



**ESPE**  
**UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS**  
**INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA  
AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA  
TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

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

**AUTOR: CARTUCHE CUVI, PAMELA ESTEFANÍA**

**DIRECTOR: KOCH ALMA, MSc.**

**SANGOLQUÍ**

**2016**

# CERTIFICACIÓN

## CERTIFICACIÓN



Alma Rosel Koch Kaiser, MSc.

### Certifica:

Que el trabajo titulado **“Obtención de un inoculante bacteriano a partir de microorganismos solubilizadores de hierro aislados del suelo de Cultivos de Banano en la provincia de El Oro – Ecuador.”** realizado por la Srta. PAMELA ESTEFANÍA CARTUCHE CUVI como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple con las normas estatutarias establecidas por la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, en el Reglamento de Estudiantes.

El mencionado trabajo, consta de un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a Pamela Estefanía Cartuche Cuvi que lo entregue al Dr. Rodrigo Ávalos, en su calidad de Coordinador de la Carrera.

Sangolquí, agosto 2016.

---

Alma Rosel Koch Kaiser, MSc

DIRECTORA

## DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD



**ESPE** DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Pamela Estefanía Cartuche Cuvi

Declaro que:

El proyecto denominado **“Obtención de un inoculante bacteriano a partir de microorganismos solubilizadores de hierro aislados del suelo de Cultivos de Banano en la provincia de El Oro – Ecuador.”** ha sido desarrollado en base a una investigación científica exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente, este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, agosto 2016.

Pamela Estefanía Cartuche Cuvi

## AUTORIZACIÓN



### AUTORIZACIÓN

Yo, Pamela Estefanía Cartuche Cuvi

Autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, la publicación en la biblioteca virtual de la institución, de la **“Obtención de un inoculante bacteriano a partir de microorganismos solubilizadores de hierro aislados del suelo de Cultivos de Banano en la provincia de El Oro – Ecuador.”**, cuyos contenidos y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, agosto 2016.

Pamela Estefanía Cartuche Cuvi

## **DEDICATORIA**

A Dios quien es mi fuerza y luz, a mis padres Leonardo Cartuche y Magdalena Cuvi, quienes me apoyan en cada momento y son ejemplo de perseverancia y amor, a mis hermanos David y Sebastián por empujarme a avanzar en mis estudios y trabajo.

**Pamela Estefanía Cartuche Cuvi**

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, por darme una educación de excelencia.

Al Laboratorio Agrodiagnostico S.A, quienes financiaron la investigación, a la MSc. Karla Garcés, quien brindo sus conocimientos para el desarrollo del proyecto, a la Ing. Gabriela Arregui por su apoyo y guía.

A la MSc. Alma Koch, quien me brindó su ayuda para la orientación del presente proyecto de investigación.

A mi familia por acompañarme a lo largo de mi carrera universitaria, a IYF Ecuador por darme una mentalidad diferente para llevar los estudios junto con el trabajo, a Laboratorios Ecu- american por brindarme una oportunidad de desempeñarme profesionalmente.

A mis amigos, Sami, Andrea, Lady, Michu, Evy, Cris y Galito, por estar a mi lado apoyándome durante el transcurso de ésta investigación.

A Loidita Leyva quien me empujó a concluir mi proyecto de graduación y me motivó a seguir adelante en la microbiología.

**Pamela Estefanía Cartuche Cuvi**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD .....	iii
AUTORIZACIÓN .....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
<b>1    CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1    Formulación del problema .....	1
1.2    Justificación.....	2
1.3    Objetivos de la investigación.....	3
1.3.1    Objetivo general .....	3
1.3.2    Objetivos específicos.....	3
1.4    Marco teórico .....	3
1.4.1    Importancia del hierro en el suelo.....	3
1.4.2    El hierro en el sistema suelo – planta.....	4
1.4.3    Toxicidad por hierro.....	6
1.4.4    Características del suelo en la provincia de El Oro .....	7
1.4.5    Transformaciones mediadas por microorganismos.....	8
1.4.5.1    Movilización de metales: Biolixiviación .....	8
1.4.5.2    Inmovilización de metales .....	9
1.4.6    Microorganismos solubilizadores de hierro.....	9
1.4.7    Medios de cultivo para el aislamiento de microorganismos solubilizadores de hierro .....	11
1.4.7.1    Nutrientes .....	11
1.4.7.2    pH.....	13
1.4.7.3    Temperatura .....	13
1.4.7.4    Fuente de Carbono .....	13
1.4.7.5    Flujo de O <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub> .....	13
1.4.8    Inoculantes bacterianos .....	14
1.4.9    Curva de crecimiento microbiano .....	15
1.4.9.1    Método turbidimétrico para determinar la curva de crecimiento microbiano.....	16

1.4.10	Banano ( <i>Musa paradisiaca</i> ).....	17
1.4.10.1	Características botánicas.....	17
1.4.10.2	Cultivo de banano.....	17
1.4.10.3	Importancia económica.....	18
1.5	Hipótesis.....	19
<b>CAPÍTULO II</b> .....		<b>20</b>
2.1	Participantes.....	20
2.2	Periodo de la investigación.....	20
2.3	Fase de campo.....	20
2.3.1	Zona de estudio.....	20
2.3.2	Recolección de muestras en suelo de cultivo de banano.....	20
2.4	Fase de laboratorio.....	21
2.4.1	Modificación de medio específico.....	21
2.4.2	Procesamiento de las muestras.....	21
2.4.3	Aislamiento de microorganismos.....	22
2.4.4	Identificación macroscópica de las colonias aisladas.....	22
2.4.5	Identificación microscópica de las colonias aisladas.....	23
2.4.6	Aislamiento en cultivo puro.....	23
2.4.7	Establecimiento de ceparios.....	24
2.4.8	Pruebas de antagonismo.....	24
2.4.9	Identificación bioquímica.....	25
2.5	Producción del inoculante a escala de laboratorio.....	26
2.5.1	Reactivación de las cepas bacterianas.....	26
2.5.2	Preparación del pre-inóculo.....	26
2.5.3	Preparación del inóculo y fermentación discontinua.....	26
2.5.4	Crecimiento microbiano.....	26
2.5.5	Curvas de crecimiento.....	27
2.6	Análisis de datos.....	27
2.7	Diagrama de flujo del proyecto.....	27
<b>CAPÍTULO III RESULTADOS</b> .....		<b>48</b>
3.1	Recolección de muestras de suelo de cultivo de banano.....	48
3.2	Aislamiento de microorganismos solubilizadores de hierro en medio específico.....	48
3.3	Características microscópicas.....	50
3.4	Antagonismo.....	51
3.5	Pruebas Bioquímicas.....	52



<b>3.6 Escalamiento.....</b>	<b>55</b>
<b>CAPÍTULO IV DISCUSIÓN .....</b>	<b>59</b>
<b>CAPÍTULO V CONCLUSIONES .....</b>	<b>64</b>
<b>CAPÍTULO VI RECOMENDACIONES .....</b>	<b>65</b>
<b>CAPÍTULO VII BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>66</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>72</b>

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación general de los suelos del litoral ecuatoriano.....	7
<b>Tabla 2.</b> Composición de medios de cultivo utilizados para Biolixiviación de hierro.....	11
<b>Tabla 3.</b> Composición del medio Pikovskaya modificado.....	12
<b>Tabla 4.</b> Requerimientos agroecológicos para la Planta de Banano. MAGAP, Zonificación agroecológica del cultivo del banano en el Ecuador.....	18
<b>Tabla 5.</b> Requerimientos nutricionales modificados en base a medio Pikovskaya y medio 9K para microorganismos solubilizadores de hierro.....	21
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de cepas asiladas según su color de crecimiento en medio Pikovskaya modificado para hierro.....	48
<b>Tabla 7.</b> Análisis de varianza.....	51
<b>Tabla 8.</b> Test de Duncan al 5%, pruebas de antagonismo.....	52
<b>Tabla 9.</b> Resultado de las pruebas bioquímicas.....	53
<b>Tabla 10.</b> Parámetros cinéticos de la fase exponencial.....	57

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo del hierro en el suelo.....	5
<b>Figura 2.</b> Fases de la cinética de crecimiento microbiano.....	16
<b>Figura 3.</b> Procesamiento de muestra de suelo de cultivo de banano.....	22
<b>Figura 4.</b> Aislamiento de cepa suspendida en caldo nutritivo en medio agar nutritivo.....	24
<b>Figura 5.</b> Esquema de pruebas de antagonismo para cepas seleccionadas.....	25
<b>Figura 6.</b> Observación de bacterias solubilizadoras de hierro en medio Pikovskaya modificado para hierro.....	49
<b>Figura 7.</b> Viraje del medio Pikovskaya modificado de verde a amarillo.....	49
<b>Figura 8.</b> Observación microscópica de bacilos Gram negativos no esporulados aislados en agar nutritivo (100x).....	50
<b>Figura 9.</b> Halos de inhibición en medio agar nutritivo.....	51
<b>Figura 10.</b> Resultado de las pruebas bioquímicas de <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> .....	54
<b>Figura 11.</b> Observación del viraje del medio a las 36 horas.....	55
<b>Figura 12.</b> Observación de las curvas de crecimiento bacteriano de los tres ensayos realizados, número de bacterias vs tiempo.....	56
<b>Figura 13.</b> Línea de tendencia para <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> en la fase de crecimiento exponencial... ..	57
<b>Figura 14.</b> Curva de pH vs tiempo en el transcurso de 72 h de incubación.....	57
<b>Figura 15.</b> Curva de pH vs temperatura en el transcurso de 72 h de incubación.....	58

## LISTADO DE ANEXOS

<b>ANEXO A:</b> Cepas de <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> que conforman el inoculante bacteriano.....	72
<b>ANEXO B:</b> Equipos utilizados durante la fase de escalamiento del inoculante bacteriano.....	73
<b>ANEXO C:</b> Ensamblaje del proceso de fermentación a escala de laboratorio.....	73

## RESUMEN

El sector bananero en el Ecuador tiene gran importancia económica al ser el primer producto de exportación del país por su alta calidad, sin embargo los cultivos de banano en el sector de Borbones, en la provincia de El Oro, presentan problemas por exceso de hierro en la composición del suelo, en forma de óxidos de hierro (hematita) producto de los procesos de meteorización y residuos de uso agrícola (Medina, 2006). El objetivo fue elaborar un inoculante bacteriano mediante el aislamiento e identificación de cepas solubilizadoras de hierro. Se modificó el medio Pikovskaya en base a los requerimientos del medio selectivo 9K, el cual permitió el crecimiento bacteriano en menor tiempo. Se aislaron 20 cepas solubilizadoras de hierro, que al ser sometidas a pruebas de antagonismo. Presentaron compatibilidad 12 de ellas con una alta significancia estadística y un halo menor a 5 mm. Las cepas con antagonismo negativo fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas, cinco pertenecieron al género *Thiobacillus ferrooxidans* y tres al género *Thiobacillus thiooxidans*. Fue descartada una cepa patógena. Las cepas de *Thiobacillus ferrooxidans* fueron seleccionadas por su gran potencial de solubilización de hierro. Se realizó un pre –inóculo con las cinco cepas seleccionadas que fue llevado a escalamiento mediante fermentación discontinua a un volumen de 1 L durante 72 h, donde se obtuvo una mayor concentración microbiana de 110 g/L a las 66 h, se confirmó que a un pH ácido tienen un mejor desarrollo.

### Palabras Clave:

- **HIERRO**
- *Thiobacillus ferrooxidans*
- **SOLUBILIZACIÓN**
- **SUELO**
- **BANANO**

## ABSTRACT

The banana sector in Ecuador has great economic importance by being the first export product of the country for its high quality, however crops sector Bourbons, in the province of El Oro, they have problems of excess iron in the composition soil, as iron oxides (hematite) product of weathering processes and waste agricultural use (Medina, 2006). The purpose was to develop a bacterial inoculant through isolation and identification of solubilizing strains of iron. The medium Pikovskaya was modified based in the requirements of selective medium 9K, which allowed bacteria growth in less time. Twenty solubilizing strains of iron were isolated, that at be subjected to tested of antagonism. Compatibility presented 12 of them with high statistical significance and a halo below 5 mm. Strains with negative antagonism were identified by biochemical tests, five belonged to the genus *Thiobacillus ferrooxidans*, three to the genus *Thiobacillus thiooxidans*. Was discarded one pathogenic strain. Strains of *Thiobacillus ferrooxidans* were selected for their great potential of iron solubilization. The pre - inoculum was performed with five selected strains, it was carried scaling by discontinuos fermentation at a volume of 1 L for 72 h, where was obtained a higher microbial concentration of 110 g / L at 66 h, it was confirmed that an acid pH have a better development.

### Keywords:

- IRON
- *Thiobacillus ferrooxidans*
- SOIL
- BANANA

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Formulación del problema

Según el Centro de Comercio Internacional (ITC) (2015), el Ecuador se encuentra como el mayor exportador de banano en volumen y en valor monetario, por su calidad y sabor, siendo cotizado en los grandes mercados de Europa, Asia y América del Norte. Es el primer producto de exportación del sector privado del país y uno de los principales contribuyentes al fisco (ProEcuador, 2013).

Sin embargo, a pesar de ser el mayor exportador de calidad del mundo, cada vez el mercado exige que el banano sea orgánico, pero para ello debe obtener la certificación de serlo, lo cual se dificulta debido al uso de agroquímicos (ProEcuador, 2013).

Para mejorar dichos cultivos en la provincia de El Oro, se han utilizado productos químicos sintéticos, como fertilizantes y plaguicidas creando problemas degradativos en los suelos y a su vez en la planta, además de que el hierro natural en el suelo debido a los procesos de meteorización se ha incrementado excesivamente en la rizosfera de la zona litoral (Medina, 2006).

Por tal motivo, el propósito de esta investigación es aislar e identificar cepas bacterianas capaces de solubilizar el hierro presente en el suelo que bloquea el paso de nutrientes hacia la planta, creando toxicidad en el vegetal.

De esta forma, se obtendrán microorganismos capaces de realizar tal desbloqueo, los cuales podrán ser utilizadas en la producción de un inoculante, así se promoverá el uso de inoculantes biotecnológicos, que garanticen cultivos más orgánicos, y puedan ser una valiosa herramienta para el sector agrícola e industrial, de la provincia de El Oro y del Ecuador.

## 1.2 Justificación

El banano depende de varios elementos para su crecimiento y producción, uno de ellos es el suelo como factor externo, debido a que el desarrollo de la raíz es fundamental para la planta. Según Hardy (1970), existen varios tropismos que condicionan un suelo, el geotropismo, aerotropismo, hidrotropismo y quimiotropismo. Siendo el quimiotropismo de interés para el presente estudio, pues la raíz se orienta hacia aquellas regiones más fértiles del suelo y evita las que pueda causar toxicidad a la planta. Especialmente el banano precisa de suelos ricos en calcio y fósforo, pero por causa de una elevada concentración de hierro en el suelo puede tener deficiencias (Devlin, 1982), (López, 1995).

