

**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**TESIS DE GRADO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO QUÍMICO**

TEMA:

**“ESTUDIO DE LAS ESPECIES QUÍMICAS AMONIO,
NITRITO Y NITRATO EN EL PROCESO DE
FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO DEL
SISTEMA *AZOLLA-ANABAENA*, MEDIANTE
TÉCNICAS COLORIMÉTRICAS Y SU
APROVECHAMIENTO”**

ELABORADA POR:

CORONEL CHAFLA JORGE ISAAC

DIRECTOR DE TESIS:

ING. QCO. CARLOS DÉCKER

**2011
GUAYAQUIL – ECUADOR**

DEDICATORIA

A Dios por darme la salud y voluntad necesaria para culminar este trabajo.

A mi madre Gloria, que con esmero y cariño se ha esforzado toda su vida para darnos un mejor futuro, siendo pilar fundamental en nuestra familia.

A mi padre, a mis hermanos Lenin y Juan Carlos quienes me brindaron sabios consejos.

A mi futura esposa Janet, que ha vivido de cerca el desarrollo de esta tesis, con quien espero compartir muchas más alegrías en el futuro.

AGRADECIMIENTOS

A todo el grupo de investigación que conforma el Programa Azolla, por brindarme un excelente ambiente y por todas las facilidades otorgadas, permitiendo que este trabajo haya sido posible, muy particularmente al Dr. Mariano Montaña al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamentales para la concreción de este trabajo.

A mi Director de tesis, Ing. Carlos Décker y al comité de tesis por revisar y enriquecer el presente trabajo.

A la Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT) y al Development Marketplace-Banco Mundial por el apoyo otorgado para el desarrollo de esta tesis.

Guayaquil, 16 de noviembre del 2011

Ing. Qco.
JOSÉ QUIROZ PÉREZ
DECANO FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
Miembros del H. Consejo Directivo
Ciudad

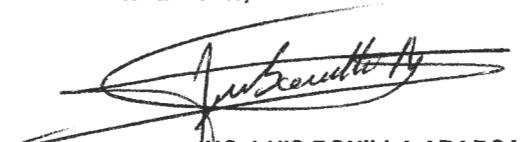
De nuestras consideraciones:

Por medio de la presente nos permitimos informar que el día miércoles 9 de Noviembre del 2011 a las 12H00, y ante el tribunal asignado por el H. Consejo Directivo, el egresado JORGE ISAAC CORONEL CHAFLA, sustentó el anteproyecto de tesis de grado titulado "ESTUDIO DE LAS ESPECIES QUÍMICAS AMONIO, NITRITO Y NITRATO EN EL PROCESO DE FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO DEL SISTEMA AZOLLA-ANABAENA, MEDIANTE TÉCNICAS COLORÍMETRICAS Y SU APROVECHAMIENTO".

Habiendo escuchado la defensa del tema, el Tribunal acordó aprobar el trabajo de tesis encontrando que el egresado, JORGE ISAAC CORONEL CHAFLA apto para incorporarse como Ingeniero Químico.

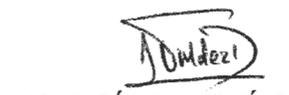
Particular que informamos a ustedes para los fines pertinentes.

Atentamente,


ING. LUIS BONILLA ABARCA
PRESIDENTE TRIBUNAL


ING. CARLOS DECKÉR COELLO
DIRECTOR DE TESIS


DR. LUIS ZALAMEA MOLINA
MIEMBRO PRINCIPAL


ING. JOSÉ VALDEZ DÍAZ
MIEMBRO PRINCIPAL

La culpa, por lo que cuentan, es del nitrógeno..... Las plantas han patentado su propio sistema para fijar el nitrógeno en las células merced a trucos muy ingeniosos y sin molestar a nadie. Pero los animales para ganar tiempo y no darle más vueltas al asunto, han resuelto el problema comiéndose las plantas y asimilando de este modo el nitrógeno ya manufacturado.....De los seres humanos para qué hablarte. Comemos plantas, animales herbívoros y también carnívoros: todo vale. Si algún ser en el mundo ha hecho divisa del “todo vale”, somos nosotros.....el hombre es el depredador total, la fiera más completa de las conocidas. La culpa de esta feroz condición, si es que nos empeñamos en hablar de culpas, la tiene, ya digo, el nitrógeno: ¿no se podía haber fijado en las células él solito, sin tantos melindres ni complicaciones?.

(Política para Amador. Fernando Savater)

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
ACTA DE SUSTENTACIÓN	
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
RESUMEN	viii
CAPÍTULO I	
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. El problema	2
1.3. Diagnóstico del problema	3
1.4. Objetivos	5
1.4.1. Objetivo principal	5
1.4.2. Objetivos particulares	5
CAPÍTULO II	
2. MARCO TEÓRICO	6
2.1. El Nitrógeno	6
2.1.1. Introducción	6
2.1.2. Nitrógeno, elemento esencial	6
2.1.3. Ciclo del nitrógeno	8
2.1.4. Fases del ciclo	11
2.1.5. Aportes y pérdidas de nitrógeno dentro del ciclo	21
2.2. Sistema Azolla-Anabaena	22
2.2.1. Introducción	22
2.2.2. Descripción Taxonómica	24
2.2.3. Distribución geográfica	25
2.2.4. Especies Nativas	25

2.2.5.	Morfología del Azolla	26
2.2.6.	Reproducción	28
2.2.7.	Identificación y clasificación taxonómica de Azolla Caroliniana	30
2.2.8.	Proceso de fijación en el Azolla	31
2.2.9.	Condiciones para su crecimiento	32
2.2.10.	Fertilización	34
2.2.11.	Análisis bromatológico	35
2.2.12.	Pestes y plagas	36
2.3.	Teoría del color	37
2.3.1.	Introducción	37
2.3.2.	Atributos del color	37
2.3.3.	Radiaciones Electromagnéticas	38
2.3.4.	Curvas Espectrofotométricas	39
2.3.5.	Espectrofotometría: cuantificación	39
2.3.5.1.	Aspectos teóricos de espectrofotometría cuantitativa	40
2.3.5.2.	Análisis espectrofotométrico	41
CAPÍTULO III		
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	42
3.1.	Ubicación de la Investigación	42
3.2.	Materiales	42
3.2.1.	Equipos de logística	42
3.2.2.	Equipos de muestreo	42
3.2.3.	Equipo de análisis	43
3.3.	Metodología	46
3.3.1.	Localización del área de muestreo	46
3.3.2.	Determinación de la línea base edáfica de los sectores en estudio	47
3.3.3.	Métodos analíticos empleados en el agua	51
3.3.4.	Organismos experimentales	53
3.3.5.	Pruebas preliminares	54
3.3.6.	Unidad Experimental	55
3.3.7.	Crecimiento	56
3.3.8.	Diseño Experimental	56

3.3.9.	Factor de estudio experimental	58
3.3.10.	Estructura y croquis del diseño experimental	58
3.3.11.	Análisis Estadístico	59
3.3.12.	Planteamiento de hipótesis	60
3.3.13.	Nivel de significación y regla de decisión	61
CAPÍTULO IV		
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
4.1.	Comparación de suelo	62
4.2.	Crecimiento de Azolla	64
4.3.	Parámetros físico-químicos	68
4.4.	Fijación nitrogenada	73
4.4.1.	Evaluación del nitrógeno del nitrito	74
4.4.2.	Evaluación del nitrógeno del nitrato	77
4.4.3.	Evaluación del nitrógeno del amoníaco	80
4.5.	Balance de masa del nitrógeno en el sistema experimental	83
4.5.1.	Balance del nitrógeno en el suelo	83
4.5.2.	Balance del nitrógeno foliar	83
4.5.3.	Balance del nitrógeno acuático	84
4.6.	Ensayo práctico de fertilización orgánica y tradicional en el arroz (<i>Oryza sativa</i>)	86
CAPÍTULO V		
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	89
5.1.	Conclusiones	89
5.2.	Recomendaciones	90
CAPÍTULO VI		
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
	ABREVIATURAS	95
	GLOSARIO DE TÉRMINOS	97
	ANEXOS	99
	1. Métodos colorimétricos Hach Dr890	
	2. Determinación de área de crecimiento del <i>Azolla-Anabaena</i>	

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
2.1. Ciclo del nitrógeno	9
2.2. Estructura y reacciones de los compuestos involucrados en el metabolismo del amonio en la planta	18
2.3. Vista superior de Azolla Caroliniana	23
2.4. Anabaena azollae: (a) heterocistos; (b) célula vegetativa; (c) Nódulos polares; (d) Azolla Filicuoides: tricomas	23
2.5. Sección transversal de hoja de Azolla	27
2.6. Ciclo de vida de azolla, mostrando la permanente presencia de las bacterias y cianobacterias	28
2.7. Cianobacteria Anabaena sp. Puede observarse su morfología filamentosa y dos heterocistos	32
2.8. Espectro electromagnético	39
3.1. Colorímetro HACH DR/890	43
3.2. Ubicación geográfica de sitios muestreados	47
3.3. Toma de muestras de suelo en sitios de estudio	48
3.4. pH-metro EUTECH OAKTON	51
3.5. Conductímetro THERMO	51
3.6. Selección, pesaje y siembra	53
3.7. Azolla en ensayo preliminar a. Sin sustrato, b. Solo sustrato, c. Ceniza-sustrato, d. Ceniza, e. Nutrientes	54
3.8. Estructura del diseño experimental bloques completos al azar con 9 tratamientos y 3 repeticiones	59
4.1. Recipientes de la experimentación con disposición rojiza en su fondo	63
4.2. Disposición del Azolla al momento de iniciar la investigación	64
4.3. Crecimiento de Azolla a los 42 días	64
4.4. Comparación del área crecimiento de Azolla en los tratamientos de acuerdo a Sector del sedimento	65
4.5. Comparación del área crecimiento de Azolla en los tratamientos de acuerdo a Elemento agregado	65
4.6. Características del pH (u) registrado en el agua agregada por efecto de la evapotranspiración en el transcurso de la investigación	68

4.7.	Comportamiento del pH (u) en los tratamientos de acuerdo a Sector del sedimento y Elemento agregado en el transcurso de la investigación	69
4.8.	Valores de Conductividad (uS/cm) registrada en el agua agregada por efecto de la evapotranspiración en el transcurso de la investigación	71
4.9.	Comportamiento de la Conductividad (uS/cm) registrada en los tratamientos de acuerdo a Sector del sedimento y Elemento agregado durante el período experimental	71
4.10.	Reacción de nitritos para análisis colorimétrico	74
4.11.	Características Nitrógeno del nitrito del agua agregada por asunto de la evapotranspiración en investigación	74
4.12.	Evolución del Nitrógeno del nitrito en el medio acuático del Azolla-Anabaena en los tratamientos de acuerdo a Sector del sedimento y Elemento agregado durante el período experimental	75
4.13.	Reacción de nitratos para análisis colorimétrico, nótese el precipitado formado	77
4.14.	Características Nitrógeno del nitrato del agua agregada por asunto de la evapotranspiración en investigación	77
4.15.	Evolución del Nitrógeno del nitrato en el medio acuático del Azolla-Anabaena en los tratamientos de acuerdo a Sector del sedimento y Elemento agregado durante el período experimental	78
4.16.	Reacción del amonio para análisis colorimétrico	80
4.17.	Evolución del Nitrógeno del amoniaco en el medio acuático del Azolla-Anabaena en los tratamientos de acuerdo a Elemento agregado	80
4.18.	Evolución del Nitrógeno del amoniaco en el medio acuático del Azolla-Anabaena en los tratamientos de acuerdo a Sector del sedimento y Elemento agregado durante el período experimental	81
4.19.	Identificación de las partes principales en la planta de <i>Oryza sativa</i>	87

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
2.1. Propiedades físicas del nitrógeno	7
2.2. Especies comunes del nitrógeno en el ambiente	7
2.3. Microorganismos fijadores de nitrógeno	13
2.4. Fuente global de nitrógeno reactivo	14
2.5. Taxonomía del Azolla en función de sus órganos reproductores	24
2.6. Distribución de las especies de azolla	25
2.7. Disposición geográfica del Azolla-Anabaena dentro del Ecuador	26
2.8. Rango de temperaturas para diferentes tipos de Azolla	33
2.9. Solución nutritiva Hoagland H-40. Componentes	34
2.10. Perfil de aminoácidos de Azolla-Anabaena nativa de invernadero	35
3.1. Especificaciones técnicas de colorímetro HACH DR/890	44
3.2. Ubicación geográfica de las áreas de estudio	46
3.3. Métodos empleados en la caracterización del suelo	48
3.4. Ensayo preliminar experimental	54
3.5. Delineamiento Experimental	57
3.6. Matriz de tratamientos del Azolla-Anabaena en bandejas	57
3.7. Factor de estudio experimental	58
4.1. Resultados de análisis de suelos al inicio y cierre del experimento	62
4.2. Rendimiento del Azolla en la fase experimental	64
4.3. Tasa relativa de crecimiento (TRC) y tiempo de duplicación (TD) de Azolla	66
4.4. Estadística descriptiva del área de Azolla-Anabaena a los 42 días del ensayo	66
4.5. Análisis estadístico con el test de Tukey de la variable área de Azolla-Anabaena a los 42 días del ensayo	67
4.6. Estadística descriptiva pH (u) en el medio acuático a los 42 días del ensayo	69
4.7. Análisis estadístico con el test de Tukey de la variable pH (u) en el medio acuático a los 42 días del ensayo	70

