

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS
FOSFATO SOLUBILIZADORAS A PARTIR DE
MUESTRAS DE SUELO Y RAÍZ, DE DIFERENTES
CULTIVOS DE ROSAS DE LA PROVINCIA DE
PICHINCHA, ECUADOR 2007**

Previa a la obtención de Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

JENNIFFER VERÓNICA HUILCAPI SALAZAR

SANGOLQUÍ, 29 de MARZO 2007

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. Jenniffer Verónica Huilcapi Salazar como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología.

Fecha

M.Sc. Alma Koch

Directora

Dra. Blanca Naranjo

Codirectora

DEDICATORIA

A Dios que gracias a él todo es posible.

A mis padres Luis, Charito a mis hermanas Karina y Jeannteh por estar siempre a mi lado y brindarme su apoyo incondicional.

A mis amigos y sobre todo a mi angelito que siempre lo tendré presente.

Jenniffer V. Huilcapi S.

AGRADECIMIENTO

A Karlita y Pablo Serrano por colaboración y sobre todo por su amistad, gracias amigos.

A M.Sc. Alma Koch por su oportuna colaboración y tiempo dedicado a este trabajo

A la Dra. Blanca Naranjo por su asesoría, ayuda y buena voluntad.

Al Ing. Marco Taipe y al Ing. Daniel Hidalgo por su acertada colaboración en la parte estadística de la investigación.

A MSc. María Mercedes Martínez y MSc. Luciana Díaz profesoras de la Pontificia Universidad Javeriana de Colombia, por su asesoramiento en cuanto a la metodología y datos teóricos.

A mis profesores de la Facultad y demás colaboradores.

Y a todos mis amigos y amigas de carrera que de alguna o de otra forma siempre me brindaron su amistad incondicional.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PÁGINA

CAPÍTULOS

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Problemática.....	2
1.2 Justificación.....	4
1.3 Objetivos de la Investigación.....	5
1.3.1 Objetivo General.....	5
1.3.2 Objetivos Específicos.....	6
1.4 Marco Teórico.....	6
1.4.1 Tipos microbianos solubilizadores de fósforo.....	6
1.4.1.1 Actividad de los microorganismos solubilizadores de fósforo.....	10
1.4.1.2 Requerimientos nutricionales microbianos.....	12
1.4.1.3 Factores que afectan a la solubilización del fósforo.....	12
1.4.2 Suelo de las florícolas.....	13
1.4.2.1 Ciclo del Fósforo.....	16
1.4.2.2 Transformaciones del fósforo en el suelo.....	21
1.4.3 Fertilizantes.....	21
1.4.3.1 Compatibilidad química de los fertilizantes.....	23
1.4.3.2 Biofertilizantes.....	26
1.5 Hipótesis.....	29
1.5.1 Hipótesis Alternativa.....	29

1.5.2 Hipótesis Nula.....	29
---------------------------	----

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Recolección de muestras.....	31
2.2 Aislamiento de microorganismos.....	33
2.2.1 Incubación.....	33
2.2.2 Diluciones.....	34
2.2.3 siembra.....	34
2.2.4 Selección.....	35
2.3 Métodos para la identificación de microorganismos solubilizadores de fósforo.....	36
2.3.1 Descripción macroscópica.....	36
2.3.2 Descripción microscópica.....	37
2.3.3 Pruebas bioquímicas.....	37
2.3.3.1 Pruebas para bacilos gram negativos y positivos.....	37
2.3.3.2 Prueba para bacilos Gram negativos.....	38
2.4 Preparación de ceparios primarios y secundarios.....	39
2.5 Determinación de similitud de microorganismos entre florícolas.....	40
2.6 Prueba de actividad fosfolubilizadora.....	40
2.7 Pruebas de antagonismo.....	41
2.8 Diseño estadístico.....	43

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1 Recolección de muestras.....	46
3.2 Siembra.....	46
3.3 Aislamiento.....	47

3.4	Identificación de microorganismos aislados.....	49
3.5	Ceparios.....	52
3.6	Determinación de similitud de microorganismos aislados de las florícolas.....	52
3.7	Evaluación de la actividad fosfolubilizadora de los microorganismos aislados...	52
3.7.1	Análisis de solubilización de los microorganismos aislados de la florícola 1..	55
3.7.2	Análisis de solubilización de los microorganismos aislados de la florícola 2..	56
3.7.3	Análisis de solubilización de los microorganismos aislados de Florifrut.....	57
3.7.4	Análisis de solubilización de los microorganismos aislados de Rosas de los Andes.	57
3.7.5	Análisis de solubilización de los microorganismos aislados de Zamvelflor....	58
3.8	Pruebas de antagonismo.....	59
 CUARTO IV: RESULTADOS		
4.1	Recolección de muestras.....	61
4.2	Sembrando y aislamiento.....	61
4.3	Identificación.....	63
4.4	Ceparios.....	63
4.5	Determinación de similitud de microorganismos entre florícolas.....	66
4.6	Evaluación de la actividad fosfolubilizadora de los microorganismos aislados...	66
4.7	Pruebas de antagonismo.....	67
4.8	Propuesta.....	67
 CONCLUSIONES.....		
		71
 RECOMENDACIONES.....		
		74
 BIBLIOGRAFÍA.....		
		76
 ANEXOS.....		
		83

ÍNDICE DE TABLAS

PÁGINA

Tabla 2.1 Sitios de recolección de las muestras de raíz y suelo tomadas de rosas de varias florícolas de la provincia de Pichincha.....	32
Tabla 2.2 Pruebas bioquímicas para identificación de microorganismos Pruebas bioquímicas utilizadas para el aislamiento e identificación de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	37
Tabla 3.1 Número de Colonias solubilizadoras de fósforo por florícola a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	48
Tabla 3.2 Sitio del aislamiento de los microorganismos solubilizadores de fósforo a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	48
Tabla 3.3 Número de colonias solubilizadoras de fósforo clasificadas por tinción Gram a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	49
Tabla 3.4 Microorganismos solubilizadores de fósforo aislados e identificados a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	50
Tabla 3.5 Microorganismos fosfosolubilizadores comunes aislados dos florícolas a partir de muestras de suelo y raíz de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	52
Tabla 3.6 Microorganismos con buena actividad solubilizadora de fósforo su respectivos datos de halos de solubilización (promedios), aislados e identificados a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	53

ÍNDICE DE CUADROS

	PÁGINA
Cuadro 1.1 Niveles adecuados de nutrientes en la solución del suelo.....	15
Cuadro 1.2 Formas de fósforo en el suelo.....	20
Cuadro 1.3 Análisis de abonos comunes y de algunos materiales orgánicos.....	23
Cuadro 1.4 Compatibilidad química entre fertilizantes en solución.....	24

ÍNDICE DE FIGURAS

PÁGINA

Figura 1.1 Rangos de pH asociados a la solubilización de fósforo por bacterias.....	7
Figura 1.2 Ciclo biogeoquímico del fósforo.....	17
Figura 2.1 Toma de muestras de raíz y suelo de rosas de invernadero para el aislamiento e identificación de bacterias fosfolubilizadoras de varios cultivos de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	33
Figura 2.2 Raíz principal de cultivo de rosas para el aislamiento e identificación de bacterias fosfolubilizadoras de varios cultivos de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	33
Figura 2.3 Caldo Pikovskaya utilizado para la pre- inoculación de muestras de suelo y raíz para el aislamiento e identificación de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	34
Figura 2.4 Agar Pikovskaya y Halos de Solubilización de fósforo formados por microorganismos fosfato solubilizadores aislados de varios cultivos de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	35
Figura 2.5 Medios utilizados para el aislamiento e identificación de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	36
Figura 2.6 Batería bioquímica utilizada en la investigación para el aislamiento e identificación de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	38
Figura 2.7 Prueba de KOO2 HiAssorted utilizada en la investigación para el aislamiento e identificación de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	38
Figura 2.8 Halos de solubilización de fósforo producidos en Agar Picovskaya por Actinomyces spp. a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007	41

Figura 2.9 Prueba de antagonismo realizada entre <i>Pseudomonas fluorescens</i> confrontada con <i>Azotobacter</i> sp. aisladas a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	42
Figura 2.10 Antagonismo positivo y Antagonismo negativo entre bacterias solubilizadoras de fósforo tomadas a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	43
Figura 3.1 Muestras de raíces tomadas de varias florícolas para el aislamiento el identificación de bacterias fosfolubilizadoras de varios cultivos de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	46
Figura 3.2 Crecimiento de diferentes microorganismos solubilizadores de fósforo en Agar Pikovskaya tomados de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	47
Figura 3.3 Crecimiento en Agar Picovskaya de microorganismos solubilizadores de fósforo sembrados por diluciones a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	47
Figura 3.4 Porcentajes de los sitios de aislamiento de microorganismos solubilizadores de fósforo a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	49
Figura 3.5 Microorganismos aislados en Agar Picovskaya con capacidad solubilizadora a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	51
Figura 3.6 Porcentaje de los géneros solubilizadores de fósforo aislados e identificados a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	51
Figura 3.7 <i>Pseudomonas fluorescens</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> Biotipe III, bacterias aisladas con buena capacidad solubilizadora a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	54
Figura 3.8 Actividad fosfolubilizadora, Promedio de halos y Desviación estándar de las colonias aisladas a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	54
Figura 3.9 Promedio de Halos de Solubilización de fósforo de las bacterias aisladas a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	55

Figura 3.10 Promedio de Halos de Solubilización de fósforo de las bacterias aisladas de la Florícola No. 1 a partir de muestras de suelo y raíz, de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	56
Figura 3.11 Promedio de Halos de Solubilización de fósforo de las bacterias aisladas de la Florícola No. 2 a partir de muestras de suelo y raíz, de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	56
Figura 3.12 Promedio de Halos de Solubilización de fósforo de las bacterias aisladas de la Florícola Florifrut a partir de muestras de suelo y raíz, de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	57
Figura 3.13 Promedio de Halos de Solubilización de fósforo de las bacterias aisladas de la Florícola Rosas de los Andes a partir de muestras de suelo y raíz, de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	58
Figura 3.14 Promedio de Halos de Solubilización de fósforo de las bacterias aisladas de la Florícola Zanvelflor a partir de muestras de suelo y raíz, de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	59

INDICE DE ANEXOS

PÁGINA

Anexo A. Diagrama de Flujo Básico del Proceso para es aislamiento e identificación de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	83
Anexo B. Materiales de toma de muestras para el aislamiento e identificación de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	84
Anexo C. Medios de cultivos utilizados para aislamiento e identificación de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	85
Anexo D. Descripción macroscópica de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	87
Anexo E. Pruebas Bioquímicas de las colonias fosfato solubilizadoras aisladas a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	90
Anexo F. Prueba KBOO2 HiASSRTED utilizadas para la identificación de bacterias fosfato solubilizadoras aisladas a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	95
Anexo G. Resultados de la evaluación de la actividad fosfatos solubilizadora de las bacterias fosfato solubilizadoras aisladas a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	97
Anexo H. Resultados de las pruebas de antagonismo realizada a bacterias fosfato solubilizadoras aisladas a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007.....	101

LEGALIZACIÓN DEL PROYECTO

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS
FOSFATO SOLUBILIZADORAS A PARTIR DE MUESTRAS DE
SUELO Y RAÍZ, DE DIFERENTES CULTIVOS DE ROSAS DE
LA PROVINCIA DE PICHINCHA, ECUADOR 2007**

ELABORADO POR:

JENNIFFER V. HUILCAPI S.