Siendo la provincia de El Oro una de las principales zonas productoras de Banano, es de vital importancia que el quimiotropismo sea el adecuado, sin embargo en estudios de suelos de varias zonas bananeras del Ecuador realizados por Medina (2006), se ha encontrado restos de cenizas volcánicas, que debido al proceso de meteorización dejan en los suelos óxidos de hierro deshidratado, dando una coloración amarilla rojiza. Por otro lado en los resultados del estudio se halló un alto contenido de minerales ferromagnesianos que tienden a incrementarse a causa de malos drenajes.

Los suelos con alto contenido de hierro disponible para la planta provocan una toxicidad y necrosis en ella, en este caso el ion férrico en condiciones de escasez de oxígeno se reduce a ion ferroso. El presente estudio permitirá aislar microorganismos solubilizadores de hierro propios del suelo, los cuales tengan la capacidad de llevar el hierro insoluble a una forma soluble, y así sea más fácil su drenaje. En estudios de campo posteriores se probará la capacidad del inoculante biológico para la solubilización del hierro.



### **1.3 Objetivos de la investigación**

#### **1.3.1 Objetivo general**

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

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

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

### **1.4 Marco teórico**

#### **1.4.1 Importancia del hierro en el suelo**

El hierro es uno de los elementos más frecuentes en los suelos agrícolas. Dependiendo de los porcentajes de compuestos férricos, se tendrá el color del suelo, también juega un papel importante en la agregación de partículas y su formación (Cruz-Sánchez, 2004).

El hierro en el suelo es el responsable del desarrollo fisiológico de las plantas, la forma asimilable es la ferrosa, y la poca soluble es la férrica. En mayor cantidad se encuentra formando silicatos de ferromagnesio, hidróxidos u óxidos, los cuales no son fácilmente asimilables por el vegetal (Aguado-Santacruz, 2012).

El hierro soluble se encuentra en forma de quelatos, en algunos casos puede ser insuficiente para cubrir las necesidades de la planta, sin embargo, este es un elemento que se caracteriza por cambiar con facilidad su estado de oxidación. Aunque el punto de partida del hierro son las formas de hierro mineralizado debido a procesos de meteorización, la variabilidad le da su importancia en los sistemas redox biológicos (Juárez, Cerdán, & Sánchez Sánchez, 2005).

La disponibilidad del hierro se ve afectada por cambios en el pH, la textura y la aireación del suelo. La materia orgánica puede aumentar su disponibilidad al incrementarse las poblaciones bacterianas (Aguado-Santacruz, 2012).

En la rizosfera el hierro puede encontrarse en varias formas que pueden ser móviles e inmóviles. Las móviles orgánicas como Fe-fulvato e inorgánicas como  $Fe^{2+}$  y  $Fe^{3+}$  mientras que las inmóviles inorgánicas como óxidos e hidróxidos y orgánicas pueden estar ligados a la materia orgánica (Uren, 1984).

#### **1.4.2 El hierro en el sistema suelo – planta**

El hierro es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre después de Si, O y Al, pues representa el 5.1% de su peso total y su contenido en suelo se estima en un 3.8% (Lindsay, 1979).

En el caso de cultivo de banano los requerimientos nutricionales son:

- Primarios.- nitrógeno, fósforo y potasio
- Secundarios.- calcio, magnesio y azufre
- Menores.- zinc, boro, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, cloro y sodio.

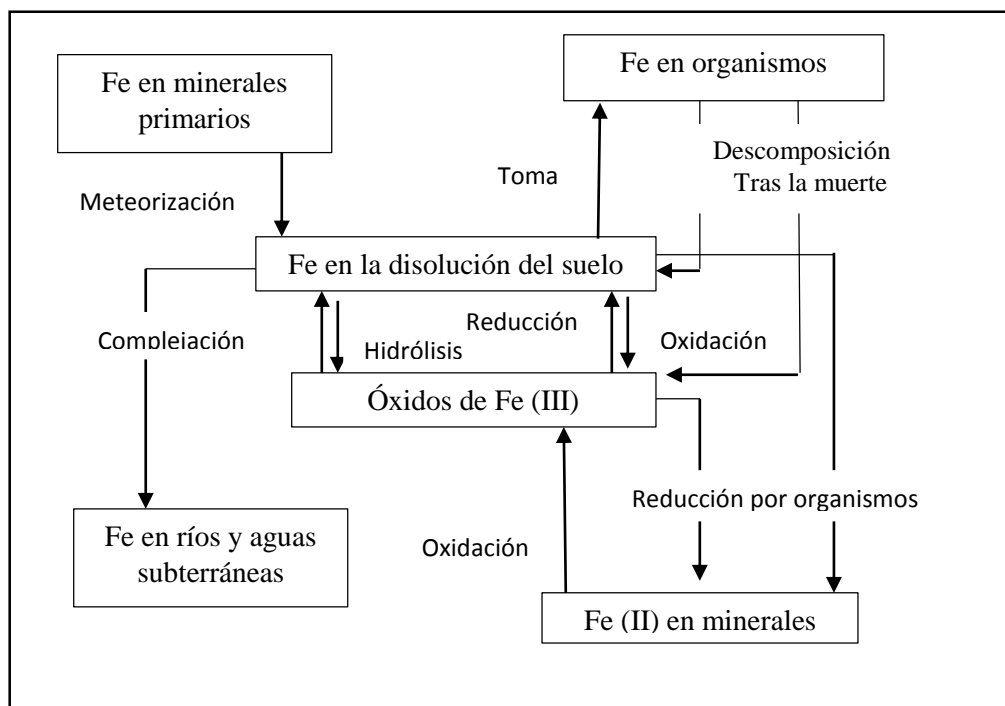
El hierro en la planta es importante para la formación de clorofila y participa en los procesos de respiración. Es parte de varios sistemas enzimáticos que pueden ser hemídicos como formación de citocromos, complejos proteínicos hierro-porfirínicos, mitocondrias, y no hemídicos que se caracterizan porque el hierro se coordina con un grupo tiol de cisteína o con azufre inorgánico formando enlaces Fe-S (Juárez, Cerdán, & Sánchez Sánchez, 2005).

El contenido normal en el vegetal es de 50-300 ppm como materia seca, o 5-10 kg/ha, sin embargo el  $\text{Fe}^{3+}$  de muchos suelos está en mayor cantidad debido a su escasa solubilidad, así la planta se ve obligada a encontrar medios de solubilizarla (Benavides, 1999).

El hierro es absorbido por la planta como  $\text{Fe}^{3+}$ , sin embargo la forma ferrosa  $\text{Fe}^{2+}$  es la metabólicamente activa (Devlin, 1982).

De los dos estados de oxidación en que se presenta el hierro en el suelo, la planta lo asimila preferentemente en la forma ferrosa, por lo cual se ve obligado a reducir la forma predominante del hierro,  $\text{Fe}^{3+}$ , en el suelo. Este proceso es llevado a cabo por la enzima reductasa, situada en la membrana plasmática de la raíz (Bienfait, 1989-Römheld, 1986).

En la figura 1 se muestra el ciclo del hierro en el suelo:



**Figura 1.** Ciclo del hierro en el Suelo

Fuente: (Murad y Fischer, 1998).

Por la baja solubilidad de los óxidos de  $\text{Fe}^{3+}$  en un pH normal del suelo, el hierro liberado precipita rápidamente como óxido o hidróxido. Es de gran importancia la reversibilidad de la reacción de óxido – reducción del hierro en los suelos, puesto que bajo condiciones anaerobias, los microorganismos pueden utilizar los óxidos de  $\text{Fe}^{3+}$  como aceptores finales de electrones para realizar la descomposición oxidativa de la materia orgánica, lo que da lugar a la reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , que generalmente es más soluble y facilita la solubilidad de los óxidos (Schwertmann, 1989).

#### **1.4.3 Toxicidad por hierro**

Los suelos con alto contenido de hierro disponible hacen que exista toxicidad manifestada en una necrosis marginal de color negro en las hojas viejas, además de disminuir la biomasa radicular, desfavoreciendo el crecimiento de la planta y el rendimiento del cultivo. Este tipo de síntomas se presentan particularmente en suelos pesados y en épocas lluviosas, debido a que el  $\text{Fe}^{3+}$  en condiciones de escasez de oxígeno se reduce a  $\text{Fe}^{2+}$  que es la forma soluble y fácilmente disponible para la planta (López, 1995).

Demasiado hierro puede provocar alteraciones en la formación de la clorofila, inhibiendo la capacidad de la planta para captar correctamente la luz solar, además de interferir en la síntesis de proteínas encargadas de llevar a cabo las reacciones químicas necesarias. Cuando la cantidad de hierro aumenta, la capacidad del vegetal para absorber otros nutrientes se ve obstaculizada principalmente de nutrientes indispensables como el fósforo y el nitrógeno, causando un deterioro en los tejidos del tallo y las hojas, conduciendo a la muerte celular (Kampfinkel, 1995).

Se recomienda drenar bien éstas áreas para corregir el problema. En sitios bajo riego, el exceso de humedad puede provocar toxicidad por hierro. En suelos ácidos y poco fértiles, suelos meteorizados, es posible observar también síntomas de toxicidad por Fe debido a los altos niveles del nutrimento del suelo (Juárez, Cerdán, & Sánchez Sánchez, 2005).

#### 1.4.4 Características del suelo en la provincia de El Oro

Uno de los cultivos de mayor interés económico del Ecuador es el banano. Según Medina (2006), actualmente existen alrededor de 130.000 hectáreas cultivadas de banano, en varias zonas del Ecuador; sin embargo, muchos de los lugares no han tenido un estudio previo del suelo que permita conocer los problemas de nutrición y de rendimiento.

Los suelos del litoral ecuatoriano consisten en sedimentos derivados de rocas ígneas como andesita, riolita, basaltos, y diabasas, sedimentarias como calizas, lutitas y dolomitas y sedimentarias que componen la cordillera occidental de los Andes (Medina, 2006).

Los principales constituyentes de las cenizas volcánicas son magnetita, augita (silicatos de Ca, Mg y Fe), olivinos (silicatos de Mg y Fe) y fedelpastos de la serie plagiocasa y ortoclasa.

Los procesos de meteorización más importantes son los que se han presentado en los minerales ferromagnesianos, dando como resultado residuos arcillosos, limosos, de color amarillo por la presencia de limonita (óxido de hierro hidratado) que posteriormente se transforman en hematita de color rojo (óxido de hierro deshidratado) (Medina, 2006).

En la tabla 1, se muestra el tipo de suelos de Machala que son en denominación común Aluvión Fértil, en el sistema americano Aluvial y en el de séptima aproximación es de tipo Entisol.

**Tabla 1.**

Clasificación General de los Suelos del Litoral Ecuatoriano

Zona	Lugar	Denominación común	Sistema Americano	Séptima Aproximación
Sur	Machala	Aluvión Fértil	Aluvial	Entisol
Oriental	El Triunfo y Milagro	Aluvión Fértil y poco fértil	Aluvial	Entisol
Sub Central	Babahoyo	Aluvión Fértil	Aluvial	Entisol
Central	Quevedo	Ceniza Volcánica	RegosolLaterítico	Inceptisol
Central	Quevedo	Depresión (Ciénega)	Gley Húmico	Inceptisol

Fuente: (Medina, 2006).

Según los resultados en estudios de suelos, nutrición y fertilización en varias zonas bananeras del Ecuador de Medina (2006), se encontró un alto contenido de hierro en la mayor parte de los suelos, siendo de interés la zona sur.

#### **1.4.5 Transformaciones mediadas por microorganismos**

Existen muchos microorganismos capaces de movilizar un metal, es decir llevarlo de un estado inicial insoluble en fase sólida a uno soluble final en fase acuosa, proceso conocido como lixiviación microbiana. Por otro lado la inmovilización de un metal, es decir de un estado insoluble a uno soluble puede ser mediada también por microorganismos (Vullo, 2003).

##### **1.4.5.1 Movilización de metales: Biolixiviación**

Es un mecanismo de solubilización mediado por microorganismos que permite que un metal pueda ser extraído en fase acuosa. Los microorganismos nativos favorecen la disolución de los diferentes metales como por ejemplo la pirita. Los microorganismos presentan un rol catalítico en la oxidación del  $\text{Fe}^{2+}$  y del azufre elemental que se da por consecuencia de la lixiviación química a  $\text{Fe}^{3+}$  e ion sulfato, respectivamente (Menadier, 2009).

La biolixiviación ocurre por dos mecanismos: directo e indirecto. Cuando el microorganismo está en contacto físico con el mineral, la disolución del mineral es dada por reacciones químicas catalizadas enzimáticamente lo que se considera lixiviación directa. En el segundo caso las reacciones pueden ser o no catalizadas enzimáticamente y sin tener contacto del microorganismo con el mineral (Rivera, 2011).

La principal bacteria encargada de los procesos de biolixiviación es *Thiobacillus ferrooxidans*, aunque es el más significativo existen otros microorganismos oxidantes de hierro y de azufre que pueden llevar las forma de hierro insolubles a solubles (Menadier, 2009).

#### 1.4.5.2 Inmovilización de metales

Dentro de los procesos de transformación dada por microorganismos existe una amplia variedad de bacterias resistentes y tolerantes a metales. Pueden ser resistentes por tener mecanismos de detoxificación cuando hay presencia del mineral (Silver, 1988). Por otro lado, los tolerantes pueden subsistir en la presencia o ausencia del mineral. Los mecanismos descritos por Vullo (2003), son:

- Biosorción: Los microorganismos son propios de lugares contaminados y son capaces de retener el metal en periodos cortos de tiempo al entrar en contacto con soluciones de dicho metal, el mecanismo no es dependiente de la temperatura.
- Bioacumulación: El microbio internaliza el metal pesado por transporte de membrana al citoplasma, ejemplo de ello es *Pseudomonas aeruginosa* capaz de acumular uranio.
- Biomineralización: Los metales son precipitados como carbonatos e hidróxidos por un mecanismo de resistencia codificado en plásmidos. Este proceso es empleado en la precipitación de sulfuros metálicos en reactores de cultivos mixtos con bacterias reductoras de sulfato.
- Biotransformación: El metal sufre un cambio químico cambiando su estado de oxidación o de metilación. Bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* puede reducir el catión  $Hg^{2+}$  a  $Hg^0$ .

#### 1.4.6 Microorganismos solubilizadores de hierro

El hierro férrico es un receptor terminal de electrones extensamente utilizado por los organismos anaerobios autótrofos y heterótrofos. El flujo de electrones es similar a los que usan como receptores terminales oxígeno o nitrato, salvo que en los organismos reductores de hierro férrico la enzima final es la hierro-férrico reductasa. Los organismos modelo incluyen *Shewanella*

*putrificans* y *Geobacter metallireducens*. Los procesos de solubilización y extracción de elementos recuperables a partir de minerales o sólidos mediados por la acción de microorganismos (bacterias u hongos) son conocidos como biolixiviación. Por otro lado la biobeneficiación a través de microorganismos es la remoción de impurezas o componentes no deseables de un metal de alto valor (Decheco, 2011).