4.8.	Estadística descriptiva Conductividad ($\mu\text{S/cm}$) en el medio acuático a los 42 días del ensayo	72
4.9.	Análisis estadístico con el test de Tukey de la variable conductividad ($\mu\text{S/cm}$) en el medio acuático a los 42 días del ensayo	72
4.10.	Estadística descriptiva del Nitrógeno del nitrito en el medio acuático a los 42 días del ensayo	75
4.11.	Análisis estadístico con el test de Tukey de la variable Nitrógeno del nitrito en el medio acuático a los 42 días del ensayo	76
4.12.	Estadística descriptiva del Nitrógeno del nitrato en el medio acuático a los 42 días del ensayo	78
4.13.	Análisis estadístico con el test de Tukey de la variable Nitrógeno del nitrato en el medio acuático a los 42 días del ensayo	79
4.14.	Estadística descriptiva del Nitrógeno del amoníaco en el medio acuático a los 42 días del ensayo	81
4.15.	Análisis estadístico con el test de Tukey de la variable Nitrógeno del amoníaco en el medio acuático a los 42 días del ensayo	82
4.16.	Resumen del nitrógeno biodisponible en el suelo durante el ensayo	83
4.17.	Resumen del nitrógeno foliar fijado durante el ensayo	84
4.18.	Calidad del agua nitrogenada empleada en todas las fases del experimento	85
4.19.	Balance global del Nitrógeno total fijado en los 42 días de desarrollo del estudio	86
4.20.	Variedad de arroz INIAP 14 producción el Mangle	88
4.21.	Variedad de arroz SGO-667 (Capirona) producción Samborondón	88

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la fijación biológica del nitrógeno y la reproducción en el proceso de propagación del sistema *Azolla-Anabaena* en su entorno.

Para lograrlo, se desarrolló un diseño en bloques completos al azar de 9 tratamientos cada uno de ellos con 3 repeticiones (T1: Sedimento Nobol + nada; T2: Sedimento Nobol + carbón; T3: Sedimento Nobol + bacterias; T4: Sedimento Mangle + nada; T5: Sedimento Mangle + carbón); T6: Sedimento Mangle + bacterias); T7: Sedimento Samborondón + nada); T8: Sedimento Samborondón + carbón); T9: Sedimento Samborondón + bacterias).

La densidad de siembra fue de 3 unidades de *Azolla Anabaena*/bandeja de 1.6 L de agua; con un de recambio de agua de alrededor del 10% diario para compensar la evapotranspiración, una vez montado el ensayo se evaluaron los parámetros físicoquímicos del agua una vez por semana. Los parámetros físicos durante la experiencia se indican: pH tuvo un mínimo de 6.18 a un máximo de 8.16; conductividad de 740 a 2280 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Así mismo se analizaron macro y micronutrientes en el suelo; se demostró que los sedimentos presentan mayor concentración de nitrógeno, a la finalización de la experimentación.

Las especies del nitrógeno presentes en el agua fluctuaron de la siguiente manera: N-NO₂ 0.02 a 0.24 mg/L; N-NO₃ 0.8 a 3.2 mg/L; N-NH₃ 0.01 a 0.73 mg/L. En cuanto al rendimiento de crecimiento de *Azolla-Anabaena* entre 0.238 a 0.640 t/h*d, siendo los de mejores resultados los tratamientos con presencia de sedimento de Samborondón.

Se determinó que en el proceso de fijación biológica del nitrógeno del sistema *Azolla-Anabaena* es de alrededor de 3.0 kg N /h*d promedio, así como la característica peso de la panca de arroz cultivado con urea es mayor que el cultivado con *Azolla*, dando ha entender que gran cantidad del nitrógeno artificial va principalmente a la panca.

I. INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

El nitrógeno (N) es un elemento esencial en el crecimiento y desarrollo de los cultivos, en donde interviene configurando aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y otras macromoléculas orgánicas. Las plantas utilizan el nitrógeno en forma de nitrato (NO_3^-) o de amonio (NH_4^+), pero estos compuestos están presentes en el suelo en cantidades limitadas, además de que se pierden fácilmente por el lavado en los suelos y por la reducción biológica del nitrato (NO_3^-). Los cultivos requieren generalmente para crecer cantidades relativamente grandes de nitrógeno, por lo que frecuentemente este elemento resulta el nutriente limitante de los suelos.

El principal reservorio de nitrógeno es la atmósfera, que lo contiene hasta en un 78 %. Sin embargo, la mayoría de los seres vivos, incluyendo todas las plantas y los animales, son incapaces de utilizar directamente el nitrógeno diatómico (N_2) para sus procesos bioquímicos vitales.

Por lo tanto, a pesar de la gran cantidad de nitrógeno en la atmósfera, la escasez de nitrógeno en el suelo constituye un factor limitante para el crecimiento de los vegetales.

Una alternativa original del abono nitrogenado químico es la fijación biológica de nitrógeno, que la realizan ciertas bacterias. Estos microorganismos poseen un complejo enzimático que se encarga de convertir el nitrógeno elemental en amonio que es directamente aprovechable para las plantas, o es oxidado a nitratos por bacterias nitrificantes presentes en los suelos (Sprent, 1979).

Por su alta capacidad fijadora de nitrógeno, la asociación simbiótica entre *Azolla* sp. y la cianobacteria filamentosa *Anabaena* sp. ha adquirido en los últimos años mucha importancia para la agricultura, especialmente de arroz (Carrapico et al., 2001; Watanabe, 2000; Peters 1983). Su empleo adquirió impulso en la década de 1970 debido a la crisis energética que amenazaba la producción de fertilizantes inorgánicos de nitrógeno.

En el Ecuador, las investigaciones prácticas del sistema *Azolla*-*Anabaena* se iniciaron en el año 2000 por iniciativa del Instituto de Ciencias Químicas y Ambientales (ICQA) de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) a través del proyecto “Aplicación de la simbiosis diazotrófica entre *Azolla* y *Anabaena* como abono verde para el cultivo de arroz en el Litoral Ecuatoriano” (Montaño, 2000) financiado por el Programa de Modernización de los Servicios Agropecuarios (PROMSA). Por estudios se ha establecido que el *Azolla*-*Anabaena* puede fijar alrededor de 600 kg de nitrógeno por hectárea por año en condiciones óptimas de temperatura, luz y composición química del sustrato (Peters, 1985).

1.2. El problema

El sistema *Azolla*-*Anabaena* es un simbiote formado del helecho acuático *Azolla* y la cianobacteria *Anabaena* que se puede utilizar como abono en plantas y pienso de animales. Este simbiote está empezando a desatar gran interés en el Ecuador debido a sus peculiares ventajas en los planos económico, social y medioambiental.

En el Instituto de Ciencias Químicas y Ambientales (ICQA) de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) se han desarrollado los proyectos “Desarrollo del Recurso *Azolla* *Anabaena* y aplicaciones en los sectores agrícola, pecuario y acuícola” y “Converting Rice Fields into Green Fertilizer Factories”, contando con el patrocinio de la SENACYT y del Banco Mundial a través de su programa “Development Marketplace” respectivamente.

Los proyectos mencionados se han centrado en el desarrollo de distintas aplicaciones científico-tecnológicas del sistema *Azolla-Anabaena* como biofertilizante nitrogenado para cultivos de arroz, debido a que el arrozal constituye el ecosistema natural de propagación del *Azolla*. Los enfoques principales de los trabajos se han dirigido al cultivo y mantenimiento del helecho, así como al estudio de usos en varios tipos de agricultura, ganadería y acuicultura. En este sentido, no se ha profundizado en la química de los eslabones de ciclo del nitrógeno relacionados con el crecimiento del *Azolla* y de los repartos en las matrices agua, suelo y en el propio simbiote.

El sistema *Azolla-Anabaena* fija nitrógeno en forma de NH_3 (amoníaco), que luego hidroliza a NH_4^+ (amonio) en los ecosistemas acuáticos, para inmediatamente evolucionar, mediante reacciones bioquímicas, a NO_2^- (nitrito) y NO_3^- (nitrato). Tales especies iónicas nitrogenadas al incorporarse a la química del agua, juegan un papel clave en el desarrollo de la vida animal y vegetal de los ecosistemas acuáticos relacionados.

1.3. Diagnóstico Del Problema

El conocimiento tropical y su resultado ciencia tropical es uno de los servicios en los que Ecuador puede realmente establecer una diferencia aportando soluciones para muchos problemas incluyendo los de salud y medio ambiente que enfrenta el mundo en desarrollo tropical.

La agricultura del Ecuador y de cualquier país, como sector primario y básico de la economía, requiere del mayor aporte de conocimiento posible, sobre todo ahora que debe enfrentar especiales desafíos en los terrenos de la competitividad, sostenibilidad, calidad, seguridad e interacción con el medioambiente.

Con ser el nitrógeno uno de los elementos químicos claves en el desarrollo de la flora en general y de la agricultura en particular, en el tema del uso del sistema *Azolla-Anabaena* como biofertilizante, casi no se conoce la cuestión de la estructura y funcionamiento de las especies químicas que activan el ciclo del

nitrógeno, sobre todo en los eslabones agronómicos (amonio, nitrito, nitrato). Menos aún se conocen las reacciones específicas de tales especies con el medio biótico y abiótico circundante, que finalmente provean pistas para la optimización científica de la actividad agrícola en todos los terrenos.

Esta tesis se propone contestar con fundamentos científicos y en el marco de conocimiento tropical, algunas de las acuciantes inquietudes que aquí se han planteado. De otro lado, los estudios del *Azolla*, del suelo, del agua y demás, en cuanto se sitúan en el Ecosistema Guayas, van a producir resultados que pueden ayudar a explicar fenómenos tan complejos como el desbalance de ciclo del nitrógeno, especialmente en lo que se articula con la fijación del nitrógeno y la desnitrificación de extensas zonas geográficas y que estarían implicados en los presentes fenómenos desastrosos de erosión del filo costero ecuatoriano.

Conviene recordar la historia del Ingeniero Químico en el país, empezó por dos acontecimientos importantes la refinación del petróleo en 1940 a cargo de Anglo Ecuadorian y el funcionamiento en 1942 de la Planta cloro-soda por el Ing. Svolod Krochin, con lo cual las instituciones universitarias en el país se propusieron en formar estos profesionales, arrancando en 1947 en la Escuela Politécnica Nacional, siendo el Ingeniero Químico desde sus inicios un hombre de conocimientos en procesos industriales, evolucionando para aprovechar los residuos y más adelante en el cuidado y protección del ambiente. Llegando en estos momentos a ser un propulsor de la investigación en busca de nuevos conocimientos en interés del Ecuador.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo principal

Evaluar la fijación biológica del nitrógeno en el proceso de la propagación del sistema *Azolla-Anabaena* en su entorno.

1.4.2. Objetivos particulares

- a) Determinar la reproducción del *Azolla* en las condiciones establecidas en el experimento.
- b) Determinar las concentraciones de las especies iónicas del nitrógeno (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-) en el medio acuático de la reproducción del biosistema *Azolla-Anabaena*.
- c) Determinar los niveles de nitrógeno fijados en el suelo por el *Azolla* durante el ciclo de desarrollo del experimento.
- d) Determinar la biodisposición de las especies agroquímicas del suelo por efecto de la propagación del *Azolla*.

II. MARCO TEORICO

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. El Nitrógeno

2.1.1. Introducción

El nitrógeno es un componente esencial para los seres vivos, la disponibilidad de este limita la productividad en la agricultura y en el ambiente en general. La mayoría de los organismos vivos son incapaces de metabolizar el nitrógeno debido a su inercia química (Olivares, 2008). Por lo tanto, la conversión de nitrógeno a formas metabolizables, tanto en forma de amonio (NH_4^+) o de nitrato (NO_3^-), es fundamental para el desarrollo y supervivencia de todos los organismos.

2.1.2. Nitrógeno, elemento esencial

El nitrógeno es un elemento diatómico, se encuentra en estado gaseoso a temperatura y presión normal, siendo incoloro, inodoro, insípido, no tóxico y sin propiedades comburentes, casi totalmente inerte, además de las propiedades físicas indicadas en la Tabla 2.1, sin embargo bajo la influencia de catalizadores, electricidad, elevadas temperaturas y presiones se vuelve reactivo, formando compuestos.

El nitrógeno es un elemento muy versátil debido a su distribución electrónica ($1s^2 2s^2 2p^3$), lo que le permite tener diferentes estados de oxidación que van de +5 a -3 por lo cual, puede formar compuestos inorgánicos y orgánicos (Faure y Mensing, 2005). En la Tabla 2.2, puede observarse los principales compuestos que forma el nitrógeno.

