas que

sugieren su implicación en el mantenimiento del balance iónico de las células (Bidwell, 1993).

La planta puede absorber cantidades superiores a las requeridas, sin que esto represente una mejora significativa del rendimiento en relación al obtenido con cantidades menores de potasio, mecanismo que es denominado “consumo de lujo” (Urbano, 2003).

Es muy variable la cantidad de potasio absorbido por la planta, esto depende de factores como el contenido de potasio en la solución de suelo y de la presencia de cationes de calcio, magnesio y sodio (Urbano, 2003).

Puede presentarse deficiencia de potasio en el cultivo por exceso de calcio activo o magnesio asimilable, dado el efecto antagónico de estos iones. De manera contraria, el exceso de potasio origina deficiencia de magnesio ocasionando cuadros de hipomagnesemia (Urbano, 2003).

En situaciones de deficiencia de K^+ la planta puede sustituirlo absorbiendo Na^+ , interviniendo en aspectos fisicoquímicos como turgencia, hidratación, presión osmótica y no en aspectos biológicos (Urbano, 2003).

Las bajas cantidades de potasio que se encuentran de manera natural en las soluciones del suelo tienden a agotarse rápidamente durante el cultivo, debido a las grandes cantidades de potasio requeridas por las plantas. Por tanto, se demanda de manera constante que las soluciones del suelo sean renovadas con potasio fijo de fácil remoción (Urbano, 2003).

La deficiencia de potasio puede presentarse de manera frecuente en suelos ligeros o arenosos, mientras que en los suelos arcillosos su cantidad suele ser suficiente (Bidwell, 1993).

Este mineral cumple funciones importantes en el desarrollo vegetativo, es así que coadyuva en la producción proteica; el tallo y los pastos crecen con mayor dureza, por lo que se reduce la necesidad de tutores; proporciona

granos y semillas de mejor tamaño y contenido; participa en condición de esencial en la formación y desplazamiento de almidones y azúcares; interviene en el desarrollo de raíces y tubérculos; y está involucrado en la formación de antocianina, pigmento de color rojo azulado de las hojas y frutos (Suquilanda y Manuel, 1995).

La validez de operación de algunas enzimas implicadas en la síntesis proteica, es ineficiente en ausencia de potasio. Este mineral es sustancial en el metabolismo vegetal, el elemento se enlaza de manera iónica a la piruvato quinasa, primordial en la respiración y el metabolismo de los carbohidratos (Bidwell, 1993). El potasio está relacionado con el funcionamiento de un número mayor de 60 enzimas involucradas con el crecimiento de las plantas, con la producción y con el transporte de metabolitos fotosintéticos hacia semillas, tubérculos, raíces y frutos. También está involucrado con la economía del agua y con el suministro de resistencia a distintas plagas, enfermedades, congelación y sequía (Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO, 2007)

Las carencias de potasio se pueden diagnosticar de manera foliar en donde se manifiesta una clorosis típicamente moteada en las hojas maduras que posteriormente se distribuye a las hojas jóvenes, dada la movilidad de este elemento en las plantas. Otra característica es la presencia de áreas necróticas en los bordes y puntas de las hojas, enroscándose de una manera característica pudiendo producirse ennegrecimiento general u hojas quemadas (Bidwel, 1993).

La deficiencia de este elemento también puede manifestarse por la evolución en roseta o acaparamiento. Como consecuencia se registra la reducción del crecimiento caulinar, el debilitamiento del tallo y la baja resistencia a patógenos. Este debilitamiento es muy evidente en los cereales que son fácilmente acamadas (se tienden ante la intemperie) y agredidas por enfermedades (Bidwell, 1993).

Por la reducción de la síntesis proteica y el daño ocasionado en la respiración, los aminoácidos y azúcares, compuestos de bajo peso molecular, se acumulan en niveles extraordinariamente elevados y se reducen polisacáridos y proteínas (Bidwell, 1993).

El potasio presente en las soluciones del suelo es rápidamente consumido por las plantas y los microorganismos y perdido por lixiviación, es por esto que la fertilidad potásica depende de la facultad del suelo para fijar y liberar el elemento y de los niveles de potasio en la solución del suelo. De tal manera que una adecuada nutrición vegetal de este mineral se basa en la existencia suficiente de K intercambiable y el mantenimiento de estos niveles (Urbano, 2003).

1.4.1.3 Potasio en la Agricultura

A pesar de que el potasio es un nutriente esencial para el adecuado desarrollo de los cultivos, los agricultores suelen darle menor atención que al nitrógeno y al fósforo. El potasio que se adiciona a los sistemas de producción comúnmente es llamado “potasa”. Este se obtenía inicialmente al concentrar los sólidos por evaporación, en ollas de hierro, luego de lavar cenizas de madera; de tal forma que, al quemar la madera cosechada, se pueda recuperar el potasio que las raíces que los árboles hayan absorbido del suelo (Espinosa y Jaramillo (Eds.), 2009).

La fertilización potásica es un proceso complejo que pretende disponer en el suelo cantidades de potasio soluble y cambiante (o de K en reserva), de tal forma que la desorción se dé a la velocidad necesaria para mantener las soluciones del suelo en una concentración suficiente, capaz de satisfacer las necesidades nutricionales de la planta (Urbano, 2003).

De manera química, la fertilización de potasio se la realiza a partir de potasa (K_2O), esta regula en la planta el consumo de agua y es retenido con facilidad por las partículas del suelo (Suquilanda, y Manuel, 1995), también puede ser aplicado como sales solubles de cloruro de potasio (KCl, 60-63%

K_2O), sulfato de potasio (K_2SO_4 , 50-52% K_2O), nitrato de potasio (KNO_3 , 44% K_2O y 13% N) y sulfato de potasio y magnesio (K_2SO_4 , $MgSO_4$, 22% K_2O , 18% MgO y 18% S) (Fassbender y Bornemisza, 1987). En promedio, en cultivos secos, se observa entre 25 y 50 kg de K_2O/ha y en los cultivos de regadío, entre 150 y 200 kg de K_2O/ha (Urbano, 2003). Adicionalmente existen otras fuentes de potasio que son utilizadas para producción orgánica, entre las que se destacan estiércol y compost, también son empleadas algas o sus derivados dado que el agua de mar posee 0.4 g de K por litro; sin embargo, en estos fertilizantes las concentraciones de potasio son inestables (Espinosa y Jaramillo (Eds.), 2009).

Independientemente de tratarse de agricultura orgánica o convencional, los fertilizantes que contienen potasio provienen, en su mayoría, de depósitos de sales marinas antiguas, proceso geológico que se dio al evaporarse los mares. (Espinosa y Jaramillo (Eds.), 2009).

En los sistemas de manejo de cultivos es muy importante el renovar las reservas de potasio dado que al término de la cosecha se ha removido potasio del campo, adicionalmente a las pérdidas de este nutriente por lixiviación y escorrentía superficial. El contenido de potasio en la porción cosechada ha permitido determinar su demanda en los diferentes cultivos. No obstante, la atención que se ha dado a la tasa de abastecimiento de potasio para el crecimiento de las plantas ha sido menor. De manera conjunta, la cantidad total demandada por la plantación y la tasa de disponibilidad de la fuente aplicada, mantienen igual importancia durante todo el crecimiento del cultivo. Al emplear fertilizantes de baja solubilidad, es posible que la velocidad con la que se requiere el potasio no sea lo suficientemente rápida como para suplir la falta de nutriente en los picos requeridos en el crecimiento. (Espinosa y Jaramillo (Eds.), 2009).

Según el informe publicado en el año 2008 por la FAO, sobre Tendencias Mundiales Actuales y Perspectivas de los Fertilizantes hasta 2011/12, América del Norte continuará siendo un proveedor primario de potasa, a su vez América Latina seguirá importando potasio.

La agencia especializada prevé que en el periodo 2007/8 al 2011/12, el consumo de potasio mundial tenga un crecimiento anual de 2.4%; en Latinoamérica será 2.5%, lo que equivale al 17.5% del consumo mundial. La mayor demanda de este fertilizante proviene de Asia del Este, Norte América y Latinoamérica. El suministro total de potasio subirá en 4.9 millones de toneladas, de tal forma que se espera que la oferta mundial de potasa se mantengan muy por encima de la demanda total, con el creciente superávit 5.7 a 6.7 millones de toneladas a una tasa de crecimiento anual del 3% durante el período analizado. En forma general, el suministro mundial de fertilizantes superará la demanda, no es un caso exclusivo el del potasio. (FAO, 2008)

En cuanto al consumo total de fertilizantes en América Latina, se prevé un aumento de aproximadamente 2.3 millones de toneladas a una tasa anual del 2.7% durante el período observado. Este crecimiento en la demanda de fertilizantes se espera debido al aumento de la producción, que puede proceder de una combinación de factores: mayor superficie cultivada y rendimientos más altos, mismos que ayudarán a América Latina a aumentar su participación en los mercados agrícolas mundiales. Los suministros de potasio en toda América, para el final del periodo de estudio será de 18 430 000 toneladas, mientras que la demanda será únicamente de 12 453 000 toneladas, sostiene el informe (FAO, 2008).

En Ecuador en el año 2006 se importaron 545 000 toneladas de fertilizantes, de las cuales 135 000 corresponden a cloruro de potasio, el segundo insumo más utilizado por la agricultura ecuatoriana. El mercado de fertilizante mueve grandes cifras, en el año indicado se señalaron montos de hasta 200 millones de dólares (Diario El Comercio, 2007). Para el año 2009 la demanda de fertilizante superó las 700 000 toneladas y los mayores importadores son Fertisa, Delcorp y Agripac (Diario El Comercio, 2009).

Dado este panorama en el cual la fertilización potásica en Latinoamérica y por supuesto en Ecuador depende de la importación, resulta conveniente establecer fertilizantes que puedan ser producidos aquí. Considerando que las fuentes de potasio son realmente reducidas para poder

fabricar fertilizantes potásicos convencionales, la alternativa de emplear biofertilizantes de microorganismos solubilizadores de potasio, además de ser amigable con el medioambiente, contribuiría con la reducción de costos favoreciendo no solo al sector agrícola, sino también a largo plazo, al sector económico.

1.4.2 Rizosfera y Comunidad Microbiana

La definición mayormente difundida de rizosfera indica que es la región de suelo que se halla afectado por acción de las raíces; sin embargo, la palabra rizosfera tiene un sentido más amplio, representando un punto de comunicación o interface entre plantas y suelo, existiendo relaciones que fluyen vía raíz-suelo y suelo-raíz (Sánchez de Prager, 2007), aquí se constituyen vínculos importantes entre el suelo, la planta y las poblaciones micro y macrobióticas que en él habitan, pudiendo ser hongos, bacterias, protozoos y nematodos (Fuentes, 2007).

En la rizosfera se pueden distinguir tres regiones: rizosfera, rizoplano y endorrizosfera. Siendo la rizosfera la región más extensa, se encuentra en relación directa con la interfaz raíz-suelo, puede medir de 1 a 3 mm de espesor; en ciertos cultivos, como los de gramíneas pratenses que poseen sistemas radiculares fasciculados muy ramificados, la zona rizosférica sería todo el suelo bajo su dominio. La segunda zona, el rizoplano le sigue a la rizosfera, justo sobre la superficie de la raíz. Enseguida se halla la endorrizósfera que incluye el tejido cortical. En la endorrizósfera es posible encontrar tres clases de organismos: los que conviven en simbiosis mutualista con la planta, los que parasitan el tejido vegetal y finalmente los que habitan los tejidos muertos de la raíz (Sánchez de Prager, 2007).

El conjunto de exudados radicales causan un efecto rizosférico que ha sido terreno de estudio para establecer buenas prácticas en los sistemas agrarios. Determinados microorganismos ocupan fuentes de energía de la raíz y proporcionan nutrientes minerales procedentes del suelo o de metabolitos que se han generado gracias a su actividad. Es así el caso de las fitohormonas

que son secretadas por algunos microorganismos rizosféricos que han transformado exudados radicales de bajo peso molecular (Sánchez de Prager, 2007). Las bacterias rizosféricas pueden contribuir con nutrientes como fósforo, potasio y nitrógeno. Un ejemplo muy importante de simbiosis que beneficia los agrosistemas es el de la nitro fijación generada por bacterias, estas pueden hallarse libres o en simbiosis con otros microorganismos. Por su parte, las micorrizas (asociación hongo-raíz) aumentan la superficie de absorción, mejoran la resistencia a la sequía de las plantas y mejoran la absorción de minerales (Fuentes, 2007), se podría decir que la micorriza es una extensión de la raíz. Distintos microorganismos también favorecen el control de patógenos (Anaya, Espinoza-García y Cruz-Ortega, 2001).

Las bacterias se localizan en los espacios intercelulares de la corteza seguidamente a continuación del ápice, mientras que los hongos micorrízicos lo hacen en la corteza detrás de la región del pelo radical. Estudios proponen que la mayor parte de microorganismos se hallan en los primeros 50 μm de la superficie de la raíz, dentro de los 10 μm iniciales podrían encontrarse 1.2×10^8 , estos datos pueden variar de acuerdo a la planta, edad, factores ambientales y de manipulación. La población microbiana ocupa únicamente del 7 al 15% de la superficie de la raíz. En el suelo rizosférico puede haber de 50 a 100 veces más microorganismos que en la demás fracción de suelo. Cada gramo de suelo rizosférico logra contener 10^9 bacterias, 10^7 actinomicetes, 10^6 hongos, 10^3 protozoos y 10^3 algas (Sánchez de Prager, 2007).

Es muy amplia la proporción de especies bacterianas aisladas a partir de raíces de diversas plantas, entre estas podemos citar distintos géneros como: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Caulobacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Phyllobacterium*, *Chromobacterium*, *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Beijerinckia*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Hyphomicrobium* (Sánchez de Prager, 2007).

Un mayor número de microorganismos pueden encontrarse en los suelos arcillosos que en capas arenosas, debido a la materia orgánica

presente. Es posible encontrar más alimento para los microorganismos en los materiales de texturas más finas (Coyne, 2000).

Mantener un suelo de calidad o saludable es una característica de interés creciente entre los agricultores dado que esto mejorará la productividad. Es así que una de las formas de conservar la calidad del suelo viene dada por la diversidad de los microorganismos presentes, su número y la forma en la que se hallan distribuidos (Coyne, 2000) y sobre todo por el tipo de microorganismos presentes que contribuirían a la mejora de los cultivos y su rendimiento.

1.4.3 Microorganismos Solubilizadores de Potasio

La actividad de ciertos microorganismos que habitan el suelo es de vital importancia en los ciclos de carbono, nitrógeno, azufre y fósforo; también para la movilización de potasio, magnesio y otros minerales, siendo aprovechados por las plantas. El potasio se encuentra retenido en la solución del suelo. Puede formar iones, estar en forma cambiante, inmovilizado entre las láminas de filosilicatos o formando parte de las estructuras minerales tales como feldespatos o micas. El Área de Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Extremadura (2006), indica que este elemento también puede hallarse en forma orgánica en los restos vegetales y en células microbianas. Tan solo una parte de él es soluble y otra es no intercambiable (Delgado Higuera, 2002).

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 ácidos 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).