La bacteria más activa en los procesos de biolixiviación pertenece al género *Thiobacillus*, específicamente *Thiobacillus ferrooxidans* (Rossi, 1990).

Las dos funciones principales de este tipo de bacterias son la oxidación de  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$ . *Acidithiobacillus* tiene forma de barra, es Gram-negativa, no forma esporas y es mesófilo excepto el termófilo *Acidithiobacilli*, que puede crecer a una temperatura más alta (Khan, Haq, Hasan, & Saeed, 2012).

Asimismo destacan otras especies como *Thiobacillus thiooxidans*, *Metallogenium* spp., *Gallionella* spp., *Leptospirillum ferrooxidans*, *Acidianus brierleyi*, *Sulfolobus* spp. y *Sulfobacillus* las dos últimas termofilicas. *Acidithiobacillus ferrooxidans* es una cepa bacteriana nativa con capacidad de oxidar hierro ferroso y compuestos del azufre, aislada a partir de efluentes y material de minas de oro. *Thiobacillus ferrooxidans* tiene un rango óptimo de crecimiento en condiciones altamente ácidas con valores de pH de 2,0 a 2,5 favorable para la oxidación de hierro ferroso y sulfuros. Para valores de pH cercanos a 2,0 ocurre una considerable inhibición de *T. ferrooxidans*., pero puede ser adaptado para valores de pH menores por adición de ácido (Decheco, 2011).

*Acidithiobacillus ferrooxidans* es un microorganismo litótrofo que deriva energía para su crecimiento mediante la oxidación de  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$ , la oxidación de azufre, sulfuro y el paso de azufre para sulfato (Khan, Haq, Hasan, & Saeed, 2012).

En la presencia de bacterias ferrooxidantes, el hierro ferroso producido en estas reacciones puede ser oxidado a hierro férrico, estableciéndose por lo tanto un proceso cíclico. Dicho ataque oxidativo tiene dos etapas (I) la interacción química del hierro férrico con el mineral sulfuroso y (II) la



regeneración del hierro férrico por la bacteria. El hierro férrico se puede reducir en condiciones anóxicas a la forma ferrosa, más soluble (Decheco, 2011).

#### 1.4.7 Medios de cultivo para el aislamiento de microorganismos solubilizadores de hierro

Las bacterias solubilizadoras de hierro son en su mayoría quimiolitotóxicas y se destaca entre ellas el *Thiobacillus ferrooxidans*. Para su aislamiento es necesario proveer un medio de cultivo adecuado para el crecimiento del microorganismo (Quintero, 2003).

##### 1.4.7.1 Nutrientes

Los nutrientes inorgánicos tales como hierro y compuestos sulfurosos son indispensables para el crecimiento, sin embargo para un buen desarrollo se debe suplementar con amonio y sales de fosfato, calcio, potasio, sodio y magnesio. Como fuente de carbono generalmente es utilizada la glucosa o sacarosa, usándose como fuente de nitrógeno el extracto de levadura. La composición del medio puede adaptarse en condiciones experimentales (Quintero, 2003).

En la Tabla 2 se muestra la composición de medios de cultivo base empleados en experimentos de biolixiviación del mineral hierro (Nagpal, 1997 - Natarajan, 1997).

**Tabla 2.**

Composición de medios de cultivo utilizados para biolixiviación de hierro.

Composición del Medio de Cultivo (g/L) de agua destilada							
Medio	Composición (g/L)						pH
Medio 9K (Silverman y Lundgren, 1959)	FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O 44.8	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 3.0	KCl 0.1	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.5	MgSO <sub>4</sub> 0.5	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 0.01	2.2
Medio Nutritivo (Raper y Fennel, 1965)	Peptona 10.0		Ext. Carne 5.0		NaCl 5.0		7.0

Fuente: (Natarajan, 1997).

Uno de los medios más utilizados para la solubilización de minerales es el medio Pikovskaya, principalmente en la solubilización de fósforo debido a que posee un indicador que permite visualizar el viraje del medio dado por la oxidación de un compuesto inorgánico generada por el microorganismo formando un halo de solubilización (Corrales, 2014).

**Tabla 3.**

Composición del medio Pikovskaya modificado

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

Fuente: (Paguay, 2013).

Es importante que para que el medio pueda ser específico para el aislamiento de bacterias solubilizadoras de hierro como *T. ferrooxidans* exista una saturación de sulfato ferroso pues la velocidad de oxidación inicial depende casi en su totalidad de la concentración de este componente. Según estudios realizados por Arias y otros (2013), el sulfato ferroso puede ser el 33% de los componentes del medio de cultivo para el aislamiento de las bacterias, pero puede variar según ensayos de adaptación. El medio 9K puede ser líquido o

sólido ideal para el aislamiento de *T. ferrooxidans*. Deben controlarse las condiciones ambiental como pH y temperatura (Arias, 2013).

#### **1.4.7.2 pH**

El pH es uno de los parámetros más importantes para el desarrollo de un microorganismo, su variación puede ocasionar que no se den correctamente las reacciones de solubilización. En el caso puntual de *Thiobacillus ferrooxidans*, el rango de pH está comprendido entre 2.0 y 2.5 lo que favorece la oxidación de hierro ferroso y sulfuros (Quintero, 2003).

#### **1.4.7.3 Temperatura**

El rango de temperatura óptimo para el crecimiento de *Thiobacillus ferrooxidans* está entre 25 °C y 35 °C, siendo el máximo de la oxidación biológica en 55 °C (Quintero, 2003).

#### **1.4.7.4 Fuente de Carbono**

Diferentes fuentes de carbono son utilizadas para el crecimiento de bacterias del género *Acidithiobacillus* como *ferrooxidans* y *thiooxidans*, entre los adecuados están la glucosa, sucrosa, fructosa, rafinosa, D-sorbitol, galactosa, lactosa y maltosa (Khan, Haq, Hasan, & Saeed, 2012).

#### **1.4.7.5 Flujo de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>**

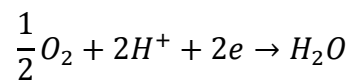
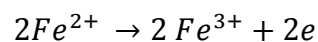
A escala de laboratorio es importante el suministro de oxígeno pues el *T. ferrooxidans* es aerobio estricto por lo tanto es un parámetro de control. A escala de laboratorio se debe analizar el uso de aireadores o agitadores ya que pueden generar algunas dificultades (Quintero, 2003).

El CO<sub>2</sub> necesario puede ser aportado por carbonatos, ya que si disminuye su solubilidad al disminuir el pH del medio puede ser un factor limitante en el crecimiento de la bacteria (Quintero, 2003).

Las bacterias utilizan rutas metabólicas que son comunes en organismos quimiolitótrofos. *Acidithiobacillus ferrooxidans* presenta el ciclo de Calvin para

fijación de CO<sub>2</sub> y rutas para fijación de nitrógeno y fosfato. El ciclo de Calvin necesita de la formación de ATP y ADPH. Ambas moléculas energéticas son obtenidas para este caso a través de la oxidación de ion ferroso con oxígeno (Díaz, 2007).

Las reacciones involucradas según Díaz (2007) para la oxidación de ion ferroso son:



#### **1.4.8 Inoculantes bacterianos**

La agricultura orgánica se define como una visión sistemática de la producción agrícola que usa como guía los procesos biológicos de los ecosistemas naturales (Suquilanda, 1996).

Para mejorar la condición del suelo se han empleado microorganismos benéficos que evitan la putrefacción y mejoran la eficacia del uso de la materia orgánica por las plantas.

De acuerdo a la definición propuesta por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la agricultura orgánica es un sistema global de gestión de la producción que fomenta y realza la salud de los agro ecosistemas, inclusive la diversidad biológica, los ciclos biológicos y la actividad biológica del suelo (Comisión del Codex Alimentarius, 2004 - Crow, 2006).

Los microorganismos benéficos interactúan con las raíces de las plantas, proporcionando nutrientes o dotan a las plantas de factores de crecimiento. Los microorganismos pueden producir sinergismo (BIOFAG, 2008).

Los biofertilizantes biológicos son obtenidos por la actividad de organismos vivos, aprovechando la simbiosis entre planta, suelo, organismos y microorganismos (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, 1998).

Con el fin de fomentar la agricultura sostenible, el uso de biofertilizantes es una alternativa para disminuir el uso de productos químicos, reduciendo el impacto ambiental y mejorando la productividad de los cultivos (Bruneton, 2008).

Un biofertilizante o inoculante bacteriano es obtenido a partir de microorganismos que tienen un efecto tangible sobre procesos de descomposición y síntesis que se dan en el suelo. Para su aislamiento, se utiliza un medio de cultivo específico que luego de ser adicionado a un soporte o sustrato inerte le proveerá los nutrimentos para su sobrevivencia. Estos productos pueden ser líquidos o sólidos, los cuales al aplicarse en el suelo o a la planta, incrementan su actividad y ejercen el efecto esperado de acuerdo a su naturaleza (Torres, 2008).

#### **1.4.9 Curva de crecimiento microbiano**

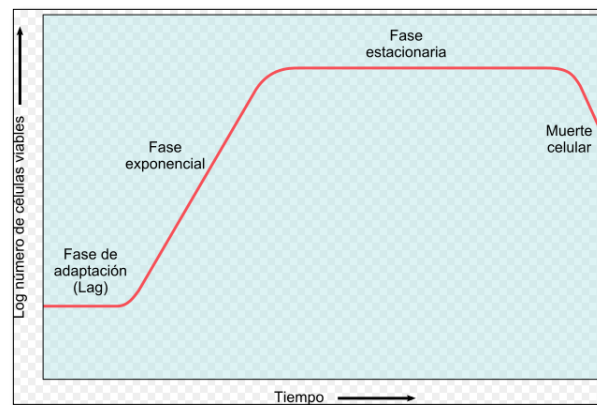
La curva de crecimiento microbiano permite determinar el número de células presentes en un cultivo bacteriano líquido conforme transcurre el tiempo de estudio, dicho así constituye una herramienta de estudio del comportamiento fisiológico bacteriano (Abbeyes, Chadefaud, Feldmann, & Ferré, 1989).

La curva es una representación gráfica de la cinética del crecimiento y consta de cuatro fases marcadas, la fase de latencia (fase de retraso), la fase de crecimiento exponencial o logarítmico, la fase estacionaria y la fase de muerte celular (Guayasamín, 2015).

Mediante la curva de crecimiento en un sistema cerrado se pone mayor interés en la fase de crecimiento exponencial donde se observa el número

máximo de microorganismos. Para ello el medio de cultivo debe contar con las condiciones de nutrientes, pH, temperatura, disponibilidad de oxígeno óptimos para su desarrollo ya sea a escala de laboratorio o escala industrial (Navarro, 2011).

En la figura 1.2 se muestra las fases de la cinética de crecimiento bacteriano:



**Figura 2** Fases de la cinética de crecimiento microbiano

Fuente: (Mandigan, 1997).

#### 1.4.9.1 Método turbidimétrico para determinar la curva de crecimiento microbiano

La turbidimetría es un método de bajo costo para determinar la medida del crecimiento microbiano mediante la densidad óptica en tiempo real. La densidad óptica (DO) o absorbancia es utilizada para medir la concentración expresada en masa o número celular de suspensiones bacterianas. La técnica se basa en el hecho de que las partículas difractan la luz dentro de ciertos límites, la reducción en tal cantidad de luz es una medida de masa bacteriana presente, las mediciones pueden ser realizadas con la ayuda de un espectrofotómetro. Por tanto el crecimiento microbiano en la turbidimetría está relacionado con el incremento de la turbidez del medio (Navarro, 2011).

### 1.4.10 Banano (*Musa paradisiaca*)

#### 1.4.10.1 Características botánicas

El banano pertenece al género *Musa* de la familia Musáceas del orden Zingiberales. No posee tronco, en su lugar presenta vainas foliares que forman una estructura llamada pseudotallo (Israeli, 1995).

El tallo verdadero es el rizoma subterráneo o también llamado cormo, su tamaño está relacionado con la parte aérea de la planta. La sección apical del cormo contiene tejidos meristemáticos de los cuales se desarrolla el sistema vascular que comunica la parte aérea con la parte subterránea (Padrón, 1996).

Como el resto de las monocotiledóneas, posee un sistema de raíces adventicio que se origina del rizoma. El poder radicular de las raíces es débil (Novillo, 2001).

#### - **Clasificación taxonómica:**

- **Reino:** Plantae
- **División:** Magnoliophyta
- **Subdivisión:** Angiosperma
- **Clase:** Liliopsida (Monocotiledonea)
- **Subclase:** Commelinidae
- **Familia:** Musaceae
- **Género:** *Musa*
- **Especie:** *M. paradisiaca*
- **Nombre Común:** Banano, Guineo (Rehm & Espig, 1976).

#### 1.4.10.2 Cultivo de banano

El banano y plátano tienen su origen en Asia meridional, siendo conocidos en el Mediterráneo desde el año 650 d.C. La especie llegó a Canarias en el siglo XV y desde allí fue llevado a América en el año 1516. El cultivo comercial se inicia en Canarias a finales del siglo XIX y principios del siglo XX. El plátano macho y el bananito son propios del sudoeste asiático; su cultivo se ha extendido a muchas regiones de Centroamérica y Sudamérica, así como de África subtropical; constituyendo la base de la alimentación de muchas regiones tropicales (Crespi, 2006).

El cultivo de *M. paradisiaca* dura un periodo de 12 meses y una vida económica de tres años, en la tabla 4 se muestra los requerimientos para su cultivo.

**Tabla 4.**

Requerimientos agroecológicos para la Planta de Banano.

<b>Parámetro</b>	<b>Rango</b>
Pendiente	Planos ligeramente inclinados
Profundidad	Profundos
Textura	Franco, limoso, franco arcilloso arenoso, franco.
Pedregosidad	Sin o pocas
pH	6.5 a 7.5 prácticamente neutro a neutro 5.5 a 6.5 a ligeramente ácido
Salinidad	No salino
Toxicidad	Sin o Nula
Nivel de fertilidad	Alta a media
Drenaje	Bien drenado
Precipitación	1200 a 2000 mm (bien distribuidos en el año)
Temperatura	> 20°C Media anual
Períodos de humedad	185 a 295 días

Fuente: MAGAP, Zonificación agroecológica del cultivo del banano en el Ecuador, Yugcha y otros. 2012.

#### **1.4.10.3 Importancia económica**

Existen dos tipos de banano comercial: Gros Michel y Cavendish. Cavendish es la variedad más cultivada en el país (Rodríguez, 2009).

Ecuador es el primer exportador de banano del mundo y su exportación al mercado de la Unión Europea es alrededor del 40%. El comercio del banano representa para el país, después del petróleo, el segundo recurso de ingresos para su economía y, consecuentemente, contribuye significativamente al largo proceso de su desarrollo (Crespi, 2006).