Tabla 2.1. Propiedades físicas del nitrógeno

Fórmula química	N ₂
Peso molecular	28.013 g/mol
Temperatura ebullición (1 atm.)	-195.8 °C
Temperatura de fusión (1 atm.)	-210 °C
Temperatura crítica	-146.9 °C
Presión crítica	33.9 bar
Densidad gas (20°C, 1 atm.)	1.161 g/L
Densidad líquido (p.e., 1 atm.)	0.808 g/L
Peso específico (aire=1)	0.967
Solubilidad en agua (0 °C, 1 atm.)	2.33 cm ³ N ₂ /100cm ³ H ₂ O
Calor específico	1.039 J/g°K
Calor de vaporización	47.56 cal/g
Calor de fusión	6.88 cal/g

Fuente: Kirk et al, 2000

El Nitrógeno, constituye un elemento clave en la vida, es componente esencial de los ácidos nucleicos (ADN y ARN), y de las proteínas (Taiz, 2006). Todos los organismos requieren nitrógeno para vivir y crecer.

Tabla 2.2. Especies comunes del nitrógeno en el ambiente

Especie	Estado	Formula	Valencia
Nitrato	Ion	NO ₃ ⁻	+5
Nitrito	Ion	NO ₂ ⁻	+3
Trióxido de Nitrógeno	Gas	N ₂ O ₃	+3
Óxido nítrico	Gas	NO	+2
Óxido nitroso	Gas	N ₂ O	+1
Nitrógeno	Gas	N ₂	0
Hidroxilamina	Gas	NH ₂ OH	-1
Amoniaco	Gas	NH ₃	-3
Amonio	Ion	NH ₄ ⁺	-3
Amina Orgánica	Sólido	R NH ₂	-3

Fuente: Gilpin, 2006

El nitrógeno es el cuarto elemento más abundante en los organismos vivos, después del carbono, oxígeno e hidrógeno, representando en el aire el 79.08 % en volumen (Stevenson, 1986).

A pesar de esto, gracias al proceso biológico de algunas bacterias y cianobacterias, el nitrógeno que se encuentra en la atmósfera puede ser asimilable, al romper la unión de sus enlaces por medios enzimáticos y así poder producir compuestos nitrogenados, que pueden ser aprovechados por la mayoría de los seres vivos, en especial las plantas, que forman relaciones simbióticas con este tipo de bacterias.

Así también, la combinación de inercia y el bajo punto de ebullición (-198°C) hacen al N₂ ideal para algunas aplicaciones industriales, tal como la congelación de alimentos, el nitrógeno líquido se obtiene para usos industriales por licuefacción del aire y subsiguiente destilación fraccionada (Haber-Schaim, 1977). La producción de nitrógeno líquido es un paso intermedio para la síntesis del amoníaco y la producción de ácido nítrico, que son sin duda los más importantes compuestos nitrogenados para la industria. Sus usos incluyen la producción de explosivos, combustibles para cohetes, plásticos y otros petroquímicos, pero alrededor del 80% de toda la producción industrial de compuestos de nitrógeno son los fertilizantes (Cox, 1995).

2.1.3. Ciclo del nitrógeno

El ciclo de nitrógeno, uno de los más complejos ciclos en la naturaleza, es el movimiento del nitrógeno entre la atmósfera, biosfera, hidrosfera y la geosfera, llevándose a cabo en él, una serie de procesos físicos, químicos y biológicos que convierten el nitrógeno gaseoso a orgánico, para finalmente ser devuelto a la atmósfera por la desnitrificación (Figura 2.1).

En este sentido, se necesita de una gran cantidad de energía para desdoblarlo y combinarlo con otros elementos como el carbono y el oxígeno. Existen cuatro mecanismos para convertir el nitrógeno (aire atmosférico) en formas más reactivas (Smil, 2000).

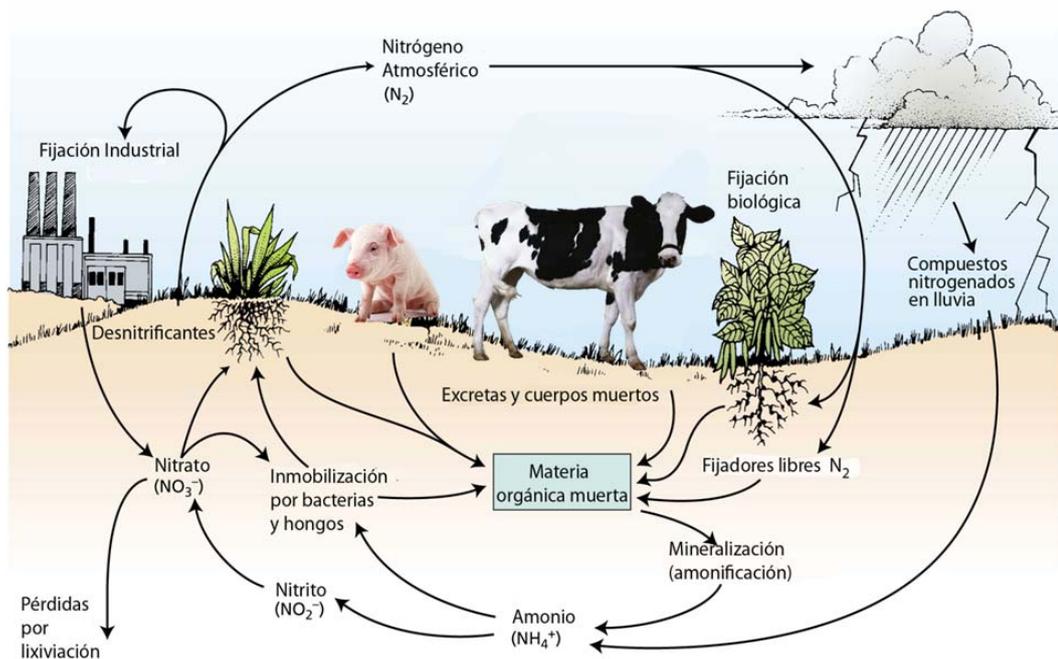


Figura 2.1. Ciclo del nitrógeno (Fuente: Taiz, 2006; edición: Autor)

Esta ruptura puede hacerse por los siguientes mecanismos: descargas eléctricas, combustión de combustibles fósiles y fijación fotoquímica, que proveen suficiente energía como para formar nitratos (NO_3^-). Este último procedimiento es reproducido en las fábricas productoras de fertilizantes.

Naturalmente, el nitrógeno es constantemente fijado de la atmósfera ya sea por la acción de descargas eléctricas (rayos) o por procesos biológicos. La fijación de nitrógeno se produce químicamente, en menor medida, cuando las moléculas de nitrógeno (N_2) se oxidan a pentóxido de nitrógeno (N_2O_5) durante tormentas eléctricas en la atmósfera. En la lluvia, este óxido de nitrógeno reacciona con el agua y produce ácido nítrico (HNO_3) que se deposita en el suelo y cuerpos de agua superficial, donde finalmente se fija como nitrato (NO_3^-).

Finalmente la fijación del nitrógeno es llevada a cabo por bacterias que usan enzimas en lugar de la luz solar o descargas eléctricas, siendo el amoníaco el primer producto de fijación biológica de nitrógeno, que es casi siempre asimilado tan rápidamente como se forma. Estas bacterias pueden ser las que viven libres en el suelo o aquellas en simbiosis, que fijan el nitrógeno sólo cuando están

presentes en nódulos con las raíces de ciertas plantas (Leguminosas) para fijar el nitrógeno, destacando los géneros *Rhizobium* o *Azotobacter*, las cuales también actúan libremente. Otro grupo son las cianobacterias acuáticas (algas verdeazuladas).

Una vez que el nitrógeno ha sido fijado en el suelo las bacterias autótrofas (*Nitrosomonas spp* y especies de *Nitrospira spp*), que juegan un papel muy importante en el ciclo de este elemento, al transformar el amonio (NH_4^+) en nitrito (NO_2^-). La modificación por otro tipo de bacteria (*Nitrobacter spp*) convierte el nitrito en nitrato (NO_3^-). Estos dos procesos involucran la oxidación química en condiciones aeróbicas y se les conoce como nitrificación del nitrógeno. El nitrato queda disponible para ser absorbido por las plantas, aunque también por ser muy soluble se pierde fácilmente en el sistema suelo por lixiviación a las aguas subterráneas y cuerpos de agua superficiales.

Sin embargo, teniendo en cuenta que la mayoría de las plantas pueden asimilar el nitrógeno únicamente en forma de amonio (NH_4^+) o nitrato (NO_3^-) y que aparecen en el suelo en concentración limitada, no es sorpresa que el nitrógeno a menudo sea el nutriente más limitante para el crecimiento vegetal.

Bajo condiciones anaeróbicas (o por lo menos anóxica), el nitrato puede ser devuelto a la atmósfera como nitrógeno molecular. Este proceso se llama desnitrificación y es llevado a cabo en suelos y aguas por ciertas bacterias desnitrificantes pertenecientes a los géneros *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* y *Thiobacillus*, que devuelven parte del nitrógeno inorgánico del suelo a la atmósfera en forma gaseosa, produciendo así una “pérdida” de este elemento para los ecosistemas y la biosfera. Estas bacterias habitan en pantanos y en fondos carentes de oxígeno.

A pesar de que la mayor parte del nitrógeno se encuentra en la atmósfera, la reserva realmente activa de este elemento se encuentra en el suelo, ya que aquí van a parar los desechos orgánicos de los organismos vivos y los restos de éstos. Y es así, como las bacterias oxidantes del nitrógeno concluyen el proceso de descomposición de estos materiales, convirtiendo el nitrógeno orgánico en inorgánico (nitratos).

Asimismo, los animales herbívoros sintetizan sus proteínas a partir de los vegetales, mientras que los carnívoros las obtienen a partir de los herbívoros recibiendo de esta manera el nitrógeno requerido para el metabolismo, crecimiento y reproducción. En las personas el consumo promedio de nitrógeno es de 11 g/día/año (Fink et al., 1999), el nitrógeno absorbido en exceso por animales y humanos acaba formando iones amonio, que resultan tóxicos y son eliminados, siendo devueltos al suelo. Esta eliminación se hace en forma de amoníaco (algunos peces y organismos acuáticos), en forma de urea (el hombre y otros mamíferos) o en forma de ácido úrico (aves y otros animales de zonas secas), así como también al descomponerse los cadáveres el nitrógeno en forma de materia orgánica muerta es convertida en gran medida a amonio por la acción de bacterias heterótrofas, aunque algo del nitrógeno en forma de materia orgánica muerta se convierte en materia orgánica no biodegradable (materia orgánica recalcitrante) y la otra parte llega a transferirse al detritus del agua o sedimento, o en el humus de los suelos (Sawyer et al., 1994). El amonio puede ser absorbido en las superficies de las partículas de arcilla en el suelo, mientras en el agua es soluble.

Desde que se consiguió la síntesis artificial de amoníaco por el proceso Haber, fue posible fabricar abonos nitrogenados, los cuales se emplean actualmente en grandes cantidades en la agricultura. Su mal uso produce, a veces, problemas de contaminación en las aguas, así como posible erosión de la salud humana y del medio ambiente debido al nitrógeno mal expresado de la urea (Montaño 2010a).

De una manera u otra el nitrógeno es un elemento que está presente en todos los procesos que se desarrollan en el ambiente, empezando su ciclo en la atmósfera, en la geosfera, todo finalmente regresa de nuevo al principio.

2.1.4. Fases del ciclo

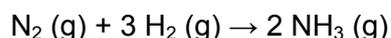
El ciclo del nitrógeno tiene cinco etapas, de las cuales sólo la asimilación no es realizada por bacterias:

a) Fijación de nitrógeno. La fijación de nitrógeno es la conversión del nitrógeno del aire (N_2) a formas distintas susceptibles de incorporarse a la composición del suelo o de los seres vivos, como el ion amonio (NH_4^+) o los iones nitrito (NO_2^-) o nitrato (NO_3^-); y también su conversión a sustancias atmosféricas químicamente activas, como el dióxido de nitrógeno (NO_2), que reaccionan fácilmente para originar alguna de las anteriores.

La fijación de nitrógeno puede ser abiótica o biológica:

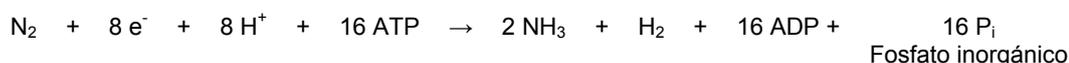
Fijación abiótica. Se forman óxidos como consecuencia de la combustión de compuestos orgánicos, descargas eléctricas, etc., que son arrastrados al suelo por la lluvia, o amonio por el proceso industrial Haber-Bosch.

Fijación industrial. El proceso Haber-Bosch de fijación de nitrógeno es el de producción de amoníaco. Se realiza haciendo pasar una mezcla estequiométrica de nitrógeno atmosférico e hidrógeno por un catalizador metálico (hierro, cobalto, molibdeno) a $500^\circ C$ y 200 atm (Kirk, 2000). Después el amoníaco se oxida a ácido nítrico, que al combinarse de nuevo con amoníaco rinde nitrato amónico, que se utiliza como explosivo y como fertilizante.



La producción de cianamida es otro proceso industrial de fijación de nitrógeno y se realiza haciendo pasar nitrógeno atmosférico sobre carburo de calcio caliente en presencia de un catalizador. La cianamida se emplea como fertilizante y para elaborar cianuro.