A pesar de la dificultad de interpretar los complejos procesos ocurridos en la naturaleza con experimentos de laboratorio, es posible obtener información sobre los principios básicos de disolución o solubilización de potasio por bacterias, mediante trabajo experimental. 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 y 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.

Los microorganismos capaces de destruir las estructuras minerales que contienen potasio son diversos. Entre ellos se encuentran bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, y *Clostridium* y hongos tales como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Mucor*. Estos microorganismos actúan de varias formas solubilizando el potasio de distintos minerales (Delgado Higuera, 2002).

Bacterias como *Bacillus mucilaginosus* y *Bacillus siliceus* atacan la biotina, moscovita, ortoclasas (Urbano, 2003). Otro microorganismo que se destaca en la solubilización de potasio es *Pseudomonas fluorescens* (Delgado Higuera, 2002).

Sugumaran & Janarthanam (2007) realizaron un estudio en el que analizaron la solubilización de potasio de distintos minerales que contienen este elemento (microclina, ortoclasa y moscovita), demostraron que *Bacillus mucilaginosus* libera potasio de moscovita con mayor facilidad que de otros minerales; aunque el mecanismo de liberación no está claro. Esta bacteria podría producir ácidos, álcalis o quelantes que actuarían sobre los minerales potásicos. Por otro lado, y a pesar de que su papel no está definido, la

producción de exopolisacáridos podría estar involucrada en el mecanismo principal de liberación de potasio de silicatos.

La investigación realizada por Wuxing, Xushi, Xianghua, Qiyin, Yongming y Christie (2007), también se desarrolló con *Bacillus mucilaginosus*. Aquí se señala que esta bacteria es capaz de extraer K^+ y SiO_2 de silicatos. El microorganismo disuelve minerales sólidos y mica liberando de forma simultánea K^+ y SiO_2 , sin embargo no es capaz de disolver feldespato. *B. mucilaginosus* produce, durante el crecimiento, ácidos orgánicos y polisacáridos. Hay dos procesos que induce la bacteria para la descomposición de los minerales de silicato. En uno de estos procesos, los polisacáridos adsorben fuertemente los ácidos orgánicos y se fijan a la superficie del mineral, dando como resultado un área de gran concentración de ácidos orgánicos cercanos al mineral. En el otro proceso los polisacáridos adsorben SiO_2 , esto afecta el equilibrio entre las fases mineral y fluida y conduce a la reacción hacia la solubilización de K^+ y SiO_2 .

Otro microorganismo capaz de liberar potasio de minerales que contiene potasio es el hongo termofílico *Aspergillus fumigatus*. Aparentemente, este hongo promueve la liberación de potasio con por lo menos tres rutas diferentes. La primera a través de la formación de complejos de ligandos orgánicos solubles, otra forma recurre a biopolímeros inmóviles tales como las secreciones de componentes insolubles, y la tercera ruta relaciona las fuerzas mecánicas en asociación con el contacto directo físico entre células y partículas minerales (Lian, Wang, Pan, Liu & Teng, 2007). En algunas investigaciones el hongo *Trichoderma viridae* ha sido asociado a la solubilización de potasio (Arévalo, 2009).

Una bacteria solubilizadora de potasio empleada en biofertilizantes es *Frateuria aurentia*. Puede actuar en cualquier tipo de suelo, en el área rizosférica. Durante su crecimiento movilizan el potasio hacia la planta (T. Stanes & Company Limited, 2006). Este microorganismo se desarrolla empleando carbono, azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos, que pueden ser del suelo o de exudados radicales (Biotech International Ltda., 2006).

En los compuestos orgánicos, la reducida cantidad de potasio no asimilable ha hecho que sea poco estudiada la acción de los microorganismos sobre el potasio orgánico, como indica el Área de Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Extremadura (2006).

Es así que distintos estudios proveen evidencia de que diversos microorganismos son capaces de elevar sustancialmente la solubilización de potasio de una extensa variedad de minerales. Sin embargo, queda un amplio camino que recorrer para determinar, de manera precisa, los mecanismos mediante los cuales los microorganismos son capaces de disolver los mencionados minerales.

1.4.4 Agricultura y Microorganismos

La producción de los cultivos y el crecimiento de las plantas están íntimamente relacionados en muchos aspectos con las actividades microbianas. Considerando estas asociaciones se han diseñado estrategias para identificar y comprender los microorganismos y mecanismos involucrados en cultivos de interés agrícola. La microbiología ha jugado un papel importante en la mejora de la agricultura.

Sin duda el suelo sufre diversas alteraciones, principalmente de origen antropológico, incidiendo sobre la calidad del terreno y alterando a los microorganismos que habitan en él, sin embargo se puede lograr una producción agrícola adecuada mediante la recuperación del suelo previa aplicación de bacterias y hongos micorrízicos asociados a las plantas (Caballero-Mellado, 2006).

La productividad agrícola se ha incrementado estrepitosamente en las últimas décadas, esto produjo como consecuencia la disminución progresiva de materia orgánica en los suelos de cultivo intensivo, deteriorando la estructura del suelo con la consecuente compactación y erosión. La contaminación de aguas subterráneas con plaguicidas y fertilizantes agravan aún más el

panorama de la agricultura no sostenible que se ha venido manejando (Rodas, 2006).

Esta disminución de la fertilidad de los suelos viene de la mano con el decaimiento de la actividad propia de la biota del suelo, dependiente de los nutrientes disponibles y de la energía que aporta la materia orgánica. Los microorganismos contribuyen con las alteraciones químicas en los materiales constitutivos del suelo, de tal manera que la reducción del componente biótico edáfico minimiza la capacidad del suelo de proveer nutrientes a partir de sus propios depósitos (Rodas, 2006).

Las sustancias secretadas por los microorganismos pueden estimular el crecimiento vegetal, por lo que resultaría beneficioso el identificar los genes que codifican para la síntesis de estas sustancias. En el conjunto de interacciones microorganismo-planta también están aquellas que perjudican a los cultivos, ciertos mecanismos microbianos son responsables de la muerte de células vegetales, mismos que deben ser estudiados a profundidad (Caballero-Mellado, 2006).

Numerosas bacterias y hongos promueven el crecimiento vegetal. De forma particular los hongos micorrízicos, que se asocian con la mayoría de plantas, en algunos casos recorriendo zonas del suelo que resultan imposibles a las raíces, favoreciendo la captación de nutrientes. Dentro de las bacterias promotoras de crecimiento (PGPB, por Plant Growth Promotion Bacterial) las rizobacterias son las más comunes. Estas bacterias favorecen la fijación biológica de nitrógeno, sintetizan diversas fitohormonas y mejoran la absorción de agua y minerales del suelo (Caballero-Mellado, 2006)

Algunas especies microbianas son capaces de inhibir microorganismos patógenos (Caballero-Mellado, 2006). Un numeroso grupo de bacterias y hongos reacciona de forma antagónica con ciertos microorganismos, acción que resulta benéfica para formular agentes de control biológico de patógenos vegetales. Entre los más importantes se pueden citar a los hongos de los

géneros *Gliocladium* y *Trichoderma* y a las bacterias de los géneros *Fusarium*, *Pseudomonas* y *Bacillus*. (Fernández-Larrea, 2001).

Dentro de la gran diversidad y complejidad de los microorganismos microbianos del suelo, existen múltiples campos de investigación, en especial en la zona rizosférica y los microorganismos que en ella interaccionan, produciendo consecuencias a favor o en contra de los cultivos. Las investigaciones en este campo pretenden mejorar el desarrollo y crecimiento vegetal y por ende incrementar la productividad agrícola a partir de aquellos microorganismos que presentan los mecanismos y capacidades requeridas para lograrlo (Rodas, 2006).

1.4.5 Biofertilizantes

Los biofertilizantes o abonos biológicos son productos obtenidos a partir de microorganismos que promueven y 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 dentro de biofertilizantes se pueden emplear macro organismos como lombrices (Benítez Burraco, 2005).

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 (BIOFAG, 2008).

El uso de biofertilizantes es una alternativa para desarrollar agricultura sostenible al sustituir parcial o completamente a los fertilizantes químicos, con ventajas ambientales y económicas, y con mayor productividad de los cultivos. De igual manera los biofertilizantes pueden ayudar a la recuperación agrícola de suelos marginales (BIOFAG, 2008).

El desarrollo a nivel investigativo e industrial, de microorganismos que favorecen el crecimiento vegetal y el control de enfermedades presenta un futuro promisorio. Existen dos clases de inoculantes: en primer lugar están aquellos que controlan enfermedades en las plantas y a continuación se encuentran los que estimulan el crecimiento de los cultivos (ECO-SAFE. 2002).

Los inoculantes que controlan las enfermedades y plagas son agentes de control biológico, que suplen o reducen la aplicación de pesticidas y fungicidas. Los inoculantes que estimulan el crecimiento proporcionan a las plantas nutrientes y fitohormonas (ECO-SAFE. 2002).

En la actualidad tiene gran acogida la comercialización de diversos inoculantes de uso agrícola. La biotecnología moderna permite que su avance sea cada vez mayor (ECO-SAFE. 2002), con el empleo de biofertilizantes a partir de organismos transgénicos fijadores de nitrógeno, así como el perfeccionamiento de las relaciones simbióticas entre las plantas y los microorganismos encargados de fijar distintos elementos. Otros avances que está permitiendo la biotecnología es el esclarecer las funciones fitorreguladoras que tienen varios compuestos (como lipoquitos-oligosacáridos), y el papel de las micorrizas en la movilización de nutrientes (Benítez Burraco, 2005).

Los biofertilizantes más populares incluyen a rizobios, cianobacterias, micorrizas, compost directo y lombrices. (ECO-SAFE. 2002).

1.4.6 Alcachofa

1.4.6.1 Características Botánicas

El término alcachofa puede referirse a la planta entera también denominada alcachofera; o a la inflorescencia en capítulo, su cabeza floral comestible. Pertenece a la familia *Asteraceae* y su nombre binomial es *Cynara scolymus*, L. (Blázquez, Díaz, Achaerandio y Pujolà, 2008).

Inicialmente su sistema radical se constituye con 6 a 12 raíces fibrosas, a continuación se ramifican de forma abundante, se tornan gruesas, llegando hasta 1 m de profundidad. Aquí acumulan las reservas alimenticias que elabora la planta (Servicios Agrícolas y Agroindustria, 2007).

Entre las hortalizas, la alcachofa presenta uno de los más grandes sistemas caulinares. Sus hojas se ubican de forma alternada, de longitudes que varían entre 0.5 a 1.5 m de largo. Estas se disponen rodeando un tallo corto y comprimido lo que permite formar roseta de 0.5 a 1.5 m de diámetro (Servicios Agrícolas y Agroindustria, 2007).

La forma de las hojas es alargada y pinnatipartida, en el cardo presenta divisiones menores en cuanto a número y profundidad. Su lámina es de color verde claro en el haz y en el envés blanquecino pubescente, lo atraviesa una nervadura gruesa y marcada. Tienen un peciolo reducido y más carnoso en el cardo. Presentan costillas longitudinales muy salientes (Blázquez *et al.*, 2008).

El tallo puede alcanzar alturas de 1 a 2 m. Al extremo de este se encuentra una inflorescencia o capítulo primario, también se forman capítulos secundarios, terciarios y hasta cuaternarios en las ramificaciones (Servicios Agrícolas y Agroindustria, 2007).

Esta *Asteraceae* presenta capítulos grandes, pueden ser redondos o alargados, de igual manera de sus brácteas adicionalmente estas son erectas, con espinas apicales o sin ellas y su coloración varía de verde a morado. Cuando se desarrolla la inflorescencia, las brácteas se apartan hacia los laterales, permitiendo la manifestación del capítulo floral distendido, con numerosas flores tubulosas, hermafroditas con tintes azul-violetas. La polinización en la gran mayoría de casos es por polinización cruzada entomófila. La fertilización da lugar al fruto en aquenio provisto de vilano, de forma oblonga y color grisáceo (Servicios Agrícolas y Agroindustria, 2007).

1.4.6.2. Cultivo

Esta especie tradicionalmente es multiplicada vegetativamente, no obstante, dadas sus cualidades biológicas es posible emplear técnicas de mejoramiento entre las que se hallan la hibridación, selección y clonación de plantas elite, incluyendo líneas endocriadas e híbridos F1 (Asprelli, Cravero y Cointry, 2001).

La alcachofa es una planta perenne en estado silvestre, las plantaciones son productivas durante dos o tres años, aunque con manejo y variedades específicas, hay registros de cultivos que han seguido produciendo por más de 15 años (Giaconi y Escaff, 2004). Cada año, esta planta brota nuevamente de la cepa, formando una roseta de hojas intensamente segmentadas (Blázquez *et al.*, 2008). Se cultiva en climas fríos a frescos, templados y con periodos brumosos. En cuanto al terreno este debe ser profundo, rico y bien drenado (Giaconi y Escaff, 2004).

Giaconi y Escaff (2004) señalan que esta planta requiere grandes cantidades de abonos. El nitrógeno es fundamental para estimular y apresurar el desarrollo de la alcachofa. Se sugiere aplicar, por ha, 220 Kg de N (1 500 Kg de salitre o 500 Kg de urea), 90 Kg de P₂O₅ (200 Kg de superfosfato triple) y tan solo 120 Kg de K₂O (240 kg de sulfato de potasio), puesto que los suelos en los que se cultiva esta *Astereceae* contribuyen con cantidades considerables de este elemento. Ciertas formas de potasio son removidas del suelo gracias a la acción de microorganismos que hacen posible que este elemento pueda ser asimilado por las plantas.

La cosecha debe realizarse antes de su floración, cuando las brácteas aún permanecen tiernas y cerradas (Mayuri, 2009), de tal forma que las cabezas no se vuelvan coriáceas ni cambien de color. El tallo de cada cabeza debe cortarse de 10 a 20 cm de longitud. El rendimiento es variable, cada una puede pesar de 50 a 500 g aproximadamente (Servicios Agrícolas y Agroindustria, 2007), se puede esperar de 50 000 a 60 000 cabezas por cada hectárea (Giaconi y Escaff, 2004).

1.4.6.3. Importancia Económica

La alcachofa es característica de la alimentación mediterránea, apreciada por sus bondades culinarias y nutritivas. De igual forma es empleada con éxito en dietas de adelgazamiento por su bajo contenido calórico y elevada cantidad de fibra y agua (Chum, Carpio y Tulio, 2009).

Entre 1962 y 2004, la producción mundial de alcachofa se practicó de manera estacional, cosechándose únicamente en determinados periodos anuales. Sin embargo, la producción de los países europeos no satisface su demanda. Este es el escenario que enfrentó Ecuador junto con otros países sudamericanos, principalmente Perú, que poseen un clima más apropiado para este cultivo (Chum, Carpio y Tulio, 2009).

Por tal motivo, Inaexpo filial de Pronaca, en el año 2004 comenzó a difundir entre los agricultores ecuatorianos el cultivo de alcachofa para exportación. De tal forma que Inaexpo 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. Es un cultivo cuya acogida va en aumento en el Ecuador, la rentabilidad es una de sus ventajas, (Diario Hoy, 2008).