El banano es la fruta más importante en el comercio internacional en términos de volumen y se ubica segunda en comparación a las frutas cítricas en representaciones monetarias. Cincuenta por ciento de la producción bananera se concentra en cuatro países que son la India, Ecuador, Brasil, y China. Sin embargo, la quinta parte de la producción mundial es exportada hacia mercados internacionales y la gran parte de producción es consumida en países en desarrollo de acuerdo a la Conferencia de las Naciones Unidas sobre comercio y desarrollo (UNCTAD, 2003).

### **1.5 Hipótesis**

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

## **CAPÍTULO II**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **2.1 Participantes**

El proyecto de investigación fue ejecutado en los laboratorios de la empresa Agrodiagnostic S.A, cuyas instalaciones están ubicadas en la ciudad de Quito, en la parroquia de Conocóto, cantón Sangolquí, provincia de Pichincha, con dirección: José Mejía Placido Caamaño s/n y Juan Montalvo. La empresa proporcionó el lugar de muestreo y proveyó de equipos, reactivos y materiales necesarios para su desarrollo.

La presente investigación se llevó a cabo gracias a la dirección de Alma Rosel Koch Kaiser MSc de la ESPE.

#### **2.2 Periodo de la investigación**

El tiempo de duración de la presente investigación fue de 12 meses.

#### **2.3 Fase de campo**

##### **2.3.1 Zona de estudio**

Las cepas bacterianas aisladas fueron obtenidas del sector bananero de Borbones, Provincia de El Oro, en diferentes haciendas bananeras para lo cual se visitó una superficie de 10 ha (hectáreas) divididas en 30 lotes de 1000 m<sup>2</sup> cada uno.

##### **2.3.2 Recolección de muestras en suelo de cultivo de banano**

Se realizó el muestreo basándose en el procedimiento descrito por Héctor M. Coraspe y Sergio Tejera (2008). Se recolectaron 30 unidades de muestreo correspondientes a 30 diferentes lotes del sector bananero de Borbones. Se utilizó una pala, fundas plásticas y desinfectante para su toma en un sitio específico. En un termo refrigerante se colocaron las muestras para su transporte hacia los laboratorios de Agrodiagnostic S.A para su análisis en máximo 24 días de almacenados.

## 2.4 Fase de laboratorio

### 2.4.1 Modificación de medio específico

El medio específico para el asilamiento fue una modificación del medio Pikovskaya, en base a los requerimientos sugeridos en el medio líquido 9K de Silverman y Lundgren, para bacterias solubilizadoras de hierro.

La composición del medio Pikovskaya modificado para Hierro fue:

**Tabla 5.**

Requerimientos nutricionales modificados en base a medio Pikovskaya y medio 9K para microorganismos solubilizadores de hierro.

<b>COMPONENTE:</b>	<b>CANTIDAD: (g/L)</b>
Glucosa	10
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5
Levadura	0.5
MnSO <sub>4</sub>	0.1
MgSO <sub>4</sub>	0.1
KCl	0.1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	3.0
Azul de bromocresol (Indicador)	0.05
Agar – agar	20

Fuente: Cartuche, P (2016).

El pH del medio fue ajustado a 3.

### 2.4.2 Procesamiento de las muestras

Las muestras almacenadas hasta por 24 h a 4°C, fueron procesadas inmediatamente, según el número de lote. Se colocó 50 g en un recipiente desinfectado con alcohol. Se homogenizaron y se tomó 10 g para las diluciones seriadas.

En un frasco de vidrio esterilizado se puso 90 ml de agua peptonada estéril al 0.1%, se añadió 10 g de muestra ya seleccionada. Esta solución fue la primera dilución 10<sup>-1</sup>.

En viales estériles con 9 ml de agua peptonada, se hicieron las diluciones seriadas, es decir de la primera dilución se tomó 1 ml de la

muestra y se adicionó a un vial, ésta nueva dilución fue  $10^{-2}$ , se continuó con el procedimiento hasta la dilución  $10^{-5}$ .



**Figura 3.** Procesamiento de muestra de suelo de cultivo de banano.

#### **2.4.3 Aislamiento de microorganismos**

Se tomó 100  $\mu$ l de las diluciones de  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  y se sembró por el método de siembra por extensión en el medio específico (Medio Pikovskaya Modificado para Hierro). Cada muestra fue sembrada por duplicado.

Se incubó a 37°C durante 48 h, para proceder al recuento de colonias e interpretación de sus características.

Las colonias con halo mayor a 7 mm fueron aisladas en cultivo puro en el medio agar nutriente, por el método de estriamiento, con un asa apropiada.

La acción solubilizadora de los microorganismos se observó en el viraje del medio de color verde a amarillo, se esperó la formación de halo mayor a 5 mm.

#### **2.4.4 Identificación macroscópica de las colonias aisladas**

Luego del crecimiento en el medio específico, se procedió a la identificación de las colonias tanto macroscópica y microscópicamente, así fueron seleccionadas las cepas que continuaron en estudio.

Se trabajó con aquella dilución que presentó mayor número de colonias con viraje al medio y un halo de solubilidad esperado.

Se realizó una tabla con los siguientes datos de las colonias: diámetro del halo formado, tamaño, forma, color, y textura; para poder compararlas los datos encontrados en bibliografía, ya revisada.

#### **2.4.5 Identificación microscópica de las colonias aisladas**

Se realizó la tinción Gram según Forbes *et al.*, 2009, para diferenciar entre la diferente morfología bacteriana. Fueron de interés los bacilos Gram negativos no esporulados los cuales se aislaron nuevamente, para la realización de un cepario primario. Cabe recalcar que para el presente proyecto se esperó obtener bacilos del género *Thiobacillus ferrooxidans*.

Se procedió a codificar las cepas seleccionadas de la siguiente manera:

A 1

Donde:

Letra = Nombre de la muestra,

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

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

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

La coloración de la cepa no se tomó como código, pero se detalló en el resultado del análisis macroscópico.

#### **2.4.6 Aislamiento en cultivo puro.**

Las colonias que cumplieron las características de interés según Pérez, Vásquez, & Ismael(2015), fueron aisladas en cultivo puro en el medio agar nutriente para su conservación.



**Figura 4.** Aislamiento de cepa suspendida en caldo nutritivo en medio agar nutriente.

#### 2.4.7 Establecimiento de ceparios.

La técnica que se utilizó para la realización del cepario (conservación de las cepas) fue la diseñada por Laboratorios Agrodiagnostic S.A.

Se realizaron 20 viales por cada cepa para continuar con las siguientes pruebas y 80 viales que fueron entregados a la empresa. Cada uno de los viales contuvo 1 ml de solución que incluyó 60% de la cepa incubada durante 24 h a 35 °C en caldo nutritivo, 10% de caldo nutritivo estéril sin inóculo el cual fue fuente de nutrimentos y 30 % de glicerina como agente conservador.

Cada vial se etiquetó según la codificación dada. El cepario se mantuvo en congelación a – 20 °C en fundas herméticas rotuladas según el código de la cepa y la fecha de elaboración.

#### 2.4.8 Pruebas de antagonismo.

Para las pruebas de antagonismo se siguió los procedimientos dados por Agrodiagnostic S.A, basados en el proyecto de investigación de (Huilcapi, 2007).

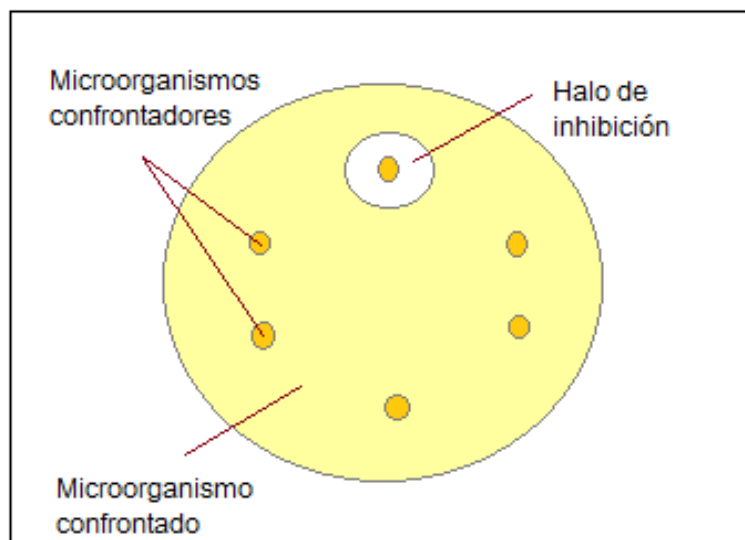
Las pruebas fueron realizadas por triplicado, y se enfrentaron las cepas que constaron en el cepario primario. Antes de realizar los ensayos se activaron las cepas sembrándolas en agar nutriente se incubaron durante 24 h. Pasadas 24 h, en tubos de ensayo con 9 ml de caldo nutritivo estéril se inocularon las cepas bacterianas, se incubaron durante 24 h, más.

Se sembró por inundación en agar nutritivo la cepa activada en el caldo nutritivo. Se colocaron en forma de reloj ocho fragmentos de sorbete estéril de 1 cm de altura y 0.5 cm de diámetro, de manera que hubo espacio entre cada uno para que se forme un halo de hasta 22 mm.

En el interior de cada sorbete (ocho pocillos), se añadió 50 µl de inóculo en caldo nutritivo para que puedan ser confrontados con la cepa inoculada en el agar nutritivo. Es decir, en cada pocillo una diferente cepa a ser confrontada. Este procedimiento se realizó con todas las cepas encontradas.

Se incubó durante 24 h a 35°C. Después del periodo de incubación se observó la presencia de halo mayor a 15 mm alrededor del sorbete y se determinó si existe antagonismo positivo, mientras que si no existe presencia de halos se estará presenciando un antagonismo negativo o compatibilidad.

Se tomó para las posteriores pruebas bioquímicas las bacterias que hayan presentado antagonismo negativo.



**Figura 5.** Esquema de pruebas de antagonismo para cepas seleccionadas.

Fuente: Agrodiagnostic S.A

#### 2.4.9 Identificación bioquímica.

Se realizó la identificación de cada cepa a partir de pruebas bioquímicas, según la clave referida por (Khan, Haq, Hasan, & Saeed, 2012).

## **2.5 Producción del inoculante a escala de laboratorio.**

### **2.5.1 Reactivación de las cepas bacterianas.**

Se realizó la suspensión de las cepas bacterianas correspondientes a *Thiobacillus ferrooxidans* en caldo nutritivo y se sembró en agar nutriente en incubación a 35 °C durante 24 h. Posteriormente se realizó tinción Gram para confirmar que el cultivo sea puro y no existan contaminantes ajenas al cepario.

En caso de contaminación se descartó y se volvió a aislar para volver a conformar el cepario primario y así no tener inconvenientes con el desarrollo del proyecto.

### **2.5.2 Preparación del pre-inóculo.**

Las cepas anteriormente seleccionadas se inocularon en 20 ml de medio de cultivo caldo nutritivo estéril y fue incubado a 35 °C por 24 h en un tubo de ensayo etiquetados.

### **2.5.3 Preparación del inóculo y fermentación discontinua**

Posteriormente 10 mL (1 % del volumen a fermentar) fueron vertidos en 900mL de medio específico Pikovskaya modificado para hierro, iniciándose la fase de producción de 1 L de inóculo. La fermentación discontinua se realizó en un matraz de 1000 mL, manteniéndose en bañomaría para mantener una temperatura constante de 35°C, durante 72 h. La aireación para el biorreactor fue proporcionado por un motor de pecera (LifeTech) con un flujo de aire de 1,5 m<sup>3</sup>/h aproximadamente.

### **2.5.4 Crecimiento microbiano**

Se tomaron muestras por triplicado cada tres horas durante 72 h, para determinar la concentración de bacterias mediante la absorbancia. También se evaluó las variaciones de pH y de temperatura (Echeverría, 2007).

#### **2.5.4.1 Concentración de biomasa**

Por medio de espectrofotometría se midió la absorbancia de las muestras a 650 nm y se determinó la concentración de biomasa microbiana en gramos por litro. La solución patrón fue el medio de cultivo Pikovskaya modificado para



hierro, el cual tiene concentración conocida de 34.45 g/L. La lectura de absorbancia se realizó por triplicado. La absorbancia patrón fue de 0.205.

#### **2.5.4.2 Medición de pH y temperatura del medio de cultivo**

El pH y la temperatura del medio de cultivo fueron verificados simultáneamente cada 3 h durante 72 h con ayuda de un pH metro (HACH) calibrado.

#### **2.5.5 Curvas de crecimiento**

Se realizaron las curvas de crecimiento, obteniendo la concentración en base a la observancia medida versus el tiempo de fermentación. Una vez realizadas las curvas se determinó el tiempo en el cual hay una mayor concentración de bacterias, es decir en la fase exponencial de la curva. Mediante la ecuación de la curva se establecieron los parámetros cinéticos de la fase exponencial.

### **2.6 Análisis de datos**

El criterio para la elección de las cepas bacterianas con mejor características solubilizadoras de hierro, se basó en la medición de los halos de crecimiento dados en el medio Pikovskaya modificado para hierro. Fueron tomadas como cepas solubilizadoras aquellas que presenten halos iguales o mayores a 10 mm.

Para las pruebas de antagonismo se consideró el diámetro del halo de inhibición, de modo que fue antagonismo positivo los halos iguales o mayores a 15 mm. Las pruebas de antagonismo se realizaron por duplicado con un tiempo de incubación de 24 h, se sometieron a un Análisis de Varianza (ADEVA). La variable dependiente fue el halo de inhibición, y como factor, las cepas confrontadas. Mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan se evidenciaron diferencias significativas.

El programa usado fue Microsoft Office Excel 2013 y XLSTAT 2016.