Fijación biológica. La fijación biológica del nitrógeno atmosférico consiste en la incorporación del nitrógeno atmosférico, a las plantas, gracias a algunos microorganismos, principalmente bacterias y cianobacterias que se encuentran presentes en el suelo y en ambientes acuáticos. Esta fijación se da por medio de la reducción de nitrógeno gaseoso (N_2) en amoníaco (NH_3) o nitratos (NO_3^-).



Estos organismos usan la enzima nitrogenasa para su descomposición, este proceso crucial sólo puede ser llevado a cabo por unos pocos grupos de seres vivos (Ver Tabla 2.3), todos ellos procariontes (Sprenst J. y Sprenst P., 1990).

Tabla 2.3. Microorganismos fijadores de nitrógeno

Microorganismo		Tipo de metabolismo al fijar N	Importancia económica
Bacillaceas	<i>Bacillus polymyxa</i>	Aeróbico, heterotrófico	Beneficios marginales en agricultura
	<i>Clostridium</i>		
Azotobacterias	<i>Azotobacter</i>	Anaeróbico, heterotrófico	Beneficios a cosechas no confirmados
	<i>Azomonas insignis</i>		
	<i>Azotococcus agilis</i>		
	<i>Beijerinckia dextrii</i>		
	<i>Dexia gummonsa</i>		
	<i>Xanthobacter flavus</i>		
Enterobacterias	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Anaeróbico o microaerófilo	Anaeróbico o microaerófilo
	<i>Enterobacter aerogenes</i>		
	<i>Erwinia herbicola</i>		
	<i>Citrobacter freundii</i>		
	<i>Azospirillum brasilense</i>		
Rizobiaceas	<i>Rhizobium</i>	Microaerófilo, heterotrófico	Importantes en la fijación asociativa
	<i>Bradyrhizobium</i>		
Streptomicetaceas	<i>Frankia</i>	Microaerófilo, heterotrófico	Uso potencial en bosques
Metanomonadaceas	<i>Methylocystis</i>	Microaerófilo, autotrófico	Obtención de proteína unicelular
	<i>Methylococcus</i>		
Tiobacteriaceas	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	Microaerófilo	Minería microbiana
Cianofíceas	<i>Anabaena</i>	Anaeróbico o microaerófilo, fotolitotrófico	Cultivo de arroz
	<i>Nostoc</i>		
	<i>Gloeotheca</i>		Producción de proteína unicelular
	<i>Spirulina</i>		
	<i>Synechococcus</i>		
Cromatiaceas	<i>Chromatium vinosum</i>	Anaeróbico, fotolitotrófico	
Clorobiaceas	<i>Chlorobium limicola</i>	Anaeróbico, fotolitotrófico	
Rodospirilaceas	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Anaeróbico, fotoorganotrófico	Depuración de aguas residuales
	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>		Abono
	<i>Rhodobacter capsulatus</i>		Piensa para piscifactorías
	<i>Rhodomicrobium vannielii</i>		

Fuente: Castillo y Cárdenas, 1990

Sin embargo, como la nitrogenasa sólo funciona en ausencia de oxígeno, las bacterias deben de alguna forma aislar la enzima de su contacto. Algunas estrategias utilizadas por las bacterias para aislarse del oxígeno son: vivir debajo de las capas de moco que cubren a las raíces de ciertas plantas, o bien, vivir dentro de engrosamientos especiales de las raíces, llamados nódulos, en leguminosas como los porotos y árboles como el tamarugo (*Rhizobium*).

La relación entre *Rhizobium* y sus plantas huéspedes es mutualista: las bacterias reciben carbohidratos elaborados por la planta, y la planta recibe nitrógeno en una forma asimilable.

En medio acuático la fijación de nitrógeno es realizada por cianobacterias. Algunas especies de helechos de agua, como el *Azolla*, tienen cavidades en las cuales viven en simbiosis la cianobacteria, *Anabaena azollae*, responsable de la fijación de nitrógeno. La cantidad de nitrógeno fijado por estas bacterias es impresionante 200 millones de toneladas anuales (Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Fuente global de nitrógeno reactivo

<i>Fuentes antropogénicas</i>	Cantidad nitrógeno fijado anual (tg)
Fertilizantes	81
Leguminosas y otras plantas	40
Combustibles fósiles	21
Quema de biomasa	40
Drenaje de los humedales	10
Limpieza de terrenos	20
Total	212
<i>Fuentes naturales</i>	
Microorganismos, algas, relámpagos	216

Fuente: Vitousek et al Galloway et al., 1995; Capone, 2001; and Smil, 1999; IFA DATA BANK, 2002
Elaboración: Autor

b) Nitrificación. El siguiente paso en la reacción del nitrógeno es la nitrificación, donde el ion amonio es convertido a la forma de nitrato en un proceso de oxidación microbológica. La modificación de NH_4^+ a NO_3^- depende de la temperatura del suelo. La transformación, es decir, la conversión ocurre rápidamente bajo condiciones aireadas con una temperatura entre 15 a 30°C y

pH de 6.5 a 7.5 (Keeney et al, 1972), asimismo, este proceso se ve completado entre dos a cuatro semanas. Esta fase es realizada en dos pasos por diferentes bacterias, hongos y organismos autótrofos.

Primero las bacterias del suelo Nitrosomonas y Nitrococcus convierten el amonio en nitrito (NO_2^-). Este proceso ocurre de acuerdo a la ecuación (Kuznetsov, 1970):



Luego, otro grupo de bacterias, Nitrobacter, transforman el nitrito en nitrato. Este proceso genera energía que es liberada y utilizada por estas bacterias como fuente de energía primaria. Normalmente, en los suelos los niveles de nitrito (tóxico para las plantas) suelen ser muy bajos en comparación con los niveles de nitratos ya que el nitrito se transforma en nitrato con mayor rapidez de la que se produce, pudiéndose expresar como:



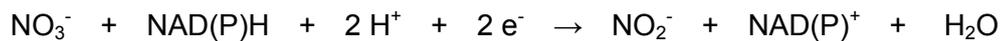
Estas reacciones de oxidación producen acidez. Pero el nitrato no es el único producto que se origina durante la nitrificación. Las diferentes reacciones que tienen lugar durante la nitrificación producen varios óxidos de nitrógeno (NO , N_2O , NO_2^-).

Varios investigadores han estudiado la fuente del oxígeno en estas reacciones (Hollocher *et al.*, 1981; Andersson y Hooper, 1983; Kumar *et al.*, 1983; Hollocher, 1984) y la idea actual es que dos de los oxígenos en el NO_3^- derivan del agua y otro deriva del O_2 , pudiendo haber un intercambio adicional de oxígeno entre el nitrato y el agua.

c) Asimilación. La asimilación ocurre cuando las plantas absorben por sus raíces compuestos orgánicos nitrogenados para su crecimiento, sean estos en forma de nitrato (NO_3^-) o amonio (NH_4^+), especies formadas por la fijación de nitrógeno o por la nitrificación, aunque parece que prefirieren el amonio como fuente de nitrógeno (Rosswall, 1981). Luego, estas moléculas son incorporadas

tanto a las proteínas, como a los ácidos nucleicos de las plantas. Los animales asimilan nitrógeno cuando se alimentan de los tejidos de las plantas convirtiéndolos en compuestos nitrogenados animales.

El primer paso dentro del proceso de asimilación es la reducción del nitrato a nitrito en el citoplasma (Oaks, 1994), el cual es catalizado por la enzima nitrato reductasa de acuerdo a la reacción:



Dicha reacción consume dos electrones suministrados por una molécula de piridín-nucleótido reducido. La forma más común de la nitrato reductasa utiliza sólo NADH como dador de electrones. La absorción del nitrato por la planta disminuye a bajas temperaturas, en anaerobiosis y en presencia de inhibidores de la respiración, lo que demuestra que es un proceso dependiente de energía metabólica.

Seguidamente, es la conversión del nitrito (NO_2^-) formado, ión altamente reactivo y potencialmente tóxico, por la enzima nitrito reductasa que lo reduce a amonio, en una reacción que requiere seis electrones donados por la ferredoxina (Fd) reducida, acorde a la siguiente reacción:



El poder reductor requerido se genera en las reacciones lumínicas de la fotosíntesis o en la glucólisis y respiración.

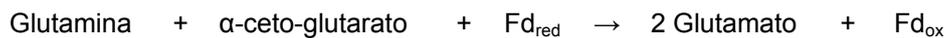
La glutamina sintetasa (GS) combina el amonio con el glutamato para formar glutamina (Figura 2.2 A):



Esta reacción requiere la hidrólisis de un ATP e involucra cationes divalentes como Mg_2^+ , Mn_2^+ o CO_2^+ como cofactores. Las plantas contienen dos clases de GS, una en el citoplasma y la otra en los plástidos de las raíces o en los cloroplastos de tallos y hojas. Las formas citosólicas son expresadas durante la

germinación de las semillas o en las células vasculares de las raíces y tallos produciendo glutamina para el transporte intracelular de nitrógeno. La GS en los plástidos de raíces genera nitrógeno, en forma de amida para el consumo, mientras que la GS de los cloroplastos de los tallos reasimila el NH_4^+ producido por fotorespiración (Lam et al 1996).

Al aumentar el nivel de glutamina aumenta la actividad de la glutamato sintasa (también conocido como glutamina 2-oxoglutarato aminotransferasa, o GOGAT). Esta enzima transfiere el grupo amida de la glutamina al alfa-ceto glutarato, produciendo dos moléculas de glutamato (Figura 2.2.A). Las plantas contienen dos tipos de GOGAT: Una forma que acepta los electrones del NADH y la otra acepta electrones de la ferredoxina (Fd):



La NADH-GOGAT se encuentra en los plástidos de los tejidos no fotosintéticos, tales como las raíces o las células vasculares de hojas en desarrollo. En las raíces la NADH-GOGAT está involucrada en la asimilación de NH_4^+ absorbida desde la rizosfera (suelo cerca de la superficie de las raíces), en las células vasculares de las hojas en desarrollo, la NADH-GOGAT asimila la glutamina translocada desde las raíces o de las hojas senescentes.

La ferredoxina dependiendo del tipo de glutamato sintasa (Fd-GOGAT) se encuentra en los cloroplastos y sirve en el metabolismo fotorespiración del nitrógeno. Tanto la cantidad de proteína y su actividad aumentan los niveles de luz. Las raíces, especialmente bajo la nutrición de nitrato, tienen Fd-GOGAT en plástidos. Fd-GOGAT en las raíces presuntamente funciona para incorporar la glutamina generada durante la asimilación de nitrato.

El amonio puede también ser asimilado a través de una vía alternativa, la Glutamato deshidrogenasa (GDH) cataliza una reacción reversible que sintetiza o desamina al glutamato (Figura 2.2.B).



La forma NADH dependiente de GDH se encuentra en las mitocondrias, y una forma dependiente de NADPH se localiza en los cloroplastos de los órganos fotosintéticos. Aunque ambas formas son relativamente abundantes, sus roles específicos aún no han sido resueltos. Se sabe que la GDH no puede sustituir las reacciones GS-GOGAT para la asimilación del amonio, y que la función primaria de la GDH es la desaminación del Glutamato (Figura 2.2. B).

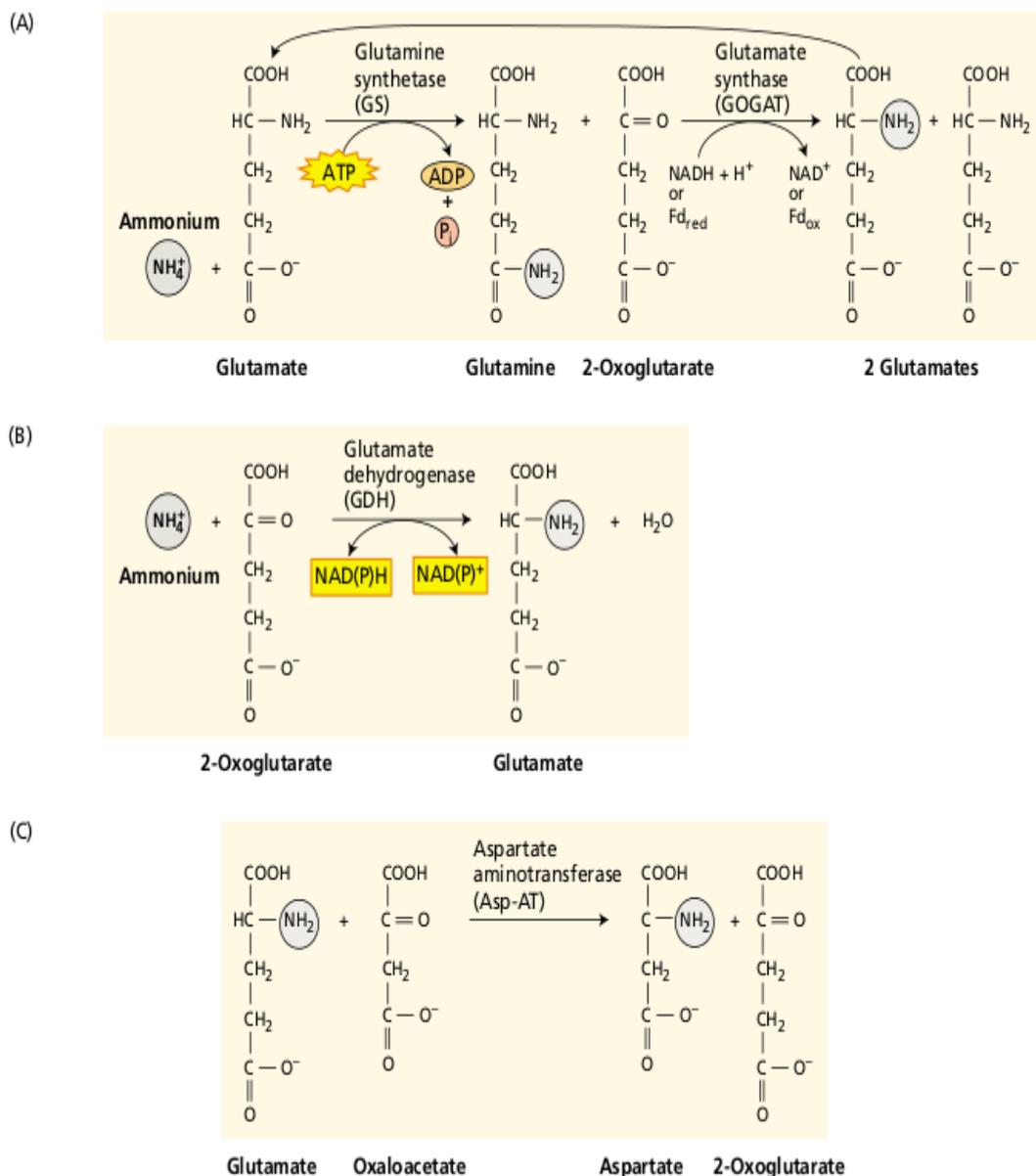
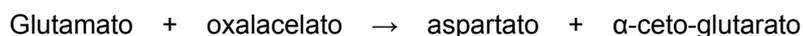