1.4.7 Técnicas Microbiológicas

1.4.7.1 Aislamiento en Medio Específico

Un medio, cualquiera sea este, que es apropiado para el crecimiento de un organismo en particular, es en cierto modo selectivo para éste microorganismo específico. En un medio de cultivo que ha sido inoculado con diversos microorganismos, únicamente los que puedan crecer ahí se reproducirán, mientras que los demás se extinguirán. De tal forma que si se conocen los requerimientos nutricionales de un microorganismo determinado,

se puede diseñar un medio que beneficie el desarrollo de este, y consienta su aislamiento a partir de una población mixta, a pesar de que el organismo buscado integre, de forma minoritaria, la población total (Stanier, Ingraham, Wheelis y Painter, 1992).

El aislamiento directo es una forma de obtener microorganismos de forma selectiva de sus hábitats naturales. Bajo esta técnica, al extender una población microbiana mixta sobre la superficie de un medio selectivo, previamente solidificado con agar, toda célula que sea capaz de crecer, se desarrollará y formará una colonia. La competencia por los nutrientes entre los microorganismos dispersos en el agar, se reduce drásticamente y de esta forma los microorganismos que crecen de manera lenta, tienen la oportunidad de generar colonias. La técnica de siembra directa en placa sobre medio selectivo, se emplea para aislar diversos microorganismos, mismos que son capaces de reproducirse en las condiciones del medio utilizado (Stanier *et al.*, 1992).

El medio empleado para aislar los microorganismos solubilizadores de potasio es una modificación del medio Pikovskaya. Usualmente el medio Pikovskaya es empleado para la detección de microorganismos solubilizadores de fosfatos, este medio contiene fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) como fosfato inorgánico soluble (Correa, 2008). La diferencia principal del medio empleado para aislar microorganismos solubilizadores de potasio es la sustitución de fosfato tricálcico por nitrato de potasio (KNO_3), del cual se libera potasio por acción de los microorganismos. La glucosa del medio actúa como fuente de energía, mientras que las sales apoyan el crecimiento de los microorganismos (Sigma, 2010). Este medio modificado también cuenta con la adición de púrpura de bromocresol como indicador de pH, que exhibe la producción de ácido que se utilizaría en esta actividad, formando un halo visible y bien diferenciado, permitiendo distinguir los microorganismos solubilizadores de potasio (Correa, 2008) de otros que también pueden crecer en ese medio, haciendo posible su aislamiento (Cano, 2006). El indicador púrpura de bromocresol presenta color violeta a pH igual o mayor a 6.8, mientras que al

acidificarse el medio, es de color amarillo a pH igual o menor a 5.2 (Britania, 2010).

1.4.7.2 Identificación Microbiana

La identificación permite determinar a qué especie pertenece una determinada cepa, mediante un proceso de comparación de diferentes características evaluadas en laboratorio. Cuanta mayor similitud exista entre las particularidades de la cepa estudiada en el laboratorio y las que tradicionalmente manifiesta una especie definida, será mayor la probabilidad de que esa cepa problema corresponda a la especie manifestada (Díaz, 2010a).

Las características empleadas para la identificación de los distintos grupos de microorganismos obedecen a las posibilidades del laboratorio que realiza la investigación, éstas son principalmente de tipo económico y de la relevancia que tenga en el estudio realizado el nivel de identificación microbiana (Díaz, 2010a).

La identificación bacteriana puede realizarse a través del estudio de características morfológicas, respuesta a tinción y resultados de pruebas bioquímicas aplicadas a los microorganismos (Gamazo, López-Goñi, y Díaz, 2005).

Al crecer las bacterias sobre un medio sólido, las células en división se mantienen relativamente fijas en su posición formando colonias, mismas que son masas visibles a simple vista, compuestas por millones de células. Estas varían en algunos aspectos; siendo tamaño, forma, superficie, consistencia, pigmentación y olor las características morfológicas más relevantes de una colonia bacteriana. Particularidades que son empleadas en la identificación de las bacterias que la conforman. El estudio de la morfología de las colonias es obligatorio para iniciar la identificación de las bacterias (Díaz, 2010b).

Al considerar a las bacterias como células individuales observables sólo al microscopio, se pueden evidenciar diferencias de tamaño, forma y

determinados detalles que caracterizan a los principales grupos de bacterias, aportando las bases esenciales para su estudio sistemático e identificación (Díaz, 2010a). Existen tres categorías morfológicas notoriamente distinguibles: formas esféricas o cocos, formas alargadas o bacilos y formas curvadas o espirilos (Díaz, 2010b).

Para la diferenciación morfológica y taxonómica de las bacterias la coloración Gram es básica. Según la tinción diferencial de Gram, las bacterias se clasifican en dos grupos bien definidos dependiendo de si retienen o no el colorante violeta de genciana o cristal violeta, empleado en la tinción. La diferencia entre ellas se da por la composición química de su pared celular y la permeabilidad de esta. Las bacterias grampositivas se ven de color azul o violeta al microscopio por presentar el citoplasma teñido uniformemente. Mientras que las bacterias gramnegativas se observan de color rojo debido al colorante safranina aplicado como contrastador (García Martos, Fernández del Barrio y Paredes Salido, 1994). El alto contenido de lípidos en la pared celular de las bacterias gramnegativas hace que sean más permeables al alcohol (Pumarola, 1999).

La identificación bioquímica se basa en las características metabólicas distintivas y determinadas de cada microorganismo por su capacidad de modificar el ambiente en el que habitan, al absorber sustancias necesarias para su desarrollo y al liberar metabolitos de desecho como enzimas o exotoxinas (Gamazo, López-Goñi, y Díaz, 2005).

Cada tipo bacteriano reacciona de forma propia y específica con el medio que les rodea, reflejando un concreto equipo enzimático. De esta manera, la caracterización de estas enzimas resulta muy favorable para identificación y clasificación bacteriana. Con este fin, se han diseñado medios de identificación o pruebas diferenciales. De acuerdo a la reacción que presenten las bacterias en estas pruebas bioquímicas se puede interpretar los resultados y lograr su identificación (Gamazo, López-Goñi, y Díaz, 2005), al sembrar las bacterias a ser examinadas en el medio de identificación, estas reaccionan sobre ciertos componentes particulares del medio, exponiendo

alguna de sus propiedades, a través de distintos indicativos como pueden ser cambio de color del medio o producción de gas (Pumarola, 1999).

1.4.7.3 Pruebas de Antagonismo

El antagonismo microbiano es un fenómeno ampliamente extendido entre los microorganismos. John L. Ingraham y Catherine A. Ingraham (1998) definen al antagonismo microbiano como la inhibición del crecimiento microbiano por acción de otro microorganismo. Puede existir una gran competencia entre los microorganismos para colonizar los ambientes que habitan, sea en su entorno natural como en la rizósfera o en un ambiente controlado en laboratorio. En la rizósfera los microorganismos han desarrollado estrategias como una alta tasa de crecimiento, movilidad y catabolismo de compuestos determinados excretados por las plantas, resistencia a condiciones específicas del suelo, síntesis de sustancias que le de acceso a penetrar a la raíz o a adherirse a esta y producción de antibióticos y sideróforos (Anaya, Espinoza-García y Cruz-Ortega, 2001).

La competencia que puede desarrollarse entre los microorganismos se da por nutrimentos del sustrato (Anaya, Espinoza-García y Cruz-Ortega, 2001), inhibiendo el crecimiento de los microorganismos con capacidades menores de asimilación de dichos nutrimentos; pero también puede darse inhibición del crecimiento bacteriano por exudados específicos que son liberados al medio, producto del metabolismo bacteriano (Cundom, Mazza de Gaid, Mazzanti de Castañon y Gutiérrez, 2000).

Las pruebas *in vitro* para decretar el potencial antagónico de un microorganismo con respecto a otro, se pueden apreciar tras la formación de halos de inhibición entre las cepas confrontadas, los resultados no necesariamente representan el grado de antagonismo en condiciones naturales (Cundom *et al*, 2000) pero reflejan el comportamiento que tendrían al producir un inóculo mixto en laboratorio, como en el desarrollo de un biofertilizante. Al ser evaluada la actividad antagónica, de cada cepa con todas las demás, se asegura que en la preparación del biofertilizante de potasio no se de ningún

tipo de competencia o acciones inhibitorias, lo que garantiza un buen rendimiento del producto (Rodríguez, Rueda, Aura y Poutou, 2002).

1.5 Hipótesis

Microorganismos solubilizadores de potasio pueden ser aislados de suelos cultivados con alcachofa y de sus raíces, localizados en el sector “La Remonta” del cantón Cayambe.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

La investigación aquí detallada cuenta con el auspicio del Laboratorio Agrícola Agrodiagnostic. La fase de laboratorio se desarrolló en sus instalaciones ubicadas en la ciudad de Quito, en la Urbanización La Luz, calle Francisco Guardera N49-229 y Luis Calixto, oficina P25. Estos laboratorios respaldaron la investigación mediante apoyo logístico para muestreo, utilización de equipos, materiales, reactivos, dotación de información bibliográfica y asesoría de personal técnico capacitado.

2.2 Fase de Campo

2.2.1 Área de Muestreo

El muestreo, de suelos y raíces, se realizó en la única plantación de alcachofa existente en la localidad de la Remonta, cuya extensión fue de 15 ha, divididas en dos parcelas grandes de 10 y 5 ha cada una. La edad de las plantas de alcachofa fue de 7 meses en el momento de la toma de muestras (Anexo A). El cultivo se manejó de forma convencional (con fertilizantes químicos de Fertiandino, específicos para alcachofa denominados Alcachofa 1, 2, 3, 4, 5 y 6, compuestos por K_2SO_4 y KNO_3 , también se adicionó el fertilizante Brócoli 1.). La Remonta se sitúa en la parroquia Ayora, Cantón Cayambe.

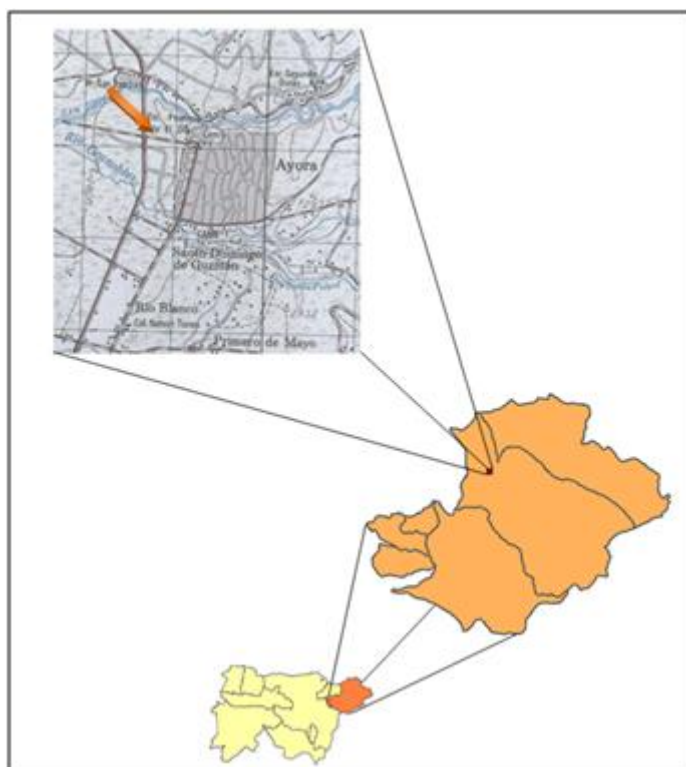


Figura 2.1 Localización del Cultivo de Alcachofa en La Remonta, ubicado en la parroquia Ayora, Cantón Cayambe de la Provincia de Pichincha. Modificado de Instituto Geográfico Militar (2010), Edufuturo (2010) y Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (2003).

2.2.2 Fase de Recolección de Muestras de Suelo de Cultivo de Alcachofa

Se utilizó una modificación del método propuesto por Héctor M. Coraspe y Sergio Tejera (2008) para toma de muestras:

1. Una vez recorrido el terreno se delimitaron los lotes o unidades de muestreo en los que se dividió el cultivo para la toma de muestras.
2. Las 15 ha de cultivo de alcachofa fueron completamente uniformes, se dividió cada lote de muestreo en extensiones de 5 000 m² cada una. De tal forma que se obtuvieron 30 lotes o unidades de muestreo.

3. Se recorrió cada unidad de muestreo al azar en forma de zigzag y cada 15 o 30 pasos se tomó una submuestra de suelo rizosférico, previa limpieza de la superficie del suelo.
4. En el lugar seleccionado para la submuestra, con la ayuda de una pala, se hizo un hueco junto a la raíz, entre 15 y 30 cm de profundidad.
5. Se retiró los extremos, hasta lograr una tajada de 5 cm de ancho aproximadamente.
6. Se colocó la submuestra en una bolsa.
7. La toma de submuestra se repitió hasta abarcar todo el lote de muestreo, depositando cada submuestra en el mismo recipiente.
8. Las submuestras obtenidas se mezclaron.
9. Se tomó una porción de esta mezcla (muestra compuesta) de 1 Kg en una bolsa plástica y se etiquetó.
10. El total de 30 muestras de suelo de 1 Kg, compuestas cada una por 30 submuestras aproximadamente, se transportaron en caja térmica refrigerada.
11. Una vez en el laboratorio se refrigeró a 4°C por 24 horas máximo.
12. Para iniciar un nuevo muestreo, en un lote diferente, se lavaron los instrumentos, se colocó alcohol antiséptico y se dejó evaporar.

2.2.3 Fase de Recolección de Muestras de Raíz de Alcachofa

El lugar de muestreo es el mismo que para la toma de muestras de suelo. Las raíces se tomaron en mismo número que las muestras de suelos, de

tal forma que se recolectó una muestra de raíz por unidad de muestreo, sumando 30 muestras de raíz. El procedimiento fue el siguiente:

1. Se tomaron al azar las muestras de raíz, siguiendo la división de lotes propuesta para la toma de muestras de suelo, obteniendo una muestra de raíz por cada lote.
2. Se extrajeron segmentos de raíces de 10 a 20 cm aproximadamente, sin ocasionar daños mecánicos, el suelo fue separado cuidadosamente de las raíces al agitar moderadamente la muestra.
3. Las raíces se colocaron, de forma individual, en bolsas plásticas y se etiquetaron.
4. Se transportaron en caja térmica refrigerada.
5. Una vez en el laboratorio se refrigeraron a 4°C por 24 horas máximo.
6. Para iniciar un nuevo muestreo se lavaron los instrumentos, se colocó alcohol antiséptico y se dejó evaporar.

2.3 Fase de Laboratorio

2.3.1 Aislamiento de Microorganismos Solubilizadores de Potasio a partir de las Muestras de Suelo por Dilución Seriada

Se emplea una variante del aislamiento realizado por Andrade y Gordillo (2008):

1. Se homogenizó la muestra.
2. Se tamizó con poro de 2 mm.

3. Una muestra de 10 g de este suelo se diluyó en 90 ml de agua peptonada estéril al 0.1%.
4. A partir de esta muestra se preparó soluciones seriadas, en agua peptonada estéril al 0,1%, en base 10 hasta 10^{-4} .
5. Se sembró por duplicado las muestras con diluciones de 10^{-3} y 10^{-4} por el método de superficie, en medio específico (Medio Pikovskaya Modificado), en un máximo de 30 minutos posteriores a la preparación de las diluciones.
6. Se incubaron a 31°C por 48 horas.
7. Las colonias con halo se aislaron, por el método de agotamiento en superficie.

