



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

Proyecto de Investigación previo
la obtención del título de
Ingeniera Agropecuaria.

Título del Proyecto de Investigación:

**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS
EFICIENTES EN LA SOLUBILIZACIÓN DE NITRÓGENO Y FÓSFORO
PRESENTES EN EL SUELO DEL BOSQUE HÚMEDO JAUNECHE”**

Autora:

Ana Patricia Pacheco Vila

Director:

Ing. Gerardo Francisco Segovia Freire, M.Sc.

Quevedo – Los Ríos – Ecuador

2016

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.

Yo, **Ana Patricia Pacheco Vila**, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normatividad institucional vigente.

Ana Patricia Pacheco Vila
AUTORA

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.

El suscrito, **Ing. Gerardo Francisco Segovia Freire, M.Sc.** Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que la estudiante **Ana Patricia Pacheco Vila**, realizó el Proyecto de Investigación de grado titulado, “ **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS EFICIENTES EN LA SOLUBILIZACIÓN DE NITRÓGENO Y FÓSFORO PRESENTES EN EL SUELO DEL BOSQUE HÚMEDO JAUNECHE**”, previo a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Ing. Gerardo Francisco Segovia Freire, M.Sc.
DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

CERTIFICACIÓN DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO.

Dando cumplimiento al Reglamento de la Unidad de Titulación Especial de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y a las normativas y directrices establecidas por el SENESCYT, el suscrito Ing. M.Sc. Gerardo Segovia Freire, en calidad de Director del Proyecto de Investigación de Grado **“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS EFICIENTES EN LA SOLUBILIZACIÓN DE NITRÓGENO Y FÓSFORO PRESENTES EN EL SUELO DEL BOSQUE HÚMEDO JAUNECHÉ”**, de autoría de la estudiante **Ana Patricia Pacheco Vila**, certifica que el porcentaje de similitud reportado por el Sistema URKUND es de 5%, el mismo que es permitido por el mencionado software y los requerimientos académicos establecidos.

Document	PACHECO PATRICIA PROYECTO DE INVESTIGACION BIOL BACTERIAS FIJADORAS DE NITROGENO Y SOLUBILIZADORAS DE FOSFORO.docx (D16700543)
Submitted	2015-12-12 08:09 (-05:00)
Submitted by	segoviagro@yahoo.es
Receiver	gsegovia.uteq@analysis.arkund.com
Message	ANALISAR TRABAJO DE INVESTIGACION DE GRADO Show full message
	5% of this approx. 30 pages long document consists of text present in 7 sources.

Ing. Gerardo Francisco Segovia Freire M.Sc.
DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACION



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

“Aislamiento y caracterización de microorganismos eficientes en la solubilización de nitrógeno y fósforo presentes en el suelo del Bosque Húmedo Jauneche”

Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria.

Aprobado por:

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Wilfrido Escobar Pavón M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Gregorio Vásconez Montufar

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Enma Torres Navarrete M.Sc.

QUEVEDO – LOS RÍOS – ECUADOR

2016

AGRADECIMIENTO.

La autora agradece a:

Agradezco infinitamente a Dios por ser ese compañero indispensable para alcanzar cada uno de mis logros.

A mis Padres, y Familia.

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de Ciencias Pecuarias y a los docentes, por haber contribuido a mi formación encaminada a la excelencia.

A la **Fundación Maquita Cushunchic - Centro de Capacitación y transferencia Tecnológica Maquita** por brindarme la oportunidad de ser autora del primer proyecto de investigación de este Centro: Microorganismos Eficientes para usos en biorremediación del cual se desprende este proyecto y adquirí experiencia tanto personal como laboral.

A mi director **Ing. Gerardo Francisco Segovia Freire, M.Sc.** manifiesto un inmenso agradecimiento por su orientación, colaboración, paciencia y disposición; por la confianza depositada en mí para el desarrollo de este trabajo.

A mi asesor de tesis **Ing. Carlos Zambrano Carriel**, Director y tutor de la actividad de investigación, por su apoyo incondicional y conocimiento el cual contribuyo al desarrollo y finalización exitosa del presente trabajo. Gracias por la orientación y ayuda brindada.

Al **Ing. Wilfrido Escobar** por su apoyo y amistad incondicional que me permitió lograr un aprendizaje que trascendió lo académico

Al equipo de apoyo del Centro de Investigación y transferencia Tecnológica Maquita a Fátima, Gabriel, Manuel, Luis , José y Karla, por su sentido del humor y consejos, con quienes compartí largas conversaciones, momentos de desesperación, presión, alegrías y satisfacciones, entre capacitaciones, viveros, cámaras de flujo y trabajos de campo haciendo más ligeros los días de trabajo en el laboratorio.

DEDICATORIA.

Al culminar esta etapa en mi formación profesional es importante dedicar este triunfo a:

Dios, Supremo hacedor de la vida, cuyo Espíritu llenó del suficiente esfuerzo mi alma y empujo mi voluntad a la consecución de este triunfo.

A la memoria de mi Padre, Otto Pacheco Coello, que con su incansable e inagotable lucha por mejores días se convirtió en el mejor ejemplo de que no hay imposibles cuando se tiene la certeza que el éxito es la transformación de todo esfuerzo por alcanzar las metas.

Mi Madre, Lourdes Vila Casquete, quien merece especial dedicación porque sin su ayuda nada de esto sería posible.... Quien sacrifico sus sueños, gracias a sus consejos y a cada oración hecha por mí, me hace decir con seguridad ¡Eres Grande Madre mía!

A mi hijo Carlos Manuel, a quien le quite el tiempo que debía dedicarle en mi afán de ser ejemplo de superación....no hay imposibles hijo mío. A ti dedicado con infinito amor vida mía.

A Mis Hermanos, son el compromiso mismo con la vida, son causa fundamental de mi esperanza, de mis anhelos... Motivo especial para superarme día a día. Gracias por estar siempre a mi lado.

Gracias por su permanente y frecuente apoyo, por su comprensión, por sacrificar tiempo y espacio, por hacer de esta: la causa de todos, por levantarme cuando alguna vez caí, por inyectar mi espíritu de mucha voluntad, por hacer de mí una mujer de bien, para servir a la sociedad.

RESUMEN.

La investigación se realizó en el Laboratorio básico de Microbiología del Centro Tecnológico Maquita propiedad de la Fundación Maquita Comercializando como Hermanos (MCCH), tuvo como objetivo, evaluar el aislamiento y la caracterización de los Microorganismos Eficientes (EM) solubilizadores de fósforo y nitrógeno presentes en el suelo del Bosque Húmedo Jauneche. Se utilizó medios de cultivo selectivos, ASHBY para determinar la capacidad solubilizadora de fósforo (CSF) y PIKOVSKAYA para determinar la capacidad fijadora de nitrógeno (CFN); características macro y microscópicas para establecer bajo estas características los posibles géneros. Se aislaron del área del bosque y de una zona con caña guadua. Para valorar la eficiencia de los microorganismos aislados se realizó Bioles constituyendo los siguientes tratamientos: T1: Biol con microorganismos de montaña; T2: Biol con microorganismos eficientes aislados; T3: Biol con microorganismos aislados pre-fermentados; T4: Biol con microorganismos eficientes + levadura. Se aplicó un Diseño Completamente al Azar con cuatro repeticiones, los biodigestores se constituyeron de depósitos herméticos de 12 litros de capacidad. Se analizó las características físico-químicas y químicas de los Bioles. Se aislaron ocho microorganismos con capacidad fijadora de nitrógeno y solubilizadora de fósforo en igual proporción, las características de mayor frecuencia fue colonias secas de forma irregular, además, formas filamentosas y conidióforos que permitieron identificar posibles cepas de *Streptomyces* sp., *Penicillium* sp., *Nocardia* y *Aspergillus* sp. El Biol con microorganismos de montaña (T1) presentó el mayor aumento de temperatura y la mayor reducción del pH, mientras el valor más alto en la conductividad eléctrica y salinidad se obtuvo del Biol pre-fermentado (T3). El Biol pre-fermentado (T3) presentó los valores más elevados de nitrógeno; fósforo; potasio; calcio; magnesio; boro; zinc; hierro y manganeso, el Biol con microorganismos eficientes (T2) mostró el mayor contenido de cobre.

Palabras claves: Microorganismos Eficientes, Capacidad Solubilizadora de Fósforo, Capacidad Fijadora de Nitrógeno, Biol.

ABSTRACT.

The investigation was carried out in the basic Laboratory of Microbiology of the Center Technological Bruise property of the Foundation Bruise Marketing as Siblings (MCCH), had as objective, to evaluate the isolation and the characterization of the Microorganisms Efficient (EM) phosphate solubilizing and nitrogen present in the floor of the Humid Forest Jauneche. It was used selective cultivation means, ASHBY to determine the capacity phosphate solubilizing (CSF) and PIKOVSKAYA to determine the capacity nitrogen fixating (CFN) and characteristic macro and microscopic to settle down I lower these characteristics the possible goods. They were isolated of the area of the forest and of an area with cane guadua. To value the efficiency of the isolated microorganisms Bioles was carried out constituting the following treatments: T1: Biol with mountain microorganisms; T2: Biol with efficient isolated microorganisms; T3: Biol with isolated pre-fermented microorganisms; T4: Biol with efficient microorganisms + yeast. A Design was applied Totally at random with four repetitions, the biodigestor was constituted of hermetic deposits of 12 liters of capacity. It was analyzed the physical-chemical and chemical characteristics of Bioles. Eight microorganisms were isolated with capacity nitrogen fixating and phosphate solubilizing in same proportion, the characteristics of more frequency were dry colonies in an irregular way, also, you form filamentous and conidióforos that allowed to identify possible stumps of *Streptomyces* sp, *Penicillium* sp., *Nocardia* and *Aspergillus* sp. Biol with mountain (T1) microorganisms presented the biggest increase of temperature and the biggest reduction in the pH, while the highest value in the electric conductivity and salinity was obtained of pre-fermented (T3) Biol. Pre-fermented (T3) Biol presented the highest values in nitrogen; match; potassium; calcium; magnesium; boron; zinc; iron and manganese, Biol with efficient (T2) microorganisms showed the biggest copper content.

Key words: Efficient Microorganisms, Capacity phosphate solubilizing, Capacity Nitrogen Fixating, Biol.

TABLA DE CONTENIDO.

Capítulo	Página.
PORTADA.....	i
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	ii
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	iii
CERTIFICACIÓN DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO.....	iv
CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
DEDICATORIA.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
TABLA DE CONTENIDO.....	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
ÍNDICE DE ECUACIONES.....	xv
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xvi
CÓDIGO DUBLIN.....	xvii
INTRODUCCIÓN.....	1
 CAPÍTULO I.....	 3
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	3
1.1. Problema de investigación.....	4
1.1.1. Planteamiento del problema.....	4
1.1.2. Formulación del problema.....	5
1.1.3. Sistematización del problema.....	5
1.2. Objetivos.....	5
1.3.1. Objetivo general.....	5
1.3.2. Objetivos específicos.....	5
1.3. Justificación.....	6

CAPÍTULO II.....	
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN.....	7
2.1. Marco teórico.....	8
2.1.1. El Bosque Húmedo.....	8
2.1.1.1. Situación del Bosque Húmedo ecuatoriano.....	8
2.1.1.2. Bosque Húmedo “Jauneche”.....	8
2.1.2. Los microorganismos simbióticos y de vida libre del suelo.....	9
2.1.2.1. Los microorganismos y su función.....	10
2.1.2.2. Grupos funcionales de los microorganismos del ciclo del nitrógeno.....	12
2.1.2.2.1. Bacterias y hongos fijadores de nitrógeno.....	15
2.1.2.3. Grupos funcionales de los microorganismos del ciclo del fósforo.....	16
2.1.2.3.1. Bacterias y hongos solubilizadores de fósforo.....	19
2.1.3. Biofertilizantes.....	20
2.1.3.1. Fertilizante orgánico líquido (Biol).....	21
2.1.4. Trabajos relacionados.....	23
2.1.4.1. Aislamiento y caracterización de microorganismos.....	23
2.1.4.2. Uso de microorganismos para el enriquecimiento de fertilizantes orgánicos.....	27
CAPÍTULO III.....	30
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	30
3.1. Localización.....	31
3.2. Tipo de investigación.....	31
3.3. Métodos de investigación.....	32
3.4. Fuentes de recopilación de información.....	32
3.5. Diseño de la investigación.....	32
3.6. Instrumentos de investigación.....	33
3.6.1. Variables evaluadas.....	33
3.6.1.1. Capacidad de fijación de nitrógeno y solubilización del fósforo.....	33
3.6.1.2. Características macroscópicas y microscópicas de las cepas aisladas.....	33
3.6.1.3. Características físico-químicas de los Bioles.....	34
3.6.1.4. Composición química de los Bioles.....	34
3.6.2. Procedimiento experimental.....	34

3.6.2.1.	Aislamiento de microorganismos y cultivo en medios selectivos.....	34
3.6.2.2.	Elaboración de Biol con la inclusión de las cepas aisladas.....	35
3.1.	Tratamiento de los datos.....	35
3.2.	Recursos humanos y materiales.....	35
CAPÍTULO IV.....		37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		37
4.1.	Resultados y discusión.....	38
4.1.1.	Características macro y microscópicas de los Microorganismos Eficientes aislados del Bosque Húmedo Jauneche.....	38
4.1.2.	Características físico-químicas del Biol enriquecido con los Microorganismos Eficientes aislados.....	43
4.1.3.	Aporte nutricional de los Microorganismos Eficientes aplicados en la elaboración de Biol.....	45
CAPÍTULO V.....		48
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		48
5.1.	Conclusiones.....	49
5.2.	Recomendaciones.....	50
CAPÍTULO VI.....		51
BIBLIOGRAFÍA.....		51
6.1.	Literatura citada.....	52
CAPÍTULO VII.....		60
ANEXOS.....		60
7.1.	Anexos.....	61
7.1.1.	Análisis de varianza de las variables estudiadas.....	61
7.1.2.	Imágenes de la investigación.....	64

ÍNDICE DE TABLAS.

	Página.
Tabla 1. Características climatológicas del Centro Tecnológico Maquita y Bosque Húmedo Jauneche.....	31
Tabla 2. Análisis de Varianza ADEVA del diseño experimental.....	32
Tabla 3. Descripción de los tratamientos.....	33
Tabla 4. Materiales y proporciones empleados en la elaboración de los Bioles.....	35
Tabla 5. Microorganismos Eficientes (EM) aislados del Bosque Húmedo Jauneche, área de muestreo y posibles géneros.....	38
Tabla 6. Características macro y microscópicas de los Microorganismos Eficientes (EM) aislados.....	39
Tabla 7. Características físico-químicas del Biol enriquecido con los Microorganismos Eficientes (EM) aislados.....	43
Tabla 8. Composición química de los Bioles enriquecidos con los Microorganismos Eficientes (EM) aislados.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS.

	Página.
Figura 1. Ciclo del nitrógeno.....	13
Figura 2. Actividad de los grupos funcionales de microorganismos en el ciclo del nitrógeno.....	14
Figura 3. Ciclo del fósforo.....	17
Figura 4. Actividad de los grupos funcionales de microorganismos en el ciclo del fósforo.....	18
Figura 5. Etapas y residuales de la descomposición en un biodigestor.....	22
Figura 6. Colonia de hongos asociados a la rizosfera y al sustrato de plantas de vainilla.....	24
Figura 7. Colonia bacterias asociadas a la rizosfera y al sustrato de plantas de vainilla.....	24
Figura 8. Actividad solubilizadora de fosfato y fijación biológica de nitrógeno.	25
Figura 9. Bacterias del género <i>Streptomyces</i> con capacidad fijadora de nitrógeno.....	40
Figura 10. Bacteria <i>Nocardia</i> (6TBJPDA) con capacidad fijadora de nitrógeno.	41
Figura 11. Hongos del género <i>Penicillium</i> con capacidad solubilizadora de fósforo.....	42
Figura 12. Hongo <i>Aspergillus fumigatus</i> (7TBJPDA) con capacidad solubilizadora de fósforo.....	43

ÍNDICE DE ECUACIONES.

	Página.
Ecuación 1. Modelo lineal del diseño experimental.....	22
Ecuación 2. Contenido de materia seca (MS).....	23
Ecuación 3. Contenido de materia orgánica (MS).....	23
Ecuación 4. Contenido de materia inorgánica (MS).....	24
Ecuación 5. Contenido de Proteína bruta (PB).....	24
Ecuación 6. Contenido de Fibra detergente neutra (FDN).....	25
Ecuación 7. Contenido de Fibra detergente ácida (FDA).....	25

ÍNDICE DE ANEXOS.

	Página.
Anexo 1. Análisis de varianza de la temperatura de los Bioles enriquecidos con Microorganismos Eficientes (EM) a los 15 días.....	61
Anexo 2. Análisis de varianza de la temperatura de los Bioles enriquecidos con Microorganismos Eficientes (EM) a los 30 días.....	61
Anexo 3. Análisis de varianza de la conductividad eléctrica de los Bioles enriquecidos con Microorganismos Eficientes (EM) a los 15 días.....	61
Anexo 4. Análisis de varianza de la conductividad eléctrica de los Bioles enriquecidos con Microorganismos Eficientes (EM) a los 30 días.....	62
Anexo 5. Análisis de varianza del pH de los Bioles enriquecidos con Microorganismos Eficientes (EM) a los 15 días.....	62
Anexo 6. Análisis de varianza del pH de los Bioles enriquecidos con Microorganismos Eficientes (EM) a los 30 días.....	62
Anexo 7. Análisis de varianza de la salinidad de los Bioles enriquecidos con Microorganismos Eficientes (EM) a los 15 días.....	63
Anexo 8. Análisis de varianza de la salinidad de los Bioles enriquecidos con Microorganismos Eficientes (EM) a los 30 días.....	63
Anexo 9. Resultados del análisis de laboratorio.....	64

CÓDIGO DUBLIN.