Figura 2.2. Estructura y reacciones de los compuestos involucrados en el metabolismo del amonio en la planta (Fuente: Taiz, 2006)

Una vez asimilado el nitrógeno en glutamina y glutamato, es incorporado en otros aminoácidos por reacciones de transaminación. Las enzimas que catalizan estas reacciones son aminotransferasas. Por ejemplo, la aspartato aminotransferasa (AAT) cataliza la siguiente reacción (Figura 2.2. C):



En la reacción mostrada el grupo amino del glutamato es transferido al aspartato. Las aminotransferasas se encuentran en el citoplasma, cloroplastos, mitocondrias, glioxisomas y peroxisomas. Las aminotransferasas localizadas en cloroplastos tienen un importante rol en la síntesis de aminoácidos, debido a que hojas de plantas o cloroplastos aislados expuestos a dióxido de carbono marcado, rápidamente incorporan el carbono marcado en glutamato, aspartato, alanina, serina y glicina.

d) Amonificación. También denominada mineralización del nitrógeno, consiste en un conjunto de reacciones a través de las cuales el nitrógeno de proteínas y otros compuestos presentes en la materia orgánica se libera en forma de amonio, siendo ésta forma asimilable por las plantas (Singh et al., 1996).

Los compuestos proteicos y otros similares, que son los constitutivos en mayor medida de la materia nitrogenada aportada al suelo, son de poco valor para las plantas cuando se añaden de manera directa. Así, cuando los organismos producen desechos que contienen nitrógeno como urea (orina) y ácido úrico (excreta de las aves), así como de los organismos muertos, éstos son degradados por bacterias presentes en el suelo y en el agua, liberando el nitrógeno al medio, bajo la forma de amoníaco (NH_3). El nitrógeno presente en el suelo es el resultado de la descomposición de materiales orgánicos y se encuentra en forma de compuestos orgánicos complejos, como proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos y nucleótidos, que son degradados a compuestos simples por microorganismos (bacterias y hongos) que se encuentran en el suelo. Estos microorganismos usan las proteínas y los aminoácidos para producir sus propias proteínas y liberan el exceso de nitrógeno en forma de amoníaco (NH_3) o ión amonio (NH_4^+).



Los iones amonio positivos pueden ser atraídos por partículas cargadas negativamente como la arcilla y materia orgánica sólida y de esta forma ser resistentes a percolar. Los iones amonio pueden empezar a percolar hasta que la capacidad de intercambio catiónico del suelo sea satisfecha (Ayans, 1975).

Los suelos de bajo pH son más eficientes en el proceso de adsorción del ion amonio que aquellos de pH elevado y los suelos con alto contenido orgánico son menos eficientes que los suelos minerales con una capacidad similar de intercambio catiónico.

Hay una etapa denominada Inmovilización, proceso contrario a la mineralización, por medio del cual las formas inorgánicas (NH_4^+ y NO_3^-) son convertidas a nitrógeno orgánico y, por tanto, no asimilables.

e) Desnitrificación. Es el cuarto paso en el ciclo del nitrógeno. La reducción de los nitratos (NO_3^-) a nitrógeno gaseoso (N_2), y amonio (NH_4^+) a amoníaco (NH_3), se llama desnitrificación, y es llevado a cabo por las bacterias desnitrificadoras, generalmente del género *Pseudomonas*, *Micrococcus* que revierten la acción de las fijadoras de nitrógeno, retornando el nitrógeno a la atmósfera en forma gaseosa. Este proceso ocasiona una pérdida de nitrógeno para el ecosistema; ocurre donde existe un exceso de materia orgánica y las condiciones son anaerobias, además de que hay poca disponibilidad de agua y un alto pH, aunado a los escurrimientos de los fertilizantes al suelo. El fenómeno de la desnitrificación se debe, a que en condiciones de mucha humedad en el suelo, la falta de oxígeno obliga a ciertos microorganismos a emplear nitrato en vez de oxígeno en su respiración.

Un ejemplo de la reacción de oxidación de la glucosa y reducción del nitrato es el siguiente (Hutchinson, 1957):



y de la reducción de nitrito a nitrógeno molecular:



2.1.5. Aportes y pérdidas de nitrógeno dentro del ciclo

Los procesos que influyen a la aportación y pérdida de los compuestos del nitrógeno en el ambiente se sintetizan en el cuadro que continúa.

Aportes	Naturales	Lluvia (a)
		Fijación biológica del nitrógeno atmosférico por las plantas.
		Fijación bacteriana del amoníaco que va disuelto en el agua.
	Artificiales	Abonos orgánicos (estiércol).
		Abonos inorgánicos (fertilizantes químicos).
Pérdidas	Absorción por las plantas	En los procesos de asimilación y absorción, las plantas incorporan los compuestos amónicos y los nitratos para transformarlos en proteínas y otros compuestos nitrogenados.
	Lixiviación o lavado del nitrato	Es el arrastre del nitrato por el agua del suelo que percola más abajo de la zona radicular. Este proceso es el que produce la contaminación de las aguas subterráneas, ya que, en general, una vez que éste deja de estar al alcance de las raíces, continúa su descenso hacia los acuíferos sin apenas ninguna transformación química o biológica..
	Arrastre por escorrentía	Una parte del agua de lluvia o del exceso riego no se infiltra en el terreno sino que fluye hacia terrenos más bajos o cursos superficiales de agua pudiendo arrastrar cantidades variables de N de los suelos agrícolas. En general, estas pérdidas de N del suelo son pequeñas, excepto cuando la escorrentía se produce poco después de un abonado nitrogenado químico.
	Desnitrificación	Es causada por bacterias anaerobias formándose gas nitrógeno y óxido nitroso que se pierden en la atmósfera (Mara, 2004).
	Volatilización (b)	Aunque puede haber pérdidas importantes de N por volatilización cuando se abona con amoníaco

		anhidro, resultan más frecuentes aquellas que ocurren cuando se emplean abonos nitrogenados en forma amónica en suelos alcalinos, sobre todo si el pH es mayor de 8. La urea puede experimentar también pérdidas variables por volatilización después de transformarse en amonio en el suelo. El estiércol, si no se incorpora al suelo, puede perder del 10 al 60 por 100 de su N por volatilización, debido a que una parte importante de su N puede estar en forma amónica.
--	--	--

(a) Contiene cantidades variables de Nitrógeno en forma de amonio, nitrato y óxidos de nitrógeno. En los sistemas naturales la lluvia constituye una fuente importante de N. Sin embargo, en los sistemas agrícolas, este aporte (5-15 kgN/ha/año) es pequeño en comparación al de los fertilizantes.

(b) En cultivos inundados, como por ejemplo el arroz, el nitrógeno orgánico pasa rápidamente a forma amoniaca (FAO, 2010), no formándose nitrato por las condiciones anaeróbicas en el medio. Así gran parte del nitrato aportado como abono se transforma en amoniaco perdiéndose rápidamente por la volatilización.

2.2. Sistema *Azolla-Anabaena*

2.2.1. Introducción

El *Azolla* es un helecho acuático con pequeñas hojas alternas y raíces simples que cuelgan dentro del agua (Figura 2.3), se reproduce vegetativamente aunque también por esporas. Su nombre proviene de las voces griegas: azo (secar) y ollyo (matar), aludiendo a su muerte cuando el entorno del helecho se seca (Lumpkin, 1993).

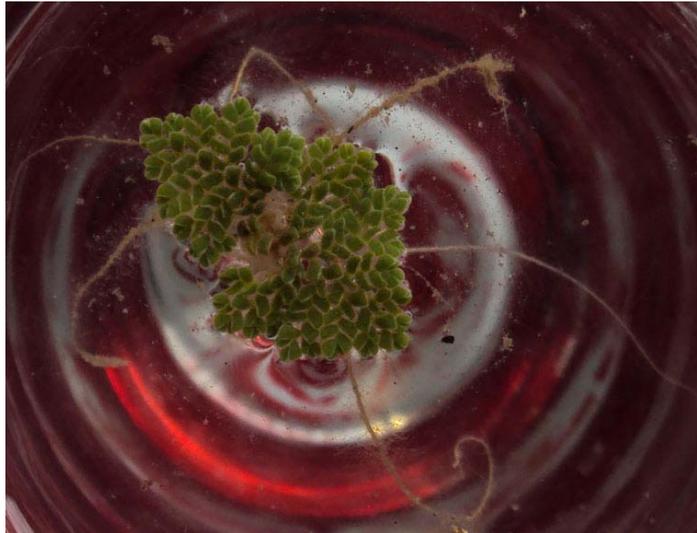


Figura 2.3. Vista superior de *Azolla Caroliniana* (Fuente: Autor)

El *Azolla* presenta una relación simbiótica hereditaria con el alga verde azul *Anabaena azollae* (Figura 2.4), una cianobacteria fijadora de nitrógeno, también denominada diazotrófica, siendo la única especie conocida que mantiene una relación simbiótica a lo largo de todas las fases del ciclo de vida del helecho (Van Hove, 1989).

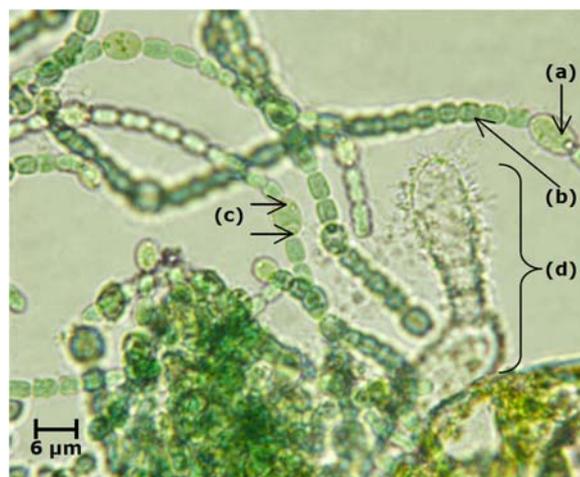


Figura 2.4. *Anabaena azollae*: (a) heterocistos; (b) célula vegetativa; (c) Nódulos polares; (d) *Azolla* Filicuoides: tricomas (Fuente: Carrapiço, 2006).

La asociación entre la *Anabaena azollae* y el *Azolla* se caracteriza principalmente por una alta productividad y alto contenido proteico, por lo que el helecho puede crecer sin fertilizantes nitrogenados (Peters y Meeks, 1989).

Se reconocen 7 especies de *azolla*, las cuales se desarrollan en climas tropicales: *A. Nilotica*, *A. Pinnata*, *A. Filiculoides*, *A. Rubra*, *A. Microphylla*, *A. Mexicana* y *A. Caroliniana*.

2.2.2. Descripción Taxonómica

Por muchos años el género *Azolla* se clasificó dentro de las *Salviniaceas*, cuya característica principal es la de ser una familia de helechos criptógamos flotantes (Calvert y Peters, 1981). La identificación se hace complicada debido a la usual ausencia de los esporocarpos (Lumpkin, 1989).

El género se divide en seis secciones, y seis especies vivientes en función de sus órganos reproductores, i.e. sacos flotantes de megasporas y gloquidios de las másulas.

Las especies identificadas se encuentran dentro del subgénero: *Euazolla* con tres sacos flotantes, y *Rhizosperma* nueve sacos flotantes (Peters et al., 1974).