2.3.2 Aislamiento de Microorganismos Solubilizadores de Potasio a partir de las Muestras de Raíz

El método que se emplea es sugerido por Agrodiagnostic:

1. Se cortaron las raíces aisladas en secciones de 5 a 7 cm de longitud.
2. Una sección de raíz se introdujo en Medio Pikovskaya Modificado líquido.
3. Se sembraron dos tubos por cada raíz.
4. Los tubos se incubaron por 48 horas a 31°C .
5. Se diluyó 1 ml del medio en el que se incubaron las raíces, en 9 ml de agua peptonada estéril al 0,1%.

6. A partir de esta muestra se prepararon soluciones seriadas en base 10 hasta 10^{-4} , en agua peptonada estéril al 0,1%.
7. Se sembraron por duplicado por la técnica de siembra en superficie, 100 μ l de las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} , en medio sólido específico (Medio Pikovskaya Modificado), en un máximo de 30 minutos posteriores a la preparación de las diluciones.
8. La incubación fue a 31°C por 48 horas.
9. Se aislaron las colonias con halo, por el método de agotamiento en superficie.

2.3.3 Medio utilizado para Aislamiento

El medio específico para el aislamiento y desarrollo de los microorganismos solubilizadores de potasio que se utilizó fue una modificación de la composición del medio Pikovskaya, sugerencia realizada por M. M. Martínez, Coordinadora del Laboratorio de Microbiología de Suelos y Medio Ambiente de la Pontificia Universidad Javeriana de Colombia (comunicación personal, octubre 23, 2008).

La composición del medio Pikovskaya modificado empleado se detalla a continuación:

- | | |
|-------------------------------|-------------|
| • Glucosa | 10 g/L |
| • Nitrato de potasio | 5 g/L |
| • Cloruro de potasio | 0.2 g/L |
| • Sulfato de amonio | 0.5 g/L |
| • Sulfato de magnesio | 0.1 g/L |
| • Sulfato de manganeso trazas | 0.1 g/L |
| • Púrpura de Bromocresol | 0.125 g/L |
| • Agar | 15 g/L |
| • pH | 7.0 \pm 2 |

El medio cambia de color morado a amarillo, indicando la acción solubilizadora de los microorganismos.

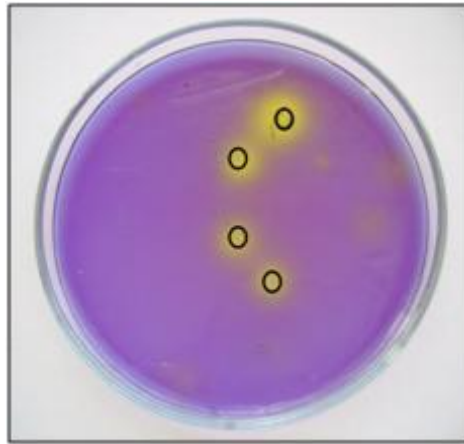


Figura 2.2 Fotografía del medio Pikovskaya modificado y acción de las colonias solubilizadoras de potasio, señaladas en círculos, tras 48 horas de incubación.

(Guevara G., 2009).

La composición del medio líquido específico es la misma que la del medio Pikovskaya modificado, pero sin la adición de agar ni púrpura de bromocresol.

2.3.4 Evaluación de la Actividad Solubilizadora de las Cepas Aisladas

1. Se colocó una sección de aproximadamente 1 cm de longitud de sorbete estéril de 0.5 cm de diámetro, sobre el medio sólido Pikovskaya modificado.
2. Se dispensó dentro de cada sorbete, 100 μ l del caldo nutritivo que contenía al microorganismo puro, en escala 2 de McFarland, por triplicado.
3. Se cultivaron a 31°C, se evaluó la medida del halo de solubilización a las 24 y 48 horas de cultivo.
4. El medio cambió de color morado a amarillo, indicando la acción solubilizadora de los microorganismos.

5. Por medio del diámetro del halo de solubilización obtenido, se determinó la actividad solubilizadora a través pruebas estadísticas. Los halos deben ser visibles y bien diferenciados.

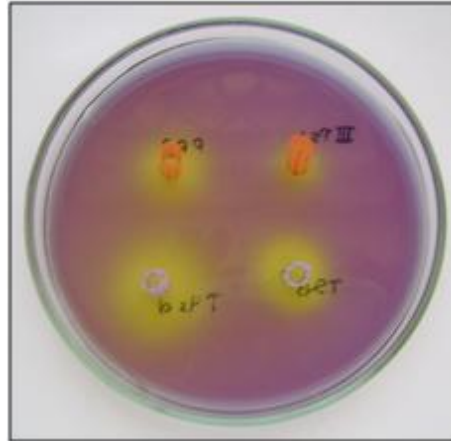


Figura 2.3 Fotografía de los halos de solubilización al evaluar la actividad solubilizadora de potasio, en medio Pikovskaya modificado, tras 48 horas de incubación. (Guevara G., 2009).

2.3.5 Identificación de las Cepas Previamente Aisladas

La identificación de las cepas se realizó únicamente con aquellas que demostraron las mejores características solubilizadoras de potasio. Para lograr dicha identificación se realizaron tres procedimientos distintos: descripción macroscópica, descripción microscópica y pruebas bioquímicas.

Para la descripción macroscópica se actuó bajo guía la propuesta por Díaz (2010b) para la Morfología y Estructura Bacteriana, logrando delinear la morfología de las colonias aisladas.

Al realizar la descripción microscópica se realizó tinción Gram y se clasificó a los microorganismos como grampositivos o gramnegativos, a continuación se identificó la forma celular de los microorganismos aislados.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas anteriores y siguiendo los criterios del Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey, se

aplicaron las pruebas bioquímicas respectivas para identificar el género de las bacterias en estudio.

2.3.6 Establecimiento del Cepario

Para esta tarea, se usó la técnica empleada por los Laboratorios Agrodiagnostic en la preparación de bancos de bacterias para la elaboración de sus diferentes productos. El cepario se estableció únicamente con las bacterias que presentaron las mejores propiedades solubilizadoras de potasio.

1. Se preparó 50 ml de caldo nutritivo, en el cual se cultivó el microorganismo hasta lograr la escala 2 de McFarland.
2. Se adicionó 50 ml de caldo nutritivo y glicerol en partes iguales, esta emulsión fue esterilizada.
3. Se mezcló la emulsión mencionada con el cultivo microbiano y se dispensó en 100 criotubos con 1 ml de la mezcla en cada uno, se congeló a -20 °C.
4. El 30% de los criotubos formaron el cepario primario y los tubos restantes constituyeron el cepario secundario.

2.3.7 Desarrollo de las pruebas de antagonismo

El método que se empleó es una modificación realizada bajo dirección de Agrodiagnostic, a la técnica propuesta por Huilcapi (2007). Las pruebas de antagonismo se realizaron exclusivamente con los microorganismos que se conservan en el cepario o banco. Estas pruebas se realizan por triplicado.

1. Se sembró de forma masiva cada microorganismo en agar nutritivo, de manera individual.

2. Sobre este se colocó un fragmento de sorbete estéril de longitud próxima a 1 cm y 0.5 cm de diámetro.
3. En el interior del sorbete se dispensó 100 μ l del caldo nutritivo que contiene el microorganismo a ser confrontado con el microorganismo presente en el agar, el caldo estuvo en escala 2 de McFarland.
4. Se incubó a 31°C por un periodo de 24 horas.
5. En caso de existir antagonismo negativo se observó crecimiento masivo alrededor del sorbete.
6. El antagonismo positivo se determinó por el crecimiento limitado del microorganismo alrededor del sorbete, dando como resultado un halo transparente al contorno del sorbete.
7. Se aceptó como antagonismo positivo halos iguales o mayores a 20 mm, datos que fueron analizados a través de pruebas estadísticas.

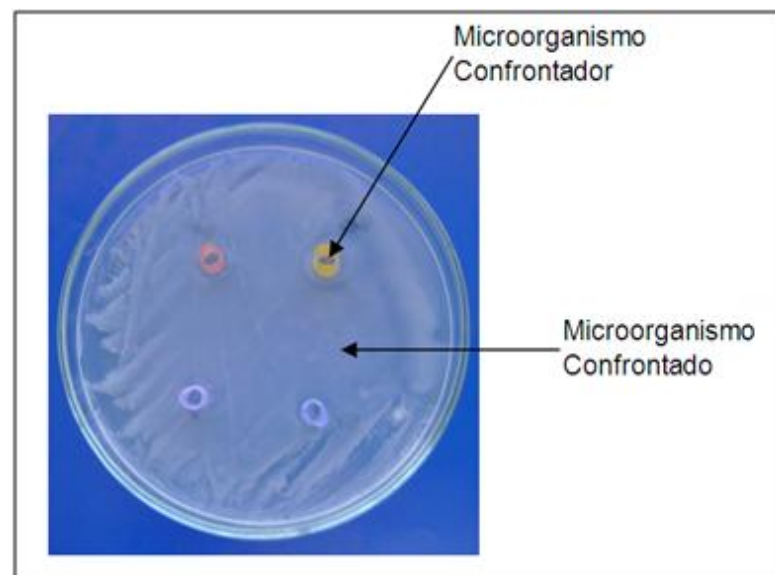


Figura 2.4 Fotografía de las pruebas de antagonismo, tras 24 horas de incubación. En los cuatro casos aquí observados se registra antagonismo negativo (Guevara G., 2009).

2.4 Análisis de Datos

La selección de las cepas con mejores características solubilizadoras de potasio, se basa en la medición de los halos de solubilización producidos por cada cepa en medio Pikovskaya modificado.

Considerando el diámetro de este halo se aceptan como cepas buenas solubilizadoras aquellas que presenten halos iguales o mayores que 15 mm. La prueba se realizó por triplicado y se tomaron medidas a la 24 y 48 horas de incubación.

Se realizó un Análisis de Varianza (ADEVA) para cada tiempo de incubación, se tomó como variable dependiente el diámetro del halo y como factor las cepas evaluadas. Los valores tomados en las pruebas de solubilización se analizaron también a través de la prueba de rangos múltiples de Duncan, lo que permitió determinar las cepas con mejores características de solubilización de potasio.

Para desarrollar las pruebas de antagonismo se consideró el diámetro del halo de inhibición para designar con antagonismo positivo a halos iguales o mayores que 20 mm. Las pruebas se realizaron por triplicado con un tiempo de incubación de 24 horas. Para el Análisis de Varianza se consideró como variable dependiente al halo de inhibición, y como factor se tomó a los microorganismos confrontados. Se realizó la prueba de rangos múltiples de Duncan para encontrar diferencias significativas.

Los datos obtenidos fueron analizados con la ayuda de los programas Microsoft Office Excel 2007 y SPSS 15.0 para Windows.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Aislamiento

Al procesar las muestras de suelos y de raíces y sembrar estas en medio Pikovskaya modificado se evidenció el crecimiento de bacterias y hongos filamentosos. Sin embargo, no se desarrollaron hongos levaduriformes en ninguna de muestras estudiadas.

Puesto que la presente investigación es parte de un macro estudio que pretende crear un biofertilizante de potasio por parte de la empresa auspiciante, y con la finalidad de introducir en este producto los mejores microorganismos solubilizadores de potasio aquí aislados se desecharon los hongos filamentosos encontrados debido a que al crear un biofertilizante en el que se hallen en consorcio estos hongos y bacterias, la población de bacterias puede disminuir por acción de los hongos debido a la tendencia que se da en este tipo de interacciones. De esta manera la investigación se desarrolló únicamente con bacterias. Se lograron aislar bacilos gramnegativos (72.22%), bacilos grampositivos (22.22%) y cocos gramnegativos (5.56%).

3.2 Evaluación de la Actividad Solubilizadora

Tras la evaluación de la forma celular, la respuesta a la tinción gram y las características morfológicas de cada colonia aislada, se seleccionó una cepa de cada tipo, para la evaluación de la actividad solubilizadora. Bajo la duda de tratarse de una cepa única o duplicada, se procedió a realizar la prueba de evaluación de la actividad solubilizadora del microorganismo en cuestión. Un total de dieciocho cepas fueron evaluadas.

El Análisis de Varianza realizado a las 24 horas de incubación, muestra alta significancia estadística en los tratamientos o cepas bacterianas evaluadas, lo que quiere decir que difieren en su capacidad solubilizadora (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Análisis de Varianza para las pruebas de solubilización a las 24 horas de incubación.

FUENTE DE VARIABILIDAD	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	P/VALOR	F
Total	53	1138.25		
Cepas Bacterianas	17	873.08	0.0017	6.97**
Error	36	265.17		

Coeficiente de Variación: 38,72%

Los halos de solubilización evaluados no formaron círculos exactos, por lo que se tomaron las medidas de tres diámetros en cada halo, el valor promedio de estos se empleó para la realización de las pruebas estadísticas. Estos promedios junto con la procedencia de cada muestra constan en el Anexo B. El promedio del diámetro de solubilización a las 24 horas de incubación fue de 7.01 mm.

Al realizar la prueba de Duncan se encontró que a las 24 horas de incubación, las cepas formaron 6 grupos, como muestra la Tabla 3.2, en donde el subconjunto “a” exhibe los mejores promedios y el subconjunto “b” los promedios más bajos (Figura 3.1).

Tabla 3.2 Prueba de rangos múltiples de Duncan para la variable halo de solubilización, medido en mm, a las 24 horas de incubación.

CÓDIGO DE AISLAMIENTO	N	SUBCONJUNTO PARA ALFA = 0.05					
		b	c	d	e	f	a
Sab	3	0.00					
AVS3	3	0.00					
Rd	3	0.00					
Sx	3	3.33	3.33				
Sw	3		5.00	5.00			
AJS2	3		6.33	6.33	6.33		
Ss	3		6.67	6.67	6.67		
Rc2	3		7.50	7.50	7.50	7.50	
Sb	3		7.67	7.67	7.67	7.67	
Sr2	3		7.67	7.67	7.67	7.67	
Sz	3		8.00	8.00	8.00	8.00	
Sf	3		8.00	8.00	8.00	8.00	
Rh	3		8.33	8.33	8.33	8.33	
Sy	3			8.67	8.67	8.67	
Re	3				10.33	10.33	10.33
Sj	3					12.00	12.00
Sc	3					12.33	12.33
Sk	3						14.33
Significancia		0.18	0.06	0.17	0.14	0.07	0.11

Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.00

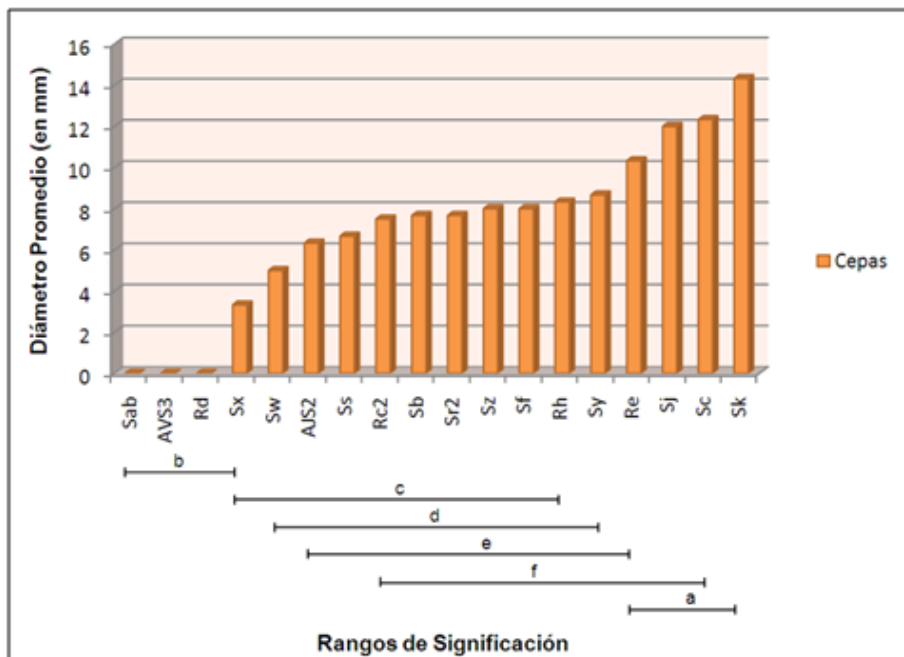


Figura 3.1 Rangos de Significación para la Prueba de Duncan para la variable diámetro de solubilización, a las 24 horas de incubación.