### **2.7 Diagrama de flujo del proyecto**

A continuación se muestra el diagrama del procedimiento que se llevó a cabo en el proyecto de investigación:

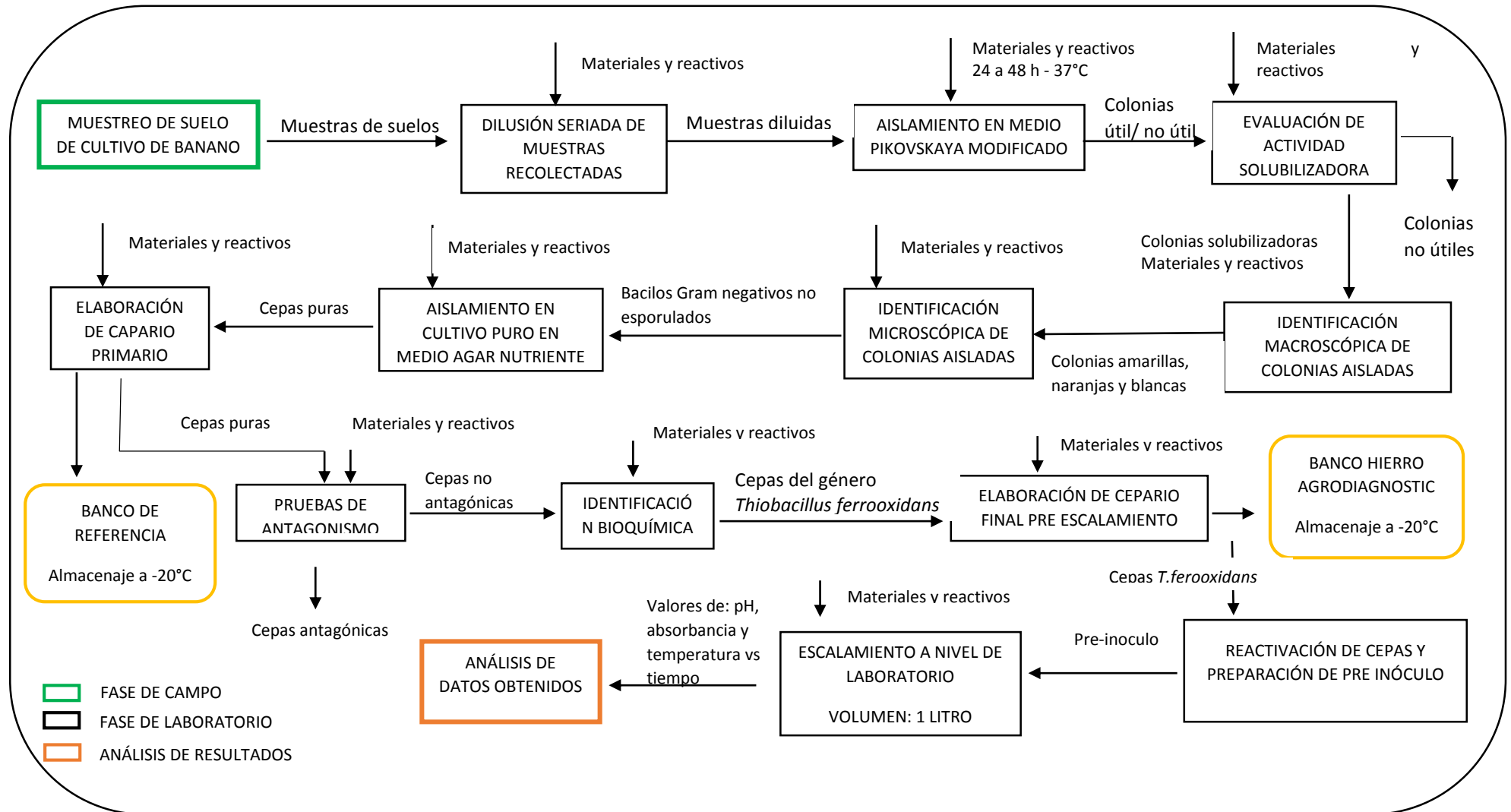


Diagrama de Flujo de la Metodología del presente Proyecto. (Fuente: Agrodiagnostic S.A). **Elaborado por:** Cartuche, 2016

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS

#### 3.1 Recolección de muestras de suelo de cultivo de banano

En el sector bananero de Borbones en la provincia de El Oro asignado por la empresa Agrodiagnostic S.A se recolectaron 15 muestras correspondientes a 15 parcelas diferentes, las cuales fueron transportadas al laboratorio para su procesamiento.

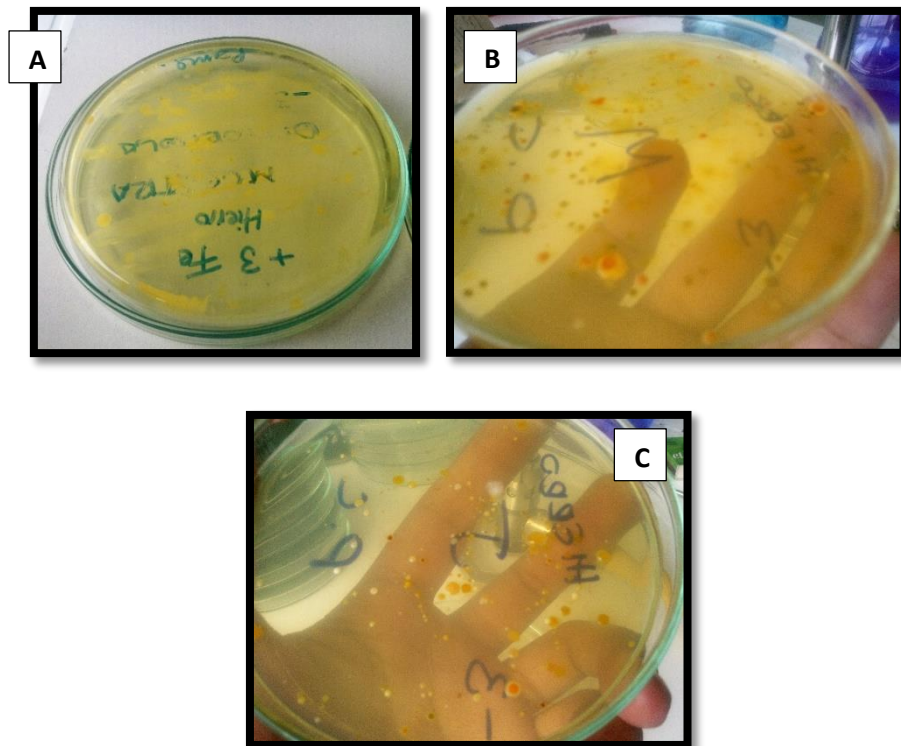
#### 3.2 Aislamiento de microorganismos solubilizadores de hierro en medio específico.

Del muestreo realizado se aislaron 26 cepas con diferentes características de UFC en base al color de la colonia las cuales fueron capaces de oxidar el sulfato ferroso dando como resultado el viraje del medio y una coloración anaranjada, amarilla y blanca, características del género *Thiobacillus ferrooxidans*. Las cepas de color blanco aisladas en medio agar nutriente toman coloración amarilla, y en el medio específico Pikovskaya modificado se tornan amarillas con mayor tiempo de incubación que las 24 horas.

#### Tabla 6.

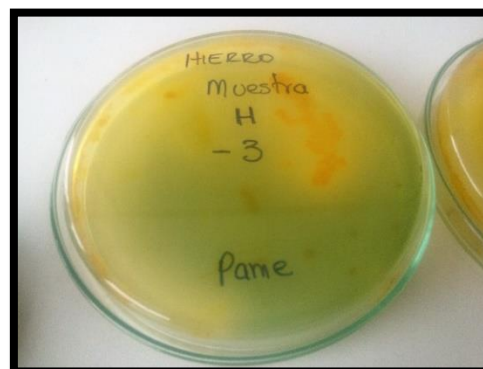
Porcentaje de cepas aisladas según su color de crecimiento en medio Pikovskaya modificado para hierro.

COLOR DE CEPA	CANTIDAD	PORCENTAJE
AMARILLO	10	38.5
NARANJA	10	38.5
BLANCO	6	23.0
<b>TOTAL CEPAS</b>	26	100.0



**Figura 6.** Observación de bacterias solubilizadoras de hierro en medio Pikovskaya modificado para Hierro. A) Amarillas, B) naranjas C) naranjas y blancas

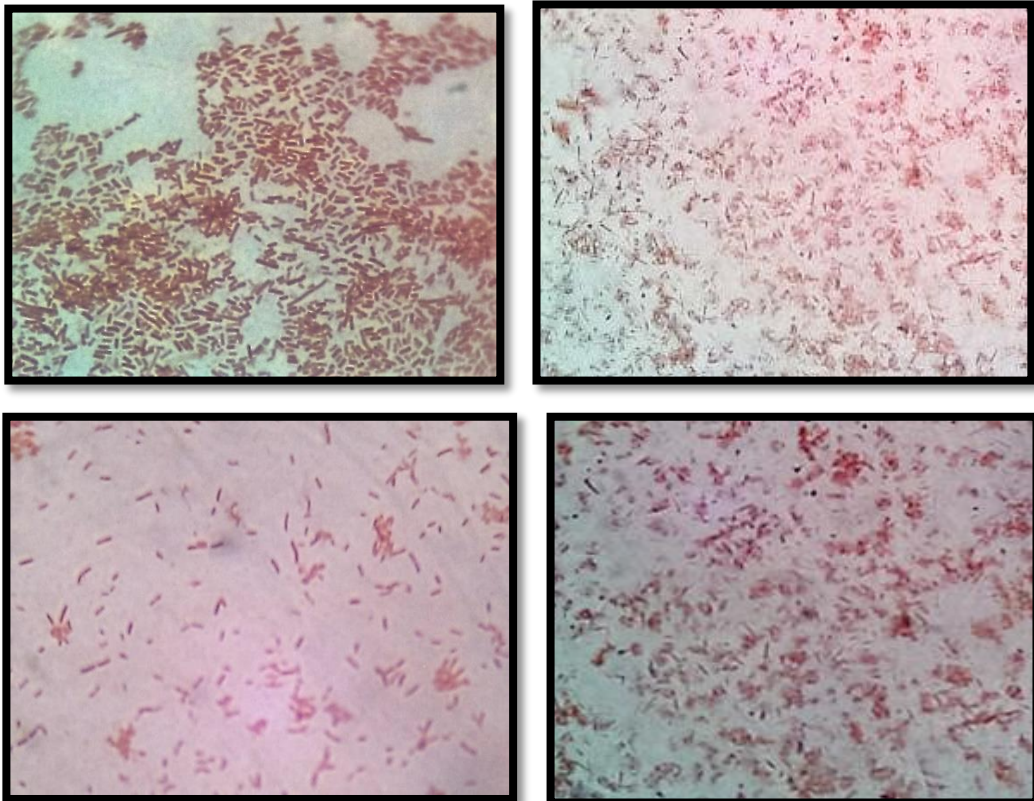
Con la finalidad de comprobar la capacidad solubilizadora de las cepas, se sembró nuevamente en el medio específico. Se obtuvieron 20 cepas capaces de virar el medio de verde a amarillo formando un halo en algunos casos debido a que el indicador azul de bromotimol en pH ácido se vuelve amarillo y a medida que las bacterias consumen el sustrato lo vuelven ácido confirmando sus características acidófilas (Khan, Haq, Hasan, & Saeed, 2012). Es decir el 77 % de las cepas solubilizaron el hierro y el 23% no lo realizaron.



**Figura 7.** Viraje del medio Pikovskaya modificado de verde a amarillo.

### 3.3 Características microscópicas

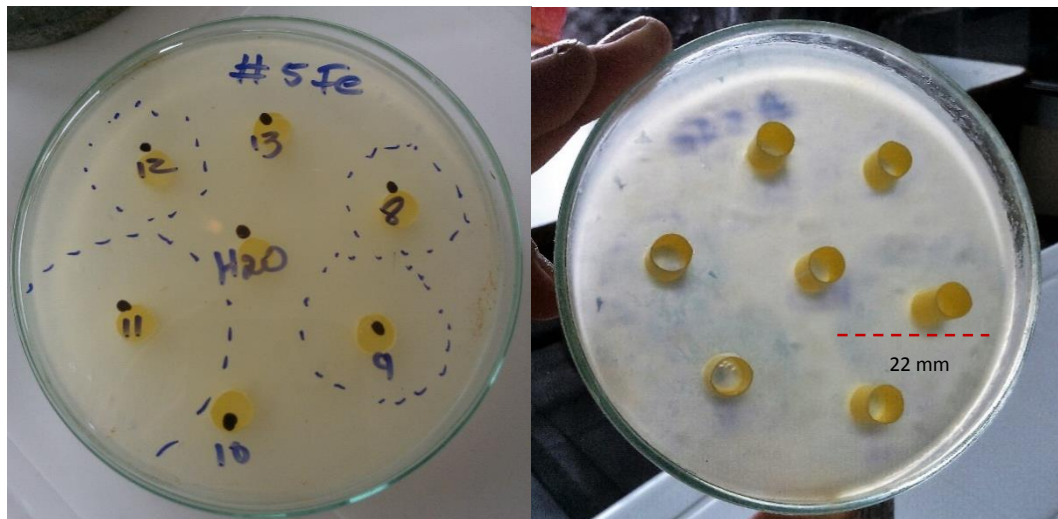
A las 26 cepas pre-seleccionadas como solubilizadoras de hierro se les realizó tinción Gram. Fueron descartadas las Gram positivas y las Gram negativas esporuladas. En total se obtuvieron 20 cepas de bacilos Gram negativos.



**Figura 8.** Observación microscópica de bacilos Gram negativos no esporulados aislados en agar nutriente (100x).

### 3.4 Antagonismo

Las 20 cepas Gram negativas no esporuladas con capacidad solubilizadora de hierro fueron sometidas a pruebas de antagonismo por triplicado, donde se determinó las cepas compatibles y antagónicas según el diámetro del halo de inhibición formado.



**Figura 9.** Halos de inhibición en medio agar nutriente

El análisis de varianza fue realizado en el programa XLSTAT, colocando como variables dependientes cualitativas la cepa A y B, y como variable dependiente cuantitativa el halo de inhibición formado entre ambas. El ADEVA fue altamente significativo con un valor de  $PR < 0.0001$ , mostrando una relación positiva entre el diámetro formado y la compatibilidad de las cepas.

**Tabla 7.**

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

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

Mediante la prueba de Duncan al 5%, se halló que las cepas D1, D2, G1, L1, M1, M2, F1, A2, L2, H1 y K1 fueron antagonicas por presentar un halo mayor a 15mm.

La prueba reportó un margen de confiabilidad del 95%.