Tabla 2.5. Taxonomía del *Azolla* en función de sus órganos reproductores

División	Secciones (Subgéneros)	Especie de <i>Azolla</i>	Característica del gloquidio (1)	Posición en la másula (2)
Pterófitas				
Orden	<i>Euazolla</i>			
Salvinales	(3 sacos flotantes)	<i>Filiculoides</i> (Lam)	Septado	Sup. total
		<i>Caroliniana</i> (Wild)	Septado	Sup. total
Familia				
Salvináceas (Azollaceae)		<i>Mexicana</i> (Presl.)	Septado	Sup. total
		<i>Microphylla</i> (Kaulf)	Septado	Sup. total
Género				
<i>Azolla</i>	<i>Rhizosperma</i> (9 sacos flotantes)	<i>Pinnata</i> (R. Brown)	Simple no septado	Sup. interior
		<i>Nilotica</i> (De Cainse)	Ausente (3)	Ausente

(1) Hills y Gopal (1976), (2) Konar y Kapoor(1974), (3) Demasly (1953)
Fuente: Lumpkin, 1991

2.2.3. Distribución geográfica

El sistema *Azolla-Anabaena* es común encontrarlo en estanques, canales y en arrozales que se encuentran dentro de las regiones cálidas templadas y tropicales alrededor del mundo.

Aun cuando los seres humanos hayan ejercido algún tipo de acción en la dispersión del *Azolla*, su correspondiente distribución endémica se presenta de acuerdo a las zonas indicadas en la Tabla 2.6.

Tabla 2.6. Distribución de las especies de azolla

Especie <i>Azolla</i>	Distribución geográfica
<i>Caroliniana</i>	En el oriente Norte América y también en el Caribe
<i>Filiculoides</i>	Sur de América del Sur y el Occidente de Norte América incluyéndose Alaska
<i>Microphylla</i>	América tropical y subtropical
<i>Mexicana</i>	En el norte de Sudamérica hasta el occidente de Norte América
<i>Rubra</i>	Oceanía
<i>Nilotica</i>	En las regiones altas del Nilo a Sudán
<i>Pinnata</i>	En lo mayor parte de Asia y en la costa de África tropical

Fuente: Lumpkin, 1991 y Saunders 1992

2.2.4. Especies Nativas

En el Ecuador se ha reportado la existencia de 4 variedades de *Azolla*: *microphylla* Kaulf, *caroliniana* Wild, *filiculoides* Lam y *mexicana* C. Presl (Jorgensen *et al*, 1999), como puede apreciarse en la Tabla 2.7. A lo largo de los proyectos *Azolla-Anabaena* encabezados por el Dr. Montaña y auspiciados por PROMSA (Montaña, 2004), SENESCYT (Montaña, 2008), Banco Mundial (Montaña, 2010), los muestreos centrados en el Ecosistema Guayas permitieron encontrar una especie nativa, que corresponde al *Azolla Caroliniana*.

Tabla 2.7. Disposición geográfica del *Azolla-Anabaena* dentro del Ecuador

Especie Azolla	Ubicación geográfica
<i>Caroliniana</i>	En la provincia del Guayas
<i>Filiculoides</i>	En las provincias del Cotopaxi, Imbabura y en el Napo.
<i>Mexicana</i>	En la provincia de Cotopaxi.
<i>Microphylla</i>	En las provincias de Galápagos y Guayas.

Fuente: Jorgensen *et al*, 1999

2.2.5. Morfología del *Azolla*

Las hojas del *Azolla* presentan forma triangular o poligonal, y flotan en la superficie del agua, dando la apariencia de alfombra con un color verde oscuro a rojizo. El diámetro de las hojas varía entre 1 a 2.5 cm en especies pequeñas, como el *Azolla pinnata* y hasta 15 cm en el caso de *Azolla nilotica*.

Los lóbulos dorsales presentes en el *Azolla*, tienen la característica principal de ser clorofílica con excepción de los bordes del lóbulo que no tienen coloración simbiote (Figura 2.5). Los lóbulos ventrales son translúcidos, se ubican en la superficie del agua y sostienen a las hojas y son de característica casi aclorofilada .

Los estomas, otra estructura, se encuentran dispuestos en hileras verticales sobre ambas superficies del lóbulo dorsal y la parte superior del lóbulo ventral, respectivamente. Al inicio, los estomas están formados por dos células separadas, que más adelante se unirán para dar origen a una sola célula anular provista de un poro central.

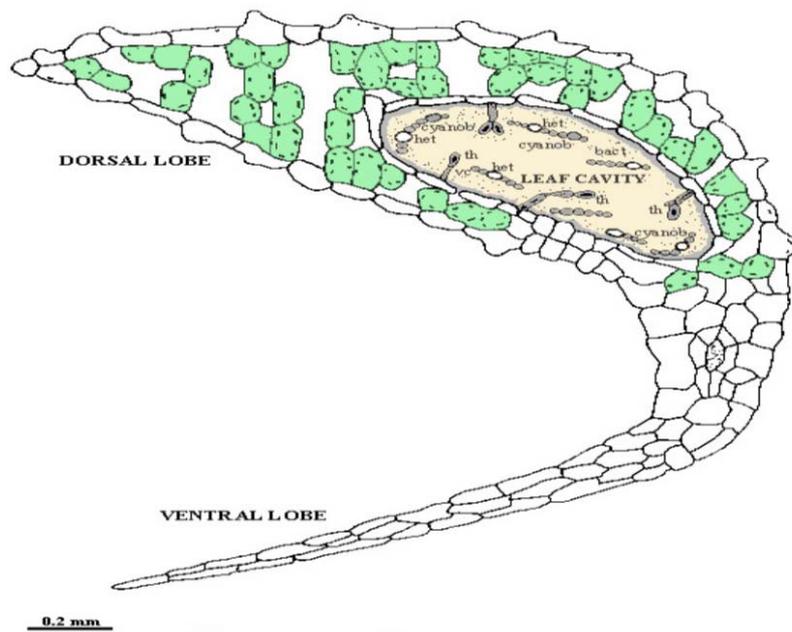


Figura 2.5. Sección transversal de hoja de *Azolla* (Fuente: Sevillano et al., 1984)

El rizoma principal es la estructura que sostiene varias ramas alternas. Existe además una zona denominada de abscisión que se ubica justamente en el punto de unión de cada rama y juega un papel importante en la reproducción vegetativa.

Colgando hacia el agua se encuentran ubicadas las raíces adventicias o en otras ocasiones se puede dar el caso de que se introduzcan en el lodo. Su longitud varía en virtud de la especie que se trate, entre 1 a 5 cm en el caso de la *A. pinnata* y hasta 11 cm en el caso de la *A. nilotica*.

El desarrollo de las raíces de *Azolla* es acropétalo, partiendo de las ramas por encima de la superficie inferior del tallo, presentando una zona de abscisión en su punto de unión.

Las raíces jóvenes cuentan con una envoltura, la que se desprende durante el crecimiento de los pelos basales de la raíz.

2.2.6. Reproducción

El sistema simbiótico es sostenido a lo largo del ciclo de vida de los helechos, donde la cianobacteria y las bacterias siempre están presentes (Figura 2.6), ya sea en las cavidades de la hoja dorsal del lóbulo o en las estructuras sexuales (Esporocarpos) (Carrapiço, 1991, 2002) .

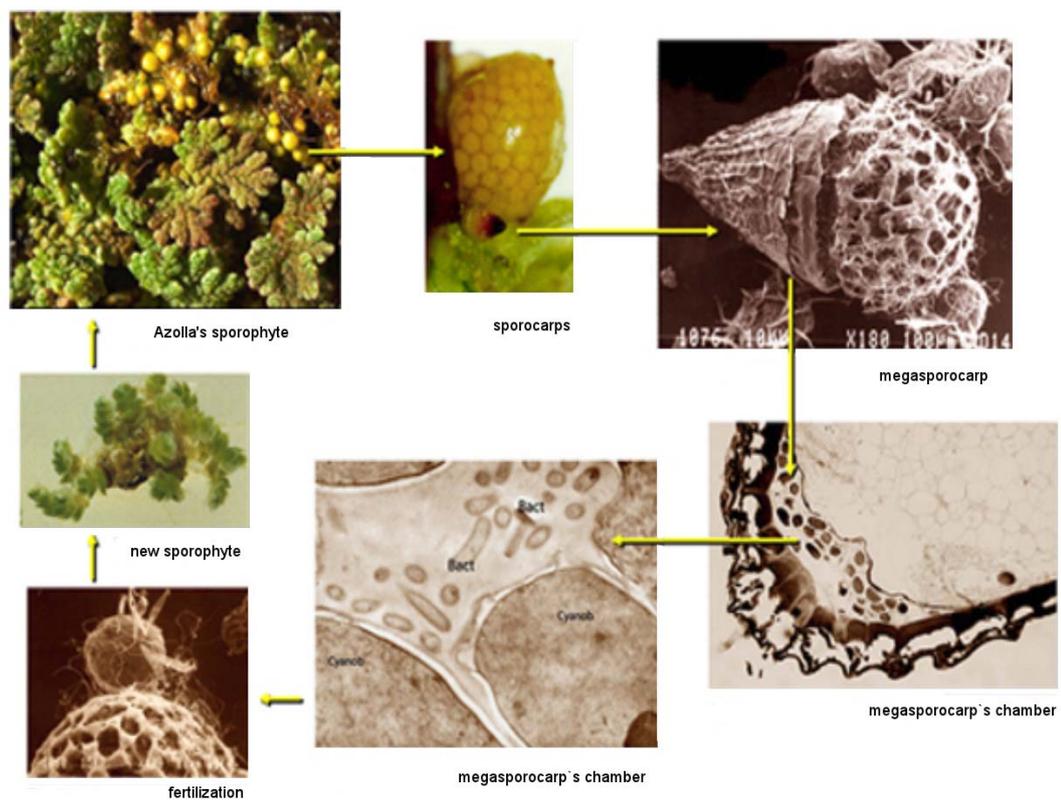


Figura 2.6. Ciclo de vida de *Azolla*, mostrando la permanente presencia de las bacterias y cianobacterias (Fuente: Carrapiço, 2010)

El *Azolla* puede reproducirse en forma vegetativa y sexual. En condiciones naturales, la *Azolla* se multiplica por reproducción vegetativa. Bajo ciertas condiciones se observa la formación de órganos sexuales y una nueva generación está formada por el embrión fertilizado. La reproducción sexual no es muy común y parece estar influenciado por factores medio ambientales (Carrapiço, 2010).

El *Azolla* generalmente se reproduce vegetativamente, consiste en la multiplicación por la fragmentación de las hojas. Esto ocurre cuando los rizomas secundarios o ramas forman una capa de abscisión en sus bases y se desprenden de los principales rizomas. Una raíz comienza a emerger de la base de la rama que separa tan pronto como las células de la capa de abscisión comienzan la maduración.

Después de la separación de la planta madre, las nuevas plantas se comportan de forma independiente. A medida que la planta joven crece en tamaño, también crecen más raíces, desarrollándose completamente en 15 a 20 días.

El helecho *Azolla* es un ejemplo de heteroespora, es decir tiene dos tipos de esporas que son producidas en la misma planta. La esporulación ocurre durante un período específico del año, y no en todas las especies.

En la primera esporulación el lóbulo ventral inicial de una rama lateral, en lugar de formar un lóbulo en la hoja, el helecho produce dos esporocarpos que son de dos tipos, microsporocarpos y megasporocarpos. El microsporocarpo, tienen alrededor de 2 mm de diámetro, cada uno produce 8 a 130 microsporangios, cada uno con 32 o 64 esporas que se llama microsporas agregando entre 3 a 10 másulas (Moore, 1969). El megasporocarpo, tiene alrededor de 0.5 mm de diámetro produciendo un megasporangio único que contiene una sola megaspora.

En la madurez, tanto el megasporocarpo y microsporocarpo se abren. El microsporangio se rompe liberando microesporas en las estructuras filamentosas conocidas como gloquidios y hundiéndose hasta el fondo. Después de un período de latencia cada microespora germina y crece hasta convertirse en un prótalo que a su vez produce gametos masculinos (anterozoides). La megaspora, aún unida al megasporocarpo, germina y se desarrolla en un prótalo que produce gametos femeninos (oosferas). Las oosferas son fecundadas por anterozoides formando embriones. Cada embrión germina y empuja afuera al esporocarpo para formar una plántula, el esporofito, flota en la superficie del agua, necesitando uno o dos meses a partir de la germinación para producir una plántula que se elevará hacia la superficie.

2.2.7. Identificación y clasificación taxonómica de *Azolla Caroliniana*

La clasificación se fundamenta en las características botánicas de la planta. Se observa una planta pequeña, acuática y flotante con tendencia a aglomerarse y formar masas compactas en la superficie del agua cuando está flotando.

La coloración de las hojas es de verde claro a intenso, dependiendo del grado de sombra y disponibilidad de nutrientes; en algunos sitios presentan coloración rojiza debido a la exposición directa de la luz solar, que puede deberse a la producción de antocianinas, que en muchas plantas es un mecanismo de defensa de la luz ultravioleta, aunque en la actualidad existe la hipótesis que la coloración rojiza también podría deberse a la concentración elevada de nitratos (Guerrero *et al*, 2009).