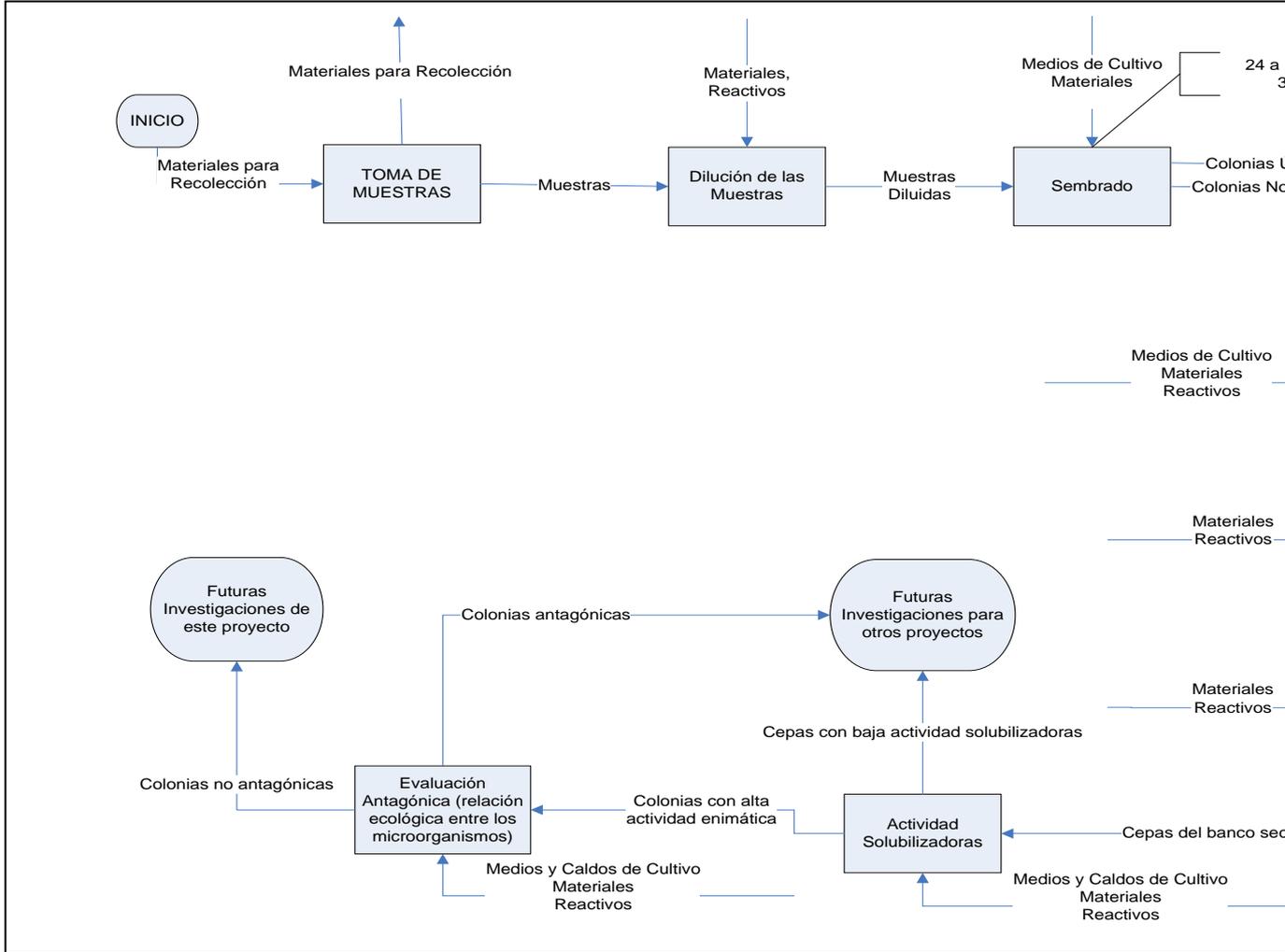
CARRERA DE INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA

COORDINADORA

Sangolquí, 29 de Marzo de 2007

ANEXO A

Diagrama de Flujo Básico del Proceso para aislamiento e identificación de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007



ANEXO B

Materiales de toma de muestras para el aislamiento e identificación de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007

- Fundas plásticas
- Palas pequeñas de jardinería
- Etiquetas adhesivas
- Esfero
- Cámara fotográfica
- Transportador frío



Figura B.1: Recolección de suelo para el aislamiento e identificación de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007

Figura B.2: Recolección de raíces para el aislamiento e identificación de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007



ANEXO C

Medios de cultivos utilizados para aislamiento e identificación de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007

Los medios utilizados en el proyecto fueron tomados del Manual de Microbiología de MERCK ⁽³⁰⁾

Tabla C.1: Medio Pikovskaya

Reactivo	Cantidad
Glucosa	10 gr / L
Fosfato tricálcico	5 gr / L
Cloruro de potasio	0.2 gr / L
Sulfato de amonio	0.5 gr / L
Sulfato de magnesio	0.1 gr / L
Sulfato de manganeso trazas	0.1 gr / L
Agar	15 gr / L
pH	7.0

Al medio se le puede agregar un indicador Púrpura de Bromocresol en cantidad de 0.125 gr / L.

Tabla C.2: Medio KingB

Reactivo	Cantidad
Proteasa peptona	20 gr / L
Fosfato dibásico	1.5 gr / L
Sulfato de magnesio	1.5 gr / L
Glicerol	10 gr / L
Agar	15 gr / L
pH	7.0

Tabla C.3: Medio Ashby

Reactivo	Cantidad
Sacarosa	10 gr / L
Fosfato monobásico de potasio	0.2 gr / L
Sulfato de magnesio	0.2 gr / L
Cloruro de calcio	0.2 gr / L
Sulfato de calcio	0.2 gr / L
Carbonato de calcio	5 gr / L
Agar	20 gr / L
pH	7.0

Tabla C .4: Medio ISP 2

Reactivo	Cantidad
Glucosa	10 gr / L
Peptona	2.5 gr / L
Extracto de levadura	2.5 gr / L
pH	7.0



Figura C.1: Medio Pikovskaya

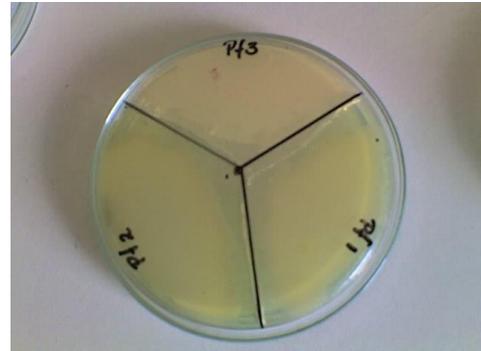


Figura C.2: Medio KingB.



Figura C.3: Medio Ashby.

ANEXO D

Descripción macroscópica de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007

Tabla D.1: Descripción macroscópica de colonias aisladas de la Florícola No. 1

Colonia	Tinción Gram	Tamaño	Forma	Elevación Superficial	Extremos	Estructura Interna	Superficie	Caract. Ópticas	Pigmentación
Ps 1	Negativo	Pequeño	Circular	Embonada	Ondulados	Lisa	Suave	Translúcida	Blanca
Ps 2	Negativo	Grande	Circular	Convexa	Ondulados	Granular	Suave	Opaca	Amarilla
Ac 1	Positivo	Grande	Irregular	Puloinada	Lobulados	Granular	Rugosa	Opaca	Blanca
BG – 2	Negativo	Grande	Circular	Convexa baja	Ondulados	Granular	Suave	Opaca	Blanca
BG – 3	Negativo	Pequeña	Irregular	Umbonada	Lobulados	Lisa	Suave	Opaca	Blanca
Az 24	Negativo	Grande	Irregular	Umbonada	Lobulados	Lisa	Suave	Opaca	Café

Tabla D.2: Descripción macroscópica de colonias aisladas de la Florícola No. 2

Colonia	Tinción Gram	Tamaño	Forma	Elevación Superficial	Extremos	Estructura Interna	Superficie	Caract. Ópticas	Pigmentación
Az 2	Negativo	Grande	Irregular	Convexa	Ondulados	Granular	Suave	Translúcida	Blanca
Az 4	Negativo	Grande	Irregular	Umbonada	Lobulados	Lisa	Suave	Opaca	Café
Az 8	Negativo	Pequeño	Irregular	convexa	Lobulados	Granular	Suave	Opaca	Marrón
L – 2	Negativo	Grande	Irregular	Convexa	Ondulados	Lisa	Suave	Opaca	Blanca
AL – 2	Negativo	Grande	Irregular	Umbonada	Lobulados	Lisa	Suave	Translúcidas	Blanca
H – 2	Negativo	Grande	Irregular	Umbonada	Lobulados	Lisa	Suave	Opaca	Blanca

Tabla D.3: Descripción macroscópica de colonias aisladas de la florícola Florifrut

