

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

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

**PRUEBA A NIVEL DE INVERNADERO Y
DETERMINACIÓN DE LA SOBREVIVENCIA DE UN
BIOFERTILIZANTE PRODUCIDO A PARTIR DE
BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FÓSFORO
UTILIZANDO UN MEDIO DE CULTIVO
ALTERNATIVO**

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

Ingeniera en Biotecnología

ELABORADO POR:

MARÍA VERÓNICA CEPEDA MIRANDA

SANGOLQUÍ, 14 de noviembre de 2008

AGRADECIMIENTO

A quien me consideró un caminante digno de este andar, y me bendice en cada paso, a Dios.

A todos quienes aligeraron esta porción del camino, quienes con una palabra o un gesto lo hicieron llevadero, mi madre, mi padre, mi hermano y mis amigos.

A quienes con su conocimiento y amabilidad agilizaron mi paso hacia el objetivo planteado, Dra. Patricia Jiménez, Dr. Germánico Silva, Ing. Marco Taipe, Ing. Pablo Araujo e Ing. Cristina Echeverría.

A Agrodiagnostic, por la oportunidad y el apoyo brindados.

María Verónica Cepeda M.

DEDICATORIA

“Caminante, no hay camino, se hace camino al andar”, esta frase describe todo lo que hoy se plasma en estas hojas, lo que se hizo y está por hacer...

Realmente no hay camino, existen trabas, trampas pero también guías y atajos, el caminante debe seguir..., confiar en su instinto y perseguir ese horizonte que no es más que aquello que le da sentido al vivir. Ese horizonte muchas veces se avizora tan claro, otras tan oscuro...

El caminante eres tú..., soy yo..., un alma en busca de razones y de sueños, en busca de dejar una huella en el camino que van marcando sus pies. Un alma que en el normal transcurso de su caminata, encuentra seres maravillosamente especiales que marcan su existir y se convierten en su atajo, su refugio, su fuente de inspiración, su guía y su razón.

Para mi razón, mi guía, mi refugio y mi fuente de inspiración... mi madre, mi padre y mi hermano, quienes con su solo existir matizan mi camino, lo hacen más ligero, lo llenan de amor, lo cubren de flores, lo colman de abrazos, colores, sonrisas y luces resplandecientes. No tengan duda que han dejado su huella en mí...

María Verónica Cepeda M.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

La crisis actual por la que el sector agrícola mundial se encuentra atravesando se debe a su estrecha relación con la utilización de fertilizantes químicos y al empobrecimiento de los suelos por su causa. Los fertilizantes químicos han sido utilizados por todos los agricultores desde hace décadas, y si bien estos han generado una mayor productividad, de un tiempo acá, han elevado sus precios amenazado la alimentación de naciones enteras (Angulo, 2007). El empirismo con el que se realizan los procesos de fertilización de los cultivos en países en vías de desarrollo como el Ecuador, implica la utilización de sustancias potencialmente peligrosas para la salud, a más de un desgaste periódico del suelo inoculado, problema que ha conllevado a la búsqueda de fertilizantes inocuos para los seres humanos y renovables para el suelo. Son varios los nutrientes necesarios para una buena germinación, el fósforo constituye uno de los elementales para el desarrollo normal de las plantas, pero su inmovilización impide su correcta solubilización y por ende su correcto aprovechamiento por parte de los cultivos. El empleo de productos biotecnológicos como biofertilizantes desarrollados a partir de bacterias solubilizadoras de fósforo, proporciona un resultado efectivo para la fertilización y absorción de los nutrientes del suelo, a más de asegurar un producto sano y una renovación de la población bacteriana del suelo.

1.2 Justificación del problema

Aunque el fósforo es un elemento que se encuentra de manera relativamente abundante en los suelos ecuatorianos, su requerimiento de alrededor de 10 a 30 kilogramos no es completamente abastecido, por lo cual debe ser suministrado por medio de fertilizantes químicos. Los fertilizantes químicos tienden a acumularse en forma de fosfatos insolubles y provocan efectos como la variación del pH del suelo y

la inmovilización de metales pesados (Angulo, 2007; Carcaño, M. 2007; Lloclla y Dávila, 2005).

Las plantas obtienen la mayoría de sus nutrientes del suelo y pese a que la mayoría de minerales se presentan en cantidades mili molares, el fósforo está presente solo en cantidades micro molares o menores. Estos niveles bajos se deben a una alta reactividad del fósforo soluble con el calcio, hierro o aluminio (presentes en suelos tropicales y subtropicales), lo cual conduce a su precipitación, inmovilizándolo e impidiendo que las plantas lo absorban (Ishikawa, et al. 2000).

La clave para mantener la productividad agrícola es la solubilización del fósforo por medio de agentes biológicos como bacterias con la aplicación de biofertilizantes en el campo. Ésta es la pauta para el inicio de una urgente transferencia de tecnología en el campo y en la industria por medio de la producción de biofertilizantes a gran escala.

Las compañías importadoras de productos químicos se encargan de distribuirlos sin tener conciencia de que a la larga, influirán en el apareamiento de más enfermedades debido a su uso intensivo, contribuyendo a una crisis en la agricultura. Este trabajo de investigación es la base para el desarrollo y elaboración de un biofertilizante de económica y fácil aplicación. Su utilización y su permanencia en los suelos hará que las corrientes se lo lleven a los ríos, y mares fertilizándolos natural y orgánicamente, contribuyendo también a la pesca, otra de las principales actividades económicas en nuestro país (Vera, 2007).

Esta investigación constituye un aporte científico-técnico para el país, al presentar una alternativa biológica confiable para satisfacer la necesidad de un método de fertilización natural. La falta de investigación en el campo de la Biotecnología en el Ecuador, como lo señala Vera (2007), ha traído consigo la quiebra del sistema agroproductivo y la aparición de enfermedades que atacan cultivos importantes como la monilla en el cacao, la sigatoka en el banano, la virosis en los cultivos de sandía y pepino y la baja productividad en el arroz y maíz.

El uso de biofertilizantes tiene la ventaja de que originan procesos rápidos, consumen poca energía y no contaminan el medio ambiente, constituyendo una biotecnología que además de incrementar la fertilidad del suelo, favorece el antagonismo y el control biológico de organismos fitopatógenos. Su uso disminuye el empleo de fertilizantes químicos fosfatados, lo que contribuye a frenar las afectaciones de los suelos agrícolas y reducir costos de producción, favoreciendo las ganancias para los agricultores. Finalmente, al reducir el uso de fertilizantes químicos, la acidez de los suelos agrícolas disminuye y por ende su fertilidad crece, debido a que este tipo de biofertilizantes enriquece los suelos por su concentración de microorganismos benéficos (Carcaño, 2007; Padilla, et al. 2006; Peticari, 2005).

El presente proyecto estudia los aspectos fundamentales de la producción de biofertilizantes por medio de fermentación discontinua a partir de bacterias solubilizadoras de fósforo; la utilización de un medio alternativo tiene como objetivo abaratar los costos de producción del biofertilizante a gran escala para así llegar a todos los agricultores del país. Por medio del estudio de los aspectos fundamentales de la producción de biofertilizantes, Agrodiagnostic posee información de primera mano del proceso de producción, lo que repercute directamente en el mejoramiento de la calidad del producto que entrega para satisfacer las necesidades del cliente. Del mismo modo la información proporcionada por el estudio le permite a la empresa tomar decisiones permisibles de producción, bajando sus costos, que es el objetivo final del productor para aumentar el margen de ganancia.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo General

Evaluar mediante una prueba a nivel de invernadero y determinar la sobrevivencia de un biofertilizante producido a partir de bacterias solubilizadoras de fósforo utilizando un medio de cultivo alternativo.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Establecer el caldo de cultivo alternativo adecuado para una producción industrial en el futuro de estas bacterias solubilizadoras de fósforo mediante el análisis de su curva de crecimiento.
- Escalar el proceso productivo del biofertilizante hasta diez litros.
- Establecer el tiempo de duración del proceso de fermentación y la concentración de biomasa del producto.
- Evaluar la acción del biofertilizante en una prueba de invernadero en plantas de maíz.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Biofertilizantes

Se define a los biofertilizantes como preparaciones o productos que contienen células de microorganismos vivas o latentes, las cuales activan el proceso biológico y son capaces de formar un compuesto fertilizante haciendo que la forma no disponible de algunos elementos esté disponible para las plantas. Dentro del término biofertilizante se incluyen aquellos basados en microorganismos fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fósforo y los microorganismos celulolíticos.

Cuando se emplean mezclas de diferentes bacterias para ser utilizadas como biofertilizantes, es preciso aclarar que los efectos benéficos que puede ocasionar una bacteria o mezcla de bacterias sobre una planta se deben a una combinación de procesos (fijación de N, fitohormonas, sustancias antimicrobianas, solubilización de fósforo, etc.) y no a uno sólo de ellos, las bacterias que promueven el desarrollo vegetal, por lo general presentan varias formas o procesos, que en su conjunto dan como resultado el beneficio a la planta (Rodas, 2006).

Los biofertilizantes pueden reemplazar a los fertilizantes químicos, y son más económicos (Boonkerd, 2000). Los cultivos deben ser provistos de fertilizantes químicos de manera repetitiva para poder cubrir la pérdida de fósforo, frente a esto,

los biofertilizantes proveen a la planta a más del este elemento, vitaminas, hormonas y minerales. Existen varios efectos deletereos al aplicar dosis altas de fertilizantes químicos en los cultivos, en este aspecto, los biofertilizantes no causan efectos tóxicos (Rodas, 2006).

1.4.2 Producción de Biofertilizantes de origen bacteriano

La producción de biofertilizantes constituye el ejemplo más representativo de la aplicación de la Biotecnología enfocada a la obtención de productos metabólicos útiles a partir de materiales vivos, pudiendo estos últimos ser microorganismos e inclusive organismos más desarrollados. Este proceso de obtención implica el desarrollo de dos fases: la fermentación y la recuperación de dichos productos (Mateos, 2007).

La primera fase denominada como “fermentación”, se refiere a los diferentes cultivos aeróbicos celulares realizados a gran escala en aparatos especializados denominados fermentadores o biorreactores donde al finalizar el proceso se recogen los productos secundarios o las células. Para que los microorganismos puedan desarrollarse en dichos cultivos se requiere del establecimiento y optimización de las condiciones óptimas para su crecimiento y producción de metabolitos, así como del control de los factores físico – químicos que afecten su rendimiento. La segunda fase implica la recuperación de los productos biológicos, este procedimiento es muy diferente al realizado durante la recuperación química puesto que los materiales involucrados son mucho más lábiles. Para llevar a cabo este proceso se debe iniciar con la formulación y esterilización del medio de cultivo y equipos a utilizar, posteriormente se continúa con el crecimiento de los microorganismos en un medio de mantenimiento para posteriormente colocarlos en un prefermentador después del cual se obtiene el inóculo para el fermentador de producción a mayor escala (Zaid, et al., 2004).

1.4.3 Crecimiento Bacteriano

Para evaluar el crecimiento microbiano es necesario efectuar medidas cuantitativas de la biomasa microbiana, del número de células por unidad de volumen, del peso de las mismas o algunas de sus actividades metabólicas (Mateos, 2005).

1.4.3.1 Ciclo de crecimiento de las poblaciones bacterianas

Una población bacteriana presenta, de manera general, un patrón de crecimiento característico al ser inoculada en un medio de cultivo recién preparado. El crecimiento típico de una población celular se ilustra en una curva de crecimiento como la presentada en la Figura 1.1 donde se reflejan las distintas fases por las que atraviesan las poblaciones bacterianas: fase lag, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte.

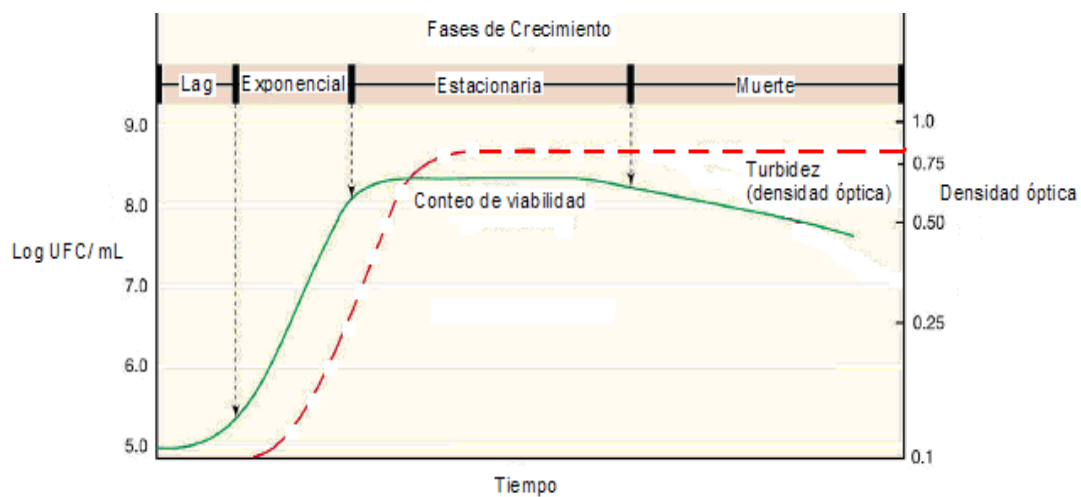


Figura 1.1 Curva de crecimiento típica de una población bacteriana (Brock, 2001).

a) Fase lag, de retraso o latencia

Al inocular una población bacteriana en un medio de cultivo recién preparado, no se espera un crecimiento inmediato debido a que las células necesitan un período de adaptación o retraso que puede ser corto o largo dependiendo de las condiciones ambientales (temperatura y composición del medio de cultivo) y del estado del inóculo. Esta última condición viene determinada por factores como: la edad del inóculo, esto es, si el inóculo proviene de un cultivo viejo definitivamente atravesará

por la fase de lag debido a que las células necesitan tiempo para reponer sus coenzimas y constituyentes celulares esenciales. Lo mismo sucede si las células presentan daños por agentes como el calor, radiación o sustancias químicas, factores que harán necesario un tiempo para reparar en ellas dicho daño. Por otra parte, si el medio de cultivo al cual la población bacteriana es transferida es pobre, ésta requerirá de un tiempo para sintetizar las enzimas y moléculas necesarias para suplir los metabolitos que no están presentes en el medio.

b) Fase exponencial o logarítmica

Se refiere al período de tiempo en el que hay un aumento en la población bacteriana, donde la cantidad de células se duplica durante cada unidad de período de tiempo y la velocidad de crecimiento es máxima. La mayoría de los microorganismos unicelulares siguen el patrón de crecimiento exponencial, pero la velocidad varía entre los organismos dependiendo de su naturaleza y de las condiciones ambientales en las que se desarrollan.

c) Fase estacionaria

Esta fase se desarrolla por dos causas principales: cuando los nutrientes del medio de cultivo se agotan y limitan el crecimiento bacteriano o cuando los metabolitos generados por las bacterias gracias a procesos biosintéticos están presentes en una concentración tal que se vuelven inhibidores del crecimiento cesando así su normal desenvolvimiento. Un aspecto importante de esta fase es que unas células nacen y otras mueren, equilibrándose los dos procesos no habiendo ni aumento ni disminución en la cantidad de células, esto se conoce como crecimiento críptico.

d) Fase de muerte

Tiene lugar después de que las células han alcanzado la fase estacionaria y siguen en incubación. En este período puede suceder que algunas células sigan vivas y continúen metabolizando, pero tarde o temprano morirán. En esta fase la viabilidad disminuye pese a que el conteo al microscopio directo se mantenga constante. Puede

darse el caso de una lisis celular, lo cual conllevaría a una disminución de estas dos variables (Brock, 2001).

1.4.3.2 Condiciones ambientales para el crecimiento bacteriano

Para poder tener un crecimiento adecuado, se deben conocer los factores ambientales que pueden incidir en el comportamiento bacteriano (Mateos, 2005).

1.4.3.2.1 Temperatura

La temperatura ambiental afecta de manera intensa a los microorganismos debido a que son unicelulares y poiquilotermos. El factor más afectado por la temperatura es la sensibilidad de las reacciones, en condiciones de bajas temperaturas, un aumento puede elevar la velocidad de crecimiento hasta cierto punto donde un mayor incremento la disminuye y puede llegar a ser letal. Las altas temperaturas pueden desnaturalizar las enzimas y proteínas esenciales además de deteriorar las membranas. Debido a esto, el crecimiento microbiano depende característicamente de la temperatura, existiendo temperaturas cardinales distintivas: temperatura mínima, óptima y máxima de crecimiento. Las óptimas varían en el rango de 0° C hasta 75° C, la temperatura de crecimiento de un microorganismo determinado abarca un margen de 30° C (Prescott, et al., 2004).

Los microorganismos pueden clasificarse en una de las siguientes cinco categorías en función de los rangos de temperatura de crecimiento:

- a) Psicrófilos: Crecen bien en rangos de temperatura de 0° C a 20° C, siendo la óptima de 15° C.
- b) Psicrófilos facultativos o psicrótrofos: Crecen bien en rangos de temperatura de 0° C a 35° C, siendo la óptima de 20° C a 30° C.
- c) Mesófilos: Crecen bien en rangos de temperatura de 15° C a 45° C, siendo la óptima de 20° C a 45° C.
- d) Termófilos: Crecen bien en rangos de temperatura de 45° C a 55° C, siendo la óptima de 55° C a 65° C.

- e) Hipertermófilos: Crecen bien en rangos de temperatura de 90° C a 100° C, siendo la óptima de 80° C a 113° C.

Al aumentar la temperatura aumenta la velocidad de las reacciones enzimáticas hasta una cierta temperatura a la cual las proteínas, el DNA y otras macromoléculas son sensibles y se desnaturalizan. Todos los microorganismos tienen una temperatura mínima, óptima y máxima de crecimiento (Mateos, 2005).

1.4.3.2.2 pH

Los microorganismos cambian el pH del medio cuando crecen, por eso se debe añadir un tampón en él para mantener el pH constante (Mateos, 2005). Cada especie tiene un rango de pH definido para su crecimiento así como también un pH óptimo. De acuerdo al pH del medio en el que se desarrollan, los microorganismos se clasifican en:

- a) Acidófilos: tienen un valor de pH óptimo entre 0 y 5.5;
- b) Neutrófilos, cuyo pH óptimo está entre 5.5 y 8; y
- c) Alcalófilos, cuyo rango de pH está entre 8.5 y 11.5.

Aunque los microorganismos suelen crecer en medios con un amplio rango de pH, la tolerancia a estas condiciones es limitada, así pues, si existen variaciones intensas del pH, los microorganismos se verán afectados debido a la alteración de la membrana plasmática o la inhibición de algunas enzimas. Para poder sobrevivir, los microorganismos tienen que adaptarse a los cambios ambientales de pH, algunos desarrollan mecanismos que van desde la síntesis de nuevas proteínas tolerantes hasta sistemas de transporte de iones hacia o desde el interior de las células (Prescott, et al., 2004).

1.4.3.2.3 Agua

Debido a que todos los organismos requieren agua para vivir, se debe conocer la disponibilidad del agua, denominada potencial de agua, cuyos valores van de 0 a 1. El potencial de agua del agua natural es 1; el potencial de agua de los campos de cultivo se sitúa entre 0,9 y 1,0 (Mateos, 2005).

1.4.3.2.4 Oxígeno

El oxígeno es necesario dependiendo del tipo de microorganismo, por ello de acuerdo a su necesidad, se han dividido en (Mateos, 2005):

- Aerobios
 - Obligados: Requieren de oxígeno para crecer (21 %)
 - Facultativos: No requieren pero crecen mejor en presencia de oxígeno.

- Microaerófilos: Requieren pero a niveles más bajos que los atmosféricos (1-15 %)

- Anaerobios
 - Aerotolerantes: No requieren y crecen peor cuando el oxígeno está presente.
 - Obligados: La presencia de oxígeno es letal

1.4.3.3 Nutrición microbiana

Las células bacterianas están compuestas por macro y micro moléculas. Las primeras pueden ser sintetizadas dentro de la célula a partir de sustancias obtenidas del medio ambiente o pueden ser obtenidas directamente de éste. En este grupo se encuentran las proteínas y los ácidos nucleicos, entre otros (Cuadro 1.1). Las sustancias utilizadas por los microorganismos para su catabolismo y anabolismo son

conocidas como macro y micronutrientes, los primeros son requeridos en grandes cantidades mientras que los segundos, en mínimas.

Cuadro 1.1 Composición química de una célula bacteriana

Molécula	Porcentaje de peso seco (b)	Moléculas por célula
Total de macromoléculas	96	24,610,000
Proteínas	55	2,350,000
Polisacáridos	5	4,300
Lípidos	9.1	22,000,000
DNA	3.1	2.1
RNA	20.5	255,500
Total de monómeros	3.5	
Aminoácidos y precursores	0.5	
Azúcares y precursores	2	
Nucleótidos y precursores	0.5	
Iones inorgánicos	1	
Total	100%	

b: Peso seco de una célula de *E. coli* creciendo activamente = 2.8×10^{-13} g. Fuente: Brock, et al., 2001

a) Macronutrientes

Carbono

Constituye el más importante y abundante de todos los nutrientes debido a que la mayoría de bacterias necesita un compuesto orgánico como fuente de Carbono. Muchas bacterias asimilan estos compuestos y los usan para la construcción de nuevos materiales celulares. Entre los compuestos orgánicos utilizados por las células bacterianas se encuentran en un orden indistinto: aminoácidos, ácidos grasos, ácidos orgánicos, azúcares, bases nitrogenadas orgánicas, compuestos aromáticos, entre otros.

Nitrógeno

Constituye el componente principal de las proteínas y los ácidos nucleicos, debido a esto, las bacterias lo obtienen de la descomposición y mineralización de organismos muertos. En la naturaleza se lo puede encontrar en dos formas inorgánicas: amoníaco (NH_3) y nitrato (NO_3^-). Otra fuente es el nitrógeno gaseoso que puede ser asimilado por ciertas bacterias, las fijadoras de nitrógeno.

Fósforo

Se encuentra en la naturaleza en forma de fosfatos orgánicos e inorgánicos. Los primeros son muy abundantes en la naturaleza pero su uso está limitado a la presencia de enzimas celulares de nombre fosfatasas que cortan las uniones ésteres que unen a las estructuras de manera orgánica con los aniones fosfatos liberándolos al suelo. Por su parte, los fosfatos inorgánicos (PO_4^{3-}) son utilizados por la mayoría de microorganismos. El fósforo constituye uno de los componentes de los ácidos nucleicos y los fosfolípidos de allí su importancia en la nutrición microbiana.

Azufre

Es necesario por formar parte estructural de aminoácidos como la cisteína y metionina, además por su presencia en vitaminas como la tiamina y la biotina. En su mayoría su fuente es orgánica en forma de sulfato (SO_4^{2-}) o sulfuro (HS^-).

Potasio

Es importante debido a su papel en la activación de algunas enzimas como aquellas que sintetizan proteínas.

Magnesio

Es importante debido a su participación en la estabilización de los ribosomas, membranas celulares y ácidos nucleicos. Además participa en la actividad de enzimas que intervienen en la transferencia de fosfato.

Calcio

Su importancia radica en su ayuda a la estabilización de la pared celular.

Sodio

Su necesidad depende del hábitat del microorganismo. Es decir, si los microorganismos están acostumbrados a un medio con sodio, lo requerirán siempre para su desarrollo; mientras que si crecieron en un medio carente de éste, se desarrollarán sin problema en un medio sin este elemento.

Hierro

Su necesidad radica en su participación en la estructura de varias enzimas que participan en la respiración.

b) Micronutrientes

Son igualmente indispensables que los macronutrientes, entre ellos están: el cobalto (forma la vitamina B₁₂), el zinc (forma parte de la estructura de varias enzimas como la RNA y DNA polimerasas), el molibdeno (forma parte de la estructura de varias enzimas), cobre (forma parte de la estructura de varias enzimas respiratorias) y el manganeso (activador de varias enzimas).

1.4.4 La agricultura y los microorganismos

La fertilidad del suelo es esencial para el desarrollo de los seres vivos y en el futuro constituirá la única y más preciada fuente de alimento. Debido al incremento en los trabajos agrícolas de los últimos años, se ha llegado a una reducción gradual del contenido de materia orgánica en las tierras cultivadas intensivamente y al deterioro de la estructura del suelo, lo cual lo ha hecho susceptible a la compactación y a la erosión entre otros procesos (Rodas, 2006).

El hecho de que los suelos son cada vez menos fértiles ha contribuido a la disminución de la actividad de los factores edáficos, que dependen de la disponibilidad de nutrientes y de la energía aportada por la materia orgánica del suelo y de los residuos de los cultivos y animales. En este aspecto, la diversidad de

microorganismos del suelo es un indicador muy sensible de la contaminación y degradación de los ecosistemas (Rodas, 2006; Ishikawa et al, 2000).

La mayor parte de la alteración química que se produce en el suelo se debe a la actividad de sus microorganismos, es por esto que la capacidad del suelo para proporcionar nutrientes al cultivo en desarrollo es cada vez menor pues sus reservas propias se van agotando. En la actualidad, solo se puede mantener un suelo productivo, si se lo mantiene con la aplicación de abonos y productos químicos, cuya cantidad va en aumento conforme pasa el tiempo. Se define como un suelo sano a aquel que es capaz a través de su actividad biótica y su propia fertilidad de hacer fructificar cultivos y hacer que permanezcan productivos por largos períodos. Para lograr este objetivo se deben conocer las capacidades y el potencial de los microorganismos promotores de crecimiento en el suelo. Estas bacterias aparecen libres en el suelo, son capaces de adaptarse, colonizar y persistir en la rizosfera de la planta favoreciendo el crecimiento o desarrollo de ésta con su actividad (Rodas, 2006).

Estos microorganismos pueden ser afectados de manera drástica por los ambientes químicos, físicos y biológicos; por factores como el pH, la fertilidad, la disponibilidad y el contenido de materia orgánica, el contenido de residuos, la temperatura, la porosidad del suelo, la variedad de cultivos, etc. Como resultado, todas las prácticas de manejo (como la quema, la exposición del suelo al sol o el uso de fertilizantes amoníacos, etc.) que afectan estos factores también afectan a la actividad microbiana positiva o negativamente. Cuando el proceso microbiano es afectado en forma negativa, generalmente se ven efectos indirectos que reducen la salud y el vigor de las plantas. Cuando se afecta en forma positiva, éste se manifiesta mejorando el vigor de la planta, la tolerancia al estrés y la resistencia a las plagas (Reilly, et al, 2000).

1.4.4.1 Bacterias predominantes en la comunidad microbiana del suelo

En el suelo, la mayoría de microorganismos existente corresponde al grupo de las bacterias (alrededor de un el 98%) y son tal vez las más diversas en cuanto al

número de especies y su comportamiento. Se reproducen rápidamente por división celular llegando a producir gran cantidad de bacterias en un período corto de tiempo. Durante el crecimiento poblacional de éstas, una diversidad de ellas puede tener disponible una elevada cantidad de carbono, por su alta actividad de alimentación. Durante la transformación del carbono natural, se originan numerosos subproductos que generan grandes cambios químicos que pueden ocurrir en el suelo como resultado del crecimiento y de la transformación del alimento por su parte. Por ello las bacterias son consideradas como los microorganismos más significativos en el desarrollo del suelo (Reilly, et al, 2000; Rodas, 2006). La supervivencia de las bacterias está limitada en suelos con poca materia viva. Algunas son buenas saprofitas, otras son endofíticas, y un número limitado puede causar enfermedades a las plantas, animales y humanos. Las bacterias con gran importancia para el suelo son aquellas que transforman los nutrientes de éste para promover directamente el crecimiento de la planta. Estos organismos juegan un papel clave en el mantenimiento del delicado balance entre la materia acumulada y la materia degradada. Numerosas bacterias son eficientes fijadoras de nitrógeno, otras son excelentes solubilizadoras de fósforo, sin duda estos organismos contribuyen sustancialmente para que los agricultores economicen en fertilizantes. Algunas de estas bacterias producen de manera natural hormonas que estimulan el crecimiento de las plantas (Reilly et al, 2000).

1.4.4.2 Microorganismos solubilizadores de fósforo

Muchas plantas han demostrado haberse beneficiado de la asociación con microorganismos bajo condiciones deficientes de fósforo. Esta asociación pudo haber resultado de una mejor absorción del fósforo disponible o por falta de fuentes asequibles para las plantas. De la primera asociación son responsables micorrizas arbusculares, de la segunda, una serie de bacterias y hongos aislados debido a su capacidad de solubilizar complejos de fosfato mineral insoluble (Ishikawa, et al, 2000).

Los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkordelia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium*, *Azotobacter* y *Erwinia* son las bacterias que favorecen en gran magnitud la solubilización de fosfatos y su

hábitat es el suelo y la rizosfera. Algunas de las especies de bacterias que han sido utilizadas como biofertilizantes, debido a la capacidad solubilizante de fósforo son las siguientes:

- *Pseudomonas striata*
- *Rhizobium leguminosarium*
- *Rhizobium loti*
- *Bacillus amyloliquefaciens*
- *Bacillus polymyxa*
- *Bacillus megaterium*
- *Bacillus pulvifaciens*
- *Bacillus circulans*

Datos de estudios muestran que las especies de los géneros *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Bacillus* son las que presentan mayor actividad solubilizadora de fósforo. Además, debido a que muchas bacterias solubilizadoras de fósforo que se encuentran presentes en el suelo no están en un número suficiente para competir con las bacterias que se encuentran ya establecidas en diferentes rizosferas es necesario inocularlas en una alta concentración para obtener una alta solubilización de fósforo. Se ha señalado que la inoculación de *Pseudomonas* en suelos, ejerce efectos positivos en las plantas como la producción y segregación de reguladores del crecimiento de plantas como auxinas, giberelinas y citoquininas, mejorando procesos como germinación de semillas, nutrición mineral, desarrollo de raíces y empleo del agua (Rodas, 2006; Santillana, 2006).

Aunque muchas de estas se encuentran presentes en el suelo, su número no es suficiente para competir con la gran variedad de bacterias que se encuentran ya establecidas en diferentes rizosferas, por esto, para obtener una alta solubilización de P, es necesario inocularlas en una alta concentración; se ha demostrado que sólo causa efecto una inoculación en suelos que dispongan sobre 1,5 por ciento de materia orgánica. Se ha comprobado que los microorganismos solubilizadores de fósforo a menudo constituyen el 30% de la población de microorganismos de la rizosfera (Rodas, 2006).

Para que las plantas puedan utilizar el fósforo, las bacterias deben hidrolizar los compuestos fosfatados para dejar al fósforo en su forma inorgánica (ION), para ello las bacterias producen enzimas llamadas fosfatasas ácidas, las cuales cambian el pH del entorno y así facilitan que el Pi (fósforo inorgánico) sea liberado por intercambio protónico al medio, reemplazando los Pi por iones Calcio. Durante la descomposición aerobia de un residuo orgánico, los compuestos de P presentes sufren transformaciones a medida que avanza la degradación de la materia orgánica, debido a procesos de mineralización e inmovilización y procesos de adsorción, desorción, precipitación y disolución, lo cual afecta la biodisponibilidad de P en la matriz del residuo y posterior aplicación en el suelo y la rizosfera (Rodas, 2006). Los microorganismos solubilizadores de fósforo desempeñan un rol importante en la nutrición de las plantas mediante el aumento de absorción de fósforo por parte de la planta. A más de fertilizar, éstos constituyen la única manera posible para incrementar el fosfato disponible para las plantas (Boonkerd, 2000).

1.4.4.2.1 Género *Pseudomonas* sp.

El género *Pseudomonas*, es uno de los principales grupos de rizobacterias con actividad promotora de crecimiento vegetal. Son bacilos Gram negativos aerobios estrictos que poseen un metabolismo oxidativo no fermentativo. Crecen entre los 10° C y 42° C pero su [temperatura óptima](#) es de 25° C a 30° C. No crecen en condiciones ácidas ($\text{pH} \leq 4.5$) y se desarrollan preferentemente en un pH neutro. Se encuentran repartidas en el suelo y el agua y por medio de su consumo de pasan a las plantas y animales. Reducen los nitratos, producen oxidasa, en agar TSA crecen en forma de colonias de 3 mm; al crecer desprenden un olor aromático, producen pigmentos: la piocianina (azul en medio alcalino y rojo en ácido) y la fluoresceína que es un pigmento amarillo (Prescott, 2006). Son bacilos rectos o curvos, no esporulados, cuyo tamaño oscila entre 0.5 y 1 μm de ancho por 1.5 y 4 μm de largo, no poseen vainas ni apéndices. Algunas especies son litotróficas pudiendo emplear H_2 como único dador de electrones y NO_3^- como aceptor de electrones en anaerobiosis. Reaccionan positivamente a la prueba de oxidasa y catalasa (Brock, et al., 2001).

Además, se ha comprobado que bacterias de este género producen gran cantidad de hormonas, como auxinas (que permiten obtener un mayor desarrollo a nivel radicular), giberelinas (que promueven el alargamiento de las células de la raíz) y citoquininas (que activan la división celular). En el suelo, estas bacterias son las encargadas de movilizar el fósforo, solubilizando los fosfatos insolubles del área radical (González, 2008).

Pertenecen a la familia *Pseudomonadaceae* y están divididas en dos grupos: las especies fluorescentes y las no fluorescentes. Poseen un interesante mecanismo de acción entre los que figuran la toma de agua y nutrientes por parte de las plantas y la producción de fitohormonas y biocontrol de patógenos (Hernández, et al., 1998). Algunas publicaciones hacen referencia a distintas *Pseudomonas sp.* que son capaces de sobrevivir e incluso degradar una gran variedad de compuestos orgánicos entre los que están algunos pesticidas, además de una gran variedad de compuestos halogenados e hidrocarburos derivados del petróleo (Altamirano y Pozzo, 2000).

Pseudomonas aeruginosa al igual que *Pseudomonas fluorescens* tiene una alta capacidad de [solubilización del fósforo](#). Esta bacteria es capaz de utilizar una gran variedad de compuestos orgánicos como sustrato para crecer. (Cuberos, et al., 1998). Este proceso es realizado ya sea por medio de la producción de ácidos orgánicos como [ácido cítrico](#), [ácido oxálico](#) o [ácido glucónico](#) que actúan sobre el pH del suelo beneficiando la solubilización del fósforo inorgánico y liberando el fosfato a la solución del suelo. Otra vía de acción es por medio de las [fosfatasas](#) que son enzimas [hidrolasas](#) ([Monoesterasas](#) y [Diesterasas](#) Fosfóricas) que actúan sobre las uniones ésteres liberando los grupos fosfatos de la materia orgánica a la solución del suelo. Las dos vías generan una mayor cantidad de fosfato susceptible de ser absorbido por las raíces de las plantas (Brock, et al., 2001)

Pseudomonas putida posee un potencial de degradación de compuestos aromáticos y xenobióticos, además posee la capacidad de colonizar el sistema radicular de plantas y de formar biopelículas. Este género es capaz de producir auxinas, giberelinas y citoquininas, mejorando así procesos esenciales como la germinación de las semillas, la nutrición mineral, el desarrollo de raíces, el empleo de

agua, etc. Además son capaces de colonizar cultivos y ser antagonistas de patógenos asociados a las raíces de las plantas (Brock, et al., 2001; Santillana, 2006).

1.4.4.2.2 Género *Azotobacter* sp.

Son bacterias Gram negativas polimórficas, además forman [quistes](#) de pared gruesa. Los cultivos de mayor edad incluyen formas encapsuladas resistentes al calor, desecación y condiciones adversas. Su tamaño varía en un rango de 2-10 x 1-2.5 μm y son de naturaleza aeróbica. Las bacterias del género *Azotobacter* sp. crecen en medios con un rango de pH de 5.5 a 8.5, y a una temperatura de 25 a 35° C. Este género utiliza el nitrógeno atmosférico para la síntesis de sus proteínas, las mismas que se mineralizan en el suelo después de su muerte, contribuyendo así con la disponibilidad de nitrógeno para las plantas. Además, algunas especies promueven la solubilización del fósforo por medio de la solubilización de fosfatos inorgánicos para el mejor aprovechamiento de este elemento por parte de las plantas (Murty y Ladha, 1988). Las diferentes especies de *Azotobacter* son conocidas por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en la rizosfera y poblar ciertos sitios influenciadas por la presencia de otros microorganismos del suelo. Pueden también actuar como un agente del control biológico pues producen ciertas sustancias que afectan el crecimiento de patógenos de plantas (Brock, et al., 2001).

1.4.5 Importancia del fósforo en los seres vivos

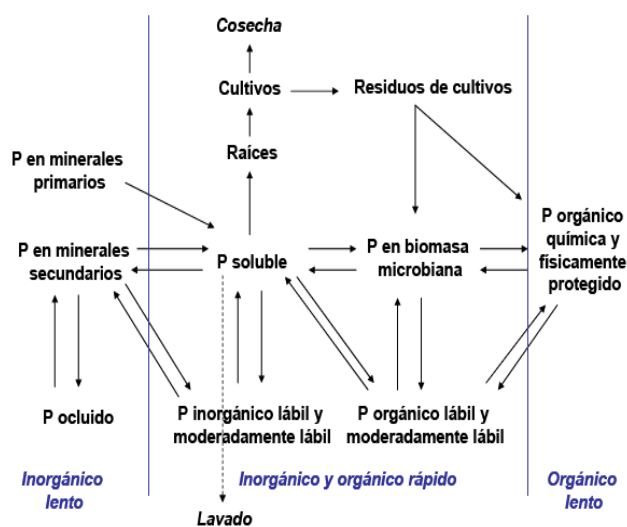
Todos los seres vivos, plantas y animales requieren fósforo. Los compuestos que contienen fósforo son esenciales para la fotosíntesis en las plantas, para transformaciones energéticas y para la actividad de algunas hormonas. Los animales obtienen fósforo de las plantas, las plantas lo obtienen de la tierra en la que crecen y, si no se han usado fertilizantes, el fósforo en el suelo proviene del material original del que éste está hecho.

1.4.5.1 Comportamiento del fósforo en el suelo

La concentración de fósforo en suelos no fertilizados varía entre 100 a 3000 miligramos de fósforo por kilogramo de tierra (Dahal, 1977). Las principales formas de fósforo inorgánico en los suelos son H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} . Esta es la forma en la cual el fósforo es utilizado por las plantas. Sin embargo, estos iones pueden también ser adsorbidos hacia la materia sólida del suelo. Alrededor del 50 al 80% del fósforo en el suelo es orgánico y proviene de la descomposición de plantas y otros organismos muertos, etc.; como fósforo es encontrado en las membranas celulares y en el DNA de los organismos vivos (Rodas, 2006). El fósforo está naturalmente disponible en el suelo, sin embargo, no existe en la cantidad suficiente para que las plantas puedan crecer. Los niveles de fósforo se reducen cuando los animales se alimentan de las plantas y luego mueren, también cuando éste es adsorbido en partículas o arrastrado por la lluvia (Dahal, 1977). Es uno de los elementos biológicos más importantes. Ayuda a unir a las moléculas de DNA y RNA y juega un rol importante en la transferencia de energía hacia las moléculas de ATP y ADP. Es también utilizado ampliamente en la agricultura como fertilizante. Su ciclo es único entre los principales ciclos biogeoquímicos, no incluye una fase gaseosa, aunque se producen pequeñas cantidades de ácido fosfórico (H_3PO_4) las cuales encuentran su vía para escapar hacia la atmósfera, contribuyendo en muchos casos a una precipitación ácida. El mayor reservorio de fósforo es la roca sedimentaria (Boonkerd, 2000).