La capacidad solubilizadora analizada a las 48 horas de incubación, presenta alta significancia estadística para las cepas bacterianas evaluadas (Tabla 3.3).

Tabla 3.3 Análisis de Varianza para las pruebas de solubilización a las 48 horas de incubación.

FUENTE DE VARIABILIDAD	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	P/VALOR	F
Total	53	4103.93		
Cepas Bacterianas	17	2467.26	5.54 E-07	3.19**
Error	36	1636.67		

Coefficiente de Variación: 51,72%

Al igual como ocurrió a las 24 horas de incubación, los halos de solubilización formados a las 48 horas de incubación no generaron círculos perfectos, razón por la que se tomaron las medidas de tres diámetros en cada halo y el valor promedio de estos (Anexo B), se utilizó en las pruebas estadísticas. El promedio del diámetro de de solubilización a las 48 horas de incubación fue de 13.04 mm.

La prueba de Duncan señala que a las 48 horas de incubación, las cepas evaluadas fueron agrupadas en 5 grupos (Tabla 3.4), de los cuales el grupo “a” está formado por las cepas con mejores promedios de halos de solubilización, es decir estas bacterias presentan las mejores características solubilizadoras de potasio y el grupo “b” presenta los promedios más bajos (Figura 3.2).

Tabla 3.4 Prueba de rangos múltiples de Duncan para la variable halo de solubilización, medido en mm, a las 48 horas de incubación.

CÓDIGO DE AISLAMIENTO	N	SUBCONJUNTO PARA ALFA = 0.05				
		b	c	d	e	a
Rd	3	2.33				
Sab	3	4.00	4.00			
AVS3	3	6.67	6.67	6.67		
Sw	3	8.00	8.00	8.00	8.00	
AJS2	3	8.67	8.67	8.67	8.67	
Rc2	3	9.00	9.00	9.00	9.00	
Sz	3	9.67	9.67	9.67	9.67	
Rh	3	10.00	10.00	10.00	10.00	
Sf	3	11.00	11.00	11.00	11.00	
Sx	3	11.00	11.00	11.00	11.00	
Sb	3	11.00	11.00	11.00	11.00	
Sy	3		16.00	16.00	16.00	16.00
Sj	3		16.67	16.67	16.67	16.67
Sr2	3			18.33	18.33	18.33
Sc	3			19.67	19.67	19.67
Ss	3				20.67	20.67
Sk	3					24.67
Re	3					27.33
Significancia		0.19	0.06	0.06	0.06	0.08

Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.00

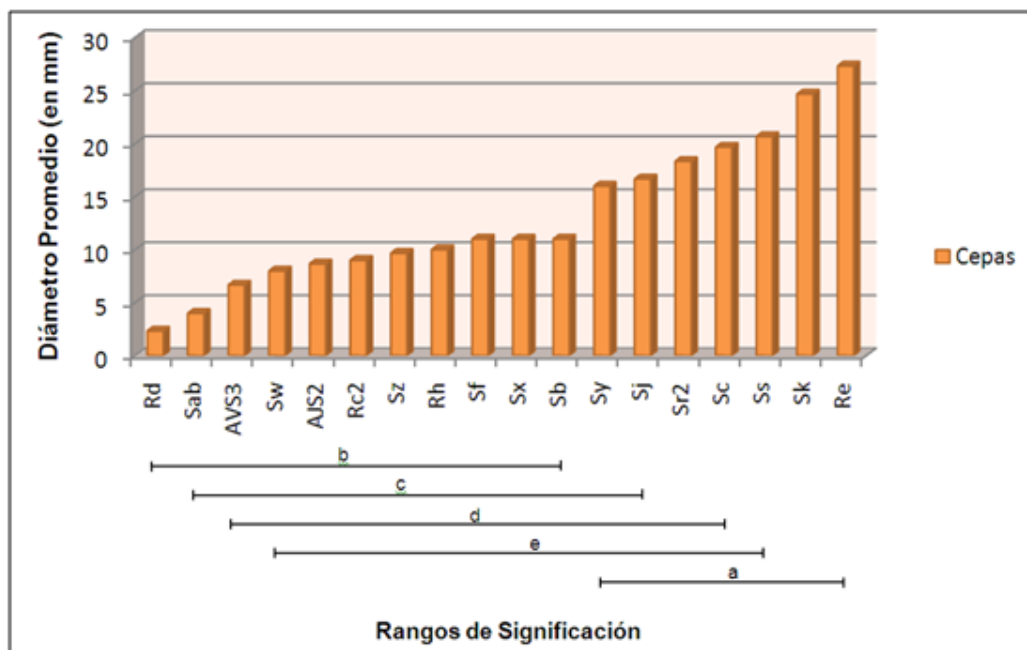


Figura 3.2 Rangos de Significación para la Prueba de Duncan para la variable diámetro de solubilización, a las 48 horas de incubación.

Los mayores halos de solubilización se obtuvieron a las 48 horas de incubación (Tabla 3.4), donde se registró un diámetro de 40 mm siendo esta la medida más alta alcanzada en toda la investigación. La diferencia en promedio fue de 6.03 mm entre los diámetros a las 48 y 24 horas de cultivo (Tabla 3.5).

Tabla 3.5 Datos estadísticos descriptivos de los diámetros de halos de solubilización, medidos en mm, para 24 y 48 horas de incubación.

HORAS DE INCUBACIÓN	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
24	54	0	18	7.01	4.63
48	54	0	40	13.04	8.8

A las 24 horas de incubación, las cepas que se aislaron de la raíz de alcachofa, no presentaron buena solubilización. Según este estudio, para las cepas aisladas del suelo, apenas el 9.50% de las mismas tuvieron buena solubilización. De igual forma, el 92.60% de las muestras evaluadas presentaron mala solubilización tras 24 horas de cultivo. Los detalles se muestran en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6 Tabla de contingencia para la Capacidad Solubilizadora a las 24 horas de incubación, en relación a la procedencia de la muestra.

			CAPACIDAD SOLUBILIZADORA		TOTAL
			BUENA	MALA	
PROCEDENCIA	Raíz	Recuento	0	12	12
		Porcentaje	0.00	100.00	100.00
	Subtotal %		0.00	24.00	22.20
	Suelo	Recuento	4	38	42
Porcentaje		9.50	90.50	100.00	
Subtotal %		100.00	76.00	77.80	
TOTAL	Recuento		4	50	54
	Porcentaje		7.40	92.60	100.00
Total %		100.00	100.00	100.00	

A las 48 horas de incubación, se puede apreciar un incremento notable en la capacidad solubilizadora. El 31.50% de las cepas evaluadas, procedentes tanto de raíz y suelo, presentan aparentemente buena capacidad solubilizadora. De las cepas de provenientes de raíz de alcachofa, el 16.70% tienen buena capacidad solubilizadora. Mientras que de las cepas de proviene de suelos cultivados con esta *Asteraceae*, el 35.70% tienen buena capacidad para solubilizar potasio (Tabla 3.7).

Tabla 3.7 Tabla de contingencia para la Capacidad Solubilizadora a las 48 horas de incubación, en relación a la procedencia de la muestra.

			CAPACIDAD SOLUBILIZADORA		TOTAL
			BUENA	MALA	
PROCEDENCIA	Raíz	Recuento	2	10	12
		Porcentaje	16.70	83.30	100.00
	Subtotal %		11.80	27.00	22.20
	Suelo	Recuento	15	27	42
Porcentaje		35.70	64.30	100.00	
Subtotal %		88.20	73.00	77.88	
TOTAL	Recuento		17	37	54
	Porcentaje		31.50	68.50	100.00
Total %		100.00	100.00	100.00	

Se observó que en la mayoría de casos, se presentaron halos menores a 15 mm, lo que indica mala capacidad solubilizadora (Figura 3.3).

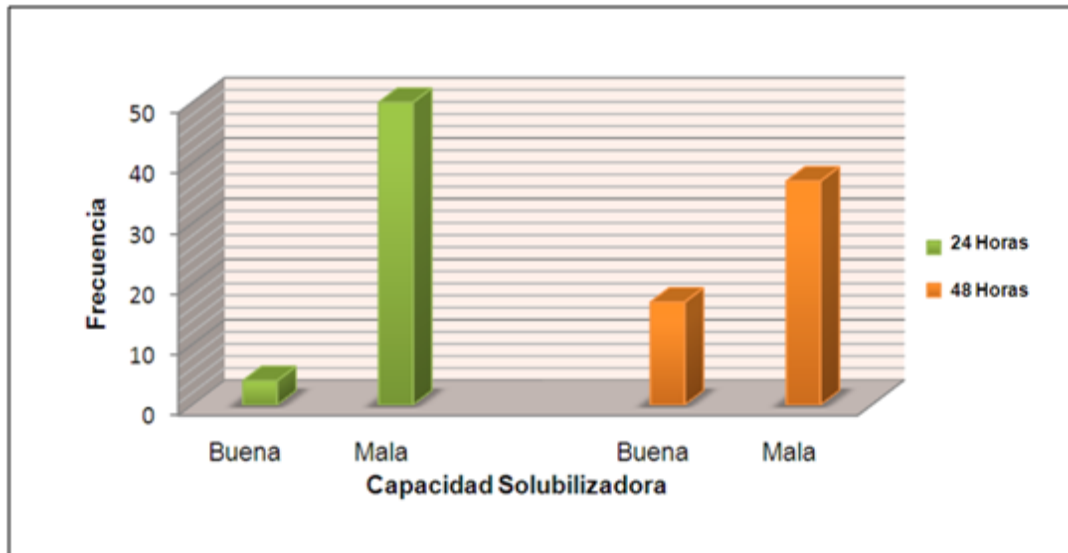


Figura 3.3 Frecuencia de aparición de buenos y malos halos de solubilización, a las 24 y 48 horas de incubación.

Basándose en los agrupamientos realizados en la Prueba de rangos múltiples de Duncan a las 48 horas de incubación, se determinó como mejores cepas solubilizadoras de potasio a aquellas que forman parte del grupo con mayores promedios (Tabla 3.8). Todos los promedios obtenidos de la prueba de Duncan se muestran en la Tabla 3.5.

Tabla 3.8 Cepas aisladas que presentan las mejores características de solubilización de potasio, con los promedios respectivos del halo de solubilización en mm y su procedencia.

CÓDIGO DE AISLAMIENTO	PROMEDIO	PROCEDENCIA
Sy	16.00	Suelo
Sj	16.67	Suelo
Sr2	18.33	Suelo
Sc	19.67	Suelo
Ss	20.67	Suelo
Sk	24.67	Suelo
Re	27.33	Raíz

3.3 Identificación de las Cepas con Mejores Características Solubilizadoras

Una vez determinadas las cepas con las mejores características solubilizadoras, se procedió a la identificación de su género. Inicialmente se determinó la tinción Gram y la forma celular (Tabla 3.9)

Tabla 3.9 Forma y reacción a la tinción Gram de las bacterias con mejores características solubilizadoras de potasio.

CÓDIGO DE AISLAMIENTO	FORMA DE LA BACTERIA	TINCIÓN GRAM
Re	Bacilo	Positivo
Sy	Bacilo	Positivo
Sc	Bacilo	Negativo
Sk	Bacilo	Negativo
Ss	Bacilo	Negativo
Sr2	Bacilo	Negativo
Sj	Coco	Negativo

La cepa codificada como Sj al ser un coco gramnegativo, con altas posibilidades de ser patógeno y a pesar de presentar buenas características solubilizadoras, fue descartada de la investigación.

En el estudio de las características de las colonias se hallaron diversas morfologías, con predominancia de colonias de superficie lisa opaca y pigmentación blanca. Todos estos rasgos se describen en la Tabla 3.10. El 50.00 % de las colonias son de tamaño pequeño (1 mm de diámetro o menor), el 33.33 % mediano (hasta 4 mm de diámetro) y el 16.67 % es grande (mayores que 4 mm de diámetro). En cuanto a la morfología el 50.00 % tienen el borde liso redondo y su forma de elevarse es plana con centro elevado. Mayores referencias se hallan en la tabla 3.11.

Tabla 3.10 Características de las colonias formadas por las bacterias con mejores características solubilizadoras de potasio.

COD	TAMAÑO	MORFOLOGÍA		SUPERFICIE	CONSISTENCIA	PIGMENTACION
		BORDE	FORMA DE ELEVARSE			
Re	grande	liso redondo	plana con centro elevada	lisa opaca	grasienta	blanca
Sy	pequeño	liso redondo	plana con centro elevada	lisa opaca	grasienta	blanca
Sc	mediano	irregular lobulado	plana con centro elevada	lisa opaca	cremosa	blanca
Sk	mediano	irregular lobulado	semiesférica o convexa	lisa opaca	cremosa	blanca
Ss	pequeño	liso redondo	plana con centro elevada	lisa opaca	grasienta	blanca
Sr2	pequeño	irregular lobulado	plana con centro elevada	lisa opaca	grasienta	blanca

Tabla 3.11 Tabla de contingencia para la morfología de las colonias, en relación a su tamaño.

TAMAÑO	MORFOLOGÍA				TOTAL	%
	LISO REDONDO		IRREGULAR LOBULADO			
	PLANA CON CENTRO ELEVADA	SEMIESFÉRICA O CONVEXA	PLANA CON CENTRO ELEVADA	SEMIESFÉRICA O CONVEXA		
GRANDE	1	0	0	0	1	16.67
MEDIANO	0	0	1	1	2	33.33
PEQUEÑO	2	0	1	0	3	50.00
TOTAL	3	0	2	1	6	
%	50.00	0.00	33.33	16.67		

Las pruebas bioquímicas que se aplicaron para poder determinar el género de los microorganismos de interés fueron TSI Agar, Simmons Citrato Agar, SIM Medio, MR-VP Medio, Ureasa Medio, Oxidasa y Catalasa. Sus resultados se muestran en la Tabla 3.12.

Tabla 3.12 Resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas a las cepas de interés.