En el hábitat natural se observa que este helecho vive asociado a otras plantas acuáticas como la lentejilla, jacinto de agua y diversos tipos de algas verde azules.

El tallo es rastrero, suave y crece como un tricoma. Las raíces alcanzan longitudes de 3 a 4 cm, son ramificadas y nacen de cada ramificación del tallo subdicótoma.

El tamaño de una hoja de *Azolla-Anabanena* normalmente desarrollada es de 0.5 mm de largo y cerca de las partes apicales de los tallitos están sobrepuestas como escamas. Cada hoja consiste de dos lóbulos: el lóbulo superior posee muchas papilas, es de color verde claro y flota, en su borde se encuentran de 2 a 4 hileras de células sin clorofila, las hojas son sin nervadura; el lóbulo inferior es de aproximadamente 0.7 a 0.8 mm de largo; es transparente–parduzco.

La reproducción es principalmente vegetativa, se lleva a cabo a través de frecuentes fragmentaciones del tallo en trozos pequeños, las que rápidamente aumentan su tamaño para repetir este proceso.

En la parte interior de un lóbulo inferior se observa un megasporangio. En la parte derecha se reconoce el indusio en forma de “gorrito”; debajo del indusio se reconocen tres flotadores y por debajo de ellas se ubicaba una sola megáspora.

Se establece que las muestras de *Azolla* utilizadas corresponden a la especie de *Azolla caroliniana* Willd y su clasificación corresponde a las categorías:

HELECHO AZOLLA

División: *Pteridophyta*

Clase: *Filicopsida*

Orden: *Salviniales*

Familia: *Azollaceae*

Género: *Azolla*

Especie: *caroliniana*

N.C: *Azolla caroliniana*

ALGA ANABAENA AZOLLAE

División: *Cyanophytas*

Clase: *Cyanophyceae*

Subclase: *Hormogonophycideae*

Orden: *Nostocales*

Familia: *Nostocaceae*

Género: *Anabaena*

Especie: *azollae*

N.C: *Anabaena azollae*

2.2.8. Proceso de fijación en el *Azolla*

En las cianobacterias, las condiciones anaeróbicas se crean en unas células especializadas llamadas heterocistos (Figura 2.7). Los heterocistos son células redondas y de gruesas paredes celulares que se diferencian cuando las bacterias filamentosas se ven privadas de NH_4^+ . Estas células, entre otras adaptaciones carecen del fotosistema II, el fotosistema productor de oxígeno en la fotosíntesis por lo que no se genera oxígeno. Los heterocistos son una adaptación para la fijación de nitrógeno ya que están extendidos en cianobacterias filamentosas aeróbicas que fijan nitrógeno.



Figura 2.7. Cianobacteria *Anabaena* sp. Puede observarse su morfología filamentososa y dos heterocistos (Fuente: Internet)

Las cianobacterias que no tienen heterocistos pueden llevar a cabo la fijación de nitrógeno sólo en condiciones anaeróbicas como las que existen en campos inundados.

En países asiáticos las cianobacterias fijadoras de nitrógeno con y sin heterocistos, son el principal modo de mantener un aporte de nitrógeno adecuado en el suelo de campos de arroz. Estos microorganismos que fijan el nitrógeno cuando los campos se inundan y mueren cuando se secan liberan el nitrógeno fijado en el suelo. El *Azolla* mantiene una asociación simbiótica con la cianobacteria *Anabaena*. La asociación *Azolla-Anabaena* puede fijar entre 30-60 kg nitrógeno atmosférico por hectárea en 30 días. Además, los helechos, contiene 3-6% N en peso seco y podría duplicar la biomasa en cada 3-5 días (Watanabe, 1982) bajo condiciones favorables.

2.2.9. Condiciones para su crecimiento

Para que el *Azolla-Anabaena* pueda desarrollarse y mantener el sistema simbiótico en buenas condiciones es necesario tener en cuenta los siguientes factores para su crecimiento:

Temperatura. Debe oscilar entre los 20°C y 28°C, aunque hay especies tropicales que crecen a temperaturas que fluctúan entre los 30°C y los 35°C (Tabla 2.8). El sistema *Azolla-Anabaena* no resiste temperaturas inferiores a 0°C o superiores a 35°C.

pH. Los suelos con un pH entre 6 y 7 son los más adecuados.

Agua. El agua es un factor importante ya que el helecho es sensible a la sequedad, es recomendable mantenerlas en cierta profundidad de agua estancada (1 cm) y requiere hasta 25 mg de fósforo aproximadamente por kg de suelo húmedo.

Viento. El viento fuerte puede matar al *Azolla* ya que lo empuja a un lado de la parcela del terreno acumulando una masa densa.

Luz. En condiciones sombreadas el *Azolla* mantiene su color verde natural, mientras que la luz directa llega a tornar de color rojizo sus hojas.

Tabla 2.8. Rango de temperaturas para diferentes tipos de *Azolla*

Subgénero	Especies	Temperatura del agua (°C)		
		Mínimo	Máximo	Óptimo para crecimiento
Euazolla	<i>A. filiculoides</i>	0-10	38-42	20-25
	<i>A. caroliniana</i>	<0-10	45	20-30
	<i>A. mexicana</i>	-	-	30-33
	<i>A. microphylla</i>	5 -8	45	25-30
Rhizosperma	<i>A. pinnata</i>			
	<i>A. pinnata</i> var. <i>Pinnata</i>	<5	>40	16-33
	<i>A. pinnata</i> var. <i>Imbricata</i>	0	45	20-30

Fuente: (Cagauan *et al.*, 1991)

Para mantener el sistema *Azolla-Anabaena* adaptada a laboratorio, se utiliza un medio de cultivo, como el H-40 (Tabla 2.9), también denominado Hoagland, que es el más recomendado para el desarrollo del *Azolla-Anabaena*.

Tabla 2.9. Solución nutritiva Hoagland H-40. Componentes

Macronutrientes	Conc. (mol/L)	Micronutrientes	Conc. (g/L)	Fe-EDTA	Cantidad (g)
CaCl ₂ .2H ₂ O	4.0	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.040	FeSO ₄ . 7H ₂ O	2.00
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.6	H ₃ BO ₃	1.425	EDTA-Na ₂	2.68
NaCl	1.0	CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.020	H ₂ O	200.00
KH ₂ PO ₄	0.7	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.110		
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0.1	Na ₂ MoO ₄ . H ₂ O	0.125		
KCl	2.0	MnSO ₄ . H ₂ O	0.765		

Fuente: (IRRI, 1991)

2.2.10. Fertilización

El principal fertilizante que se necesita es fósforo, que debe ser soluble en el agua y aplicarse a las parcelas en una proporción de 150 a 225 kg/ha. Ocasionalmente se adiciona cenizas de tamo de arroz como fuente de potasio en una proporción de 20 kg/ha, así como otros abonos orgánicos.

Los porcentajes de los nutrientes minerales en el sistema *Azolla-Anabaena* (peso seco) son los siguientes:

Nitrógeno	4-5%
Fósforo	0.5%
Potasio	1-2%
Calcio	0.5%
Magnesio	0.5%
Hierro	0.1%

En casos de deficiencia de algunos de estos elementos, el *Azolla* cambiará en sus características.

Deficiencia de fósforo: cambian su color a café-rojizo, son frágiles y las raíces se alargan.

Deficiencia de calcio: los lóbulos dorsales se tornan rojizos, la *anabaena* se libera al medio.

Deficiencia de potasio: se torna amarillenta y después de color pardo.

Deficiencia de hierro: disminuye la cantidad de clorofila hasta tornarse amarilla la planta.

2.2.11. Análisis bromatológico

Análisis bromatológicos en tejido foliar fueron realizadas en ESPOL-ICQA-Laboratorio de Bromatología por el método Kjeldhall dieron 7.02 % y en INIAP-Bolicho 5.02 % de nitrógeno, que en valor de proteína es alrededor de 37.5 %. Estos resultados concuerdan con estudios de cepas de *Azolla-Anabaena* capaces de acumular en su biomasa aproximadamente un 8 % de N.

Tabla 2.10. Perfil de aminoácidos de *Azolla-Anabaena* nativa de invernadero

Aminoácido	%
Acido aspártico	2.14
Treonina	0.93
Serina	0.94
Acido glutámico	2.75
Prolina	0.88
Glicina	1.23
Alanina	1.52
Valina	1.18
Metionina	0.29
Isoleucina	0.92
Leucina	1.67
Tirosina	0.70
Fenilalanina	1.16
Histidina	0.45
Lisina	0.89
Arginina	1.10
Triptofano	0.42

Se analizaron aminoácidos de *Azolla-Anabaena* nativa de invernadero desarrollado en los laboratorios del INIAP-Santa Catalina con los resultados que se muestran en la Tabla 2.10.

2.2.12. Pestes y plagas

Al sistema *Azolla-Anabaena* como todas las plantas las atacan diversas enfermedades y plagas. Algunos organismos llegan a infestar las raíces y se pegan también a las hojas, incluyendo los siguientes.

- Hongos, como la *Rhizoctonia* que causa manchas grises en la superficie de las hojas, para combatirlos se recomienda rociar con insecticidas orgánicos.
- El damping-off o también denominado mal de almácigos, que aparece a temperaturas elevadas, se lo puede combatir utilizando ceniza vegetal.
- Insectos, en especial los lepidópteros como el Barrenador, Barrenillo pardo, Barrenillo gris, el gusano hilandero y ácaros, se alimentan de las hojas de las plantas y se combaten rociando soluciones de insecticidas orgánicos, como alcohol de ajo o ají picante.
- Moluscos, como caracoles de tierra y de agua, cangrejos y pulgas de agua que se comen las raíces y las hojas de las plantas, se combaten rociando soluciones de insecticidas orgánicos como el jugo de la ortiga.

2.3. Teoría del color

2.3.1. Introducción

Desde hace muchos años se ha usado el color como ayuda para la medición de un compuesto o grupo de compuestos que hacen parte de una sustancia química, cuando hablamos de color, no es más que el reflejo de luz blanca que despiden los objetos que nos rodean (Küppers, 2002); al reemplazar el ojo humano por otros detectores de radiación se puede estudiar la absorción de sustancias, no solamente en la zona del espectro visible, sino también en ultravioleta e infrarrojo.

Quizás la técnica más usada para determinar la concentración de dichos compuestos es la colorimetría. El fundamento de la técnica consiste en el paso de luz blanca a través de una solución coloreada, algunas longitudes de onda se absorben con preferencia sobre otras.

2.3.2. Atributos del color

Según Potter (1970), la luz reflejada por un objeto de color puede ser dividida en tres componentes a los que se han dado los términos de Valor, Matiz y Croma. El Valor (Valué) se refiere a la claridad u oscuridad del color. El Matiz (Hue) a la Longitud de Onda predominante que determina si el color es rojo, verde o azul. El Croma (Saturación, Pureza) se refiere a la intensidad del color. El color de un objeto puede definirse con precisión en términos del valor numérico de estos tres componentes, esto se conoce como Colorimetría de Estímulo Triple, y es la base de varios instrumentos de Medición de Color y sistemas de anotación de color. Las muestras que tienen los mismos tres números son del mismo color. Estos números varían según si color de una manera sistemática que puede ser reproducida gráficamente en un Diagrama de Cromaticidad.

La intensidad del color es proporcional a la concentración del compuesto que se mide, mientras que la cantidad de luz absorbida es proporcional a la intensidad del color y por lo tanto a la concentración.

2.3.3. Radiaciones Electromagnéticas

Pueden considerarse como un conjunto de corpúsculos, llamados fotones, los cuales llevan asociada una onda. La energía de radiación está relacionada con la longitud de onda. Las longitudes de onda más cortas poseen mayor energía que las longitudes de onda más largas. De tal manera que se puede hablar de un espectro electromagnético constituido por las radiaciones electromagnéticas, mismo que se ha dividido en varias regiones, de acuerdo con la longitud de onda (λ) y la energía, como se expresa en la Figura 2.8.

1. Rayos X (1-100 nm)
2. Ultravioleta (100-390 nm)
3. Visible (390-700 nm)
4. Infrarrojo (700-100 000 nm)
5. Microondas (100 000- 1 000 000 nm)

El órgano de la vista, puede percibir diversas radiaciones energéticas de distintas longitudes de onda, sin embargo puede apreciar solo aquellas que se encuentran entre los 400 y 700 nanómetros; este proceso se lleva a cabo cuando pequeñas células ubicadas en la retina del ojo, también llamadas conos, registran radiaciones de energía, a las que llamamos luz, convirtiéndolas en impulsos eléctricos, que a través del sistema nervioso llegan hasta el cerebro donde concluye con una sensación de color (Kuppers, 2002).