El ciclo del fósforo se origina con la introducción de fosfato (PO_4) en los suelos cercanos a las rocas. El fosfato ingresa a los sistemas vivos cuando las plantas lo toman en forma de iones fosfato del suelo. El fosfato se mueve desde las plantas hacia los animales cuando los herbívoros comen plantas y cuando los carnívoros comen herbívoros. El fosfato que pasó a formar parte del tejido de los animales es regresado al suelo por medio de excreción, orina o heces, en las plantas éste regresa por medio de su descomposición (Boonkerd, 2000). El fósforo presente en el suelo puede ser agrupado en cuatro formas generales: (1) fósforo inorgánico, disponible para la planta, y tres formas que no son disponibles para las plantas: (2) fósforo orgánico, (3) fósforo adsorbido y (4) fósforo mineral primario (Cuadro 1.2).

Cuadro 1.2 Ciclo del fósforo simplificado donde se presentan las diferentes vías por las cuales el fósforo es absorbido por las plantas



Fuente: Fixen, 2003

Los diferentes procesos mediante los cuales el fósforo se transforma son: erosión y precipitación, mineralización e inmovilización y adsorción y desorción. Tanto erosión como mineralización y desorción son procesos que elevan el fósforo disponible para la planta, mientras que los tres restantes lo disminuyen.

a) Erosión o desgaste y precipitación

Los suelos poseen minerales ricos en fósforo de manera natural, estos son erosionados por largos períodos de tiempo y se vuelven disponibles para las plantas. El fósforo puede dejar de ser disponible a través de la precipitación, la cual se lleva a cabo si el fósforo inorgánico disponible de las plantas reacciona con Fe, Al y Mg disueltos en suelos ácidos o con el calcio en suelos alcalinos para formar minerales de fosfato.

b) Mineralización e inmovilización

La mineralización es la conversión microbiana de fósforo orgánico a $H_2PO_4^-$ o HPO_4^{2-} , formas disponibles para las plantas conocidas como ortofosfatos. Este

proceso reduce la necesidad de la aplicación de fertilizantes. La inmovilización se lleva a cabo cuando estas formas disponibles son consumidas por microbios convirtiendo todo el fósforo en sus formas orgánicas, no disponibles para las plantas. El fósforo tomado por las bacterias se hace disponible una vez que el microorganismo muere.

c) Adsorción y desorción

La adsorción es la unión química del fósforo disponible para las plantas con las partículas de suelo, lo cual reduce su disponibilidad. Es un proceso rápido mientras que la desorción es lenta y se diferencia de la precipitación en el hecho de que es una unión reversible y ésta última implica cambios permanentes en las propiedades químicas del fósforo. La desorción es la liberación del fósforo adsorbido hacia la solución del suelo.

d) Eliminación

Es la mayor causa de pérdida de fósforo en las granjas, se produce debido a la acción arrasadora del agua sobre las partículas de suelo unidas al fósforo en los sedimentos al igual que con el fósforo disuelto aplicado en los fertilizantes. Esto se ve disminuido con la reducción del flujo de agua sobre la tierra (Hyland, et al., 2005)

1.4.5.2 Comportamiento del fósforo en las plantas

Casi todos los procesos que se llevan a cabo en las plantas requieren de fósforo (P) para operar. Este elemento es esencial en las reacciones relacionadas con el mantenimiento de la vida como los son: transferencia de energía, activación de proteínas y regulación de procesos metabólicos. Debido a sus reacciones con los componentes del suelo, el fósforo ingresa a las raíces por medio de difusión, al igual que el potasio.

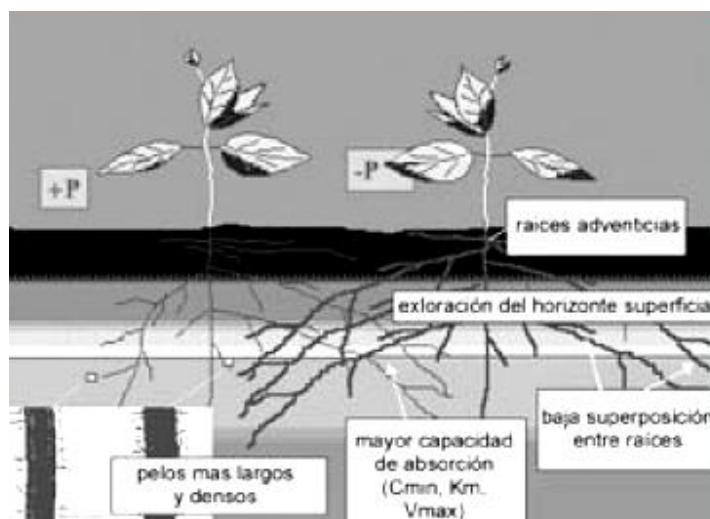


Figura 1.2 Influencia de la arquitectura radical en la eficiencia en la adquisición de fósforo (Fuente: Rubio, 2002).

La absorción de éste ocurre primeramente en las puntas jóvenes de las raíces dentro de las células epidérmicas con pelos radicales y dentro de las células de la capa superficial de la corteza radicular. Las primeras, se expanden de manera continua en la tierra y están expuestas a las concentraciones de fósforo encontradas en la mayor parte de la solución del suelo (Figura 1.2). El fósforo solo se desplaza por escasos milímetros debido a su intensa interacción con la matriz del suelo, su absorción depende en gran parte del grado en el que las raíces de las plantas exploran el suelo. Debido a que la disponibilidad de fósforo es más elevada en la superficie del suelo y decrece con la profundidad, se ha afirmado que raíces con mayor concentración de pelos radicales en la superficie son más eficientes en la absorción de fósforo (Rubio, 2002). Hedley et al. (1994), señalaron cuatro mecanismos externos en la rizosfera, determinantes para la eficiencia de absorción de P por las plantas:

- a) Modificación del sistema radical
- b) Cambios del pH en el suelo inducido por las raíces producidos por la liberación de agentes quelantes, ácidos orgánicos y otros compuestos que alteran la química del suelo, pudiendo ocurrir solubilización del P-inorgánico.
- c) Asociación de las raíces con hongos micorrízicos.
- d) Habilidad para utilizar el P-orgánico del suelo por medio de la liberación de enzimas fosfatasa ácidas por parte de las raíces y microorganismos del suelo que

actúan sobre la materia orgánica originando una mineralización netamente bioquímica.

1.4.5.2.1. Transporte Apoplástico y Simplástico

Existen dos vías para la absorción de agua y nutrientes en la raíz:

Vía A o vía del simplasto o simplasma, ruta donde el agua y los nutrientes pasan de una célula a la siguiente atravesando la pared celular y el plasmalema para luego entrar en el citoplasma. Posteriormente esta solución se mueve a lo largo cada célula a través de los plasmodesmos que conectan el citoplasma de una célula con el de la célula vecina. Para esto se requiere que los solutos atraviesen la barrera semipermeable que constituye el plasmalema. El simplasma es un sistema vivo dentro de la planta, que conecta cada órgano en crecimiento. Está conformado por células de paredes delgadas denominadas parénquima donde el contenido de cada una (protoplasma) se conecta con el de la adyacente, es muy frágil y requiere de la protección de apoplasto para mantener su estabilidad.

Vía B o vía del apoplasto, ruta donde el agua y los nutrientes disueltos en ella se mueven exclusivamente a través de las paredes celulares, sin cruzar membranas. Es el sistema continuo de paredes celulares y espacios intercelulares en los tejidos vegetales y equivale al espacio de difusión libre hasta la endodermis y comprende las paredes de la raíz, las células corticales y los espacios abiertos entre estos tejidos (Figura 1.3).



Figura 1.3 Sección transversal de una raíz que muestra las vías simplástica y apoplástica del movimiento de nutrientes (Fuente: Mikkelsen, 2005).

Este “espacio muerto” está formado de fibras entrelazadas que forman una especie de rejilla entre las raíces que sirve como un filtro para la solución del suelo, la misma que se mueve a través de estos poros hasta que alcanza la zona denominada “banda caspariana” que rodea el núcleo de la raíz. Esta banda obstruye el movimiento de la solución del suelo a través del apoplasto pues está formada principalmente por suberina, un compuesto hidrofóbico que actúa como una barrera contra el agua y los solutos. Es aquí donde los nutrientes deben optar por la primera vía o vía del simplasto para poder entrar en las células. Una carga neta negativa asociada con las células de las paredes, repele aniones que se encuentran en la solución como fosfato y nitrato (NO_3^-) y limita su transporte a poros de mayor tamaño dentro del apoplasto.

El movimiento de nutrientes a través de éste, dentro de la raíz, es mayor en la cercanía de la punta y en tejidos jóvenes donde la banda de Caspary aún no se ha desarrollado completamente. En el apoplasto no hay barreras de permeabilidad y los nutrientes siguen aquí las leyes de la difusión simple.

Aunque la concentración de fósforo en la solución del suelo puede ser menor a 50 ppb, la concentración dentro de las células de las plantas es mucho mayor. Para que las plantas eleven esta concentración requieren del desarrollo de transporte activo a través de las membranas de la raíz. Algunos cambios ocurren en la rizosfera con el

fin de mejorar la absorción del fósforo, muchas raíces exudan ácidos orgánicos (principalmente citrato y oxalato) hacia la rizosfera, alterando el pH del suelo y estimulando la disponibilidad de fósforo. Además, los compuestos orgánicos desplazan al fósforo retenido en el suelo (intercambio de ligandos) y algunos microorganismos propios de la rizosfera ayudan a la solubilización del fósforo. Pero ninguno de estos mecanismos puede ayudar a que las plantas se provean de fósforo si la tierra no posee la cantidad suficiente (Mikkelsen, 2005).

Las plantas captan los elementos minerales del suelo por medio de la absorción radicular, mecanismo donde están involucrados procesos físico-químicos y procesos contragradiante. Ya en la raíz, los nutrientes pueden seguir la vía del apoplasta hasta llegar a la endodermis donde se verán forzados a pasar activamente por el simplasma, o serán absorbidos por la epidermis o por los pelos radiculares para pasar de célula a célula por medio de los plasmodesmos en la vía del simplasma. Ya en el sistema vascular, la solución del suelo o los iones pasan del simplasma al apoplasta para después llegar al xilema desde donde son arrastrados por la corriente de transpiración hacia toda la planta (Giménez, 1991).

La deficiencia de fósforo en las plantas se presenta con la aparición de una coloración morada en las hojas y tejidos jóvenes debido a la formación de antocianinas producidas por como respuesta a la falta de fósforo en la formación de pentosas.

1.5 Sistema de hipótesis o pregunta de investigación

La sobrevivencia del biofertilizante producido a partir de bacterias solubilizadoras de fósforo en 3 meses supera el mínimo de 10^8 células por mililitro, estimado por bibliografía asociada a biofertilizantes o inoculantes biológicos (MINIAGP, 2000; Anexo N; Gonzáles, 2004).

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

La empresa auspiciante del proyecto de tesis fue Agrodiagnostic, las instituciones que colaboraron con los análisis fisicoquímicos del medio de cultivo alternativo y del sustrato utilizado para la fase de invernadero fueron: Laboratorios Centrocesal y Laboratorio de manejo de suelos y aguas de la Estación Experimental “Santa Catalina” respectivamente. La fase de invernadero se llevó a cabo en las instalaciones de uno de los invernaderos del Centro Internacional de la papa (CIP).

2.2 Zona de estudio

Fase de laboratorio:

Lugar: Laboratorios “Agrodiagnostic”
Provincia: Pichincha
Cantón: Quito
Parroquia: Comité del Pueblo
Zona: Norte de Quito
Altitud: 2840 m.s.n.m

Fase de invernadero:

Lugar: Centro Internacional de la papa
Provincia: Pichincha
Cantón: Mejía
Parroquia: Cutuglahua
Altitud: 3058 m.s.n.m
Latitud: 0°22' Sur
Longitud: 78°33' Oeste
Área del invernadero: 184 m²

2.3 Período de tiempo de investigación

El proyecto se inició en el mes de noviembre del 2007 y su parte experimental finalizó en julio del 2008.

2.4 Diseño experimental

2.4.1 Fase de Laboratorio

2.4.1.1 Evaluación del crecimiento bacteriano en los tres biofertilizantes

La concentración bacteriana expresada en Log_{10} (UFC/mL) se tomó como un índice del crecimiento bacteriano, el cual se evaluó en dos repeticiones, utilizando un DCA (Diseño completamente al azar) tomando como tratamientos los tres biofertilizantes realizados a partir de tres medios de cultivo diferentes (comercial (PKM), jugo de caña puro (JCP) y jugo de caña modificado (JCM), a los cuales se los consideró como tres biofertilizantes diferentes.

Tratamientos: 3 (PKM, JCP y JCM)

Unidad Experimental: Un tubo con 5 mL de cultivo líquido.

Variable: Concentración bacteriana en Log_{10} (UFC/mL)

Repeticiones u observaciones: 17 (una observación cada tres horas durante un período de 48 horas)

2.4.1.2 Evaluación de la sobrevivencia de los biofertilizantes

La sobrevivencia de los biofertilizantes se evaluó con un experimento factorial en DBCA de 3 x 3 x 2 repeticiones:

Factor B = Biofertilizantes

3 niveles:

PKM: b0

JCP: b1

JCM: b2

Factor P = Períodos de evaluación

3 niveles:

AE (antes del envasado): p0

1M (al mes de envasado): p1

3M (a los tres meses de envasado): p2

Variable: Log_{10} (UFC/mL)

2.4.2 Fase de Invernadero

2.4.2.1 Evaluación de los biofertilizantes en tres distintos sustratos

Se preparó un biofertilizante a partir de tres medios de cultivo: comercial (PKM), jugo de caña puro (JCP) y jugo de caña modificado (JCM), a los cuales se los consideró como tres biofertilizantes diferentes. A estos, se los evaluó utilizando un experimento factorial en DBCA con tres repeticiones frente a un testigo y un tratamiento químico: $3 \times 3 + 2$. Los tres biofertilizantes se evaluaron en los sustratos: tierra, tierra 50% + 50% sustrato CIP y sustrato CIP solo. Este es un sustrato especial elaborado por el CIP, que contiene humus, pomina y tierra de zanja.

Factor de estudio: Evaluación de 3 biofertilizantes: uno elaborado con medio comercial (PKM), el segundo elaborado con jugo de caña puro (JCP) y el tercero elaborado con jugo de caña modificado (JCM) en 3 dosis (0.5 mL/L, 1.5 mL/L y 2.5 mL/L), desarrollados a partir de bacterias solubilizadoras de fósforo en invernadero utilizando semillas de maíz (*Zea mays*) de la variedad INIAP 122, cuya información se detalla en el Anexo D.

Bloques o Repeticiones: 3

Unidad experimental: 1 maceta de 5 kg de capacidad con cuatro plantas de maíz de la variedad INIAP 122.

Factor B = Biofertilizantes

3 niveles:

PKM: b0

JCP: b1

JCM: b2

Factor D = Dosis

3 niveles:

0.5 mL/L: d0

1.5 mL/L: d1

2.5 mL/L: d2

b: Tratamiento testigo

tq: Tratamiento químico

Tratamientos: 11: b0d0, b0d1, b0d2, b1d0, b1d1, b1d2, b2d0, b2d1, b2d2, b, y tq

Variables evaluadas: Incremento en la altura de la planta de maíz (*Zea mays*) de la variedad INIAP 122 en centímetros, longitud de las raíces, diámetro del tallo, peso seco, porcentaje de materia seca, porcentaje de humedad, razón peso seco parte aérea/ peso seco parte radical.

2.5 Procedimientos

2.5.1 Fase de Laboratorio

2.5.1.1. Selección de cepas bacterianas

Con fundamento en el trabajo elaborado por Huilcapi (2007), se seleccionaron las cepas de bacterias con la capacidad solubilizadora de fósforo más alta almacenadas en el banco de Agrobiodiagnóstico para la producción del biofertilizante. Como base para esta selección se tomaron en cuenta las pruebas de antagonismo realizadas entre las bacterias en el ensayo desarrollado por Huilcapi (2007); se escogieron solo las cepas no antagónicas entre sí, encontrándose un total de 10 cepas que cumplían estas características (Anexo A).

2.5.1.2 Reactivación de las cepas bacterianas

Esta fase es primordial para el desarrollo del proyecto debido a que implica el correcto aislamiento y pureza de los cultivos bacterianos con los que se va a trabajar. La pureza fue monitoreada por medio de una tinción Gram de cada cultivo para comprobar la ausencia de bacterias contaminantes. Se inició el ensayo inoculando las cepas en Agar Nutritivo-7145A de la casa comercial Acumedia. Se colocaron 20 µL de la solución bacteriana almacenada en el banco en el medio de cultivo, utilizando una micropipeta calibrada Icell-MOD P-213 con puntas debidamente esterilizadas, y se procedió a la siembra por estriado o rayado en cajas petri, se las dejó en incubación por 24 horas a 30° C en una incubadora Incucell. De las 10 cepas señaladas, solamente 6 fueron sometidas al proceso de reactivación debido a que los bancos de las dos restantes presentaron contaminación, en este caso, se decidió no utilizar estas cepas

puesto que las bacterias contaminantes podrían afectar el normal desenvolvimiento de las cepas solubilizadoras (Tabla 2.1).

Tabla 2.1 Microorganismos solubilizadores de fósforo utilizados para la producción del biofertilizante. Quito, Pichincha, 2008.

Cepa	Descripción
<i>Azotobacter</i> sp. (Az 6)	Bacilos Gram Negativos
<i>Pseudomonas putida</i> (AL-2)	Bacilos Gram Negativos
<i>Azotobacter</i> sp. (Az 8)	Bacilos Gram Negativos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (BG-4)	Bacilos Gram Negativos
<i>Azotobacter</i> sp. (Az 10)	Bacilos Gram Negativos
<i>Azotobacter</i> sp. (Az 19)	Bacilos Gram Negativos

Inicialmente, se procedió a la reactivación de las cepas en el medio Agar Nutritivo, pero debido a que es un medio que favorece la proliferación de otro tipo de microorganismos presentes en el banco, resultado de la contaminación, se optó por utilizar los medios King B y Ashby, cuyas composiciones se encuentran detalladas en los Cuadros 2.1 y 2.2 y fueron proporcionadas por Agrodiagnostic, para reactivar *Pseudomonas* sp. y *Azotobacter* sp., respectivamente.

A partir de una siembra por estriado con asa de siembra (Brock, 2001), y la incubación durante 24 y 48 horas correspondientemente, se logró una reactivación selectiva de las bacterias deseadas, obteniéndose cultivos puros de las mismas, con una concentración de aproximadamente 10^3 UFC/ mL por cada cepa (Matheus, 2004). Cuadro 2.1 Composición del medio de cultivo Agar Ashby utilizado para la reactivación de *Azotobacter* sp. Quito, Pichincha, 2008.

Reactivo	Composición por litro
Sacarosa	10 g
Fosfato monobásico de potasio	0.2 g
Sulfato de magnesio	0.2 g
Cloruro de calcio	0.2 g
Sulfato de calcio	0.2 g
Carbonato de calcio	5 g
Agar Agar*	20 g

*Acumedia- 7558

Cuadro 2.2 Composición del medio de cultivo Agar King B utilizado para la reactivación de *Pseudomonas* sp. Quito, Pichincha, 2008.

Reactivo	Composición por litro
Agua de peptona*	20 g
Fosfato dipotásico	1.5 g
Sulfato de magnesio	1.5 g
Glicerina o glicerol	10 g
Agar Agar	15 g

* Acumedia-7365

2.5.1.3 Selección, formulación y preparación de los medios de cultivo para la producción del biofertilizante

2.5.1.3.1 Selección del medio de cultivo comercial

La selección del medio de cultivo comercial fue basándose en revisión bibliográfica. Para el caso de *Azotobacter* sp., se encontró una gran variedad de medios químicamente definidos y fácilmente reproducibles, entre ellos se encontró el Caldo Ashby y el Caldo Pikovskaya modificado con roca fosfórica. Se optó por la utilización de este último codificándolo como PKM y llamándolo también medio comercial, cuya composición se detalla en el Cuadro 2.3, debido a que además de ser un medio que favorece el crecimiento de bacterias del género *Azotobacter* sp., también es útil para cepas solubilizadoras de fósforo entre las que se encuentra el género *Pseudomonas* sp., según lo descrito por Subba-Rao (1999).

Cuadro 2.3 Composición del caldo de cultivo Pikovskaya modificado con roca fosfórica (PKM) y del medio alternativo modificado (JCM) utilizados para la producción de los biofertilizantes. Quito, Pichincha, 2008.

Reactivo	Composición por L para el medio Pikovskaya modificado (PKM)	Composición por L para el medio alternativo modificado (JCM)
Roca fosfórica	5 g	4.98
Glucosa	10 g	-
Cloruro de potasio	0.2 g	-
Cloruro de sodio	0.2 g	0.17
Sulfato de amonio	0.5 g	0.10

Sulfato de magnesio	0.1 g	0.0082
Extracto de levadura*	3.5 g	3.50
Agua de Peptona	5 g	5.00
Carbonato de calcio	0.1 g	0.05

* Acumedia-7184

2.5.1.3.2 Selección y formulación del medio de cultivo alternativo

La selección del medio de cultivo alternativo fue sobre la base de una revisión bibliográfica, tomando en cuenta la reducción de costos para su obtención. Se utilizó jugo puro de caña codificándolo como JCP y nombrándolo también como medio de cultivo alternativo, debido a su alto contenido de carbohidratos, principal componente requerido por las bacterias, el contenido estimado por litro de este medio está resumido en el Cuadro 2.4. Su formulación se realizó sobre la base de sus análisis fisicoquímicos, donde el parámetro más relevante tomado en consideración fue el alto contenido de carbohidratos. Sobre la base de los análisis realizados por Centrocasal (Anexo B), se estableció utilizar tanto jugo de caña puro (JCP), como jugo de caña añadido los nutrientes necesarios para asemejar su composición al medio comercial, al mismo que se lo llamó medio alternativo modificado y se codificó con las siglas JCM, para conocer el comportamiento de las bacterias en los distintos medios. Pese a la naturaleza fermentativa del medio, lo que no constituyó una desventaja, la concentración de la biomasa bacteriana se mantuvo dentro del rango aceptable para biofertilizantes. La esterilización tanto del medio alternativo puro como del modificado constituyó un proceso esencial para evitar la presencia de levaduras esporádicas que puedan afectar la calidad del producto.

Cuadro 2.4 Contenido nutritivo estimado para un litro de jugo de caña, tomado de los análisis químicos realizados por Centrocasal (Anexo B). Quito, Pichincha, 2008.

Parámetro	Composición por litro
Carbohidratos totales	151.9 g
Sodio	0.0342 g
Potasio	0.3488 g
Proteínas	0.4 g
Magnesio	0.0918 g
Calcio	0.0497 g

2.5.1.4 Elaboración de la curva de calibración para el medio de cultivo comercial PKM

Existe un método para determinar la concentración bacteriana basándose en espectrofotometría, el mismo que depende de la calidad del medio y las características, fundamentalmente su turbidez. Tomando en cuenta esta información, se determinó la concentración bacteriana por este método en el cultivo bacteriano realizado en el medio PKM, evaluando su absorbancia. Para poder relacionar la absorbancia con la cantidad de UFC presentes en cada mililitro de medio se elaboró una curva de calibración; para su construcción, se estableció la longitud de onda con la que se trabajó a lo largo de todo el ensayo que fue de 560 nm, pues esta absorbancia fue utilizada en ensayos previos obteniéndose excelentes resultados además de ser la densidad óptica utilizada para la elaboración de la curva de Mc. Farland (Anexo J). Pese a que la curva de Mc. Farland fue elaborada con el fin de relacionar UFC/mL con la absorbancia de un cultivo de *E. coli* y especies cercanas, se utilizó una metodología similar para el cálculo de la concentración bacteriana de otras especies a partir de una ecuación que relaciona su densidad óptica con su concentración.

Para la obtención de esta curva se partió de un inóculo de 100 mL compuesto por 90% de medio PKM y 10% de pool bacteriano incubado por 24 horas (formado por bacterias solubilizadoras de fósforo: *Pseudomonas* sp. y *Azotobacter* sp.). Posteriormente, a partir del inóculo se prepararon diluciones sucesivas (10^{-1} a 10^{-10}) en agua estéril, de cada dilución se tomó una parte para la medición en el espectrofotómetro y otra para la siembra en placas Kirkman (1996) y Gaitán y García (1998). Esta siembra en placa se realizó colocando 100 μ L de cada dilución en Agar Nutriente Acumedia 7568, para el conteo de unidades formadoras de colonias o UFC usando el método de siembra en placa por extensión descrito por Brock (2001). Para esto se utilizó una micropipeta calibrada de 100 μ L Icell-MOD P-213 y puntas de plástico debidamente esterilizadas. La transmitancia de cada dilución a una longitud de onda de 540 nm se midió utilizando un espectrofotómetro Spectronic 20 Baush y Lomb en tubos de vidrio Milton Roy.

Para calcular la absorbancia o densidad óptica de las muestras se utilizó la siguiente fórmula descrita por Lambert-Beer (González y Varea, 2006):

$$O.D = A = 2 - \log \%T$$

Este procedimiento se realizó manteniendo las condiciones óptimas para el crecimiento bacteriano bajo las cuales se desarrolló todo el ensayo: temperatura de 20 a 35 °C (medida con un termómetro B&C Germany) y pH neutro o ligeramente ácido (controlado con papel medidor de pH Macery-Nagel 921-10).

Kirkman (1996) afirma que se puede correlacionar de manera lineal la concentración bacteriana con la absorbancia de una muestra. Para poder calcular la concentración bacteriana a partir de datos de absorbancias conocidas, se debe colocar a la variable Densidad Óptica en el eje de las abscisas (X) y la concentración bacteriana en el eje de de las ordenadas (Y), esta curva debe ser ajustada a una línea recta por el método de mínimos cuadrados. Esto último se realizó utilizando el programa Excel 2007 del paquete Microsoft Office 2007 y el software XLSTAT versión 2008.6.05. Para los medios de cultivo alternativos, no se elaboró una curva de calibración debido a que la turbidez que presentaron hizo imposible el empleo del espectrofotómetro. Para estos se realizó una siembra en cajas petri de las muestras tomadas cada tres horas, procurando preparar las diluciones necesarias para el conteo de UFC/mL utilizadas para la elaboración de la curva de crecimiento.

2.5.1.5 Producción de biofertilizante a partir de bacterias solubilizadoras de fósforo a escala de 1 litro utilizando los tres medios de cultivo: PKM, JCP y JCM

Se utilizaron cultivos en su fase exponencial tanto para los preinóculos como para los inóculos de esta fase y la fase a escala 10 L, esto se debe a que durante esta la fase exponencial, la concentración bacteriana está en ascenso, y por ende la concentración de los inóculos es mayor.

2.5.1.5.1 Preparación del inóculo y fermentación discontinua

Para preparar el inóculo, se transfirieron las 6 cepas cultivadas en medios sólidos hacia un medio líquido que consistió en Caldo Nutritivo-7146 de la casa comercial Acumedia y se las dejó en incubación por 24 horas a 30° C; posteriormente se preparó un pool con las mismas y se lo dejó incubar un tiempo de 3 horas a 30° C, verificando visualmente que su turbidez vaya en aumento (Gaitán y García 1998). Posteriormente, se vertieron 100 mL de pool elaborado (inóculo) lo que corresponde a un 10 % del volumen total a fermentar según Trevan, et al. (1998) en 900 mL de cada uno de los medios de cultivo (PKM, JCP y JCM), iniciándose la fase de producción a escala 1 L. Se construyó un fermentador discontinuo para cada medio, los tres consistieron en matraces de vidrio debidamente sellados, a los cuales se les añadió oxígeno en forma de aire (con un flujo de 1 L/minuto aproximadamente) utilizando motores para peceras Lifetech. A continuación se realizaron una serie de 6 ensayos que consistieron en dos repeticiones para cada medio de cultivo para evaluar las variables: crecimiento bacteriano (se midió la absorbancia con una longitud de onda de 540 nm con la ayuda del espectrofotómetro para el medio PKM y se realizaron siembras en cajas para los medios JCP y JCM), pH con la ayuda de papel medidor de pH Macery-Nagel 921-10 y temperatura en grados centígrados con la ayuda de un termómetro B&C Germany. Todas las variables fueron evaluadas midiendo sus parámetros en cada una de las muestras tomadas de los tres fermentadores en intervalos de tres horas durante las 48 horas que duró cada ensayo. Además, se graficó la cinética de la fase exponencial de acuerdo a las siguientes ecuaciones dadas por Brock (2001), que se adaptan muy bien a los datos experimentales de esta fase:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

De donde se obtiene la siguiente ecuación después de integrarla:

$$\ln X_t = \ln X_0 + \mu t$$

$$X_t = X_0 * e^{\mu t}$$

La transformación de esta ecuación en una recta tomando logaritmos proporciona lo siguiente:

$$\log_{10} X_t = \log_{10} X_0 + \frac{\mu * t}{2.303}$$

$$X_t = X_0 * 10^{\frac{\mu t}{2.303}}$$

Un parámetro constante importante para una población creciente de modo exponencial es el tiempo de duplicación o generación, que ocurre cuando $\frac{X_t}{X_0} = 2$.

Reajustando y sustituyendo este valor en la ecuación anterior, tenemos:

$$2 = 10^{\frac{\mu(t_{gen})}{2.303}}$$

De donde se obtiene:

$$\mu = \frac{\log_{10} 2 * 2.303}{t_{gen}} = \frac{0.693}{t_{gen}} \quad n = \frac{t}{t_{gen}}$$

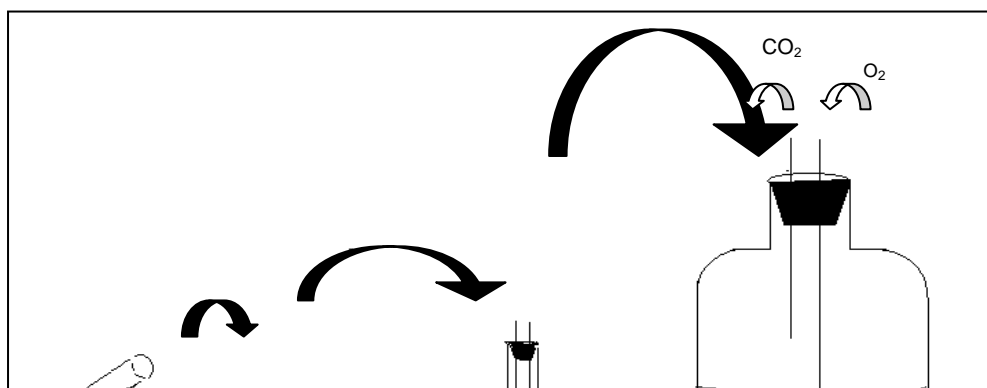
Donde n es el número de veces en las que la concentración bacteriana fue duplicada durante la fase exponencial (número de generaciones) y μ es la relación constante de crecimiento o velocidad instantánea. El tiempo de generación t_{gen} puede utilizarse para definir otro parámetro de crecimiento, k, que es la constante de velocidad media del crecimiento que expresa mejor la velocidad de crecimiento en un cultivo discontinuo como el empleado en este ensayo:

$$k = \frac{1}{t_{gen}}$$

Estas ecuaciones reflejan las actividades de una población de un cultivo típico, donde X_0 corresponde al número celular o densidad de la población bacteriana al tiempo 0, X_t es el número celular o densidad de la población al tiempo t, t es el tiempo que transcurre mientras se mide el crecimiento y μ corresponde a la constante de velocidad instantánea que constituye una aproximación más cercana de la velocidad a la que transcurren las actividades individuales.

2.5.1.6 Escalado a 10 L de la producción del biofertilizante a partir de bacterias solubilizadoras de fósforo utilizando los tres medios de cultivo

De manera usual en el escalado se sigue un proceso de preinoculación, inoculación, incubación y traspaso de pequeños volúmenes a volúmenes mayores, esto puede observarse en la Figura 2.1 y en el Anexo F.



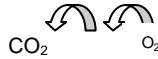


Figura 2.1 Esquema del escalado a 10 L del proceso de producción de biofertilizante a partir de bacterias solubilizadoras de fósforo. Quito, Pichincha, 2008.

2.5.1.6.1 Preparación del preinóculo

El preinóculo consistió en la preparación del pool bacteriano constituido por las 6 cepas solubilizadoras de fósforo aisladas, el mismo que se dejó incubar durante tres horas.

2.5.1.6.2 Preparación del inóculo y fermentación discontinua a escala 10 L

Posteriormente 100 mL (10% del volumen a fermentar) de este pool fueron vertidos en 900 mL de cada uno de los tres medios de cultivo, iniciándose la fase de producción a escala 1 L (inóculo). En esta última se detuvo la fermentación a la hora en la que se inició la fase exponencial para continuar con el proceso de producción a escala 10 L de forma aséptica (Echeverría, 2007).

Se colocó 1 L del inóculo en 9 L de cada uno de los medios en envases de 40 L, el aire para el fermentador discontinuo fue proporcionado por motores para peceras con un flujo aproximado de 1 L/ minuto. En esta fase se evaluaron las mismas variables evaluadas en la fase de producción 1 L: crecimiento bacteriano, pH y temperatura.

Se tomaron los datos tanto de absorbancia para el medio comercial (PKM) como conteo de unidades formadoras de colonias o UFC/mL en placa para los medios

alternativo puro (JCP) y alternativo modificado (JCM). Con estos datos se realizó una curva de crecimiento al final de cada ensayo para conocer el comportamiento de las bacterias y el tiempo en el que alcanzaron su fase exponencial para saber donde detener el proceso de fermentación y proceder al almacenamiento y empaquetado del producto.

Durante esta y la anterior fase se toma muy en cuenta el establecimiento de las condiciones lo más estériles posibles, por ello se realizaron siembras en placa para conocer si existe o no contaminación en los biofertilizantes mediante tinción Gram (Mateos, 2007).

2.5.2 Fase de Invernadero

2.5.2.1 Selección del sustrato para las macetas

Debido a que se requirió evaluar la capacidad solubilizadora de fósforo de las cepas que conforman el producto, se estableció la utilización de tierra normal esterilizada procedente del CIP para las macetas. A la tierra se le realizaron análisis previos de contenido de los nutrientes principales: N, P y K además de P soluble y P total (Anexo C, sección C.1). Además, debido a la consistencia compacta de la tierra utilizada como sustrato, se decidió utilizar también un tipo de sustrato preparado por el CIP, el mismo que consistió en una formulación de humus de lombriz, tierra de zanja y pomina, para garantizar el crecimiento de las plantas en él y tener un parámetro para comparar en el momento del análisis. Finalmente se utilizó un tercer sustrato, consistente en tierra estéril 50% y sustrato del CIP 50%.

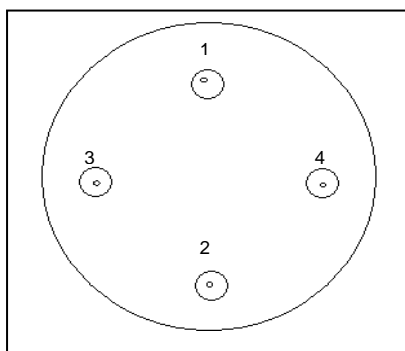
2.5.2.2 Esterilización del sustrato

Inicialmente, se estableció una esterilización utilizando una autoclave pero debido al gran volumen de tierra requerida se utilizó un equipo esterilizador Beckett

RWB (20 PSI), con el cual se obtuvo el producto estéril en 6 horas. Finalizada esta operación, se procedió a dejar enfriar los sustratos durante 48 horas, después de lo cual se procedió a colocarlos en las macetas de 5 kg.

2.5.2.3 Siembra en macetas

Se estableció un experimento factorial en DBCA con dos adicionales que consistieron el testigo y el tratamiento químico (18-46-00 o Fosfato diamónico): 3x3+2. Para los 3 sustratos se evaluaron los 3 biofertilizantes (PKM, JCP y JCM) en 3 dosis (0.5 mL/L, 1.5 mL/L y 2.5 mL/L, las cuales corresponden a una dosis de: 0.5 L/Ha, 1.5 L/Ha y 2.5 L/Ha) en macetas con semillas de maíz (*Zea mays*) de la variedad INIAP 122. Se colocaron aproximadamente 3 kg de cada uno de los tres



sustratos en cada maceta, se procedió a embeber a la semilla de maíz en cada uno de los tratamientos, además de humedecer los sustratos antes de la siembra. Se plantaron 4 semillas en cada maceta a una profundidad aproximada de 2.5 cm siguiendo un mismo patrón de ubicación (en cruz), (Figura 2.2).

Figura 2.2 Esquema de la disposición en cruz de las semillas de maíz de la variedad INIAP 122 en cada maceta. Quito, Pichincha, 2008.

Las macetas fueron colocadas en su totalidad en la misma cama del invernadero para asegurar la igual incidencia de luz, humedad y temperatura para todas las macetas, como se puede observar en el esquema de la Figura 2.3 y en el Anexo I.

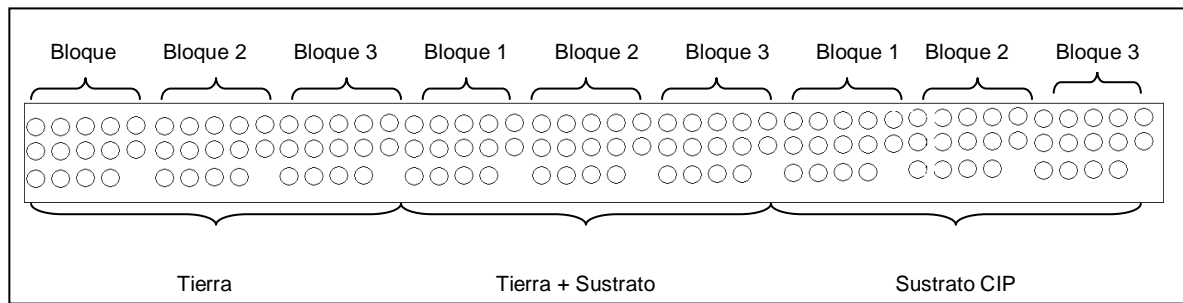


Figura 2.3 Esquema de la disposición en la cama de invernadero de los distintos bloques por sustrato. Quito, Pichincha, 2008.

La disposición de las macetas por tratamiento fue al azar en los bloques II y III de cada sustrato ya que en el bloque I se distribuyó de manera ordenada por tratamiento y por dosis.

2.5.2.4 Germinación de las semillas

Las macetas con las semillas se colocaron dentro de un invernadero cuyo ambiente fue controlado y contaba con la luz y humedad necesarias para el cultivo. Se realizó un control de temperatura y humedad relativa por medio de la utilización de un sensor especializado denominado HOB0 H8 de marca Onset, cuyos datos fueron almacenados en el software Box CarPro 4.3 y se presentan en el Anexo K.

2.5.2.5 Riego de las plántulas

Se utilizó una manguera con una boquilla de gota fina para asegurar que la cantidad de agua vertida sea igual para todas las macetas. El riego se hizo dos veces al día cada 48 horas, una a las 9 de la mañana y otra a las 3 de la tarde debido a que el maíz es un cultivo exigente de agua. Para administrar el agua de manera adecuada, se procuró no exceder la capacidad de campo del sustrato impidiendo que el aire presente en los poros del suelo sea desplazado por el agua, evitando una posibles asfixia radicular (Aello, et al., 2003). El maíz al igual que el resto de plantas, transpira agua en forma de vapor, se lleva a cabo un fenómeno de demanda de agua por parte de la atmósfera y de oferta por parte del suelo. Si el suelo suministra de

forma eficiente el agua demandada, las plantas de maíz crecen adecuadamente, estas condiciones son las se procuraron mantener durante todo el ensayo.