Colonia	Tinción Gram	Tamaño	Forma	Elevación Superficial	Extremos	Estructura Interna	Superficie	Caract. Ópticas	Pigmentación
Az 6	Negativo	Grande	Irregular	Convexa	Ondulados	Lisa	Suave	Translúcidas	Blanca
Az 9	Negativo	Pequeño	Irregular	Convexa	Lobulados	Granular	Suave	Translúcida	Blanca
Az 15	Negativo	Pequeño	Irregular	convexa	Lobulados	Granular	Suave	Translúcida	Blanca
BG – 1	Negativo	Grande	Irregular	Convexa	Ondulados	Lisa	Suave	Translúcidas	Blanca
D – 2	Negativo	Grande	Circular	Convexa baja	Lobulados	Lisa	Suave	Translúcidas	Blanca
BG – 4	Negativo	Grande	Irregular	Convexa	Ondulados	Lisa	suave	Opaca	Blanca
AL – 1	Negativo	Grande	Irregular	Convexa	Ondulados	Lisa	Suave	Translúcidas	Blanca

Tabla D.4: Descripción macroscópica de colonias aisladas de la florícola Rosas de los Andes

Colonia	Tinción Gram	Tamaño	Forma	Elevación Superficial	Extremos	Estructura Interna	Superficie	Caract. Ópticas	Pigmentación
Az 19	Negativo	Grande	Irregular	Convexa	Ondulados	Lisa	Suave	Translúcidas	Blanca
Az 13	Negativo	Pequeño	Irregular	Convexa	Lobulados	Granular	Suave	Translúcida	Blanca
Az 27	Negativo	Pequeño	Irregular	Convexa	Lobulados	Granular	Suave	Opaca	Marrón

Tabla D.5: Descripción macroscópica de colonias aisladas de la florícola Zamueflor

Colonia	Tinción Gram	Tamaño	Forma	Elevación Superficial	Extremos	Estructura Interna	Superficie	Caract. Ópticas	Pigmentación	Diámetro de halo Solubilización
Az 10	Negativo	Pequeño	Irregular	Convexa	Lobulados	Granular	Suave	Translúcida	Blanca	
Az 21	Negativo	Pequeño	Irregular	Convexa	Ondulados	Lisa	Suave	Opaca	Marrón	
Az 22	Negativo	Pequeño	Irregular	Convexa	Lobulados	Granular	Suave	Translúcida	Blanca	

ANEXO E

Pruebas Bioquímicas de las colonias fosfato solubilizadoras aisladas a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007

Tabla E.1: Pruebas Bioquímicas de las colonias aisladas de la Florícola No. 1

Colonia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Ps 1	+	-	-	+	+/-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	K/K
Ps 2	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	K/K
Ac 1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	A/A
BG - 2	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	K/A
BG - 3	+	-	+	+	+	-	+/-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	K/A
Az 24	+	-	-	+	-	-	+/-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	A/A

1. Motilidad
2. Indol
3. Sulfuro
4. Glucosa (producción ácido)
5. Xilosa (producción ácido)
6. Sabouraud Dextrosa
7. NaCl 5%
8. NaCl 7%
9. Catalasa
10. Rojo de Metilo
11. Voges-Proskauer

12. Urea
13. Crecimiento a 4°C
14. Hidrólisis Almidón
15. Oxidasa
16. Lisina
17. Citrato
18. TSI

Tabla E.2: Pruebas Bioquímicas de las colonias aisladas de la Florícola No. 2

Colonia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Az 2	+	-	-	+	+/-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	A/A
Az 4	+	-	-	+	+/-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	A/A
Az 8	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	A/A
L - 2	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	K/A
AL- 2	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	A/A
H - 2	+	-	+	+	+	-	+/-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	K/A
Az 9	+	-	-	+	+/-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	A/A
Az 15	+	-	-	+/-	+	-	+	-	+	-	+/-	-	-	-	+	-	-	A/A

1. Motilidad
2. Indol
3. Sulfuro
4. Glucosa (producción ácido)
5. Xilosa (producción ácido)
6. Sabouraud Dextrosa
7. NaCl 5%
8. NaCl 7%
9. Catalasa
10. Rojo de Metilo
11. Voges-Proskauer

12. Urea
13. Crecimiento a 4°C
14. Hidrólisis Almidón
15. Oxidasa
16. Lisina
17. Citrato
18. TSI

Tabla E.3: Pruebas Bioquímicas de las colonias aisladas de la florícola Florifrut

Colonia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Az 6	+	-	-	+/-	-	-	+/-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	A/A
Az 9	+	-	-	+	+/-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	A/A
BG -1	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	A/A
Az 15	+	-	-	+/-	+	-	+	-	+	-	+/-	-	-	-	+	-	-	A/A
D -2	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	K/A
AL -1	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	K/A

1. Motilidad
2. Indol
3. Sulfuro
4. Glucosa (producción ácido)
5. Xilosa (producción ácido)
6. Sabouraud Dextrosa
7. NaCl 5%
8. NaCl 7%
9. Catalasa
10. Rojo de Metilo
11. Voges-Proskauer

12. Urea
13. Crecimiento a 4°C
14. Hidrólisis Almidón
15. Oxidasa
16. Lisina
17. Citrato
18. TSI

Tabla E.4: Descripción macroscópica de colonias aisladas de la florícola Rosas de los Andes

Colonia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Az 19	+	-	-	+	+/-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	A/A
Az 13	+	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	A/A
Az 27	+	-	-	+	+	+/-	+	-	+	-	+	-	-	-	+/-	-	-	A/A

1. Motilidad
2. Indol
3. Sulfuro
4. Glucosa (producción ácido)
5. Xilosa (producción ácido)
6. Sabouraud Dextrosa
7. NaCl 5%
8. NaCl 7%
9. Catalasa
10. Rojo de Metilo
11. Voges-Proskauer

12. Urea
13. Crecimiento a 4°C
14. Hidrólisis Almidón
15. Oxidasa
16. Lisina
17. Citrato
18. TSI

Tabla E.5: Descripción macroscópica de colonias aisladas de la florícola Zamuelflor

Colonia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Az 10	+	-	-	+/-	-	-	+/-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	A/A
Az 21	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	A/A
Az 22	+	-	-	+	+/-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	A/A

1. Motilidad
2. Indol
3. Sulfuro
4. Glucosa (producción ácido)
5. Xilosa (producción ácido)
6. Sabouraud Dextrosa
7. NaCl 5%
8. NaCl 7%
9. Catalasa
10. Rojo de Metilo
11. Voges-Proskauer

12. Urea
13. Crecimiento a 4°C
14. Hidrólisis Almidón
15. Oxidasa
16. Lisina
17. Citrato
18. TSI

ANEXO F

Prueba KBOO2 HiASSRTED utilizadas para la identificación de bacterias fosfato solubilizadoras aisladas a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007

Esta prueba se realizó a 10 colonias negativas para identificar posibles patógenos, los resultados a continuación:



Figura F.1 Kit KBOO2 HiASSORTED

No.	Test	Reagents to be added after incubation	Principle
1	Citrate utilization		Detects capability of organism to utilize citrate as a sole carbon source
2	Lysine decarboxylase		Detects Lysine decarboxylation
3	Ornithine decarboxylase		Detects Ornithine decarboxylation
4	Urease		Detects urease activity
5	Phenylalanine deamination	2 drops of TDA	Detects Phenylalanine deamination activity
6	Nitrate reduction	2 drops of sulphanic acid and 2 drops of N,N-Dimethyl-1-Naphthylamine	Detects Nitrate reduction
7	H ₂ S production		Detects H ₂ S production
8	Glucose		Glucose utilization
9	Adonitol		Adonitol utilization
10	Lactose		Lactose utilization
11	Arabinose		Arabinose utilization
12	Sorbitol		Sortbitol utilization

Tabla F.1: Identificación por KBOO2 HiASSORTED

No.	Test	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Citrate utilization	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
2	Lisien decarboxylase	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
3	Ornithine decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Urease	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+/-
5	Deamination	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
6	Nitrate reduction	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+
7	H ₂ S production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	Adonitol	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
10	Lactose	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
11	Arabinose	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
12	Sorbitol	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-

Tabla F.2: Resultados del test KBOO2 HiASSORTED

No.	Código	Nombre
1	Ps 2	<i>Pseudomonas fluorescens Biotype III</i>
2	BG - 1	<i>Erwinia nigrifluens</i>
3	BG - 2	<i>Erwinia nigrifluens</i>
4	BG - 3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
5	BG - 4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
6	AL - 2	<i>Klebsiella oxytoca</i>
7	D - 2	<i>Pseudomonas fluorescens Biotype I</i>
8	H - 2	<i>Pseudomonas putida</i>
9	L - 2	<i>Klebsiella pneumoniae subspecies rihnoscleromatis</i>
10	AL - 1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

ANEXO G

Resultados de la evaluación de la actividad fosfatos solubilizadora de las bacterias fosfato solubilizadoras aisladas a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007

Tabla G.1: Resultados de la evaluación de la actividad fosfato solubilizadora de los microorganismos aislados de la Florícola 1.

Cepa	Media Aritmética	Desviación estándar	No. observaciones	T student (4.3027)	Actividad solubilizadora
Ps1	5,4	0,1	3	6,928	Buena
5,3					
5,5					
5,4					
Ps2	6,467	0,306	3	8,315	Excelente
6,2					
6,4					
6,8					
Ac	5,433	0,153	3	4,914	Buena
5,3					
5,4					
5,6					
BG-3	4,300	0,200	3	-6,062	Mala
4,1					
4,5					
4,3					
Az 24	3,600	0,173	3	-14,000	Mala
3,5					
3,5					
3,8					

* T Student calculada > 4.3027 actividad solubilizadora buena

* T Student calculada < 4.3027 actividad solubilizadora mala

Tabla G.2: Resultados de la evaluación de la actividad fosfato solubilizadora de los microorganismos aislados de la Florícola 2.