Título:		Aislamiento y caracterización de microorganismos eficientes en la solubilización de nitrógeno y fósforo presentes en el suelo del Bosque Húmedo Jauneche			
Autora:		Ana Patricia Pacheco Vila			
Palabras clave:		Microorganismos Eficientes,	Capacidad Solubilizadora de Fósforo,	Capacidad Fijadora de Nitrógeno,	Biol.
Fecha de Publicación:					
Editorial:					
Resumen	Resumen.- se evaluó el aislamiento y la caracterización de los Microorganismos Eficientes (EM) solubilizadores de fósforo y nitrógeno presentes en el suelo del Bosque Húmedo Jauneche. Se utilizó medios de cultivo selectivos, ASHBY para determinar la capacidad solubilizadora de fósforo (CSF) y PIKOVSKAYA para determinar la capacidad fijadora de nitrógeno (CFN) y características macro y microscópicas para establecer bajo estas características los posibles géneros. Se aislaron del área del bosque y de una zona con caña guadua. Para valorar la eficiencia de los microorganismos aislados se realizó Bioles constituyendo los siguientes tratamientos: T1: Biol con microorganismos de montaña; T2: Biol con microorganismos eficientes aislados; T3: Biol con microorganismos aislados pre-fermentados; T4: Biol con microorganismos eficientes + levadura. Se aplicó un Diseño Completamente al Azar con cuatro repeticiones, los biodigestores se constituyeron de depósitos herméticos de 12 litros de capacidad. Se analizó las características físico-químicas y químicas de los Bioles. Se aislaron ocho microorganismos con capacidad fijadora de nitrógeno y solubilizadora de fósforo en igual proporción, las características de mayor frecuencia fue colonias secas de forma irregular, además, formas filamentosas y conidióforos que permitieron identificar posibles cepas de <i>Streptomyces</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Nocardia</i> y <i>Aspergillus</i> sp. El Biol con microorganismos de montaña (T1) presentó el mayor aumento de temperatura y la mayor reducción del pH, mientras el valor más alto en la conductividad eléctrica y salinidad se obtuvo del Biol pre-fermentado (T3). El Biol pre-fermentado (T3) presentó los valores más elevados de nitrógeno;				

fósforo; potasio; calcio; magnesio; boro; zinc; hierro y manganeso, el Biol con microorganismos eficientes (T2) mostró el mayor contenido de cobre.

Abstract. - To evaluate the isolation and the characterization of the Microorganisms Efficient (EM) phosphate solubilizing and nitrogen present in the floor of the Humid Forest Jauneche. It was used selective cultivation means, ASHBY to determine the capacity phosphate solubilizing (CSF) and PIKOVSKAYA to determine the capacity nitrogen fixating (CFN) and characteristic macro and microscopic to settle down I lower these characteristics the possible goods. They were isolated of the area of the forest and of an area with cane guadua. To value the efficiency of the isolated microorganisms Bioles was carried out constituting the following treatments: T1: Biol with mountain microorganisms; T2: Biol with efficient isolated microorganisms; T3: Biol with isolated pre-fermented microorganisms; T4: Biol with efficient microorganisms + yeast. A Design was applied Totally at random with four repetitions, the biodigestor was constituted of hermetic deposits of 12 liters of capacity. It was analyzed the physical-chemical and chemical characteristics of Bioles. Eight microorganisms were isolated with capacity nitrogen fixating and phosphate solubilizing in same proportion, the characteristics of more frequency were dry colonies in an irregular way, also, you form filamentous and conidióforos that allowed to identify possible stumps of *Streptomyces* sp, *Penicillium* sp., *Nocardia* and *Aspergillus* sp. Biol with mountain (T1) microorganisms presented the biggest increase of temperature and the biggest reduction in the pH, while the highest value in the electric conductivity and salinity was obtained of pre-fermented (T3) Biol. Pre-fermented (T3) Biol presented the highest values in nitrogen; match; potassium; calcium; magnesium; boron; zinc; iron and manganese, Biol with efficient (T2) microorganisms showed the biggest copper content.

Descripción	86 hojas : dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM
URI:	

INTRODUCCIÓN.

Preservar el ambiente y el cuidado de los caudales productivos son prioridades fundamentales para llevar a cabo la agricultura sostenible, desde este punto de vista considerando el deterioro ambiental que causa el uso indiscriminado de fertilizantes sintéticos, surge interés de utilizar técnicas establecidas para la aplicación de microorganismos para la elaboración de biofertilizantes.

Como una alternativa a los fertilizantes químicos está la posibilidad de utilizar bacterias del suelo, que como parte de su metabolismo incrementan la fertilidad y benefician a las plantas, por lo que se les ha denominado promotoras del crecimiento de las plantas (PGPRs). Entre sus actividades están la fijación del nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de hormonas, antibióticos y otros compuestos de importancia para el desarrollo de los cultivos (1).

En general, los microorganismos desarrollan en el suelo actividades relacionadas con procesos de descomposición, mineralización de complejos orgánicos y translocación de bioproductos y elementos minerales que conllevan al desplazamiento de nutrientes en el ecosistema suelo-planta. Dentro de la gran diversidad de microorganismos presentes en el suelo llaman la atención los que se encuentran vinculados con la estimulación de los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes, ya que a través de estos se genera la movilización de elementos como carbono, nitrógeno, oxígeno, hidrógeno, calcio, sodio, azufre, fósforo y potasio entre los seres vivos y la atmósfera o la biomasa (2).

Los microorganismos son los componentes más importantes del suelo. Constituyen su parte viva y son los responsables de la dinámica de transformación y desarrollo. La diversidad de microorganismos que se encuentran en una fracción de suelo cumple funciones determinantes en la transformación de los componentes orgánicos e inorgánicos que se le incorporan. Esto permite comprender su importancia en la nutrición de las plantas al efectuar procesos de transformación hasta elementos que pueden ser asimilados por sus raíces. La humificación de la materia orgánica es un proceso netamente microbiológico (3).

El nitrógeno molecular (N_2) que existe en la atmósfera no es fácilmente asimilable por los vegetales debido a que el triple enlace que une los átomos que forman la molécula es difícil de romper; la única forma de aprovechar el nitrógeno atmosférico es mediante el proceso metabólico conocido como Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN), el cual asegura la disponibilidad de nitrógeno en los ecosistemas naturales (Zuberer, 1998 citado por Lara *et al.*,

(4)) por otro lado el Fósforo (P) es abundante en los suelos tanto en formas inorgánicas y orgánicas. El bajo nivel de disponibilidad de P es debido a la alta reactividad de P soluble con Ca, Fe (5).

En la actualidad la fijación biológica de micro y macro nutrientes tiene mayor relevancia, en el contexto de agricultura sostenible, evitando así la utilización de insumos químicos contribuyendo al mejoramiento del suelo, de allí se hace necesario realizar investigaciones con ideas relacionadas a la conservación de los ecosistemas con el uso de biofertilizantes que han tomado significancia desarrollándose así investigaciones de Microorganismos de funciones eficientes para la obtención de biofertilizantes. La propuesta hace parte de un proyecto de investigación en el área de Microbiología del Suelo con gran connotación en agroecología microbiana del Centro de Tecnología Maquita de la Fundación MCCH (Maquita Comercializando Como Hermanos). El trabajo investigativo estuvo enmarcado en realizar el aislamiento y caracterización de Microorganismos Eficientes solubilizadores de fósforo y nitrógeno presentes en el suelo del Bosque Húmedo Jauneche y la evaluación del efecto en las características físico-químicas y químicas del fertilizante orgánico líquido Biol enriquecido con los microorganismos aislados.

CAPÍTULO I
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de investigación.

1.1.1. Planteamiento del problema.

El suelo agrícola cultivado en el mundo, ha sido degradado por el mal manejo de las prácticas agropecuarias (6). La utilización de fertilizantes químicos de fuente mineral, con poca eficiencia en el suelo, provoca un incremento en los costos de producción debido a su alto precio y a las altas dosis para alcanzar los requerimientos de los cultivos. Además del impacto en el ambiente por los activos insolubles que afectan los suelos (7).

El nitrógeno y el fósforo son los principales nutrientes que limitan el crecimiento de plantas. El nitrógeno es un elemento requerido en grandes cantidades por los cultivos, sin embargo, en el suelo es uno de los elementos más limitantes ya que se encuentra en formas poco disponibles para las plantas (8). La forma soluble de fósforo presente en los fertilizantes puede ser precipitado después de la aplicación y convertirse en formas insolubles, y no disponibles para las plantas (9) estos elementos considerados como los más importantes en el crecimiento y desarrollo de las plantas debe ser incorporados a través de la fertilización química o por medio de la fijación biológica y solubilización llevada a cabo por microorganismos.

Estas bacterias y otros microorganismos usados en la fertilización de los suelos agrícolas constituyen los biofertilizantes y existen ya algunos que son comercializados; sin embargo, algunas veces no son efectivos debido a que proceden de condiciones edafoclimáticas totalmente diferentes, por lo que se prefiere el uso de microorganismos propios de los suelos donde van a ser utilizados, adaptados a las condiciones ecológicas y que puedan ser utilizados, compitiendo exitosamente con la biota nativa (1).

1.1.2. Formulación del problema.

¿Se ha logrado aislar y la caracterizar los Microorganismos Eficientes solubilizadores de fósforo y nitrógeno presentes en el suelo del Bosque Húmedo Jauneche?

1.1.3. Sistematización del problema.

- ¿Se han aislado y caracterizado microorganismos solubilizadores de Nitrógeno y Fósforo, haciendo uso de técnicas de medio de cultivo selectivo y según los criterios morfológicos macro y microscópicos?
- ¿Cuáles son las características físico-químicas de pH, temperatura, conductividad eléctrica y salinidad de Biol enriquecido con Microorganismos Eficientes aislados?
- ¿Qué aporte nutricional tienen los Microorganismos Eficientes aplicados en la elaboración de Biol?

1.2. Objetivos.

1.3.1. Objetivo general.

Evaluar el aislamiento y la caracterización de los microorganismos Eficientes solubilizadores de fósforo y nitrógeno presentes en el suelo del Bosque Húmedo Jauneche.

1.3.2. Objetivos específicos.

- Aislar y caracterizar los microorganismos solubilizadores de Nitrógeno y Fósforo, haciendo uso de técnicas de medio de cultivo selectivo y siguiendo criterios morfológicos macro y microscópicos.
- Evaluar las características físico-químicas de pH, temperatura, conductividad eléctrica y salinidad de Biol enriquecido con los Microorganismos Eficientes aislados.
- Determinar el aporte nutricional de los Microorganismos Eficientes aplicados en la elaboración de Biol, mediante análisis químico.

1.3. Justificación.

La necesidad apremiante de estrategias sostenibles y de bajo impacto agrícola en agricultura requiere del desarrollo de preparados microbianos que mejoren la nutrición de las plantas. En los últimos años ha habido un interés creciente en los microorganismos benéficos del suelo, ya que éstos pueden promover el crecimiento de las plantas y en algunos casos también evitar la infección del tejido vegetal por patógenos. Tales microorganismos pueden ser simbióticos o de vida libre. Simbióticos se refieren a aquellos microorganismos que viven dentro de los tejidos, mientras los de vida libre están asociados a las partículas del suelo y generalmente se encuentran en la zona de la rizósfera (10).

La aplicación de técnicas de biotecnología microbiana permiten que varios grupos de microorganismos sean utilizados como alternativas válidas en el proceso de mejoramiento de suelos y fertilidad, como prueba de ello tenemos la utilización de microorganismos capaces de solubilizar fósforo y nitrógeno en el suelo.

La importancia de los biofertilizantes radica en que son una opción amigable para el suelo ya que debido al uso excesivo de las tierras de cultivo, estas puedan presentar un desgaste, por lo tanto se espera contribuir a mitigar el problema de contaminación ambiental provocado por el uso indiscriminado de fertilizantes químicos, mediante el uso de los biofertilizantes (6).

El uso de la técnica de captura de microorganismos de montaña es factible para ser utilizada por los productores agropecuarios como manejo económico y rentable de la producción, y que pueden ser utilizados como un sustituto parcial de la fertilización o de enmiendas (11).

El presente estudio tuvo como finalidad aislar y caracterizar microorganismos del suelo que tengan la capacidad de solubilizar fósforo y nitrógeno mediante la producción de ácidos orgánicos. La posibilidad de encontrar alternativas válidas más limpias en la producción agrícola, justifica ampliamente la ejecución de estudios como el presente. Ya que no solamente se obtendrán productos de mejor calidad, sino que también se cuidará el ambiente, al disminuir el uso excesivo de fertilizantes sintéticos.

CAPÍTULO II
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco teórico.

2.1.1. El Bosque Húmedo.

Este ecosistema es famoso por su exuberancia y por poseer una de las mayores diversidades de plantas y animales en el mundo. La vegetación se encuentra muy desarrollada y puede ser dividida en muchos estratos dependiendo su altura (suelo, sotobosque, dosel, árboles emergentes.) El dosel normalmente está formado por árboles altos, de 25 a 35 m de altura; los árboles emergentes gigantes superan los 50 m de altura. La perpetua humedad y el calor favorecen un rápido reciclaje de los nutrientes: hongos microorganismos e insectos descomponen con rapidez los materiales y los vuelven a integrar a la cadena de nutrientes que toman las plantas. También hay hongos, conocidos como micorrizas, que viven asociadas a las raíces de muchos árboles aumentando la superficie de absorción (12).

En los bosques los microorganismos que llevan a cabo este proceso (fijación de nitrógeno) representan aproximadamente el 5% de la población bacteriana total y se encuentran en la superficie de varios órganos de los árboles, tejidos radicales y foliares, suelo y tubérculos de ectomicorrizas (13).

2.1.1.1. Situación del Bosque Húmedo ecuatoriano.

Los bosques húmedos tropicales de la costa del Ecuador forman parte de la ecorregión del Chocó, que compartimos con Colombia y que constituye uno de los 25 puntos calientes o hotspots del mundo (áreas que en conjunto contribuyen con el 75% de la biodiversidad del planeta y en las que se debería concentrar gran parte de los esfuerzos de conservación. La extraordinaria biodiversidad de esta región y su importancia en términos ecológicos, se ve contrastada con el poco conocimiento que se tiene aún de ella y con la acelerada destrucción de la que es objeto (14).

2.1.1.2. Bosque Húmedo “Jauneche”.

Es un área protegida que tiene una extensión de 139.8 hectáreas. Se encuentra en la Zona bioclimática Región húmeda tropical según Holdridge, en la Zona de vida del Bosque tropical húmedo. Los tipos de bosque y vegetación que se pueden apreciar son: Bosque maduro no intervenido: árboles, arbustos, herbáceas, epífitas, lianas y helechos. Bosque inundado y pantano estacional: Vegetación limosa - herbáceas, trepadoras, sumergidas y

flotantes. Bosque disturbado: Malezas arbóreas y herbáceas - árboles, arbustos, herbáceas y epifitas. Posee una biodiversidad característica de un bosque tropical húmedo primario. En Jauneche el paisaje que presenta es estrecho y homogéneo. Se compone de la repetición de diversas especies de flora que obstruyen el campo visual, pues la densidad del bosque es muy alta. (15).

La Reserva “Jauneche” alberga una combinación de especies endémicas del Chocó y de Tumbes. Existen algo más de 160 especies, entre las que se incluyen poblaciones de especies amenazadas de rango restringido, como *Lathrotriccus griseipectus* y *Onychorhynchus occidentalis*. La flora de esta Reserva fue caracterizada por Dodson *et al.*, (16), aún existen dos especies de primates en la Reserva, *Alouatta palliata* y *Cebus capucinus*. También se encuentran dos especies de ardillas, incluyendo *Sciurus stramineus*, endémica tumbesina. Existen dos especies de venados, *Odocoileus virginianus* y *Mazama americana* (DD), algunos roedores, marsupiales grandes y felinos como *Leopardus pardalis* y *L. wiedii*. Especies más grandes como *Puma concolor* y *Panthera onca* se han extinguido.

2.1.2. Los microorganismos simbióticos y de vida libre del suelo.

En un suelo fértil existe una gran diversidad de microorganismos. Las bacterias exceden la población de todos los grupos de microorganismo y los hongos que prevalecen cerca de la superficie en una condición aeróbica son descomponedores y mejoran la estructura física mediante la acumulación de sus micelios (17).

El suelo es un recurso viviente y dinámico que condiciona la producción de alimentos. Su calidad tiene un papel fundamental en el mantenimiento del balance entre producción y consumo de dióxido de carbono en la biosfera. El suelo no sólo es la base para la agricultura, sino que de él depende toda la vida del planeta. La mayor parte de las etapas de los ciclos biogeoquímicos tienen lugar en él Paul y Clark (1996) citados por García (18).

La biomasa microbiana en la rizósfera es hasta 10 veces mayor que la del suelo; estos microorganismos transforman la materia orgánica en humus, que es el carbono más estable. La biomasa de la raíz es muy superior en presencia de simbioses (hongos ectomicorrízicos y micorrízico-arbusculares, bacterias fijadoras de nitrógeno); estos hongos en la raíz de las plantas son fundamentales para la biodiversidad y el ecosistema (19).

Las bacterias endófitas de las plantas son aquellas que se encuentran en los tejidos en diferentes concentraciones, pero no provocan una actividad patógena sobre esta (9), establecen asociación simbiótica y producen grandes beneficios para las plantas. Cumplen una gran diversidad de funciones como promotoras de crecimiento vegetal, control biológico sobre una diversidad de fitopatógenos, mejoran la eficiencia de los procesos de fitoremediación de compuesto tóxicos en la rizósfera (20).

Mientras los microorganismos de vida libre están en el suelo. La actividad y eficiencia de los microorganismos de vida libre (no simbiótica) con capacidad de fijar nitrógeno han demostrado un extraordinario potencial para la explotación agrícola (4).

2.1.2.1. Los microorganismos y su función.

Las poblaciones microbianas y sus interacciones son componentes clave en el sistema continuo suelo-planta, afectando al desarrollo de los cultivos. La fijación biológica del nitrógeno atmosférico por bacterias diazotróficas, es el segundo proceso más importante después de la fotosíntesis que se realiza en la naturaleza (Silvia *et al.*, 1998 citados por Pérez *et al.*, (9)).

Las ventajas nutricionales que obtiene cada integrante de una asociación micorrízica explica, en parte, el éxito de tal interrelación. Algunos hongos micorrízicos pueden producir auxinas o sea hormonas que estimulan el crecimiento de los vegetales, y otros producen antibióticos. Esto ayuda a regular el microambiente alrededor de las raíces y contribuye a prevenir la infección de las plantas (21).

En las dos últimas décadas se ha relevado la existencia de asociaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno, con gramíneas forrajeras tropicales y cereales dentro de las características más importantes está la interacción entre la disimilación y asimilación de nitratos y la fijación de nitrógenos cuya manipulación debe representar la clave para complementar la fijación con abonos minerales (22).

Además, la biomasa de la raíz es mucho mayor en presencia de microorganismos simbioses (hongos ectomicorrízicos, micorrízico-arbusculares, fijadores de nitrógeno) los que, además de proveerles nutrientes y agua, tienen impactos no nutricionales sobre las plantas, como capacidad para excluir iones tóxicos, influencia sobre la fotosíntesis y actividad hidráulica de la planta y control de patógenos (19).