**Tabla 8.**

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

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

### 3.5 Pruebas Bioquímicas

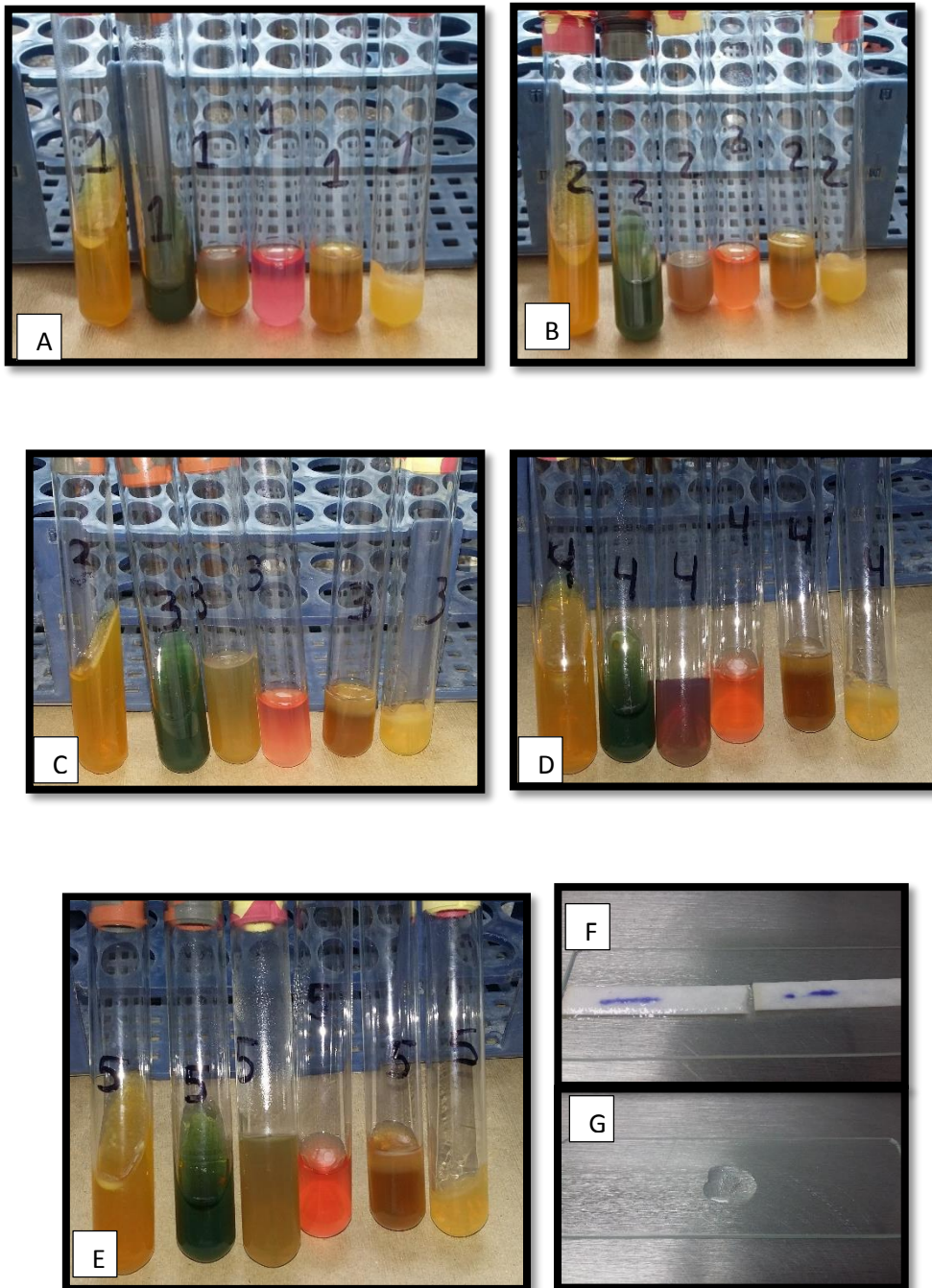
Mediante pruebas de antagonismo se consiguió como resultado ocho cepas con antagonismo negativo o compatibilidad, las cuáles fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas, obteniendo cinco cepas que corresponden al género *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Para la identificación bioquímica se usó la clave propuesta por (Khan S., 2012).

**Tabla 9.**  
Resultado de las pruebas bioquímicas de las cepas no antagónicas.

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



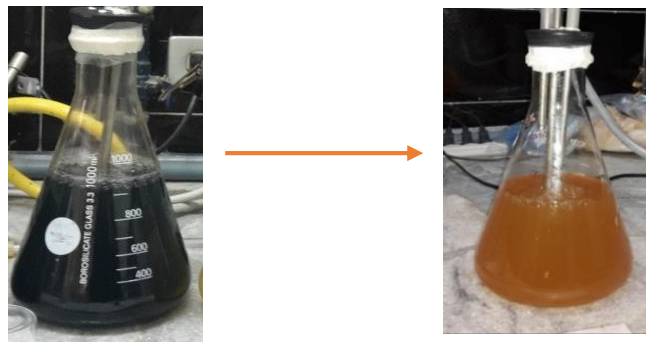


**Figura 10.** Resultado de las pruebas bioquímicas de *Thiobacillus ferrooxidans* para las cepas A) E1, B) E2, C) I2, D) O1, E) N1, F) Reacción oxidasa, G) Reacción catalasa.

### 3.6 Escalamiento

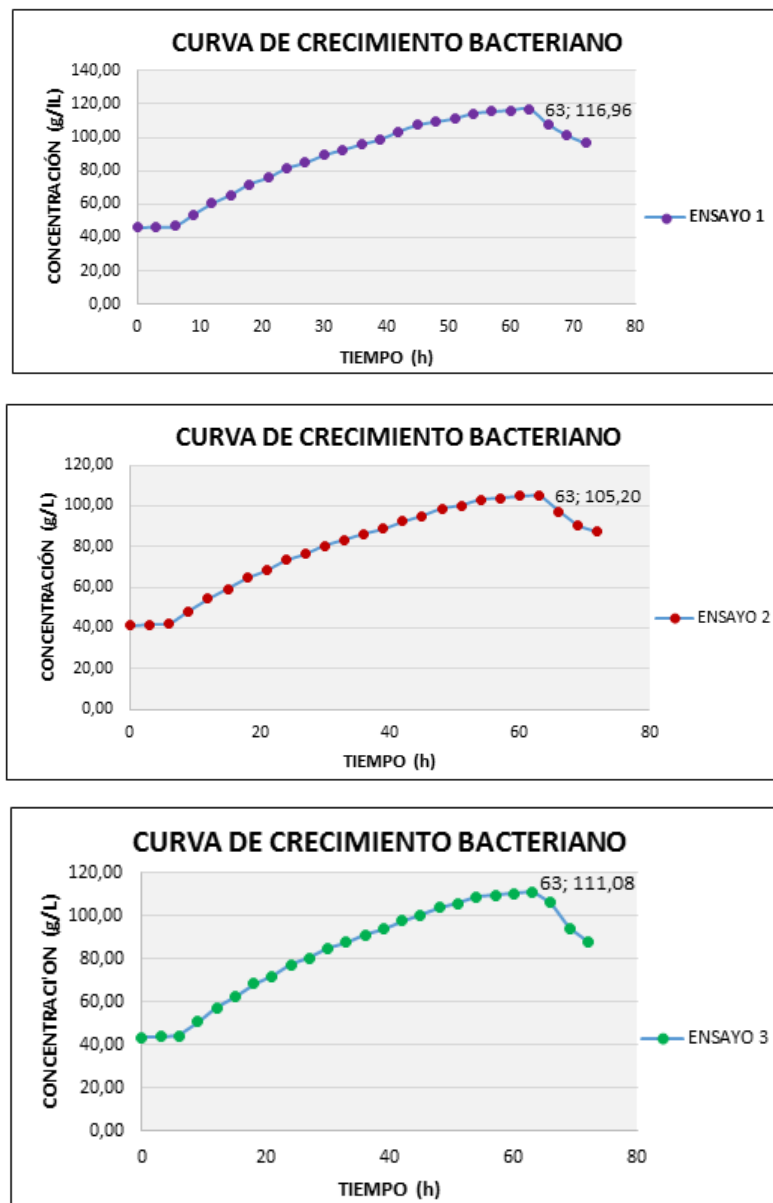
Con las cepas de *Thiobacillus ferrooxidans* E1, E2, I2, O1 Y N1, obtenidas tras la bioquímica se procedió a hacer el pre – inóculo (2%) de 20 mL para su posterior escalamiento a 1L. Se tomó la absorbancia (por triplicado), la temperatura y el pH durante 72 h con intervalos de 3 h.

Se observó que transcurridas 36 h del proceso de crecimiento, las bacterias viraron el color del medio, es decir, cambiaron el color del medio Pikovskaya modificado de verde a amarillo.



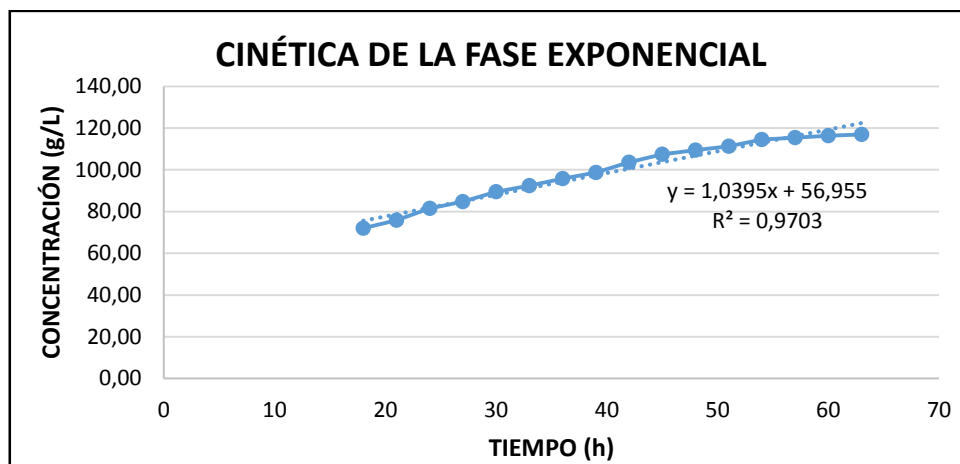
**Figura 11.** Observación del viraje del medio a las 36 h.

Se realizó la curva de crecimiento bacteriano en función del número de bacterias y el tiempo de incubación (Figura 3.7). Tomando en cuenta al control, se evidenció que la fase de latencia en la que las bacterias de *Thiobacillus ferrooxidans* se adaptan al medio se observa entre las 0 h y 6 h. Posteriormente se observa la fase de crecimiento exponencial que es el tiempo en el que las bacterias se reproducen, se dio entre las 9 h y 60 h. Después la fase estacionaria se observa a entre las 60 – 63 h, terminando con la fase de muerte celular que fue desde las 66 a las 72 h que duró la toma de las muestras (Prescott, Harley, & Klein, 2004).



**Figura 12.** Observación de las curvas de crecimiento bacteriano de los tres ensayos realizados, número de bacterias vs tiempo.

Como se observa en la Figura 3.8 al realizar la ecuación de tendencia lineal con la fase de crecimiento exponencial de la curva de crecimiento microbiano se obtuvo la pendiente 1,0395 que equivale a la velocidad de crecimiento de las bacterias *Thiobacillus ferrooxidans* usados para la producción piloto del inoculante.



**Figura 13.** Línea de tendencia para *Thiobacillus ferrooxidans* en la fase de crecimiento exponencial.

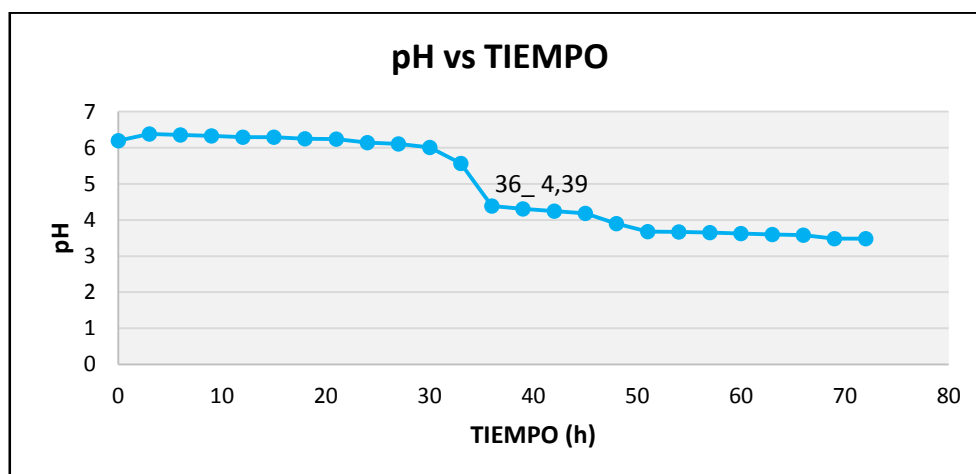
En la tabla 3.5 se observa el proceso de escalamiento, la fase exponencial que duró 48 h y presentó una velocidad de crecimiento microbiano de 1.0395 g/h, el tiempo de generación bacteriano fue 0.96 h.

**Tabla 10.**

Parámetros cinéticos de la fase exponencial.

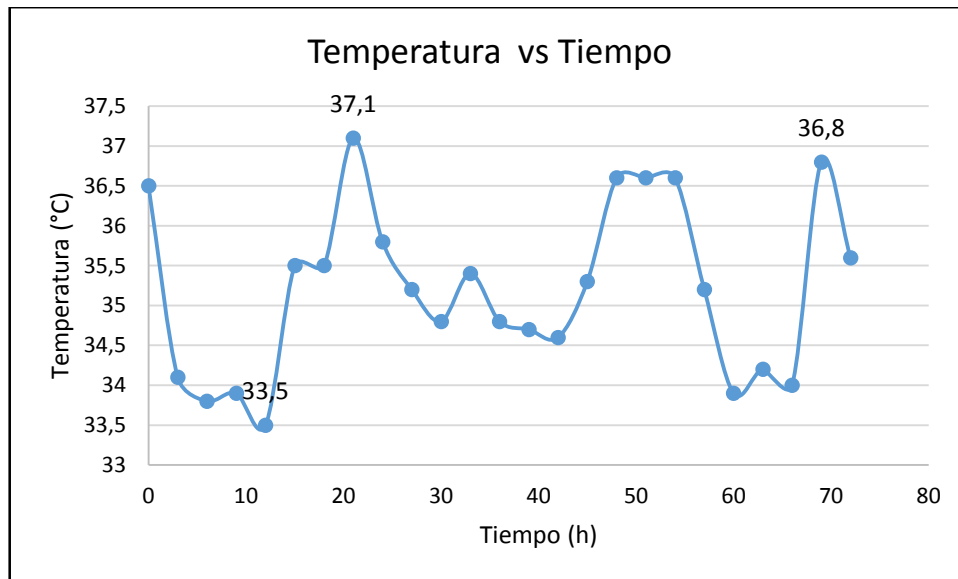
Parámetro	Valores	Fórmula
Velocidad	1.0395 g/h	Pendiente línea de tendencia
Generación	0.96 h	Velocidad <sup>-1</sup>

En la Figura 3.9 se observó que a las 36 h empieza a disminuir el pH a 4.39, coincide con el tiempo de viraje del medio de verde a amarillo.



**Figura 14** Curva de pH vs tiempo en el transcurso de 72 h de incubación.

La Figura 3.10 mostró que no existen cambios representativos de temperatura, pues se mantuvo en intervalos de 33.5 – 37.1 °C durante las 72 h de fermentación permitiendo el normal desarrollo de las bacterias.



**Figura 15.** Curva de pH vs temperatura en el transcurso de 72 h de incubación.

## **CAPÍTULO IV**

### **DISCUSIÓN**

La superficie cultivada de banano en Ecuador es de alrededor de 180 mil hectáreas, con un crecimiento de 53% durante los últimos cinco años. Su estructura productiva se caracteriza porque el 90% de los productores se concentran en fincas de hasta 50 hectáreas, dentro de las superficies más cultivadas se encuentra el sector bananero de Borbones en la provincia de El Oro (Vásquez, 2005).

Agrodiagnostic S.A ha visitado y evidenciado el problema de exceso de hierro en sus suelos, por lo cual el muestreo de este proyecto estuvo basado en el criterio de la empresa. En base a otros estudios se encontró que la concentración de Fe en los suelos son altos ( $Fe > 40\text{ppm}$ ) (Martínez, 2013). Debido a que el hierro se encuentra biodisponible para la planta de banano en exceso provoca toxicidad en la planta causando daños severos, en parte esto se debe a las características medio ambientales que posee el cultivo (Medina, 2006).