Cepa	Media Aritmética	Desviación estándar	No. observaciones	T student (4.3027)	Actividad solubilizadora
Az 22	4,400	0,265	3	-3,928	Mala
4,1					
4,5					
4,6					
Az 4	4,467	0,252	3	-3,671	Mala
4,2					
4,5					
4,7					
Az 8	5,433	0,153	3	4,914	Buena
5,3					
5,4					
5,6					
L2	5,533	0,208	3	4,438	Buena
5,3					
5,6					
5,7					
AL - 2	5,633	0,208	3	5,270	Buena
5,8					
5,7					
5,4					

* T Student calculada > 4.3027 actividad solubilizadora buena

* T Student calculada < 4.3027 actividad solubilizadora mala

Tabla G.3: Resultados de la evaluación de la actividad fosfato solubilizadora de los microorganismos aislados de la Florícola Florifrut.

Cepa	Media Aritmética	Desviación estándar	No. observaciones	T student (4.3027)	Actividad solubilizadora
Az 6	5,767	0,153	3	8,693	Buena
5,8					
5,6					
5,9					
Az9	5,400	0,173	3	4,000	Mala
5,2					
5,5					
Az 15	3,567	0,351	3	-7,069	Mala
3,2					
3,9					
3,6					
BG-4	5,667	0,208	3	5,547	Buena
5,9					
5,5					
AL-1	5,267	0,115	3	4,000	Mala
5,2					
5,2					
5,4					

* T Student calculada > 4.3027 actividad solubilizadora buena

* T Student calculada < 4.3027 actividad solubilizadora mala

Tabla G.4: Resultados de la evaluación de la actividad fosfato solubilizadora de los microorganismos aislados de la Florícola Rosas de los Andes.

Cepa	Media Aritmética	Desviación estándar	No. observaciones	T student (4.3027)	Actividad solubilizadora
Az 19	5,600	0,100	3	10,392	Buena
5,5					
5,6					
Az 13	5,400	0,200	3	3,464	Buena
5,2					
5,6					
Az 27	4,533	0,153	3	-5,292	Mala
4,5					
4,7					
4,4					

* T Student calculada > 4.3027 actividad solubilizadora buena

* T Student calculada < 4.3027 actividad solubilizadora mala

Tabla G.5: Resultados de la evaluación de la actividad fosfato solubilizadora de los microorganismos aislados de la Florícola Rosas de los Andes.

Cepa	Media Aritmética	Desviación estándar	No. observaciones	T student (4.3027)	Actividad solubilizadora
Az10	5,833	0,208	3	6,934	Excelente
5,6					
6					
	5,9				
Az 21	5,433	0,153	3	4,914	Buena
5,6					
5,4					
	5,3				
Az22	3,600	0,458	3	-5,292	Mala
3,2					
4,1					
	3,5				

* T Student calculada > 4.3027 actividad solubilizadora buena

* T Student calculada < 4.3027 actividad solubilizadora mala

ANEXO H

Resultados de las pruebas de antagonismo realizada a bacterias fosfato solubilizadoras aisladas a partir de muestras de suelo y raíz, de diferentes cultivos de rosas de la provincia de Pichincha, Ecuador 2007

Tabla H.1: Confrontación antagónica de la cepa Ps 1 contra el resto

Confrontado	Confrontador	Análisis Estadístico	
		T Student calculada	Antagonismo
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Ps 1)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Biotype III (Ps 2)	-26,558	Negativo
	<i>Actinomyces</i> sp. (Ac 1)	-15.371	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 8)	-0.47	Negativo
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Biotype I (L – 2)	1.73	Negativo
	<i>Pseudomonas putida</i> (AL – 2)	-0.100	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 6)	-0.254	Negativo
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (BG -4)	1.545	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 19)	1.010	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 10)	1.020	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 21)	0.598	Negativo

* T Student calculada > 4.3027 Antagonismo positivo

* T Student calculada < 4.3027 Antagonismo negativo

Tabla H.2: Confrontación antagónica de la cepa Ps 2 contra el resto

Confrontado	Confrontador	Análisis Estadístico	
		T Student calculada	Antagonismo
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Biotype III (Ps 2)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Ps 1)	-0.1010	Negativo
	<i>Actinomyces</i> sp. (Ac 1)	-1.25	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 8)	-0.123	Negativo
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Biotype I (L – 2)	1.35	Negativo
	<i>Pseudomonas putida</i> (AL – 2)	-0.150	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 6)	1.56	Negativo
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (BG -4)	-0.25	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 19)	-0.26	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 10)	-0.35	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 21)	0.60	Negativo

* T Student calculada > 4.3027 Antagonismo positivo

* T Student calculada < 4.3027 Antagonismo negativo

Tabla H.3: Confrontación antagonica de la cepa Ac 1 contra el resto

Confrontado	Confrontador	Análisis Estadístico	
		T Student calculada	Antagonismo
Actinomycetes sp. (Ac 1)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Ps 1)	-0.356	Negativo
	<i>Pseudomonas fluorescens Biotype III</i> (Ps 2)	0.456	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 8)	0.102	Negativo
	<i>Pseudomonas fluorescens Biotype I</i> (L – 2)	0.369	Negativo
	<i>Pseudomonas putida</i> (AL – 2)	0.35	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 6)	0.74	Negativo
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (BG -4)	0.36	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 19)	0.12	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 10)	0.65	Negativo
<i>Azotobacter</i> sp. (Az 21)	0.29	Negativo	

* T Student calculada > 4.3027 Antagonismo positivo

* T Student calculada < 4.3027 Antagonismo negativo

Tabla H.4: Confrontación antagonica de la cepa Az 8 contra el resto

Confrontado	Confrontador	Análisis Estadístico	
		T Student calculada	Antagonismo
<i>Azotobacter</i> sp. (Az 8)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Ps 1)	-10,00	Negativo
	<i>Pseudomonas fluorescens Biotype III</i> (Ps 2)	-1,00	Negativo
	Actinomycetes sp. (Ac 1)	-11,20	Negativo
	<i>Pseudomonas fluorescens Biotype I</i> (L – 2)	-10,000	Negativo
	<i>Pseudomonas putida</i> (AL – 2)	-3,500	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 6)	-1,890	Negativo
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (BG -4)	-4,000	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 19)	-2,000	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 10)	-12.00	Negativo
<i>Azotobacter</i> sp. (Az 21)	-9.00	Negativo	

* T Student calculada > 4.3027 Antagonismo positivo

* T Student calculada < 4.3027 Antagonismo negativo

Tabla H.5: Confrontación antagónica de la cepa L - 2 contra el resto

Confrontado	Confrontador	Análisis Estadístico	
		T Student calculada	Antagonismo
<i>Pseudomonas fluorescens Biotype I (L - 2)</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Ps 1)	1.36	Negativo
	<i>Pseudomonas fluorescens Biotype III</i> (Ps 2)	-11.20	Negativo
	<i>Actinomyces</i> sp. (Ac 1)	-0.36	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 8)	-44.36	Negativo
	<i>Pseudomonas putida</i> (AL - 2)	-36.25	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 6)	-40.36	Negativo
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (BG -4)	-10.20	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 19)	-10.36	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 10)	-10.6	Negativo
<i>Azotobacter</i> sp. (Az 21)	-7.60	Negativo	

* T Student calculada > 4.3027 Antagonismo positivo

* T Student calculada < 4.3027 Antagonismo negativo

Tabla H.6: Confrontación antagónica de la cepa AL - 2 contra el resto

Confrontado	Confrontador	Análisis Estadístico	
		T Student calculada	Antagonismo
<i>Pseudomonas putida (AL - 2)</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Ps 1)	-1.3	Negativo
	<i>Pseudomonas fluorescens Biotype III</i> (Ps 2)	-5.6	Negativo
	<i>Actinomyces</i> sp. (Ac 1)	-4.6	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 8)	-5.8	Negativo
	<i>Pseudomonas fluorescens Biotype I</i> (L - 2)	-0.10	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 6)	1.00	Negativo
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (BG -4)	-0.23	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 19)	1.10	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 10)	0.1	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 21)	14.50	Positivo

* T Student calculada > 4.3027 Antagonismo positivo

* T Student calculada < 4.3027 Antagonismo negativo

Tabla H.7: Confrontación antagónica de la cepa Az 6 contra el resto

Confrontado	Confrontador	Análisis Estadístico	
		T Student calculada	Antagonismo
Azotobacter sp. (Az 6)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Ps 1)	2.36	Negativo
	<i>Pseudomonas fluorescens Biotype III</i> (Ps 2)	1.26	Negativo
	<i>Actinomyces</i> sp. (Ac 1)	-0.586	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 8)	-16.52	Negativo
	<i>Pseudomonas fluorescens Biotype I</i> (L - 2)	-13.69	Negativo
	<i>Pseudomonas putida</i> (AL - 2)	-12.11	Negativo
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (BG -4)	0.22	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 19)	-10.11	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 10)	-24.3	Negativo
<i>Azotobacter</i> sp. (Az 21)	1.52	Negativo	

* T Student calculada > 4.3027 Antagonismo positivo

* T Student calculada < 4.3027 Antagonismo negativo

Tabla H.8: Confrontación antagónica de la cepa BG - 4 contra el resto

Confrontado	Confrontador	Análisis Estadístico	
		T Student calculada	Antagonismo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (BG -4)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Ps 1)	-7.0	Negativo
	<i>Pseudomonas fluorescens Biotype III</i> (Ps 2)	-10.0	Negativo
	<i>Actinomyces</i> sp. (Ac 1)	-7.0	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 8)	-1.0	Negativo
	<i>Pseudomonas fluorescens Biotype I</i> (L - 2)	-7.0	Negativo
	<i>Pseudomonas putida</i> (AL - 2)	1.0	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 6)	-7.000	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 19)	-5.000	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 10)	-2.33	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 21)	-1.00	Negativo

* T Student calculada > 4.3027 Antagonismo positivo

* T Student calculada < 4.3027 Antagonismo negativo

Tabla H.9: Confrontación antagónica de la cepa Az 19 contra el resto

Confrontado	Confrontador	Análisis Estadístico	
		T Student calculada	Antagonismo
Azotobacter sp. (Az 19)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Ps 1)	-1.3	Negativo
	<i>Pseudomonas fluorescens Biotype III</i> (Ps 2)	-14.5	Negativo
	<i>Actinomyces</i> sp. (Ac 1)	-13.00	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 8)	-10.00	Negativo
	<i>Pseudomonas fluorescens Biotype I</i> (L – 2)	-5.2	Negativo
	<i>Pseudomonas putida</i> (AL – 2)	-12.30	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 6)	-35.00	Negativo
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (BG -4)	-12.00	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 10)	-10.00	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 21)	-12.00	Negativo