Los microorganismos diazótrofos (fijadores de nitrógeno), organismos de vida libre capaces de fijar nitrógeno, descritos desde el siglo pasado, han sido objeto no solo de estudio en microbiología de suelos, sino también en el desarrollo de productos biológicos comerciales (23).

Para el caso de la caña de azúcar se ha demostrado la importancia que tiene la bacteria endófito *Azoarcus sp.*, dado que suple en un 70% las necesidades de nitrógeno a través de la fijación biológica de nitrógeno (9).

El potasio es uno de los minerales con requerimientos más altos en la nutrición vegetal, y a pesar de que el suelo presente cantidades suficientes para satisfacer las necesidades de los cultivos, este mineral debe ser suministrado en fertilizantes, debido a que las formas de potasio presentes en mayor cantidad en la solución del suelo, no son asimilables por las plantas. Sin embargo ciertos microorganismos son capaces de solubilizar el potasio del suelo posibilitando a las plantas la asimilación de este mineral (24).

Cepas de *Bacillus sphaericus* y *Bacillus firmus*, son reconocidos en la literatura en el biocontrol de larvas de insectos y fitopatógenos respectivamente (6).

En la germinación de semillas se utilizan inóculos de microorganismos fijadores de nitrógeno, un ejemplo es la inoculación de café (*Coffea canephora*) en vivero, ya que favorece el crecimiento de las plántulas (altura de planta, diámetro de tallo y número de hojas) (25). Este efecto también fue observado por Escobar *et al.*, (1) en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), disminuyendo el número de días a la floración e incrementando la altura, volumen radicular, materia seca total, aérea y radicular. En cacao Argüello y Moreno (26) indican que las partes más desarrolladas de las plantas inoculadas en su estudio fueron la longitud del tallo, la raíz y la lámina foliar; además de una mayor concentración de nitrógeno en el tejido vegetal en condiciones de campo. En el caso de gramíneas de interés comercial como el arroz (*Oryza sativa* L.), Hernández *et al.*, (27) indican que estos microorganismos liberan metabolitos en la rizosfera que disminuyen la concentración de *Pyricularia oryzae* Sacc. y la severidad de la enfermedad, lo que trae consigo reducciones en la aplicación de productos químicos y menor incidencia de la piriculariosis o quemazón del arroz. En especies forestales la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno estimuló el crecimiento longitudinal y la nutrición nitrogenada de Pino (*Pinus patula*) (13).

Las bacterias fijadoras de N atmosférico hidrocarbonoclastas son capaces de fijar N atmosférico en suelos contaminados con queroseno, por lo que se sugiere incorporar a este grupo microbiano en los suelos afectados por este hidrocarburo (28).

Respecto a esta problemática Pérez *et al.*, (29), indican que la formación de micelas por la interacción de biosurfactantes con compuestos hidrofóbicos como los hidrocarburos favorece los procesos de biorremediación en sitios contaminados con este tipo de compuestos porque mejoran la disponibilidad de los hidrocarburos hacia los microorganismos y las plantas para absorberlos, transformarlos y/o degradar estos contaminantes orgánicos.

Las poblaciones de bacterias fijadoras de N atmosférico y bacterias fijadoras de N atmosférico hidrocarbonoclastas son mayores en la zona rizosférica que en el suelo sin planta. Esto indica que, en suelos contaminados por queroseno, es importante incorporar plantas al sistema para estimular a mayores poblaciones en el sitio afectado (28).

La correlación entre estos grupos funcionales es evidente y muy importante en el mantenimiento del ciclo del nitrógeno y la fertilidad del suelo. Cualquier factor que altera las poblaciones de estos grupos tendrá una respuesta inmediata en el crecimiento de las plantas (30).

Por tal motivo es evidente la necesidad de reintroducir los microorganismos del suelo como parte de programas de recuperación de suelos y/o revegetación de áreas severamente alteradas como los taludes de carreteras, derechos de vía de gasoductos y oleoductos, áreas expuestas por actividad minera y otras (31).

2.1.2.2. Grupos funcionales de los microorganismos del ciclo del nitrógeno.

Las plantas, los animales y los microorganismos requieren la mayoría de las formas de nitrógeno para su incorporación en la biomasa celular, pero la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico está restringido a un número limitado de bacterias y asociaciones simbióticas (30).

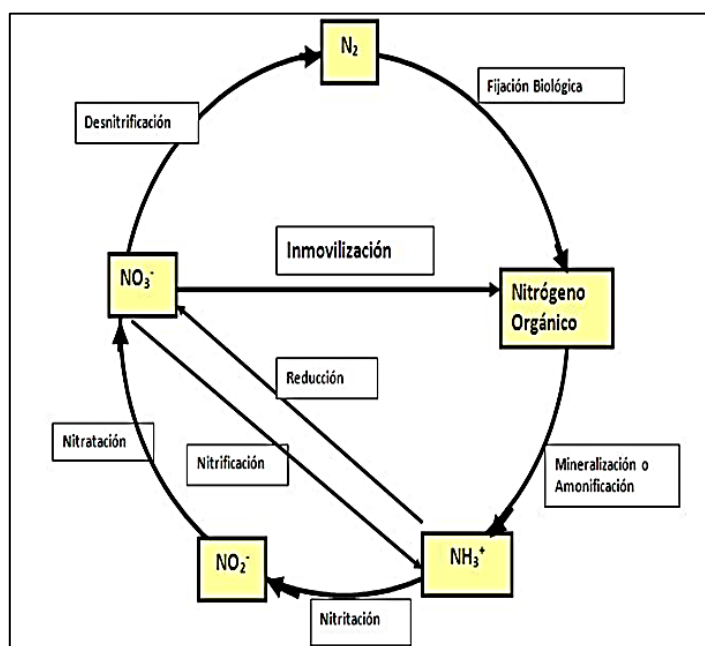
El nitrógeno, presente en los tejidos verdes de las plantas y en semillas, es considerado un macronutriente junto con el fósforo y el potasio. Los suelos tienen cantidades de nitrógeno muy superiores a las requeridas por los cultivos; sin embargo, casi todo este elemento se

encuentra en la materia orgánica y anualmente sólo se mineralizan 1 a 3 % del nitrógeno total (Ardila, 2007 citado por Escobar *et al.*, (1)).

La fijación de nitrógeno puede ser puramente abiótica o biológica. Por la primera se forman óxidos como consecuencia de la combustión de compuestos orgánicos, descargas eléctricas, etc., que son arrastrados al suelo por la lluvia, o amonio por el proceso industrial Haber Bosch. Por la segunda, la fijación biológica de nitrógeno (FBN), proceso llevado a cabo por organismos procarióticos, el N_2 es reducido a amonio e incorporado a la biosfera. A pesar de la abundancia de N_2 en la atmósfera (más del 70 por ciento), no es aprovechable por las plantas que se ven obligadas a utilizar las formas combinadas que se encuentran en el suelo en cantidad insuficiente para soportar los cultivos intensivos (32).

La molécula de nitrógeno, N_2 , es bastante inerte. Para separar los átomos, de tal manera que puedan combinarse con otros átomos, se necesita el suministro de grandes cantidades de energía. Tres desempeñan un papel importante. Uno de los procesos en la fijación del nitrógeno en la biosfera es el relámpago, la energía enorme de un relámpago rompe las moléculas de nitrógeno y permite que se combinen con el oxígeno del aire. Los óxidos de nitrógeno formados se disuelven en el agua de lluvia y forman nitratos. En esta forma pueden ser transportados a la tierra. La fijación atmosférica del nitrógeno probablemente representa un 5-8% del total (33). En la Figura 1, se muestra el ciclo del nitrógeno.

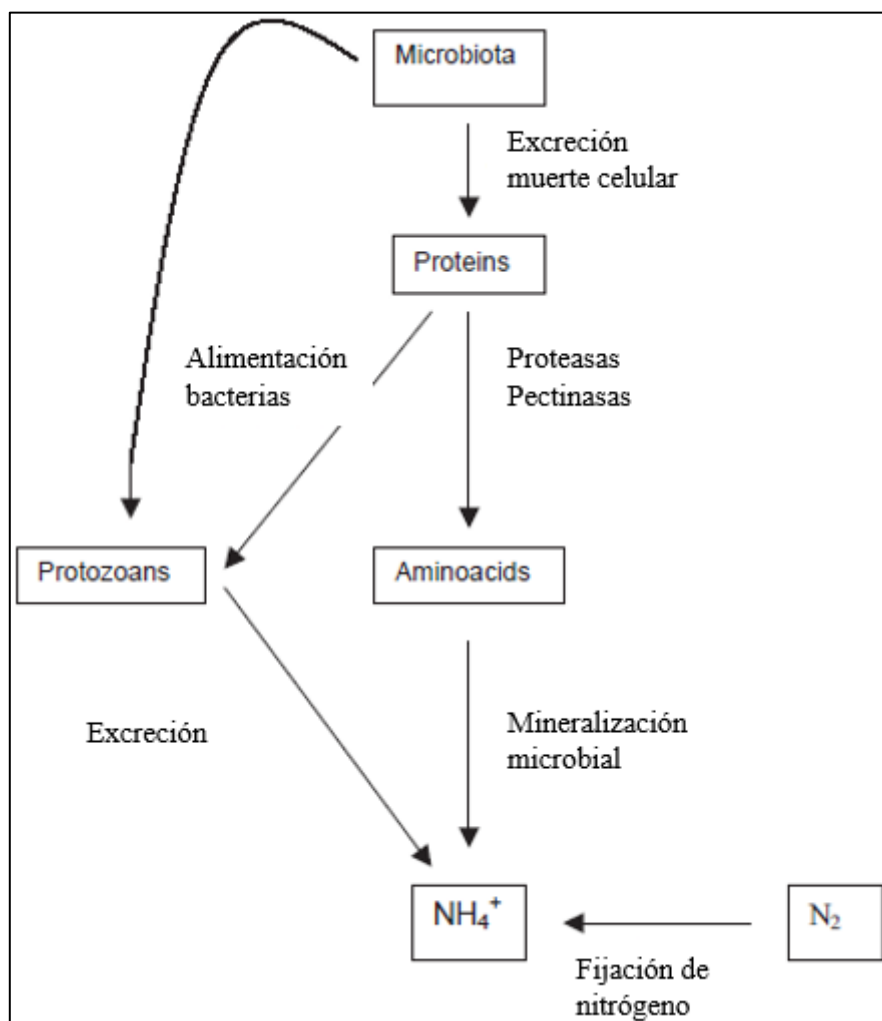
Figura 1. Ciclo del nitrógeno.



FUENTE: RODRÍGUEZ, 2014

Existen varios grupos funcionales en el ciclo del nitrógeno que se pueden utilizar como bioindicadores de alteraciones en el suelo, los grupos a tener en cuenta son los fijadores simbióticos o de vida libre (no simbióticos) de nitrógeno para las legumbres y plantas no leguminosas, respectivamente, y otros que participan en el proceso de mineralización del nitrógeno orgánico en el suelo tales como amonificadores de vida libre y protozoos, que también tienen una función importante de la movilización y la mineralización de los compuestos de nitrógeno (Figura 2). La fijación biológica no simbiótica de nitrógeno se lleva a cabo por algunas bacterias de vida libre géneros que están asociadas con la rizosfera de la planta. La asociación simbiótica de microorganismos y leguminosas es el más eficaz en términos de la cantidad de nitrógeno fijado. La cantidad de nitrógeno fijado por año por estos grupos de microorganismos es mucho mayor que la fijación de vida libre (30).

Figura 2. Actividad de los grupos funcionales de microorganismos en el ciclo del nitrógeno.



FUENTE: ANDRADE, 2004

2.1.2.2.1. Bacterias y hongos fijadores de nitrógeno.

El Nitrógeno (N) es un elemento necesario en la composición de proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares, siendo así una molécula esencial para el crecimiento de todos los organismos. En la atmósfera el N ocupa aproximadamente el 80%, existiendo en la forma $N\equiv N$; sin embargo, el N_2 , debido al triple enlace entre los dos átomos de nitrógeno, que hace a la molécula casi inerte, no puede ser aprovechado por la mayoría de las formas vivientes, sino sólo por un pequeño grupo de microorganismos altamente especializados, que incluyen algas, bacterias y actinomicetes. Para ser utilizado en el crecimiento, este debe ser primero reducido y luego “fijado” (combinado) en la forma de iones amonio (NH_4^+) o nitrato (NO_3^-) (Figura 1.) (34).

El proceso a través del cual esos microorganismos reducen el nitrógeno hasta una forma utilizable es conocido como Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN por sus siglas en español). El proceso puede ser llevado a cabo por los microorganismos en vida libre o en simbiosis con plantas, y el mismo no sólo permite usar el nitrógeno atmosférico sino también revertir o reducir la degradación del suelo. Las bacterias fijadoras de nitrógeno que se desarrollan de forma natural en el suelo, se conocen desde hace más de un siglo. Representan un biofertilizante ecológico y se dividen en dos grandes grupos: Las simbióticas, específicas de las leguminosas, como el *Rhizobium*, y las libres, que viven en el suelo y no necesitan la planta para su reproducción, como el *Azotobacter* y el *Azospirillum*, entre los más importantes en agricultura (Allan y Graham, 2002; Parsons, 2004) citado por Figueroa (34).

Los microorganismos capaces de catalizar el rompimiento del triple enlace de nitrógeno y activarlo para que se combine con otros elementos químicos, como el hidrógeno o el oxígeno, se les conoce con el nombre de fijadores de nitrógeno o diazótrofos. Dentro de las bacterias de vida libre encontramos especies de *Azospirillum*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Bacillus*. Numerosas investigaciones en el ámbito mundial demuestran las bondades la utilización de bacterias asimbióticas del género *Azotobacter* sp. y *Azospirillum* sp. En lo que se refiere a la reducción del periodo de tiempo de germinación en las semillas de tomate, ají y algodón, inoculadas con este microorganismo probablemente por la inducción de la producción de hormonas de crecimiento, incrementan la respuesta a la fertilización química u orgánica (6).

También existe asociación entre bacterias fijadoras y plantas del tipo gramíneas. En estos casos la bacteria invade los espacios entre células de la raíz pero sin penetrar en las células vegetales, por lo que no se trata de una simbiosis verdadera. Algunos cultivos que se pueden beneficiar de este tipo de asociaciones son: Caña de azúcar, Sorgo, Arroz y Trigo. Se conoce que algunas especies de *Azospirillum* y *Azotobacter* penetran la corteza de la raíz y producen fitohormonas como giberelinas, auxinas, citocininas, ácido abscísico y fijan N_2 (Lynch, 1990 citado por Rives *et al.*, (35)).

Las bacterias diazotróficas nativas aisladas tienen una correlación con la materia orgánica, fósforo, el pH del suelo, tipo de riego y profundidad de la raíz, a su vez se observa una mayor concentración de materia orgánica a mayor profundidad del suelo (23).

Los fijadores de nitrógeno más eficiente son cepas de *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradirhizobium* y *Azorhizobium* (5). Los géneros *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp, muestran una producción considerada de amonio lo que indica una gran capacidad de fijación de nitrógeno en ensayos *in vitro* (4).

Se ha determinado que la presencia del gen *NifH* codifica la enzima nitrogenasa responsable de la fijación de N_2 , por lo tanto en algunos estudios para determinar la actividad fijadora de nitrógeno, se realiza una prueba de la presencia de este gen en los microorganismos aislados (36).

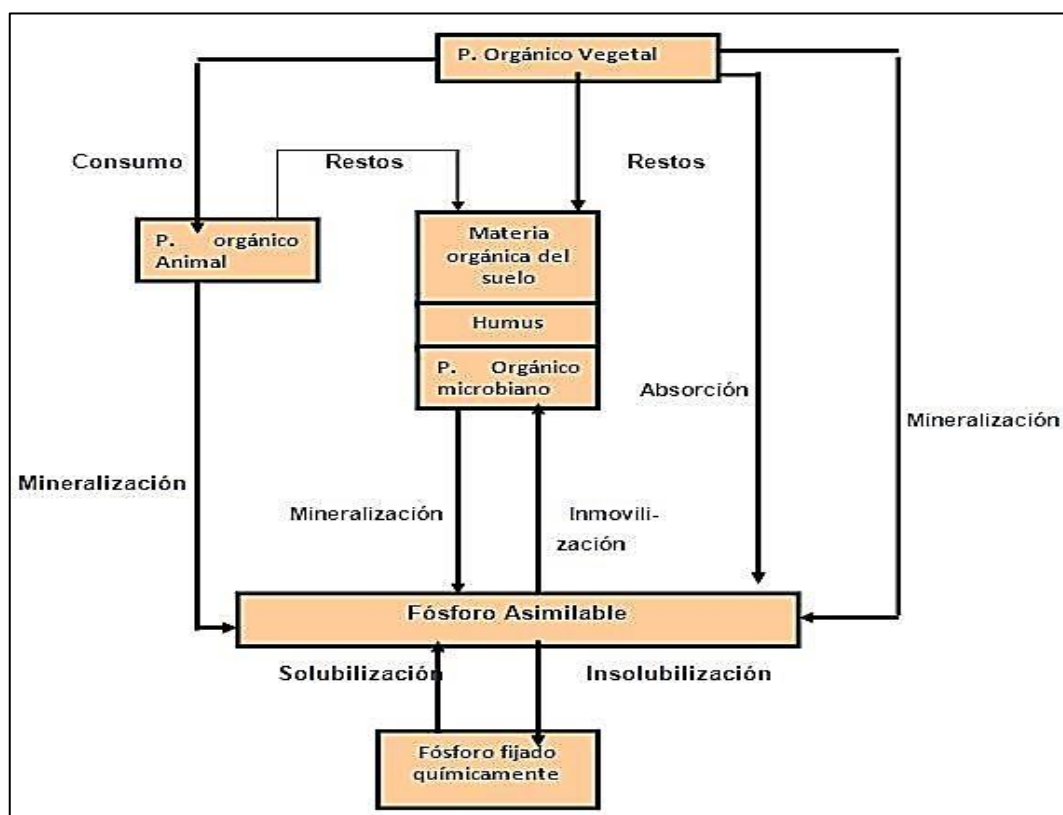
2.1.2.3. Grupos funcionales de los microorganismos del ciclo del fósforo.