2.5.2.6 Medición de los parámetros a evaluar

a) Altura de las plantas

Esta variable fue evaluada con un metro, con el cual se tomó la medida de la altura a partir del nivel de la tierra hasta la hoja con más empinamiento.

b) Longitud de las raíces

Con la ayuda de un metro se tomó la medida a partir de la raíz más larga y fue medida en centímetros desde la base del tallo al ápice radical.

c) Diámetro del tallo

Esta variable fue evaluada con un calibrador de marca Mitutoyo. Se tomó la medida del tallo a partir del extremo más próximo al nivel de la tierra en la maceta.

d) Peso seco

La evaluación del peso seco es una medida real del crecimiento de las plantas debido a que las plantas tienen una alta composición de agua y el nivel de esta en una planta dependerá de la cantidad de agua presente en el ambiente. Para esto, se removió el sustrato y se extrajeron suavemente cada una de las plántulas de la maceta (4 plántulas). Se las colocó en un recipiente semi plano con agua para limpiar las raíces y se procedió a pesar cada una de las plántulas con una balanza analítica AND FX-200 y separar con ayuda de un bisturí la parte aérea de la raíz. Las muestras fueron colocadas en fundas de papel pequeñas rotuladas. Se obtuvo el peso de cada funda, lo que fue considerado como el peso húmedo de la funda. Posteriormente, para obtener el peso seco, el material clasificado en las dos porciones de la planta y

separado por repetición, se colocó en fundas de papel en el horno Cole Parmer 0501560 a 70° C por 24 a 48 horas hasta que alcanzó un peso constante. Finalmente se pesaron todas las muestras en la balanza analítica. Los valores de planta completa se obtuvieron al sumar los valores de peso seco de raíz y de parte aérea.

e) Porcentaje de materia seca

Se midió el porcentaje de materia seca según lo descrito por Azofeifa y Moreira (2005) a través de la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Peso seco}}{\text{Peso humedo}} * 100 = \% \text{ Materia seca}$$

f) Porcentaje de humedad: w

Se midió el contenido hídrico relativo al peso seco de las plantas según lo descrito por Azofeifa y Moreira (2005), a través de la siguiente fórmula:

$$w = \frac{m1 - m2}{m1} * 100$$

Donde:

m1: masa en gramos de la planta o porción de la planta húmeda antes del secado (peso fresco)

m2: masa en gramos de la planta o porción de la planta después del secado (peso seco)

g) Razón en peso seco parte aérea/ peso seco parte radical

Esta relación fue evaluada para comparar los efectos del biofertilizante sobre la parte aérea y radical de las plantas (Azofeifa y Moreira, 2005).

$$v/r = \frac{\text{peso seco vastago}}{\text{peso seco raiz}} = \frac{g}{g}$$

2.6 Análisis del contenido de P soluble en agua en la tierra

Se realizó un análisis preliminar y uno al final de la tierra pura utilizada para conocer si el fósforo soluble se incrementó o disminuyó. Este tipo de análisis constituye una herramienta importante para la agricultura, pues es una guía para conocer sus niveles nutricionales y es un punto de partida para programas de fertilización. Pero lo más importante, constituye una herramienta para monitorear los cambios nutricionales que se dan en el suelo (Fernández et al, 1984).

Partiendo de la premisa que señala que las plantas utilizan el fósforo soluble en H₂O o fósforo disponible para su crecimiento, se realizaron los análisis respectivos del sustrato tierra para conocer la cantidad de fósforo disponible en el suelo para las plantas antes de la germinación y posteriormente se realizaron análisis de las distintas dosis en tierra para conocer si la cantidad de fósforo soluble aumentó o disminuyó atribuyendo ese efecto a la actividad bacteriana.

Este análisis se realizó únicamente en el sustrato tierra debido a que solo en este sustrato se mantuvieron condiciones controladas ya que los otros dos sustratos contenían mayor cantidad de materia orgánica, factor que podía afectar la capacidad solubilizadora de las bacterias.

2.7 Análisis Estadístico de Datos

El análisis estadístico de los datos fue realizado con el programa Excel del paquete Microsoft Office 2007 y el programa XLSTAT versión 2008.6.05. Se calculó el promedio de cada una de las variables por tratamiento del ensayo y se realizó el análisis estadístico para cada una de esas variables, por medio de análisis de varianza. Se aplicó la prueba de significancia de Tukey al 5% para la comparación de los promedios en los tratamientos donde se detectaron diferencias significativas y el análisis de regresión para la curva de calibración del medio de cultivo y para la evaluación de la fase exponencial.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 Elaboración de la curva de calibración para el medio de cultivo comercial PKM

Siguiendo el método establecido por Kirkman (1996) y Gaitán y García (1998), la elaboración de la curva de calibración consistió en graficar el crecimiento bacteriano normal en términos exponenciales, es decir con concentraciones conocidas y en aumento sucesivo, luego se ajustaron dichos datos por mínimos cuadrados a un sistema lineal (Tabla 3.1 y Figura 3.1).

Tabla 3.1 Valores utilizados para la elaboración de la curva de calibración de las bacterias solubilizadoras de fósforo utilizadas en el ensayo. Quito, Pichincha, 2008.

Dilución	Absorbancia	UFC/mL
10^{-10}	0.097	1.8E+11
10^{-9}	0.108	2.5E+11
10^{-8}	0.128	5.0E+11
10^{-7}	0.159	8.6E+11
10^{-6}	0.174	1.1E+12
10^{-5}	0.202	1.3E+12
10^{-4}	0.221	1.5E+12

De acuerdo a esta figura, se puede observar la tendencia de los datos hacia la linealidad, la misma que va en ascenso indicando una proporcionalidad entre ambas variables, señalando que para este grupo de bacterias, su concentración en un medio líquido es directamente proporcional a su absorbancia.

Con esta curva estandarizada a las condiciones de trabajo, se obtuvo una ecuación de ajuste, con la cual se continuaron los procesos de fermentación en el reactor o fermentador (Figura 3.1).

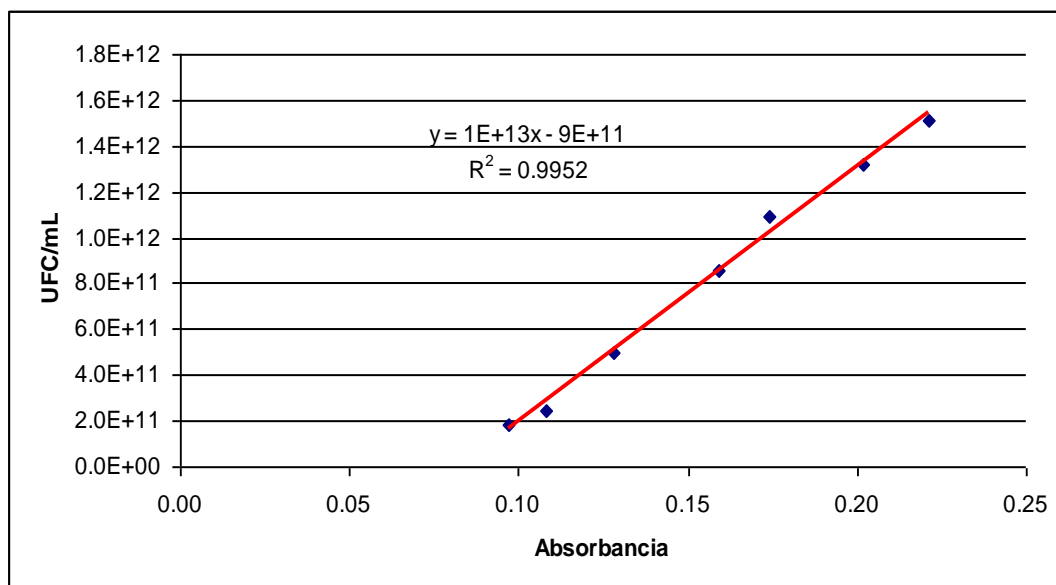


Figura 3.1 Curva de calibración en medio comercial PKM para las bacterias solubilizadoras de fósforo. Quito, Pichincha, 2008.

El coeficiente de determinación R^2 de 0.995, mostró un valor altamente cercano a la unidad, lo cual reflejó una buena correlación lineal entre las variables y una relación directa que es creciente debido a que la pendiente es positiva. De acuerdo a este análisis, el modelo de la curva de calibración del medio PKM, resultó tener un valor altamente significativo y el p-valor presentó un valor menor a alfa, lo que proporciona una mejor predicción del modelo lineal (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 ADEVA para la regresión lineal de la curva de calibración en medio PKM. Quito, Pichincha, 2008.

F. de V	GL	SC	CM	F. cal	p-Valor (*)
Modelo	1	1.63×10^{24}	1.63×10^{24}	1033.48 **	< 0.0001
Error	5	7.89×10^{21}	1.58×10^{21}		
Total corregido	6	1.64×10^{24}			

(*) p-Valor calculado para $\alpha=0,05$.

3.2 Producción de biofertilizante a partir de bacterias solubilizadoras de fósforo a escala de 1 litro utilizando los tres medios de cultivo: PKM, JCP y JCM

3.2.1 Preparación del inóculo

El inóculo consistió en un pool de las bacterias solubilizadoras de fósforo incubado por tres horas a una temperatura de 30 °C, siguiendo lo descrito por Gaitán y García (1998), se obtuvieron inóculos con concentraciones entre 10^4 y 10^6 UFC/mL (Tabla 3.3).

Tabla 3.3 Concentración de los inóculos utilizados para la producción de los biofertilizantes a partir de bacterias solubilizadoras de fósforo. Quito, Pichincha, 2008.

Medio	t (h)	UFC/mL
PKM	3	2.59×10^9
JCP	3	1.01×10^4
JCM	3	1.11×10^4

3.2.2 Crecimiento bacteriano

El conteo de UFC/mL se realizó en placa en dos repeticiones en los medios JCP y JCM y utilizando el espectrofotómetro para, a partir de la absorbancia medida, calcular la concentración bacteriana en UFC/mL en el medio PKM mediante de la ecuación de ajuste obtenida en la curva de calibración.

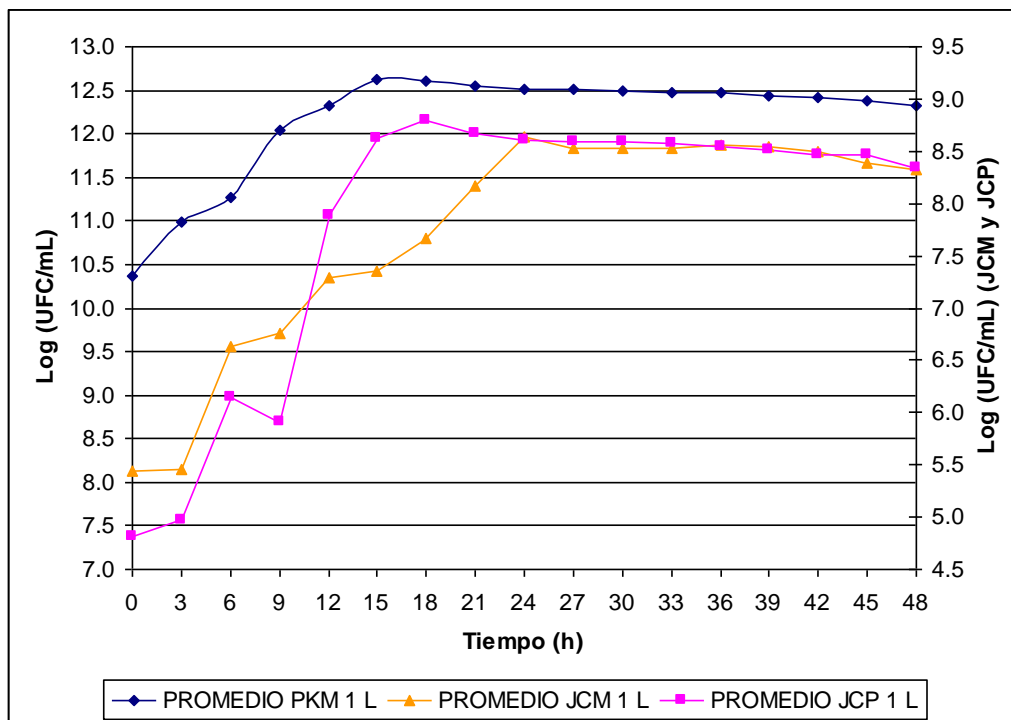


Figura 3.2 Curva de crecimiento de las bacterias solubilizadoras de fósforo (promedio del Log_{10} UFC/mL) en los medios de cultivo PKM, JCP y JCM durante el ensayo a escala 1 L. Quito, Pichincha, 2008.

El grado máximo de desarrollo exponencial en los tres medios de cultivo utilizados fue alcanzado entre las 15 y 24 horas de incubación. La concentración bacteriana fue mayor en el medio PKM, con un promedio de 4.13×10^{12} UFC/mL, seguida de una concentración de 8.01×10^8 UFC/mL encontrada en promedio en el medio JCP (Tabla 3.4).

El medio con menor concentración bacteriana fue el codificado como JCM, en el cual se encontraron en promedio 4.83×10^8 UFC/mL. Estos valores promedio superan mínimo de 10^8 células por mililitro, estimado por bibliografía para a biofertilizantes o inoculantes biológicos (MINIAG, 2000, Anexo N; Gonzáles, 2004).

Tabla 3.4 Crecimiento de las bacterias solubilizadoras de fósforo durante el primer y segundo ensayo en los medios PKM, JCP y JCM expresado en UFC/mL y Log (UFC/mL) en el ensayo a escala 1 L. Quito, Pichincha, 2008.

t (h)	PKM								JCP						JCM										
	Primer Ensayo			Segundo Ensayo			-		Primer Ensayo			Segundo Ensayo			-		Primer Ensayo			Segundo Ensayo			-		
	A (560 nm)	UFC/ mL	Log (UFC/ mL)	A (560 nm)	UFC/ mL	Log (UFC/ mL)	UFC/ mL	Log (UFC/ mL)	UFC/ mL	Log (UFC/ mL)	UFC/ mL	Log (UFC/ mL)	UFC/ mL	Log (UFC/ mL)	UFC/ mL	Log (UFC/ mL)	UFC/ mL	Log (UFC/ mL)	UFC/ mL	Log (UFC/ mL)	UFC/ mL	Log (UFC/ mL)	UFC/ mL	Log (UFC/ mL)	
0	0.11	1.51E+10	10.18	0.12	3.66E+10	10.56	2.59E+10	10.41	1.10E+04	4.04	3.90E+05	5.59	2.01E+05	5.30	2.35E+06	6.37	3.35E+04	4.53	1.19E+06	6.08					
3	0.17	6.91E+10	10.84	0.10	1.42E+11	11.15	1.06E+11	11.02	2.27E+04	4.36	3.98E+05	5.60	2.10E+05	5.32	2.85E+06	6.45	2.85E+04	4.45	1.44E+06	6.16					
6	0.22	1.24E+11	11.09	0.12	2.92E+11	11.47	2.08E+11	11.32	6.60E+04	4.82	2.86E+07	7.46	1.43E+07	7.16	4.90E+06	6.69	3.63E+06	6.56	4.27E+06	6.63					
9	0.44	9.05E+11	11.96	0.22	1.34E+12	12.13	1.12E+12	12.05	1.51E+04	4.18	4.50E+07	7.65	2.25E+07	7.35	5.28E+06	6.72	6.00E+06	6.78	5.64E+06	6.75					
12	0.52	1.86E+12	12.27	0.33	2.38E+12	12.38	2.12E+12	12.33	5.28E+07	7.72	1.11E+08	8.05	8.19E+07	7.91	3.80E+07	7.58	1.02E+07	7.01	2.41E+07	7.38					
15	0.54	4.48E+12	12.65	0.47	3.79E+12	12.58	4.13E+12	12.62	7.79E+08	8.89	2.30E+08	8.36	5.05E+08	8.70	6.00E+07	7.78	8.50E+06	6.93	3.43E+07	7.53					
18	0.50	4.09E+12	12.61	0.49	3.98E+12	12.60	4.04E+12	12.61	1.31E+09	9.12	2.90E+08	8.46	8.01E+08	8.90	1.60E+08	8.20	1.30E+07	7.11	8.65E+07	7.94					
21	0.44	3.54E+12	12.55	0.46	3.66E+12	12.56	3.60E+12	12.56	9.00E+08	8.95	2.50E+08	8.40	5.75E+08	8.76	1.80E+08	8.26	1.20E+08	8.08	1.50E+08	8.18					
24	0.42	3.30E+12	12.52	0.42	3.30E+12	12.52	3.30E+12	12.52	7.00E+08	8.85	2.35E+08	8.37	4.68E+08	8.67	2.65E+08	8.42	7.00E+08	8.85	4.83E+08	8.68					
27	0.41	3.22E+12	12.51	0.40	3.13E+12	12.50	3.18E+12	12.50	6.50E+08	8.81	2.30E+08	8.36	4.40E+08	8.64	2.13E+08	8.33	5.50E+08	8.74	3.82E+08	8.58					
30	0.41	3.20E+12	12.51	0.39	2.97E+12	12.47	3.09E+12	12.49	6.40E+08	8.81	2.35E+08	8.37	4.38E+08	8.64	2.16E+08	8.33	5.10E+08	8.71	3.63E+08	8.56					
33	0.41	3.18E+12	12.50	0.37	2.82E+12	12.45	3.00E+12	12.48	6.20E+08	8.79	2.29E+08	8.36	4.25E+08	8.63	2.14E+08	8.33	5.20E+08	8.72	3.67E+08	8.56					
36	0.41	3.19E+12	12.50	0.36	2.70E+12	12.43	2.94E+12	12.47	6.00E+08	8.78	2.10E+08	8.32	4.05E+08	8.61	2.40E+08	8.38	5.50E+08	8.74	3.95E+08	8.60					
39	0.39	2.95E+12	12.47	0.34	2.47E+12	12.39	2.71E+12	12.43	5.20E+08	8.72	1.98E+08	8.30	3.59E+08	8.56	2.26E+08	8.35	5.30E+08	8.72	3.78E+08	8.58					
42	0.40	3.08E+12	12.49	0.32	2.29E+12	12.36	2.68E+12	12.43	4.80E+08	8.68	1.81E+08	8.26	3.31E+08	8.52	2.08E+08	8.32	4.90E+08	8.69	3.49E+08	8.54					
45	0.36	2.73E+12	12.44	0.29	2.02E+12	12.31	2.37E+12	12.38	4.60E+08	8.66	1.87E+08	8.27	3.24E+08	8.51	1.43E+08	8.16	4.20E+08	8.62	2.82E+08	8.45					
48	0.32	2.29E+12	12.36	0.28	1.94E+12	12.29	2.11E+12	12.33	3.10E+08	8.49	1.54E+08	8.19	2.32E+08	8.37	1.17E+08	8.07	3.90E+08	8.59	2.54E+08	8.40					

En la curva de crecimiento se distinguen las diferentes fases por las que atravesó el cultivo bacteriano discontinuo, lo más notable es la existencia de una fase lag o de retraso mucho más prolongada para los medios JCM y JCP en comparación con el medio PKM.

La fase exponencial en los medios PKM, JCP y JCM, tiene una duración de 15, 18 y 24 horas respectivamente. En el inicio de la fase estacionaria y la de muerte, la concentración bacteriana disminuyó, culminando con un promedio de 2.11×10^{12} , 2.32×10^8 y 2.54×10^8 UFC/ mL para los medios PKM, JCP y JCM respectivamente (Figura 3.2 y Tabla 3.4).

Debido a que los datos se encontraban en una notación exponencial, se realizó una transformación de las UFC/ mL de cada uno de los medios a logaritmos en base 10 (Tabla 3.4). En el análisis de varianza para el crecimiento bacteriano se encontró alta significancia estadística para los tratamientos en ambos ensayos a escala 1 L (Tabla 3.5).

Tabla 3.5 ADEVA para el crecimiento bacteriano expresado en Log_{10} (UFC/mL) durante la fase de laboratorio para la producción de biofertilizantes a escala 1 L. Quito, Pichincha, 2008.

F. de V	GL	Primer Ensayo					Segundo Ensayo				
		SC	CM	F calc.	CV	$\bar{x}_{..}$	SC	CM	F calc.	CV	$\bar{x}_{..}$
Total	50	296.5					273.4				
Trat.	2	219.1	109.6	68.03	**		221.5	110.7	102.4	**	
Error exp.	48	77.3	1.6				51.9	1.1			
					13.8%	9.21				11.3%	9.24

De acuerdo a la prueba de significancia de Tukey se obtuvo que hay diferencias entre el medio comercial y los medios alternativos pero no entre los alternativos entre si, puesto que comparten un rango específico de significancia (Tabla 3.6).

Tabla 3.6 Prueba de Tukey del crecimiento bacteriano expresado en Log₁₀ (UFC/mL) durante el ensayo a escala 1 L para los tres medios de cultivo. Quito, Pichincha, 2008.

Tratamientos	Primer Ensayo (*)	Segundo Ensayo (*)
	Log (UFC/mL)	Log (UFC/mL)
PKM	4.30 a	4.32 a
JCP	2.72 b	2.80 b
JCM	2.77 b	2.70 b

(*) Tratamientos identificados con letras iguales no tuvieron diferencias significativas entre sí, al aplicar la prueba de Tukey considerando $\alpha=0,05$.

Las curvas de crecimiento del cultivo discontinuo representadas en Log₁₀ (UFC/mL) vs. Tiempo en cada uno de los tres medios de cultivo durante el primer y segundo ensayo a escala 1 L se presentan en las Figuras 3.3 y 3.4, de donde gráficamente se observa que la mayor concentración bacteriana fue alcanzada por el biofertilizante producido en el medio PKM.

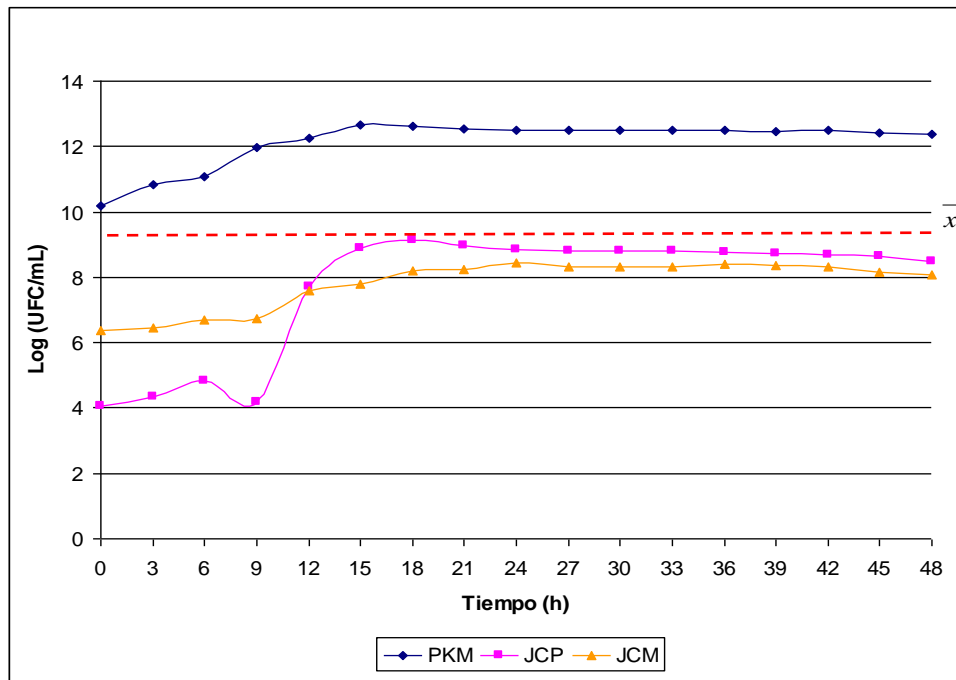


Figura 3.3 Curva de crecimiento de las bacterias solubilizadoras de fósforo en los tres medios de cultivo durante el primer del ensayo a escala 1 L. Quito, Pichincha, 2008.

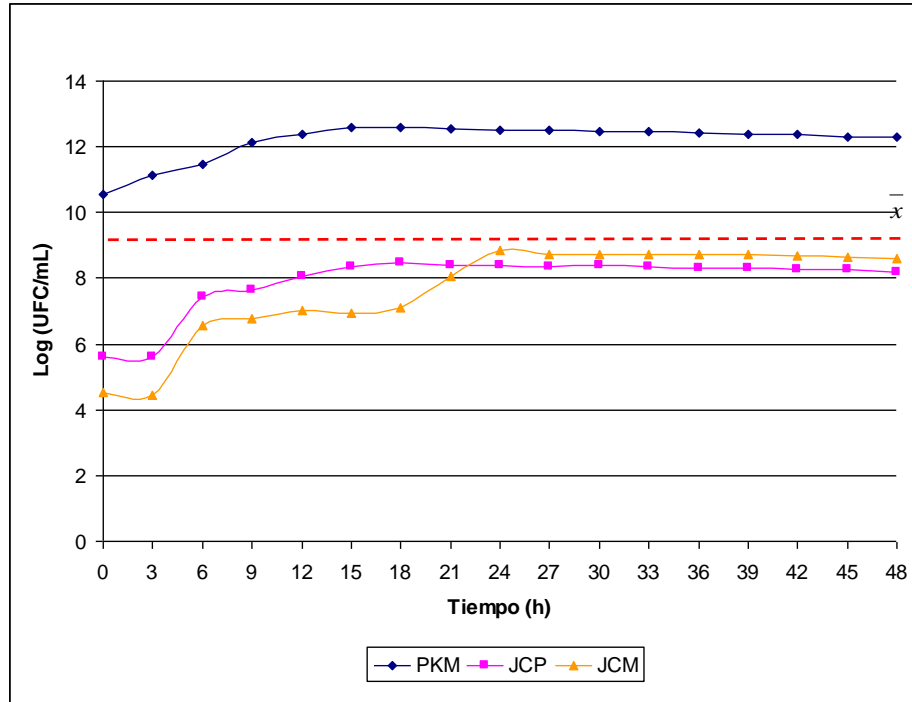


Figura 3.4 Curva de crecimiento de las bacterias solubilizadoras de fósforo en los tres medios de cultivo durante el segundo ensayo a escala 1 L. Quito, Pichincha, 2008.

La concentración bacteriana en los medios JCP y JCM fue más baja que la alcanzada por los microorganismos en el medio PKM, pero se mantuvo dentro del rango de 10^8 UFC/ mL (Figura 3.5).

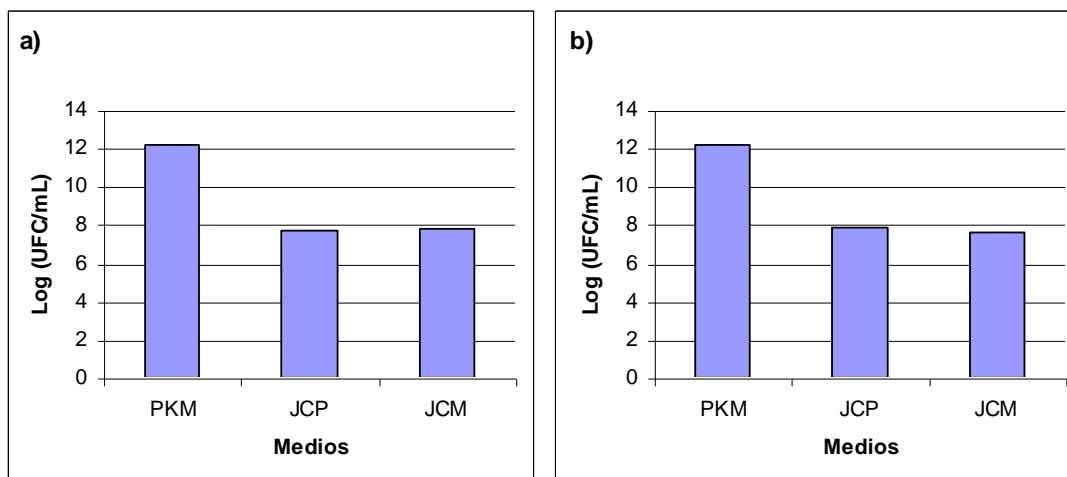


Figura 3.5 Promedio de Log (UFC/mL) encontrados en los tres medios evaluados durante los ensayos: (a) primero y (b) segundo realizados a escala 1 L. Quito, Pichincha, 2008.

3.2.2.1 Cinética de la fase exponencial

En los tres medios de cultivo utilizados (PKM, JCP y JCM), se graficó el segmento que representa la fase exponencial de su curva de crecimiento en términos logarítmicos, donde la pendiente del gráfico corresponde al cociente de la velocidad específica de crecimiento para el logaritmo de la constante matemática e : $\mu/\text{Log}_{10}(e)$, en las condiciones de trabajo (Brock, 2001 y Vargas, 2005). A partir de la velocidad obtenida, se calcularon los parámetros cinéticos: tiempo de generación y el número de veces en las que la concentración bacteriana fue duplicada (número de generaciones).

En el medio PKM, la fase exponencial se ajustó adecuadamente a una recta, encontrándose valores cercanos a la unidad para el coeficiente de determinación R^2 , demostrando una relación directa entre el tiempo y la concentración bacteriana alcanzada (Figura 3.6). En este medio, el pool bacteriano alcanzó un tiempo medio de generación entre 1.81 y 2.52 horas (Tabla 3.8).

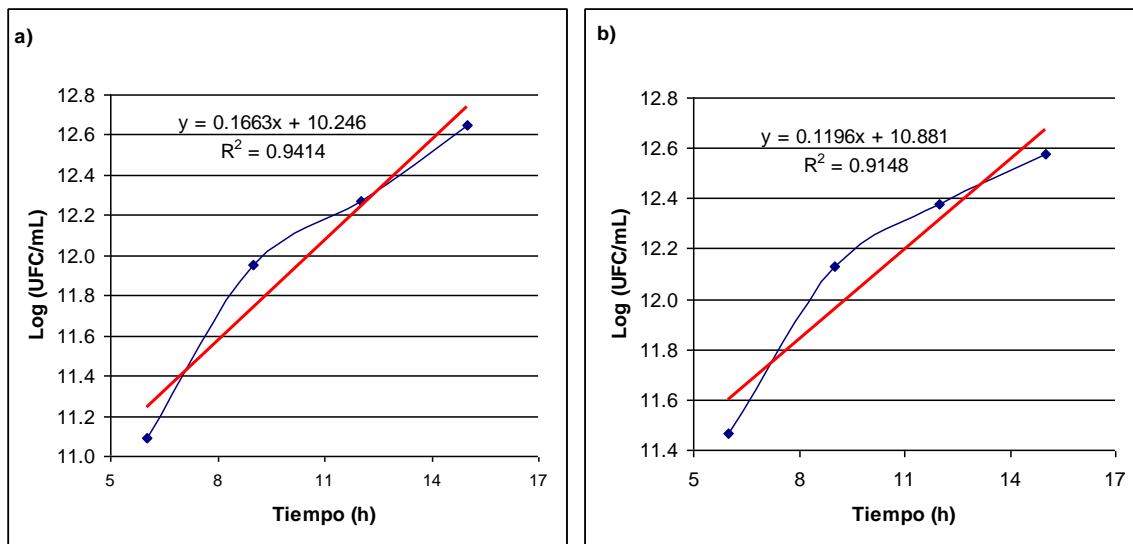


Figura 3.6 Cinética de la fase exponencial del crecimiento de las bacterias solubilizadoras de fósforo durante los ensayos: (a) primero y (b) segundo en medio PKM a escala 1 L. Quito, Pichincha, 2008.

De acuerdo al análisis de varianza, el modelo para la regresión lineal de la fase exponencial en el medio PKM, resultó tener un valor significativo, lo que es corroborado con el p-valor menor a alfa, que proporciona una buena predicción del modelo lineal (Tabla 3.7).

Tabla 3.7 ADEVA para la regresión lineal de la fase exponencial en el primer y segundo ensayo en medio PKM a escala 1 L. Quito, Pichincha, 2008.

F. de V	GL	Primer ensayo				Segundo ensayo					
		SC	CM	F. cal	p-Valor (*)	SC	CM	F. cal	p-Valor (*)		
Modelo	1	1.24	1.24	32.16	**	0.030	0.64	0.64	21.48	**	0.044
Error	2	0.08	0.04				0.06	0.03			
Total corregido	3	1.32					0.70				

(*) p-Valor calculado para $\alpha=0,05$.

Tabla 3.8 Parámetros de la cinética de la fase exponencial del crecimiento de las bacterias solubilizadoras de fósforo en los dos ensayos realizados en medio PKM a escala 1 L. Quito, Pichincha, 2008.

Parámetro	Descripción	Valor		Unidades
		Primer Ensayo	Segundo Ensayo	
μ	Constante de velocidad instantánea	0.38	0.28	UFC/mL*h
t_{gen}	Tiempo medio de generación	1.81	2.52	h/generaciones
t	Tiempo que transcurre mientras se mide el crecimiento	15.00	18.00	h
k	Valor promedio para la población en un periodo finito de tiempo	0.55	0.40	generaciones/h
n	Número de generaciones	8.29	7.15	-

Los valores de los parámetros cinéticos de los dos ensayos muestran una diferencia mínima que es atribuida al tiempo tardado en realizar la siembra en placas para todas las muestras después de la incubación.

En el medio JCP, el coeficiente R^2 reflejó una menor correlación entre las variables tiempo y concentración bacteriana (expresada en Log_{10} UFC/mL) durante el primer ensayo, esto se corrobora con el p-valor calculado que se presenta superior a alfa. Esta correlación aumenta en el segundo ensayo, reflejándose esto en el valor del coeficiente R^2 cercano a la unidad (Figura 3.7).

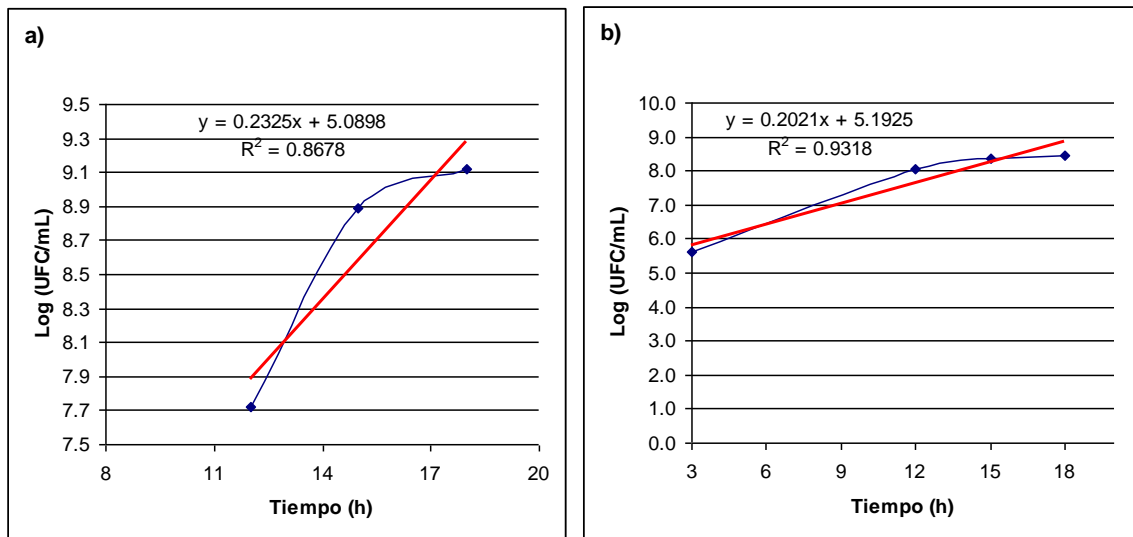


Figura 3.7 Cinética de la fase exponencial del crecimiento de las bacterias solubilizadoras de fósforo durante los dos ensayos: (a) primero y (b) segundo en medio JCP a escala 1 L. Quito, Pichincha, 2008.

De acuerdo al análisis de la varianza del segundo ensayo en el medio JCP, el modelo para la regresión lineal de la fase exponencial resultó tener un valor significativo, y el p-valor fue menor a alfa, lo que proporciona una mejor predicción del modelo lineal que la realizada durante el primer ensayo (Tabla 3.9).

Los parámetros cinéticos calculados para este medio, demuestran una mayor cantidad de generaciones en comparación con el medio PKM, y un tiempo mayor empleado para alcanzar la fase máxima de crecimiento (18 horas) (Tabla 3.10).

Tabla 3.9 ADEVA para la regresión lineal de la fase exponencial en el primer y segundo ensayo en medio JCP a escala 1 L Quito, Pichincha, 2008.

F. de V	Primer ensayo					Segundo ensayo				
	GL	SC	CM	F. cal	p-Valor (*)	GL	SC	CM	F. cal	p-Valor (*)
Modelo	1	0.97	0.97	6.57 *	0.237	1	5.14	5.14	27.31 *	0.035
Error	1	0.15	0.15			2	0.38	0.19		
Total corregido	2	1.12				3	5.52			

(*) p-Valor calculado para $\alpha=0,05$.

Tabla 3.10 Parámetros de la cinética de la fase exponencial del crecimiento de las bacterias solubilizadoras de fósforo en el primer y segundo ensayo en medio JCP. Quito, Pichincha, 2008.

Parámetro	Descripción	Valor		Unidades
		Primer Ensayo	Segundo Ensayo	
μ	Constante de velocidad instantánea	0.54	0.47	UFC/mL*h
t_{gen}	Tiempo medio de generación	1.29	1.49	h/generaciones
t	Tiempo que transcurre mientras se mide el crecimiento	18.00	18.00	h
k	Valor promedio para la población en un periodo finito de tiempo	0.77	0.67	generaciones/h
n	Número de generaciones	13.90	12.09	-

En el medio JCM, el coeficiente R^2 reflejó una mejor correlación entre las variables en comparación con el medio JCP (Figura 3.8).

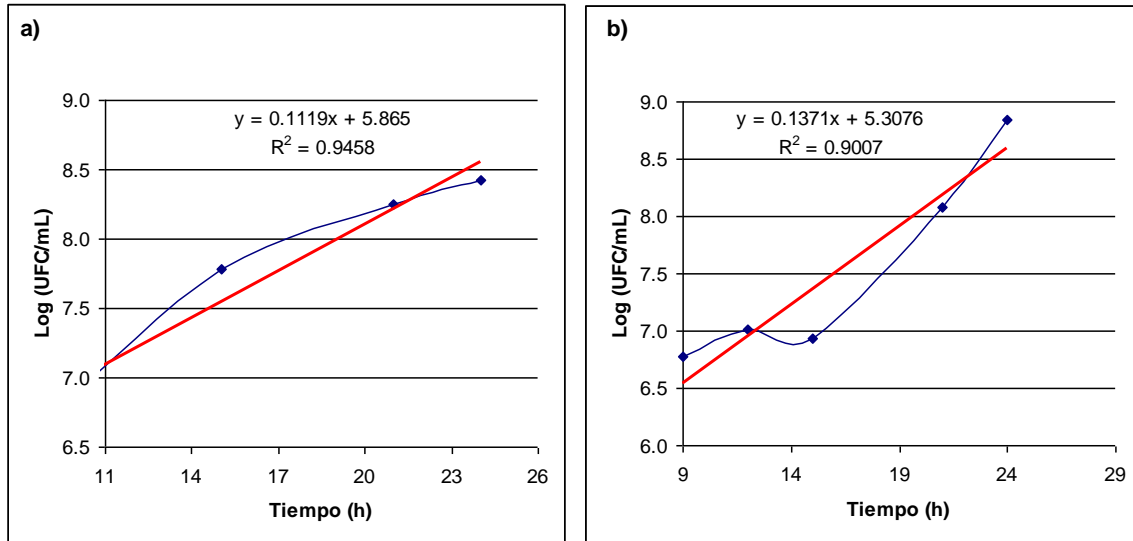


Figura 3.8 Cinética de la fase exponencial del crecimiento de las bacterias solubilizadoras de fósforo durante los ensayos: (a) primero y (b) segundo en medio JCM a escala 1 L. Quito, Pichincha, 2008.