* T Student calculada > 4.3027 Antagonismo positivo

* T Student calculada < 4.3027 Antagonismo negativo

Tabla H.10: Confrontación antagónica de la cepa Az 19 contra el resto

Confrontado	Confrontador	Análisis Estadístico	
		T Student calculada	Antagonismo
Azotobacter sp. (Az 10)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Ps 1)	-12.0	Negativo
	<i>Pseudomonas fluorescens Biotype III</i> (Ps 2)	-27.00	Negativo
	<i>Actinomyces</i> sp. (Ac 1)	-12.36	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 8)	-10.00	Negativo
	<i>Pseudomonas fluorescens Biotype I</i> (L – 2)	-12.30	Negativo
	<i>Pseudomonas putida</i> (AL – 2)	-1236	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 6)	-10.00	Negativo
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (BG -4)	-45.00	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 19)	-7.00	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 21)	-8.90	Negativo

* T Student calculada > 4.3027 Antagonismo positivo

* T Student calculada < 4.3027 Antagonismo negativo

Tabla H.11: Confrontación antagónica de la cepa Az 21 contra el resto

Confrontado	Confrontador	Análisis Estadístico	
		T Student calculada	Antagonismo
Azotobacter sp. (Az 21)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Ps 1)	-7.00	Negativo
	<i>Pseudomonas fluorescens Biotype III</i> (Ps 2)	-13.00	Negativo
	<i>Actinomyces</i> sp. (Ac 1)	-7.00	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 8)	-8.00	Negativo
	<i>Pseudomonas fluorescens Biotype I</i> (L – 2)	-1.73	Negativo
	<i>Pseudomonas putida</i> (AL – 2)	0.57	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 6)	0.50	Negativo
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (BG -4)	-4.00	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 19)	-4.60	Negativo
	<i>Azotobacter</i> sp. (Az 10)	-2.30	Negativo

* T Student calculada > 4.3027 Antagonismo positivo

* T Student calculada < 4.3027 Antagonismo negativo

CAPÍTULO PRIMERO

INTRODUCCIÓN

1.1 Problemática.- El fósforo es un elemento esencial para los seres vivos, está presente en pocas cantidades en la ecósfera y se encuentra en formas químicas poco accesibles para la mayoría de los seres vivos.

En las plantas, el fósforo es adquirido por absorción de los iones disueltos en el suelo, los iones tienen una disponibilidad restringida ya que tienden a precipitar en presencia de metales divalentes (Ca^{+2} , Mg^{+2}) e iones férricos (Fe^{+3}) a un pH de

neutro a básico. Existen microorganismos que aumentan la solubilidad de ciertas iones de fósforo (fosfato) facilitando su accesibilidad por parte de las plantas.

Actualmente existe una tendencia generalizada en buscar alternativas biológicas a los sistemas que se emplean en el campo de la agricultura, con el fin de elevar rendimientos de los cultivos y provocar un aumento de exportaciones. De acuerdo con investigaciones extranjeras, en los últimos años se están buscando herramientas biológicas para disminuir formas insolubles de fósforo orgánico e inorgánico y reducir el uso de fertilizantes nocivos para el medio ambiente. (Servicio de Información Agropecuaria del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, 2005). Los microorganismos existentes en el suelo no son sólo capaces de fijar el nitrógeno atmosférico, aumentar la capacidad extractiva de nutrientes por parte del sistema radical de las plantas, solubilizar fósforo insoluble en el suelo, sino que también son productores de sustancias promotoras o inhibidoras del crecimiento vegetal y tienen un sin número de funciones en la microvida del suelo, de gran interés teórico y práctico para la producción agropecuaria (Franco, 2002).

Por otro lado, el uso de fertilizantes en los cultivos puede ser perjudicial porque no se realizan estudios previos sobre la composición química del suelo, del tipo de cultivo y sobre todo los posibles daños con el uso de químicos. El problema crece cuando ciertos elementos no logran ser captados por la planta y se acumulan en el suelo sin poder ser solubilizados fácilmente empobreciendo las tierras de cultivo e impidiendo el desarrollo normal de la planta (Martínez, 2004).

El cultivo de productos agrícolas y siembra de gran variedad de flores en especial de la rosa es de los ejes económicos principales en nuestro país, sin embargo; ha llegado a ser un problema por el mal uso de fertilizantes y productos químicos.

Las exportaciones de flores en Ecuador crecen en un ritmo aproximado de 23 millones anuales desde 1993 hasta el 2001; existen 4729 Ha dedicadas al cultivo de flores, de las cuales 73.6% corresponden a flores permanentes y el 26.4% a flores transitorias. Pichincha es la provincia que se destaca, en cuanto a superficie cultivada de flores, con 66% de la superficie total (Araujo, 2005).

La idea de tener una agricultura sostenible en nuestro país se centra en la disminución o eliminación de productos químicos tanto en la fertilización como en la lucha contra enfermedades y plagas de las plantas. Dentro de la agricultura sostenible se habla de biofertilización y bioprotección o biocontrol, términos que han adquirido mayor importancia, cuando se ha podido mejorar los cultivos a través del manejo de microorganismos, incrementando su presencia en la rizosfera de forma natural, siendo posible su eliminación cuando han cumplido su función y el riesgo ecológico que supone su diseminación al ambiente. (Centro de investigación de Microbiología Agrícola, 2001).

1.2 Justificación.- A nivel mundial se habla de una "Biotecnología del Suelo", tanto convencional como de punta y se considera realizable la transformación de los sistemas de producción mediante la manipulación de los microorganismos del suelo y de sus procesos en el sistema suelo-planta, a través del empleo de prácticas

convencionales de manejo o de manipulación genética de los microorganismos y plantas involucradas, orientadas para reducir efectos dañinos y maximizar beneficios (Nahas, 1996).

Ecuador es uno de los pocos países sudamericanos que no ha desarrollado productos biológicos alternativos que sustituyan parcial o totalmente a los fertilizantes químicos dañinos para el medio ambiente. Esto representa una desventaja competitiva frente a los países vecinos que ya se encuentran participando del tratado de libre comercio. De acuerdo a los datos del Banco Central del Ecuador a través del Proyecto SICA, solo de enero a diciembre del 2002 se importaron aproximadamente 223.000 toneladas de fertilizante a base de urea, lo que representó un gasto del 30% de la producción total.

Según Araujo (2005) el país invierte entre el 20 y 30% de sus costos totales de producción en compra de fertilizantes. Con el desarrollo de fertilizantes biológicos, no solo se beneficia el sector agrícola de nuestro país; sino que contribuyen favorablemente con el cuidado del medio ambiente disminuyendo la necesidad de fertilizantes químicos contaminantes a un costo relativamente bajo.

La producción de biofertilizantes en el Ecuador se ha visto limitada por la falta de estudios realizados sobre el tema. Se ha logrado aislar microorganismos benéficos para el suelo, sin embargo, no se ha intentado realizar una producción industrial de los mismos.

Finalmente, la ingeniería en Biotecnología es una carrera que está empezando en el Ecuador y con muchas expectativas para el futuro, es por eso, que se espera que produzca ingresos y nuevas fuentes de trabajo para los ecuatorianos. Con este proyecto se pretende dar el paso previo para la formulación de un bioinoculante.

La presente investigación se realizó para encontrar un método natural que remuevan el fósforo acumulado en el suelo agrícola y eliminar numerosos productos químicos en los cultivos; se llevó a cabo en Laboratorios AGRO-DIAGNOSTIC como parte de un proyecto mayor desarrollado por la empresa auspiciante, el cual tiene como objetivo final producir biofertilizante para el desarrollo de una agricultura orgánica.

1.3 Objetivos de la Investigación.-

1.3.1 Objetivo general.- Aislar e identificar bacterias fosfato solubilizadoras de muestras de suelo y raíz, de cultivos de rosas de la provincia de Pichincha.

1.3.2 Objetivos específicos.-

- Aislar mediante la verificación de la capacidad fosfolubilizadora bacterias del suelo y raíz tomadas de varios cultivos de rosas de la provincia de Pichincha.
- Identificar bacterias fosfolubilizadoras aisladas, a partir de las muestras de raíz y suelo de cultivos de rosas de Pichincha.

- Establecer una comparación entre las bacterias fosfato solubilizadoras aisladas de los suelos y las raíces de las muestras de rosas tomadas, para conocer en qué lugar se hallan en mayor proporción.

- Conformar un cepario primario y secundario con las bacterias aisladas que servirán para futuras investigaciones.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Microorganismos asociados al proceso de solubilización de fósforo.- Existe una gran variedad de microorganismos en el suelo asociados al proceso de solubilización de fósforo. La mayoría de microorganismos son bacterias incluyendo algunas especies de actinomicetos e incluso algunos estudios indican relaciones simbióticas entre hongos formadores de micorrizas y actinomicetos (Martínez, 1996).

Los géneros bacterianos fosfolubilizadores son aerobios en su mayoría, sin descartar algunos facultativos, heterótrofos y mesófilos. La asimilación del fósforo se encuentra ligada a pH neutro entre 6.5 a 7. La Figura 1.1 indica que en suelos ácidos se vuelve difícil la solubilización de fosfatos de aluminio y hierro aún más cuando están en suelos arcillosos; mientras en suelos alcalinos los fosfatos de calcio la fijación es menor. Además, se debe tener en consideración que las concentraciones de nitrógeno y carbono deben ser adecuadas para la solubilización en una relación de 30:1 (Novo *et al.*, 2003).



Figura 1.1 Rangos de pH asociados a la solubilización de fósforo por bacterias (Novo *et al.*, 2003)

La mineralización del fósforo orgánico se encuentra siempre entre los rangos de la mesófila, aunque se ha determinado que se puede extender a temperaturas entre 40° y 50° C, indicando microflora termófila.

La presencia de plantas en los suelos también es muy importante puesto que se ha demostrado que en la zona rizosférica se crea un microhábitat adecuado para el desarrollo, debido a las exudaciones que puede brindar la raíz de la planta. Además, en suelos que están sujetos al fenómeno de **hidroperiodismo** la remoción de fósforo es mayor (Fernández *et al.*, 1988).