Las muestras de suelo a pesar de ser tomadas de diferentes fincas bananeras, todas presentaron características similares en su consistencia y color del suelo amarillento debido a la alta presencia de hierro (Juárez, Cerdán, & Sánchez Sánchez, 2005).

Se recolectaron 15 muestras correspondientes a 15 parcelas diferentes. Se logró aislar 26 cepas en el medio Pikovskaya modificado para hierro, para poder iniciar el estudio. Se encontraron 20 cepas de bacilos Gram negativos sin formación de esporas, y seis cepas de bacilos Gram negativos con formación de esporas los cuales fueron descartados, pues la finalidad del estudio fue aislar bacterias solubilizadoras de hierro las cuales no son esporuladas. Principalmente se esperó encontrar el género *Thiobacillus ferrooxidans*, que puede metabolizar el hierro y azufre (Colmer y Hinflé, 1947; Colmer et al, 1950).

Uno de los aspectos fundamentales para el desarrollo del proyecto fue la modificación del medio Pikovskaya, para ello se analizó los requerimientos nutricionales del género *Thiobacillus*. Se encontró que el medio de cultivo debe tener una saturación de sulfato ferroso para que solo aquellas bacterias capaces de oxidar el medio puedan crecer (Nagpal, 1997).

Si bien el medio 9K es el óptimo para el desarrollo de éste tipo de bacterias, no cuenta con un indicador que permita comprobar la solubilización del hierro dada por los microorganismos. Se tomaron los principales nutrientes del medio 9k (Tabla 1.2), además de ello en varios estudios realizados para el aislamiento de *T. ferrooxidans* el crecimiento de las bacterias tarda cinco días en incubación (Natarajan, 1997).

La empresa Agrodiagnostic S.A trabaja con el medio Pikovskaya modificándolo para lograr el crecimiento de diferentes tipos de microorganismos. Debido a que el crecimiento se puede evidenciar a partir de las 48 h y posee un indicador de azul de bromotimol que permite evidenciar el viraje del medio de verde a amarillo, es por ello que la composición del medio Pikovskaya (Tabla 1.3) fue modificada en base a los requerimientos del medio 9K, muchos de los componentes coincidieron entre ambos medios, se utilizó como fuente de carbono a la glucosa en base al estudio realizado por (Khan, Haq, Hasan, & Saeed, 2012).

El medio Pikovskaya modificado para hierro (Tabla 2.1), fue saturado a un 33% de sulfato ferroso siguiendo la recomendación de Arias (2013). Determinadas bacterias oxidantes de hierro y/o azufre (*Thiobacillus thiooxidans*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*) obtienen energía a través de la oxidación del hierro ferroso y compuestos reducidos de azufre, acidificando los suelos como consecuencia de la producción de ácido sulfúrico y consecuentemente solubilizando sulfuros metálicos y otros compuestos metálicos (Ortiz, 2006).

Se realizaron pruebas experimentales que permitieron encontrar la composición adecuada de cada elemento inorgánico, que permita el crecimiento de bacterias solubilizadoras de hierro. Se tomó la composición del

ensayo donde se obtuvo mayor crecimiento bacteriano. Uno de los principales parámetros a controlar en el medio de cultivo fue el pH, ya que el crecimiento de *T. ferrooxidans* está comprendido entre 2.0 a 2.5, sin embargo el pH del medio se estabilizó a 3, solo incrementándose en 0.5, sin tener problemas en el desarrollo de las bacterias, que crecieron en su mayoría de color amarillo y naranja (77% de las cepas aisladas), reflejando las características de las bacterias de interés (Vullo, 2003).

Una vez modificado el medio de cultivo se realizaron como comprobaciones de solubilización la siembra de las 20 cepas Gram negativas no esporuladas. Al confirmar la cepas, se procedió a su aislamiento y conservación en cultivo puro en el medio Agar nutriente, uno de los medios utilizados en los procesos de biolixiviación (Natarajan, 1997).

El objetivo del proyecto fue lograr obtener un inoculante bacteriano líquido, conformado solamente por microorganismos capaces de oxidar el  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  que permitan una eficiente movilización de los componentes férricos en el suelo. Por lo tanto al lograr aislar cepas del género *Thiobacillus* garantiza la oxidación del hierro lo cual concuerda con los géneros predominantes en suelo ácidos como *Thiobacillus* y *Leptospirillum* (Norris, et al, 1990).

Para las pruebas de antagonismo, algunos valores fueron negativos por no tener halo de inhibición, por lo cual debieron ajustarse los datos en el mínimo de 1mm o se obtuvo el promedio de los datos de los dos ensayos con valores no negativos. Una vez corregidos los datos se ingresaron en el programa XLSTAT, que realizó todos los análisis estadísticos de ANOVA, y test de DUNCAN. De ésta manera se corrigieron errores que pudieran haber ocurrido durante la medición del halo (Rada & Merino, 2007).

De las pruebas de antagonismo realizadas se encontraron 12 cepas compatibles con capacidad solubilizadora, al identificarlas mediante pruebas bioquímicas siguiendo la clave de (Khan, Haq, Hasan, & Saeed, 2012), se encontraron cinco cepas de *Thiobacillus ferrooxidans*, dos cepas de *Thiobacillus thiooxidans* y dos cepas de *Pseudomonas s.p.*, para realizar el inoculante bacteriano solo se conservaron las cepas de *Thiobacillus*



*ferrooxidans*, debido a que *Thiobacillus thiooxidans* posee inhabilidad para oxidar el hierro ferroso y sulfuros minerales (Torma, 1985), por otro lado las cepas de *Pseudomonas s.p* fueron descartadas porque en algunos casos suelen ser patógenas en cultivos de banano (Quito, 2007).

Las cepas aisladas identificadas como Solubilizadoras de hierro fueron incubadas durante 24 horas para obtener mejores resultados en la conservación mediante el método de criopreservación en viales a  $-20^{\circ}\text{C}$ , utilizando glicerol al 30% como agente crioprotector. A pesar de ser almacenadas en fundas herméticas existieron ciertas contaminaciones, por lo cual cada vez que se realizaba un nuevo proceso del estudio, se realizó coloración Gram para verificar su pureza, en caso de existir contaminantes, se aisló nuevamente en medio agar nutriente y Pikovskaya (Bayona, 2003).

Una vez aisladas, seleccionadas y purificadas, se llevaron curvas de crecimiento con un espectrofotómetro de acuerdo al método usado por Stanbury (1988), se tomó lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 650nm ( $DO_{650}$ ), ( $DO_{650}$ ) donde la solución patrón fue el medio de cultivo estéril, al medir su absorbancia esta fue de 0.205. Mediante la curva de crecimiento se encontró que el máximo de concentración de bacterias de 110 g/L se dio a las 66 h aproximadamente (Juárez, 2004).

Los resultados obtenidos por la curva de pH versus tiempo mostraron que el *Thiobacillus ferrooxidans* puede utilizar el catión  $\text{Fe}^{3+}$  como último aceptor de electrones en lugar de  $\text{O}_2$ , con valores de pH menores a 5.5. En el presente proyecto se alcanzó una disminución en el pH a las 66 h este fue de 3.4, sin embargo si el tiempo de fermentación hubiese sido mayor a las 72h el valor de pH disminuiría continuamente, claro que el valor alcanzado está en el punto de mayor crecimiento bacteriano. Así se comprobó que la velocidad de oxidación de *T. ferrooxidans* depende del pH, temperatura y concentración de quelatos de hierro en la solución redox (Perez, 2005).

Debido a que el pH en la fase de laboratorio es controlada, se deberá analizar como investigación futura la capacidad de *Thiobacillus ferrooxidans* a adaptarse en el suelo de la bananera, pues el pH del suelo cumple un rol

importante en la presencia de óxidos e hidróxidos de hierro en él, la biodisponibilidad del hierro decrece cuando el pH se torna básico y aumenta cuando el pH es ácido (Aguado, 2012).

En la fase exponencial las bacterias comienzan a reproducirse y la velocidad de crecimiento varía dependiendo de las condiciones ambientales como la temperatura y composición del medio de cultivo o por las características genéticas de los microorganismos. Los valores de pH empiezan a disminuir debido al consumo y degradación de la glucosa como fuente de carbono que producen ácidos orgánicos que acidifican el pH del medio (Bobadilla, 2008).

En la fermentación durante 72 h de incubación se realizó la curva de temperatura versus tiempo, la temperatura debió mantenerse constante a 35°C, pero por motivos de medición de otros parámetros existieron ciertas fluctuaciones. En la figura 3.10 se observa que la temperatura se mantuvo entre 33.5 – 37.1 °C, lo cual concuerda con estudios realizados por Khan (2012), donde los cultivos se incubaron a 30 ° C hasta que el color del medio cambió de ladrillo a rojo indicando que el hierro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) fue oxidado por acción de las bacterias. En el proyecto se pudo evidenciar el viraje del medio a las 36 h, en el punto exacto donde el pH empieza a disminuir (Khan, Haq, Hasan, & Saeed, 2012).

La obtención de un inoculante biológico permitirá que los suelos puedan ser transformarse en cultivos orgánicos, en el caso específico del cultivo de banano las prácticas agrícolas con este tipo de inoculantes mejoraran la estructura del suelo y de la microfauna nativa. Al usar microorganismos propios del sector de Borbones se garantiza que no serán patógenos para la planta ni crearán efectos secundarios adversos a futuro, de esta manera no solo se mejorará la calidad del cultivo sino las especies que se alimenten de ella. Al final la biolixiviación que se produce por medio de *Thiobacillus ferrooxidans* permitirá un suelo equilibrado en nutrientes (Suquilanda Manuel B, 1996 - Crow, 2006).

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES

De las muestras de suelo de cultivo de banano procesadas se logró aislar 26 cepas de las cuales 20 fueron bacilos Gram negativos no esporulados, y seis bacilos Gram negativos esporulados.

De 20 cepas de bacilos Gram negativos no esporulados que fueron sometidas a pruebas de antagonismo, 12 no mostraron significancia en el test de Duncan con un 95 de confianza, presentando antagonismo negativo al tener un halo menor a 10 mm.

Se obtuvo cinco cepas correspondientes a la especie *Thiobacillus ferrooxidans*, dos fueron *Pseudomonas s.p.*, y dos *Thiobacillus thiooxidans*, pertenecientes a la microflora de suelos de cultivos de banano del sector de Borbones en la provincia de El Oro.

Durante el escalamiento se determinó la curva de crecimiento y se evidenció viraje del medio a las 36 horas debido a la disminución de pH a 4.39, pH en el cual las bacterias *Thiobacillus ferrooxidans* pueden reproducirse; con un punto máximo de crecimiento a las 66 horas a un pH de 3.48.

La cinética exponencial en el proceso de fermentación arrojó una velocidad de crecimiento microbiano  $k=1.0395$  g/h, con un tiempo de generación  $g=0.96$  horas, que es el tiempo aproximado de duplicación de las bacterias del género *Thiobacillus ferrooxidans*.

La temperatura en la fase de escalamiento osciló entre 33.5 y 37.1 °C permitiendo un buen desarrollo de los microorganismos.

## CAPÍTULO VI

### RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar un estudio de la remoción de hierro mediado por *Thiobacillus ferrooxidans* en el suelo de cultivo de banano en el sector de Borbones evaluando su capacidad de biosolubilización de hierro (Vullo, 2003).

Se recomienda realizar la caracterización molecular de las cepas aisladas de *Thiobacillus ferrooxidans* para obtener datos más exactos para una comprobación de la identificación de los microorganismos aislados.

Se recomienda valorar la capacidad de solubilización de hierro que tendría un inoculante de *Thiobacillus ferrooxidans* junto con *Thiobacillus thiooxidans*. También realizar un estudio si es factible aislar microorganismos productores sideróforos como *Pseudomonas* que utilizan otro mecanismo de solubilización de hierro y permiten un mejor desarrollo de la planta (Aguado-Santacruz, 2012)

Se recomienda en un estudio futuro diseñar un reactor a escala industrial que provea de las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos para la producción de un biofertilizante para la solubilización de hierro.

Es necesario realizar pruebas de invernadero y de campo para comprobar la capacidad de solubilización de hierro del inoculante en plantaciones de banano y también para determinar así la cantidad de inoculante que va a ser usada en el cultivo.

## CAPÍTULO VII

### BIBLIOGRAFÍA

- Abbayes, H., Chadeaud, M., Feldmann, J., & Ferré, Y. (1989). *Botánica Vegetales Inferiores*. París: Reverté.
- Aguado, G. M. (2012). Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *FITOTEC*, 4-5.
- Aguado-Santacruz, G. M.-G.-F. (2012). Impacto de los Sideróforos microbianos y Fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas. *Fitotec*, 9-21.
- Anaya, A. E.-G.-O. (2001). *Relaciones químicas entre organismos: Aspectos básicos y perspectivas de su aplicación*. México: P y V editores.
- Arias, V. A. (2013). Adaptación de Thiobacillus ferrooxidans a sustratos conformados con especies de minerales piríticos. *Ingeniería Metalúrgica, UNMSM*, 2-11.
- Azario, R., Salvarezza, S., Ibarra, A., & García, M. (2010). Efecto del Cromo Hexavalente y Trivalente sobre el Crecimiento de Escherichia coli ATCC 35218. *Información Tecnológica: Química y aplicaciones*, 21(1), 51-56.
- Benavides, A. (julio de 1999). Absorción y asimilación de hierro en las plantas. *Departamento de horticultura*, 3-4. Obtenido de [http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/hierro\\_en\\_plantas.pdf](http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/hierro_en_plantas.pdf)
- Bienfait, H. F. (1989). Prevention of stress in iron metabolism of plants. *Acta Bot. Neerl* 38, 105-129.
- BIOFAG. (2008). *Red Iberoamericana de Fertilizantes Biológicos para la Agricultura y el Medio Ambiente*. Obtenido de <http://www.biofag.org.ar>
- Bobadilla, C. R. (2008). Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenidos de residuos de plaza. *Pontificia Universidad Javeriana. Carrera de Microbiología Industrial*, 25-33.
- Bruneton, J. (2008). *Farmacognosia, Fotoquímica y Plantas Medicinales*. ACRIBIA.