COD	TSI			CI	SIM			MR-VP		U	O	C
	P/F	G	Ac		M	I	Ac	MR	VP			
Re	K/A	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
Sy	A/A	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Sc	A/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
Sk	A/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
Ss	A/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
Sr2	A/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+

P/F – Pico/Fondo

G – Gas

Ac – Ácido Sulfhídrico

CI – Citrato

M – Motilidad

I – Indol

U – Urea

O – Oxidasa

C – Catalasa

La bacteria codificada como Re se fue identificada como *Bacillus* puesto que presenta características relevantes para este género, como sus células que son grampositivas y tienen forma de bastones rectos formando cadenas, con bordes cuadrados, así mismo presentan motilidad positiva y catalasa positiva. El análisis para la bacteria cuyo código es Sy mostró que se trata de un miembro del género *Clostridium*, dado que sus células presentan forma de bastón, frecuentemente distribuidas en pares, con terminaciones redondeadas, sus células son grampositivas. Esta bacteria se distingue por la motilidad positiva junto con catalasa y oxidasa negativas. Finalmente, las bacterias Sc, Sk, Ss y Sr2, demostraron pertenecer al género *Pseudomonas*. Estas son gramnegativas y sus células tienen forma de bastón o de cocobacilo, otra característica esencial para este género es la reacción de catalasa positiva. De esta manera se determinaron los géneros expuestos en la Tabla 3.13. En el Anexo C se encuentran fotografías de las células bacterianas anteriormente mencionadas.

Tabla 3.13 Géneros de las bacterias seleccionadas con las mejores características solubilizadoras de potasio, con su respectivo código de aislamiento.

CÓDIGO DE AISLAMIENTO	GÉNERO
Re	<i>Bacillus sp.</i>
Sy	<i>Clostridium sp.</i>
Sc	<i>Pseudomonas sp.</i>
Sk	<i>Pseudomonas sp.</i>
Ss	<i>Pseudomonas sp.</i>
Sr2	<i>Pseudomonas sp.</i>

3.4 Pruebas de Antagonismo

Las pruebas de antagonismo se realizaron con las seis cepas anteriormente identificadas. Las medidas que se evaluaron fueron largo y ancho del halo formado, cuyos valores se muestran en el Anexo D.

Todos los tratamientos presentaron diámetros con medidas muy inferiores a los planteados para antagonismo positivo (20 mm), tal como se observa en la Tabla 3.14.

Tabla 3.14 Datos estadísticos descriptivos de los diámetros de largo y ancho de halos de inhibición, medidos en mm.

	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
Largo	90	0.00	9.15	2.17	2.98
Ancho	90	0.00	8.00	2.68	3.06

Es preciso mencionar que el diámetro del contenedor del microorganismo confrontador era de 5 mm, por lo que en muchos casos al tomar los datos de largo y ancho no es posible formar un plano, dado que en repetidas ocasiones una de las dos medidas es 0 mm. A partir de este punto se restó el diámetro del contenedor para realizar los cálculos correspondientes.

Por lo tanto se acepta como antagonismo positivo halos mayores o iguales que 15 mm. Los nuevos valores constan la Tabla 3.15.

Tabla 3.15 Datos estadísticos descriptivos de los diámetros de halos de inhibición, sin contar con el diámetro del contenedor, medidos en mm.

	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
Largo	90	0.00	4.15	0.39	0.72
Ancho	90	0.00	3.00	0.46	0.74
Promedio Largo y Ancho	90	0.00	3.13	0.43	0.66

Se puede determinar que entre todas las cepas evaluadas no existe antagonismo, puesto que en cada caso se registran valores muy inferiores a 15 mm, como se observa en la tabla anterior (Tabla 3.15). Sin embargo el Análisis de Varianza demuestra a continuación, que si existe diferencia significativa entre las cepas evaluadas con pruebas de antagonismo.

Para el Análisis de Varianza se consideró como variable dependiente al halo de inhibición que en este caso es el diámetro promedio entre largo y ancho para cada observación. Y como factor se tomó a los microorganismos confrontados. Se obtuvo como resultado que las cepas evaluadas presentan diferencia estadística, por la significancia demostrada en este ADEVA (Tabla 3.16).

Tabla 3.16 Análisis de Varianza para las pruebas de antagonismo.

FUENTE DE VARIABILIDAD	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	P/VALOR	F
Total	89	39.05		
Cepas Bacterianas	5	4.89	0.04	2.41*
Error	84	34.15		

Coefficiente de Variación: 149.93%.

La prueba de Duncan para la evaluación antagónica, permitió agrupar a las cepas en dos conjuntos (Figura 3.4). En la Tabla 3.17 se encuentran estos cálculos.

Tabla 3.17 Prueba de rangos múltiples de Duncan para la variable halo de antagonismo, medido en mm.

MICROORGANISMO CONFRONTADO	N	SUBCONJUNTO PARA ALFA = 0.05	
		b	a
Sr2	15	0.14	
Sy	15	0.15	
Sk	15	0.35	0.35
Re	15	0.48	0.48
Sc	15		0.71
Ss	15		0.71
Significancia		0.19	0.16

Usa el tamaño muestral de la media armónica = 15.00

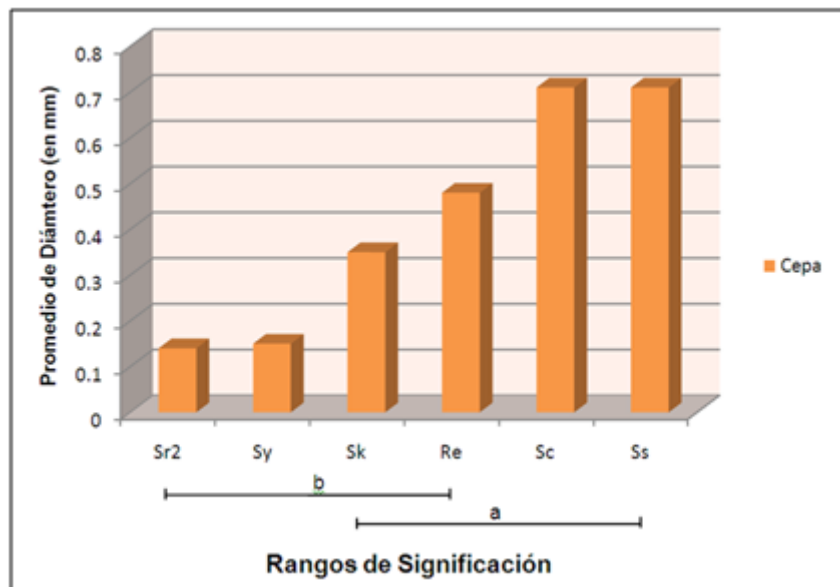


Figura 3.4 Rangos de Significación para la Prueba de Duncan para la variable diámetro del halo de antagonismo.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento

El aislamiento de los microorganismos solubilizadores de potasio se realizó a partir de suelos cultivados de alcachofa y sus raíces, de la localidad de la Remonta. Puesto que esta *Asteraceae* requiere para su producción suelos que contengan elevadas cantidades de este mineral (Giacconi y Escaff 2004), existe una probabilidad considerable de encontrar aquí microorganismos solubilizadores de potasio.

En el proceso de aislamiento de los microorganismos solubilizadores de potasio únicamente se encontraron bacterias y hongos filamentosos. No se encontraron levaduras. Si bien el suelo es el mayor reservorio para estos hongos levaduriformes, como lo indica Carrillo (2003), no se encuentran registros de levaduras capaces de solubilizar potasio, exclusivamente bacterias y hongos filamentosos (Delgado Higuera, 2002; Urbano, 2003).

Los microorganismos aislados en esta investigación serán parte del inóculo mixto que conformará un biofertilizante solubilizador de potasio, de tal forma que estará compuesto únicamente por bacterias. Se descartan los hongos encontrados debido a que estudios señalan que cuando las bacterias se asocian con hongos, la población de bacterias tiende a disminuir. En este tipo de interacciones bacteria-hongo, el hongo obtiene ganancias por las relaciones de parasitismo o depredación (Rivera-Cruz, Trujillo-Narcía, Ferrera, Rodríguez, Sánchez, Volke Haller y Fernández-Linares, 2006). Los hongos son capaces de secretar sustancias que pueden eliminar la población o las colonias bacterianas que se encuentren muy próximas (Fraume, 2007).

4.2 Actividad Solubilizadora

El medio Pikovskaya modificado empleado en esta investigación para el aislamiento de microorganismos solubilizadores de potasio contiene dos fuentes de potasio: nitrato de potasio (KNO_3) y cloruro de potasio (KCl). En el medio Pikovskaya original empleado para aislar microorganismos solubilizadores de fósforo, éstos usan el fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) como única fuente de fosfatos (Correa, 2008). Sin embargo, en el medio modificado los microorganismos solubilizadores de potasio podrían emplear potasio proveniente de KNO_3 (sustituto de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) y de KCl para realizar su acción solubilizadora (Sánchez (Ed.), 2007).

En muchos estudios se asocia la solubilización de potasio con la producción de ácidos de origen microbiano, principalmente orgánicos aunque distintas investigaciones proponen que los ácidos implicados en la liberación de potasio también pueden ser inorgánicos (Wuxing *et al*, 2007; Sugumaran & Janarthanam, 2007; Biotech International Ltda., 2006). La metodología aquí empleada se basa precisamente en esta propiedad de los microorganismos solubilizadores de potasio, resulta válido utilizar la acidificación como criterio de solubilización e incluir un indicador de pH en el medio Pikovskaya, que revela la excreción de ácidos y así permitir la identificación de los microorganismos de interés.

La oxidación parcial de la glucosa podría producir los ácidos orgánicos necesarios para dar lugar a la solubilización de potasio (Sugumaran & Janarthanam, 2007). Las bacterias *Pseudomonas* sp. (Sc, Sk, Ss, Sr2) y *Clostridium* sp. (Sy) aisladas en esta investigación, fermentan glucosa, lactosa y/o sacarosa, mientras que *Bacillus* sp. (Re) solamente fermenta glucosa; características reveladas por la prueba de TSI Agar (Britania, 2010).

Sin embargo, hay estudios que indican que la solubilización de potasio por parte de microorganismos puede darse sin la liberación de ácidos al medio, y por consiguiente sin la variación de pH (Sugumaran & Janarthanam, 2007; Lian *et al*, 2007). Dado que el medio Pikovskaya modificado cuenta con todos

los nutrientes y factores de crecimiento microbiano requerido por los microorganismos solubilizadores de potasio, es probable que las cepas que crecieron en este medio y no presentaron formación de halos pueden también ser capaces de solubilizar el mineral objeto del estudio. Un caso particular, señalado por Sugumaran y Janarthanam (2007) revela que *Bacillus mucillaginosus* no cambia el pH del medio durante la incubación, indicando que no produce ácidos. Es así que los polisacáridos secretados por las bacterias podrían estar relacionados con la liberación de potasio. La secreción de álcalis o de quelantes bacterianos podrían estar implicados en los mecanismos de solubilización de potasio que no emplean ácidos (Sugumaran & Janarthanam, 2007; Lian *et al*, 2007).

Los microorganismos que no forman halos y sin embargo solubilizan potasio, podrían reflejar esta capacidad en pruebas cuantitativas en medio líquido específico, que cuente con las fuentes de potasio soluble necesarias para este fin (Bonilla, 2005).

Las 18 cepas evaluadas mostraron alta significancia estadística, lo que demuestra que todas las cepas tienen diferentes capacidades solubilizadoras de potasio; indicando que cada una de ellas responde de manera diferente, incluyendo a aquellas que por similitudes morfológicas de las colonias, podrían estar duplicadas en los ensayos de solubilización. Esto sugiere que cada cepa evaluada pertenece a un tipo diferente de bacteria.

Los mayores halos de solubilización se obtuvieron a las 48 horas de incubación, con máximo de 18 mm de diámetro a las 24 horas mientras que a las 48 horas se alcanzó el diámetro máximo de 40 mm. Se puede apreciar una diferencia notable en cuanto al incremento de los diámetros de solubilización desde las 24 horas de incubación hasta las 48 horas. Los datos encontrados indican que los cálculos para determinar las cepas con mejores capacidades solubilizadoras podrían realizarse a partir de los diámetros obtenidos a las 48 horas de cultivo.

Del total de 18 cepas evaluadas, 14 provienen de suelos y 4 de raíces. Probablemente el número de cepas aisladas de raíces hubiese sido mayor si se implementaba agitación en los tubos con medio líquido Pikovskaya modificado, en los cuales se incubaron las raíces, puesto que en los medios líquidos las bacterias utilizan fundamentalmente el oxígeno aquí disuelto (Ertola, Yantorno y Mignone, 2010) y la agitación incrementaría el intercambio de oxígeno, creando condiciones más favorables para el desarrollo de las bacterias en donde pudieron desarrollarse microorganismos que no lo hicieron a través del método empleado en la presente investigación.

Las 18 cepas evaluadas fueron sometidas a las pruebas de solubilización con repeticiones, dando un total de 54 ensayos. A las 48 horas de incubación, el 31.50 % de estos produjo resultados con buena capacidad solubilizadora, correspondiendo el 11.80 % a raíz y 88.20 % a suelo. Como se puede apreciar, la mayoría de cepas seleccionadas con mejores características solubilizadoras de potasio provienen de suelos, guardando concordancia con el hecho de que el mayor número de cepas analizadas también proceden de suelos.

4.3 Identificación de las Cepas con Mejores Características Solubilizadoras

Las 7 cepas seleccionadas con mejores características presentaron diámetros promedios que van desde los 16.00 mm hasta los 27.33 mm. Siendo el menor para *Clostridium* sp. y el mayor valor para *Bacillus* sp. Es justamente este último género bacteriano el que reporta un considerable número de investigaciones con respecto a su capacidad solubilizadora de potasio, debido a su gran potencial, tal como muestran los trabajos de Sugumaran & Janarthanam (2007) y Wuxing *et al* (2007).

Los resultados obtenidos en la presente investigación muestran predominancia de bacilos gramnegativos (72.22%), de todos ellos sobresale el género *Pseudomonas*. Esto coincide con el hecho de que los microorganismos

más comunes que se hallan en el suelo colonizando la rizosfera son precisamente gramnegativos y de estos *Pseudomonas* parecen ser las más abundantes, probablemente se deba a su elevada versatilidad metabólica, lo que favorece su competitividad, como sugiere Collados (2006).

La constitución de la población bacteriana del suelo puede indicar las condiciones químicas y físicas de los mismos. La existencia de una bacteria como *Clostridium*, es evidencia de condiciones anaeróbicas, en la totalidad del suelo o en micrositos de este (Bautista (Ed.), 2004). Puesto que también se aislaron *Bacillus* que pueden ser aerobios estrictos o anaerobios facultativos (Organización Panamericana de la Salud, 2010) y sobretudo *Pseudomonas*, que son organismos aeróbicos estrictos (Figueroa-Arredondo, 2007), se puede presumir que las condiciones anaeróbicas en los suelos de los cultivos de alcachofa muestreados se dan únicamente en delimitados micrositos.