El fósforo es un elemento limitante para el desarrollo de las plantas, debido a la formación de fosfatos. La movilización del fósforo en la naturaleza lo hacen los microorganismos, ya que participan en la disolución y transformación del elemento hasta combinaciones asimilables por las plantas.

Cuando se incorporan al suelo residuos de cosecha, materiales orgánicos, enmiendas, estiércol, se agregan gran cantidad de compuestos organofosforados. El fosfato orgánico es hidrolizado por la enzima fosfatasa que segregan los

microorganismos y libera el fosfato, para que sea asimilado por la planta (Cardona, 1996).

La microflora responsable de la solubilización de fosfatos es muy diversa y está representada por bacterias, hongos y actinomicetos, los que pueden en su conjunto alcanzar del 10 al 15% de la microflora total del suelo y aún más en la zona rizosférica de las plantas (Oviedo *et al.*, 2005). Entre los géneros bacterianos reportados como capaces de la solubilización de fosfatos inorgánicos se encuentran *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium* y otros. Entre los hongos solubilizadores se encuentran los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Sclerotium*, *Rhizopus* y otros (Fernández *et al.*, 1988).

Las bacterias *Bacillus megaterium*, *Bacillus mesentericus* y *Pseudomonas putida* solubilizan formas orgánicas del fósforo (ortofosfato) las transforman a fosfatos asimilables para las plantas. Los hongos del género *Aspergillus*, *Penicillium* y *Rhizopus* degradan ácidos nucleicos y glicerofosfatos a fosfatos simples. Las levaduras del género *Saccharomyces* y *Rhodotorula* cumplen la misma función que los hongos. El actinomiceto *Streptomyces* destruye las moléculas orgánicas fosfatadas liberando así el fósforo (Novo *et al.*, 2003).

En los suelos de reacción ácida predominan los fosfatos insolubles de hierro y aluminio. Cuando se han utilizado enmiendas cálcicas se fija el fósforo como fosfato tricálcico. Las bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Aerobacter* solubilizan fosfatos inorgánicos en el suelo (Fernández *et al.*, 1988).

La diversidad de microorganismos cumplen funciones determinantes en la transformación de los componentes orgánicos e inorgánicos, lo que permite comprender su importancia en la nutrición de las plantas al efectuar procesos de transformación hasta elementos que pueden ser asimilados por sus raíces (Martínez *et al.*, 1996). El suelo es un medio muy heterogéneo y por ello los microorganismos se distribuirán de forma desigual.

Entre las funciones más importantes que cumplen los microorganismos asociadamente en los procesos de transformación están (Fernández *et al.*, 1988):

- Suministro directo de nutrientes (Fijación de nitrógeno).
- Transformación de compuestos orgánicos que la planta no puede tomar a formas inorgánicas que si pueden ser asimiladas (Mineralización). Ejemplo: Proteína hasta aminoácidos y a nitratos.
- Solubilización de compuestos inorgánicos para facilitar la absorción por las plantas. Ejemplo: Fosfato tricálcico a Fosfato monocálcico.
- Cambios químicos en compuestos inorgánicos debido a procesos de oxidación y reducción. Ejemplo. Oxidación del azufre mineral a sulfato. Oxidación del nitrógeno amoniacal a nitrato.
- Aumento del desarrollo radicular en la planta que mejora la asimilación de nutrientes, la capacidad de campo y el desarrollo.
- Reacciones antagónicas, parasitismo y control de fitopatógenos.
- Mejoramiento de las propiedades físicas del suelo.

La mayor actividad de los microorganismos se realiza desde la superficie del suelo, las colonias de microorganismos permanecen adheridas a las partículas de arcilla y humus (fracción coloidal) y a las raíces de las plantas que

les suministran sustancias orgánicas que les sirven de alimento y estimulan su reproducción. Estas exudaciones dependen del estado nutricional de la planta y así favorecen el crecimiento de los microorganismos que son importantes para ella. Su actividad y su desarrollo están asociados a la disponibilidad de los sustratos a transformar. La colonización de algunos grupos microbianos sobre las fracciones orgánicas e inorgánicas depende de la función que se cumpla en la transformación (degradación de carbohidratos o proteínas, amonificación, nitrificación, oxidación, reducción, mineralización, solubilización). Por lo tanto, mientras algunos microorganismos actúan sobre un sustrato, otros se desarrollan en los productos de la transformación. Cuando terminan su función sobre la degradación del sustrato, los grupos microbianos que estaban actuando principalmente disminuyen al máximo, se reproducen o entran en latencia y se incrementa la población de otros que cumplirán funciones de transformación en los productos del metabolismo del grupo microbiano anterior. Cada proceso químico desencadenado por un microorganismo es una etapa en la descomposición de un material orgánico o inorgánico. Una mayor cantidad de microorganismos en el suelo permite una mejor actividad metabólica y enzimática para obtener plantas bien nutridas con buena capacidad de producción (Delgado, 2005).

El número y diversidad de las especies bacterianas que habitan el suelo puede ser afectado por el manejo o tratamiento que se de al suelo. Por ejemplo, inundaciones durante regadío y movimiento de la tierra durante la preparación para la siembra inciden en la aireación del suelo y por lo tanto en los procesos metabólicos que en su interior se desarrollan. La aplicación de pesticidas, manejo de hierbas y microorganismos fitopatógenos, tiene un efecto secundario

sobre las poblaciones microbianas las cuales pueden ser inhibidas (Grupo de Biotecnología Ambiental e industrial, 1999).

1.4.1.2 Requerimientos nutricionales microbianos.- El metabolismo microbiano está orientado hacia la reproducción de los organismos y éstos requieren que esos constituyentes químicos estén disponibles para la asimilación y síntesis de nuevo material celular. El elemento principal de todas las células vivas, en base a su masa es carbono, oxígeno, nitrógeno, hidrógeno, fósforo y azufre. Varios metales son esenciales para la vida ya que sirven como cofactores para el transporte de electrones que se lleva a cabo en reacciones específicas catalizadas por enzimas (Mayea *et al.*, 1998). Las proteínas constituyen la mayoría de macromoléculas dentro de las células bacterianas. Se considera que aproximadamente el 90% de la masa de las células vivas es agua.

1.4.1.3 Factores que afectan a la solubilización del fósforo-

Fuentes de energía.- Dependiendo de la fuente de energía los microorganismos movilizados de fósforo muestran una mayor o menor capacidad de solubilización. Así parece que cada microorganismo muestra una determinada preferencia por una fuente de energía para la completa expresión de su actividad enzimática fosfatasa (Pintado, 2002).

pH.- El pH óptimo para la solubilización máxima de fosfato inorgánico comprobado, es neutro o ligeramente ácido en medio líquido para bacterias y de 4.0-5.0 para hongos como *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp (Pintado, 2002).

Temperatura.- La temperatura óptima para la solubilización de fosfatos varía para cada microorganismo. Así para *Pseudomonas* se sitúa entre 20-30° C y para hongos en los 30°C. Para temperaturas superiores se observa un rápido decrecimiento en la actividad movilizadora.

Periodo de incubación.- En condiciones de cultivo parece que al aumentar el tiempo de incubación, aumenta la capacidad solubilizadora (Martínez, 2004).

Aislamiento y medios de cultivo.- La capacidad de solubilización de fosfato depende de la zona de procedencia de los microorganismos. Muchos aislados de bacterias pierden su potencial movilizador tras varios pases de cultivo en medios de laboratorio y algunos microorganismos no solubilizan en medio sólido pero si lo hacen en medio líquido (Pintado, 2002).

1.4.2 Suelo de las florícolas.- Los suelos de nuestro planeta se forman de una combinación de procesos físicos, químicos y biológicos. La parte mineral es la más abundante al contrario de la materia orgánica tiene baja proporción pero es igual de importante que las demás. La composición química y la estructura física del suelo en un lugar dado están determinadas por el tipo de material geológico del que se origina, por la cubierta vegetal, por la cantidad de tiempo en que ha actuado la meteorización, por la topografía y por los cambios artificiales resultantes de las actividades humanas. Los requerimientos de suelo de las distintas plantas varían mucho, y no se puede generalizar sobre el terreno ideal para el crecimiento de todas las plantas.

La producción de rosas de invernadero tiene una forma rígida de crecimiento que al mismo tiempo es muy susceptible a daños por condiciones atmosféricas inadecuadas, temperaturas o humedad, además de las enfermedades y plagas. El invernadero en que se cultivan debe transmitir luz adecuada, tener una buena calefacción por las noches y control de humedad.

El rosal se puede clasificar como un arbusto perenne, caducifolio a temperatura por debajo de 12° C de otoño a primavera. A temperaturas por encima de 15° C las plantas continúan creciendo y floreciendo (Ecuaquímica C.A., 2004).

Las rosas tienen unas pocas raíces correosas y un número limitado de raíces de alimentación más finas, de modo que requieren un suelo bien drenado con buena retención de agua. Sobre suelos arcillosos se puede instalar drenes permanentes, mientras que en suelo limosos más ligeros necesitan inicialmente cultivar a profundidad. Se puede incorporar materia orgánica (25 mm) extendida sobre la superficie y mezclada con suelo (200 mm) para incrementar la retención o absorción de nutrientes solubles (Salinger, 1991).

Tanto los análisis de suelo como los análisis foliares juegan un papel muy importante en el diagnóstico y control de nutrición de los cultivos ya que permiten determinar exactamente la relación suelo – planta al tener presente los demás factores de crecimiento y las interacciones del entorno donde se desarrollan (Ecuaquímica C.A., 2004).

Los niveles recomendables de nutrientes para rosas depende de muchos factores como: tipo de drenado, textura del suelo, contenido de materia orgánica entre otros. El Cuadro 1.1 presenta valores referenciales requeridos para un cultivo de rosas:

Cuadro 1.1 Niveles adecuados de nutrientes en la solución del suelo (Calvache, 2000)

Elemento	Unidades	Óptimo
N – NH ⁴	ppm	80
N – NO ₃	ppm	50
N – Tot	ppm	130
Fósforo	ppm	40
Zinc	ppm	0.5
Cobre	ppm	0.4
Hierro	ppm	1.0
Manganeso	ppm	2.0
Boro	ppm	1.5
Azufre	ppm	12.0
Potasio	Meg/litro	5.2
Calcio	Meg/litro	3.6
Magnesio	Meg/litro	3.0
pH		6.0

Para el cultivo de rosas el suelo debe estar bien drenado y aireado para evitar encharcamientos, por lo que los suelos que no cumplan estas condiciones deben mejorarse en este sentido, pudiendo emplear diversos materiales orgánicos.