El fósforo después del nitrógeno, es el nutriente inorgánico más requerido por plantas y microorganismos y además en el suelo es el factor limitante del desarrollo vegetal, a pesar de ser abundante tanto en formas inorgánicas como orgánicas. El fósforo de vital importancia para el desarrollo de los vegetales, se encuentra en el suelo como formas solubles en muy baja concentración, con valores comprendidos entre 5 y 30 mg kg⁻¹, debido a que el fósforo soluble reacciona con calcio, hierro o aluminio que provocan su precipitación, disminuyendo su disponibilidad para las plantas (1). Por lo tanto se considera, que la solubilización de distintas rocas fosfatadas y de otras fuentes de fósforo inorgánico por los microorganismos del suelo es una alternativa fundamental para incrementar la cantidad de nutriente disponible para las plantas (37).

Los principales grupos funcionales del ciclo del fósforo son los hongos micorrícicos y los microorganismos de solubilización de fosfato inorgánico. La interacción entre estos dos

grupos microbianos es fundamental para la nutrición de la mayoría de las plantas nativas y también es de interés agronómico (30). El ciclo del fósforo se muestra en la Figura 3.

Figura 3. Ciclo del fósforo.

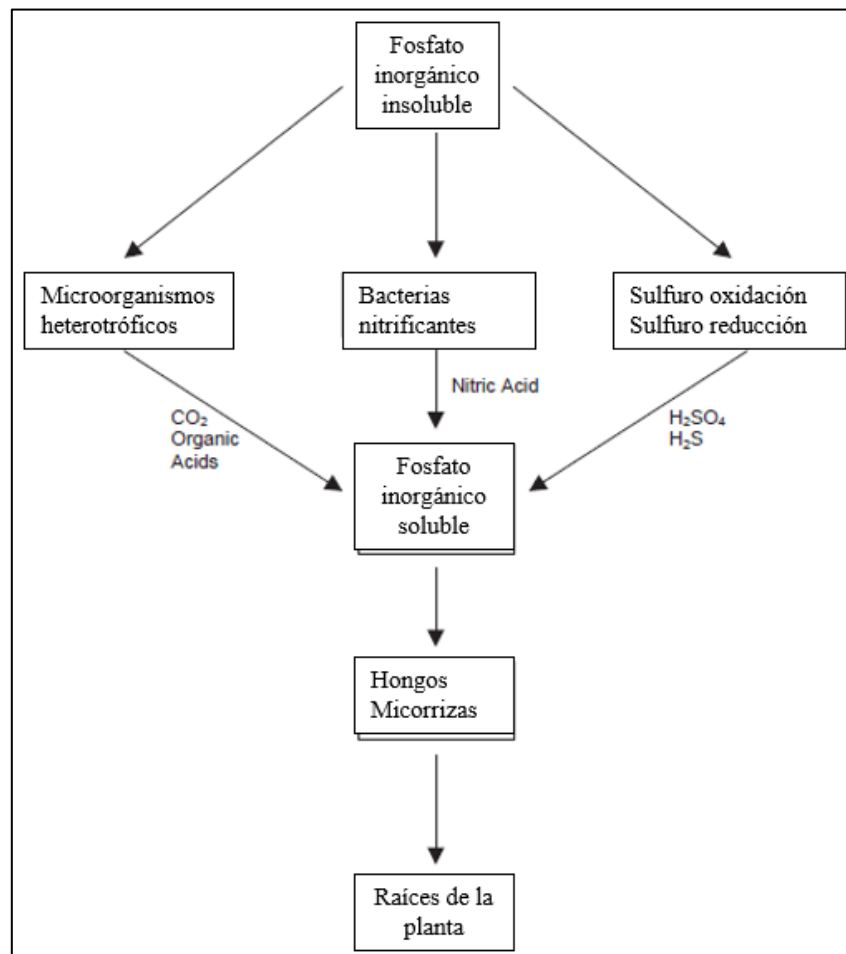


FUENTE: RODRÍGUEZ, 2014

El grupo funcional solubilizante de fosfatos puede incluir hongos, actinomicetos y bacterias que son capaces de fosfato inorgánico solubilizante por la producción y excreción de ácidos orgánicos e inorgánicos, de un grupo de enzimas fosfatasa y de dióxido de carbono (CO_2) en la solución de suelo de la rizosfera (30).

Andrade (30), explica que interacción entre los solubilizadores de fosfato y las micorrizas puede estimular la colonización de micorrizas y/o crecimiento de la planta mediante el aumento de los niveles de fósforo (Figura 4). Esta relación simbiótica entre las raíces de las plantas y los hongos micorriza mejora la adquisición de nutrientes minerales, no solo de los elementos especialmente inmóviles tales como P, Zn y Cu, sino también iones más móviles como S, Ca, K, Fe, Mg, Mn, Cl, Br y N.

Figura 4. Actividad de los grupos funcionales de microorganismos en el ciclo del fósforo.



FUENTE: ANDRADE, 2004

Varios ejemplares de bacterias y hongos se han aislado y caracterizado por su capacidad para solubilizar complejos de fosfato mineral. Aunque las bacterias P-solubilizantes superan en número a los hongos P-solubilizantes en el suelo, aislados fúngicos en general, presentan una mayor capacidad de solubilización de P que las bacterias, tanto en medios líquidos y sólidos (5).

Cepas de bacterias Fosfato solubilizantes como *Enterobacter agglomerans* y *Azotobacter chroococcum*. Entre los géneros de hongos conocidos son *Aspergillus*; *Penicillium*; *Rhizoctonia* y *Cyathus*. Si bien muchos géneros bacterianos presentan esta capacidad para solubilizar fósforo inorgánico, es de particular interés detectar esta habilidad en grupos que tengan otras propiedades de promoción de crecimiento vegetal, como por ejemplo, capacidad para fijar nitrógeno atmosférico (37).

2.1.2.3.1. Bacterias y hongos solubilizadores de fósforo.

Guzmán (7) menciona, que se establece dos tipos de bacterias que solubilizan el fósforo. Unas lo hacen a partir de formas orgánicas y las otras de formas inorgánicas. *Bacillus megaterium*, *Bacillus mesentericus* y *Pseudomonas putida* solubilizan las formas orgánicas del fósforo y las transforman a fosfatos asimilables por las plantas. Formas inorgánicas son solubilizadas por bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Rhizobium*, y *Serratia*.

Estos microorganismos crecen en medios con fosfato tricálcico, apatita o materiales insolubles similares como única fuente de fosfato y no solo asimilan el elemento sino que solubilizan una gran proporción del mismo, liberándolo en cantidades superiores a sus demandas nutricionales. El principal mecanismo microbiológico por el cual los compuestos fosfatados son movilizados es la disminución del pH del medio por la liberación de ácidos orgánicos (Alexander 1980; Nahas 1996; Kumar, *et al.* 2001 citados por Fernández *et al.*, (37)).

Se ha demostrado que muchos microorganismos del suelo como Hongos y Actinomicetos, pueden solubilizar iones fosfatos (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}) a partir de fuentes de fósforo orgánico e inorgánico de escasa solubilidad. Para que los compuestos orgánicos del humus o de la materia orgánica recién incorporada pueda ceder fósforo a la solución del suelo y a las plantas parece necesaria la acción hidrolíticas de las fosfatasas Guerrero *et al.*, (1996) citados por Pérez *et al.*, (38) Entre los hongos solubilizadores de fosfato se encuentran *Penicillium implicatum*, *Penicillium vítreo-viridae*, *Paecilomyces*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Scopulariopsis*, *Moniliella*, y *Mortierella*. Por otro lado, fosfatos tricálcicos son transformados por *Trichoderma aureoviride*, y *Aspergillus aculeatus*. Finalmente, el fosfato de hierro es solubilizado por *Aspergillus oryzae*, *Paecilomyces*, *Gongronella butleri* y *Fusarium oxysporum* (7).

Las Levaduras y Actinomicetos, cumplen funciones como Fijación del nitrógeno y fósforo atmosférico, descomposición de desechos orgánicos y residuos, supresión de patógenos de desarrollo del suelo, reciclaje e incremento de la disponibilidad de nutrientes para las plantas, degradación de tóxicos incluyendo pesticidas, producción de antibióticos y otros componentes bioactivos, producción de moléculas orgánicas simples para el consumo de las plantas, formación de complejos de metales pesados para la toma limitada por las plantas, solubilización de fuentes de nutrientes insolubles y a la producción de polisacáridos para

mejorar la agregación del suelo FUNDASES, (2007) citado por Pérez (39) Levaduras del género *Saccharomyces* y *Rhodotorula* son capaces de transformar fósforo orgánico. Dentro de los actinomicetes, representantes del género *Streptomyces* han demostrado la producción de fosfatasas, principalmente durante los procesos de descomposición de materia orgánica Higuera, (2002) citado por Guzmán (7).

2.1.3. Biofertilizantes.

Una alternativa para mejorar la fertilidad de los suelos pueden ser los Microorganismo Eficientes, los mismos que son un cultivo microbiano mixto, de especies seleccionadas de microorganismos benéficos, que inoculados al suelo contribuyen a restablecer el equilibrio microbiano, muchas veces deteriorado por las malas prácticas de manejo agronómico; estos a su vez contribuyen a acelerar la descomposición de los desechos orgánicos en el suelo, lo cual incrementa también la disponibilidad de nutrientes para las plantas (40).

Por ejemplo el cultivo de arroz utiliza cantidades sustanciales de nitrógeno, de la cantidad total de nitrógeno molecular fijada cada año el 69.5% corresponde a la fijación biológica y el 15% es fijado por el hombre para convertirlo en fertilizantes. Para fijar los 40 millones de toneladas de fertilizante que cada año son arrojados a los campos se requiere un empleo masivo de combustibles fósiles. El encarecimiento de estos combustibles así como la contaminación ambiental que produce la aplicación masiva de los fertilizantes nitrogenados hace su uso cada vez más restringido (22).

Entre los biofertilizantes asimbióticos se encuentran los producidos a base de bacterias con capacidad para fijar N atmosférico en forma asimbiótica, denominadas fijadoras de nitrógeno de vida libre (FNVL), estas bacterias pudieran contribuir significativamente a suministrar N a los cultivos y sustituir parcialmente la aplicación de fertilizantes nitrogenados de origen industrial, lo cual constituye una alternativa viable para proveer el N en cultivos de interés socioproductivo, altamente exigentes en este elemento (41).

Los biofertilizantes se pueden aplicar en suelos degradados y donde la presencia de microorganismos ha sido afectada negativamente por el uso inapropiado de técnicas agrícolas (exceso de agroquímicos, talas, quemas, entre otras) que han propiciado la degradación y han reducido su diversidad y efectividad. Además, se debe inocular cuando existen poblaciones altas de microorganismos que no se asocian efectivamente con la especie de la planta cultivada (6).

Se ha determinado que la aplicación en campo de bio-preparados con microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre pueden aportar de 46 a 50 kg de N ha⁻¹ (41).

Hernández *et al.*, (27) indican que la adquisición de nutrientes del suelo a través del crecimiento radical, la fijación biológica del nitrógeno, la solubilización de fosfatos, la producción de fitohormonas y de metabolitos antifúngicos, hacen posible la elaboración de productos biológicos eficientes a partir de bacterias diazotróficas, con características amigables con el ambiente. Sin embargo, el éxito de estos inoculantes bacterianos depende de la selección de cepas autóctonas.

La calidad de un abono orgánico se determina en relación con el agroecosistema en que será utilizado, por lo que es necesario identificar en la caracterización de los abonos: el contenido nutricional, la facilidad de suministro de nutrientes, y las características físicas, químicas (metales pesados) y microbiológicas que más inciden en el agroecosistema objetivo (42).

2.1.3.1. Fertilizante orgánico líquido (Biol).

Existen diversos fertilizantes líquidos y sólidos de origen químico, cuyos precios son muy elevados y no están al alcance de algunos productores. Últimamente se está volviendo a valorar y rescatar tecnologías ancestrales que no dañan al ambiente, que permiten obtener alimentos de mejor calidad, usando recursos locales que son de bajo costo. Una de estas tecnologías es la elaboración del biofertilizante líquido, conocido también como Biol (43).

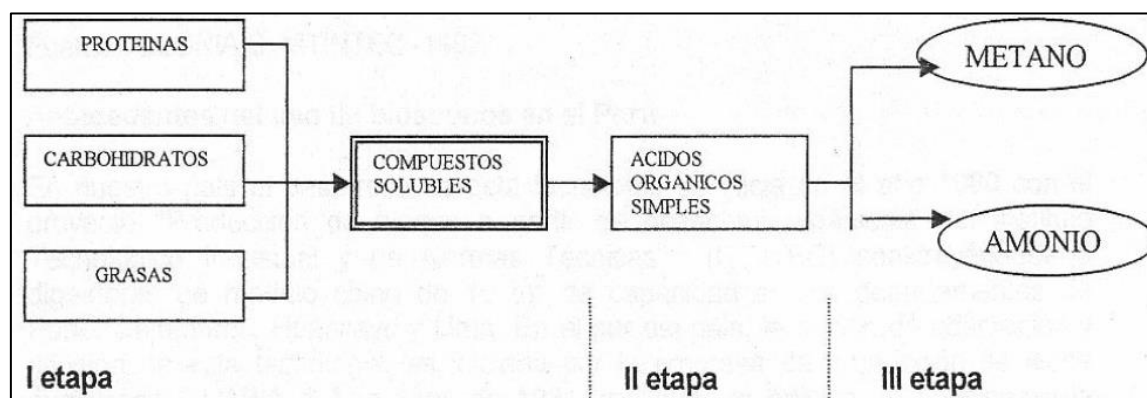
El uso de los abonos orgánicos para mantener y mejorar la disponibilidad de nutrimentos en el suelo y obtener mayores rendimientos en los cultivos, se conoce desde la antigüedad. Los abonos orgánicos son muy variables en sus características físicas y composición química principalmente en el contenido de nutrimentos; la aplicación constante de ellos, con el tiempo, mejora las características físicas, químicas, biológicas y sanitarias del suelo (44).

Biol es un efluente líquido proveniente de la descomposición en condiciones anaeróbicas de la materia orgánica que se realiza en depósitos cerrados o biodigestores. En la Figura 5, se muestra de manera simplificada las etapas y los residuales de la descomposición en un biodigestor (45).

El biol tiene dos componentes: una parte sólida y una líquida. La primera es conocida como biosol y se obtiene como producto de la descarga o limpieza del biodigestor donde se elabora

el biol. La parte líquida es conocida como abono foliar. El resto sólido está constituido por materia orgánica no degradada, excelente para la producción de cualquier cultivo (46).

Figura 5. Etapas y residuales de la descomposición en un biodigestor.



FUENTE: SIURA, 2006

La fermentación es un proceso de descomposición anaeróbica de la materia orgánica, por efecto de microorganismos que operan en condiciones ambientales favorables como humedad mayor al 60%, temperatura entre 25 a 30 °C y un pH de 4 a 4.5. Los hongos (levaduras) entre los que se destaca *Sccharomyces cerevisiae*, son los principales microorganismos de la fermentación. Estos al segregar zimasa (enzima) que convierte a los carbohidratos de la materia orgánica (glucosa, sacarosa, fructosa) en alcohol etílico y dióxido de carbono con liberación de calor (47).

Los elementos que se forman como producto de la fermentación o descomposición de la materia orgánica, son sustancias húmicas conocidas como ácidos húmicos; ácidos fúlvicos y huminas, que se caracterizan por su estado coloidal, su color oscuro, su elevado peso molecular y su acidez. Los ácidos húmicos son moléculas más grandes y contienen más nitrógeno, carbono y azufre. Los ácidos fúlvicos además de contener los elementos anteriores, presentan un mayor porcentaje de oxígeno motivo por el cual su acidez es más alta y por lo tanto tienen mayor cantidad de retención de minerales. Las huminas son las menos solubles (47).

Mamani *et al.*, (47) indican que el uso de especies vegetales con características bioscidas en la elaboración del Biol, lo convierte adicionalmente en un bioplaguicida, que reduce el ataque de ciertas plagas y enfermedades. Algunas especies que le pueden brindar esta característica son: Ajenjo (*Astemisa* sp.); Eucalipto (*Eucaliptos globulus*); Cicuta (*Erodium cicutarum*); Paico (*Chenopodium ambrosoides*); Ortiga (*Urtica* sp.); Muña (*Menthostachis espicata*); Locoto (*Capsicum pubescens*); Tarwi (*Lupinos mutabilis*), entre otras (47). La

composición del Biol depende mucho del tipo de residuos que entran en el biodigestor, se puede decir que cada Biol es único (48).

El análisis de Biol es una práctica que permite calcular una buena dosificación del uso de Biol en el cultivo, de acuerdo a sus necesidades, sin hacer un uso irracional del producto. La cantidad y forma de aplicar el Biol varía en función del cultivo, tipo y calidad del suelo (49).

El uso del Biol es principalmente como promotor y fortalecedor del crecimiento de la planta, raíces, y frutos, gracias a la producción de hormonas vegetales, las cuales son desechos del metabolismo de las bacterias típicas de este tipo de fermentación anaeróbica, por lo cual su uso continuado en explotaciones agrícolas conllevará a requerir de menor cantidad de fertilizantes químicos habitualmente utilizados. Hay cinco grupos hormonales principales: Adeninas, Purinas, Auxinas, Giberelinas y Citoquininas, todas estimulan la formación de nuevas raíces y su fortalecimiento, también inducen la floración, tienen acción fructificante, estimula el crecimiento de tallos hojas, etc (48).

Ventajas del uso del Biol como fertilizante

Entre las ventajas de la utilización de este recurso se tiene (48,47):

- Permite un mejor intercambio catiónico en el suelo, que amplía la disponibilidad de nutrientes.
- Se puede emplear como fertilizante líquido por rociado o junto con el agua de riego en sistemas automáticos de irrigación.
- Promueve las actividades fisiológicas y estimula el crecimiento y desarrollo de las plantas.
- Es un producto orgánico que requiere únicamente insumos naturales para su elaboración.
- Su preparación es fácil y tiene un bajo costo.