La cepa codificada como S_j fue descartada de la investigación por ser identificada como coco gramnegativo. La literatura escasamente reporta que el suelo sea un reservorio para este tipo de bacterias. Se señala que el 20% de los microorganismos del suelo rizosférico son gramnegativos, sin embargo se indica que estos presentan forma de bacilo; en el suelo se reportan cocos grampositivos. (Área de Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Extremadura, 2006). Por cuestiones de presupuesto no se realizaron las pruebas pertinentes para su debida identificación, y por temor a tratarse de un patógeno, se retiró la cepa considerada problema. Sin embargo, se conserva un cepario de ésta, con la finalidad de realizar estudios futuros, ya que podría tratarse de una cepa no reportada o simplemente confirmarse como una bacteria patógena conocida.

3.4 Pruebas de Antagonismo

Las pruebas de antagonismo se realizaron con las seis cepas anteriormente identificadas, que serían las bacterias a incluirse en un posible biofertilizante solubilizador de potasio. Todos los tratamientos presentaron

diámetros con medidas muy inferiores a los planteados para antagonismo positivo (20 mm), puesto que un halo menor no es tomado como una actividad antagónica significativa, siendo 9.15 mm la mayor extensión registrada, y en repetidas ocasiones la medida fue 0.00 mm; del manera que se consideró antagonismo negativo entre todas las cepas analizadas. Estos resultados pueden deberse al hecho de todas las bacterias fueron aisladas de un mismo cultivo de alcachofa, reflejando en cierto grado la relación ecológica de estas bacterias solubilizadoras de potasio en los suelos muestreados (Rodríguez *et al*, 2002).

El hecho de obtener medidas de antagonismo marcadamente bajas en relación al límite fijado en la investigación para establecer la existencia de antagonismo positivo, es un buen indicador del trabajo eficiente que pueden realizar las bacterias en un cultivo mixto, al ser utilizadas en un biofertilizante. Estas pruebas *in vitro* para establecer el potencial antagónica de una bacteria con respecto a otra, reflejan que la capacidad y la variabilidad genética de los microorganismos presentes en el biofertilizante serán eficientes en el campo (Cundom *et al*, 2000). Esto garantiza un gran rendimiento del producto (Rodríguez *et al*, 2002).

A pesar de que ninguna de las bacterias sometidas al ensayo presenta antagonismo negativo, todas respondieron de manera distinta, con baja actividad antagónica siendo estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de Rangos Múltiples de Duncan. Esta prueba las ubicó en dos grupos, en los cuales las bacterias del mismo género se colocaron en diferentes rangos, considerando el diámetro del halo de inhibición entre los microorganismos confrontados.

3.5 Cepario

Es primordial la conservación y mantenimiento de la colección de bacterias seleccionadas con las mejores características solubilizadoras de potasio. Los ceparios aquí desarrollados pretenden conservar los

cultivos viables a lo largo del tiempo, mantenerlos puros y libres de contaminación; almacenándolos estables, sin alteraciones en sus características. Al reducir la temperatura de las bacterias a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, el metabolismo de estas se reduce sustancialmente. En condiciones normales, este descenso en la temperatura podría ocasionar el rompimiento de las células tras la formación de cristales de hielo, adicionalmente al solidificarse el agua se halla una concentración de sales que podría afectar a la célula. La adición de glicerol al cultivo bacteriano, como agente protector de las células, neutraliza el efecto de las sales (Gonzales, 2010).

Se conservan ceparios de las seis cepas bacterianas identificadas con las mejores características solubilizadoras de potasio, divididos en dos grupos. El 30 % de los criotubos que conforman el banco de cada cepa reposa en el laboratorio auspiciante como banco de reserva, denominado cepario primario. Mientras que el 70 % de los criotubos que conforman el cepario secundario serán los que se tomarán para realizar las futuras investigaciones a desarrollarse a partir del presente estudio, como es el caso de la producción de un biofertilizante solubilizador de potasio.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

1. A partir de muestras de suelo y de raíces de cultivos de alcachofa de la localidad de La Remonta, cantón Cayambe, fue posible aislar microorganismos solubilizadores de potasio.
2. De un total de dieciocho cepas sometidas a las pruebas de solubilización, cuatro fueron aisladas a partir de raíz y catorce de suelo.
3. Las cepas aisladas que presentan las mejores características solubilizadoras de potasio fueron cuatro pertenecientes al género *Pseudomonas* sp., una a *Clostridium* sp. y una a *Bacillus* sp.
4. De las seis cepas con mejor respuesta solubilizadora, únicamente la del género *Bacillus* sp. pertenece a los microorganismos aislados de muestras de raíz.
5. El mejor diámetro de halo de solubilización en medio Pikovskaya modificado fue de 27.33 mm, como promedio de los halos obtenidos por acción de *Bacillus* sp.
6. Las pruebas de antagonismo realizadas entre las seis cepas que mostraron las mejores características de solubilización de potasio, fueron en todos los casos negativas.
7. Las cepas de *Pseudomonas* sp., *Clostridium* sp. y *Bacillus* sp., reposan en ceparios en el laboratorio auspiciante del presente estudio, para realizar futuras investigaciones, principalmente con respecto a la producción de un biofertilizante de potasio.

8. Los hongos filamentosos solubilizadores de potasio aislados en este estudio, no pudieron ser aislados ni conservados en ceparios debido a los procesos de investigación preestablecidos por el laboratorio auspiciante.

9. Las técnicas microbiológicas empleadas para aislar y determinar las mejores cepas solubilizadoras de potasio, reflejaron eficiencia y resultados adecuados, acordes a los objetivos de la investigación.

CAPÍTULO 6

RECOMENDACIONES

Se recomienda investigar los mecanismos de acción específicos para lograr la solubilización de potasio por medio de los microorganismos estudiados, su relación directa en suelos agrícolas así como la descomposición de minerales potásicos en campo. De igual manera es pertinente analizar a detalle su comportamiento *in vitro*; especificando los procesos bioquímicos que intervienen.

Debido a que en el presente estudio se eliminaron los hongos filamentosos encontrados, sería conveniente realizar investigaciones exclusivas para aislar hongos solubilizadores de potasio, siguiendo una metodología propia para este fin. Este trabajo podría revelar microorganismos con capacidades superiores a las registradas por bacterias.

Se recomienda realizar un estudio en el que se pretenda aislar microorganismos solubilizadores de potasio, cuyos mecanismos de acción no se realicen por medio de la producción de ácidos. Se debe utilizar medios selectivos que no necesiten evidenciar cambio de pH. Estos microorganismos podrían expresar su capacidad a través ensayos cuantitativos en medio líquido que contengan fuentes de potasio soluble.

Se debe continuar este estudio con etapas posteriores en las que se analicen todas las variables pertinentes para crear un producto biofertilizante solubilizador de potasio con las cepas bacterianas aisladas en la investigación, como el análisis de diferentes sustratos, concentraciones de microorganismos y su aplicación y efecto en campo.

Sería conveniente, al momento de realizar el biofertilizante, hacerlo con cepas específicas pertenecientes a las zonas y cultivos en los cuales se planea

utilizar el producto, con el fin de no introducir especies extrañas y mantener el equilibrio ecológico del sector.

De igual manera, sería favorable realizar estudios más avanzados y profundos que sustenten que las bacterias a emplearse en el biofertilizante no producen metabolitos que podrían resultar nocivos para otras especies que se encontrarían en el campo a aplicar el producto, desde microorganismos propios de ese suelo, hasta organismos mayores que podrían entrar en contacto con el cultivo biofertilizado, garantizando que no se afecta la ecología general de la zona. Así mismo, se deberían realizar investigaciones en las que se determine el tiempo (en años) de disponibilidad de potasio en el suelo, antes de que las bacterias agoten su contenido.

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

Anaya, A., Espinosa-García, F. y Cruz-Ortega R. (2001). Relaciones Químicas entre Organismos: Aspectos Básicos y Perspectivas de su Aplicación. México: P y V Editores.

Andrade, L. y Gordillo, A. Aislamiento e Identificación de Microorganismos Solubilizadores de Fosforo a partir de Suelos Ecuatorianos. Tesis de Licenciatura en Microbiología Clínica y Aplicada, Pontificia Universidad Católica de Quito (2008).

Área de Edafología y Química Agrícola. (2006). El Suelo como Hábitat. Microorganismos del Suelo. Bacterias. Liberación de Nutrientes. Extraído el 11 de Septiembre, 2008, del sitio Web de la Universidad de Extremadura: <http://www.unex.es/edafo/ECAP/ECAL6MBactLibNutr.htm>

Arévalo, E. (2009). Más Arroz a Menos Costos con la Aplicación de Biofertilizantes y Materia Orgánica. Revista Arroz, 57, 26-28. Extraído el 25 de febrero, 2010, de <http://www.fedearroz.com.co/revistanew/Arroz478.pdf#page=26>

Asprelli, P., Cravero, V. y Cointry, E. (2001). Evaluación de la Variabilidad presente en una Población de Clones de Alcaucil (*Cynara Scolymus* L.).

Extraído el 2 de marzo, 2010, del sitio Web de la Universidad Nacional de Rosario: <http://www.fcagr.unr.edu.ar/Investigacion/revista/rev1/2.htm>

Bautista, F. (Ed.). (2004). Técnicas de Muestreo para Manejadores de Recursos Naturales. México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Benítez Burraco, A. (2005). Avances recientes en Biotecnología Vegetal e Ingeniería Genética de Plantas. Barcelona: Editorial Reverté.

Bidwell, R.G.S. (1993). Fisiología Vegetal. México D.F.: AGT Editors, S.A.

Biocultivos S.A. (2010). Cepa Azotobacter chroococcum. Extraído el 25 de abril, 2010 de <http://www.biocultivos.com.co/dctos/Ficha+Tecnica+Azotobacter+Chroococcum.pdf>

BIOFAG - Red Iberoamericana de Biofertilizantes Microbianos para la Agricultura. 2008. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Extraído el 8 de Septiembre, 2008 de <http://www.biofag.org.ar/>

Biotech International Ltda. (2006). Biopotash. Extraído el 24 de febrero, 2010 de <http://www.biotech-int.com/biopotash.html>

Blázquez J, Díaz C, Achaerandio M y Pujolà M. (2008). Elaboración de Productos de V Gama a partir de la Alcachofa (*Cynara scolymus*). Extraído el 2 de marzo, 2010 de <https://upcommons.upc.edu/pfc/bitstream/2099.1/4708/>

1/memoria.pdf

Bonilla, M. (Ed.). (2005). Estrategias Adaptativas de Plantas del Páramo y del Bosque Altoandino en la Cordillera Oriental de Colombia. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.

Britania. (2010). Lisina Hierro Agar. Extraído el 11 de marzo, 2010 de <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/lisinahierroagar.htm>

Caballero-Mellado, J. (2006). Microbiología Agrícola e Interacciones Microbianas con Plantas. Revista Latinoamericana de Microbiología 48. 154 – 161. Resumen extraído el 22 de Septiembre, 2008 <http://www.medigraphic.com/espanol/e-htms/e-lamicro/e-mi2006/e-mi06-2/em-mi062p.htm>

Cano, R.S. (2006). Métodos de Análisis Microbiológico. Normas ISO, UNE. Extraído el 11 de marzo, 2010 de <http://www.analizacalidad.com/docftp/fi148anmic.pdf>

Carrillo, L. (2003). Los Hongos de los Alimentos y Forrajes. Levaduras. Extraído el 24 de abril, 2010 de del sitio Web de la Universidad de Universidad Nacional de Salta: <http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/09htextolevaduras.pdf>

Chum, L., Carpio, M. y Tulio, M. (2009). Proyecto para la Producción y Comercialización de la Alcachofa en Conserva como Alternativa de Exportación al Mercado Europeo (Alemania). Extraído el 2 de marzo, 2010, del sitio Web de la Escuela Superior Politécnica del Litoral: <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/1827/1/3586.pdf>

Conti, M. E. (2006). Dinámica de la Liberación y Fijación de Potasio en el Suelo. Facultad de Agronomía - Universidad de Buenos Aires. Extraído el 19 de Septiembre, 2008 de <http://www.elsitioagricola.com/articulos/conti/liberacion%20y%20Fijacion%20Potasio.asp>

Coraspe, H. M., y Tejera, S. (2008). Procedimiento para la Toma de Muestras de Suelos. Extraído el 22 de Septiembre, 2008 de <http://www.ceniap.gov.ve/publica/divulga/fd54/suelos.htm>

Correa, M. (2008). Evaluación de Caracteres PGPR en Actinomicetos e Interrelaciones de estas Rizobacterias con Hongos Formadores de Micorrizas. Extraído el 11 de marzo, 2010 de <http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/2110/1/17716093.pdf>

Coyne, M. (2000). Microbiología del Suelo: Un Enfoque Exploratorio. Madrid: Editorial Paraninfo.

Collados, C. (2006). Impacto de Inoculantes basado en *Azospirillum* Modificado Genéticamente sobre la Diversidad y la Actividad de los Hongos de la Micorriza Arbuscular en Rizosfera de Trigo y Maíz. Extraído el 24 de abril, 2010 de <http://hera.ugr.es/tesisugr/16160009.pdf>

Cundom, M., Mazza de Gaid, S., Mazzanti de Castañon, M. y Gutiérrez, S. (2000). Actividad Antagónica *in vitro* de Aislamientos de *Trichoderma* sp. sobre Esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum*. Extraído el 11 de marzo, 2010, del sitio Web de la Universidad Nacional del Nordeste: http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/2000/5_agrarias/a_pdf/a_042.pdf

Delgado Higuera, M. (2002). Los Microorganismos del Suelo en la Nutrición Vegetal. Investigación ORIUS Biotecnología. Extraído el 8 de Septiembre, 2008 de <http://www.oriusbiotecnologia.com/site/index.php?id=20,63,0,0,1,0>

Diario El Comercio. (2007). La Urea se lleva el 37 por ciento del Mercado de los Fertilizantes. Extraído el 11 de marzo, 2010 de http://www.elcomercio.com/solo_texto_search.asp?id_noticia=64422&anio=2007&mes=3&dia=14

Diario El Comercio. (2009). Los Mata Malezas, los Más Usados. Extraído el 11 de marzo, 2010 de http://www.elcomercio.com/solo_texto_search.asp?id_noticia=205873&anio=2009&mes=11&dia=28

Diario Hoy. (2008). Alcachofas Ganan Mercado. Extraído el 2 de marzo, 2010 de <http://www.hoy.com.ec/noticias-ecuador/alcachofas-ganan-mercado-290261-290261.html>

Díaz, M. (2010a). Pruebas de Identificación Bacteriana. Extraído el 11 de marzo, 2010 de <http://chopo.pntic.mec.es/~gdiaz3/apuntes/UT161.pdf>

Díaz, M. (2010b). Morfología y Estructura Bacteriana. Extraído el 11 de <http://chopo.pntic.mec.es/~gdiaz3/apuntes/UT121.pdf>

ECO-SAFE. (2002). Tendencias Actuales en Agricultura Sostenible. Extraído el 9 de Septiembre, 2008 de www.ucc.ie/biomerit/ecosafe/ECO%20SAFE%20-%20Spanish%20Bulletin.pdf

Edufuturo. (2010). Cantón Cayambe. Extraído el 30 de marzo, 2010 de <http://www.edufuturo.com/fotosRemote.php?id=20587>

Egas, J. (2001). Manual de Bacteriología Médica. Quito: Escuela de Bioanálisis Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Ertola R., Yantorno O., y Mignone C. (2010). Crecimiento Microbiano. Extraído el 3 de junio, 2010 de <http://www.biologia.edu.ar/microind/crecimiento%20bacteriano.htm>

Espinosa, J. y Jaramillo, R. (Eds.). (2009, Abril). Manejo del Potasio para la Producción de Cultivos Orgánicos. Informaciones Agronómicas, 73, 11-14.