De acuerdo a los resultados del análisis de la varianza, el modelo para la regresión lineal de la fase exponencial para los dos ensayos en el medio JCM resultó tener un valor significativo, además el p-valor presentó valores menores a alfa, lo que proporciona una buena predicción del modelo lineal (Tabla 3.11). En cuanto a los parámetros cinéticos, se observó que el tiempo medio de generación fue mayor en este medio en comparación con los dos anteriores, y el número de generaciones alcanzado fue mayor que el conseguido en el medio PKM (Tabla 3.12).

Tabla 3.11 ADEVA para la regresión lineal de la fase exponencial en el primer y segundo ensayo en medio JCM a escala 1 L. Quito, Pichincha, 2008.

F. de V	Primer ensayo					Segundo ensayo						
	GL	SC	CM	F. cal	p-Valor (*)	GL	SC	CM	F. cal	p-Valor (*)		
Modelo	1	1.66	1.66	34.89	*	0.027	1	2.91	2.91	27.21	*	0.014
Error	2	0.10	0.05				3	0.32	0.11			
Total corregido	3	1.76					4	3.23				

(*) p-Valor calculado para $\alpha=0,05$.

Tabla 3.12 Parámetros de la cinética de la fase exponencial del crecimiento de las bacterias solubilizadoras de fósforo en el primero y segundo ensayos en medio JCM. Quito, Pichincha, 2008.

Parámetro	Descripción	Valor		Unidades
		Primer Ensayo	Segundo Ensayo	
μ	Constante de velocidad instantánea	0.26	0.32	UFC/mL*h
t_{gen}	Tiempo medio de generación	2.69	2.20	h/generaciones
t	Tiempo que transcurre mientras se mide el crecimiento	24.00	24.00	h
k	Valor promedio para la población en un periodo finito de tiempo	0.37	0.46	generaciones/h
n	Número de generaciones	8.92	10.93	-

3.3 Producción de biofertilizante a partir de bacterias solubilizadoras de fósforo a escala de 10 litros utilizando los tres medios de cultivo

3.3.1 Preparación del preinóculo

El preinóculo para esta fase consistió en un pool de las bacterias solubilizadoras de fósforo incubado por tres horas a una temperatura de 30 °C, siguiendo lo descrito por Gaitán y García (1998), obteniéndose concentraciones entre 10^4 y 10^6 UFC/mL (Tabla 3.13).

Tabla 3.13 Concentración de los preinóculos utilizados para la producción de los biofertilizantes a escala 10 L. Quito, Pichincha, 2008.

Medio	t (h)	UFC/mL
PKM	3	1.51×10^{10}
JCP	3	1.10×10^4
JCM	3	2.35×10^6

3.3.2 Preparación del inóculo

El inóculo para esta fase consistió en el pool de las bacterias solubilizadoras de fósforo a escala 1 L incubado a una temperatura de 30 °C, hasta el tiempo en el que se inició la fase exponencial para conseguir la mayor concentración. Se obtuvieron concentraciones entre 10^8 y 10^{12} UFC/mL (Tabla 3.14).

Tabla 3.14 Concentración de los inóculos utilizados para la producción de los biofertilizantes a escala 10 L. Quito, Pichincha, 2008.

Medio	t (h)	UFC/mL
PKM	16.5	2.57×10^{12}
JCP	18	1.00×10^6
JCM	24	1.60×10^6

3.3.3 Crecimiento bacteriano

El grado máximo de desarrollo exponencial durante la fase de escalado para los tres medios fue alcanzado entre las 18 y 21 horas de incubación (Tabla 3.15 y Figura 3.9). Para el medio PKM, la concentración celular obtenida fue de 6.31×10^{12} UFC/mL, para JCP fue de 6.90×10^8 y para JCM fue de 6.76×10^8 , valores que superan el mínimo de 10^8 células por mililitro, estimado por bibliografía asociada a biofertilizantes o inoculantes biológicos (MINIAG, 2000, Anexo N; Gonzáles, 2004) (Tabla 3.15).

Lo más notable en la curva de crecimiento de las bacterias en el medio PKM es la concentración con la que parten los cultivos, que constituye la concentración máxima alcanzada en la fase a escala 1 litro. Se observa que el cultivo bacteriano en el medio PKM inició con la mayor concentración, seguido del realizado en JCM y finalmente se encuentra el cultivo realizado en el medio JCP. No se evidenció la presencia de una fase lag debido a que los inóculos fueron preparados a partir de los mismos medios de cultivo, evitando así la fase de adaptación y continuando con la fase de crecimiento exponencial que duró 18 horas para los medios PKM y JCP y 21 horas para el medio JCM (Figura 3.9).

Tabla 3.15 Crecimiento de las bacterias solubilizadoras de fósforo durante la fase de producción a 10 L, en los medios PKM, JCP y JCM expresado en UFC/mL y transformado a Log₁₀ UFC/mL. Quito, Pichincha, 2008.

Tiempo (h)	PKM			JCP		JCM	
	A (560 nm)	UFC/mL	Log (UFC/mL)	UFC/mL	Log (UFC/mL)	UFC/mL	Log (UFC/mL)
0	0.35	2.57E+12	12.41	1.00E+06	6.00	1.60E+06	6.20
3	0.38	2.87E+12	12.46	5.60E+06	6.75	1.65E+07	7.22
6	0.40	3.08E+12	12.49	7.30E+06	6.86	3.50E+07	7.54
9	0.44	3.54E+12	12.55	8.90E+06	6.95	6.50E+07	7.81
12	0.46	3.66E+12	12.56	2.65E+07	7.42	1.20E+08	8.08
15	0.52	4.33E+12	12.64	1.44E+08	8.16	1.80E+08	8.26
18	0.72	6.31E+12	12.80	6.90E+08	8.84	6.06E+08	8.78
21	0.64	5.48E+12	12.74	5.80E+08	8.76	6.76E+08	8.83
24	0.59	4.95E+12	12.69	4.20E+08	8.62	5.20E+08	8.72
27	0.57	4.79E+12	12.68	3.10E+08	8.49	4.08E+08	8.61
30	0.55	4.63E+12	12.67	2.50E+08	8.40	3.30E+08	8.52
33	0.52	4.33E+12	12.64	2.09E+08	8.32	2.50E+08	8.40
36	0.48	3.91E+12	12.59	2.00E+08	8.30	2.35E+08	8.37
39	0.46	3.66E+12	12.56	1.99E+08	8.30	2.26E+08	8.35
42	0.44	3.54E+12	12.55	1.98E+08	8.30	2.10E+08	8.32
45	0.42	3.30E+12	12.52	1.96E+08	8.29	2.08E+08	8.32
48	0.30	2.11E+12	12.32	1.93E+08	8.29	2.06E+08	8.31

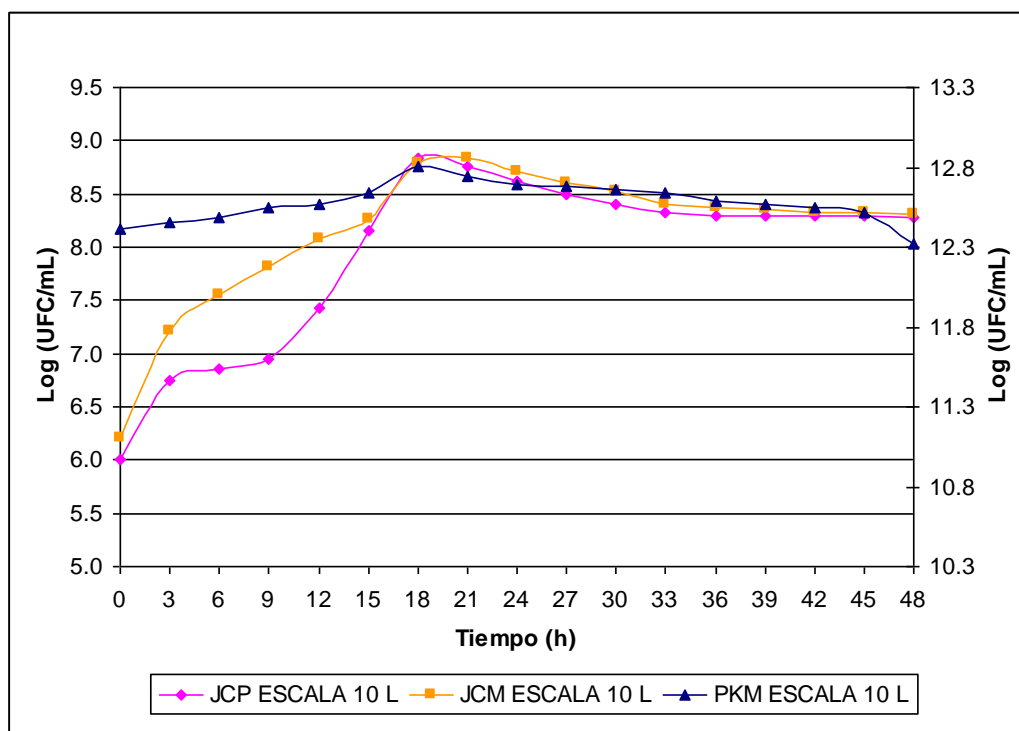


Figura 3.9 Curva de crecimiento de las bacterias solubilizadoras de fósforo en el medio de cultivo PKM durante ensayo a escala 10 L. Quito, Pichincha, 2008.

En el análisis de varianza para el crecimiento bacteriano, se encontró alta significancia estadística para los tratamientos (Tabla 3.16).

Tabla 3.16 ADEVA para el crecimiento bacteriano expresado en Log_{10} (UFC/mL) durante la fase de producción a escala 10 L. Quito, Pichincha, 2008.

F. de V	GL	SC	CM	F calc.	CV	$\bar{x}_{..}$
Total	50	251.0				
Trat	2	233.0	116.5	310.1	**	
Error exp.	48	18.0	0.4			
					2.1%	9.56

La prueba de significancia de Tukey determinó la diferencia entre el medio comercial y los dos alternativos, cuyos resultados entre si, en cuanto a crecimiento bacteriano se refiere, son similares (Tabla 3.17).

Tabla 3.17 Rangos de significancia al 5% para la prueba de Tukey del crecimiento bacteriano expresado en Log_{10} (UFC/mL) en el ensayo a escala 10 L para los tres medios de cultivo. Quito, Pichincha, 2008.

Tratamientos	Log (UFC/mL) (*)
PKM	4.30 a
JCM	2.89 b
JCP	2.81 b

(*) Tratamientos identificados con letras iguales no tuvieron diferencias significativas entre sí, al aplicar la prueba de Tukey considerando $\alpha=0,05$.

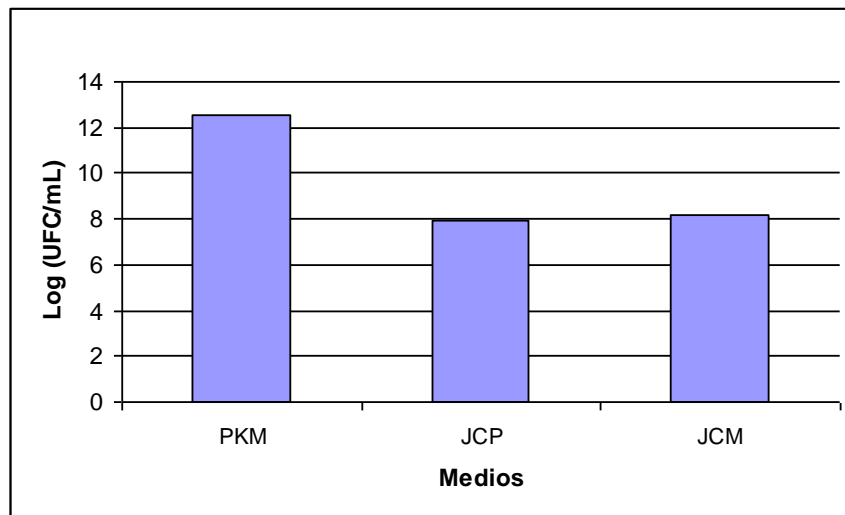


Figura 3.10 Promedio de Log₁₀ (UFC/mL) encontrados en los tres medios evaluados durante el ensayo realizado a escala 10 L. Quito, Pichincha, 2008.

El mejor medio de cultivo para la producción del biofertilizante a escala 10 L, fue el medio PKM, donde se alcanzó la mayor concentración bacteriana de 6.31×10^{12} UFC/mL, superando a los dos medios alternativos (Figuras 3.9 y 3.10).

3.3.3.1 Cinética de la fase exponencial

Se representó la fase exponencial en términos logarítmicos de los medios PKM, JCP y JCM, cuyo comportamiento se ajusta a una línea recta, ratificándolo con los valores de los coeficientes de determinación de cada uno, los mismos que fueron cercanos a la unidad (Figura 3.11).

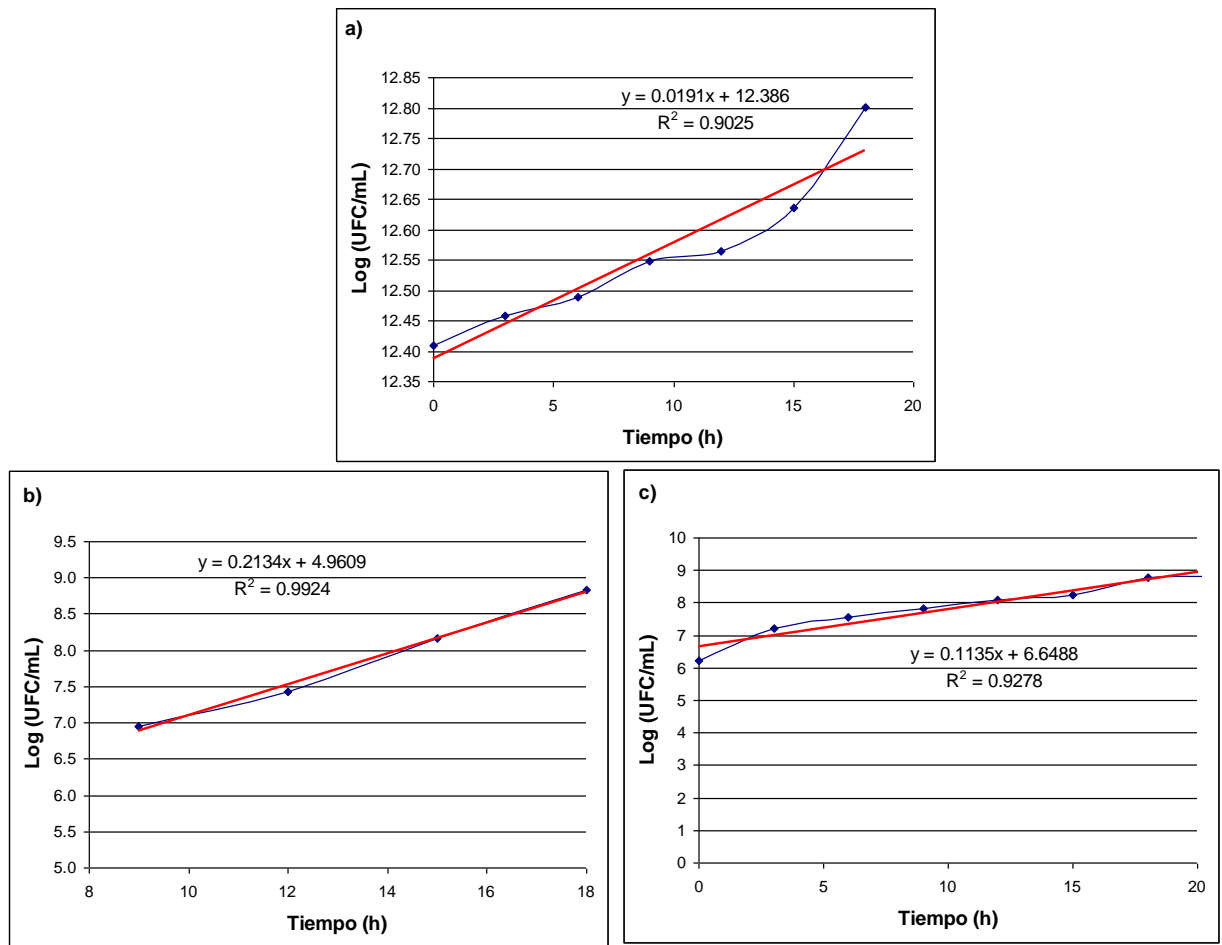


Figura 3.11 Cinética de la fase exponencial del crecimiento de las bacterias solubilizadoras de fósforo durante el ensayo a 10 L en los tres medios: a) PKM, b) JCP y c) JCM. Quito, Pichincha, 2008.

Los resultados del análisis de la varianza se utilizaron para evaluar la significación del modelo. De acuerdo a este análisis, el estadístico F del modelo para la regresión lineal de la fase exponencial en el los tres medios evaluados a escala 10 L, resultó tener un valor altamente significativo, lo que proporciona una excelente predicción del modelo lineal (Tabla 3.18). Los parámetros cinéticos presentados muestran que se alcanzó un número mayor de generaciones en el medio JCP. Además, la constante de velocidad instantánea disminuyó en todos los medios. En el medio PKM, el tiempo medio de generación fue el mayor debido a que la concentración bacteriana del inóculo se mantuvo dentro de los valores obtenidos a escala 1 L (Tabla 3.19).

Tabla 3.18 ADEVA para la regresión lineal de la fase exponencial en el ensayo en los medios PKM, JCP y JCM a escala 10 L. Quito, Pichincha, 2008.

F. de V	PKM				JCP				JCM			
	GL	CM	F. cal	p-Valor (*)	GL	CM	F. cal	p-Valor (*)	GL	CM	F. cal	p-Valor (*)
Modelo	1	0.1	46.3 **	0.001	1	2.1	261.8 **	0.004	1	4.9	77.1 **	0.0001
Error	5	0.002			2	0.008			6	0.1		
Total	6				3				7			

(*) p-Valor calculado para $\alpha=0,05$.

Tabla 3.19 Parámetros de la cinética de la fase exponencial del crecimiento de las bacterias solubilizadoras de fósforo en el ensayo realizado en los tres medios de cultivo a escala 10 L. Quito, Pichincha, 2008.

Parámetro	Descripción	Valor			Unidades
		PKM	JCP	JCM	
μ	Constante de velocidad instantánea	0.04	0.49	0.26	UFC/mL*h
t_{gen}	Tiempo medio de generación	15.76	1.41	2.65	h/generaciones
t	Tiempo que transcurre mientras se mide el crecimiento	18.00	18.00	21.00	h
k	Valor promedio para la población en un periodo finito de tiempo	0.06	0.71	0.38	generaciones/h
n	Número de generaciones	1.14	12.76	7.92	-

3.4 Temperatura

La temperatura en los medios PKM y JCM varió entre el mínimo de 21.7 ± 0.29 °C y el máximo de 22.8 ± 0.29 °C y en el medio JCP entre 21.5 °C y 23 °C (Figura 3.12).

Las bacterias presentaron un alto crecimiento en estas condiciones aún cuando no hubo control externo de temperatura puesto que el ensayo se realizó a temperatura ambiente (Tabla 3.20).

Tabla 3.20 Temperatura registrada en los tres medios utilizados durante todo el ensayo de laboratorio (1 y 10 L). Quito, Pichincha, 2008.

Tiempo (h)	Temperatura (°C)		
	PKM (*)	JCP (*)	JCM (*)
0	22.3 ± 0.58	21.8 ± 0.29	22.2 ± 0.29
3	22.5 ± 0.00	21.5 ± 0.00	21.8 ± 0.58
6	22.1 ± 0.06	22.3 ± 0.29	21.8 ± 0.29
9	22.5 ± 0.00	22.2 ± 0.29	22.2 ± 0.58
12	22.7 ± 0.29	22.0 ± 0.87	21.7 ± 0.29
15	22.8 ± 0.29	21.7 ± 0.29	21.7 ± 0.29
18	22.7 ± 0.29	22.0 ± 0.50	21.7 ± 0.58
21	22.7 ± 0.76	22.2 ± 0.29	22.3 ± 0.29
24	22.8 ± 0.29	22.3 ± 0.29	22.8 ± 0.29
27	22.7 ± 0.29	23.0 ± 0.00	22.7 ± 0.29
30	21.7 ± 0.29	22.5 ± 0.00	22.2 ± 0.29
33	22.0 ± 0.50	22.2 ± 0.29	22.2 ± 0.29
36	22.0 ± 0.50	21.7 ± 0.29	22.5 ± 0.00
39	22.2 ± 0.58	21.7 ± 0.29	22.2 ± 0.29
42	22.5 ± 0.40	22.2 ± 0.58	22.5 ± 0.00
45	22.3 ± 0.29	22.5 ± 0.00	22.0 ± 0.00
48	22.7 ± 0.58	22.5 ± 0.00	22.2 ± 0.29

* Promedio de los ensayos realizados en cada uno de los medios a escala 1 L 10 L \pm desviación estándar

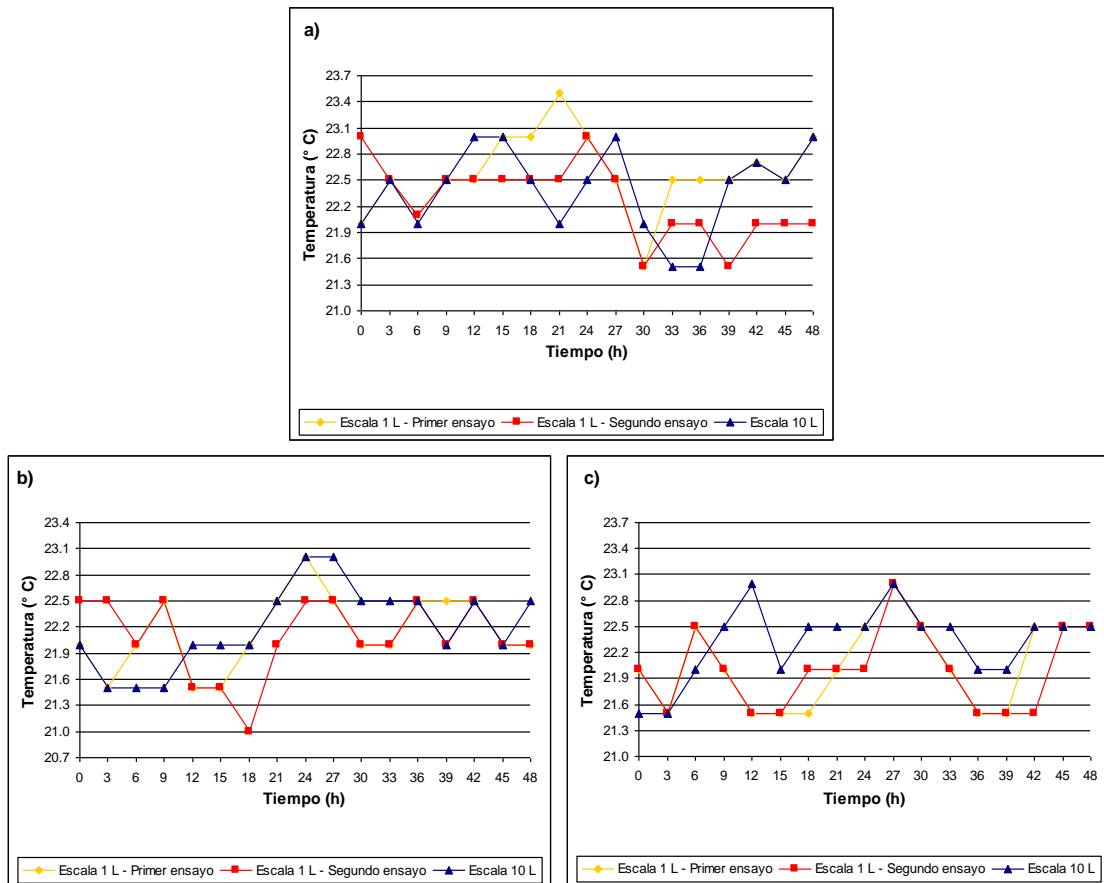


Figura 3.12 Variación de la temperatura durante las 48 horas de monitoreo en los ensayos a 1 L y 10 L en los tres medios de cultivo: a) PKM, b) JCP y c) JCM. Quito, Pichincha, 2008.

3.5 pH

El pH en el medio PKM varió entre el mínimo de 6.0 y el máximo de 7.7 ± 0.58 ; en el medio JCP la variación fue de 6.00 a 7.00 y en el medio JCM de 5.00 a 7.00 (Tabla 3.21 y Figura 3.13).

El crecimiento de las bacterias alcanzó altas concentraciones y sobrepasó el rango estimado para inoculantes biológicos aún cuando el pH presentó variación (Anexo N).

Tabla 3.21 pH registrado en los tres medios utilizados durante todo ensayo de laboratorio (escalas 1 y 10 L). Quito, Pichincha, 2008.

Tiempo (h)	pH		
	PKM (*)	JCP (*)	JCM (*)
0	7.0 ± 0.00	7.0 ± 0.00	7.0 ± 0.00
3	7.0 ± 0.00	6.7 ± 0.58	7.0 ± 0.00
6	7.0 ± 0.00	7.0 ± 0.00	6.3 ± 0.58
9	6.7 ± 0.58	6.7 ± 0.58	6.3 ± 0.58
12	6.3 ± 0.58	6.0 ± 0.00	6.0 ± 0.00
15	6.3 ± 0.58	6.0 ± 0.00	6.0 ± 0.00
18	6.3 ± 0.58	6.0 ± 0.00	5.3 ± 0.58
21	6.0 ± 0.00	6.0 ± 0.00	5.0 ± 0.00
24	6.0 ± 0.00	6.0 ± 0.00	6.0 ± 0.00
27	6.7 ± 0.58	6.0 ± 0.00	5.0 ± 0.00
30	6.7 ± 0.58	6.0 ± 0.00	5.3 ± 0.58
33	7.0 ± 0.00	6.0 ± 0.00	5.3 ± 0.58
36	7.3 ± 0.58	6.0 ± 0.00	5.7 ± 0.58
39	7.3 ± 0.58	6.0 ± 1.00	5.0 ± 0.00
42	7.3 ± 0.58	6.0 ± 1.00	6.0 ± 0.00
45	7.7 ± 0.58	6.3 ± 0.58	6.3 ± 0.58
48	7.7 ± 0.58	6.0 ± 0.00	6.3 ± 0.58

* Promedio de los ensayos realizados en cada uno de los medios a escala 1 L 10 L ± desviación estándar

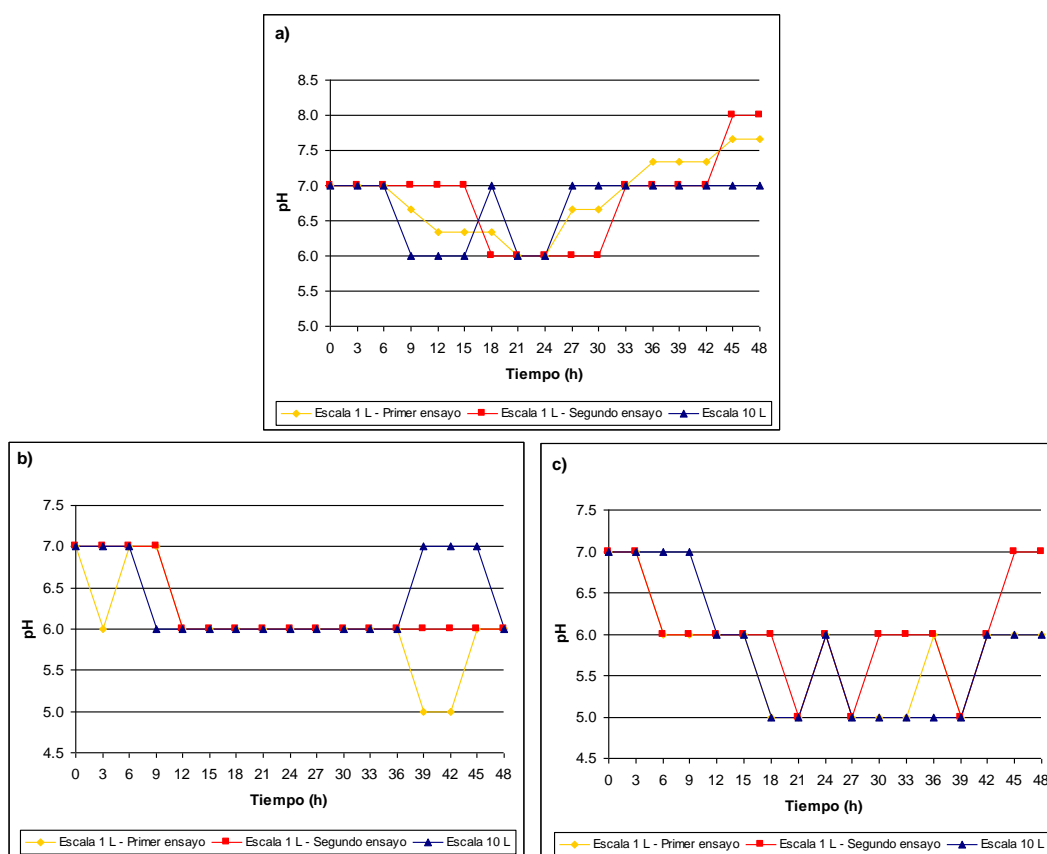


Figura 3.13 Variación del pH durante las 48 horas de monitoreo en los ensayos a 1 L y 10 L en los tres medios: a) PKM, b) JCP y c) JCM. Quito, Pichincha, 2008.

3.6 Establecimiento del caldo de cultivo adecuado y costos de producción de los biofertilizantes

Este análisis fue realizado con base en el tiempo en el que los microorganismos incubados alcanzaron su fase exponencial en cada medio y la concentración bacteriana final, el costo de la producción de cada biofertilizante, y la sobrevivencia de cada uno después de tres meses de envasados.

Con respecto al tiempo tardado en alcanzar su fase exponencial, los mejores biofertilizantes de los tres fueron los desarrollados en el medio PKM y en el medio JCP. El medio de cultivo comercial alcanzó una mayor concentración bacteriana que se mantuvo estable durante los períodos de evaluación de su sobrevivencia, mientras que JCP presentó una concentración bacteriana menor, este medio fue el menos estable en cuanto a concentración bacteriana a través del tiempo, esto se puede observar en la Figura 3.38b donde se graficó el promedio de UFC/mL alcanzado por cada uno de los biofertilizantes durante los tres períodos de evaluación.

Desde el punto de vista del costo de producción, el mejor biofertilizante fue el realizado en el medio JCP, con un costo estimado de producción de: \$ 861.33 por cada 100 L, le siguió el biofertilizante realizado en el medio JCM con un costo de \$ 991.41 por cada 100 L y finalmente el realizado en el medio PKM con un costo de \$ 1493.55 por 100 L, casi el doble del costo de producción en el medio JCP (Anexo G).

Cada uno de los biofertilizantes cumplió con la concentración mínima de un inoculante biológico (Anexo N), pero para poder reconocer su verdadera acción, debe observarse también el comportamiento en el ensayo de invernadero.

3.7 Prueba de Invernadero

Los análisis realizados a los tres sustratos utilizados están detallados en el Anexo C. La esterilización de cada uno de los sustratos, dio como resultado la eliminación de cualquier microorganismo propio del suelo que podía interactuar con las bacterias que componían los tres biofertilizantes. Debido a naturaleza franco arcillosa del suelo utilizado y su capacidad de compactación, se lo tuvo que dejar secar por un tiempo prolongado, una vez seco, se procedió a descompactarlo para continuar con la siembra. Las semillas germinaron después de 3 días de ser sembradas

en todos los sustratos. El riego fue realizado cada dos días, teniendo en cuenta el alto requerimiento de agua de las plantas en el invernadero.

3.7.1 Medición de los parámetros a evaluar en los tres sustratos utilizados en la prueba de invernadero

La evaluación de todas las variables descritas a continuación fue realizada tanto en sustrato Tierra como en sustrato Tierra + Sustrato: las variables: altura de la planta, diámetro del tallo, longitud de la raíz, peso seco de la planta, relación peso seco parte aérea/raíz, porcentaje de humedad de la planta completa y porcentaje de materia seca de la planta completa, fue realizada al finalizar la fase de invernadero al cabo de dos meses de sembradas las semillas de maíz de la variedad INIAP 122. En el Sustrato CIP, se evaluaron las dos primeras variables debido al gran volumen que alcanzaron, además, se optó por no sacrificar las plantas para la evaluación de las demás variables, puesto que ya se contaba con un segundo sustrato para establecer las comparaciones necesarias. Los valores de estas variables correspondientes a cada repetición por tratamiento en los sustratos: Tierra, Tierra + Sustrato CIP y Sustrato CIP se presentan en el Anexo L.

a) Altura de las plantas

El mejor sustrato al evaluar esta variable fue el sustrato elaborado por el CIP, presentando plantas con un promedio de altura de 65.3 cm; por otra parte, el sustrato denominado Tierra + Sustrato CIP presentó plantas con una altura promedio de 53.6 cm, el sustrato que presentó las plantas con menor altura fue el denominado Tierra alcanzando un promedio de 27.8 cm (Tabla 3.22).

Tabla 3.22 ADEVA para la altura de las plantas de maíz en una prueba de invernadero al evaluar 3 biofertilizantes en 3 dosis diferentes y un tratamiento químico frente a un testigo utilizando tres sustratos diferentes. Quito, Pichincha, 2008

F. de V	GL	Tierra		Tierra + Sustrato CIP		Sustrato CIP	
		CM	F. cal	CM	F. cal	CM	F. cal

Total	32									
Tratamientos	10	16.0	11.6	**	25.4	5.0	**	307.7	16.2	**
Dosis	2	2.1	1.5	ns	16.7	3.3	ns	154.9	8.2	*
Biofertilizantes	2	1.9	1.3	ns	20.0	3.9	*	13.9	0.7	ns
BD	4	10.2	7.4	**	5.8	1.1	ns	178.7	9.4	**
Factorial vs adicional	1	47.3	34.3	**	135.5	26.5	**	1874.4	98.7	**
Blanco vs Químico	1	64.2	46.5	**	21.7	4.2	ns	150.0	7.9	*
Bloques	2	4.2	3.0	ns	9.2	1.8	ns	47.4	2.5	ns
Error Experimental	20	1.4			5.1			19.0		
		CV (%) = 4.2			CV (%) = 4.2			CV (%) = 6.7		
		\bar{x} (cm) = 27.8			\bar{x} (cm) = 53.6			\bar{x} (cm) = 65.3		

El mejor tratamiento al evaluar esta variable en el sustrato Tierra fue b0d1, correspondiente al biofertilizante elaborado en el medio PKM en una dosis de 1.5 mL/L, cuyas plantas alcanzaron un promedio de 30.21 cm. Por otra parte, el tratamiento denominado b1d1 fue menos favorable presentando plantas con una promedio de 26.14 cm; el testigo presentó una altura de 22.02 cm, constituyendo la menor en comparación con los demás tratamientos (Figura 3.14 y Tabla 3.23). De acuerdo al índice de efectividad de la inoculación (IEI) calculado y mostrado en el Anexo L, se encontró un rango de incremento en la altura de 0.1 % a 0.44 % con respecto al testigo en los tres bloques. El mejor biofertilizante fue el realizado en el medio PKM, las dosis más efectivas fueron 1.5 mL/L para PKM y 0.5 mL/L para JCP y JCM (Figura 3.15 y).

De acuerdo al ADEVA se encontró un coeficiente de variación adecuado y significancia estadística en los tratamientos y la interacción Blanco o testigo vs químico (Tabla 3.22). La prueba de Tukey para tratamientos afirma que no existieron diferencias en la aplicación de los tratamiento b0d1 y b1d0, además de que la aplicación de estos y el testigo es diferente a la aplicación del resto de tratamientos (Tabla 3.23). Al comparar los tratamientos testigo y químico, la prueba de Tukey encontró que no hubo diferencia en la aplicación de estos dos tratamientos, pese a que el promedio de este último superó al testigo (Figura 3.16 y Tabla 3.24).

Tabla 3.23 Prueba de Tukey para los tratamientos utilizados para evaluar la altura de las plantas de maíz en una prueba de invernadero como respuesta a la aplicación de 3 biofertilizantes en 3 dosis diferentes y un tratamiento químico frente a un testigo (b) utilizando tres sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

Tratamientos	Descripción	\bar{x} Altura (cm)			
		Tierra	Tierra + Sustrato CIP	Sustrato CIP	
b0d1	Medio PKM en una dosis de 1.5 mL/L	30.21 a	55.08 a	63.92 a	
b1d0	Medio JCP en una dosis de 0.5 mL/L	29.95 a	54.83 ab	64.33 ab	
b2d0	Medio JCM en una dosis de 0.5 mL/L	29.46 ab	53.00 ab	62.50 abc	
b0d2	Medio PKM en una dosis de 2.5 mL/L	29.37 ab	56.00 ab	79.75 abcd	
tq	Tratamiento Químico	28.56 ab	51.22 ab	44.33 bcd	
b2d2	Medio JCM en una dosis de 2.5 mL/L	28.25 ab	54.17 ab	74.92 cd	
b1d2	Medio JCP en una dosis de 2.5 mL/L	27.85 ab	56.00 abc	64.03 cd	
b2d1	Medio JCM en una dosis de 1.5 mL/L	27.27 ab	53.00 abc	65.92 cd	
b0d0	Medio PKM en una dosis de 0.5 mL/L	27.06 ab	51.17 bc	67.00 cd	
b1d1	Medio JCP en una dosis de 1.5 mL/L	26.14 b	57.92 bc	77.50 de	
b	Testigo	22.02 c	47.42 c	54.33 e	

(*) Tratamientos identificados con letras iguales no tuvieron diferencias significativas entre sí, al aplicar la prueba de Tukey considerando $\alpha=0,05$. Comparar lo q estaba en tierra esta en cuarto en sustrato, etc)

Tabla 3.24 Prueba de Tukey de la altura de las plantas de maíz en una prueba de invernadero al evaluar 3 biofertilizantes en 3 dosis diferentes y un tratamiento químico frente a un testigo (b) utilizando como sustrato tierra normal y sustrato CIP para los tratamientos Testigo (b) y Químico (tq). Quito, Pichincha, 2008.

Tratamiento	\bar{x} Altura (cm) (*)	
	Tierra	Sustrato CIP
b	22.02 a	54.33 a
tq	28.56 a	44.33 b

(*) Tratamientos identificados con letras iguales no tuvieron diferencias significativas entre sí, al aplicar la prueba de Tukey considerando $\alpha=0,05$.

Por otra parte, el mejor tratamiento al evaluar esta variable en el sustrato Tierra + Sustrato CIP fue el denominado b1d1 correspondiente al biofertilizante elaborado en el medio JCP en una dosis de 1.5 mL/L, cuyas plantas alcanzaron una altura promedio de 26.14 cm. El tratamiento que menos estimuló el incremento en la altura de las plantas fue el b0d0 correspondiente al biofertilizante elaborado en el medio PKM con una dosis de 0.5 mL/L, las plantas correspondientes al testigo o blanco fueron las que menor altura presentaron (Figura 3.14 y Tabla 3.23). De acuerdo al índice de efectividad de la inoculación (IEI) calculado y presentado en el Anexo L, se encontró un rango de incremento de esta variable que varió de 0.05 % a 0.25 %. El mejor biofertilizante fue el denominado JCP, las dosis más efectivas fueron 2.5 mL/L para PKM y JCM, y 1.5 mL/L para JCP (Figura 3.15 a y b).