La desinfección del suelo puede llevarse a cabo con calor u otro tratamiento que cubra las exigencias del cultivo. En caso de realizarse fertilización de fondo, es necesario un análisis de suelo previo (Servicio de Información Agropecuaria del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, 2005).

Las temperaturas óptimas de crecimiento se considera que son desde 17 a 25 °C, a temperaturas elevadas, las flores son pequeñas con pocos pétalos y color más pálido. Las temperaturas frías como las nocturnas atrasan el crecimiento las flores que desarrollan gran número de pétalos, se deforman y aplanan, produciendo flores llamadas cabezas de toro (Calvache, 2000).

Las rosas toleran un suelo ácido pero los suelos minerales deben mantenerse en un pH de 6.0 aproximadamente; las rosas son intolerantes de altos niveles de calcio, desarrollándose rápidamente las clorosis. Si el suelo es alcalino puede aplicarse azufre elemental e incorporar turba.

El índice de crecimiento para la mayoría de los cultivares de rosa sigue la curva total de luz a lo largo del año. Así, en los meses de verano, cuando prevalecen elevadas intensidades luminosas y larga duración del día, la producción de flores es más alta que durante los meses de invierno (Servicio de Información Agropecuaria del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, 2005).

1.4.2.1 Ciclo del Fósforo.- El fósforo es un nutriente esencial para la vida vegetal, animal y de microorganismos. Su importancia radica en la formación de moléculas orgánicas (ácidos nucleicos, ATP, fosfolípidos) y en reacciones de transferencia de energía. A diferencia del nitrógeno, potasio, azufre y otros elementos, el fósforo es un nutriente limitante, no es posible capturarlo biológicamente directamente desde el aire, como ocurre con el nitrógeno, y su ciclo natural involucra largos períodos, lo que en términos de manejo agrícola equivale a decir que no se puede depender del ciclo del fósforo, sino de la

La vida microbiana es afectada por carencia de este elemento creando problemas en la actividad nitrofixadora de las bacterias de vida libre, algunos ejemplos son: *Azotobacter* asocia niveles de fósforo con abundancia de sus poblaciones; es estrechamente sensible a la deficiencia de fósforo, siendo un indicador de la fertilidad del suelo; *Rhizobium* depende del fósforo asimilable es indispensable para la conservación de movilidad de dichas colonias; *Aspergillus niger* es utilizado en técnicas para determinar deficiencia de fósforo en el suelo (Cardona *et al.*, 1996).

Los microorganismos llevan a cabo cierto número de transformaciones del elemento, estas incluyen (Fernández *et al.*, 1988):

1. Alteración de la solubilidad de compuestos inorgánicos de fósforo.
2. Mineralización de compuestos orgánicos con la liberación de fosfato inorgánico.
3. Conversión del anión inorgánicos aprovechable en componentes celulares.
4. Llevar a cabo una oxidación o reducción de compuestos inorgánicos de fósforo.

Según, Fernández (1988) en el suelo, el fósforo es un factor imprescindible para el mantenimiento de la actividad biológica estando presente en niveles de 400 a 1.200 mg/Kg. Los niveles bajos de este nutriente puede ocasionar trastornos significativos en el crecimiento de la planta perturbando el rendimiento agrícola.

El fósforo se presenta en forma de ortofosfatos en el suelo, como derivados del ácido fosfórico, H_3PO_4 , calcio y aluminio. Los compuestos

formados pueden encontrarse en forma de sales en solución, sales cristalinas o sales absorbidas por los coloides del suelo (Suquilanda, 2001). El fósforo en el suelo se puede encontrar de las siguientes maneras:

- Compuestos de calcio, magnesio, hierro, aluminio y minerales de arcilla (aluminio silicatos).
- Compuestos orgánicos presentes en residuos de animales o resultantes de síntesis microbiana.
- Compuestos orgánicos e inorgánicos elaborados por tejidos de plantas.
- Apatitos primarios y otros minerales fosforados primarios.

Las formas orgánicas provienen de los residuos animales, vegetales y microbianos, pueden llegar a constituir el 50 – 60 % del total de fósforo en el suelo. Entre las formas orgánicas del fósforo en el suelo y en los restos acumulados en su superficie se encuentra la fitina, nucleoproteínas, ácidos nucleicos, azúcares fosforilados, fosfolípidos y combinaciones poco móviles, difíciles de hidrolizar por ácidos y de lenta descomposición por los microorganismos (Cardona *et al.*, 1996).

Las formas minerales del fósforo en los suelos están representadas por minerales primarios como las apatitas, hidroxapatitas y oxiapatitas, las que se encuentran formando parte de la roca madre y se caracterizan por la gran insolubilidad de las mismas pero a pesar de esto constituyen las mayores reservas del elemento y bajo ciertas condiciones se pueden meteorizar y hacerse solubles y asimilables para las plantas y microorganismos (Martínez, 2004).

Otro grupo de fosfatos minerales son aquellos que se encuentran retenidos en las superficies de los óxidos hidratados de Fe, Al y Mn, siendo poco asimilables y solubles. Adicionalmente un grupo de fosfatos minerales y algo más solubles que los anteriores y que tienden a predominar en los suelos neutros y alcalinos son los fosfatos cálcicos en sus tres formas: fosfatos mono, di y tricálcico. Los primeros son medianamente solubles y el tercero muy insoluble y difícil de asimilar por plantas y microorganismos. Un último grupo de fosfatos está representado por los fosfatos de Na, K y Mg los cuales son muy solubles (Fernández *et al.*, 1988).

Un resumen de las formas de fósforo en el suelo se presenta en el Cuadro 1.2:

Cuadro 1.2 Formas de fósforo en el suelo (Toreto *et al.*, 200)

	Denominación	Composición	Características
Fosfatos de calcio	Hidroxiapatita	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \text{Ca}(\text{OH})_2$	mayor abundancia
	Oxiapatita	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \text{CaO}$	
	Fluorapatita	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \text{CaF}_2$	mayor abundancia
	Carbonatoapatita	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \text{CaCO}_3$	
	Fosfato tricálcico	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	
	Fosfato bicálcico	CaHPO_4	mayor solubilidad
	Fosfato monocálcico	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	mayor solubilidad
Fosfatos de hierro	Vivianita	$\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	
	Estrengita	$\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	
Fosfato de Aluminio	Variscita	$\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	

1.4.2.2 Transformaciones del fósforo en el suelo.- Las transformaciones del fósforo en el suelo forman un ciclo en el cual los iones ortofosfato se fijan intensamente por medios físicos, químicos o biológicos y donde las pérdidas del elemento

como resultado del arrastre o la volatilización a la atmósfera son insignificantes o no tienen lugar en absoluto (Fernández *et al.*, 1988). De ese modo los procesos claves dentro del ciclo son la descomposición de la materia orgánica y la disolución del fósforo inorgánico.

Las transformaciones biológicas que pueden sufrir los compuestos del fósforo en los suelos pueden tener varios orígenes y están determinados por las condiciones agrofísicas, agroquímicas y agrobiológicas que incidan sobre el suelo en un momento dado (Grupo de biotecnología Ambiental e Industrial, 1999).

En las transformaciones microbianas del fósforo en los suelos se pueden diferenciar cuatro procesos fundamentales:

1. Mineralización de compuestos orgánicos del fósforo.
2. Inmovilización biológica.
3. Procesos de oxidación y reducción.
4. Solubilización de fosfatos inorgánicos del suelo (Martínez, 2006).

1.4.3 Fertilizantes.- Al igual que todos los seres vivos, las plantas deben recibir nutrientes para sobrevivir. Además de luz y agua, necesitan una dieta regular de minerales y otros elementos. La hierba, las flores, los árboles, y hasta las malezas compiten entre sí para absorber los nutrientes. Al aplicar fertilizantes a plantas de forma periódica, se renuevan los nutrientes para que las plantas puedan seguir creciendo y produciendo hojas, flores y frutos (Civera *et al.*, 1996).

El cultivo de rosas en el Ecuador ha crecido de manera importante debido a las condiciones climáticas y edafológicas muy favorables, que permiten producir rosas en invernadero sencillos y a menor costo. Pero esas condiciones se vienen deteriorando por un mal manejo del suelo, los fertilizantes y el agua en la práctica de fertirrigación, produciendo la salinización de los suelos y contaminación de aguas subterráneas (Calvache, 2000).

El tema de la nutrición de las plantas es demasiado amplio para ser considerado en detalle, pero es necesario entenderlo para asegurar que las plantas tomen lo necesario de acuerdo a sus exigencias y evitar el despilfarro de dinero en fertilizantes innecesarios.

Todos los elementos minerales, en contraste al carbono, oxígeno se absorben en solución por las raíces del suelo o del medio de cultivo; unos pocos se suministran adicionalmente y se absorben por las hojas. Los nutrientes primarios y secundarios se requieren en grandes cantidades, los elementos menores o trazas se miden en ppm. El Cuadro 1.3 indica algunos de los fertilizantes más utilizados en el cultivo de rosas con sus respectivos porcentajes de macronutrientes.