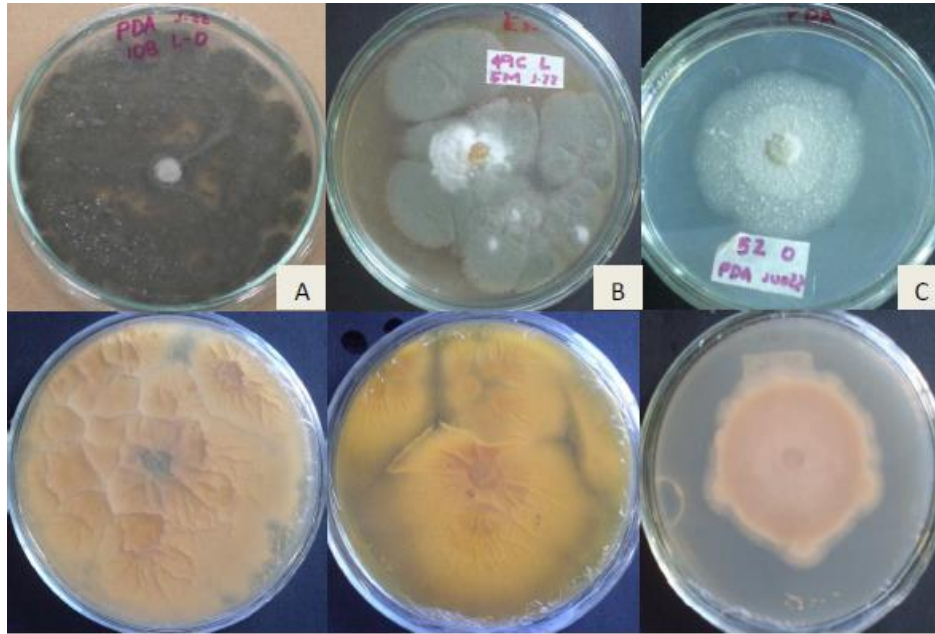
2.1.4. Trabajos relacionados.

2.1.4.1. Aislamiento y caracterización de microorganismos.

El solubilizador de fosfato orgánico más eficiente obtenido por Álvarez (50) es el hongo de la especie *Plectosphaerella cucumerina*, mientras los microorganismos celulolíticos más

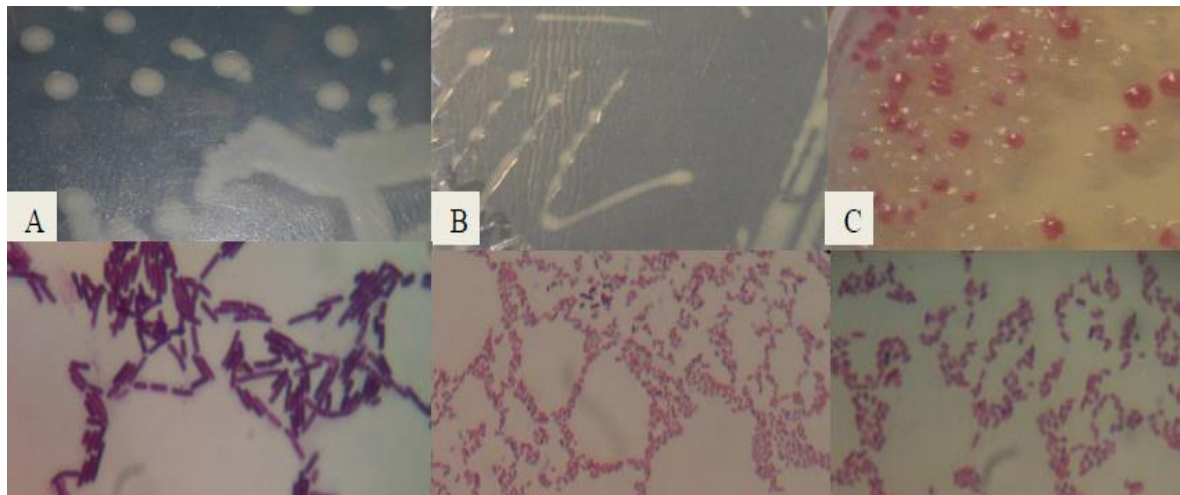
eficientes fueron los hongos *Penicillium griseofulvum* y *Aspergillus fumigatus* (Figura 6). Entre los microorganismos fijadores asimbióticos de nitrógeno sobresalieron tres cepas de *Pseudomonas koreensis*, *Bacillus cereus* y *Serratia* sp (Figura 7).

Figura 6. Colonia de hongos asociados a la rizosfera y al sustrato de plantas de vainilla.



Aspergillus fumigatus (A); *Penicillium griseofulvum* (B) y *Plectosphaerella cucumerina* (C). Arriba: dorso; Abajo reverso.
FUENTE: ÁLVAREZ, 2012

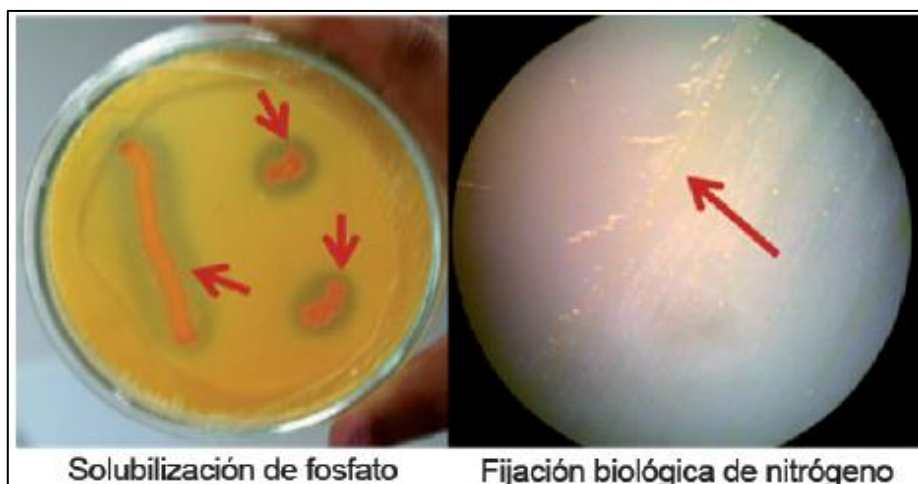
Figura 7. Colonia bacterias asociadas a la rizosfera y al sustrato de plantas de vainilla.



Bacillus cereus (A); *Pseudomonas koreensis* (B) y *Serratia* sp. (C). Arriba: colonias; Abajo micromorfología.
FUENTE: ÁLVAREZ, 2012

Pérez *et al.*, (9), utilizo medios selectivos para deterninar la actividad fijadora de nitrógeno y solubilizadora de fósforo de bacterias endófitas de pasto colosoana (*Bothriochloa pertusa*) utilizando los criterios que se observan en la Figura 8.

Figura 8. Actividad solubilizadora de fosfato y fijación biológica de nitrógeno.



Aisladas *in vitro* de bacterias endófitas del pasto colosoana (*Bothriochloa pertusa*)
FUENTE: PÉREZ *et al.*, 2014

Clavijo *et al.*, (23) realizó una caracterización fenotípica de 104 cepas aisladas tomando en consideración las siguientes características micro y macroscópicas. Características microscópicas: 1: Bacilo largo y ovoide, 2: Cocobacilos, 3: Bacilos, 4: Bacilos elipsoidales, 5: Bacilos pequeños, 6: Cocoides, 7: Bacilos grandes, 8: Bacilos largos, 9: Bacilos en pares, 10: Cocos, 11: Bacilos dispuestos en cadena. En las características macroscópicas: 1: Circular, regular, elevada, lisa, crema brillante; 2: Circular, regular, elevada, lisa, transparente brillante; 3: Ovalada, regular, elevada, lisa, transparente brillante; 4: Ovalada, irregular, elevada, lisa, transparente brillante; 5: Circular, irregular, elevada, lisa, transparente brillante; 6: Circular, regular, elevada, lisa, blanco humo; 7: Irregular, irregular, elevada, lisa, transparente brillante; 8: Irregular, regular, elevada, lisa, transparente brillante; 9: Circular, regular, elevada, lisa, blanco humo con halo; 10: Circular, regular, elevada, lisa, transparente brillante, con halo; 11: Circular, regular, elevada, lisa, crema opaca, colonias con halo.

Fernández *et al.*, (37) indican que en el número de bacterias solubilizadoras de fosfato no variaron en los distintos suelos en una región sojera. Obtuvieron 14 aislamientos solubilizadores: 10 de la microflora y 4 de *Bradyrhizobium* sp. y sus halos oscilaron entre 4 y 15 mm. Las cantidades de fosfato solubilizadas por las bacterias de la microflora variaron

entre 3% y 24,1% en un medio líquido sin solución tamponada mientras que en un medio tamponado variaron entre 0,07% y 4,82%. En un medio líquido sin solución reguladora, los aislamientos de *Bradyrhizobium* sp. solubilizaron en porcentajes que variaron entre 7,1% y 8,5% mientras que en un medio tamponado oscilaron entre 0,1% y 0,16%.

Salazar y Ordóñez (2), lograron la obtención de 24 cepas de Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno. Los 24 Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno fueron identificados en género siguiendo criterios morfológicos al comprar microscópicamente el micelio aéreo que estas cepas generan con micelios de referencia que se encuentran reportados en el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Se identificaron 13 cepas como pertenecientes al género *Streptomyces* y 11 restantes al género *Nocardia*. En los suelos del ecosistema Bosque Secundario se identificaron 3 cepas del género *Streptomyces* y 5 cepas del género *Nocardia*. En el ecosistema Guadual se lograron identificar 6 cepas del género *Streptomyces* y 4 cepas del género *Nocardia*. Finalmente, en el ecosistema Humedal fueron aisladas 4 cepas del género *Streptomyces* y 2 cepas del género *Nocardia*.

Padron *et al.*, (51) en su estudio, determinó que las cepas fijadoras de nitrógeno se desarrollaron mejor en aquellos suelos con bajo contenido de materia orgánica o manejo intensivo, dado que en éstas condiciones se estimula mejor la fijación simbiótica de nitrógeno. Mientras que el mayor desarrollo de bacterias solubilizadoras de fósforo se observó en aquellos manejos con mayor contenido de fósforo, ya sea bajo fertilización orgánica o inorgánica.

Por su parte Arias y Piñeros (52) aislaron 129 cepas axénicas de hongos filamentosos que corresponden a 15 géneros en total de las zonas de frailejones de los páramos de Guasca y Cruz Verde. Los géneros de mayor incidencia fueron *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp. con porcentajes de incidencia de 60 y 30% respectivamente, las especies de hongos filamentosos varían según el páramo y la población activa.

Rico (53), determinó que es posible aislar gran cantidad de bacterias del género *Azotobacter* y del grupo Actinomiceto de la rizósfera de *Solanum tuberosum* Linnaeus, 1753 de las zonas altoandinas. *Azotobacter* tiene mayor capacidad antagónica frente a *Fusarium solani* que las bacterias del grupo Actinomicetos; sin embargo, estos inhibieron notablemente el crecimiento de *Rhizoctonia solani*. De igual forma *Azotobacter* mostró mayor capacidad para producir ácido indol acético (AIA) y solubilizar fosfato, en cambio el resultado de Actinomicetos fue moderado con respecto a dichas capacidades.

2.1.4.2. Uso de microorganismos para el enriquecimiento de fertilizantes orgánicos.

Se han demostrado mejoría en la calidad del compost utilizando microorganismos eficientes aislados, incrementando la actividad biológica. El tratamiento conformado por compost más la mezcla de microorganismos registró la presencia significativa de bacterias que van del orden de 1.8×10^3 UFC por gramo de compost, y hongos de 12 UFC de *Penicillium* y 6 UFC de *Aspergillus* por gramo de compost. En el tratamiento testigo, se contabilizó el número de organismos vivos en el compost y se pudo determinar la presencia significativa de bacterias que van del orden de 8×10^3 UFC por gramo de compost y hongos de 35 UFC de *Penicillium* y 29 UFC de *Aspergillus* por gramo de compost. El compost enriquecido con microorganismos efectivos presentó una composición entre 0.16 a 5.18% de nitrógeno; 0.69 a 0.92% de fósforo; 0.15 a 0.30% de potasio; 2.45 a 2.63% de calcio; 0.83% de magnesio; 0.07% de sodio; 111.00 a 113.0 ppm de zinc; 16.0 a 17.0 ppm de cobre; 8890.0 a 9835 ppm, 0.10 ppm de boro; 6.60 de pH y 11.14 a 11.88 mmho en la conductividad eléctrica (40).

En el compostaje de gallinaza Uribe *et al.*, (54) indican mayores valores de Nitrógeno y Potasio para la mezcla de gallinaza con microorganismos eficientes EM además se obtuvo un descenso de pH más acelerado lo que estabiliza eficientemente el compost. De igual manera en el compostaje de residuos de caña de azúcar, Garcés (55), determinó que el proceso duro ocho semanas gracias a la intervención de EM.

Haro (56), determinó que la formulación de Biol enriquecido con microorganismos eficientes (EM) aislados de una zona con vegetación natural, presentó mejora en los parámetros productivos del brócoli, con una concentración de 6% de EM y con una dilución del 15% en la aplicación.

Para enriquecer el contenido de nitrógeno y fósforo, Rendón (57), evaluó la inclusión de niveles de alfalfa y roca fosfórica como fuente de estos elementos, determinaron que una formulación de Biol con 20 kg de codornaza, 3 kg de alfalfa y 2 kg de roca fosfórica el mismo que dio un valor de 4.40% de nitrógeno con un pH de 7.01 (Neutro), la inclusión de 3 kg de roca fosfórica reportó un valor de 0.319% de fósforo y un pH de 6.97 (neutro) y en la conductividad eléctrica valores de 20.83 ms/cm a 32.50 ms/cm.

Álava (58), reporta que el Biol enriquecido con bacterias ácido lácticas presentó valores altos en minerales y niveles favorables de hormonas y microorganismos benéficos en

comparación con el Biol común. Evaluaron la inclusión de 8 y 10% de bacterias con una composición de 0.1 y 0.2 % de nitrógeno; 0.5 y 0.5% de fósforo; 0.37 y 0.37% de potasio, 0.18 y 0.20% de calcio; 0.05 y 0.06% de magnesio y 0.02 y 0.02% de azufre para cada nivel respectivamente.

Medina (59), determinó que el estiércol de ovino es un residuo de las actividades agropecuarias con alto potencial de ser aprovechado como abono orgánico, al ser utilizado como materia prima en los procesos de biodigestión anaeróbica (Biol I-G) y de fermentación láctica (Biol II-G), procesos mediante los cuales se mejoran las concentraciones de sus nutrientes. Los análisis microbiológicos realizados al Biol I-G evidencian que el proceso de biodigestión anaeróbica no terminó con los patógenos presentes en el estiércol fresco de ovino. Así también, demuestran que el Biol II-G es un producto inocuo, que debido a su nivel de acidez está libre de microorganismos patógenos, y cuyo uso no implicaría riesgos a la salud de las personas, la calidad del suelo y de cultivos. En la composición determinó valores de 7.20 a 8.20 de pH; 15.30 a 21.30 dS/m de conductividad eléctrica; 980.00 a 1876.00 mg/L de nitrógeno; 71.20 a 121.00 mg/L de fósforo; 1940.00 a 6760.00 mg/L de potasio; 104.80 a 3500.00 mg/L de calcio; 27.60 a 1200 mg/L de magnesio y 542 a 3400 mg/L de sodio.

En su estudio Oñate (60), determinó la composición del Biol enriquecido con cal apagada, humus de lombriz, roca fosfórica, cascara de huevo molidas, caballo chupa y alfalfa picada con los siguientes valores: pH 6.87; conductividad eléctrica 11.10 ms/cm; 1.24% de nitrógeno; 790 ppm de fósforo; 0.12% de potasio; 0.59% de calcio; 0.12% de magnesio; < 0.002 ppm de cobre; 36.0 ppm de hierro; 70.0 ppm de manganeso y 12.0 ppm de zinc.

Álvarez (46), indica que la composición del Biol a base de estiércol bovino y alfalfa es: Nitrógeno 0.092 (%); Fósforo 112.80 ppm; Potasio 860.40 ppm; Calcio 112.10 ppm; Magnesio 54.77 ppm; Cobre 0.036 ppm; Manganeso 0.075 ppm; Hierro 0.820 ppm; Cobalto 0.024 ppm; Boro 0.440 ppm y Selenio 0.019 ppm.

Campo *et al.*, (11) al comparar los microorganismos comerciales, con los capturados artesanalmente de tres sistemas agroecológicos (café, potrero y un bosque natural), observó que los capturados presentaron mayores valores en cuanto a altura, diámetro y menor incidencia de plagas en el cultivo de acelga (*Beta vulgaris var. cicla*).

Larreategui y Banchón (61), destacan la formulación de compost obtenido con residuos vegetales y microorganismos aislados de un bosque húmedo Premontano, ya que en este producto se encontraron concentraciones relevantes de carbono (10.13%) y nitrógeno (0.96%).

Siura (45), indica que la composición química del Biol, tiene los valores: conductividad eléctrica 14.7 dS/m; pH 7.3; sólidos en suspensión 13.5 g/litro; nitrógeno 920.0 mg/litro; fósforo 92.2 mg/litro y potasio 2297.5 mg/litro, además 12 ng/g (nanogramo/gramo) de ácido indol acético, 9.7 ng/g de Giberelinas y 9.3 ng/g de purinas respectivamente.

Aparcana y Jansen (48), indican que las características y composición del Biol están relacionados a los materiales con los que se prepara, de esta manera estos autores indican que la composición del Biol con fuente principal de estiércol bovino es la siguiente: pH 7.96; materia seca 4.18%; nitrógeno total 2.63 g/Kg; fósforo 0.43 g/Kg; potasio 2.66 g/Kg; calcio 1.05 g/Kg; magnesio 0.38 g/Kg; sodio 0.404 g/Kg.

Araya (62), determinó que durante el período de 30 días de fermentación hay ligeros cambios físico-químicos en los bioles, dependiendo de la base utilizada. En el caso de bioles preparados con boñiga, pasaron de 5.4 a 5.7, mientras que la conductividad pasó de 9000 a 9750 $\mu\text{S/cm}$, mientras que los bioles preparados con pasto fermentado pasaron de 4.2 a 4.6 y la conductividad de 9000 a 10000 $\mu\text{S/cm}$. En general se observó que los bioles son pobres desde el punto de vista nutricional, y su composición varía dependiendo de la base utilizada y de la adición de lixiviado del raquis del racimo del banano. Cerca del 50 a 70 % de los elementos fueron detectados en el sobrenadante. Los contenidos en los bioles con boñiga varían entre 0.7 y 1.13 g/L para nitrógeno, 160 a 180 g/l de fósforo, 1500 a 5500 g/l de potasio, 4.20 g/l de calcio, 250 a 300 g/l de magnesio, 150 a 70 g/l de azufre. También presentan niveles bajo de hierro de 15 a 20 mg/l, de 0.4 a 0.7 mg/l de cobre y 2 mg/l de zinc, 10 mg/l de manganeso, y 0.2 y 0.3 mg/l de boro. En el caso del pasto fermentado, en comparación con los bioles a base de boñiga, se detectaron contenidos superiores de nitrógeno (1.9 a 2.3 g/l) y fósforo (1100 a 1400 mg/l). En el caso del potasio, el nivel varía según el uso de lixiviado del raquis, entre 2400 y 6700 mg/l. También se observaron niveles inferiores de calcio (280 a 390 mg/l), niveles superiores de magnesio y azufre (670-780 mg/l y 280-350 mg/l respectivamente), contenidos similares de hierro y cobre (20 y 0.6-1,8 mg/l respectivamente), niveles superiores de zinc (5 a 7 mg/l), manganeso (20 a 30 mg/l) y boro (0.4 mg/l).