- Corrales, L. A. (2014). Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *Revista NOVA*, 1-5.
- Crespi, J. (2006). *Historical Overview o the European Union Banana Import Polic*.  
Obtenido de <http://www.afese.com/img/revistas/revista53/comerbanano.pdf>
- Crow, P. (2006). Aplicación de métodos estadísticos multivariados en el estudio de calidad de enmiendas orgánicas sólidas y líquidas preparadas en las provincias de Guayas, Los Ríos y El Oro. *Escuela Superior Politécnica del Litoral. Instituto de Ciencias Matemáticas*.
- Crow, P. (2006). Aplicación de métodos estadísticos multivariados en el estudio de calidad de enmiendas orgánicas sólidas y líquidas preparadas en las provincias de Guayas, Los Ríos y El Oro. *ESPOL*.
- Cruz-Sánchez, M. O.-H.-C.-S. (2004). El papel de óxidos de hierro en suelos. *Terra Latinoamericana*, 485-497.
- Cundom, M. M. (marzo de 2010). *Actividad antagónica in vitro de aislamientos de Trichoderma sp. sobre esclerosis de Sclerotinia sclerotiorum*. Obtenido de Web de la Universidad Nacional del Nordeste:  
[http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/2000/5\\_agrarias/a\\_pdf/a\\_042.pdf](http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/2000/5_agrarias/a_pdf/a_042.pdf)
- De la Rosa, M., Prieto, J., & Navarro, J. (2011). *Microbiología en ciencias de la salud. Conceptos y aplicaciones* (3era edición ed.). Barcelona: Elsevier.
- Decheco, A. (2011). Metabolismo Microbiano. *INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE LA FIPA. Universidad del Callao. Perú*, 204-206.
- Devlin, R. (1982). *Fisiología Vegetal* (Cuarta edición ed.). Barcelona, España: Editorial Omega S.A.
- Díaz, P. (2007). Estudio de la actividad oxidativa y crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en la oxidación de ión ferroso en presencia de carbón activado. *Departamento de Ingeniería química y Biotecnología. Universidad de Chile*, 4-8.
- Duque, C. (1998). *Industria avícola: Impacto ambiental y aprovechamiento de los residuos*. Colombia: Seminario internacional. Gestión integral de residuos sólidos y peligrosos, siglo XXI. Programa Nacional de Biotecnología Animal.
- Echeverría. (2007). *Producción de biofertilizante a partir de cepas autóctonas de Azotobacter spp mediante fermentación discontinua en caldo pikovskaya modificado y caldo alternativo a escala de 10 litros*. Escuela Politécnica del Ejército, Ciencias de la Vida y la Agricultura, Sangolquí.
- Guayasamín, G. (2015). Desarrollo de un medio de cultivo para producir Leucotocin a partir de *Mannheimia haemolytica*. *Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales. Universidad Politécnica Salesiana*, 9-11.

- Huilcapi, J. (2007). Aislamiento e identificación de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador. Ingeniería en Biotecnología. Universidad de las Fuerzas Armada - ESPE. 41-42.
- INEC, & CONAVE. (2013). *Instituto Nacional de Estadística y Censos*. (G. N. Ecuador, Editor) Recuperado el 15 de Julio de 2015, de Ecuador en Cifras. Procesador de estadísticas agropecuarias. Visualizador de estadísticas agropecuarias del Ecuador: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/procesador-de-estadisticas-agropecuarias-3/>
- INIAP-PROMSA. (2003). *Determinación de metales contaminantes en cultivos de exportación y su repercusión sobre la calidad de los mismos*. INIAP, Los Ríos.
- Juárez, A. (2004). Biolixiviación de minerales sulfuro-ferroso en jales: aislamiento y caracterización de ucltivos puros y mixtos de microorganismos involucrados. *Universidad de Colima: Facultad de Ciencia Biológicas y agropecuarias.*, 2-18.
- Juárez, M., Cerdán, M., & Sánchez Sánchez, A. (2005). Hierro en el sistema suelo - planta. *Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante*, 1-22.
- Kampfenkel, K. V. (1995). Effects of Iron Excess on *Nicotiana plumbaginifolia* Plants (Implications to Oxidative Stress). *American Society of Plant Biologists*, 725-735. Obtenido de <http://www.plantphysiol.org/content/107/3/725.full.pdf+html>
- Khan S., H. F. (2012). Isolation and Characterization of Acidophilic Sulphur and Iron. Oxidizing Acidithiobacillus ferrooxidans from Black Shale. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 85-94. Recuperado el 13 de 10 de 2015, de [http://www.innspub.net/wp-content/uploads/IJB-V2No2-p85-94\(1\).pdf](http://www.innspub.net/wp-content/uploads/IJB-V2No2-p85-94(1).pdf)
- Khan, S., Haq, F., Hasan, F., & Saeed, K. (2012). Isolation and Characterization of Acidophilic Sulphur and Iron. Oxidizing Acidithiobacillus ferrooxidans from Black Shale. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 85-94.
- López, A. y. (1995). Manual de Nutrición y Fertilización del Banano. *Instituto de la Potasa y el Fósforo*, 1-3.
- Mandigan, M. M. (1997). *Brock Biology of Microorganism*. Prentince Hall International, Inc.
- Martínez, Y. H.-P. (2013). Mapeo de Zinc y Hierro en suelos Ecuatorianos para la focalización de áreas potenciales para la biofortificación agronómica del cultivo de la papa. *V Congreso Ecuatoriano de la Papa. INIAP*, 8.
- Medina, E. (2006). Estudios de suelos, nutrición y fertilización en varias zonas bananeras del Ecuador. *X Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo. Guayaquil – Ecuador.*, 2-4. Obtenido de <http://www.secsuelo.org/wp-content/uploads/2015/06/8.-Estudios-de-Suelos.pdf>

- Menadier, M. (2009). Biolojivación de piritas por *Acidithiobacillus ferrooxidans* y cepas nativas. 3-10.
- Murad y Fischer. (1998). *Research Gate*. Obtenido de [https://www.researchgate.net/figure/39436232\\_fig1\\_Fig-1-Ciclo-del-hierro-en-el-suelo-Adaptada-de-Murad-y-Fischer-1988](https://www.researchgate.net/figure/39436232_fig1_Fig-1-Ciclo-del-hierro-en-el-suelo-Adaptada-de-Murad-y-Fischer-1988)
- Nagpal, S. (1997). A structured model for *Thiobacillus ferrooxidans* growth on ferrus iron . *Biotechnology and bioengineering*, 310-319.
- Natarajan, K. M. (1997). Some microbiological aspects of bauxite mineralization and beneficiation. *Minerals and Metallurgical Processing*, 47-53.
- Navarro, C. (2011). Cinética del crecimiento y determinación de la fase de muerte en *Staphylococcus aureus* Cowan I bajo diferentes condiciones nutricionales. *Facultad experimental de ciencias. Universidad de Zulia*, 24-30.
- Novillo, F. y. (2001). Indicadores de la actividad bananera en el Ecuador. *Organización Mundial de Comercio, Reporte del Panel: Comunidades Europeas – Régimen para la importación, venta y distribución de bananas*.
- Ortiz, I. S. (2006). Técnicas de recuperación de suelos contaminados. *Informa de vigilancia tecnológica*, 44-45.
- Padrón, E. (1996). Diseño Completamente al Azar. *Diseños experimentales con aplicación a la agricultura y la ganadería*.
- Paguay, L. V. (2013). Aislamiento de bacterias solubilizadoras de calcio de la rizósfera de cultivos de alcachofa (*CYNARA SCOLYMUS*) ubicados en Laso-Latacunga-Cotopaxi. *Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales. Universidad Politécnica Salesiana*, 78.
- Perez, H. V. (2005). Desulfuración biológica: una alternativa para el tratamiento de emisiones de gases a la atmósfera. *AIDIS*, 17-19.
- Pérez, N., Vásquez, A., & Ismael, G. -P. (2015). Adaptación de la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans* a partir de drenajes ácidos de minas de carbón para su uso en la recuperación de oro diseminado en concentrados gravimétricos. *Universidad Francisco de Paula Santander*, 82-84.
- Prescott, L., Harley, J., & Klein, D. (2004). *Microbiología* (Quinta Edición ed.). Madrid, España: McGraw-Hill Interamericana de España.
- ProEcuador. (2013). Análisis del sector banano. *Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones*, 1-5.
- Quintero, D. (2003). Biolixivación de aluminio y hierro presente en Bauxita Gibbsítica usando cepas heterótrofas indígenas. *Departamento de biología. Universidad De Los Andes. Merida, México*, 23-38.



- Quito, D. (2007). Estudio Comparativo de dos Biofertilizantes Líquidos en Condiciones in vitro e Invernadero en Plantas de Banano y su Efecto en el Desarrollo de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Escuela Superior Politecnica del Litoral, Ingeniería Agropecuaria*, 3-9.
- Rada, G., & Merino, T. (2007). *Medición de variables, error de medición y sesgo*. Universidad Católica de Chile. Santiago: Epicentro. Obtenido de <http://escuela.med.puc.cl/recursos/recepidem/PDF/INSINTROD3.pdf>
- Rehm, S., & Espig, G. (1976). *Cultivos del trópico y subtrópico*. Ulmer.
- Rivera, R. C.-M. (2011). Estudio de biolixiviación de un mineral de sulfuros de cobre de baja ley co bacterias Tio- y Ferro- oxidantes en condiciones termófilas. *Revista de la Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional Autónoma de México.*, 66-67.
- Rodríguez, A. (2009). Estudio de la factibilidad de la producción y comercialización de banano (*Musa sp.*), variedad Gran enano Cavendish, en Quevedo, provincia de Los Rios. *Colegio de Agricultura, Alimentos y Nutrición. Departamento de Agroempresas. Universidad San Francisco de Quito*, 31.
- Rodríguez, E. R. (2002). *Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias termofílicas aeróbicas, con actividad proteolítica, a partir de pilas de compost en fase termofílica*. Obtenido de Biología. org: <http://www.biologia.org/revista/pdfs/54.pdf>
- Römheld, V. M. (1986). Thythmic iron stress reactions in sunflower at suboptimal iron supllly. *Physiol Plant.* 53, 347-354.
- Rossi, G. (1990). *Biohydrometallurgy*. Hamburg: McGraw Hill.
- Schwertmann, U. T. (1989). Iron Oxides. In Mineral in soil environments. (J. B. Dixon, Ed.) *Soil Science Society of America, 2nd edition.*, 379-438.
- Silver, S. y. (1988). Plasmid- mediated heavy metal resistances. *Annual reviews on Microbiology*, 42-43.
- Suquilanda, M. (1996). *Agricultura Orgánica. Alternativa tecnologica del futuro. Fundagro.*
- Torres, A. (2008). Efecto de la fertilización con Bioles durante la fase de Vivero de *Swietenia macrophylla* (CAOBA). *Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencia de la Producción. ESPOL*, 19-20.
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología* (9na edición ed.). Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Uren, N. C. (1984). Forms, reactions and availability of iron in soils. . *J. Plant Nutr*, 165-176.

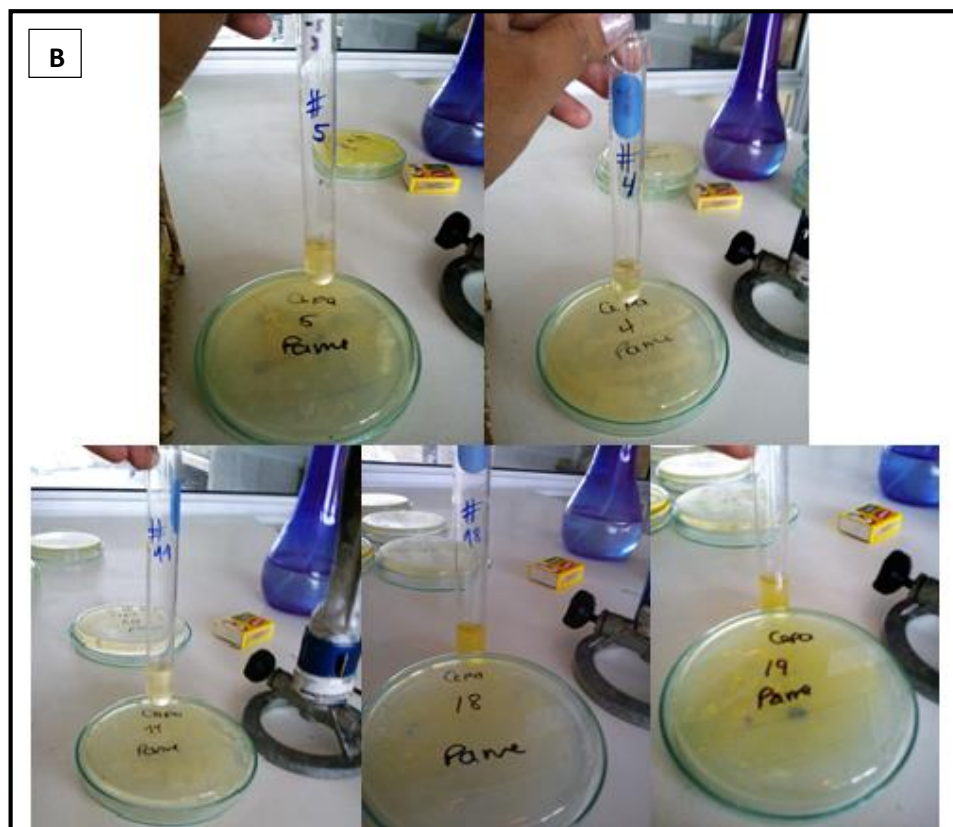
Vasquez, E. C. (2005). Perspecctivas de las exportaciones de banano de Ecuador frente al Régimen de arancel único de la Comunidad Económica Europea aplicable a partir del primero de enero del 2006. *Universidad de Barcelona*, 2.

Vegunopal, R., Sharma, T., Saxena, V., & N.R, M. (2005). *Mineral Processing Technology*. Dhanbad, India: Tata McGraw-Hill Publishing Company Limites.

Vullo, D. (2003). MICROORGANISMOS Y METALES PESADOS: UNA INTERACCIÓN EN BENEFICIO DEL MEDIO AMBIENTE. *Química Viva*, 1-5.

## ANEXOS

**ANEXO A:** Cepas de *Thiobacillus ferrooxidans* que conforman el inoculante bacteriano.



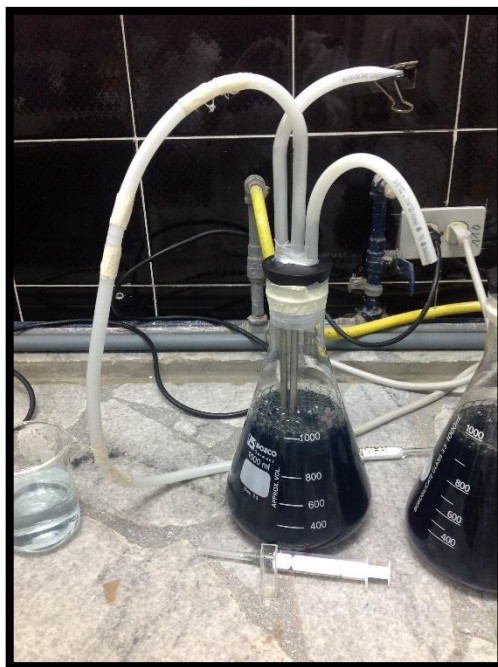
A) Cepas de *Thiobacillus ferrooxidans* en incubación para elaboración de ceparios, B) Cepas de *Thiobacillus ferrooxidans* para elaboración del inóculo microbiano.

**ANEXO B:** Equipos utilizados durante la fase de escalamiento del inoculante bacteriano.



A) Espectrofotómetro Thermo, modelo GENESIS 10UV, B) pH metro HACH, modelo SensION 1, C) motor para pecera Lifetech (aireador).

**ANEXO C:** Ensamble del proceso de fermentación a escala de 1 litro.



Biorreactor discontinuo aireado para el escalamiento a 1 L de *Thiobacillus ferrooxidans*.