Cuadro 1.3 Análisis de abonos comunes y de algunos materiales orgánicos utilizados en la producción de rosas de invernadero (Calvache, 2000)

Nombre químico	Nombre común	Análisis elementos %			
		N	P	K	Mg
Abonos simples					

Sulfato amónico	Sulfato amónico	21			
Nitrato amónico	Nitrato amónico	35			
Nitrato de sodio	Nitrato de sodio	16			
Urea	Urea	46			
Nitrato amónico-cálcico	Nitrato amónico-cálcico NAC	26			
Nitrato cálcico	Salitre calizo	15			
Urea formaldehído	Nitroform/Uramit	38			
Fosfato monocálcico	Superfosfato		7	39	
Fosfato cálcico magnésico	Superfosfato de serpentina			48	
Cloruro de potasio	Cloruro de potasio				
Abonos compuestos					
Nitrato potásico	Nitrato potásico	14		39	
Fosfato monoamónico	Fosfato monoamónico MAP	11	21		
Fosfato diamónico	Fosfato diamónico DAP	18	20		
Fosfato de magnesio y amonio	Magamp.comK	8	17	6	14
Sangre y hueso	Sangre y hueso	5 a 7	6		
Harina de huesos tratada	Harina de huesos	6	7		
Estiércol de oveja, gallinaza	Jardín abundante de	4	1,4	3	
	Gallinaza	2,2	1	1,7	7,3 pH
	de baterías o cajas	1,3	0,7	0,7	7,5 pH

1.4.3.1 Compatibilidad química de los fertilizantes.- Para la preparación de la solución madre para aplicar en el suelo de florícolas es necesario conocer la compatibilidad o incompatibilidad de fertilizantes a usar para no provocar reacciones químicas que al final arrojen resultados diferentes a los esperados. Así mismo, es necesario conocer sobre antagonismos y sinergismos de los elementos aplicados y sobre la acidez o basicidad de la solución resultante (Calvache, 2000).

La incompatibilidad más importante se produce cuando la mezcla de fertilizantes origina precipitados en solución madre, generando insolubilidad en la planta. El Cuadro 1.4 presenta compatibilidades e incompatibilidades de los fertilizantes más comunes en florícolas:

Cuadro 1.4 Compatibilidad química entre fertilizantes en solución. (Calvache, 2000)

Fertilizantes	Urea	Nitrato de amonio	Sulfato de amonio	Nitrato de calcio	Nitrato de potasio	Cloruro de potasio	Sulfato de potasio	Fosfato de amonio	Sulfatos de Fe, Zn, Cu,	Quelatos de Fe, Zn,	Superfosfato triple	Sulfato de magnesio	Acido fosfórico	Acido sulfúrico	Acido nítrico
Urea															
Nitrato de amonio															
Sulfato de amonio				I	R	R	R								
Nitrato de calcio			I				I	I	I		I	I	I	I	
Nitrato de potasio			R				R		R		I	R		R	
Cloruro de potasio			R				R		R			R		R	
Sulfato de potasio			R	I	R	R			R			R		R	
Fosfato de amonio				I					I	R		I			
Sulfatos de Fe, Zn, Cu				I								R	I	R	I
Quelatos de Fe, Zn, Cu,				I											I
Superfosfato triple	R			I											
Sulfato de magnesio				I	R	R	R	I							
Acido fosfórico				I			R		I	R					
Acido sulfúrico				I						R					
Acido nítrico										I					
I: Incompatible R: Incompatibilidad reducida															

Una de las técnicas de manejo más comúnmente usadas para preservar los agroecosistemas consiste en aplicar fertilizantes inorgánicos (nitrógeno, fósforo y potasio) o estiércol. La aplicación de cantidades muy pequeñas de estos agroquímicos puede conducir al “minado de nutrientes” (cuando la cantidad de nutrientes extraídos por los cultivos cosechados es superior a la cantidad de nutrientes aplicados), mientras que la aplicación de cantidades excesivas puede conducir a la lixiviación de los mismos, lavado del exceso de nutrientes con la consiguiente contaminación de las aguas subterráneas y de superficie (Rittman, 2001).

El empleo de fertilizantes con fósforo y la tasa de acumulación de fósforo en suelos agrícolas se triplicaron entre 1960 y 1990, desde entonces se ha visto disminuir algo en los últimos años. El flujo de fósforo hacia los océanos es hoy tres veces mayor que el flujo natural (Kiely, 1999).

Algunos problemas actuales:

- Efectos negativos de herbicidas, fungicidas, insecticidas y otros biocidas.
- Transformación de ecosistemas naturales de todo tipo en terreno cultivado.
- Pérdida de biodiversidad, al transformarse ecosistemas con multitud de especies en otros con unas pocas.
- Erosión del terreno.
- Agotamiento de minerales del suelo.
- Salinización del suelo en zonas secas.
- Muchos de estos problemas van agotando y desertizando el suelo, obligando a abandonar unos terrenos para arar otros nuevos, que a su vez se agotan, creando un círculo vicioso que va destruyendo el entorno.
- Contaminación por nitrógeno y fósforo en ríos y lagos, por el uso de fertilizantes químicos.

Finalmente, la contaminación del agua por escorrentía del fósforo producto del intensivo uso de este nutriente es superior en suelos pesados (contenido alto de arcilla) que en los suelo ligeros (contenido alto de arena). Debido a que en los suelos pesados tienen menor capacidad de infiltración por lo tanto puede generar mayor escorrentía (Seoáñez, 1999).

En la escorrentía el fósforo puede estar en forma soluble (disuelto) o en forma fija (adsorbido a las partículas de suelo). La concentración de fósforo en la solución de suelo en los 1 a 3 mm superiores puede diluirse por precipitación permitiendo que se libere más fósforo en solución desde altas concentraciones de fósforo plantean un mayor riesgo, en general, de pérdidas en la escorrentía que los suelos con contenidos de fósforo más bajos. Los suelos muy erosionados también sufren de pérdida de fósforo en la escorrentía y deben ser controlados de manera que las partículas del suelo que transportan el fósforo retenido no abandonen el lugar y alcancen las aguas superficiales.

1.4.3.2 Biofertilizantes.- El término biofertilizante puede definirse como preparados que contienen células vivas o latentes de cepas microbianas eficientes fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fósforo, potencializadoras de diversos nutrientes o productoras de sustancias activas, que se utilizan para aplicar a las semillas o al suelo con el objetivo de incrementar el número de estos microorganismos en el medio y acelerar los procesos microbianos de tal forma que se aumenten las cantidades de nutrientes que pueden ser asimilados por las plantas o se hagan más rápidos los procesos fisiológicos que influyen sobre el desarrollo y el rendimiento de los cultivos.

El uso de biopreparados presenta las ventajas de que origina procesos rápidos, como son en general los de origen microbiano, que consumen escasa energía no renovable y que son "limpios", es decir, no contaminantes del medio ambiente. Además, los procesos se realizan en el ambiente rizosférico, en la inmediata vecindad de las raíces, y las plantas se benefician en un plazo muy

breve. La utilización de inoculantes biológicos ha tenido una amplia difusión en los últimos años, también se ha difundido su efecto positivo sobre el rendimiento de muchos cultivos y en distintas situaciones y la factibilidad de una agricultura orgánica (Pintado, 2002).

Algunos trabajos realizados con microorganismos solubilizadores de fósforo en diferentes cultivos se muestran a continuación:

Se ha encontrado que la solubilización de fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, primero se produce una “adaptación” de *Pseudomonas putida* 10-15 días y después de éste período se incrementa el crecimiento del maíz, peso de tallos y la captación de fósforo (Amara *et al.*, 1995). Resultados similares se reportaron, al probar 31 bacterias y 11 hongos encontró que *Pseudomonas cepacia* y *Penicillium purpurogenum* mostraron la mayor actividad de solubilización de fósforo, y la respuesta significativa en grano, materia seca y contenidos de fósforo (Nahas, 1996). Con *Pseudomonas striata* se encontró resultados similares (Dubey, 1996).

En trigo, la biofertilización con *Glomus intraradices* en dos niveles de fósforo, produjo incrementos de rendimiento del grano de trigo similares a los producidos por la aplicación de fósforo (Mohammad, 1998).

También se ha informado que la inoculación tiene efecto sobre algunos compuestos de la raíz y la planta (fitohormonas, enzimas, pH, biocontroladores) y éstos, a su vez, tiene un efecto positivo sobre el rendimiento. La inoculación de trigo y cebada con *Agrobacterium rhizogenes*, *Pseudomonas fluorescens* y

Rhizobium leguminosarum produjo la colonización bacteriana y está relacionada con la acumulación de blumenina (Fester *et al.*, 1998).

Similarmente, en otra investigación se informó la utilización de inoculantes biológicos, *Agrobacterium radiobacter*, *Enterobacter aerogenes*, *Flavobacterium sp.*, *Pseudomonas fluorescens* y *Serratia strain 218*, que incrementaron la actividad nitrogenasa en la rizósfera. También el tratamiento de semillas con bacterias incrementó la captación de P33 y el contenido de N, P y K de tallos y raíces, largo de tallos y rendimiento de fibra de lino (Vorobeikov *et al.*, 1996).

La interacción fitohormonal entre *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium leguminosarum* con el cultivo del trigo, incrementó el número de macollos fértiles, número de espigas, materia seca y rendimiento de grano. Paralelamente, el contenido de N y P en el grano se incrementó significativamente (Amara *et al.*, 1995).

En general los trabajos realizados a nivel internacional con microorganismos solubilizadores de fósforo en su mayoría son del género *Pseudomonas*. En nuestro país el uso de bacterias para la agricultura está en desarrollo pero con solubilizadores de fósforo aún no existen reportes en ningún cultivo. Los microorganismos a más de remover dicho elemento también producen sustancias estimuladoras del tipo hormonal, como auxinas, giberelinas y citoquininas, y también producen sustancias de otro tipo, como aminoácidos y promotores específicos de crecimiento. Otra característica del género *Pseudomonas*, consiste en inducir la iniciación radicular e incrementar la

formación de raíces y pelos radiculares, favoreciendo el desarrollo general en los cultivos (Dubey, 1996).

Por otro lado también se realiza investigación con cepas de hongos solubilizadores como *Aspergillus aculeatus* *Aspergillus oryzae*, *Paecilomyces*, *Gongronella butleri* y *Fusarium oxysporum* destacándose *Trichoderma* con especial solubilización en fosfatos de hierro y calcio in vitro (Vera *et al.*, 2002).

1.5 Hipótesis.-

1.5.1 Hipótesis Alternativa.- En las muestras de cultivos de rosas de suelo y raíz tomadas de la provincia de Pichincha existen microorganismos con capacidad de solubilizar fósforo.

1.5.2 Hipótesis Nula.- En las muestras de cultivos de rosas de suelo y raíz tomadas de la provincia de Pichincha no existen microorganismos con capacidad de solubilizar fósforo del suelo.