CAPÍTULO III
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización.

La presente investigación se llevó a cabo de marzo a mayo del 2015, en el Laboratorio básico de Microbiología del Centro Tecnológico Maquita propiedad de la Fundación Maquita Comercializando como Hermanos (MCCH), el mismo que está ubicado en el Km. 19 de la Vía Sto. Domingo en el Cantón San Jacinto de Buena Fe, provincia de Los Ríos. Se encuentra a una altura de 100 metros sobre el nivel del mar entre las coordenadas geográficas de 0°53' de latitud y 79°29' de longitud oeste. El análisis químico de los Bioles se realizó en el Laboratorio de Análisis de Suelos y Plantas "SALBRA" cantón Mocache, Provincia de los Ríos.

Las muestras de suelo se extrajeron del Bosque Húmedo Jauneche ubicado en Jauneche, cantón Palenque perteneciente a la Provincia de Los Ríos. A la altura de 70 msnm entre las coordenadas geográficas 1°14' de latitud y 79°48' de longitud Oeste.

Tabla 1. Características climatológicas del Centro Tecnológico Maquita y Bosque Húmedo Jauneche.

Parámetros	Valores promedios Centro Tecnológico Maquita	Valores promedios Bosque Húmedo Jauneche
Altitud (msnm)	100	70
Precipitación anual: (mm)	2265.00	2000.00
Temperatura media (°C)		
min-max:	20°-33° C	18°-36° C
Humedad relativa promedio	84%	72-80%
Heliofanía (horas luz/año)	870	1016.03
Zona ecológica	Bosque Húmedo Tropical	Bosque Húmedo Tropical
Topografía:	Ligeramente Ondulado	Ligeramente Ondulado

FUENTE: DEPARTAMENTO AGROMETEOROLÓGICO DEL INIAP, 2014.

ELABORADO: AUTORA

3.2. Tipo de investigación.

El presente Proyecto de Investigación de Grado es de Tipo Exploratorio en el periodo de aislamiento y caracterización de los microorganismos fijadores de nitrógeno y solubilizadores de fósforo presentes en el suelo del Bosque Húmedo Jauneche y de tipo Experimental en la fase de evaluación del efecto de los microorganismos aislados en la preparación de Biol. El Proyecto tributa a la línea de investigación 11: Comportamiento agronómico, evaluación y mejoramiento de las características nutricionales y métodos de

conservación de gramíneas, leguminosas, arboles forrajeros, subproductos agropecuarios y residuos agroindustriales con fines de alimentación de animales domésticos.

3.3. Métodos de investigación.

Se realizó con el método de investigación experimental en la fase de aislamiento y caracterización mediante la incubación de los microorganismos en medios selectivos y en la evaluación de las características del Biol con la determinación del efecto de la inclusión de los microorganismos aislados sobre el pH, temperatura, conductividad eléctrica y composición química.

3.4. Fuentes de recopilación de información.

Los datos experimentales fueron obtenidos de fuentes primarias con la recolección directa de las muestras en el sitio experimental y la incubación en medios de cultivo selectivo, además los valores cualitativos en la evaluación del Biol. Se contrastaron los resultados con valores de investigaciones similares en revistas indexadas, tesis y libros considerándose estas como fuentes secundarias de información.

3.5. Diseño de la investigación.

Para la evaluación del Biol se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), cada unidad experimental fue conformada por un balde hermético de 12 litros (biodigestor), constituyendo un total de 16 unidades experimentales. El modelo lineal del diseño:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Dónde:

Y_{ij} : Valor de la variable de respuesta

μ : Media general

α_i : Efecto del tratamiento

ε_{ij} : Error experimental

Tabla 2. Análisis de Varianza ANDEVA del diseño experimental.

Fuente de Variación	Grados de libertad	
Tratamientos	$t-1$	3
Error experimental	$t(r-1)$	12
Total	$tr-1$	15

ELABORADO: AUTORA

En la Tabla 3, se muestra la descripción de los tratamientos.

Tabla 3. Descripción de los tratamientos.

Tratamiento	Descripción	Código
T1	Biol con microorganismos de montaña	BMM
T2	Biol con microorganismos eficientes	BEM
T3	Biol pre-fermentado	BPF
T4	Biol con microorganismos eficientes + levadura	BEM+LV

ELABORADO: AUTORA

3.6. Instrumentos de investigación.

Para el aislamiento y caracterización de microorganismos: Como instrumentos de investigación se analizó el efecto de las variables: características morfológicas macro y microscópicas de microorganismos eficientes en la fijación de nitrógenos y solubilización de fósforo. Estos factores registraron con la observación crecimiento de cada microorganismo en cajas Petri en medios selectivos.

Para la evaluación del Biol se determinaron las características físico-químicas de pH, temperatura y conductividad eléctrica y químicas con el contenido de nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, boro, zinc, cobre, hierro y manganeso en el Laboratorio de Análisis de Suelos y Plantas “SALBRA”.

3.6.1. Variables evaluadas.

3.6.1.1. Capacidad de fijación de nitrógeno y solubilización del fósforo.

Para determinar la capacidad de fijación de nitrógeno y solubilización del fósforo se empleó el aislamiento en medios selectivos. Los medios de cultivo selectivos son aquellos que favorecen el crecimiento de ciertos microorganismos mientras suprimen el de otros (64). Se utilizó el medio de cultivo Ashby para identificar los microorganismos fijadores de nitrógeno y el medio Pikovskaya para observar la capacidad de solubilización de fósforo de acuerdo a la metodología descrita por Padron *et al.*, (51).

3.6.1.2. Características macroscópicas y microscópicas de las cepas aisladas.

Las características macroscópicas comprendieron la forma observable de las colonias aisladas: forma, color, superficie y borde de acuerdo a lo señalado por Clavijo *et al.*, (23).

Las características microscópicas fueron las observaciones de los filamentos y conidias según lo indicado por Salazar y Ordoñez (2) para las bacterias; Arias y Piñeros (52) para los hongos.

3.6.1.3. Características físico-químicas de los Bioles.

El análisis pH se determinó con un potenciómetro en cada biodigestor a los 15 y 30 días, en los mismos periodos se determinó la conductividad eléctrica con un amperímetro, la temperatura con termómetro de mercurio y la salinidad.

3.6.1.4. Composición química de los Bioles.

El análisis de nitrógeno se realizó con el método de Kjeldahl por digestión en ácido sulfúrico, el fósforo, potasio, calcio, magnesio, boro, zinc, cobre, hierro y manganeso se determinó por digestión por vía húmeda con ácido sulfúrico más óxido de selenio.

3.6.2. Procedimiento experimental.

3.6.2.1. Aislamiento de microorganismos y cultivo en medios selectivos.

Se recolectaron muestras de suelo de zonas cercana a las raíces de árboles y caña guadua, los mismos que fueron incubados en medios de cultivo Agar nutritivo y PDA (Potate Dextrose Agar) para diferenciar bacterias y hongos con un total de 32 cajas Petri, que se incubaron por ocho días.

Se separaron las cepas para inocular en medios de cultivo selectivos Ashby para identificar los microorganismos fijadores de nitrógeno y el medio Pikovskaya para observar la capacidad de solubilización de fósforo, incubados por ocho días a 28 °C. Se consideraron positivos al observar crecimiento para los microorganismos fijadores de nitrógeno pues el medio al carecer de este elemento solo permite el crecimiento de microorganismos que fijen nitrógeno atmosférico retenido dentro de la caja Petri. De igual forma para las solubilizadoras de fósforo se determinó como positivo al observar la formación de un halo según lo descrito por Pérez *et al.*, (9).

Los microorganismos determinados como positivos se caracterizaron macroscopicamente y microscopica por observacion y comparación taxonómica por fenotipos con el uso del Manual Bergey`s de Brenner *et al.*, (21).

3.6.2.2. Elaboración de Biol con la inclusión de las cepas aisladas.

Se inoculó la mezcla de los microorganismos aislados, hongos y bacterias; fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fósforo, en semillas de trigo para una reproducción rápida. Esta masa microbiana fue incorporada con los materiales necesarios para la elaboración de Biol. Los materiales usados en cada tratamiento se indican en la Tabla 4.

Tabla 4. Materiales y proporciones empleados en la elaboración de los Bioles.

Material	Tratamientos			
	T1	T2	T3	T4
Estiércol de ganado vacuno (Litros)	5	5	5	5
Microorganismos de montaña (MM) (ml)	500	500	500*	500
Microorganismos eficientes (EM) (Kg)	0	0.227	0.227*	0
Levadura (gramos)	25	25	25	25
Melaza (ml)	330	330	330	330
Yogurt (ml)	4.1	4.1	4.1	4.1
Leguminosa (Kg)	0.227	0.227	0.227	0.227
Agua (litros)	2.38	2.38	2.38	2.88

*Pre-fermentados por 5 días.

ELABORADO: AUTORA

Los biodigestores se constituyeron de depósitos de 12 litros con un total de 16 fueron abiertos a los 15 y 30 días para el análisis físico y químico correspondiente.

3.1. Tratamiento de los datos.

Las características microscópicas y macroscópicas fueron sistematizadas en tablas con el uso de Microsoft EXCEL.

Para los valores cuantitativos de las características físico-químicas, el análisis de datos se realizó mediante el análisis de varianza (ANDEVA) y las medias separadas mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$), con la utilización del paquete estadístico SAS (65).

3.2. Recursos humanos y materiales.

Talento humano que contribuyó en la realización del presente proyecto de investigación:

- Coordinador del Laboratorio Ing. M.Sc. Carlos Zambrano Carriel.
- Director del proyecto de investigación Ing. M.Sc. Gerardo Francisco Segovia Freire.

- Estudiante Ana Patricia Pacheco Vila.
- Asistente de laboratorio Sr. Manuel Villamar.

Se utilizaron los materiales:

- | | |
|--|---------------------------------------|
| • Baldes herméticos | • Tubos de ensayo |
| • Machetes | • Microscópico |
| • Balanza | • Placas porta objetos |
| • Escobas de barrer | • Medios de cultivos |
| • Paletas de madera | • Incubadora Autoclave |
| • Sacos | • Microscopio |
| • Ligas elásticas | • Estereoscopio |
| • Lápices | • Potenciómetro |
| • Libro de campo | • Cajas Petri |
| • Navajas | • Mechero |
| • Estiletes | • Capilares |
| • Pomas | • Cultivos selectivo |
| • Plásticos | • Colonias de microorganismo |
| • Cámara fotográfica | • Reactivos para identificación |
| • Ingredientes para biol | • Biol |
| • Morteros | • Materiales y equipos de Laboratorio |
| • Pipetas | |
| • Balanza analítica de precisión 0.001g. | |

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados y discusión.

4.1.1. Características macro y microscópicas de los Microorganismos Eficientes aislados del Bosque Húmedo Jauneche.

Se aislaron en medios selectivos ocho cepas de Microorganismos Eficientes (EM), cuatro bacterias y cuatro hongos, cinco de los microorganismos se aislaron del bosque y tres de la caña guadua, en igual proporción se obtuvieron las cepas con Capacidad Fijadora de Nitrógeno (CFN) y Capacidad Solubilizadora de Fósforo (CSF). El mayor número de posibles géneros aislados (tres) fue *Streptomyces*, todas con CFN, seguido del género *Penicillium* con igual número con *P. funiculosum*, *P. implicatum* y *P. brefeldianum* con CSF, al igual que *Actinomicete* y *Aspergillus fumigatus*, además se encontró una posible cepa de *Nocardia* con CFN (Tabla 5).

Tabla 5. Microorganismos Eficientes (EM) aislados del Bosque Húmedo Jauneche, área de muestreo y posibles géneros.

Área	Tipo de microorganismo	CFN	CSF	Posibles géneros	Código+
Bosque	Bacteria	+	-	<i>Streptomyces</i>	4TBJPDA
	Bacteria	+	-	<i>Nocardia</i>	6TBJPDA
	Hongo	-	+	<i>Penicillium funiculosum</i>	5TBJPDA
	Hongo	-	+	<i>Aspergillus fumigatus</i>	7TBJPDA
	Hongo	-	+	<i>Penicillium implicatum</i>	8TBJPDA
Caña Guadua	Bacteria	+	-	<i>Streptomyces</i>	5CGJPDA
	Bacteria	+	-	<i>Streptomyces</i>	1CGJPDA
	Hongo	-	+	<i>Penicillium brefeldianum</i>	3CGPDA

CFN: Capacidad Fijadora de Nitrógeno; CSF: Capacidad Solubilizadora de Fósforo; + positivo; - negativo; TBJ: Tierra de bosque Jauneche; CGJ: Caña guadua Jauneche; PDA: Potate dextrosa agar. ELABORADO: AUTORA.

Álvarez (50), en la rizósfera de plantas de vainilla, de igual manera logro aislar microorganismos *Penicillium griseofulvum* y *Aspergillus fumigatus*, este autor indica que los hongos resultaron ser eficientes celulolíticos (degradadores de celulosa). Similar a los reportado por Arias y Piñeros (52), uno de los géneros de mayor incidencia fue *Penicillium* sp. Salazar y Ordóñez (2), en suelos del ecosistema Bosque Secundario identificaron 3 cepas del género *Streptomyces* y 5 cepas del género *Nocardia*, un número mayor al encontrado es

esta investigación debido posiblemente al reducido número de áreas de muestreo. Por su parte, Rico (53) determinó que todas las cepas aisladas del grupo Actinomicetos pertenecen al género *Streptomyces*, debido a la que este grupo es abundante en los suelos. Pérez y Chamorro (20) indican que especies del género *Streptomyces* poseen gran importancia, por la producción de metabolitos secundarios, que cumplen además funciones particulares relacionadas con la interacción bacteria-planta-ambiente y como sustancias tóxicas y señalizadoras. Las características macro y microscópicas de los microorganismos aislados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Características macro y microscópicas de los Microorganismos Eficientes (EM) aislados.

Cepa Aislada	Características macroscópicas	Características microscópicas
4TBJPDA	Colonia café oscuro, seca, adherida al agar, forma irregular borde redondeado no uniforme	Formas filamentosas presencia de conidióforos
6TBJPDA	Colonia cremosa, sin pigmento, forma irregular, bordes redondeados	Filamentos no fragmentados
5TBJPDA	Aterciopeladas, micelio de color blanco con masa conidial gris verdoso	Micelio fragmentado, formas bacilares
7TBJPDA	Aterciopeladas de color verde oscuro, redondas, bordes irregulares radiales	Conidióforos cortos con cabezas conidiales con conidios en masa
8TBJPDA	Borde delgado blanco y de textura rígida, polvorosa de color verde oscura	Conidióforos cortos con verticilo terminal con ramas conidios globosos de paredes gruesas
5CGJPDA	Colonia seca, forma irregular, borde ondulado no uniforme	Filamentos en forma de espirales
1CGJPDA	Colonia café, seca, adherida al agar, forma irregular borde redondeado no uniforme	Filamentos no fragmentados
3CGPDA	Superficie algodonosa de color blanco	Conidios bivercificados

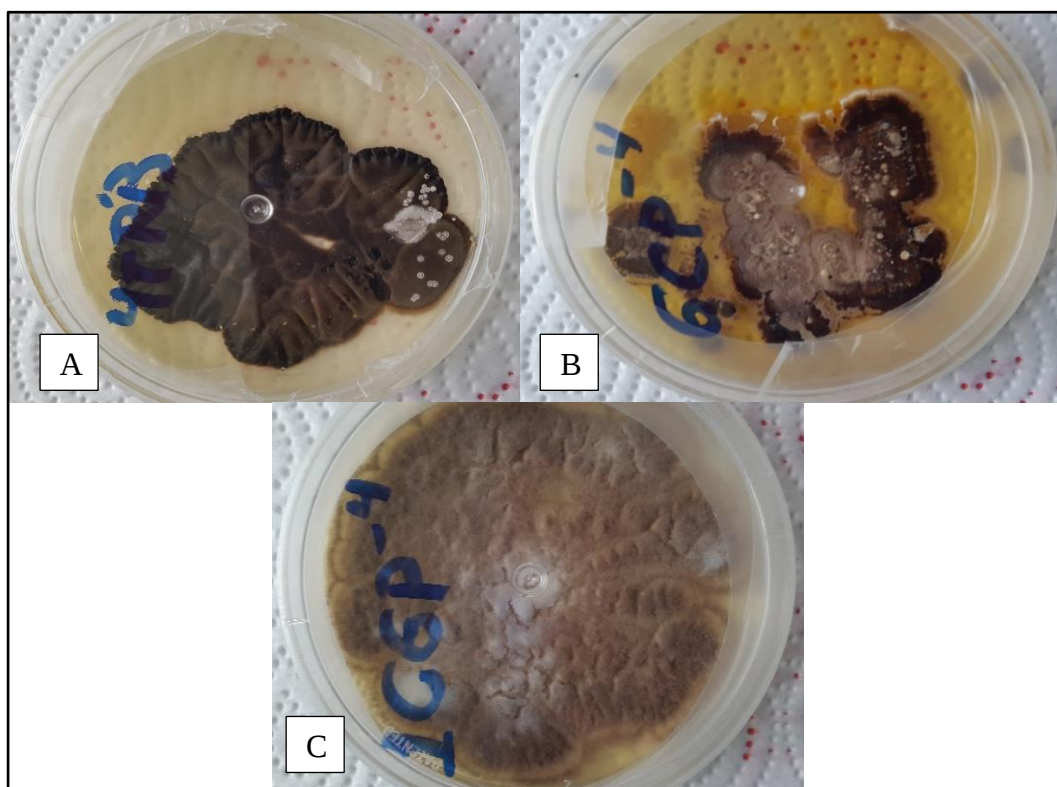
TBJ: Tierra de bosque Jauneche; CGJ: Caña guadua Jauneche; PDA: Potate dextrosa agar.

FUENTE: Laboratorio básico de Microbiología Centro Tecnológico Maquita.

ELABORADO: AUTORA

Salazar y Ordoñez (2), indican que macroscópicamente los microorganismos con CFN (Actinomicetos) tienen la característica de ser colonias secas de aspecto seroso, mientras las morfologías microscópicas son forma de coco, gram positivos y presencia de estructuras miceliales. Las cepas de *Streptomyces* aisladas se muestran en la Figura 9.