En el ADEVA se encontró un coeficiente de variación adecuado y significancia para los tratamientos y biofertilizantes entre si (Tabla 3.22). De acuerdo a la prueba de significancia de Tukey, existió una diferencia en la aplicación del tratamiento denominado b0d1 (correspondiente al biofertilizante en medio PKM en una dosis de 1.5 mL/L), el resto de tratamientos y el testigo (Tabla 3.23). Al comparar los biofertilizantes, se encontró que existieron diferencias en la aplicación de los biofertilizante PKM y JCM, mientras que no hubo diferencia en la aplicación de los Biofertilizantes PKM y JCP, y JCP y JCM (Tabla 3.25). El promedio de las plantas donde se inoculó el tratamiento químico superó al de las plantas testigo (Figura 3.16).

Tabla 3.25 Prueba de Tukey de la altura de las plantas de maíz en la prueba de invernadero al evaluar 3 biofertilizantes en 3 dosis diferentes y un tratamiento químico frente a un testigo (b) utilizando como sustrato tierra simple con sustrato CIP para los tres biofertilizantes donde: b0: PKM, b1: JCP y b2: JCM. Quito, Pichincha, 2008.

Tratamiento	\bar{x} Altura (cm) (*)
b1	56.25 a
b0	54.08 ab
b2	53.39 b

(*) Tratamientos identificados con letras iguales no tuvieron diferencias significativas entre sí, al aplicar la prueba de Tukey considerando $\alpha=0,05$.

El mejor tratamiento al evaluar esta variable en el sustrato elaborado por el CIP, fue el denominado b0d2 correspondiente al biofertilizante elaborado en el medio PKM en una dosis de 2.5 mL/L, cuyas plantas alcanzaron una altura promedio de 79.75 cm. Por otra parte, el tratamientos que menos influyó en el desempeño de esta variable fue el tratamiento b2d0 correspondiente al biofertilizante en el medio JCM en una dosis de 0.5 mL/L, cuyas plantas alcanzaron una altura promedio de 62.5 cm. Las plantas correspondientes al tratamiento químico presentaron la menor altura de todo el ensayo, alcanzando un promedio de 44.33 cm (Figura 3.14 y Tabla 3.23). De acuerdo al índice de efectividad de la inoculación (IEI) calculado y mostrado en el Anexo L, se encontró un rango de incremento de esta variable de 0.02 % a 0.80 %. El mejor biofertilizante fue el denominado PKM y las dosis más efectivas fueron: 2.5 mL/L para PKM y JCM, y 1.5 mL/L para JCP (Figura 3.15). De acuerdo al análisis de varianza, se encontró un CV adecuado y hubo significancia estadística al comparar los

tratamientos testigo y químico (Tabla 3.22). La prueba de Tukey encontró diferencia entre el testigo y el tratamiento químico superando el primero al químico (Figura 3.16 y Tabla 3.24).

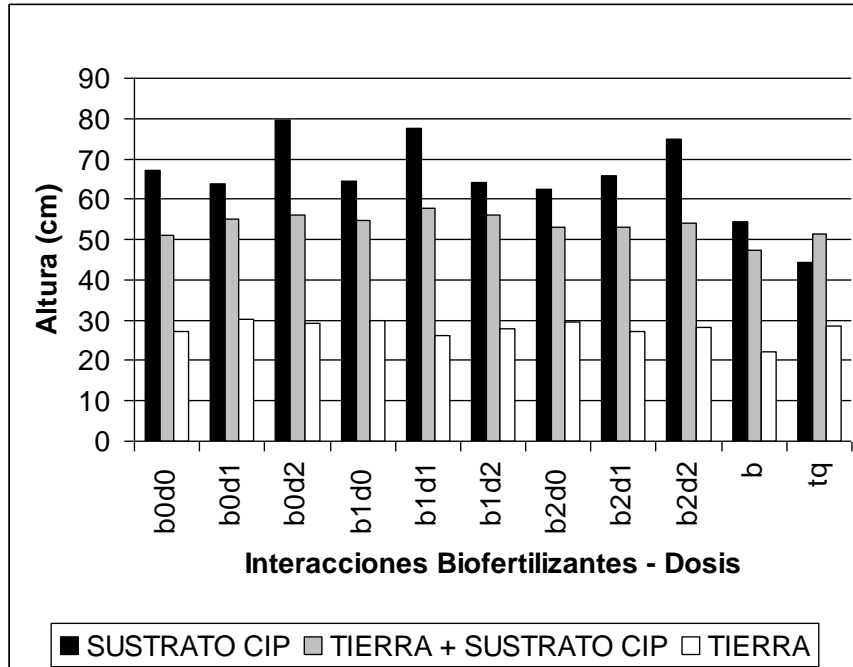


Figura 3.14 Promedio de la altura de plantas de maíz, al evaluar 3 biofertilizantes en 3 dosis diferentes y un tratamiento químico frente a un testigo (b) en invernadero utilizando tres sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

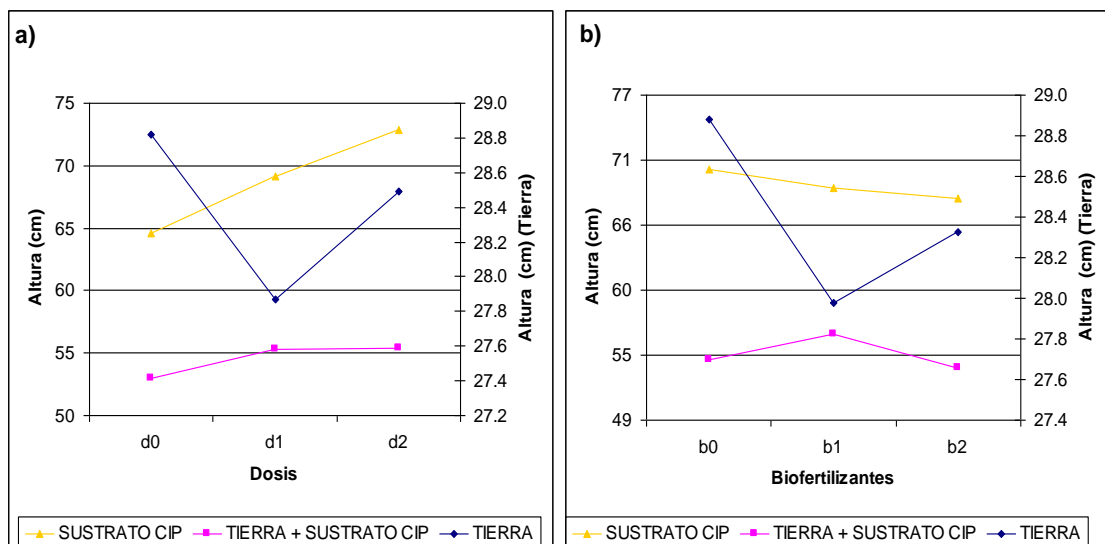


Figura 3.15 Promedio de la altura de plantas de maíz, al evaluar: (a) 3 biofertilizantes y (b) 3 dosis en tres sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

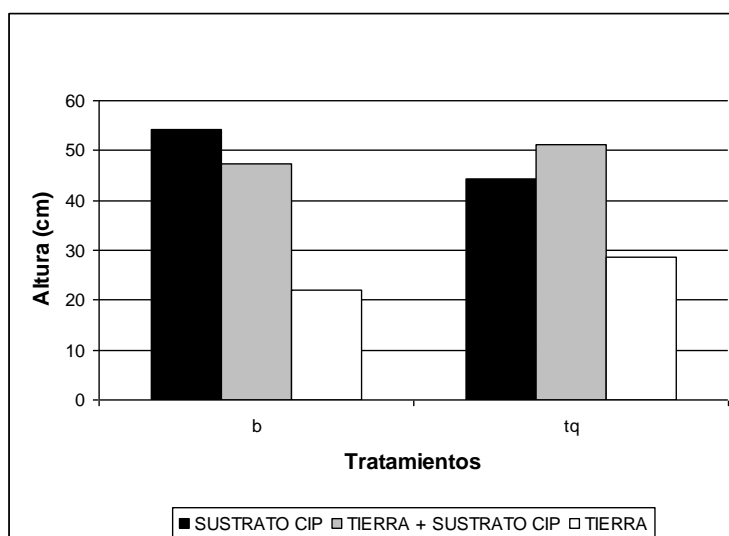


Figura 3.16 Promedio de la altura de plantas de maíz, al evaluar el tratamiento químico (tq) y el testigo (b) en tres sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

b) Longitud de las raíces

El mejor sustrato al evaluar esta variable fue el denominado Tierra, cuyas plantas alcanzaron una longitud promedio de 35.2 cm en sus raíces, por su parte las plantas correspondientes al sustrato Tierra + CIP alcanzaron un promedio de 28 cm (Tabla 3.26).

Tabla 3.26 ADEVA para la longitud de las raíces de las plantas de maíz en la prueba de invernadero al evaluar 3 biofertilizantes en 3 dosis diferentes y un tratamiento químico frente a un testigo (b) utilizando dos sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

F. de V	GL	Tierra			Tierra + Sustrato CIP					
		CM	F. cal	CV	$\bar{x}_{..}$ cm	CM	F. cal	CV	$\bar{x}_{..}$ cm	
Total	32									
Tratamientos	10	154.9	7.6	**		7.8	1.5	ns		
Dosis	2	20.8	1.0	ns		9.6	1.9	ns		
Biofertilizantes	2	57.1	2.8	ns		0.2	0.0	ns		
BD	4	11.5	0.6	ns		13.8	2.7	ns		
Factorial vs adicional	1	588.1	29.0	**		0.5	0.1	ns		
Blanco vs Químico	1	759.2	37.4	**		3.1	0.6	ns		
Bloques	2	17.3	0.9	ns		49.3	2.4	ns		
E. Experimental	20	20.3				20.4				
					12.8%	35.2			16.1%	28.0

El mejor tratamiento al evaluar esta variable en el sustrato Tierra fue b1d1 correspondiente al biofertilizante elaborado en el medio JCP con una dosis de 1.5

mL/L, cuyas plantas presentaron una longitud promedio de sus raíces de 43 cm. El tratamiento b0d2 correspondiente al biofertilizante desarrollado en el medio PKM en una dosis de 2.5 mL/L presentó el menor promedio de raíz en sus plantas, alcanzando un valor de 32.31 cm. Las plantas correspondientes al tratamiento químico presentaron la menor longitud de raíz de todo el ensayo (Figura 3.17 y Tabla 3.27). De acuerdo al índice de efectividad de la inoculación (IEI) mostrado en el Anexo L, se encontró un rango de incremento de esta variable de 0.01 % a 0.36 % con respecto al testigo. El mejor biofertilizante fue el denominado JCP y las dosis más efectivas fueron 1.5 mL/L para PKM y JCP, y 0.5 mL/L para JCM (Figura 3.18 a y b). En el análisis de varianza se encontró un coeficiente de variación adecuado, y significancia estadística para los tratamientos y la interacción Blanco vs. Químico. La prueba de Tukey determinó que no existieron diferencias en la aplicación de los 9 tratamientos entre si, pero en la aplicación de todos frente al tratamiento químico (Tablas 3.26 y 3.27). Se encontró diferencia en la aplicación del tratamiento químico frente al testigo, superando el promedio de la longitud radical del testigo a las correspondientes al tratamiento químico (Figura 3.19 y Tabla 3.28).

Tabla 3.27 Prueba de Tukey para los tratamientos y promedios por tratamiento de la longitud de las raíces de las plantas de maíz en la prueba de invernadero al evaluar 3 biofertilizantes en 3 dosis y un tratamiento químico frente a un testigo (b), utilizando dos sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

Tratamientos	Descripción	\bar{x} Longitud (cm)	
		Tierra (*)	Tierra + Sustrato CIP
b1d1	Medio JCP en una dosis de 1.5 mL/L	43.00 a	27.88
b1d2	Medio JCP en una dosis de 2.5 mL/L	39.36 a	31.58
b2d0	Medio JCM en una dosis de 0.5 mL/L	37.75 a	28.25
b	Testigo	37.50 a	28.50
b2d1	Medio JCM en una dosis de 1.5 mL/L	37.42 a	27.82
b1d0	Medio JCP en una dosis de 0.5 mL/L	36.87 a	24.98
b0d1	Medio PKM en una dosis de 1.5 mL/L	36.28 a	26.93
b2d2	Medio JCM en una dosis de 2.5 mL/L	36.25 a	27.75
b0d0	Medio PKM en una dosis de 0.5 mL/L	35.54 a	29.18
b0d2	Medio PKM en una dosis de 2.5 mL/L	32.31 a	28.54
tq	Tratamiento Químico	15.00 b	27.06

(*) Tratamientos identificados con letras iguales no tuvieron diferencias significativas entre sí, al aplicar la prueba de Tukey considerando $\alpha=0,05$.

Tabla 3.28 Prueba de Tukey para la longitud de las raíces de las plantas de maíz en el ensayo de invernadero utilizando como sustrato tierra normal para los tratamientos Testigo (b) y Químico (tq). Quito, Pichincha, 2008.

Tratamiento	\bar{x} Longitud (cm) (*)
b	37.50 a
tq	15.00 b

(*) Tratamientos identificados con letras iguales no tuvieron diferencias significativas entre sí, al aplicar la prueba de Tukey considerando $\alpha=0,05$.

Por otra parte, el mejor tratamiento al evaluar esta variable en el sustrato Tierra + Sustrato CIP, fue el denominado b1d2, correspondiente al medio JCP en una dosis de 2.5 mL/L, con un promedio en la longitud de la raíz de sus plantas de 31.58 cm. El tratamiento cuyas plantas presentaron el menor promedio fue el denominado b1d0, correspondiente al medio JCP en una dosis de 0.5 mL/L con un valor de 24.98 cm (Figura 3.17 y Tabla 3.27). De acuerdo al índice de efectividad de la inoculación (IEI) calculado y mostrado en el Anexo L, se encontró un rango de incremento de esta variable de 0.02 % a 0.35 % con respecto al testigo.

El biofertilizante que mayor efecto causó fue el realizado en el medio de cultivo JCP y las dosis más efectivas fueron 0.5 mL/L para PKM y JCM y 2.5 mL/L para JCP (Figura 3.18 a y b).

En el análisis de varianza se encontró un coeficiente de variación aceptable, y ninguna significancia estadística en las fuentes de variación evaluadas (Tabla 3.26). Al comparar el tratamiento químico con el testigo, las plantas correspondientes al testigo superaron en promedio a las correspondientes al tratamiento químico (Figura 3.19).

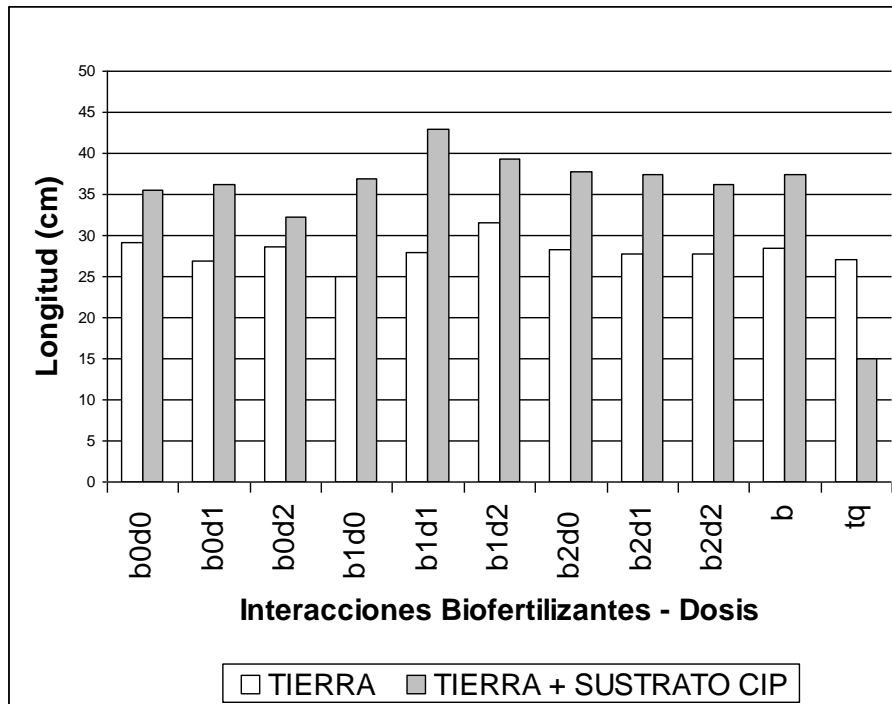


Figura 3.17 Promedio de la longitud de la raíz de plantas de maíz, al evaluar 3 biofertilizantes en 3 dosis diferentes y un tratamiento químico frente a un testigo (b) en invernadero utilizando dos sustratos diferentes. Quito, Pichincha, 2008.

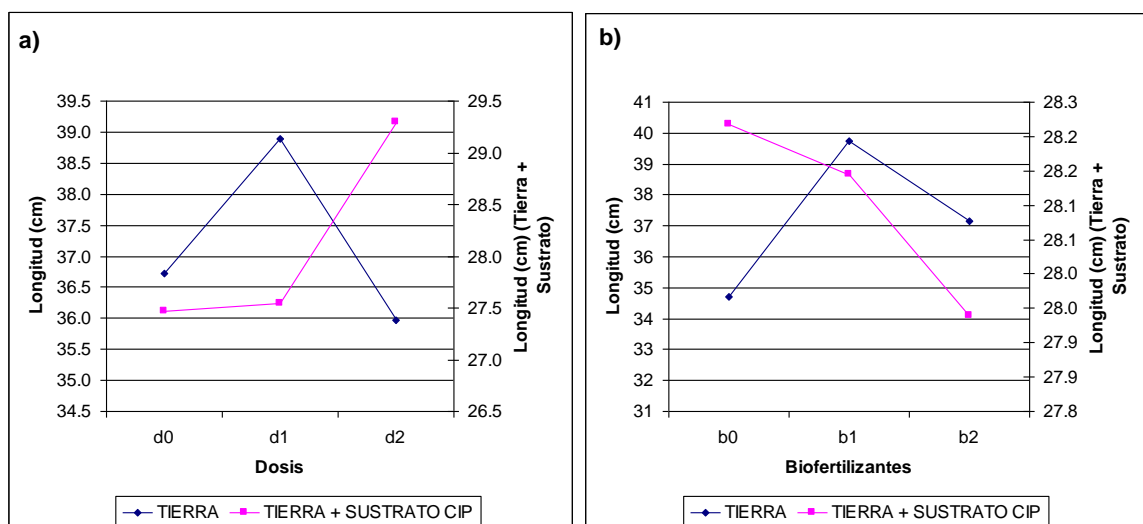


Figura 3.18 Promedio de la longitud de la raíz de las plantas de maíz, al evaluar: (a) 3 dosis diferentes y (b) tres biofertilizantes en dos sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

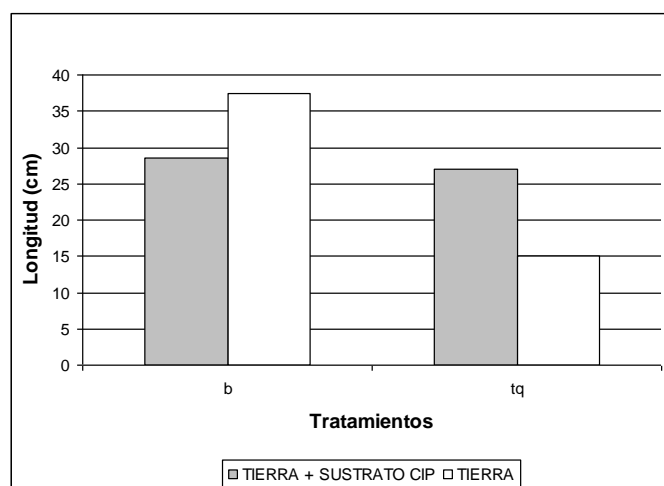


Figura 3.19 Promedio de la longitud de la raíz de las plantas de maíz, al evaluar el tratamiento químico (tq) y el testigo (b) en dos sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

c) Diámetro del tallo

El mejor sustrato al evaluar esta variable fue el denominado Sustrato CIP, observándose plantas con el mayor de diámetro del tallo y un promedio de 11.8 mm, a continuación se encontró el sustrato denominado Tierra + Sustrato CIP con un valor medio de 9.5 mm. El sustrato donde se encontraron plantas con el menor diámetro del tallo fue el denominado Tierra, con un valor promedio de: 5.1mm (Figura 3.20 y Tabla 3.30).

Tabla 3.29 ADEVA para el diámetro del tallo de las plantas de maíz en la prueba de invernadero al evaluar 3 biofertilizantes en 3 dosis y un tratamiento químico frente a un testigo en tres sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

F. de V	GL	Tierra		Tierra + Sustrato CIP			Sustrato CIP			
		CM	F. cal	CM	F. cal	CM	F. cal			
Total	32									
Tratamientos	10	0.3	0.4	ns	1.3	0.3	ns	3.1	0.2	ns
Dosis	2	0.0	0.1	ns	1.2	0.2	ns	1.4	0.1	ns
Biofertilizantes	2	0.1	0.2	ns	3.1	0.6	ns	3.3	0.2	ns
BD	4	0.4	0.5	ns	0.4	0.1	ns	2.6	0.1	ns
Factorial vs adicional	1	0.9	1.3	ns	1.1	0.2	ns	11.1	0.6	ns
Blanco vs Químico	1	0.2	0.2	ns	1.8	0.4	ns	0.4	0.0	ns
Bloques	2	0.4	0.5	ns	0.1	0.9	ns	1.6	0.8	ns
Error Experimental	20	0.8			0.1			2.1		

CV (%) = 17.4

CV (%) = 4.0

CV (%) = 12.3

$$\bar{x} \text{ (mm)} = 5.1$$

$$\bar{x} \text{ (mm)} = 9.5$$

$$\bar{x} \text{ (mm)} = 11.8$$

El mejor tratamiento al evaluar esta variable en el sustrato Tierra fue b1d1, correspondiente al biofertilizante elaborado en el medio JCP en una dosis de 1.5 mL/L, con un promedio del diámetro del tallo de 5.42 mm en sus plantas. El tratamiento cuyas plantas presentaron el menor valor para esta variable fue b0d0 correspondiente al medio PKM en una dosis de 0.5 mL/L, el testigo presentó el menor diámetro de todo el ensayo (Figura 3.20 y Tabla 3.30). De acuerdo al índice de efectividad de la inoculación (IEI) calculado y mostrado en el Anexo L, se encontró un rango de incremento de esta variable de 0.03 % a 0.83 % con respecto al testigo. El biofertilizante que mayor efecto causó fue el realizado en el medio JCP y las dosis más efectivas fueron: 2.5 mL/L para PKM, 1.5 mL/L para JCP y 0.5 mL/L para JCM (Figura 3.21).

En el análisis de varianza se encontró un coeficiente de variación aceptable y ninguna diferencia significativa entre las fuentes de variación (Tabla 3.29). Se encontró que las plantas en las que se aplicó el tratamiento químico superaron ligeramente a las correspondientes al testigo (Figura 3.22).

Tabla 3.30 Promedios del diámetro del tallo de las plantas de maíz en la prueba de invernadero al evaluar 3 biofertilizantes en 3 dosis diferentes y un tratamiento químico frente a un testigo (b) utilizando tres sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

Tratamientos	Descripción	\bar{x} Diámetro (mm)		
		Tierra	Tierra + Sustrato CIP	Sustrato CIP
b1d1	Medio JCP en una dosis de 1.5 mL/L	5.42	9.71	11.13
b1d0	Medio JCP en una dosis de 0.5 mL/L	5.29	9.90	11.50
b0d2	Medio PKM en una dosis de 2.5 mL/L	5.29	9.92	14.21
b0d1	Medio PKM en una dosis de 1.5 mL/L	5.26	9.74	11.75
b2d0	Medio JCM en una dosis de 0.5 mL/L	5.17	9.50	11.79
b2d2	Medio JCM en una dosis de 2.5 mL/L	4.88	9.10	11.50
b1d2	Medio JCP en una dosis de 2.5 mL/L	4.82	9.87	11.75
tq	Tratamiento Químico	4.79	8.53	10.25
b2d1	Medio JCM en una dosis de 1.5 mL/L	4.75	8.01	12.58
b0d0	Medio PKM en una dosis de 0.5 mL/L	4.71	10.20	12.01
b	Testigo	4.46	9.63	10.79

Por otra parte, El mejor tratamiento al evaluar esta variable en el sustrato Tierra + Sustrato CIP, fue b0d0, correspondiente al medio PKM en una dosis de 0.5 mL/L y un valor promedio de 10.30 mm de diámetro del tallo. El tratamiento donde se presentaron los valores menores para esta variable fue el denominado b2d1 correspondiente a JCM en una dosis de 1.5 mL/L, con un promedio de 8.01 mm (Figura 3.22 y Tabla 3.30).

De acuerdo al índice de efectividad de la inoculación (IEI) calculado y mostrado en el Anexo L, se encontró un rango de incremento de esta variable que va de 0.01 % a 0.13 %. El biofertilizante que mayor efecto causó fue el realizado en el medio de cultivo PKM, la dosis más efectiva fue la de 0.5 mL/L para PKM, JCP y JCM (Figura 3.21 y Tabla 3.30).

En el análisis de varianza se encontró un coeficiente de variación aceptable, no hubo significancia estadística para ninguna de las fuentes de variación (Tabla 3.29). Se encontró que el testigo o blanco superó al tratamiento químico en este ensayo (Figura 3.22).

Finalmente, el mejor tratamiento al evaluar esta variable en el sustrato elaborado por el CIP, fue el denominado b0d2 correspondiente al medio PKM y la dosis 2.5 mL/L. El tratamiento que menos influyó fue b1d1 y las plantas correspondientes al tratamiento químico presentaron el menor diámetro en sus tallos (Figura 3.20 y Tabla 3.25). De acuerdo al índice de efectividad de la inoculación (IEI) calculado y mostrado en el Anexo L, se encontró un rango de incremento de esta variable de 0.01 % a 0.52 %.

En el ADEVA se encontró un coeficiente de variación aceptable y ninguna significancia estadística para las fuentes de variación (Tabla 3.24). Se encontró que el testigo superó al tratamiento químico en este ensayo (Figura 3.22).

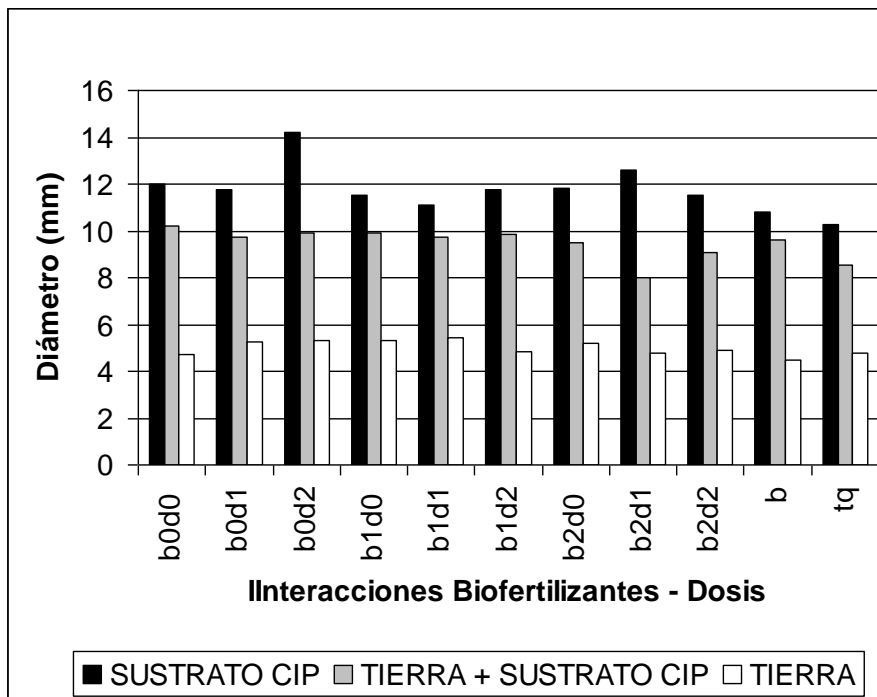


Figura 3.20 Promedio del diámetro del tallo de plantas de maíz, al evaluar 3 biofertilizantes en 3 dosis diferentes y un tratamiento químico frente a un testigo (b) en invernadero utilizando 3 sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

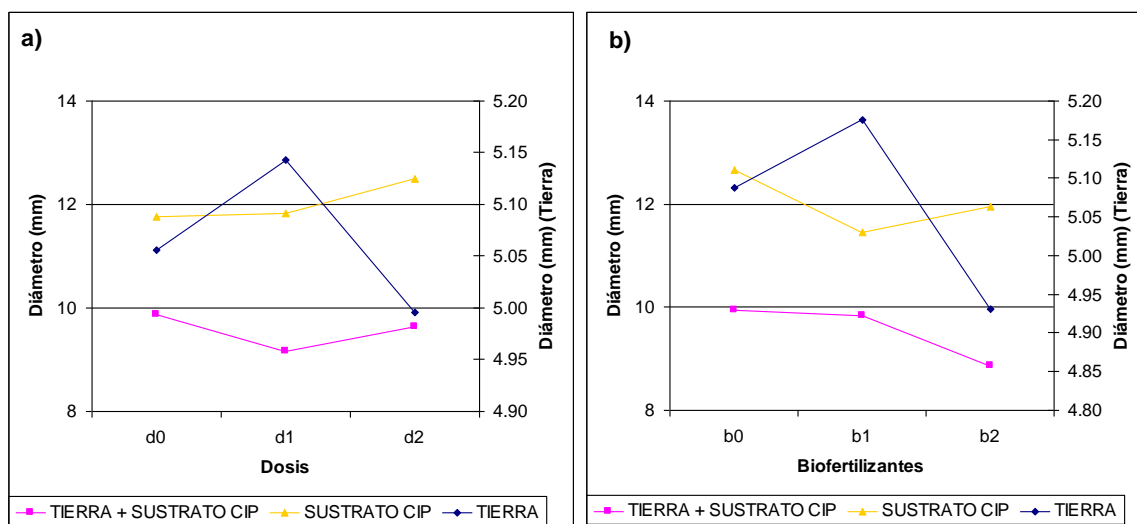


Figura 3.21 Promedio del diámetro del tallo de plantas de maíz, al evaluar: (a) 3 dosis y (b) tres biofertilizantes en tres sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

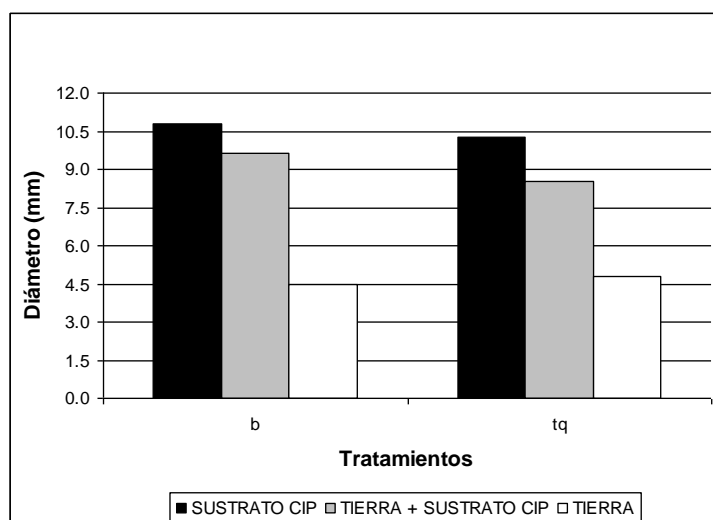


Figura 3.22 Promedio del diámetro del tallo de plantas de maíz, al el tratamiento químico frente al testigo (b) en tres sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

d) Peso seco

El mejor sustrato al evaluar esta variable fue el denominado Tierra + Sustrato CIP, con un valor promedio de peso seco en sus plantas de 3.0 g; por su parte, las plantas correspondientes al sustrato Tierra presentaron un menor peso seco, con un valor de 1.8 g (Figura 3.23 y Tabla 3.31).

Tabla 3.31 ADEVA para el peso seco de las plantas de maíz en la prueba de invernadero al evaluar 3 biofertilizantes en 3 dosis diferentes y un tratamiento químico frente a un testigo (b) utilizando dos sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

F. de V	GL	Tierra				Tierra + Sustrato CIP			
		CM	F. cal	CV	$\bar{x} \dots$ (g)	CM	F. cal	CV	$\bar{x} \dots$ (g)
Total	32								
Tratamientos	10	0.2	28.4	**		1.3	0.3	ns	
Dosis	2	0.01	1.1	ns		0.3	0.1	ns	
Biofertilizantes	2	0.08	9.7	**		1.7	0.3	ns	
BD	4	0.4	47.5	**		0.8	0.2	ns	
Factorial vs adicional	1	0.5	69.2	**		0.6	0.1	ns	
Blanco vs Químico	1	0.02	3.0	ns		4.9	0.9	ns	
Bloques	2	0.01	1.9	ns		0.5	0.4	ns	
E. Experimental	20	0.01				1.1			
				5%	1.8			36%	3.0

El mejor tratamiento al evaluar esta variable en el sustrato Tierra fue b2d2, correspondiente al biofertilizante elaborado en el medio JCM en una dosis de 2.5 mL/L con un promedio de peso seco de 2.22 g. Los tratamientos donde el valor de esta variable fue el menor fueron los denominados b0d2 y b2d1, correspondientes al medio PKM en una dosis de 2.5 mL/L y el medio JCM en una dosis de 1.5 mL/L respectivamente. El peso seco de las plantas correspondientes al tratamiento químico fue el menor de todos los tratamientos con un promedio de 1.43 g (Figura 3.23 y Tabla 3.32). De acuerdo al índice de efectividad de la inoculación (IEI) calculado, se encontró un rango de incremento de esta variable entre 0.01 % a 0.51 % (Anexo L). El biofertilizante que mayor efecto causó fue el realizado en el medio de cultivo JCM y las dosis más efectivas fueron: 0.5 mL/L para PKM, 1.5 mL/L para JCP y 2.5 mL/L para JCM (Tabla 3.32 y Figura 3.24).

De acuerdo al análisis de varianza se encontró un coeficiente de variación aceptable y alta significancia estadística para los tratamientos y biofertilizantes (Tabla 3.31). Según la prueba de Tukey, hubo diferencia en la aplicación de los tratamientos b0d0, b1d1, b2d0 y b2d2 con relación al resto de tratamientos, se encontró además que no hay diferencia entre la aplicación de estos tres primeros entre si (Tabla 3.32 y 3.33). Se observó que el testigo superó al tratamiento químico, encontrándose un promedio del peso seco de 1.55 g y 1.43 g respectivamente (Figura 3.25).

Tabla 3.32 Prueba de Tukey para la interacción Biofertilizantes - Dosis, del peso seco de las plantas completas de maíz en la prueba de invernadero al evaluar 3 biofertilizantes en 3 dosis y un tratamiento químico frente a un testigo (b), utilizando dos sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

Tratamientos	Descripción	Peso seco (g)	
		Tierra	Tierra + Sustrato CIP
b2d2	Medio JCM en una dosis de 2.5 mL/L	2.22 a	2.80
b1d1	Medio JCP en una dosis de 1.5 mL/L	2.17 a	3.95
b0d0	Medio PKM en una dosis de 0.5 mL/L	1.97 ab	2.95
b2d0	Medio JCM en una dosis de 0.5 mL/L	1.96 b	3.29
b0d1	Medio PKM en una dosis de 1.5 mL/L	1.67 c	2.38
b1d0	Medio JCP en una dosis de 0.5 mL/L	1.64 c	3.19
b1d2	Medio JCP en una dosis de 2.5 mL/L	1.61 c	3.44
b2d1	Medio JCM en una dosis de 1.5 mL/L	1.57 c	2.10
b0d2	Medio PKM en una dosis de 2.5 mL/L	1.57 c	3.14
b	Testigo	1.55 c	3.58
tq	Tratamiento Químico	1.43 c	1.78

(*) Tratamientos identificados con letras iguales no tuvieron diferencias significativas entre sí, al aplicar la prueba de Tukey considerando $\alpha=0,05$.

Tabla 3.33 Prueba de Tukey para los tres biofertilizantes (b0: PKM, b1: JCP y b2: JCM) del peso seco de las plantas completas de maíz en la prueba de invernadero, al evaluar 3 biofertilizantes en 3 dosis y un tratamiento químico frente a un testigo (b) utilizando como sustrato tierra simple. Quito, Pichincha, 2008.

Tratamiento	\bar{x} Peso Seco (g)
b2	1.92 a
b1	1.81 b
b0	1.74 c

(*) Tratamientos identificados con letras iguales no tuvieron diferencias significativas entre sí, al aplicar la prueba de Tukey considerando $\alpha=0,05$.

El mejor tratamiento al evaluar esta variable en el sustrato Tierra + Sustrato CIP, fue b1d1 correspondiente al medio JCP en una dosis de 1.5 mL/L, en este caso, el testigo fue el tratamiento que se encuentra más cercano a este valor. El tratamiento que menos influyó en el desempeño de la variable evaluada independientemente del testigo y el químico fue el denominado b2d1 correspondiente a JCM en una dosis de 1.5 mL/L, pero el tratamiento químico fue el que menos influyó en todo el ensayo realizado en este sustrato (Figura 3.23 y Tabla 3.32). De acuerdo al índice de efectividad de la inoculación (IEI) calculado para esta variable, se encontró un rango de incremento de 0.15 % a 1.24 % con respecto al testigo (Anexo L). El biofertilizante que mayor efecto causó fue el realizado en el medio de cultivo alternativo modificado y de entre las dosis aplicadas, las más efectivas fueron 2.5 mL/L para PKM y JCM, 1.5 mL/L para JCP (Tabla 3.32 y Figura 3.24 a y b).

Del ADEVA se encontró un coeficiente de variación dentro del rango aceptado para este tipo de experimento y un promedio general superior al encontrado en el otro sustrato (Tabla 3.31). Se observa que no hubo significancia estadística en ninguna de las fuentes de variación evaluadas, al comparar el testigo con el tratamiento químico se observó que el testigo superó al tratamiento químico en el ensayo realizado en este sustrato (Figura 3.25).