Fassbender H.W., y Bornemisza E. (1987) Química de Suelos con Énfasis en Suelos de América Latina. San José: IICA.

Fernández-Larrea Vega, O. (2001). Microorganismos Antagonistas para el Control Fitosanitario. Revista Manejo Integrado de Plagas 62. 96-100. Resumen extraído el 22 de Septiembre, 2008 de la base de datos de Virtualpro <http://www.revistavirtualpro.com/revista/index.php?ed=2006-10-01&pag=21>

Figuroa-Arredondo, P. (2007). Anaerobios y Pseudomonas - Infecciones Oportunistas. Extraído el 24 de abril, 2010 de <http://pathmicro.med.sc.edu/Spanish/chapter15.htm>

Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO. (2007). IPNS - Glosario de la Gestión Integrada de los Nutrientes. Extraído el 11 de marzo, 2010 de http://www.fao.org/ag/agl/agll/ipns/index_es.jsp?term=p220&letter=P

Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO. (2008). Current world fertilizer trends and outlook to 2011/12. Extraído el 11 de marzo, 2010 de <ftp://ftp.fao.org/agl/agll/docs/cwfto11.pdf>

Fraume, N. (2007). Diccionario Ambiental. Bogotá: Eco Ediciones

Fuentes, R. (2007). Agrosistemas Sostenibles y Ecológicos: La Reconversión Agropecuaria. Santiago de Compostela: Servicio de Publicacións e Intercambio Científico.

Gamazo, C., López-Goñi, I., y Díaz, R. (2005). Manual Práctico de Microbiología. Barcelona: Masson S.A.

García Martos, P., Fernández del Barrio, M. y Paredes Salido, F., (1994). Microbiología Clínica Práctica. Cádiz: Servicio Publicaciones UCA

Giaconi, V. y Escaff, M. (2004). Cultivo de Hortalizas. Santiago de Chile: Editorial Universitaria.

Gonzales P. (2010). Mantenimiento y Conservación de Microorganismos Industriales. Extraído el 3 de junio, 2010 de <http://nostoc.usal.es/sefin/MI/tema04MI.html>

Holt J.G. (Ed.). (1977). The Shorter Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore: The Williams & Williams Company. Eighth Edition.

Huilcapi, J. Aislamiento e identificación de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de muestras de suelo y raíz de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007. Tesis de Ingeniería en Biotecnología, Escuela Politécnica del Ejército (2007).

Ingraham J.L., e Ingraham C.A. (1998). Introducción a la Microbiología.
Barcelona: Editorial Reverté, S.A.

Instituto Geográfico Militar I.G.M. (2010). Mapa Cayambe Escala 1:50 000.
Edición 2.

Intélite. (2006). Conservación de los suelos y alimentos sin químicos,
ventajas de los biofertilizantes. Extraído el 22 de Septiembre, 2008 de
<http://www.quiminet.com.mx/pr8/Biofertilizantes.htm>

International Plant Nutrition Institute IPNI. (2008). Importancia del Potasio en
el Suelo. International Plant Nutrition Institute. Northern Latin America. Extraído
el 14 de Septiembre, 2008 de [http://www.ppi-ppic.org/ppiweb/mexnca.nsf/\\$webindex/9EC7575DCDE53D4786256AB100208547?opendocument&navigator=home+page](http://www.ppi-ppic.org/ppiweb/mexnca.nsf/$webindex/9EC7575DCDE53D4786256AB100208547?opendocument&navigator=home+page)

Lian, B., Wang, B., Pan, M., Liu, C., & Teng, H. (2007). Microbial Release of
Potassium from K-Bearing Minerals by Thermophilic Fungus *Aspergillus*
fumigatus. Resumen extraído el 24 de febrero, 2010, de la base de datos
ScienceDirect.

Mayuri, J. (2009). Mejoramiento en Propagación y Post Cosecha de Tomate,
Sandía, Alcachofa, Melón, Fresa, Cebolla y Pimiento. Extraído el 2 de marzo,
2010 de <http://www.scribd.com/doc/17054005/POST-COSECHA>

Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca MAG. (2003). Pichincha: Ubicación Geográfica de la Producción. Extraído el 30 de marzo, 2010 de AVÍCOLA http://www.sica.gov.ec/cadenas/maiz/docs/mapa_pichincha_aves.htm

Moscatelli, G., Lutens, J., Gómez, L. (2001). Niveles de disponibilidad y reservas de potasio en Argentina. Primer Simposio: Potasio en Sistemas Agrícolas Argentinos. Facultad de Agronomía de la UBA y Fertilizar – International Potash Institute. Buenos Aires. Extraído el 16 de Septiembre, 2008 de <http://www.ipipotash.org/udocs/Sesion%20I.pdf>

Navarro Blaya, S., Navarro García, G. (2003). Química Agrícola: El Suelo y los Elementos Químicos Esenciales para la Vida Vegetal. Madrid: Mundi-Prensa Libros.

Organización Panamericana de la Salud. (2010). Bacillus. Extraído el 25 de abril, 2010 de http://www.bvsde.paho.org/CD-GDWQ/docs_microbiologicos/Bacterias%20PDF/Bacillus.pdf

Pumarola, A. (1999). Microbiología y Parasitología Médica. Barcelona: Masson S.A.

Rivera-Cruz, M., Trujillo-Narcía, A., Ferrera, R., Rodríguez, R., Sánchez, P., Volke Haller V. y Fernández-Linares, L. (2006). Fitorremediación de Suelos con Benzo(a)pireno mediante Microorganismos Autóctonos y Pasto Alemán

(*Echinochloa polystachya* (H.B.K.) HITCH.) Extraído el 24 de abril, 2010 de <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/154/15402201.pdf>

Rodas P., A. (2006). La Agricultura y Microorganismos: Una Visión Sustentable para el Manejo de los Suelos. Extraído el 14 de Septiembre, 2008 http://www.engormix.com/s_articles_view.asp?art=1129&AREA=AGR-417

Rodríguez, E., Rueda, A., Aura, P. y Poutou, R. (2002). Aislamiento, Identificación y Caracterización de Bacterias Termofílicas Aeróbicas, con Actividad Proteolítica, a partir de Pilas de Compost en Fase Termofílica. Extraído el 11 de marzo, 2010 de <http://www.biologia.org/revista/pdfs/54.pdf>

Sánchez, J. (Ed.). (2007). Potencial Biotecnológico de Microorganismos en Ecosistemas Naturales y Agroecosistemas. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.

Sánchez de Prager, M. (2007). Las Endomicorrizas: Expresión Bioedáfica de Importancia en el Trópico. Cali: Ferriva.

Sebiot y Eumedia (Eds.) (2000). La Biotecnología Aplicada a la Agricultura. Madrid: Grupo Mundi-Prensa.

Servicios Agrícolas y Agroindustria. (2007) Cosecha de Alcachofas, Características de las Alcachofas, Importancia en Chile. Extraído el 2 de marzo, 2010 de <http://seragro.cl/?a=742>

Sigma. (2010). Pikovskaya's Agar. Extraído el 11 de marzo, 2010 de <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/4/p1602dat.P ar.0001.File.tmp/p1602dat.pdf>

Stanier R.Y., Ingraham J.L., Wheelis M.L., y Painter P.R. (1992). Microbiología. Barcelona: Editorial Reverté, S.A.

Sugumarán, P., & Janarthanam, B. (2007). Solubilization of Potassium Containing Minerals by Bacteria and their Effect on Plant Growth. Extraído el 24 de febrero, 2010 de [http://www.idosi.org/wjas/wjas3\(3\)/14.pdf](http://www.idosi.org/wjas/wjas3(3)/14.pdf)

Suquilanda V., y Manuel B. (1995). Fertilización Orgánica, Manual Técnico FUNDAGRO. Quito: Ediciones UPS.

T. Stanes & Company Limited. (2006). Liquid Biofertilizers. Extraído el 24 de febrero, 2010 de http://www.tstanes.com/symbion_k_pmb.html

III Censo Nacional Agropecuario, (2006). Cuadros Estadísticos: MAG – Banco Central del Ecuador Extraído el 22 de Septiembre, 2008 de <http://www.sica.gov.ec/censo/index.htm>

Urbano Terrón P. (2003). Tratado de Fitotecnia General. Bilbao: Mundi-Prensa Libros.

Wuxing, L., Xushi, X., Xianghua, W., Qiyin, Y., Yongming, L., & Christie, P. (2007). Decomposition of Silicate Minerals by *Bacillus mucilaginosus* in Liquid Culture. Environmental Geochemistry and Health 28. 133-140. Resumen extraído el 25 de Septiembre, 2008 de la base de datos de SpringerLink <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=17723948>

ANEXOS

ANEXO A: Muestreo de suelo y de raíces de alcachofa en la localidad de La Remonta, cantón Cayambe.



a) Fotografía del cultivo de alcachofa. (Guevara G., 2009).



b) Fotografía de la recolección de muestras de suelo y raíces de alcachofa. (Guevara G., 2009).

ANEXO B: Procedencia de las muestras evaluadas y diámetro (en mm) de los halos de solubilización de potasio generados por las mismas, a las 24 y 48 horas de incubación y sus repeticiones respectivas.

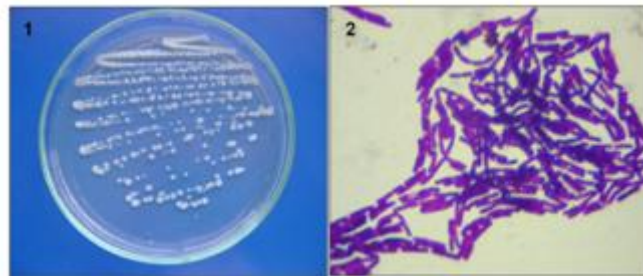
Halos de Solubilización

PROCEDENCIA	CÓDIGO DE AISLAMIENTO	24 HORAS			48 HORAS		
		R 1	R 2	R 3	R 1	R 2	R 3
Raíz	Re	12	8	11	40	12	30
Suelo	Sab	0	0	0	7	0	5
Suelo	AVS3	0	0	0	10	5	5
Raíz	Rh	9	8	8	10	10	10
Suelo	Ss	10	5	5	26	21	15
Suelo	Sz	9	6	9	9	10	10
Suelo	Sj	18	8	10	30	9	11
Suelo	AJS2	7	7	5	7	14	5
Suelo	Sw	5	5	5	11	6	7
Suelo	Sy	12	9	5	19	20	9
Suelo	Sf	11	7	6	17	8	8
Suelo	Sc	12	15	10	17	30	12
Raíz	Rd	0	0	0	7	0	0
Suelo	Sk	18	18	7	35	28	11
Suelo	Sx	0	5	5	7	17	9
Suelo	Sb	5	9	9	7	15	11
Suelo	Sr.2	9	7	7	16	14	25
Raíz	Rc2	7.5	5	10	9*	7	11

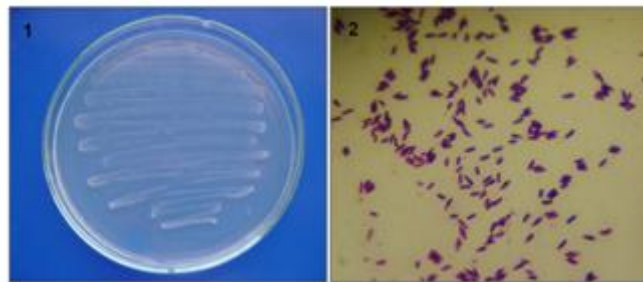
R - Repetición

*Originalmente este diámetro fue de 85 mm, pero debido a que este valor es atípicamente alto en comparación a las demás mediciones, se cambió este dato por el promedio de las mediciones de las repeticiones 2 y 3.

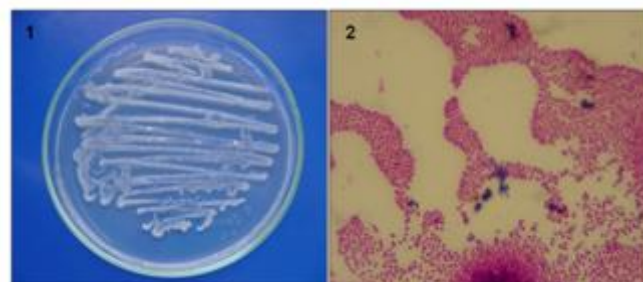
ANEXO C: Colonias bacterianas en Agar Nutritivo (1) y vista al microscopio de las bacterias con tinción gram (2), identificadas con las mejores características solubilizadoras de potasio.



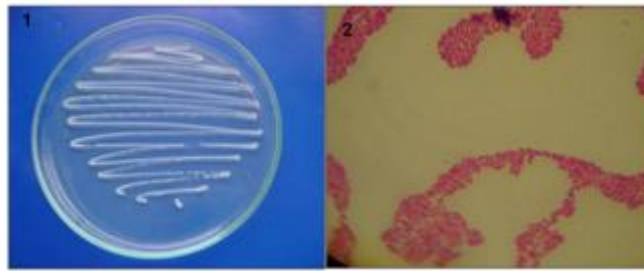
a) Fotografía de *Bacillus* sp. Código de aislamiento Re. (Guevara G., 2009).



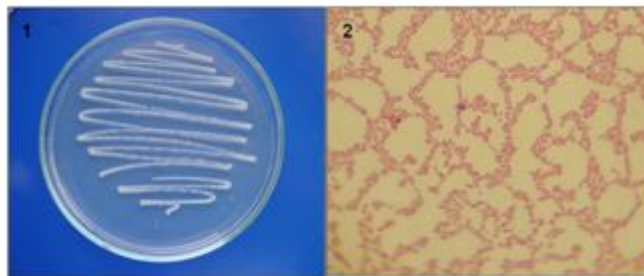
b) Fotografía de *Clostridium* sp. Código de aislamiento Sy. (Guevara G., 2009).



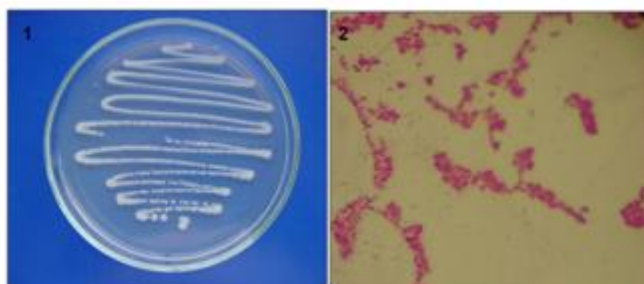
c) Fotografía de *Pseudomonas* sp. Código de aislamiento Sc. (Guevara G., 2009).



d) Fotografía de *Pseudomonas sp.* Código de aislamiento Sk. (Guevara G., 2009).



e) Fotografía de *Pseudomonas sp.* Código de aislamiento Ss. (Guevara G., 2009).



f) Fotografía de *Pseudomonas sp.* Código de aislamiento Sr2. (Guevara G., 2009).

ANEXO D: Diámetro de los halos de antagonismo en mm, a las 24 horas de incubación.

Halos de Antagonismo

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