Figura 9. Bacterias del género *Streptomyces* con capacidad fijadora de nitrógeno.



A: Cepa 4TBJPDA; B: 5CGJPDA; C: 1CGJPDA; TBJ: Tierra de bosque Jauneche; CGJ: Caña guadua Jauneche; PDA: Potate dextrosa agar.

FUENTE: Laboratorio básico de Microbiología Centro Tecnológico Maquita.

ELABORADO: AUTORA

Rico (53), indica que el elevado número de especies identificadas en su trabajo de investigación se debe a que las colonias del género *Streptomyces* poseen una gran variabilidad en cuanto al color de sus esporas y del micelio de la base.

Salazar y Ordoñez (2), indican una descripción similar de la cepa de *Nocardia*, colonia cremosa, sin pigmento difusible en el medio, forma irregular, bordes redondeados (Figura 10), además microscópicamente agrupación de cocos Gram positivos. Aunque no es el caso estricto de la presente investigación (Lacey, 1973 citados por Rico (53)), indica que los principales géneros aislados a partir de suelos son *Nocardia*, *Streptomyces* y *Micromonospora*.

Kuhad *et al.*, (5), indican que microorganismos del genero *Nocardia* cumplen funciones en el suelo como productores de fitohormonas y sideróforos (que conducen a la formación de complejos solubles de Fe), que indican su capacidad como promotores de crecimiento vegetal.

Figura 10. Bacteria *Nocardia* (6TBJPDA) con capacidad fijadora de nitrógeno.



TBJ: Tierra de bosque Jauneche; PDA: Potate dextrosa agar.
FUENTE: Laboratorio básico de Microbiología Centro Tecnológico Maquita.
ELABORADO: AUTORA

La mayor parte de hongos aislados con CSF podrían pertenecer al género *Penicillium* (Figura 11), identificando por observación las características de la cepa 5TBJPDA podría ser *Penicillium funiculosum*, coinsidiendo con lo indicado por Arias y Quinteros (52), los mismos que detallan a más de las características microscopicas espuestas (Tabla 6), conidioforos biverticilados, conidios sbglobosos a elipsoidales, lisos a rugosos. La cepas 8TBJPDA *Penicillium implicatum*; identificadas de igual manera por Arias y Quinteros (52), que describe como colonias que crecen muy poco y lentamente, con margen delgado, blanco y de textura rigida, producen abundantes esporas que se acumulan en el centro formando costras con la edad, de color verde claro y oscuro, de textura purulenta. Paralelamente la cepa 3CGPDA *Penicillium brefeldianum*, es descrita como una colonia de superficie algodonosa de color blanco a crema, con exudación limitada e incolora.

Figura 11. Hongos del género *Penicillium* con capacidad solubilizadora de fósforo.



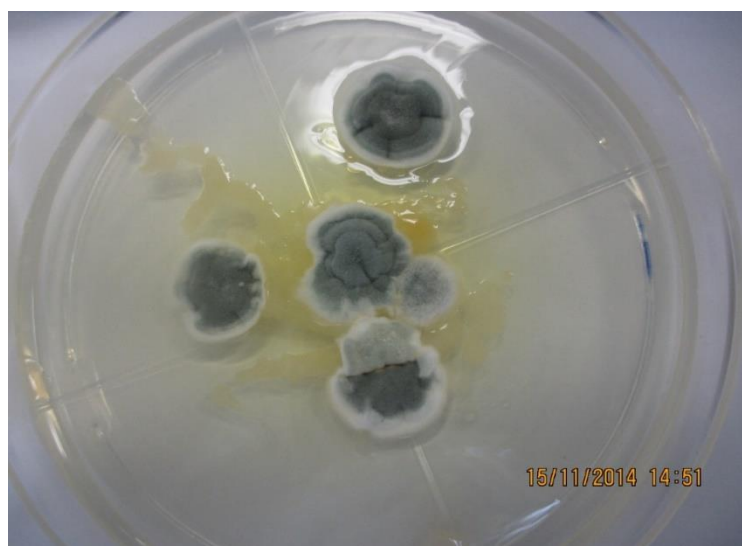
A: *Penicillium funiculosum* (5TBJPDA); B: *Penicillium implicatum* (8TBJPDA); C: *Penicillium brefeldianum* (3CGPDA); TBJ: Tierra de bosque Jauneche; CGJ: Caña guadua Jauneche; PDA: Potate dextrosa agar.

FUENTE: Laboratorio básico de Microbiología Centro Tecnológico Maquita.

ELABORADO: AUTORA

El hongo 7TBJPDA posiblemente de la especie *Aspergillus fumigatus* se muestra en la Figura 12. Las especies de *Aspergillus* se caracterizan en los cultivos por sus aparatos conidiales, que representan el mecanismo de reproducción asexual del hongo. Constan de una célula basal o «célula pie», sobre la que se eleva perpendicularmente el conidióforo, que en su porción terminal se ensancha en una vesícula, sobre la que se sitúan en una o dos hileras unas formaciones alargadas a modo de botellas, que se denominan esterigmas, en las que se producen las conidias de *Aspergillus*. El conjunto de las conidias de un aparato conidial origina las cabezas conidiales, de interés en la diferenciación de especies (66). Álvarez *et al.*, (36) indican que la especie *Aspergillus fumigatus* es un microorganismo celulolítico (degradador de celulosa) muy efectivo no obstante cepas aisladas de *Aspergillus* sp. por estos autores no presentaron CSF aun cuando en la literatura se indica que este género tiene la capacidad de producir fitasas y en la presente investigación también fue corroborado (Tabla 5).

**Figura 12. Hongo *Aspergillus fumigatus* (7TBJPDA)
con capacidad solubilizadora de fósforo.**



TBJ: Tierra de bosque Jauneche; PDA: Potate dextrosa agar.
FUENTE: Laboratorio básico de Microbiología Centro
Tecnológico Maquita.
ELABORADO: AUTORA

4.1.2. Características físico-químicas del Biol enriquecido con los Microorganismos Eficientes aislados.

Las características físico-químicas del Biol enriquecido con los Microorganismos Eficientes (EM) aislados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Características físico-químicas del Biol enriquecido con los Microorganismos Eficientes (EM) aislados.

Trat	Parámetros							
	Temp (°C)		CE (Sm/cm)		pH		Salinidad (mg/l)	
	15 días	30 días	15 días	30 días	15 días	30 días	15 días	30 días
T1	29.35 ^a	27.20 ^a	7.52 ^{ab}	6.51 ^b	4.81 ^b	4.51 ^c	4.03 ^a	3.45 ^b
T2	28.07 ^{ab}	26.87 ^a	7.26 ^{ab}	6.88 ^b	4.91 ^{ab}	4.60 ^{bc}	3.99 ^a	3.74 ^{ab}
T3	27.25 ^b	26.75 ^a	8.24 ^a	7.61 ^a	5.18 ^{ab}	4.91 ^{ab}	4.67 ^a	4.22 ^a
T4	26.75 ^b	26.95 ^a	6.15 ^b	5.37 ^c	5.37 ^a	4.97 ^a	3.08 ^b	2.72 ^c
Media	27.85	26.94	7.29	6.59	5.07	4.75	3.94	3.53
CV (%)	2.51	1.09	8.96	4.74	4.39	3.09	8.46	7.98
P<	0.0011	0.2304	0.0055	<.0001	0.0152	0.0017	0.0002	<.0001

Trat: Tratamiento; Temp: Temperatura; CE: Conductividad Eléctrica; CV: Coeficiente de variación; P<: Probabilidad; ^{abc} letras diferentes entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey P<0,05).
ELABORADO: AUTORA

La temperatura mostró diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre los tratamientos únicamente a los 15 días de muestreo, el mayor promedio se obtuvo del T1 con 29.35 °C, en el periodo de 30 días los rangos de temperatura fueron menores al primero, debido posiblemente a la fase de estabilización en el biodigestor, el aumento de temperatura inicial representa el fin de la fase aeróbica y el inicio de la fermentación anaeróbica. Rendón (57), evaluó la inclusión de niveles de alfalfa y roca fosfórica en el Biol de codornaza como fuente de estiércol, determinó una temperatura entre 15 y 19 °C a los 45 días de fermentación, inferiores a las reportadas en este estudio, este factor está relacionado a la temperatura ambiente.

La conductividad eléctrica presentó diferencias altamente significativas ($p < 0.05$), el T3 presentó los promedios más altos en ambos periodos de muestreo con 8.24 y 7.61 Ms/cm a los 15 y 30 días respectivamente, mientras el valor más bajo se obtuvo de T4 con 6.15 y 5.37 Ms/cm, estos cambios sugieren la transformación de los materiales en fermentación. La conductividad eléctrica la capacidad que tienen las sales inorgánicas en solución (electrolitos) para conducir la corriente eléctrica (49). Los resultados obtenidos son inferiores a los reportados por Oñate (60) con 11.10 Ms/cm y Rendón (57) con valores de 20.83 Ms/cm a 32.50 Ms/cm respectivamente, esto podría deberse a la utilización de roca fosfórica en la elaboración de los respectivos Bioles.

El análisis de varianza en el potencial de hidrogeno (pH) mostró diferencias ($p < 0.05$) entre los Bioles evaluados a los 15 y 30 días, con valores inferiores a 5.5 en la tabla de referencia indicarían una cualidad de fuertemente ácido, el tratamiento con el menor ácido fue T4 con 5.37 y 4.97, mientras la mayor ácido se obtuvo de T1 con 4.81 y 4.51, estos valores indican una eficiente fermentación microbiana especialmente de tipo láctica por la presencia de yogur en los ingredientes del Biol (Tabla 4). Se observa un descenso respecto al tiempo lo que indica que a partir de los 15 días la fermentación continúa. Resultados inferiores a los reportados por Medina (59) que fueron de 7.20 a 8.20 en bioles con fermentación láctica y sucesiva fermentación láctica, no obstante similar a lo reportado por Araya (62), que obtuvo valores de pH entre 4.9 al iniciar la elaboración hasta 5.2 a los 30 días de fermentación los bioles fueron inoculados con microorganismos efectivos y microorganismos de montaña y la mezcla entre ellos.

En otros estudios se ha comprobado que el uso de microorganismos eficientes (EM) genera un cambio en este parámetro, en el compostaje de gallinaza Uribe *et al.*, (54) indica que se obtuvo un descenso de pH más acelerado lo que estabiliza eficientemente el compost. De

igual manera en el compostaje de residuos de caña de azúcar Garcés (55), determinó que el proceso de compostaje duro ocho semanas gracias a la intervención de EM menor al tiempo requerido 16 a 18 semanas.

La salinidad de los Bioles evaluados fue diferente ($p < 0.05$) en los periodos de muestreo, a los 15 días T1, T2 y T3 fueron similares estadísticamente con 4.03; 3.99 y 4.67, T4 presentó el promedio más bajo con 3.08. A los 30 días, T3 presentó el valor más alto con 4.22 respectivamente, los valores fueron menores al transcurrir el tiempo, no obstante la tendencia fue diferente.

4.1.3. Aporte nutricional de los Microorganismos Eficientes aplicados en la elaboración de Biol.

Los valores de la composición química de los Bioles enriquecidos con los microorganismos eficientes aislados de observan en la Tabla 8.

Tabla 8. Composición química de los Bioles enriquecidos con los Microorganismos Eficientes (EM) aislados.

Elemento	Tratamiento				Promedio	DESVEST
	T1	T2	T3	T4		
Nitrógeno (%)	0.12	0.14	0.15	0.11	0.13	0.02
Fósforo (%)	0.04	0.04	0.05	0.03	0.04	0.01
Potasio (%)	0.27	0.26	0.32	0.21	0.26	0.05
Calcio (%)	0.15	0.13	0.15	0.12	0.14	0.01
Magnesio (%)	0.05	0.05	0.06	0.04	0.05	0.01
Boro (mg/kg)	0.03	0.03	0.36	0.29	0.18	0.17
Zinc (mg/kg)	3.77	3.62	4.21	2.89	3.62	0.55
Cobre (mg/kg)	1.44	1.51	1.50	1.30	1.44	0.10
Hierro (mg/kg)	76.20	75.00	94.10	57.80	75.78	14.83
Manganeso (mg/kg)	6.64	7.18	8.68	5.62	7.03	1.28

DESVEST: Desviación estándar.

Elaborado: AUTORA.

El contenido de nitrógeno (%) fue mayor en T3 con 0.15 no obstante, el promedio general fue de 0.13 ± 0.02 %, similar al reportado por Álava (58) en Bioles enriquecidos con bacterias

ácido lácticas con valores de 0.1 y 0.2 %. Álvarez (46), indica que la composición de nitrógeno del Biol a base de estiércol bovino y alfalfa es 0.092 %. Esta similitud podría deberse a la fuente de estiércol bovino y la interacción de los microorganismos. Araya (62), encontró valores de 0.07 a 0.21% en Bioles fermentados por 30 días, utilizando microorganismos eficientes y microorganismos de montaña.

El porcentaje de fósforo obtuvo valores similares entre los tratamientos con valores entre 0.03 y 0.05 % con una desviación estándar de 0.01%. Resultados inferiores a los demostrados por Oñate (60) con 790 ppm lo que equivale a 0.079%, en el Biol enriquecido con roca fosfórica. Aparcana y Jansen (48), reportó un valor similar con 0.43 g/kg (0.043%), estos autores indican que las características y composición del Biol están relacionados a los materiales con los que se prepara, por lo tanto cada Biol es único.

El contenido de potasio (%) del Biol T3 0.32% fue superior al promedio general (0.26 ± 0.05), mientras T4 obtuvo el valor más bajo con 0.21%, similares a los valores de Bioles convencionales indicados por Aparcana y Jansen (48) con 0.266% (2.66 g/kg) y Siura (45) con 0.229% (2297.5 mg/litro) y en el Biol enriquecido por bacterias ácido lácticas reportados por Álava (58) con 0.37%. El potasio es uno de los minerales con requerimientos más altos en la nutrición vegetal (24).

La presencia de calcio en los Bioles fue similar con valores entre 0.12 y 0.15% con una desviación estándar de 0.01%. Valores inferiores a los indicados por Álava (58), con 0.18 a 0.20% en Bioles enriquecidos con bacterias lácticas y a los demostrados por Oñate (60) con 0.59% en Biol enriquecido con cal apagada, humus de lombriz, roca fosfórica, cascaras de huevo molidas, caballo chupa y alfalfa picada.

El magnesio estuvo presente con valores similares entre los Bioles evaluados con 0.04 a 0.06% respectivamente. Similar a los demostrado por Aparcana y Jansen (48) con 0.038% (0.38 g/kg) en Bioles convencionales y a lo reportado por Álava (58) con 0.05 a 0.06% en Bioles enriquecidos con 8 y 10% de inclusión de bacterias lácticas respectivamente.

El porcentaje de boro en el Biol T3 0.36 ppm fue superior al promedio obtenido (0.18 ± 0.17 ppm), seguido de T4 que obtuvo 0.29 ppm, mientras T1 y T2 obtuvieron 0.03 ppm cada uno respectivamente. Resultados inferiores a lo indicado por Álvarez (46), con 0.440 ppm en Biol a base de estiércol bovino y alfalfa. Araya (62) encontró valores de 0.2 a 0.8 ppm en Bioles fermentados por 30 días inoculados con EM y MM.

El contenido de zinc (ppm) en los Bioles evaluados fue similar con valores de 2.89 a 4.21 ppm. Los resultados obtenidos fueron inferiores a lo indicado por Oñate (60) con 12.0 ppm esto podría deberse a la mayor diversidad de materiales en la elaboración del Biol. Por su parte Araya (62), encontró valores similares con 1.73 a 6.48 ppm en Bioles inoculados con microorganismos eficientes y microorganismos de montaña fermentados por 30 días, este autor utilizó como material pasto fermentado.

El cobre estuvo presente en proporciones similares, con valores entre 1.30 y 1.51 ppm con un promedio general de 1.44 ± 0.10 ppm, los resultados fueron superiores a los indicados por Álvarez (46) que indica 0.036 ppm en Bioles convencionales, los compuestos a base de cobre son utilizados como fungicidas-bactericidas.

La mayor diferencia entre los componentes del Biol estuvo en el contenido de hierro y manganeso (ppm), T3 obtuvo los valores más altos con 94.10 y 8.68 ppm, mientras T4 obtuvo los valores más bajos con 57.80 y 5.62 ppm, con un promedio general de 75.78 ± 14.83 y 7.03 ± 1.28 ppm respectivamente. En estos componentes, Oñate (60), reporta valores de 36.00 ppm en hierro y 70.0 ppm de manganeso, estas diferencias podrían deberse a los componentes en la elaboración del Biol.

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones.

- Se aislaron ocho microorganismos con capacidad fijadora de nitrógeno y solubilizadora de fósforo en igual proporción, las características de mayor frecuencia fue colonias secas de forma irregular, además, formas filamentosas y conidióforos que permitieron identificar posibles cepas de *Streptomyces* sp., *Penicillium* sp., *Nocardia* y *Aspergillus* sp.
- El Biol con microorganismos de montaña (T1) presentó el mayor aumento de temperatura y la mayor reducción del pH, mientras el valor más alto en la conductividad eléctrica y salinidad se obtuvo del Biol pre-fermentado (T3).
- El Biol pre-fermentado (T3) presentó los valores más elevados de nitrógeno; fósforo; potasio; calcio; magnesio; boro; zinc; hierro y manganeso, el Biol con microorganismos eficientes (T2) mostró el mayor contenido de cobre.