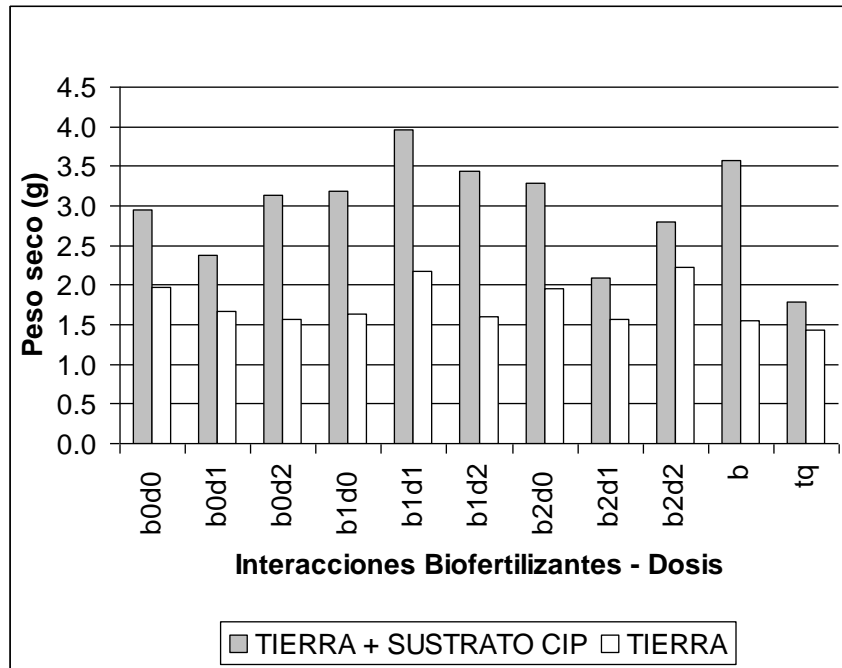


Figura 3.23 Promedio del peso seco de las plantas completas de maíz, al evaluar 3 biofertilizantes en 3 dosis y un tratamiento químico frente a un testigo (b) en invernadero utilizando tres sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

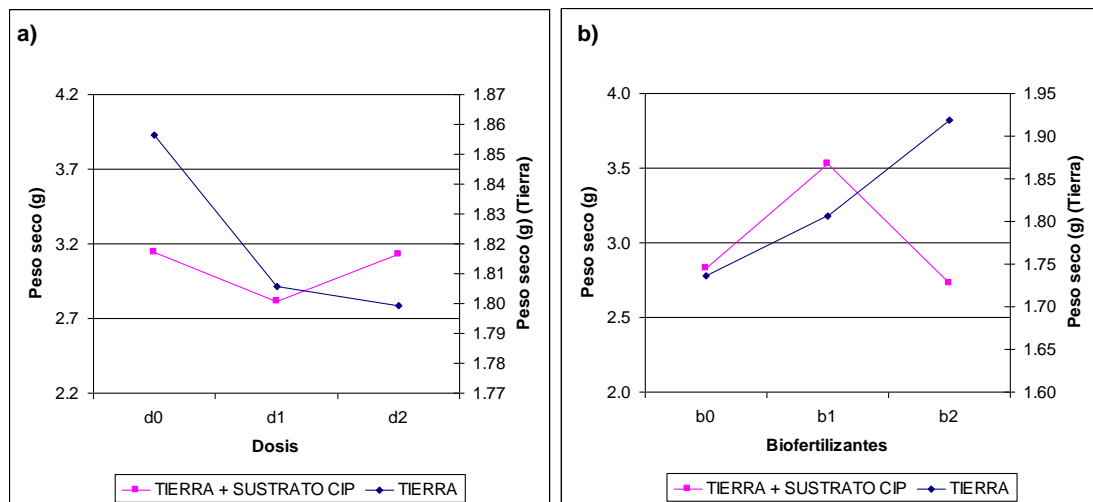


Figura 3.24 Promedio del peso seco de las plantas completas de maíz, al evaluar: (a) 3 dosis y (b) tres biofertilizantes en dos sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

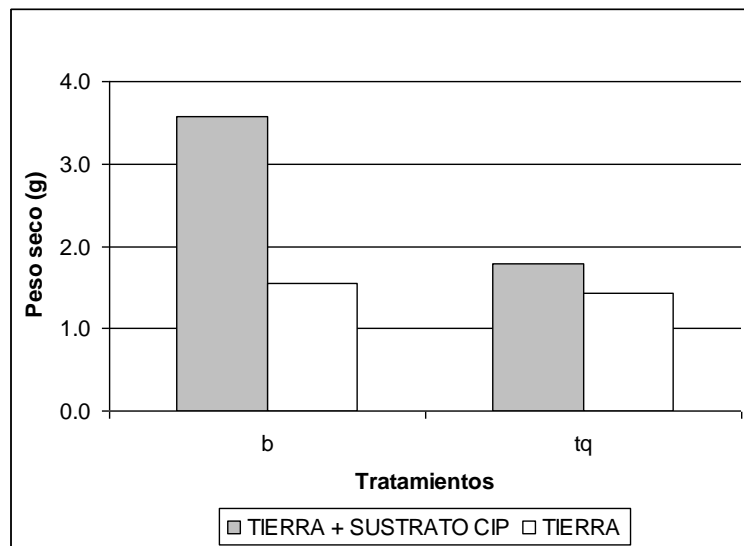


Figura 3.25 Promedio del peso seco de las plantas completas de maíz, al evaluar el tratamiento químico (tq) y el testigo (b) en dos sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

e) Porcentaje de materia seca

El mejor sustrato al evaluar esta variable fue el denominado Tierra Simple, cuyas plantas presentaron el mayor promedio del porcentaje de materia seca correspondiente a 31.3 %, por su parte, las plantas correspondientes al sustrato Tierra presentaron el menor promedio de la variable que correspondió a 18.1% (Tabla 3.34 y Figura 3.26).

Tabla 3.34 ADEVA para el porcentaje de materia seca de las plantas de maíz en la prueba de invernadero al evaluar 3 biofertilizantes en 3 dosis y un tratamiento químico frente a un testigo (b), utilizando dos sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

F. de V	GL	Tierra		Tierra + Sustrato CIP		
		CM	F. cal	CM	F. cal	
Total	32					
Tratamientos	10	157.1	1.4	ns	33.2	6.5 **
Dosis	2	50.5	0.4	ns	2.1	0.4 ns
Biofertilizantes	2	534.6	4.6	*	34.6	6.7 **
BD	4	54.7	0.5	ns	30.5	6.0 **
Factorial vs adicional	1	20.3	0.2	ns	16.5	3.2 ns
Blanco vs Químico	1	161.8	1.4	ns	119.6	23.4 **
Bloques	2	205.6	1.8	ns	19.7	0.6 ns
Error Experimental	20	115.7			32.3	
		CV (%) = 34.4			CV (%) = 31.4	
		\bar{x} (%) = 31.3			\bar{x} (%) = 18.1	

El mejor tratamiento al evaluar esta variable en el sustrato Tierra fue b2d2, correspondiente al biofertilizante elaborado en el medio JCM con una dosis de 2.5 mL/L con un promedio de 44.16 %, el tratamiento cuyas plantas presentaron el menor porcentaje de materia seca fue b1d0 correspondiente al biofertilizante elaborado en el medio JCP en una dosis de 0.5 mL/L (Figura 3.26 y Tabla 3.36). En este ensayo tanto el tratamiento químico como el testigo superaron al tratamiento b1d0. De acuerdo al índice de efectividad de la inoculación (IEI) calculado para esta variable, se encontró un rango de incremento de 0.09 % a 0.61 % con respecto al testigo (Anexo L). El biofertilizante que mayor efecto causó fue JCP y las dosis más efectivas fueron: 0.5 mL/L para PKM, 1.5 mL/L para JCP y 2.5 mL/L para JCM (Figura 3.27 y Tabla 3.36).

En el análisis de varianza se encontró un coeficiente de variación aceptable y alta significancia estadística para la fuente de variación denominada Biofertilizantes (Tabla 3.34). De acuerdo a la prueba de Tukey, se observó que no existió diferencia en la aplicación de los biofertilizantes PKM y JCP pero si la hubo con relación al biofertilizante JCM (Tabla 3.35). Se encontró que el testigo (b) superó al tratamiento químico en este ensayo con un promedio de 38.43 y 24.44 % respectivamente (Figura 3.28).

Tabla 3.35 Prueba de Tukey para los tres biofertilizantes (b0: PKM, b1: JCP y b2: JCM) del porcentaje de materia seca de las plantas completas de maíz en la prueba de invernadero al evaluar 3 biofertilizantes en 3 dosis diferentes y un tratamiento químico frente a un testigo (b) utilizando dos sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

Tratamiento	\bar{x} Materia seca (%)	
	Tierra (*)	Tierra + Sustrato CIP (*)
b0	26.91 b	16.28 a
b1	27.53 b	20.12 a
b2	40.56 a	18.86 a

(*) Tratamientos identificados con letras iguales no tuvieron diferencias significativas entre sí, al aplicar la prueba de Tukey considerando $\alpha=0,05$.

Tabla 3.36 Prueba de Tukey para los tratamientos del porcentaje de materia seca de las plantas de maíz en la prueba de invernadero, al evaluar 3 biofertilizantes en 3 dosis y un tratamiento químico frente a un testigo (b), utilizando dos sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

Tratamientos	Descripción	Materia seca (%) (*)	
		Tierra	Tierra + Sustrato CIP
b2d2	Medio JCM en una dosis de 2.5 mL/L	44.16	19.27 a
b2d1	Medio JCM en una dosis de 1.5 mL/L	40.28	15.58 a
b2d0	Medio JCM en una dosis de 0.5 mL/L	37.23	21.74 a
b	Testigo	34.83	21.05 a
b1d1	Medio JCP en una dosis de 1.5 mL/L	32.15	23.85 a
b1d2	Medio JCP en una dosis de 2.5 mL/L	29.33	18.23 a
b0d0	Medio PKM en una dosis de 0.5 mL/L	28.74	15.27 a
b0d1	Medio PKM en una dosis de 1.5 mL/L	28.40	17.28 a
tq	Tratamiento Químico	24.44	12.12 a
b0d2	Medio PKM en una dosis de 2.5 mL/L	23.58	16.28 a
b1d0	Medio JCP en una dosis de 0.5 mL/L	21.11	18.29 a

(*) Tratamientos identificados con letras iguales no tuvieron diferencias significativas entre sí, al aplicar la prueba de Tukey considerando $\alpha=0,05$.

Por su parte, el mejor tratamiento al evaluar esta variable en el sustrato Tierra + Sustrato CIP, fue el denominado b1d1, correspondiente al medio JCP en una dosis de 1.5 mL/L con un promedio de 23.85 %. Independientemente del testigo y el químico, el tratamiento cuyas plantas presentaron el menor promedio en porcentaje de materia seca fue el denominado b0d0 correspondiente a PKM en una dosis de 0.5 mL/L con un valor de 15.27 %. Las plantas correspondientes al tratamiento químico presentaron el menor promedio de la variable en todo el ensayo que fue de 12.12% (Figura 3.26 y Tabla 3.36). De acuerdo al índice de efectividad de la inoculación (IEI) calculado para esta variable, se encontró un rango de incremento de 0.06 % a 1.07 % (Anexo L). El biofertilizante que mayor efecto causó fue el realizado en el medio de cultivo alternativo JCP y las dosis más efectivas fueron: 1.5 mL/L para PKM y JCP y 0.5 mL/L para JCM (Figura 3.27 y Tabla 3.36).

De acuerdo al análisis de varianza, se encontró un coeficiente de variación aceptable y alta significancia estadística para los tratamientos, biofertilizantes, la interacción Biofertilizantes – Dosis y Blanco vs. Químico (Tabla 3.29). Según la prueba de Tukey, no existieron diferencias en la aplicación de todos los tratamientos y tampoco existió diferencia en la aplicación de los tres biofertilizantes (Tablas 3.34 y

3.35). No hubo diferencia en la aplicación del testigo y el tratamiento químico (Tabla 3.37 y Figura 3.28).

Tabla 3.37 Prueba de Tukey para los tratamientos: testigo (b) y químico (tq) del porcentaje de materia seca de las plantas de maíz en la prueba de invernadero al evaluar 3 biofertilizantes en 3 dosis diferentes y un tratamiento químico frente a un testigo utilizando como sustrato tierra + Sustrato CIP. Quito, Pichincha, 2008.

Tratamiento	\bar{x} Materia Seca (%) (*)
b	21.05 a
tq	12.12 a

(*) Tratamientos identificados con letras iguales no tuvieron diferencias significativas entre sí, al aplicar la prueba de Tukey considerando $\alpha=0,05$.

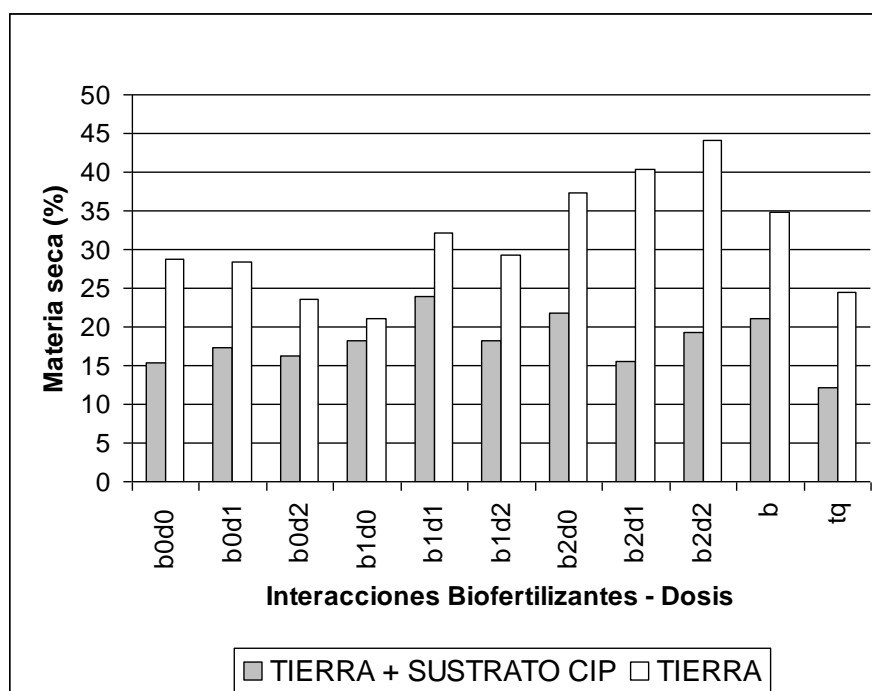


Figura 3.26 Promedio del porcentaje de materia seca de las plantas completas de maíz, al evaluar 3 biofertilizantes en 3 dosis y un tratamiento químico frente a un testigo en invernadero utilizando dos sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

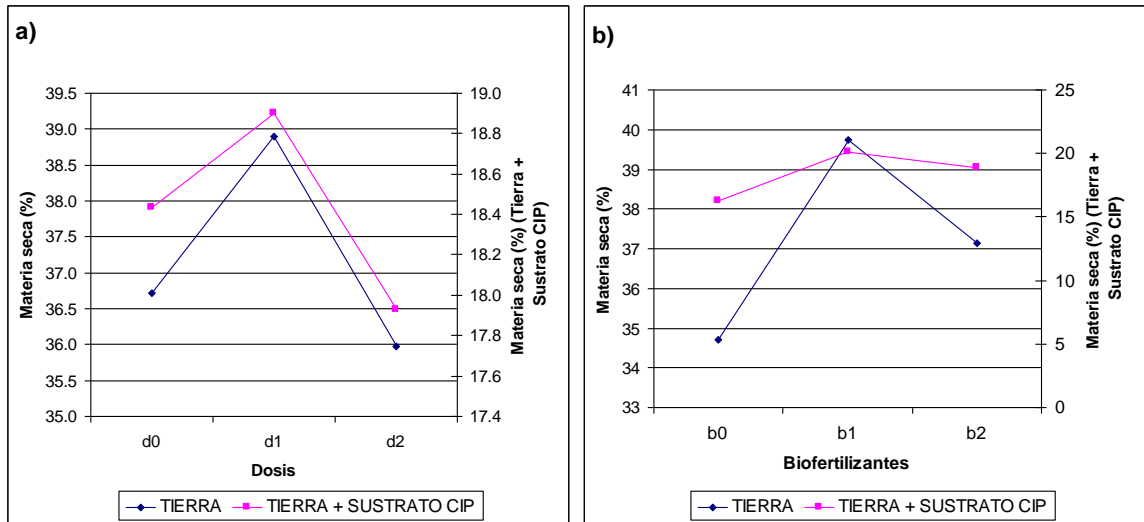


Figura 3.27 Promedio del porcentaje de materia seca de las plantas completas de maíz, al evaluar: (a) 3 dosis diferentes y (b) tres biofertilizantes en dos sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

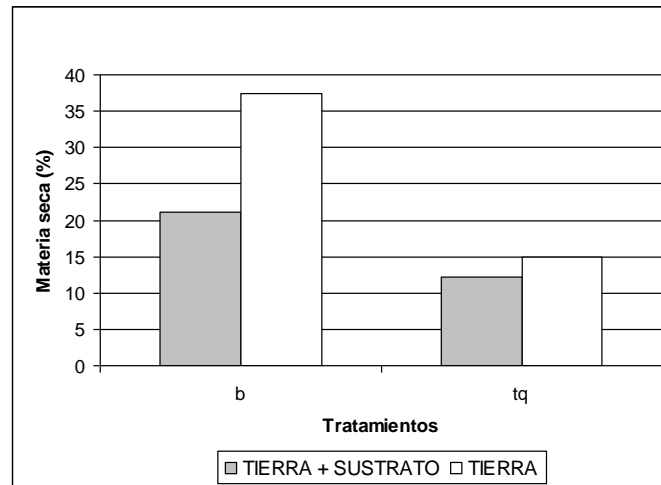


Figura 3.28 Promedio del porcentaje de materia seca de las plantas completas de maíz, al evaluar el tratamiento químico (tq) frente al testigo (b) en invernadero utilizando dos sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

f) Porcentaje de humedad

Tabla 3.38 ADEVA para el porcentaje de humedad de las plantas completas de maíz en la prueba de invernadero al evaluar 3 biofertilizantes en 3 dosis y un tratamiento químico frente a un testigo (b) utilizando dos sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

F. de V	GL	Tierra		Tierra + Sustrato CIP		
		CM	F. cal	CM	F. cal	
Total	32					
Tratamientos	10	157.1	1.4 ns	33.2	6.5 **	
Dosis	2	50.5	0.4 ns	2.1	0.4 ns	
Biofertilizantes	2	534.6	4.6 *	34.6	6.7 **	
BD	4	54.7	0.5 ns	30.5	6.0 **	
Factorial vs adicional	1	20.3	0.2 ns	16.5	3.2 ns	
Blanco vs Químico	1	161.8	1.4 ns	119.6	23.4 **	
Bloques	2	205.6	1.8 ns	19.7	0.6 ns	
Error Experimental	20	115.7		32.3		
		CV (%) = 15.7		CV (%) = 6.9		
		$\bar{\gamma}$ (%) = 68.7		$\bar{\gamma}$ (%) = 81.9		

El mejor sustrato al evaluar esta variable fue el denominado Tierra + Sustrato CIP, cuyas plantas presentaron el mejor promedio de porcentaje de humedad, correspondiente a 81.9 %, por su parte, las plantas correspondientes al sustrato Tierra presentaron un porcentaje de humedad promedio de 68.7 % (Figura 3.29 y Tabla 3.38).

En cuanto a los tratamientos aplicados, el mejor tratamiento al evaluar esta variable en el sustrato Tierra fue b1d0, correspondiente al biofertilizante elaborado en el medio JCP aplicado en una dosis de 0.5 mL/L, cuyo promedio fue de 78.89 %. El tratamiento cuyas plantas presentaron el menor porcentaje de materia seca durante todo el ensayo fue b2d2, correspondiente al biofertilizante elaborado en el medio JCM en una dosis de 2.5 mL/L, con un promedio de 55.84 %, el testigo y el tratamiento químico superan a este último (Figura 3.29 y Tabla 3.40). De acuerdo al índice de efectividad de la inoculación (IEI) calculado, se encontró un rango de incremento de esta variable entre 0.01 % y 0.47 % con respecto al testigo (Anexo L). El biofertilizante que mayor efecto causó en este ensayo fue el realizado en el medio PKM, las dosis más efectivas fueron: 2.5 mL/L para PKM y 0.5 mL/L para JCP y JCM (Tabla 3.35 y Figura 3.30).

En el análisis de varianza se encontró un coeficiente de variación aceptable y significancia estadística para los biofertilizantes (Tabla 3.38). La prueba de Tukey estableció dos rangos para esta fuente de variación, en el primero se encontraron los biofertilizantes PKM y JCP y en el segundo JCM, lo que señala una diferencia en la aplicación de estos (Tabla 3.39). Se encontró que el tratamiento químico superó al testigo en este ensayo puesto que sus plantas presentaron valores mayores para esta variable, 75.56 y 65.17 % respectivamente (Figura 3.31).

Tabla 3.39 Prueba de Tukey para los tres biofertilizantes (b0: PKM, b1: JCP y b2: JCM) del porcentaje de humedad de las plantas completas de maíz en la prueba de invernadero al evaluar 3 biofertilizantes en 3 dosis y un tratamiento químico frente a un testigo (b), utilizando dos sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

Tratamiento	\bar{x} Humedad (%) (*)	
	Tierra	Tierra + Sustrato CIP
b0	73.09 a	83.72 a
b1	72.47 a	79.88 a
b2	59.44 b	81.14 a

(*) Tratamientos identificados con letras iguales no tuvieron diferencias significativas entre sí, al aplicar la prueba de Tukey considerando $\alpha=0,05$.

Por otra parte, el mejor tratamiento al evaluar esta variable en el sustrato Tierra + Sustrato CIP fue el químico, con un porcentaje de 87.88 %, el biofertilizante cuyas plantas presentaron el mayor porcentaje fue b0do correspondiente al producto realizado en el medio PKM en una dosis de 0.5 mL/L con un promedio de 84.73 %. El tratamiento cuyas plantas presentaron el menor porcentaje de humedad fue b1d1 correspondiente a JCP en una dosis de 2.5 mL/L con un promedio de 76.15 % (Figura 3.29 y Tabla 3.40). De acuerdo al índice de efectividad de la inoculación (IEI) calculado, se encontró un rango de incremento de 0.01 % a 0.31 % para esta variable (Anexo L). El biofertilizante que mayor efecto causó fue el realizado en el medio PKM y las dosis más efectivas fueron 2.5 mL/L para PKM y JCP y 1.5 mL/L para JCM (Figura 3.30 y Tabla 3.40). De acuerdo al análisis de varianza, se encontró un coeficiente de variación aceptable y significancia estadística para: Tratamientos, biofertilizantes y para la interacción Biofertilizantes – Dosis y Blanco vs. Químico (Tabla 3.38). De acuerdo a la prueba de Tukey para tratamientos, no existió diferencia en la aplicación de todos los tratamientos (Tabla 3.40), lo mismo sucede con la fuente de variación biofertilizantes, mostrándose un rango igual para todos (Tabla 3.39). Así también, Tukey estableció el mismo rango tanto para el tratamiento químico como para el testigo, aunque sus porcentajes fueron diferentes, con valores de 87.88 % y 78.95% respectivamente (Figura 3.31 y Tabla 3.41).

Tabla 3.40 Prueba de Tukey para los tratamientos del porcentaje de humedad de las plantas de maíz en una prueba de invernadero al evaluar 3 biofertilizantes en 3 dosis y un tratamiento químico frente a un testigo (b), utilizando dos sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

Tratamientos	Descripción	Humedad (%)	
		Tierra	Tierra + Sustrato CIP
b1d0	Medio JCP en una dosis de 0.5 mL/L	78.89	81.71 a
b0d2	Medio PKM en una dosis de 2.5 mL/L	76.42	83.72 a
tq	Tratamiento Químico	75.56	87.88 a
b0d1	Medio PKM en una dosis de 1.5 mL/L	71.60	82.72 a
b0d0	Medio PKM en una dosis de 0.5 mL/L	71.26	84.73 a
b1d2	Medio JCP en una dosis de 2.5 mL/L	70.67	81.77 a
b1d1	Medio JCP en una dosis de 1.5 mL/L	67.85	76.15 a
b	Testigo	65.17	78.95 a
b2d0	Medio JCM en una dosis de 0.5 mL/L	62.77	78.26 a
b2d1	Medio JCM en una dosis de 1.5 mL/L	59.72	84.42 a
b2d2	Medio JCM en una dosis de 2.5 mL/L	55.84	80.73 a

(*) Tratamientos identificados con letras iguales no tuvieron diferencias significativas entre sí al aplicar la prueba de Tukey considerando $\alpha=0,05$.

Tabla 3.41 Prueba de Tukey para los tratamientos testigo (b) y químico (tq) del porcentaje de humedad de las plantas de maíz en la prueba de invernadero al evaluar 3 biofertilizantes en 3 dosis y un tratamiento químico frente a un testigo utilizando como sustrato Tierra + sustrato CIP. Quito, Pichincha, 2008.

Tratamiento	Humedad (%)
tq	87.88 a
b	78.95 a

(*) Tratamientos identificados con letras iguales no tuvieron diferencias significativas entre sí, al aplicar la prueba de Tukey considerando $\alpha=0,05$.

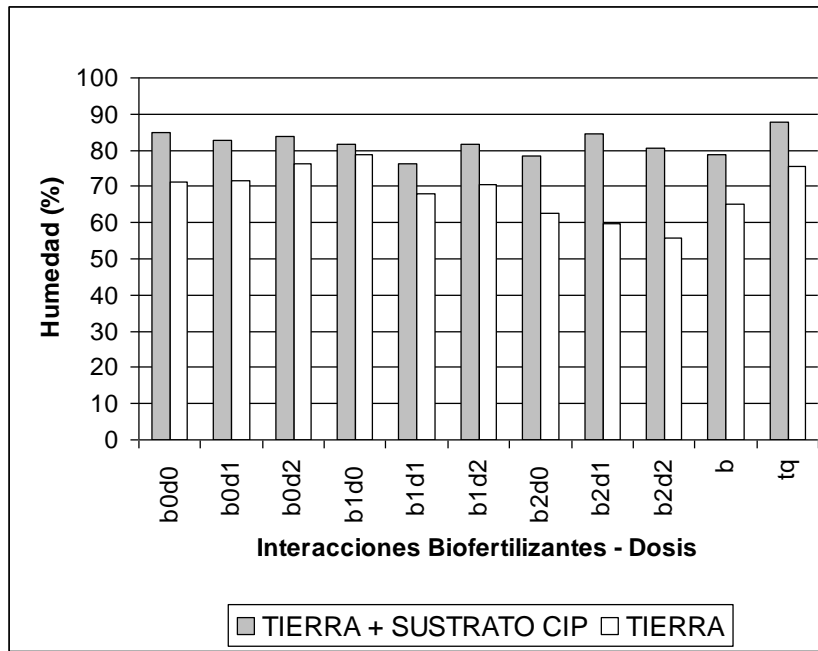


Figura 3.29 Promedio del porcentaje de humedad de las plantas completas de maíz, al evaluar 3 biofertilizantes en 3 dosis y un tratamiento químico frente a un testigo en invernadero utilizando dos sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

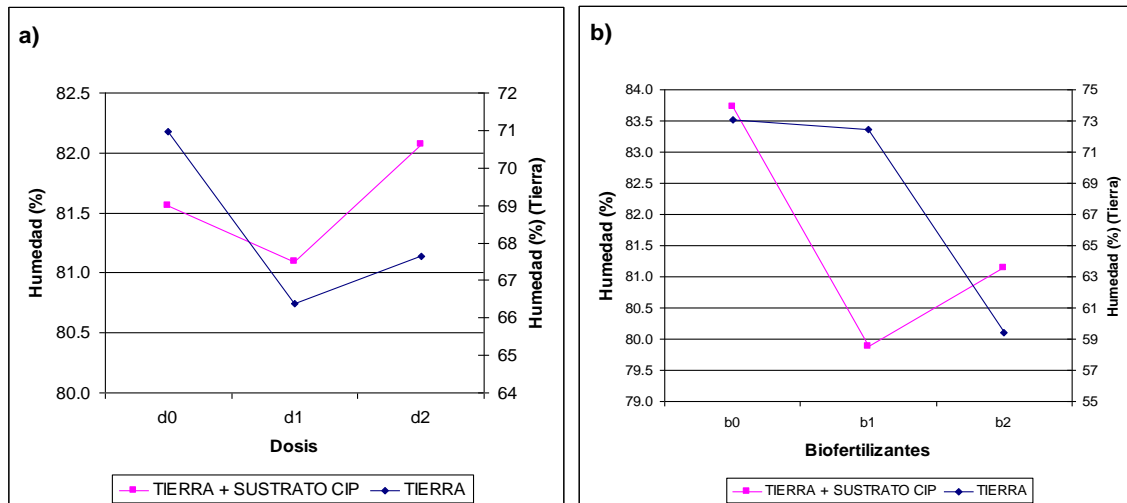


Figura 3.30 Promedio del porcentaje de humedad de las plantas completas de maíz, al evaluar: (a) 3 dosis y (b) 3 biofertilizantes y un tratamiento químico frente a un testigo en invernadero utilizando dos sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

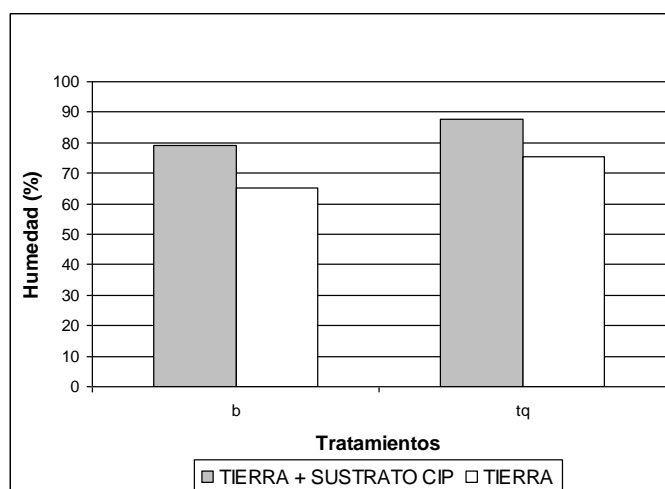


Figura 3.31 Promedio del porcentaje de humedad de las plantas completas de maíz, al evaluar el tratamiento químico (tq) frente al testigo (b) en invernadero utilizando dos sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

g) Razón peso seco parte aérea/ peso seco parte radical

El mejor sustrato al evaluar esta variable fue el denominado Tierra + Sustrato CIP, cuyas plantas presentaron el mayor promedio de razón peso seco parte aérea/peso seco parte radical que fue de 4.4, por su parte, las plantas correspondientes al sustrato Tierra presentaron un menor porcentaje, cuyo valor fue de 2.0 (Figura 3.32).

Tabla 3.42 ADEVA para la razón peso seco parte aérea/ peso seco parte radical de las plantas de maíz en una prueba de invernadero al evaluar 3 biofertilizantes en 3 dosis diferentes y un tratamiento químico frente a un testigo utilizando dos sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

F. de V	GL	Tierra			Tierra + Sustrato CIP		
		CM	F. cal	ns	CM	F. cal	ns
Total	32						
Tratamientos	10	1.3	1.8	ns	3.8	0.7	ns
Dosis	2	0.2	0.3	ns	1.3	0.3	ns
Biofertilizantes	2	0.1	0.1	ns	2.1	0.4	ns
BD	4	0.5	0.6	ns	3.3	0.6	ns
Factorial vs adicional	1	7.2	9.7	**	10.3	2.0	ns
Blanco vs Químico	1	3.6	4.8	*	7.8	1.5	ns
Bloques	2	0.7	1.0	ns	12.0	2.5	ns
Error Experimental	20	0.7			4.7		
		CV (%) = 42.8			CV (%) = 49.5		

x (cm) = 2.0

x (cm) = 4.4

El mejor tratamiento al evaluar esta variable en el sustrato Tierra, fue el tratamiento químico, con un promedio de 3.78, por otra parte, el mejor biofertilizante fue b1d2, correspondiente al biofertilizante elaborado en el medio JCP en una dosis de 2.5 mL/L, cuyo promedio fue de 2.28. El tratamiento, cuyas plantas presentaron el menor promedio fue b1d0, correspondiente al biofertilizante producido en medio JCP en una dosis de 0.5 mL/L, el testigo supera también a este último (Figura 3.32 y Tabla 3.43).

Con respecto al índice de efectividad de la inoculación (IEI) calculado para esta variable, se encontró un rango de incremento de 0.01 % a 1.38 % (Anexo L). El biofertilizante que mayor efecto causó fue el realizado en el medio JCP, las dosis más efectivas fueron: 0.5 mL/L para PKM, 2.5mL/L para JCP y JCM (Figura 3.33 y Tabla 3.43).

En el análisis de varianza se encontró un coeficiente de variación adecuado y significancia estadística para las fuentes de variación: Factorial vs. Adicional y Blanco vs. Químico (Tabla 3.42). De acuerdo a la prueba de Tukey para Factorial vs. Adicional, se encontró existió diferencia en la aplicación del tratamiento químico y el resto de tratamientos, de la misma manera no existió diferencia en la aplicación de los tratamientos químico, b1d2 y b2d2, que corresponden a los biofertilizantes elaborados en los medios JCP en una dosis de 2.5 mL/L y JCM en la misma dosis respectivamente (Tabla 3.43). Al comparar el testigo con el tratamiento químico se observó que las plantas correspondientes al tratamiento químico superaron a las correspondientes al testigo. La prueba de Tukey los ubicó en dos rangos distintos destacando su diferencia (Tabla 3.44 y Figura 3.34).

Tabla 3.43 Factorial vs. Adicional para la razón peso seco parte aérea/ peso seco parte radical de las plantas de maíz en una prueba de invernadero al evaluar 3 biofertilizantes en 3 dosis y un tratamiento químico frente a un testigo utilizando dos sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

Tratamientos	Descripción	Razón peso seco parte aérea/peso seco parte radical	
		Tierra (*)	Tierra + Sustrato CIP

tq	Tratamiento Químico	3.78 a	4.43
b1d2	Medio JCP en una dosis de 2.5 mL/L	2.28 ab	3.46
b	Testigo	2.24 b	6.72
b2d2	Medio JCM en una dosis de 2.5 mL/L	2.10 ab	6.21
b2d0	Medio JCM en una dosis de 0.5 mL/L	2.03 b	4.00
b0d0	Medio PKM en una dosis de 0.5 mL/L	1.96 b	3.19
b1d1	Medio JCP en una dosis de 1.5 mL/L	1.84 b	4.86
b0d1	Medio PKM en una dosis de 1.5 mL/L	1.57 b	4.00
b2d1	Medio JCM en una dosis de 1.5 mL/L	1.57 b	3.65
b0d2	Medio PKM en una dosis de 2.5 mL/L	1.51 b	3.75
b1d0	Medio JCP en una dosis de 0.5 mL/L	1.29 b	3.97

(*) Tratamientos identificados con letras iguales no tuvieron diferencias significativas entre sí, al aplicar la prueba de Tukey considerando $\alpha=0,05$.

Tabla 3.44 Prueba de Tukey para los tratamientos testigo (b) y químico (tq) de la razón peso seco parte aérea/ peso seco parte radical de las plantas de maíz, en la prueba de invernadero al evaluar 3 biofertilizantes en 3 dosis diferentes y un tratamiento químico frente a un testigo utilizando como sustrato tierra simple. Quito, Pichincha, 2008.

Tratamiento	\bar{x}	Razón (*)
tq		3.78 a
b		2.24 b

(*) Tratamientos identificados con letras iguales no tuvieron diferencias significativas entre sí, al aplicar la prueba de Tukey considerando $\alpha=0,05$.

Por otra parte, el mejor tratamiento al evaluar esta variable en el sustrato Tierra + Sustrato CIP, fue el testigo, cuyas plantas alcanzaron un promedio de 6.72, el mejor biofertilizante fue el denominado b2d2, correspondiente al medio JCM en una dosis de 2.5 mL/L, con un promedio de 6.21. El tratamiento en cuyas plantas se obtuvieron los menores valores para esta variable fue b0d0, correspondiente al medio PKM en una dosis de 0.5 mL/L (Figura 3.32 y Tabla 3.43). De acuerdo al índice de efectividad de la inoculación (IEI) calculado para esta variable, se encontró un rango de incremento de 0.04 % a 1.49 % (Anexo L). El biofertilizante que mayor efecto causó fue el realizado en el medio de cultivo JCM y las dosis más efectivas fueron: 1.5 mL/L para PKM y JCP, y 2.5 mL/L para JCM (Figura 3.33 y Tabla 3.43).

En el análisis de varianza se encontró un coeficiente de variación adecuado además de no existir significancia estadística para ninguna de las fuentes de variación evaluadas en este ensayo (Tabla 3.42). Se encontró que las plantas correspondientes al

testigo presentaron un promedio mayor para la variable evaluada que el tratamiento químico, con valores de 6.72 y 4.43 respectivamente (Figura 3.34).

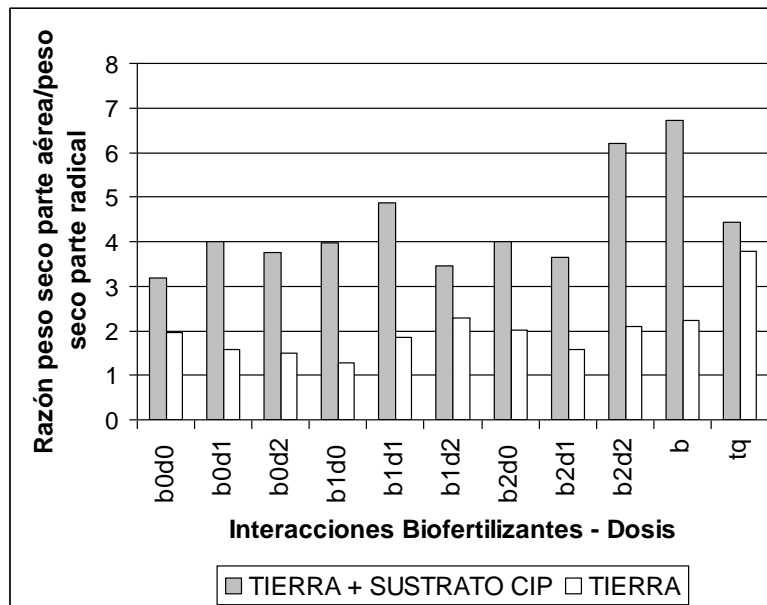


Figura 3.32 Promedio de la razón peso seco parte aérea/ peso seco parte radical de las plantas de maíz, al evaluar 3 biofertilizantes en 3 dosis diferentes y un tratamiento químico frente a un testigo en invernadero utilizando dos sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

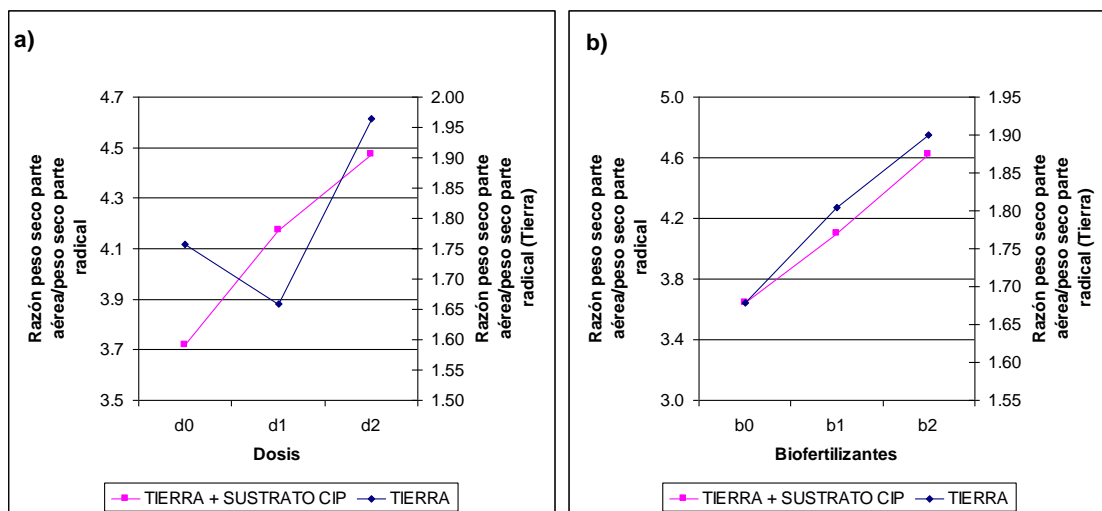


Figura 3.33 Promedio de la razón peso seco parte aérea/ peso seco parte radical de las plantas de maíz, al evaluar: (a) 3 dosis y (b) 3 biofertilizantes y un tratamiento químico frente a un testigo en invernadero utilizando dos sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

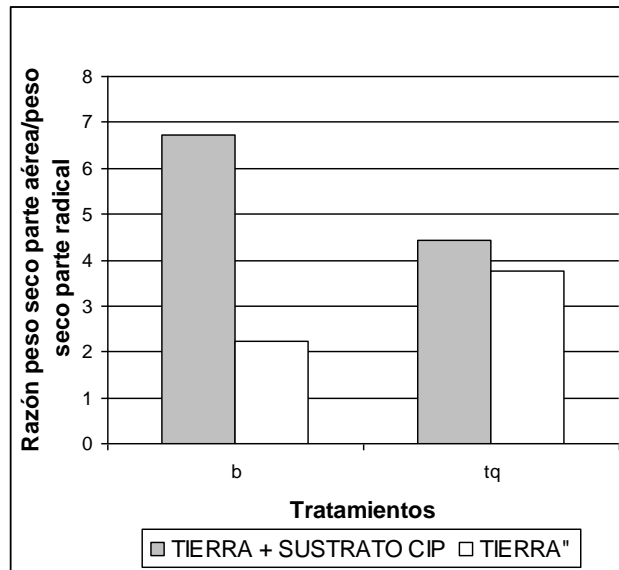


Figura 3.34 Promedio de la razón peso seco parte aérea/ peso seco parte radical de las plantas de maíz, al evaluar un tratamiento químico (tq) frente a un testigo (b) en invernadero utilizando dos sustratos. Quito, Pichincha, 2008.

3.7.2 Coloración de las hojas de las plantas correspondientes a cada tratamiento en el sustrato Tierra

Se observó una coloración violácea diferente entre algunas plantas correspondientes al ensayo en tierra, esto puede deberse a la falta de absorción de fósforo por parte de las raíces o a la alta compactación del suelo. De acuerdo al grado de coloración presente en las 4 plantas correspondientes a cada maceta, se estableció un rango de valoración, el cual se utilizó para valorar las plantas de cada maceta (Tabla 3.45, 3.46 y Figura 3.35).

Tabla 3.45 Rango de coloración de las hojas de las plantas de maíz al evaluar 3 biofertilizantes en 3 dosis diferentes y un tratamiento químico frente a un testigo utilizando como sustrato tierra simple en invernadero. Quito, Pichincha, 2008.

Rango	% Coloración Violácea
1	0%
2	25%
3	40%
4	75%
5	90%

Tabla 3.46 Número de plantas por coloración según los rangos especificados para las plantas de maíz correspondientes al ensayo en sustrato Tierra. Quito, Pichincha, 2008.

Tratamiento/ Rango	1	2	3	4	5
b0d0	0	6	0	2	0
b0d1	1	2	1	0	0
b0d2	4	4	0	0	0
b1d0	1	4	2	1	0
b1d1	2	3	2	1	0
b1d2	0	2	4	2	0
b2d0	1	2	1	3	1
b2d1	4	7	1	0	0
b2d2	5	5	1	1	0
t	1	1	2	0	0
tq	3	1	0	0	0

Tabla 3.47 Análisis de contingencia y frecuencias (F) de los porcentajes correspondientes a la coloración de las plantas de maíz de a cuerdo al rango establecido para la fase de invernadero. Para las celdas con tres filas, la primera corresponde al porcentaje equivalente al número de plantas por rango, la segunda al porcentaje con relación al número total de plantas por tratamiento y la tercera al porcentaje relacionado al total de plantas por coloración. Quito, Pichincha, 2008.

Tratamiento/ Color	1	2	3	4	5	%	F	%	
b0d0	0.0%	7.1 75.0% 16.22 %	0.0%	2.4% 25.0 % 20.0 %	0.0%	11. 3	%	8	9.52
b0d1	1.2% 25.0% 4.55% 4.8%	2.4% 50.0% 5.41% 4.8%	1.2% 25.0% 7.14%	0.0%	0.0%	5.7	%	4	4.76
b0d2	50.0% 18.18 %	50.0% 10.81 %	0.0%	0.0%	0.0%	11. 3	%	8	9.52
b1d0	1.2% 12.5% 4.55%	4.8% 50.0% 10.81 %	2.4% 25.0% 14.29 %	1.2% 12.5 % 10.0 %	0.0%	11. 3	%	8	9.52
b1d1	2.4% 25.0% 9.09%	3.6% 37.5% 8.11%	2.4% 25.0% 14.29 %	1.2% 12.5 % 10.0 %	0.0%	11. 3	%	8	9.52

b1d2	0.0%	2.4% 25.0% 5.41%	4.8% 50.0% 28.57%	2.4% 25.0% 20%	0.0%	11.3	%	8	9.52
b2d0	1.2% 12.50% 4.55%	2.4% 25.0% 5.41%	1.2% 12.5% 7.14%	3.6% 37.5% 30.0%	1.2% 12.5% 100%	11.3	%	8	9.52
b2d1	4.8% 33.33% 18.18% %	8.3% 58.33% 18.92% %	1.2% 8.33% 7.14%	0.0%	0.0%	17.0	%	1 2	14.2 9
b2d2	6.0% 41.67% 22.73% %	6.0% 41.67% 13.51% %	1.2% 8.33% 7.14%	1.2% 8.33% 10.0%	0.0%	17.0	%	1 2	14.2 9
t	1.2% 25.0% 4.55%	1.2% 25.0% 2.7%	2.4% 50.0% 14.29%	0.0%	0.0%	5.7	%	4	4.76
tq	3.6% 75.0% 13.64% %	1.2% 25.0% 2.7%	0.0%	0.0%	0.0%	5.7	%	4	4.76
%	26.2%	44.0%	16.7%	11.9%	1.2%	84		8 4	99.9 8

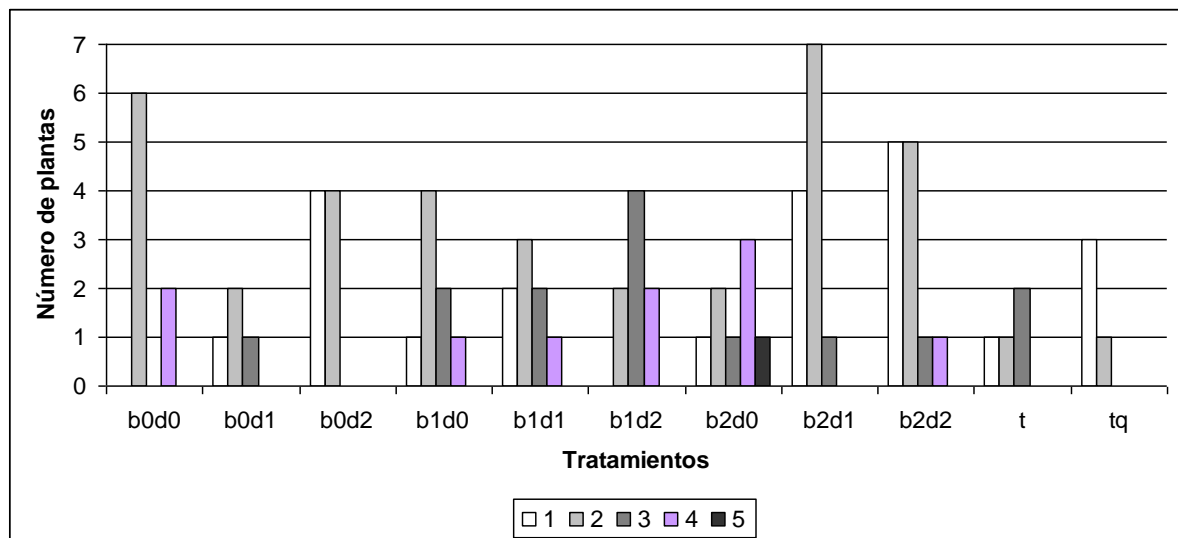


Figura 3.35 Plantas por maceta y por tratamiento que presentaron hojas con coloración violácea en el ensayo de invernadero en el sustrato Tierra. Quito, Pichincha, 2008.

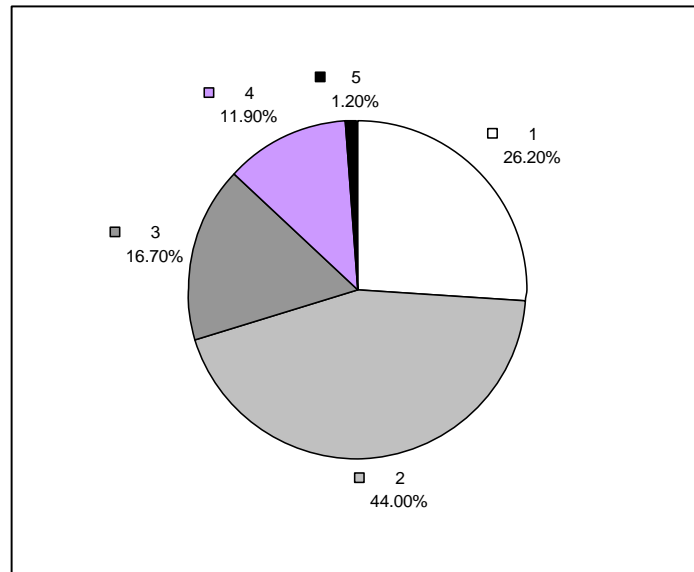


Figura 3.36 Análisis de contingencia de los rangos de coloración de las plantas de maíz de acuerdo al rango establecido para la fase de invernadero. Quito, Pichincha, 2008.

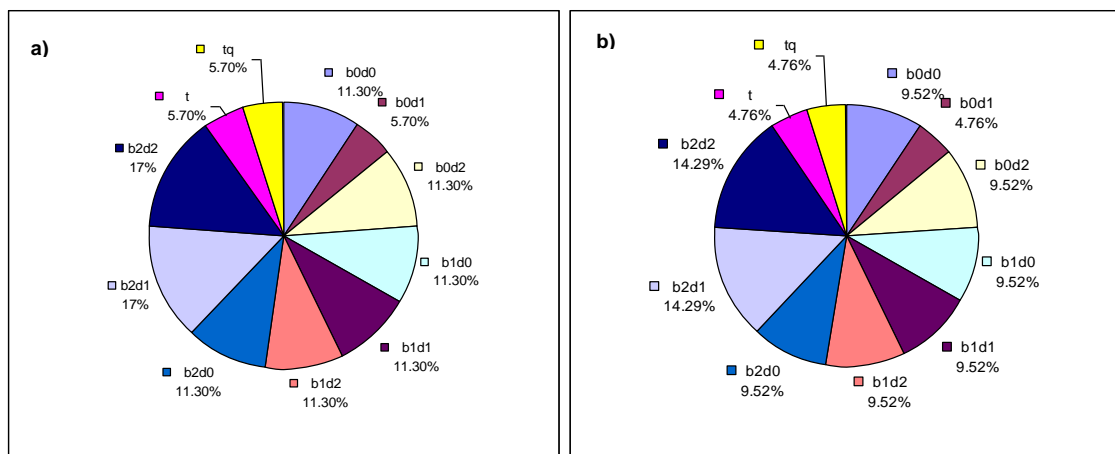


Figura 3.37 Plantas por tratamiento que presentaron hojas con coloración violácea dentro de todos los rangos en el ensayo de invernadero: a) porcentaje total y b) porcentaje correspondiente. Quito, Pichincha, 2008.

En el ensayo de invernadero existió un mayor porcentaje de plantas con características dentro del rango de coloración número 2. Los tratamientos que presentaron un mayor porcentaje de coloración violácea dentro de los rangos de valoración fueron b2d1, correspondiente al biofertilizante elaborado con el medio JCM en una dosis de 1.5 mL/L y b2d2, correspondiente al biofertilizante elaborado en el medio JCM en una dosis de 2.5 mL/L. El tratamiento que estimuló la aparición de

color violáceo en las hojas en el mayor rango (5) fue b2d0 correspondiente al biofertilizante elaborado en el medio JCM en una dosis de 0.5 mL/L. De acuerdo al análisis de contingencia, el tratamiento b0d0 estimuló en mayor parte una coloración del rango 2, al igual que el tratamiento b0d1, b1d0, b1d1, b2d1, b2d1 y b0d2, estos dos últimos estimularon en igual porcentaje el apareamiento de coloración en el rango 1. Además, los tratamientos que estimularon de una mejor manera el apareamiento de una coloración del rango 3, rango 1 y 4 fueron: b1d2, tq y b2d0 respectivamente (Tabla 3.47 y Figuras 3.36 y 3.37).

3.8 Análisis del contenido de P soluble en agua en tierra simple

Los niveles de fósforo soluble en el sustrato tierra disminuyeron en la mayoría de las macetas, excepto en las correspondientes a los tratamientos: b0d1 y b1d0 verificándose en éstas la actividad solubilizadora de fósforo puesto que las plantas tomaron lo necesario y las bacterias continuaron con su actividad solubilizadora. El fósforo restante en el blanco es la cantidad que dejaron de usar las plantas y que quedó en la tierra hasta el tiempo de evaluación final (Tabla 3.48 y Anexo E).

Tabla 3.48 Concentración del fósforo soluble en agua en los sustratos utilizados, antes y después de finalizada la fase de invernadero. Quito, Pichincha, 2008.

Etapa	Sustrato	Fósforo soluble ppm	Nivel (*)	Fósforo Total	Fósforo fijado
Antes de la siembra	Tierra	9.3	Mediano	57.0	47.7
	Tierra + Sustrato CIP	13.1	Alto		
	Sustrato CIP	31.0	Muy Alto		
Después de la germinación	Tierra b0d0	8.9	Mediano		
	Tierra b0d1	14.0	Alto		
	Tierra b0d2	7.9	Mediano		
	Tierra b1d0	9.4	Mediano		
	Tierra b1d1	6.0	Bajo		
	Tierra b1d2	4.3	Bajo		
	Tierra b2d0	3.5	Bajo		
	Tierra b2d1	0.9	Bajo		
	Tierra b2d2	5.7	Bajo		
	Blanco (B)	1.6	Bajo		
	TQ	6.4	Bajo		

(*) Niveles descritos de acuerdo a los rangos establecidos por Smith (2000).

3.9 Supervivencia del biofertilizante

Para evaluar la supervivencia de los biofertilizantes, se aplicó un experimento Factorial en DBCA de 3 x 3 x 2 repeticiones, cuyos datos se encuentran en el Anexo M. Las características del diseo factorial se detallan a continuaci3n:

Factor B = Biofertilizantes	Factor P = Perodos de evaluaci3n
3 niveles:	3 niveles:
PKM: b0	AE (antes del envasado): p0
JCP: b1	1M (al mes de envasado): p1
JCM: b2	3M (a los tres meses de envasado): p2

Variable: Log_{10} UFC/mL

En el an3lisis de varianza se encontr3 alta significancia estadística para las fuentes de variabilidad: tratamientos, biofertilizantes, perodos de evaluaci3n e interacciones entre ellos. No existi3 significancia para las repeticiones, reflejando un buen manejo del ensayo. El coeficiente de variaci3n, tuvo un valor adecuado y demuestra homogeneidad y el valor promedio de la variable evaluada corresponde a una concentraci3n del orden de 10^9 UFC/mL (Tabla 3.49).

Tabla 3.49 ADEVA para el experimento factorial realizado para la evaluaci3n de la supervivencia del biofertilizante. Quito, Pichincha, 2008.

F. de V	GL	SC	CM	F. cal	CM	CV (%)	\bar{x} (Log (UFC/mL))
Total	17	33.7					
Tratamientos	8	33.1	4.1	56.9	**		
Biofertilizantes	2	14.8	7.4	101.7	**		
Perodos de evaluaci3n	2	8.5	4.3	58.6	**		
BP	4	9.8	2.4	33.6	**		
Repeticiones	1	0.02	0.02	0.2	ns		
Error Experimental	8	0.58	0.1				
						3.1	8.7

La mayor concentración bacteriana fue mantenida en el medio PKM, alcanzando un valor final de 2.34×10^8 UFC/mL. A continuación se encontró la concentración medida en el medio JCM con un valor de 1.45×10^8 UFC/mL, y por último la concentración medida en el medio JCP que correspondió a un valor final de 3.67×10^7 UFC/mL, la misma que es menor al valor establecido para inoculantes biológicos (Figura 3.38, Tabla 3.50, Anexo N).

La prueba de significación DMS reveló que el mejor nivel de Biofertilizantes es b0, que corresponde al biofertilizante producido en el medio PKM, seguido por el producido en el medio JCM y el medio JCP, los mismos que al estar dentro del mismo rango no tienen diferencias entre sí (Tabla 3.51).

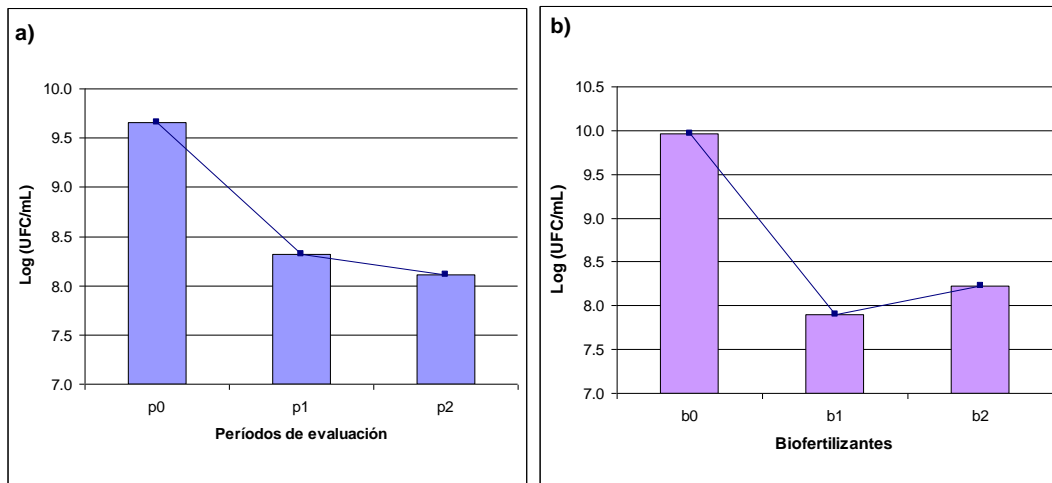


Figura 3.38 Promedio de Log_{10} (UFC/mL) encontradas al evaluar: (a) tres períodos y (b) tres biofertilizantes para verificar su sobrevivencia. Quito, Pichincha, 2008.

De acuerdo a las interacciones, la mayor cantidad de UFC/mL, correspondiente a 2.19×10^{12} UFC/mL, fue hallada en el biofertilizante PKM durante el período p0 de evaluación que corresponde a tiempo antes del envasado. El período donde la concentración bacteriana disminuyó, fue el período p2, correspondiente a tres meses después del envasado. El biofertilizante JCP disminuyó su concentración de UFC/mL a partir del segundo período (Figura 3.39, y Tabla 3.50).

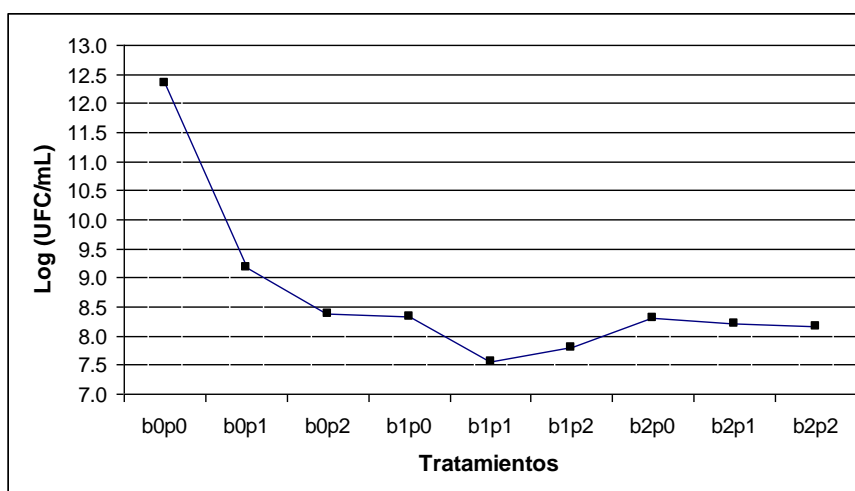


Figura 3.39 Promedio de las interacciones Biofertilizantes – Períodos de evaluación, al evaluar 3 niveles de cada uno de ellos. Quito, Pichincha, 2008.

Tabla 3.50 Promedios para la interacción Biofertilizantes – Períodos de evaluación del experimento factorial realizado para la evaluación de la sobrevivencia del biofertilizante. Quito, Pichincha, 2008.

Interacción	Descripción	\bar{x} (*)
b0p0	Biofertilizante en medio PKM evaluado antes del envasado	12.34 a
b0p1	Biofertilizante en medio PKM evaluado 1 mes después del envasado	9.18 b
b0p2	Biofertilizante en medio PKM evaluado 3 meses después del envasado	8.37 b
b1p0	Biofertilizante en medio JCP evaluado antes del envasado	8.34 c
b2p0	Biofertilizante en medio JCM evaluado antes del envasado	8.30 d
b2p1	Biofertilizante en medio JCM evaluado 1 mes después del envasado	8.21 e
b2p2	Biofertilizante en medio JCM evaluado 3 meses después del envasado	8.16 e
b1p2	Biofertilizante en medio JCP evaluado 3 meses después del envasado	7.80 e
b1p1	Biofertilizante en medio JCP evaluado 1 mes después del envasado	7.56 e

(*) Tratamientos identificados con letras iguales no tuvieron diferencias significativas entre sí, al aplicar la prueba de Tukey considerando $\alpha=0,05$.

Tabla 3.51 Prueba de DMS para los niveles de B (Biofertilizantes) del experimento factorial realizado para la evaluación de la sobrevivencia de tres biofertilizantes. Quito, Pichincha, 2008.

Niveles	Biofertilizante	\bar{x} (*)
b0	PKM	9.96 a
b2	JCM	8.22 b
b1	JCP	7.90 b

(*) Tratamientos identificados con letras iguales no tuvieron diferencias significativas entre sí, al aplicar la prueba de DMS considerando $\alpha=0,05$.

El mejor nivel de los períodos de evaluación es p0, que corresponde al primer período de evaluación (al mes después del envasado), seguido por el segundo y tercero período (Tabla 3.52).

Tabla 3.52 Prueba de DMS para los niveles de P (Períodos de evaluación) del experimento factorial realizado para la evaluación de la sobrevivencia del biofertilizante. Quito, Pichincha, 2008.

Niveles	Períodos de evaluación	\bar{x} (*)
p0	Antes del Envasado (AE)	9.66 a
p1	Al mes de envasado (1M)	8.31 b
p2	A los tres meses de envasado (3M)	8.11 b

(*) Tratamientos identificados con letras iguales no tuvieron diferencias significativas entre sí, al aplicar la prueba de DMS considerando $\alpha=0,05$.

De acuerdo a estos resultados, se puede notar que la viabilidad de los biofertilizantes PKM y JCM se mantuvo dentro del rango establecido para inoculantes biológicos (Anexo N) ,hasta los tres meses de conservación, mientras que la del biofertilizante JCP disminuyó durante el tercer período.

3.10 Análisis Económico

El Análisis económico reveló que todos los experimentos son rentables, pero, de acuerdo a los cálculos del Valor actual neto (VAN), el biofertilizante preparado con el medio PKM fue el más rentable. A pesar de que los costos de producción para

este biofertilizante fueron los más caros, el flujo de caja señala que los ingresos superaran a los egresos si se considera una venta aproximada de 100 a 200 L por mes.

De igual manera, el valor calculado para la Tasa de rentabilidad intena (TIR) que es un es un indicador de rentabilidad relativa del proyecto, para el biofertilizante producido en el medio PKM fue superior a la tasa exigida de 18% , indicando así que el proyecto donde se utilizó el medio de cultivo PKM tiene una rentabilidad asociada mayor que la tasa de mercado, por lo tanto es más conveniente que los otros biofertilizantes (Anexo G).

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

4.1 Elaboración de la curva de calibración para el medio de cultivo comercial PKM

Esta curva de calibración mostró una tendencia similar a la curva de Mc Farland, aunque presentó un número menor de UFC/mL. Esto se debe a que el volumen de las células de *Pseudomonas* sp. y *Azotobacter* sp. es ligeramente mayor al de *E. coli* (Cuberos, et al., 1998), debido a que el volumen de cada especie bacteriana es diferente se debe realizar una curva de calibración para la especie o especies con la que se esté trabajando.

4.2 Producción de biofertilizante a partir de bacterias solubilizadoras de fósforo a escala de 1 litro utilizando los tres medios de cultivo: PKM, JCP y JCM

Crecimiento bacteriano

El pool preparado con las bacterias solubilizadoras de fósforo fue capaz de crecer en los tres medios establecidos, indicando así que todos los medios en mayor o menor grado, proporcionaron a las bacterias los nutrientes necesarios para sobrevivir.

Todos los medios poseen como fuente de carbono y energía a la glucosa en forma azúcar. Para una mejor discusión, se empezó analizando el crecimiento en cada fase por medio, de la siguiente manera:

Fase Lag:

- En el medio PKM, la fase lag fue mínima, casi imperceptible, esto pudo deberse a que la composición del caldo nutritivo utilizado para la preparación del pool es muy similar a la del medio Pikovskaya modificado puesto que contiene extracto de levadura, NaCl, y fuentes proteicas, haciendo que los microorganismos tarden menos en adaptarse a este nuevo medio (Figura 3.2).
- En los medios JCP y JCM, las bacterias atravesaron por una fase Lag un tanto más larga, con una duración de aproximadamente tres horas, esto fue debido a que las bacterias tuvieron que adecuarse a la única fuente de carbono existente, que constituyeron los azúcares totales y reductores contenidos en el jugo de caña; además que los componentes del medio JCM fueron una mezcla entre los que conforman el jugo natural de caña de azúcar y el medio comercial, necesitándose una mejor adaptación por parte de las bacterias para estas condiciones (Figura 3.2).

Fase Exponencial:

- En el medio PKM, la mayor concentración en esta fase tuvo lugar después de 15 horas de cultivo, conservando para ambos ensayos una concentración efectiva para su utilización como inoculantes biológicos. La mayor duración de esta fase denota una buena capacidad de duplicación de las bacterias y una concentración de nutrientes ideal en el medio (Figura 3.2).
- En el medio JCP, la mayor concentración en esta fase tuvo lugar después de aproximadamente 18 horas de cultivo, lo que refleja una duración similar al medio PKM, ratificando que la naturaleza nutritiva del medio es óptima para el crecimiento bacteriano.
- En el medio JCM, la mayor concentración en esta fase tuvo lugar a las 24 horas, esto se produjo debido a que hubo un retraso debido al tiempo requerido por las bacterias para adaptarse y tomar los nutrientes de este medio mixto (origen químico y natural).

Fase Estacionaria:

- Para el medio PKM, esta fase duró hasta las 33 horas de cultivo encontrándose una disminución en la concentración bacteriana.
- En los medios JCP y JCM, esta fase duró hasta las 33 a 36 horas de cultivo, denotando una buena calidad en los medios de cultivo.

Fase de Muerte:

- Esta fase fue alcanzada por todos los cultivos después de las 33 horas de cultivo, y se produjo por la falta de nutrientes y el exceso de metabolitos producidos que tienden a inhibir el crecimiento bacteriano.

Cinética de la Fase exponencial

Los dos ensayos realizados para los distintos medios a escala 1 litro, mostraron una similitud en los parámetros medidos, las variaciones se produjeron debido a la estandarización del proceso de producción, donde la variación mínima del tiempo de incubación del preinóculo hace que el valor de estos parámetros se altere. Los parámetros cinéticos calculados demuestran una mayor cantidad de generaciones en los medios alternativos (JCP y JCM) en comparación con el medio comercial (PKM), esto puede reflejar que la calidad del medio influye directamente con el comportamiento bacteriano puesto que en un inicio las bacterias utilizan todos los nutrientes disponibles pero al no haber reservas, empiezan a morir como sucedió en JCP y JCM, mientras que en PKM, la utilización fue parcial y ayudó a un crecimiento mejor, esto se ve expresado en la mayor concentración bacteriana al finalizar el proceso de fermentación.

4.3 Escalado a 10 L de la producción del biofertilizante a partir de bacterias solubilizadoras de fósforo utilizando los tres medios de cultivo

Este procedimiento fue realizado de acuerdo al esquema presentado en la Figura 2.1, debido a que de esta manera se reduce la probabilidad de contaminación con otros microorganismos no deseados puesto que en las etapas iniciales los volúmenes de los medios son más pequeños y por ende más manejables. Además, se puede identificar contaminación en las etapas previas a la inoculación del

fermentador, evitando así la pérdida de toda la materia prima en la incubación. La cantidad de células de los microorganismos traspasada al siguiente medio, minimiza el efecto por contaminación de las etapas subsiguientes: esto sucedió debido a que los microorganismos originales atravesaron por una etapa de competencia donde aquellos que se encontraron en mayoría, tuvieron mayor probabilidad de sobrevivir que aquellos que no alcanzaron un número de células considerable (Placencia y Ruiz, 2006).

4.3.1 Fermentación discontinua a escala 10 L

4.3.1.1 Crecimiento bacteriano

La concentración del inóculo para esta fase fue aquella alcanzada al inicio de la fase exponencial, por ello la similitud en el comportamiento a ambas escalas.

Fase Lag:

- En este ensayo llevado a cabo a escala 10 L, se produjo una reducción de la fase lag o de retraso en todos los medios, esto se debe a que los inóculos fueron desarrollados en el mismo medio de cultivo, confirmándose lo descrito por Brock et al (2001) que afirma que al inocular un cultivo que crece exponencialmente al mismo medio bajo las mismas condiciones de crecimiento, no se observa la fase de retraso y el crecimiento exponencial sigue a la misma velocidad. Esto se debe a que aceleraron su metabolismo hasta alcanzar la fase exponencial en un tiempo menor que su inóculo.

Fase Exponencial:

- En el medio PKM y JCP la mayor concentración bacteriana se produjo después de 18 horas de incubación y en el medio JCM se produjo después de 21 horas de cultivo. El inicio de esta fase depende de la duración de la fase lag. En comparación con la fase de escala 1 L, el comportamiento de los medios fue similar, simplemente se adelantó el inicio de la fase debido a la corta duración de la fase lag.

Fase Estacionaria:

- Esta fase duró hasta aproximadamente 30 horas después de haber iniciado el cultivo, esto se debe a que los nutrientes empiezan a agotarse y las células a producir mayor cantidad de metabolitos.

Fase de Muerte:

- Esta fase empezó después de las 33 horas de incubación en todos los medios, el inicio de esta fase demostró que los nutrientes de los medios de cultivo comenzaron a agotarse.

4.3.1.1.1 Cinética de la Fase exponencial

Los parámetros cinéticos de esta fase en todos los medios se redujeron con respecto a los calculados en la fase 1L, lo que implica un cambio en el comportamiento bacteriano en la escala 10 L, debido a la calidad del inóculo y a la mayor cantidad de medio y a las concentraciones de los nutrientes. Pese a que las bacterias del inóculo fueron incubadas en el mismo medio, y se redujo la fase lag, éstas redujeron su capacidad de duplicación como respuesta a la nueva inoculación a un volumen mayor.

4.4 Variación de pH

El pH de los medios de cultivo es generalmente modificado por los microorganismos que crecen en él. Dependiendo de las fuentes de energía y del metabolismo de cada género bacteriano, el medio puede acidificarse o alcalinizarse. Existen mecanismos desarrollados por algunas bacterias que les permiten sobrevivir a este tipo de cambio, así, pueden sintetizar nuevas proteínas como respuesta de tolerancia a distintos medios (Brock, et al., 2001).

Con respecto al medio PKM, en los dos ensayos realizados a escala 1 L el pH final fue de 8, un valor que no es el óptimo pero que si se encuentra dentro del rango estimado para el crecimiento del pool bacteriano. El cambio del pH de 7 a 8 puede

interpretarse como resultado del metabolismo microbiano al producir amoníaco después de consumir parte de los aminoácidos presentes en el extracto de levadura que conforma el medio Pkovskaya (Brock, et al., 2001). A escala 10 L, pH final terminó en la neutralidad debido a diversos procesos metabólicos que se dan lugar en las bacterias utilizadas.

Por otra parte, para el medio JCP, en el ensayo a escala 1 L, la variación del pH en este medio fue mucho mayor debido a que el ensayo se realizó en jugo de caña puro, sin la adición de agentes buferantes. El pH final fue de 6. Pese a esto, la actividad microbiana continuó, debido a que las bacterias se adaptaron a los cambios de pH para sobrevivir, esto lo confirman los conteos y las tinciones realizadas a cada muestra monitoreada durante la fermentación. La disminución del pH puede atribuirse a la solubilización de la fuente fosfatada que en el caso del jugo de caña puro constituyeron los fosfatos, es posible que las bacterias del biofertilizante hayan producido ácidos orgánicos, especialmente ácido málico y ácido glicólico, que rompen las uniones entre los aniones fosfatos, liberando estos últimos a la solución del medio.

Este comportamiento es normal de bacterias solubilizadoras de fosfato que actúan en un medio sin tampón puesto que pueden existir otros mecanismos involucrados en la solubilización de los compuestos de fósforo. Puede ocurrir que bajo condiciones no tamponadas se manifieste un metabolismo bacteriano que implique la producción de otro u otros ácidos diferentes a los producidos cuando el medio de cultivo tiene tampón. En el proceso de solubilización, el tipo de ácido secretado por el microorganismo es más importante que la cantidad (Fernández, et al., 2005). En el ensayo a escala 10 L, el pH terminó en la neutralidad, esto se atribuye a la variedad de procesos metabólicos de las bacterias utilizadas.

Finalmente, el pH en el medio JCM varió mucho más que en los otros medios donde este parámetro fue mucho más constante. Este cambio de pH puede atribuirse a la adaptación de los microorganismos al medio alternativo modificado y puede ser el producto de reacciones llevadas a cabo por estos para adaptar su metabolismo a nuevas condiciones. La disminución del pH se atribuye a la solubilización de la fuente fosfatada que en el caso de este medio constituyeron los fosfatos del jugo de caña y la

roca fosfórica añadida. Este proceso está relacionado con diversos mecanismos involucrados en la solubilización de los compuestos de fósforo. A su vez, el aumento de pH se atribuye a la producción de amoníaco a partir de la metabolización de los aminoácidos presentes en el extracto de levadura utilizado para la preparación del medio Pikovskaya modificado.

En el ensayo a escala 10 L el pH final fue un tanto ácido con un valor de 6, esto pudo deberse a la ausencia de una solución tamponadora de pH, haciendo que varios mecanismos bacterianos se activen y fomenten la acidificación del medio (Fernández, et al., 2005).

4.5 Establecimiento del caldo de cultivo adecuado

Los caldos de cultivo más adecuados de acuerdo al tiempo de fermentación fueron PKM y JCP. Las bacterias tardaron más en crecer en el medio JCM debido a que debían adaptarse a una nueva fuente de nutrientes que tenía características mixtas: jugo de caña y reactivos químicos.

Desde el punto de vista del costo de producción, el medio JCP fue el más económico debido a que es un medio natural fácil de conseguir y no requiere un tratamiento especial más que una adecuada esterilización.

De acuerdo a la prueba de invernadero, los biofertilizantes más adecuados estuvieron en el siguiente orden: JCP, JCM y PKM, lo que demuestra un mejor desempeño de los medios alternativos como sustrato para las bacterias del biofertilizante debido posiblemente al pH con el que inició el inóculo en el medio PKM que fue aproximadamente de 7.7, el pH ácido facilita que el fósforo inorgánico del suelo sea liberado por intercambio protónico al medio (Reyes, 1991).

Finalmente, tomando en cuenta el tiempo de sobrevivencia, el biofertilizante que mayor concentración bacteriana tuvo después de los tres meses de envasado fue el elaborado a base del medio comercial PKM debido posiblemente a la alta concentración inicial de su inóculo y su estabilidad a través del tiempo.

4.6 Prueba de Invernadero

La respuesta de los microorganismos depende del sustrato al que fueron inoculados, el criterio inicial para medir su capacidad solubilizadora partió del halo de solubilización que presentaron en la etapa preliminar del proyecto (Huilcapi, 2007). Lo cierto es que, como lo explica Gyaneshwar, et al., (1998), muchos microorganismos que solubilizaron fósforo en condiciones de laboratorio, pueden no hacerlo en condiciones diferentes como en suelo. Esto puede deberse a su susceptibilidad a cambios de pH, complementada con una disminución de producción de ácidos orgánicos que producen. Estos mismos autores afirmaron que solo los ensayos de campo pueden establecer la capacidad solubilizadora de fósforo inorgánico de los microorganismos aislados en laboratorio, y si ésta es realmente efectiva en plantas de interés comercial como el maíz.

La importancia de utilizar un biofertilizante a partir de bacterias solubilizadoras de fósforo se debe a que el fósforo es uno de los nutrientes más importantes para el desarrollo de las plantas, pero éste es muy poco móvil en el suelo y se inmoviliza fácilmente en las fracciones orgánica e inorgánica (González, 2006). Debido a esto, cualquier mecanismo que facilite la absorción de este nutriente es válido, en el caso de esta investigación, la inoculación de bacterias solubilizadoras de fósforo se realizó con el afán de aumentar la disponibilidad de este nutriente. Las bacterias *Pseudomonas sp.* y *Azotobacter sp.* fueron utilizadas como biofertilizante debido a que a más de establecer una relación simbiótica con las plantas o vivir libremente en los suelos, favorecieron el crecimiento de las plantas en ensayos previos y en esta investigación; esto puede atribuirse a su efecto inhibitorio de agentes patógenos, la síntesis de fitohormonas y enzimas (fosfatasa) que promueven el crecimiento de las plantas (Ferraris y Couretot, 2006).

La temperatura, humedad relativa y calidad de las semillas sembradas influyeron en el normal desempeño de las plantas de maíz del ensayo. La utilización de semillas certificadas, influyó en la uniformidad de la germinación, además, garantizan una germinación homogénea, están libres de virus y enfermedades y

constituyen un excelente mecanismo de seguimiento de las distintas variedades (Bravo, 2001).

El rango de variación de la temperatura dentro del invernadero de 15.30 a 12.73° C, sobrepasó la temperatura mínima de germinación del maíz (Faiguenbaum, 2008). Por ello se tuvo una germinación normal que empezó entre las 48 y 72 horas después de ser sembradas las semillas, esto se evidenció en la uniformidad de la emergencia de todas las plantas.

La humedad en el invernadero varió dentro de un rango aceptable, tomando en cuenta que para la germinación normal de las semillas de maíz es necesario un rango de humedad relativa entre 45 y 60 % (Morales, 2003). Además, no se encontraron efectos visibles de la falta de humedad, puesto que todas las plantas presentaron una contextura normal durante todo el ensayo y ningún signo de marchitamiento. La humedad relativa es un factor importante para el normal desarrollo de las plantas pues si es demasiado baja causa una un exceso de pérdidas de calor de la planta por evaporación de agua. Por otra parte, si la humedad relativa es alta, la planta no puede enfriarse adecuadamente (Lafitte, 2001).

a) Altura de las plantas

En el sustrato Tierra, las plantas correspondientes a todos los tratamientos superaron la altura alcanzada por el tratamiento testigo debido posiblemente a la acción benéfica de las bacterias en los biofertilizantes. El biofertilizante que mayor efecto causó fue el realizado en el medio PKM, esto pudo deberse a la alta concentración bacteriana que poseía con respecto a los dos restantes.