5.2. Recomendaciones.

En base a los resultados obtenidos se recomienda:

- Confirmar mediante caracterización genotípica el género y especie de las cepas aisladas que fueron descritas como posibles *Streptomyces* sp., *Penicillium* sp., *Nocardia* y *Aspergillus* sp.
- Evaluar el uso del Biol pre-fermentado (T3) a nivel de campo, en pruebas de germinación, toxicidad y/o productivas.
- Difundir a los productores la metodología de captura, propagación y uso de microorganismos autóctonos para mejorar la salud y producción de los agroecosistemas.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

6.1. Literatura citada.

1. Escobar C, Horna Y, Carreño C, Mendoza G. Caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* spp. y su efecto en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate” en Lambayeque. Scientia Agropecuaria. 2011; 2: p. 39-49.
2. Salazar M, Ordóñez A. Aislamiento e Identificación de actinomicetos fijadores de nitrógeno en el suelo Universidad Tecnológica de Pereira. Trabajo de Grado Químico Industrial. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de Tecnología. Escuela de Tecnología Química; 2014.
3. Delgado M. Los microorganismos del suelo en la nutrición vegetal. [En línea].; 2011 [Citado Septiembre 14 del 2015]. Disponible en: <http://www.oriusbiotecnologia.com/los-microorganismos-del-suelo-en-la-nutricion-vegetal>.
4. Lara C, Villalba M, Oviedo L. Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia. Revista Colombiana de Biotecnología. 2007; 9(2): p. 6-14.
5. Kuhad R, Manohar D, Tripathi K, Singh A. Diversity and Functions of Soil Microflora in Development of Plants. In Varma A, Abbott L, Werner D, Hampp R, editors. Plant Surface Microbiology.: Springer; 2004. p. 71-98.
6. Cuervo J. Aislamiento y caracterización de *Bacillus* spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Trabajo de Grado Microbiólogo Agrícola y Veterinario. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana , Facultad de Ciencias Basicas ; 2010.
7. Guzmán E. Aislamiento y caracterización de Bacterias solubilizadoras de Fosforo a partir de cuatro suelos de la Provincia del Chimborazo. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad Recursos Naturales. Escuela Ingeniería Agronómica; 2011.
8. Moreno L, Pérez A, Ramírez M, Franco M. Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la viabilidad de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno utilizadas en la

- elaboración de inoculantes biológicos para arveja (*Pisum sativum*) y soya (*Glycine max*). Rev. Colomb. Biotecnol. 2014; 16(2): p. 45-56.
9. Pérez A, Tuberquia A, Amell D. Actividad *in vitro* de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos. Agron. Mesoam. 2014; 25(2): p. 213-223.
 10. Peña H, Reyes I. Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de Nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). Interciencia. 2007; 32(8): p. 560-565.
 11. Campo A, Acosta R, morales S, Prado F. Evaluación de microorganismos de montaña (MM) en la producción de acelga en la Meseta de Popayá. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 2014; 12(1): p. 79-87.
 12. Opepa. Bosques. [En línea]. 2014 [Citado Julio 15 del 2015]. Disponible en: www.opepa.org.
 13. Orozco C, Martínez P. Evaluación de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno asimbióticos aislados de la rizósfera de *Pinus patula* en Colombia. BOSQUE. 2009; 30(2): p. 70-77.
 14. Vázquez M, Freire J, Suárez L. Biodiversidad en el suroccidente de la provincia de Esmeraldas: un reporte de las evaluaciones ecológicas y socioeconómicas rápidas Esmeraldas - Ecuador: EcoCiencia y MAE; 2005.
 15. Nicola M. Creación de dos circuitos turísticos sustentables para el desarrollo, promoción y fortalecimiento de la actividad turística en la provincia de Los Ríos. Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, Ingeniería en Administración de Empresas Turísticas; 2013.
 16. Dodson C, Gentry A, Valverde M. La Flora de Jauneche, Los Ríos, Ecuador. Parker TA, Carr JL, editors. Los Rios - Ecuador: Selbyana ; 1986.
 17. Serrano Y. Microorganismos del suelo. [En línea]; 2015 [Citado Junio 14 del 2015]. Disponible: www.bayamon.inter.edu.

18. García I. Microorganismos del suelo y sustentabilidad de los agroecosistemas. Revista Argentina de Microbiología. 2011; 43: p. 1-3.
19. Valdés M. El cambio climático y el estado simbiótico de los árboles del bosque. Rev. Mex. Cien. For. 2011; 2(5): p. 5-14.
20. Pérez A, Chamorro L. Bacterias Endófitas: Un nuevo campo de investigación para el desarrollo del sector agropecuario. Rev. Colombiana cienc. Anim. 2013; 5(2): p. 439-462.
21. Carrillo L. Microbiología Agrícola; 2003.
22. Vallejo M, Bonilla C, Castilla L. Evaluación de la asociación bacterias fijadoras de nitrógeno-líneas interespecíficas de arroz-nitrógeno, en Typic haplustalf. Ibagué, Colombia. Acta Agron. 2008; 57(1): p. 43-49.
23. Clavijo C, Chipana V, Centeno J, Zúñiga D, Guillén C. Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias diazotróficas de la rizósfera del cultivo de Olea europea "olivo" en Tacna Perú. Ecología Aplicada. 2012; 11(2): p. 89-102.
24. Guevara M. Aislamiento e identificación de microorganismos solubilizadores de potasio a partir de muestras de suelo y raíces de cultivos de alcachofa de la localidad de la Remonta, Cantón Cayambe. Tesis Ingeniera en Biotecnología. Sangolquí: Escuela Politécnica del Ejército , Departamento de Ciencias de la Vida; 2010.
25. Ibarra J, Aguirre J, Ley A, Cadena J, Zavala G. *Coffea canephora* (Pierre) ex Froehner inoculado con micorriza y bacteria fijadora de nitrógeno en vivero. Revista Chapingo Sere Horticultura. 2014; 20(2): p. 201-213.
26. Argüello A, Moreno L. Evaluación del potencial biofertilizante de bacterias diazótrofes aisladas de suelos con cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). Acta Agronómica. 2014; 63(3): p. 238-245.
27. Hernández A, Rives N, Acebo Y, Diaz A, Heydrich M, Divan V. Potencialidades de las bacterias diazotróficas asociativas en la promoción del crecimiento vegetal y el control

de *Pyricularia oryzae* (Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Rev. Protección Veg. 2014; 29(1): p. 1-10.

28. Hernández E, Ferrera-Cerrato R, Rodríguez R. Bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno atmosférico en rizósfera de frijol contaminada con queroseno. Terra Latinoamericana. 2003; 21(1): p. 81-89.
29. Pérez J, Anaya O, Chang C, Membrillo I, Calva G. Producción de biosurfactantes por bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno crecidas en hidrocarburos. Revista CENIC. 2010; 41: p. 1-9.
30. Andrade G. Role of Functional Groups of Microorganisms on the Rhizosphere Microcosm Dynamics. In Varma A, Abbott L, Werner D, Hampp R, editors. Plant Surface Microbiology.: Springer; 2004. p. 51-69.
31. Ruiz P, Davey C. Efectos del manejo de suelos de laderas en hongos formadores de micorrizas arbusculares y en bacterias fijadoras de nitrógeno en ultisoles sujetos a erosión pluvial en la Amazonía Peruana. Ecología Aplicada. 2003; 2(1): p. 87-92.
32. Olivares J. Fijación biológica de Nitrógeno. Granada - España;; 2008.
33. Rodríguez P. Los procesos microbiológicos en la actividad agropecuaria. [En línea].; 2014 [Citado Mayo 23 del 2015]. Disponible en: www.monografias.com.
34. Figueroa J. Fijación biológica de nitrógeno. Revista Científica UDO Agrícola. 2004; 4(1).
35. Rives N, Vega M, Díaz A, Acebo Y, Muñiz O, Hernández A. Aislamiento y caracterización molecular de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno asociadas a 4 variedades comerciales de arroz. [En línea]; 2011 [Citado Septiembre 12 del 2015]. Disponible en: [http://www.actaf.co.cu/revistas/revista-grano/Revista%20en%20PDF%20\(Vol%2012%20No%201\)/Trabajo9.pdf](http://www.actaf.co.cu/revistas/revista-grano/Revista%20en%20PDF%20(Vol%2012%20No%201)/Trabajo9.pdf).
36. Álvarez C, Osorio W, Díez M, Marín M. Caracterización bioquímica de microorganismos rizosféricos de plantas de vainilla con potencial como biofertilizantes. Agron. Mesoam. 2014; 25(2): p. 225-241.

37. Fernández L, Zalba P, Gómez M, Sagardoy. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *CI. SUELO*. 2005; 23(1): p. 31-37.
38. Pérez C, De La Ossa A, Montes V. Hongos solubilizadores de fosfatos en fincas ganaderas del Departamento de Sucre. *Rev. Colombiana cienc. Anim.* 2012; 4(1): p. 35-45.
39. Pérez M. Efecto de microorganismos aplicados por fertiriego en la disponibilidad de fósforo en dos sistemas de cultivo de banano en la Zona bananera del Magdalena. Palmira - Colombia; 2009.
40. Yáñez Á. Aprovechamiento de los E.M. (Microorganismos eficientes) para mejorar la calidad del abono orgánico tipo compost. Tesis Magister en Agroecología y Ambiente. Ambato-Ecuador: Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Agropecuarias ; 2014.
41. López M, Martínez R, Brossard M, Marcia T. Capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico de cepas nativas de agroecosistemas venezolanos. *Agronomía Trop.* 2010; 60(4): p. 355-361.
42. Pérez R, Pérez A, Vertel M. Caracterización nutricional, físico-química y microbiológica de tres abonos orgánicos para uso en agroecosistema de pasturas en la subregión sabanas del Departamento de Sucre, Colombia. *Revista Tumbaga*. 2010; 5: p. 27-37.
43. Díaz P, Campos N, Calderón C. Elaboración de biofertilizante líquido BIOL: Asociación para la Conservación de la Cuenca Amazónica; 2008.
44. Trinidad A. Abonos orgánicos. Ficha Técnica. Montecillo-México: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación, Subsecretaría de Desarrollo Rural; 2007.
45. Siura S. Uso de abonos orgánicos en producción de hortalizas. Curso de Agroecología. Universidad Nacional Agraria La Molina , Departamento de Horticultura ; 2006.

46. Álvarez F. Preparación y uso de biol. Primera ed. Lima-Perú: Soluciones Prácticas; 2010.
47. Mamani P, Chávez E, Ortuño N. El Biol. Biofertilizante casero para la producción ecológica de cultivos. Vallejos J, Almaza J, Herbas J, editors.: PROIMPA; 2012.
48. Aparcana S, Jansen A. Estudio sobre el valor fertilizante de los productos del proceso "fermentación anaeróbica para producción de biogás: German ProfEC; 2008.
49. De la Rosa J. Análisis físico y químico de fertilizante orgánico (Biol) producido por biodigestores a partir de estiércol de ganado. Memoria de Residencia Ingeniería en Agronomía. Xocoyucan-México: Instituto Tecnológico de Altiplano de Tlaxcala; 2012.
50. Álvarez C. Identificación y caracterización bioquímica, morfológica y molecular de microorganismos cultivables asociados a la rizósfera y al sustrato de plantas de vainilla. Tesis Magíster en Ciencias-Geomorfología y Suelos. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias; 2012.
51. Padron L, Torres D, Contreras J, López M, Colmenares C. Aislamientos de cepas fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fósforo en un suelo alfisol venezolano. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 2012; 3(3): p. 285-297.
52. Arias E, Piñeros P. Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los paramos de Guasca y Cruz Verde. Trabajo de Grado Microbiología Industrial. Bogotá-Colombia: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias ; 2008.
53. Rico M. Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género *Azotobacter* y *Actinomicetos* aislados de cultivos de *Solanum tuberosum* Linnaeus, 1753 (Papa) cultivados en zonas altoandinas del Perú. Tesis Biólogo con Mención en Biología Celular y Genética. Lima-Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos , Facultad de Ciencias Biológicas; 2009.
54. Uribe J, Estrada M, Córdoba S, Hernández L, Bedoya D. Evaluación de los Microorganismos eficaces (E.M) en producción de abono orgánico a partir del estiércol de aves de jaula. Rev. Col. Cienc. Pec. 2001; 14(2): p. 164-172.

55. María G. Producción de abono orgánico a partir de residuos de caña de azúcar y azolla con la aplicación de microorganismos eficientes (EM's). Prabajo de Grado Ingeniera Bioquímica. Ambato-Ecuador: Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos; 2014.
56. Haro M. Aplicación de biol enriquecido con microorganismos eficientes para la producción limpia de brócoli (*Brassica oleracea* va. Italica) híbrido Legacy. Tesis Magister en Agroecología y Ambiente. Ambato-Ecuador: Univeridad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Agropecuaria; 2013.
57. Rendón A. Elaboración de abono orgánico tipo biol a partir de estiércol de codorniz enriquecido con alfalfa y roca fosfórica para elevar su contenido de nitrógeno y fósforo. Trabajo de Investigación Ingeniero Bioquímico. Ambato-Ecuador: Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias e Ingeniería Bioquímica; 2013.
58. Álava L. Biol enriquecido con diferentes dosis de bacterias ácido lácticas y su influencia en la productividad de pimiento (*Capsicum annuum* L) ESPAM 2012. Tesis Ingeniero Agrícola. Calceta-Ecuador: Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Felix López, Carrera de Ingeniería Agrícola; 2015.
59. Medina A. Evaluación de la calidad de biol de segunda generación de estiércol. UNALM, Programa de Ovinos y Camélidos Americanos; 2013.
60. Oñate E. Respuesta agronómica del cultivo de coliflor (*Brassica oleracea* var. skywalker) a la aplicación de biol enriquecido. Trabajo de Investigación de Grado Ingeniero Agrónomo. Ambato-Ecuador: Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Agropecuarias; 2014.
61. Larreategui E, Banchón C. Un modelo matemático para la reducción del tiempo de compostaje. Enfoque UTE. 2014; 5(1): p. 29-37.
62. Araya F. Producción y caracterización de bioles para su uso en el cultivo de banano (*Musa* sp). Rio Frio, Sarapiquí, Heredia, Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica , Sede Regional San Carlos ; 2010.

63. Departamento Agrometeorológico del INIAP. Información Agrometeorológica de la Finca Experimental "La María". Quevedo, Ecuador: Intituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI), Estación Experimental Tropical Pichilingue; 2014.
64. Cultivo de microorganismos. Microbiología General. In Tema 2.- Cultivo de microorganismos.; 2005?.
65. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. Versión 9.0. User's guide. Cary, Estados Unidos; 2004.
66. García J. Capítulo 72. Hongos oportunistas. In Pumarola A, Rodríguez A, García J, Piédrola G. Microbiología y Parasitología Médica. Segunda ed.: Salvat p. 779-796.

CAPÍTULO VII

ANEXOS

7.1. Anexos.

7.1.1. Análisis de varianza de las variables estudiadas.

Anexo 1. Análisis de varianza de la temperatura de los Bioles enriquecidos con Microorganismos Eficientes (EM) a los 15 días.

Fuente	DF	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	15.48187500	5.16062500	10.50	0.0011
Error experimental	12	5.89750000	0.49145833		
Total	15	21.37937500			

FUENTE: ANÁLISIS ESTADÍSTICO SAS, 2004.

ELABORADO: AUTORA.

Anexo 2. Análisis de varianza de la temperatura de los Bioles enriquecidos con Microorganismos Eficientes (EM) a los 30 días.

Fuente	DF	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	0.43187500	0.14395833	1.65	0.2304
Error experimental	12	1.04750000	0.08729167		
Total	15	1.47937500			

FUENTE: ANÁLISIS ESTADÍSTICO SAS, 2004.

ELABORADO: AUTORA.

Anexo 3. Análisis de varianza de la conductividad eléctrica de los Bioles enriquecidos con Microorganismos Eficientes (EM) a los 15 días.

Fuente	DF	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	9.02681875	3.00893958	7.03	0.0055
Error experimental	12	5.13592500	0.42799375		
Total	15	14.16274375			

FUENTE: ANÁLISIS ESTADÍSTICO SAS, 2004.

ELABORADO: AUTORA.

Anexo 4. Análisis de varianza de la conductividad eléctrica de los Bioles enriquecidos con Microorganismos Eficientes (EM) a los 30 días.

Fuente	DF	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	10.47710000	3.49236667	35.68	<.0001
Error experimental	12	1.17440000	0.09786667		
Total	15	11.65150000			

FUENTE: ANÁLISIS ESTADÍSTICO SAS, 2004.
ELABORADO: AUTORA.

Anexo 5. Análisis de varianza del pH de los Bioles enriquecidos con Microorganismos Eficientes (EM) a los 15 días.

Fuente	DF	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	0.78402500	0.26134167	5.25	0.0152
Error experimental	12	0.59735000	0.04977917		
Total	15	1.38137500			

FUENTE: ANÁLISIS ESTADÍSTICO SAS, 2004.
ELABORADO: AUTORA.

Anexo 6. Análisis de varianza del pH de los Bioles enriquecidos con Microorganismos Eficientes (EM) a los 30 días.

Fuente	DF	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	0.61281875	0.20427292	9.45	0.0017
Error experimental	12	0.25932500	0.02161042		
Total	15	0.87214375			

FUENTE: ANÁLISIS ESTADÍSTICO SAS, 2004.
ELABORADO: AUTORA.

Anexo 7. Análisis de varianza de la salinidad de los Bioles enriquecidos con Microorganismos Eficientes (EM) a los 15 días.

Fuente	DF	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	5.13681875	1.71227292	15.34	0.0002
Error experimental	12	1.33952500	0.11162708		
Total	15	6.47634375			

FUENTE: ANÁLISIS ESTADÍSTICO SAS, 2004.

ELABORADO: AUTORA.

Anexo 8. Análisis de varianza de la salinidad de los Bioles enriquecidos con Microorganismos Eficientes (EM) a los 30 días.

Fuente	DF	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	4.73236875	1.57745625	19.77	<.0001
Error experimental	12	0.95772500	0.07981042		
Total	15	5.69009375			

FUENTE: ANÁLISIS ESTADÍSTICO SAS, 2004.

ELABORADO: AUTORA.

7.1.2. Imágenes de la investigación.

Anexo 9. Resultados del análisis de laboratorio.

LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS Y PLANTAS
"SALBRA"

Malecón y primero de Agosto. Cantón Mocache, Provincia Los Ríos

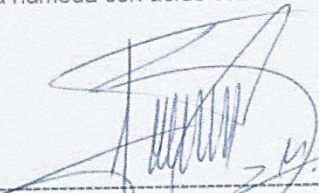
Telf. 05 2 707012, Cel. 0988986645

RUC. 0200656999001

PROPIETARIO:	HACIENDA: Evita	FECHA:	ANALITO
Fundación MCCH	Recinto: Cantón Provincia:	30 de Abril del 2015	Abonos Líquido

Identificación de la muestra	N	P	K	Ca	Mg	CE	B	Zn	Cu	Fe	Mn
	%					Ms/cm	mg/kg (ppm)				
Biol T1	0.12	0.040	0.270	0.147	0.048	9.11	0.031	3.77	1.44	76.2	6.64
Biol T2	0.14	0.040	0.255	0.131	0.049	11.86	0.030	3.62	1.51	75.0	7.18
Biol T3	0.15	0.047	0.319	0.145	0.056	8.45	0.36	4.21	1.50	94.1	8.68
Biol T4	0.11	0.030	0.205	0.124	0.037	10.32	0.29	2.89	1.30	57.8	5.62

Método Empleado: Digestión por vía húmeda con ácido sulfúrico mas óxido de selenio



 Javier Saltos M. Ing. Agr. Mg. Sc. del Suelo
 Responsable