Estos efectos positivos observados sugieren que posiblemente existió un sinergismo entre la planta de maíz y las bacterias de los biofertilizantes, estimulando el desarrollo de la parte aérea en conjunto con las fitohormonas que excretan las raíces. Esto fue reportado por varios autores que realizaron investigaciones relacionadas con los efectos de la inoculación de bacterias promotoras de crecimiento desde el año 1997 (Santillana, 2006). Inclusive, Mayak et al. (2004) inocularon

rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas de maíz y reportaron un mayor desarrollo de su parte aérea.

La concentración de fósforo soluble con la que partió el biofertilizante en el suelo fue de una concentración media, al finalizar en ensayo se analizó también la concentración final en cada maceta por tratamiento. De acuerdo a la Tabla 3.48, para el tratamiento b0d1 (correspondiente al medio PKM en una dosis de 1.5 mL/L), la concentración de fósforo soluble aumentó, esto se interpreta como la posible acción efectiva de las bacterias solubilizadoras de fósforo mediante la solubilización del fósforo orgánico e inorgánico presente en el suelo (Fankem, et al., 2008).

Al comparar las dosis aplicadas por fertilizante en el sustrato Tierra, las más efectivas en la evaluación de esta variable son las correspondientes a 1.5 mL/L y 0.5 mL/L, no así la dosis de 2.5 mL/L, esto pudo deberse a la falta de porosidad de este sustrato, lo que pudo haber afectado el movimiento y la oxigenación de las bacterias, haciendo que aquellas que estaban en mayor concentración se vayan muriendo por encontrarse excesivamente aglomeradas. Pese a que el incremento no superó el porcentaje de 0.44 %, hay una diferencia notable entre la planta testigo y las inoculadas con los biofertilizantes.

La respuesta débil de algunos biofertilizantes después de su inoculación se debe a que no todos los microorganismos se adaptan de una manera rápida a la rizosfera. Esto sucede después de que los productos son almacenados a temperaturas de alrededor de 5 °C, atraviesan por una etapa de inoculación en el suelo donde deben recuperar su actividad bioquímica causada quizá por el estrés de la temperatura de la que fueron sometidos. Una vez estabilizados, y eliminada esta causa de estrés, los microorganismos retoman totalmente sus actividades normales (Sánchez y Corrales, 2005). Además, algunos estudios respaldan esta afirmación, tal es el caso del estudio realizado Sánchez y Corrales, (2005), donde se evidenciaron cambios en bacterias Gram negativas debido al estrés por congelación, estos cambios fueron a nivel molecular y están directamente relacionados con la composición de su membrana y su metabolismo.

En el sustrato denominado Tierra + Sustrato CIP, no se utilizaron análisis químicos finales puesto que debido a la utilización de una composición de 50% de

tierra y 50% de sustrato elaborado por el CIP, garantizaron una mejor porosidad en el suelo y una mayor concentración de fósforo soluble al inicio del ensayo (Tabla 3.48). Los resultados se analizaron basándose en los parámetros visibles y medibles de las plantas sometidas a los distintos tratamientos comparados con el testigo sin inocular.

El mejor tratamiento para esta variable fue b1d1 (correspondiente al biofertilizante elaborado en el medio JCP en una dosis de 1.5 mL/L). El medio de cultivo en el que se realizó la producción de los biofertilizantes es importante, en este caso el más efectivo fue el realizado a base de jugo de caña con reactivos añadidos para asemejar su composición a la del medio comercial, esto quiere decir que contó con las sales y compuestos minerales necesarios para estimular el crecimiento bacteriano; además, los resultados, con respecto a la altura de las plantas, del biofertilizante realizado en el medio comercial son similares a los de este medio. Las dosis más efectivas entre los biofertilizantes fueron de 1.5 y 2.5 mL/L, que constituye las más altas y provee una mayor concentración de microorganismos.

En el ensayo realizado en sustrato CIP, sucedió lo mismo que en el ensayo anterior, puesto que la efectividad de los biofertilizantes no tuvo como base los análisis químicos del sustrato. Se obtuvieron mejores resultados en las plantas inoculadas con los biofertilizantes, sobrepasando todas al tratamiento testigo, lo que ratifica un efecto positivo ejercido por las bacterias solubilizadoras de fósforo. La planta testigo mostró un menor desarrollo en cuanto a la altura de su tallo en comparación con las plantas inoculadas con los diferentes tratamientos, esto posiblemente sucedió gracias al efecto solubilizador de los biofertilizantes.

La prueba de Tukey encontró diferencias en la aplicación de los distintos biofertilizantes, las cuales se atribuyen a la diferente composición de los medios de cultivo en los que fueron elaborados y a las distintas respuestas de las bacterias ante el medio en el que fueron inoculadas. La actividad positiva de las bacterias inoculadas puede deberse a la acción efectiva del mecanismo de solubilización de fósforo, debido a que estas poseen un alto requerimiento de este elemento, en un nivel muy superior al de las plantas, de incluso hasta diez veces mayor. Esta necesidad pudo hacer que desarrollen distintos mecanismos para proveérselo tanto a partir de la fracción orgánica como de la fracción inorgánica. En el caso del fósforo inorgánico presente en

el suelo, las bacterias inoculadas pueden producir ácidos orgánicos como el ácido málico y ácido glicólico, los cuales rompen las uniones entre los cationes (Ca^{++} , Mg^{++}) unidos a las arcillas y los aniones fosfatos, liberándolos a la solución del suelo. En el caso del fósforo orgánico, las bacterias pueden producir fosfatasas específicas que cortan las uniones ésteres principales responsables de la unión de la materia orgánica con aniones fosfatos, causando su liberación a la solución del suelo, para así ser asimilados por las plantas, el fosfato liberado por estas dos vías es muy susceptible de ser fijado (González, 2006).

Para algunos tratamientos, el desarrollo de las raíces que fue favorecido por la inoculación de las bacterias solubilizadoras de fósforo, se manifestó en un mayor crecimiento de la parte aérea de las plantas, esto concuerda con los resultados presentados por Santillana (2006) quien reporto incrementos en el área radicular de plantas de maíz.

b) Longitud de las raíces

Este parámetro fue evaluado con base en investigaciones previas que afirman que tanto el género *Pseudomonas sp.* como *Azotobacter sp.*, ejercen efectos positivos sobre el desarrollo radicular de las plantas al ser aplicados como biofertilizantes (Pan et al., 1999).

En el sustrato Tierra, se encontró un mayor incremento en la longitud de las raíces en las plantas de maíz sometidas al tratamiento b1d1 (correspondiente al medio JCP en una dosis de 1.5 mL/L), esto pudo deberse al pH con el que inició el biofertilizante y a la correcta adaptación al medio del suelo de las bacterias que lo conforman. Esto constituye un signo de mejora en la capacidad de explorar el sustrato para adquirir fósforo del suelo, provocado por la presencia de las bacterias solubilizadoras de fósforo, las cuales producen de fitohormonas que inducen a un gran desarrollo radicular (González, 2008).

Aunque el comportamiento de cada género bacteriano es distinto, los resultados obtenidos en el ensayo pueden atribuirse a una asociación de mecanismos, simultánea o sucesiva donde cada cambio observado y medido es producto de la suma

de cada actividad desarrollada dentro de una condición ambiental específica (Bashan & Levanony, 1993).

Por otra parte, las plantas correspondientes al blanco o testigo sin inocular presentaron raíces con longitudes similares a aquellas correspondientes a los tratamientos con los biofertilizantes, e incluso superiores a algunos de ellos, estos resultados no señalan una deficiencia en los biofertilizantes sino que, según Corrales, et al., (2007), podrían evidenciar un síntoma del estrés por deficiencia de fósforo que podría padecer esa variedad, puesto que según los análisis realizados a la tierra en cuestión, ésta poseía una cantidad media de fósforo disponible para las plantas. Por su parte, el tratamiento químico resultó afectar menos la elongación de las raíces de las plantas de maíz, esto pudo deberse a que el fósforo necesario estaba disponible y las plantas no tuvieron la necesidad de estimular el crecimiento radicular para explorar así el sustrato.

En el sustrato denominado Tierra + Sustrato CIP, hubo mayor porosidad y se logró una mejor estructura no compacta. Esto se verifica con el hecho de que no existieron plantas con hojas de color morado en este ensayo. El mayor efecto sobre esta variable fue el ejercido por el tratamiento b1d1 (correspondiente al medio JCP en una dosis de 2.5 mL/L), esto pudo ser producto del estímulo de las bacterias solubilizadoras de fósforo sobre las raíces de las plantas y la presencia de humus de lombriz, factor que podría beneficiar a las plantas en este aspecto. Se ha señalado que la adición de un sustrato orgánico como el humus, es beneficioso para los microorganismos del suelo, en este caso, los microorganismos del biofertilizante, aumentado su actividad, acelerando la circulación de nutrientes y la humedad del suelo, lo cual va de la mano con un aumento en la actividad enzimática, promoviendo el crecimiento de las raíces. Además, aumenta la porosidad total y la estabilidad de los agregados del suelo, reduciendo su dureza (Añez y Espinoza, 2002).

La falta de respuesta con respecto al resto de tratamientos sugiere una falla en la adaptación de las bacterias al suelo. La falta de crecimiento en las plantas testigo sugiere la presencia de estrés en las raíces por la falta de un agente facilitador de fósforo soluble (Corrales, 2007).

c) Diámetro del tallo

En el sustrato Tierra el incremento del diámetro de los tallos que alcanzó un máximo de 0.83 %, refleja un efecto positivo de los biofertilizantes sobre la evaluación de esta variable. El mejor tratamiento fue el denominado b1d1 (correspondiente al medio JCP en una dosis de 1.5 mL/L), esto pudo deberse al pH inicial del producto y a lo favorable que resulta esta condición para la solubilización del fósforo en el suelo. Los tallos correspondientes a todos los biofertilizantes superaron en diámetro a los correspondientes al testigo, lo que ratifica un efecto positivo de los biofertilizantes sobre las plantas de maíz. La compactación del suelo pudo ser un factor determinante para el normal desarrollo de las plantas, por ello estos resultados se deben contrastar con los obtenidos los otros dos sustratos.

En el sustrato denominado Tierra + Sustrato CIP, el tratamiento b0d0 (correspondiente al medio PKM en una dosis de 0.5 mL/L) fue el mejor, la falta de respuesta del tratamiento b2d1 puede deberse a que pese a que el sustrato poseía la porosidad necesaria, las bacterias del producto no lograron adaptarse a las nuevas condiciones.

En el sustrato CIP se encontró el mayor incremento en esta variable debido a la calidad y composición tanto física como nutricional del mismo. Se observó una diferencia notable entre el testigo y el mejor tratamiento, ratificando el efecto positivo de la inoculación de los biofertilizantes.

d) Peso seco

Según Roveda y Polo (2007), mayores niveles de fósforo disponible en el suelo incrementan el peso seco de la planta y promueven el crecimiento radical debido a las mayores tasas en el crecimiento de raíces centrales y laterales.

En el sustrato Tierra, el mejor tratamiento fue b2d2 (correspondiente al medio JCM en una dosis de 2.5 mL/L), todos los tratamientos superaron al testigo verificando la acción positiva de las bacterias sobre las plantas. Al comparar la concentración de fósforo soluble en la tierra remanente del ensayo con b2d2 y la del

testigo, se puede verificar la correcta acción de las bacterias puesto que la concentración de fósforo en el tratamiento b2d2 fue superior a la del testigo.

En el sustrato denominado Tierra + Sustrato CIP, la composición de éste influyó en el comportamiento de la variable, no se encontraron diferencias significativas en la acción de todos los biofertilizantes aplicados. Visiblemente hubo una diferenciación entre el tratamiento b1d1 (correspondiente al medio JCP en una dosis de 1.5 mL/L), el mejor del ensayo y el testigo, el resto de biofertilizantes no lo superó, esto sucede debido al alto contenido de humedad que presentaron las plantas de casi todos los tratamientos.

e) Porcentaje de materia seca

Como las plantas tienen una alta composición de agua y el nivel de agua en una planta depende de la cantidad de agua de su medio ambiente, se evaluó el porcentaje de materia seca para medir el crecimiento de las plantas de una manera más real dado que el fósforo es un elemento móvil y se lo puede encontrar acumulado en partes vegetativas hasta la floración (Zubillaga, 2005).

En el sustrato Tierra, el biofertilizante que mejor estimuló el porcentaje de materia seca fue el denominado b2d2 (correspondiente al medio JCM en una dosis de 2.5 mL/L), lo que implicó una mejor adaptación de las bacterias que componían este biofertilizante a las condiciones del suelo. La presencia de hojas púrpura en las plantas de maíz en este sustrato denota una deficiencia en la disponibilidad del fósforo o un exceso de compactación del suelo, lo que se traduce en una reducción de la materia seca de los cultivos, según lo explica Zubillaga (2005). Pero en el caso de este ensayo, la materia seca no disminuyó e inclusive fue superior a la presente en el otro sustrato evaluado, lo que verifica la acción positiva de las bacterias inoculadas.

En el sustrato Tierra + Sustrato CIP, la producción de materia seca en porcentaje se incrementó con la aplicación de la dosis de 1.5 mL/L de los biofertilizantes JCP y 0.5 mL/L de JCM, puesto que de la comparación entre dosis, estas resultan ser las más representativas. Aplicaciones de 0.5 mL (para JCP y PKM)

mostraron una tendencia a deprimir la materia seca. Este factor está directamente influenciado por el volumen radical y el de la parte aérea, así pues, el hecho del que el tratamiento testigo sobrepase la media del ensayo confirma el efecto benéfico que produce el sustrato elaborado por el CIP sobre todas las plantas del ensayo.

f) Porcentaje de humedad

Entre los efectos benéficos del uso de microorganismos como *Pseudomonas sp.* y *Azotobacter sp.* en las plantas, figura el mejoramiento en la disponibilidad de agua y el desarrollo de las mismas (Thuar, 2005).

Esto se observó en el ensayo en tierra al evaluar la cantidad de agua retenida en las plantas, pues esto es un reflejo de su alta disponibilidad y respuesta frente a la inoculación bacteriana. En este ensayo, la mayoría de tratamientos superó al testigo, aunque se encontró que no existieron diferencias entre los tratamientos, visiblemente, el mejor tratamiento lo constituyó el medio realizado a base de jugo puro de caña de azúcar en una dosis de 0.5 mL/L, esto pudo deberse a la adecuada adaptación de las bacterias que lo conforman al sustrato.

En el sustrato denominado Tierra + Sustrato CIP, el mejor tratamiento fue el químico, debido a proporcionó de una manera más fácil el fósforo y de acuerdo a González, et al., (2002), una respuesta favorable de las plantas a la cantidad de fósforo en el suelo tiene mucho que ver con la humedad aprovechable para las plantas. La porosidad brindada por la pomina jugó un papel muy importante en la movilización del agua y los nutrientes en la maceta para este ensayo.

g) Razón peso seco parte aérea/ peso seco parte radical

En el sustrato Tierra, se observó que la razón fue menor para la mayoría de medios al compararla con los tratamientos: b1d2 (correspondiente al medio JCP en una dosis de 2.5 mL/L), el testigo y el tratamiento químico. Esto implica un mayor crecimiento relativo de las raíces en relación a la parte aérea en las plantas, efecto

deseado de acuerdo a los reportes de biofertilizantes relacionados al crecimiento radical de las plantas.

En el sustrato denominado Tierra + Sustrato CIP, la razón fue menor para todos los tratamientos a excepción del testigo, evidenciando así el efecto estimulador del crecimiento radical por parte de los biofertilizantes. Pese a que no se encontraron diferencias significativas en su aplicación, de acuerdo a la Figura 3.32, el mejor tratamiento fue el elaborado a base de jugo de caña modificado, lo que favorece a la elección de este como medio alternativo.

4.6.2 Coloración de las hojas de las plantas correspondientes a cada tratamiento en tierra

Se encontraron hojas con coloración violácea o morada, solamente en las macetas correspondientes al ensayo con tierra. Esta coloración puede atribuirse a la deficiencia de fósforo en la planta ocasionada por la falta de absorción de este elemento o debido a la baja disponibilidad de este elemento en el suelo (Instituto de la potasa y el fósforo, 2008). La coloración morada se debe a la formación de antocianinas producidas por la falta de fósforo, elemento que interviene en las reacciones de formación de pentosas. Al no existir el fósforo necesario, los carbonos que forman dichos azúcares son desviados para formar antocianinas. Factores como el manejo de los cultivos y el clima pueden también afectar la apariencia de las plantas, algunos pueden ocasionar deficiencias temporales de este nutriente como es el caso de las condiciones del suelo como el exceso de humedad o la compactación (INPOFOS, 2008). Este último factor fue el que incidió en la aparición de hojas color morado en este ensayo, puesto que el sustrato utilizado correspondió a tierra procedente de las inmediaciones del CIP, la misma que presentó una característica compacta después de ser esterilizada. Las características del suelo influyeron mucho en el desempeño del ensayo puesto que el maíz es un cultivo muy exigente (Faiguenbaum, 2008).

La presencia de una coloración violácea o morada en las hojas se atribuye a la calidad de la tierra en la que las plantas fueron sembradas puesto que, de las plantas

realizadas en el ensayo donde se utilizó otro tipo de sustrato no se encontró ninguna con coloración morada en sus hojas (INPOFOS, 2008).

4.7 Análisis del contenido de P soluble en agua en la tierra

El ensayo se realizó con base en los análisis químicos efectuados a la tierra con referencia al fósforo soluble, así se conoció si la concentración varió con el tiempo, de manera similar al ensayo realizado por Fankem, et al., (2008), quien evaluó la cantidad de fósforo soluble en un ensayo con *Pseudomonas sp.* en laboratorio durante siete días y se encontró que las bacterias utilizadas convirtieron efectivamente el fosfato insoluble a una forma soluble. Lo mismo sucedió en el ensayo de invernadero realizado en tierra correspondiente a esta investigación, iniciando con su análisis previo y terminando con el análisis de cada tratamiento por maceta para conocer si el fósforo soluble había aumentado o disminuido al compararlo con el testigo.

En la tierra correspondiente a los tratamientos b0d1 (biofertilizante elaborado con el medio PKM en una concentración de 1.5 mL/L) y b1d0 (biofertilizante elaborado con el medio JCP en una concentración de 0.5 mL/L), se presentó un aumento en la concentración de fósforo soluble, lo que puede ser atribuido a la acción efectiva de las bacterias solubilizadoras de fósforo.

La concentración en los demás tratamientos varió desde un mínimo de 0.9 ppm a un máximo de 8.9 ppm, valores diferentes a los del testigo, esto significa que las bacterias utilizadas convirtieron de manera eficaz el fosfato insoluble a una forma soluble, tal como lo afirma Fankem, et al. (2008) en su investigación. La razón por la cual la tierra correspondiente a la maceta del tratamiento b2d1 (biofertilizante elaborado con el medio JCM en una concentración de 1.5 mL/L) presentó una menor concentración de fósforo soluble pudo deberse a la alta demanda de este elemento por parte de la planta, o la falta de acoplamiento al medio de la rizosfera por parte de las bacterias solubilizadoras de fósforo. Se descarta una variación en la eficiencia de absorción de P por diferentes especies o por cultivares de una misma especie

atribuidos a diferentes mecanismos para captar y utilizar el fósforo del suelo debido a que se utilizaron semillas certificadas de la misma especie.

Por otra parte, la concentración del fósforo soluble en la tierra correspondiente al tratamiento químico superó a la del testigo, esto se debe a que fue inoculada con un fertilizante fosforado, permitiendo a la planta satisfacer sus necesidades de manera eficiente e incluso dejando una concentración considerable de fósforo soluble natural en el suelo sobrante.

4.8 Sobrevivencia de los biofertilizantes

El biofertilizante realizado con el medio PKM presentó la mayor concentración bacteriana al finalizar los tres períodos de evaluación, esto pudo deberse a la alta concentración inicial de su inóculo y a la composición química del medio, el cual proporciona a las bacterias una fuente fosfatada, carbohidratos, aminoácidos y macronutrientes esenciales para la sobrevivencia bacteriana. El conteo bacteriano final en el medio JCP disminuyó notablemente, lo que puede atribuirse a la naturaleza especial del jugo de caña dada por su elevada concentración de azúcares totales y reductores. El medio JCM proporcionó mejores condiciones para la sobrevivencia puesto que este poseía una fuente de nutrientes natural y otra química dada por los componentes añadidos.

Con respecto a los períodos de evaluación, se observó que conforme transcurre el tiempo de almacenamiento en congelación, la concentración bacteriana disminuye, esto se debió a cambios en el metabolismo bacteriano que muchas veces las llevan a la muerte, posiblemente debido al agotamiento de los nutrientes propios de los medios de cultivo, a efectos ambientales como la variación de la temperatura o a la acumulación de metabolitos producidos por las bacterias, los cuales pueden inhibir el crecimiento bacteriano en los medios, disminuyendo la concentración bacteriana final (Tabla 3.52).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

- La concentración de biomasa alcanzada por los tres biofertilizantes: PKM, JCP y JCM producidos fue de: 6.31×10^{12} UFC/mL, 6.9×10^8 UFC/mL y 6.76×10^8 UFC/mL, respectivamente, considerándose concentraciones óptimas para su uso como inóculos.
- Los tres biofertilizantes: PKM, JCP y JCM, alcanzaron la mayor concentración bacteriana en la fase exponencial a escala 1 L después un tiempo de: 15, 18 y 24 horas de cultivo respectivamente; mientras que en la fase de producción a escala 10 L, estos alcanzaron la mayor concentración bacteriana después un tiempo de: 18, 18 y 21 horas respectivamente.
- El escalado del proceso de producción del biofertilizante a 10 L se manifestó en el aumento en la concentración bacteriana final en los medios PKM y JCM, no así en el JCP.
- El caldo de cultivo alternativo más adecuado que constituye una buena alternativa para la producción masiva de un biofertilizante, de acuerdo a la concentración bacteriana final alcanzada, a los costos de producción y, al ensayo de invernadero, es el jugo de caña, aunque su sobrevivencia no sobrepasa los dos meses después del envasado.
- En la prueba de invernadero realizada el mejor sustrato fue el denominado Sustrato CIP.
- La sobrevivencia de los biofertilizantes preparados con los medios: PKM y JCM sobrepasó los tres meses después del envasado, con una concentración final superior al orden de 10^8 UFC/mL establecido para inoculantes biológicos, lo que nos permite afirmar que su tiempo de vida útil puede ser superior a este período siempre y cuando se los conserve en recipientes herméticos y en refrigeración.

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES

- Para un mejor seguimiento de la ruta del fósforo disuelto que se considera realmente disponible para la planta, se recomienda realizar un control por medio de un marcador fluorescente para determinar la fracción del fósforo extraído por medio de técnicas isotópicas.
- Realizar un ensayo de invernadero con una mayor duración, con el fin de establecer la influencia de la cantidad de fósforo absorbida en la calidad del grano de maíz.
- Realizar investigaciones posteriores complementarias en las cuales se evalúe la actividad de la enzima fosfatasa ácida liberada por las raíces y estimulada por la presencia de las bacterias solubilizadoras de fósforo.
- Continuar con la investigación y búsqueda de nuevos microorganismos de géneros y especies diferentes relacionados a la estimulación del crecimiento vegetal.

CAPÍTULO VII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aello, M., Di Marco, O., Arias, S., Chicatún, A. & Lee, S. (2003). Composición morfológica de la planta de maíz y degradabilidad ruminal de hojas y tallos. Unidad Integrada Balcarce: Facultad de Ciencias Agrarias. Extraído el 16 de Agosto, 2008, del sitio Web del Instituto Nacional de tecnología Agropecuaria: <http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/posters/22/posteraello1bis.htm>

Altamirano, M. & Pozzo, M. (2000). Aislamiento e identificación de bacterias hidrocarburoclíticas provenientes de un suelo sometido a biorremediación. XXVII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. 17-17 Extraído el 16 de Abril, 2008, de: <http://www.cepis.org.pe/bvsaidis/resisoli/iii-131.pdf>.

Angulo, I. (2007). Crisis alimentaria mundial. 24-32.. Extraído el 10 de Abril, 2008, de: <http://www.fao.org/ec/archivos/cafolis/Crisis%20Alimentaria%20Mundial%20FAO.pdf>.

Añez, B & Espinoza, W. (2002). Fertilización química y orgánica. ¿Efectos interactivos o independientes sobre la producción de zanahoria? Revista Forestal Venezolana. [Versión Electrónica] Vol 2 - Número 46.

Azofeifa, A., Moreira, M. (2005). Absorción y distribución de nutrimentos en plantas de chile dulce (*Capsicum Nahum cv .UCR 589*) en Alajuela, Costa Rica. Revista Agronomía Costarricense. [Versión electrónica]. Enero-junio año/ vol 29, número 001. Pp. 77-84.

Bashan, Y. & Levanony, H. (1993). Current Status of *Azospirillum* inoculation technology. *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Canadian Journal of Microbiology. [Versión electrónica], 36:591-608.

Boonkerd, N. (2000). Biofertilizer Development. ThaiScience. [Versión electrónica], (23) 113-116.

Bravo, G. (2001, Enero 20) Semillas certificadas están respondiendo. La Prensa, p. B23.

Brock, T., Smith, D & Madigan, M. (2001). Microbiología (pp 330-907). USA. Editorial Prentice- Hall Hispanoamericana. Octava edición.

Carcaño, M. (2007). Microbiología de Suelos. Periódico digital. [Versión electrónica]. E-mail disponible: mgcarca@siu.buap.mx.

Corrales, I., Amenos, M., Poschenrieder, C., & Barcelo, J. (2007). "Phosphorus efficiency and root exudates in two contrasting tropical maize varieties". Journal of Plant Nutrition. [Versión electrónica].30 (4-6): 887-900.

Cuberos, L., Gómez, E., Cordero M, García, A & Pachón, J. (1998). Infecciones por *Pseudomonas spp.* Revista de pediatría.. 6 (2), 70-71. Resumen extraído el 12 de Junio del 2008, del sitio Web de la Sociedad española de pediatría extrahospitalaria y atención primaria: www.sepeap.es/libros/MEDICINE98/Artikulu/m7808.pdf

Dahal, R. (1977). Soil organic phosphorus. Advances in Agronomy. [Versión electrónica]. Volumen 28.

Echeverría, C. Producción de biofertilizante a partir de cepas autóctonas de *Azotobacter spp.*, mediante fermentación discontinua en caldo Pikovskaya modificado y caldo alternativo a escala diez litros. Tesis de Ingeniería en Biotecnología, Escuela Politécnica del Ejército (2007).

Faiguenbaum, H. (2008) Siembra y establecimiento del cultivo de maíz. Red Agrícola Edición N° 22. Extraído el 10 de Junio del 2008 de: <http://www.redagricola.com/content/view/251/49/>

Fangio M., Iurlina, O. y Fritz, R. (2007). Actividad antimicrobiana de mieles del sudeste de la provincia de Buenos Aires frente a *Escherichia coli*. Revista Argentina de Microbiología. [Versión electrónica], ISSN 0325-7541. E-mail disponible: rfritz@mdp.edu.ar.

Fankem, H., Ngo, L., Deubel, A., Quinn, J., Merbach, W., Etoa, F. & Nwaga, D. (2008). Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by strains of *Pseudomonas fluorescens* isolated from acidic soils of Cameroon. African Journal of Microbiology Research. [Versión Electrónica]. Vol. (2) pp. 171-178. ISSN 1996-0808.

Fernández, M. (1984). "Fertilización biológica en suelos calizos. Solubilización de fósforo mineral con cepas *Bacillus cereus*". Revista del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. [Versión Electrónica]. Vol. (1) pp. 73-75.

Fernández, L., Zalba, P. & Gómez, M. (2005). Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. Ciencias del Suelo. [Versión electrónica]. Ene./jul. 2005, vol.23, no.1, p.31-37.

Ferraris, G., & Couretot, L. (2006). Evaluación de la utilización de bacterias solubilizadoras de fósforo (*Pseudomonas spp*) en Trigo. 48, 45-55. Extraído el 20 de Julio del 2008, de: <http://www.elsitioagricola.com/articulos/ferraris/Evaluacion%20de%20la%20Utilizacion%20de%20Bacterias%20Solubilizadoras%20de%20fosforo%20en%20trigo.asp>

Fixen, P. (2003). Dinámica del fósforo en el suelo y en el cultivo en relación al manejo de los fertilizantes fosfatados. Extraído el 22 de julio del 2008 de: <http://www.inpofos.org/ppiweb/ltamn.nsf/htm>.

Gaitán, I., E. García. (1998). Prueba a nivel de campo y escalado a planta piloto del proceso de producción de biofertilizante. [Versión Electrónica], 18-23. <http://www.monografias.com/trabajos13/biofer/biofer.shtml>.

Gamazo, C., López-Goñi, I. & Díaz, R. (2005). Manual práctico de Microbiología. España: Elsevier.

García, G. 2006. Los alimentos y la nutrición. Ecología. [Versión Electrónica]. <http://vivirenarmonia.wetpaint.com/page/los+alimentos+y+la+nutrici%C3%93N?t=anon>.

Giménez, I. (1991). Ensayos sobre la translocación en plantas de fungicidas sistémicos. Sanidad Vegetal, Plagas. [Versión Electrónica], 17, 497-518.

Goendi, D., Saraswati, J., Adiningsih. (1995). Nutrient- solubilizing and aggeragte-stabilizing microbes isolated from selected humid tropical soil. Menara-Perkebunan. [Versión Electrónica], 63(2):60-66.

González, G. (2006). Efecto Solubilizador del Fósforo del Suelo y de los Fertilizantes. Inoculación Bacteriana en el cultivo de Maíz. Extraído el 10 de junio, 2008, de:http://www.rizobacter.com.ar/home/es/informes_tecnicos/index.php?subaction=showfull&id=1152819488&archive=&start_from=&ucat=3&bubaction=showfull

González, G. (2008). Rizofos Liq Trigo. Bacterias Solubilizadoras de Fósforo. Características, Propiedades, Resultados Experimentales. Extraído el 10 de junio, 2008, de

http://www.rizobacter.com.ar/home/es/informes_tecnicos/index.php?subaction=showfull&id=1208983178&archive=&start_from=&ucat=3&bubaction=showfull

González, D., & Varea, R. (2006). Apuntes de Espectroscopia. Auxiliares de Laboratorio. [Versión Electrónica], pp. 28-30.

González, D., Núñez, R., Ruiz, J. & Turrent, A. (2002). Procedimientos para predecir la respuesta del maíz a Fósforo en condiciones de secano. Revista Chapingo. [Versión Electrónica] 20,4,471-483.

Gyaneshwar P, Naresh G & Parekh J. (1998). Effect of buffering on the phosphate-solubilizing ability of microorganisms. World J. Microbiology and Biotechnology. [Versión Electrónica], 14:669-673.

Hedley, M., Kirk, G., & Santos, M. (1994). Phosphorus utilized by upland rice cultivar. Plant and Soil. [Versión Electrónica], 158: 53-62.

Hernández, A., Fernández, A & Hernández, A. (1998). Identificación de cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas cepacia* aisladas de la rizosfera del maíz. Cultivos Tropicales. [Versión Electrónica], 19(1):5-8.

Huilcapi, J. Aislamiento e identificación de bacteria 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).

Hyland, C., et al. (2005). Phosphorus Basics – The Phosphorus Cycle. Agronomy Fact Series. Resumen extraído el 13 de Julio, 2007 de <http://nmsp.css.cornell.edu/publications/factsheets/factsheet12.pdf>

Instituto de la potasa y el fósforo (INPOFOS). (2008). Conozca la Deficiencia de fósforo. Revista del instituto nacional de nutrición vegetal. [Versión Electrónica], 439- 448.

Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). (2008) Producción de Semillas. Extraído el 18 de Mayo, 2008 de: http://www.iniap-ecuador.gov.ec/direccion_produccion.php.

Ishikawa, S., Adu-Gyamfi, J., Nakamura, T., Yoshihara, T., Watanabe, T. & Wagatsuma, T. (2000). Genotypic variability in phosphorus solubilizing activity of root exudates by pigeonpea grown in low – nutrient environments. [Versión Electrónica], 134-136.

Lafitte, H. (2001). Producción y protección vegetal. El maíz en los trópicos. Mejoramiento y producción, FAO. [Versión Electrónica], ISBN: 9253044578. X7650/S.

Lloclla, H. & A. Dávila. (2005). Consorcio microbiano solubilizadores de fósforo aislados de suelos agrícolas. Extraído el 12 de Noviembre, 2007, del sitio web de la red mundial de científicos peruanos: www.rmcp-peru.org/IICICP/ba/002/index.html

Mateos, P. (2007). Biotecnología y organismos transgénicos. Tipos de fermentadores. Extraído el 23 de Abril 23, 2008, del sitio Web de la Universidad de Salamanca: <http://nostoc.usal.es/sefin/MI/tema12MI.html>

Mateos, P. (2005). Crecimiento Bacteriano. Extraído el 12 Noviembre, 2007, del sitio Web de la Universidad de Salamanca: <http://coli.usal.es/web/educativo/micro2/tema07.html>

Matheus, J. (2004). Evaluación agronómica del uso de compost de residuos de la industria azucarera (biofertilizante) en el cultivo de maíz (*Zea mays L.*). Revista Bioagro v.16 n.3. [Versión Electrónica], 1316-3361.

Mayak S., Tirosh T. & Glick B. (2004). Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. Plant Physiology and Biochemistry. [Versión Electrónica], 42: 565-572.

Mikkelsen, R. (2005). A closer look at phosphorus uptake by plants. Potash and Phosphate Institute Journey. [Versión Electrónica], 378- 390.

Ministerio de Agricultura del Perú (MINIAGP). (2000). Reglamento Técnico Aprobado para los Productos Orgánicos por resolución N° 0078-2003-AG. Extraído el 16 Noviembre, 2007, del sitio Web de Perú Rural: www.biofag.org.ar/actividades/talleres/AbstractTaller2005.pdf.

Morales, J. (2003). Invernaderos. Infojardín. [Versión Electrónica], 1-5.

Moral, I. (2006). Modelos de regresión: lineal simple y regresión logística. Revista Edén. [Versión Electrónica] (20), 14-20.

Murty, G. & Ladha , K. (1988). Influence of Azospirillum inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. Plant Soil. [Versión Electrónica], 108:281-285.

Navarro, M. (2007). Manual de prácticas de suelos y fertilizantes. Extraído el 6 de Junio, 2008, del sitio Web del Colegio de Bachilleres del estado de Sonora: <http://www.cobachsonora.edu.mx:8080/wb3/work/sites/COBACH/resources/LocalContent/82/2/Suelos%20y%20fertilizantes.%20Manual%20de%20practicas.pdf>

Pan, B., Bai, Y., Leibovitch, S., & Smith, D. (1999). Plant growth promoting rhizobacteria and kinetin as ways to promote corn growth and yield in a short-growing-season area. European Journal of Agronomy. [Versión Electrónica], 11: 179-186.

Padilla, E., Esqueda, M., Sánchez, A., Troncoso, R. & Sánchez, A. (2006). Efecto de Biofertilizantes en Cultivo de Melón Acolchado con Polietileno. Revista Fitotecnia Mexicana. [Versión Electrónica], 29-40.

Pérez, C. (1997). Producción de biofertilizante a partir de *Azotobacter chroococcum*. Universidad Nacional de Ingeniería. Managua, Nicaragua. [Versión Electrónica]. E-mail disponible: rvelia@una.edu.ni

Perticari, A. (2005). Uso de biofertilizantes. Inoculación y fijación biológica de nitrógeno en el cultivo de soja. IMYZA INTA. [Versión electrónica]. E-mail disponible: aperticari@cni.inta.gov.ar.

Placencia, M & Ruiz, M. (2006). Caracterización y Bioaumentación de cepas de *Pseudomonas* nativas obtenidas de suelos biorremediados con técnicas de landfarming y biopilas para optimizar el rendimiento del proceso de degradación de hidrocarburos en suelos del campamento CPF (Central Production Facilities) AGIP Oil Ecuador Bloque 10. Quito. Escuela de Bioanálisis PUCE.

Prescott, L.M., Harley, J.P. & Klein, D.A. (2004). Microbiología. España. Mc Graw-Hill/ Interamericana. 5ta. Edición.

Reilly, J., Trutmann, P., & Rueda, A. (2002) Guía Salud de Suelos. Manual para el cuidado de la salud de suelos. Universidad de Cornell y Zamorano. Extraído del sitio Web de la Plataforma Latinoamericana de Gestion de Conocimientos: http://www.asocam.org/biblioteca/57_1.doc.

Reyes, I. (1991). Dinámica del fósforo y aislamiento de algunos microorganismos en la mezcla pulpa de café-roca fosfórica. San Cristóbal. Venezuela. Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Experimental del Táchira. [Versión Electrónica], 17:397-408. 1991.

Rodas, A. (2006). La Agricultura y Microorganismos. Revista electrónica Engormix. [Versión Electrónica], 13-27.

Roveda, G., Polo, C. (2007). Mecanismos de adaptación de maíz asociado a *Glomus spp.* en suelos con bajo fósforo disponible. Revista Agronomía colombiana ISSN 0120-9965. [Versión Electrónica], v.25 n.2.

Rubio, G. (2002). Conectando el fósforo del suelo con la planta. Revista digital del Instituto Internacional de Nutricion Vegetal. [Versión Electrónica], 44-53. E-mail disponible: rubio@agro.uba.ar

Sánchez, L. & Corrales, L. (2005). Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. Nova Publicación Científica. [Versión Electrónica], 1-116. E- mail disponible: lcorralesr@unicolmayor.edu.co

Santillana, N. (2006). Producción de biofertilizantes utilizando *Pseudomonas* sp. biofertilizers production using *pseudomonas* sp. Ecología Aplicada ISSN 1726-2216. [Versión Electrónica], 5(1,2), (87-91).

Smith, M. (2000). Guía del cultivo de maíz. Extraído el 27 de Julio, del sitio Web de la de San Luis Hills Farm: <http://www.slhfarm.com/maizguia.html>.

Subba-Rao, N. (1999). Microbiología del suelo. Publicaciones científicas. 38-41.

Trevan, M., Boffe, S., Goulding, H., Stabury, P. (1998). Biología. Principios Biológicos. Zaragoza, España. Editorial Acribia, S.A.

Thuar, A. (2005). Evaluación de la Producción en un Cultivo de Maíz Inoculado con *Pseudomonas* sp. y Diferentes Dosis de Fertilizantes a Campo. Resumen extraído el 13 de Junio del 2008, del sitio Web de Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Agronomía y Veterinaria: http://www.rizobacter.com.ar/home/es/informes_tecnicos/index.php?subaction=showfull&id=1152900919&archive=&start_from=&ucat=3&

Kirkman, T.W. (1996). WAPP: Fit to data with y-errors. Extraído el 27 de Enero, 2008 del sitio Web de la Universidad de Saint John: http://www.physics.csbsju.edu/stats/chi_fit.html

Vera, R. (2007). Cultivan pese a presencia de virus. Extraído el 14 de Noviembre, 2007, de <http://www.eldiario.com.ec/noticias-manabi-ecuador/45182>

Weng, Z., Díaz, R., & Álvarez, I. (2005). Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer? . Comunicación breve Instituto Nacional de Higiene,

Epidemiología y Microbiología. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología ISSN 1561-3003. [Versión electrónica] v.43 n.3.

Zaid, A, et al. (2004). Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación. Roma. Extraído el 12 de Mayo del 2008, del sitio Web de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación: http://www.fao.org/biotech/index_glossary.asp

Zubillaga, M. (2005). Cátedra de Fertilidad y Fertilizantes. Resumen extraído el 12 de Abril del 2008, del sitio Web del buscador Fertilizando: <http://www.fertilizando.com/articulos/Manejo%20del%20Fosforo%20en%20Maiz.as>

p