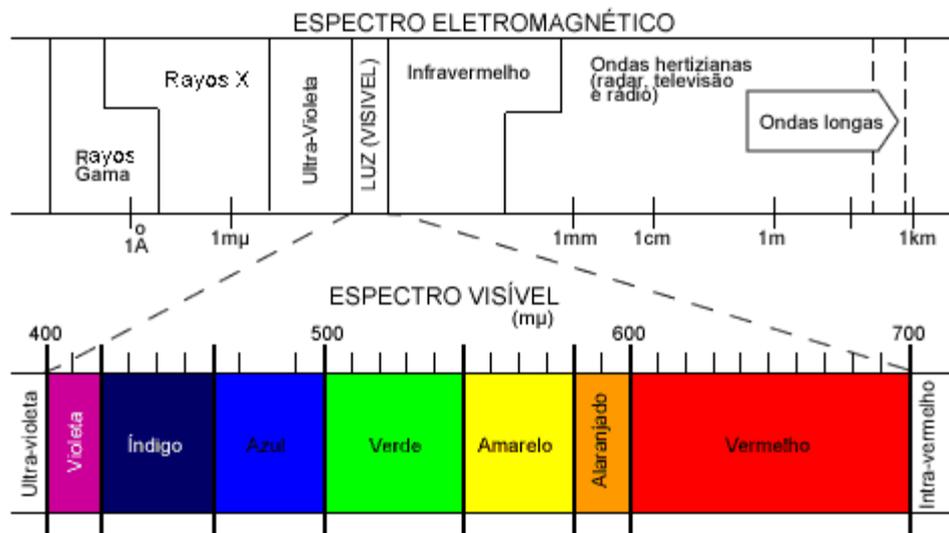


Figura 2.8. Espectro electromagnético
Fuente: Kam Teng, 2010

2.3.4. Curvas Espectrofotométricas

Por lo general los objetos deben sus colores a la absorción selectiva de diferentes cantidades de luz dentro de sus longitudes de onda visibles. Las longitudes de onda no absorbidas son aquellas reflejadas o transmitidas por los objetos y visibles por el observador. En otras palabras, los objetos amarillos característicamente absorben la luz azul, los objetos rojos absorben la luz verde, entre otros.

Físicamente, el color de un objeto es medido y representado por Curvas Espectrofotométricas, las que diagraman fracciones de la luz incidente (reflejada o transmitida) como una función de la longitud de onda, por todo el espectro visible.

2.3.5. Espectrofotometría: cuantificación

Dentro de los métodos colorimétricos, se utilizan medidas de energía radiante, ya sea emitida, absorbida o reflejada. Estas medidas se determinan a través de técnicas fotométricas. Las técnicas fotométricas tienen su fundamento en las interacciones de las radiaciones electromagnéticas sobre la materia.

2.3.5.1. Aspectos teóricos de espectrofotometría cuantitativa

Bozimowsk *et al* (1983), señalan que la absorción de luz por parte de una sustancia es una propiedad característica de ella, que puede ser utilizada para su identificación y cuantificación.

Todas las sustancias absorben luz en alguna región del espectro electromagnético (VIS, UV, IR, etc.).

La absorción de luz depende de la estructura química del compuesto absorbente, y en especial de ciertos grupos funcionales, de modo que es posible identificar un compuesto por medio de las características de su espectro de absorción.

Ley de Lambert. Cuando un rayo de luz monocromática pasa a través de un medio absorbente, su intensidad disminuye exponencialmente a medida que la longitud del medio absorbente aumenta.

Ley de Lambert: $I = I_0 e^{-k_1 l}$

Ley de Beer. Cuando un rayo de luz monocromática pasa a través de un medio absorbente, su intensidad disminuye exponencialmente a medida que la concentración del medio absorbente aumenta.

Ley de Beer: $I = I_0 e^{-k_2 c}$

Estas dos leyes se combinan en la ley de Beer-Lambert: $I = I_0 e^{-k_3 cl}$

Ley de Beer-Lambert

Cuando se pasa un rayo de luz monocromática de intensidad inicial I_0 a través de una solución en un recipiente transparente, parte de la luz es absorbida de manera que la intensidad de la luz transmitida I es menor que I_0 . Ocurre alguna disminución en la intensidad de la luz por dispersión de las partículas o reflexión en las interfases, pero principalmente por absorción de la solución. La relación entre I e I_0 depende de la longitud del medio absorbente, l , y de la concentración

de la solución absorbente, c . Estos factores se hallan relacionados en la Ley de Lambert y Beer.

La Ley Lambert Beer es un medio matemático de expresar cómo la materia absorbe la luz. Esta ley afirma que la cantidad de luz que sale de una muestra es disminuida por tres fenómenos físicos:

1. La cantidad de material de absorción en su trayectoria (concentración).
2. La distancia que la luz debe atravesar a través de la muestra (distancia de la trayectoria óptica).
3. La probabilidad de que el fotón de esa amplitud particular de onda sea absorbido por el material (absorbencia o coeficiente de extinción).

Para medir la absorbancia de una sustancia se utiliza el espectrofotómetro, instrumento destinado a medir la absorción por especies inorgánicas y orgánicas de luz monocromática en la región ultravioleta / visible del espectro.

Los espectrofotómetros dan la lectura directa de la absorbancia (A) o bien, el porcentaje de transmitancia (%T). La relación entre ambos es: $A = 2 - \log \%T$.

2.3.5.2. Análisis espectrofotométrico

Todo método espectrofotométrico se basa en la comparación de la absorbancia de una sustancia de concentración desconocida con la de una solución de la misma sustancia cuya concentración se conoce y a la cual se denomina solución patrón o estándar.

La absorbancia de una solución es la resultante de la absorbancia del soluto cuya concentración se desea conocer y la de otros componentes del sistema (solventes, reactivos) que absorben también a esa longitud de onda. Estos compuestos se denominan interferencias. Se debe descartar la absorbancia de las interferencias, para ello es necesario hacer siempre una muestra que contenga todos los componentes del sistema menos aquel que se desea medir. Esta muestra se llama blanco y la absorbancia de éste debe restarse a las muestras problema y a los patrones, o bien, con el blanco se calibra el instrumento a absorbancia igual a 0, o sea 100% de transmisión.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación de la Investigación

El presente estudio de investigación se realizó en el Laboratorio de Cromatografía del Instituto de Ciencias Químicas y Ambientales de la Escuela Superior Politécnica del Litoral, ubicado en el km 30.5 vía Perimetral, Campus Gustavo Galindo en Guayaquil, Ecuador.

3.2. Materiales

3.2.1. Equipos de logística

En el laboratorio se dispone de adecuada infraestructura eléctrica (110V y 220V polarizada), equipos de muestreo, balanza analítica, estufa eléctrica, vidriería, equipos de cómputo, internet, información y personal técnico capacitado.

3.2.2. Equipos de muestreo

Para la ubicación geográfica de los puntos de muestreo se empleó el GPS Magellan Triton 2000, que dispone de una pantalla táctil a color de 2.7 pulgadas, tiene un receptor GPS Sirf Star III y compatibilidad WAAS/EGNOS lo que permite una precisión de 3 metros.

El sistema de posicionamiento global (GPS) tiene por objetivo calcular la posición de un punto cualquiera en un espacio de coordenadas (x, y, z), partiendo del cálculo de las distancias del punto a un mínimo de tres satélites cuya localización es conocida.

La obtención de muestras de un suelo se realizó empleando un barreno y una lampa, siguiendo un camino zigzagueante por los lotes de estudio.

3.2.3. Equipo de análisis

Colorímetro HACH DR 890

El colorímetro HACH DR/890 (Figura 3.1), es un fotómetro de filtro con LED (Light Emitting Diode) como fuente de luz, controlado por microprocesador, apropiado para ensayos colorimétricos en el laboratorio o en campo de aguas naturales, aguas industriales y cualquiera de sus variantes intermedias. El instrumento está precalibrado para mediciones colorimétricas comunes e incluye una útil función de calibración para métodos del usuario y para futuros métodos de HACH.



Figura 3.1. Colorímetro HACH DR/890 (Fuente: Autor)

Tabla 3.1. Especificaciones técnicas de colorímetro HACH DR/890

Características	Especificaciones
Rango de longitud de onda:	420, 520, 560, 610 nm
Ancho de banda espectral:	10 nm
Exactitud de longitud de onda:	± 1 nm
Linealidad fotométrica:	± 0,002 A (0-1 A)
Reproducibilidad fotométrica:	± 0,005 A (0-1 A)
Precisión fotométrica:	± 0,005 A@1.0 ABS nominal
Lámpara fuente:	Diodo electroluminiscente (LED)
Detector:	Fotodiodo de silicio
Modos de lectura de datos:	Concentración, absorbancia, % transmitancia
Almacenamiento de datos:	Hasta 99 valores medidos
Rango fotométrico:	0-2 A
Perdida de luz:	<1,0% a 400 nm
Rango de funcionamiento:	0 a 50 ° C
Tipo de baterías	4 Celdas alcalinas tipo AA
Peso de Instrumento	450 g (sin pilas)

Fuente: Manual Hach DR 890

En la Tabla 3.1 se presentan algunas especificaciones para el instrumento DR/890, otras características incluyen:

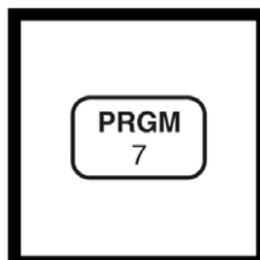
- Capacidad de más de 90 parámetros de pruebas, desde el aluminio a zinc.
- Selección automática de la longitud de onda de acuerdo a los parámetros preprogramados.
- Almacenamiento de datos y recuperación de registro de datos de campo o laboratorio.
- Conversión de los resultados a formas alternativas para muchos parámetros (por ejemplo, PO₄, P₂O₅, P).
- Temporizador de tiempo incorporado para controlar los tiempos de reacción específicos requeridos en los procedimientos de prueba.
- Salida con adaptador IR (infrarrojos) para el conector RS232 que permite la transferencia de datos del colorímetro con una impresora o un ordenador externo.
- Facilidad de ingreso de métodos por el usuario o nuevos métodos por Hach.

Procedimiento típico de empleo de Espectrofotómetro Serie DR/800

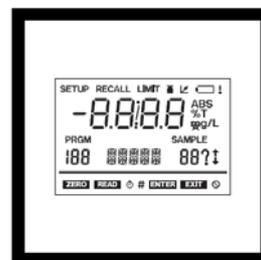
El procedimiento indicado abajo es referencial, siendo los volúmenes específicos de las muestras, los reactivos, las celdas de muestra e incluso los intervalos de tiempo, pueden variar para cada procedimiento dado, en los métodos Hach.



1. Preparar la muestra y la solución de blanco (si es necesario) para las mediciones tal como se describe en el procedimiento de prueba aplicable.



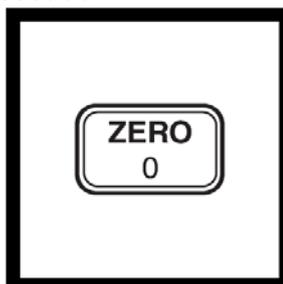
2. Presionar **PRGM**. La pantalla mostrará **PRGM ?**. Utilizando el teclado numérico, ingresar el número de programa almacenado para el parámetro deseado.



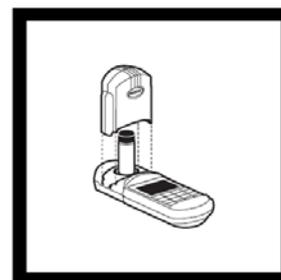
3. La pantalla mostrará las unidades de medida, el parámetro y el icono **ZERO**.



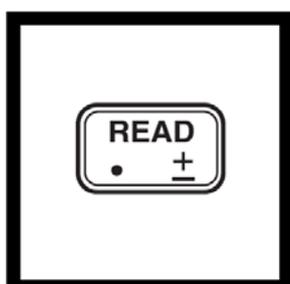
4. Colocar el blanco en el soporte de celdas. Tapar firmemente la celda de muestra con la tapa del instrumento.



5. Presionar **ZERO**. El cursor se moverá hacia la derecha y luego la pantalla mostrará un valor cero, la unidad de medida y el parámetro.



6. Colocar la muestra de prueba preparada en el soporte de celdas. Tapar firmemente la celda de muestra con la tapa del instrumento.



7. Presionar: **READ**. El cursor se moverá hacia la derecha, luego aparecerá el resultado.

3.3. Metodología

3.3.1. Localización del área de muestreo

Las áreas de estudio se encuentran ubicadas en las localidades de Nobol, Mangle y Samborondón. Las coordenadas de ubicación de los sitios muestreados corresponden a los indicados en la Tabla 3.2 en Coordenadas Geográficas UTM huso horario 17, datum WGS 84.

Tabla 3.2. Ubicación geográfica de las áreas de estudio

Sitio	Coordenadas Geográficas UTM	Descripción del sector
Recinto El Mangle	614251m E 9808821m S	Las vías de acceso corresponden a una carretera de primer orden; para llegar a la finca se debe recorrer una distancia de 2 km desde la vía principal y a 58 km vía a Daule.
Hcda La Victoria Samborondón	642428 m E 9786720 m S	Las vías de acceso corresponden a una carretera de segundo orden; para llegar a la finca se debe recorrer una distancia de 0.5 km desde la carretera principal y a 16 km partiendo de la cabecera cantonal.
Nobol	609738 m E 9787253 m S	Las vías de acceso corresponden a una carretera de primer orden; para llegar a la finca se debe recorrer una distancia de 1 km desde el cruce vial y aproximadamente a 32 km de Guayaquil.

Fuente: Investigación de campo

Los sectores seleccionados fueron elegidos bajo los siguientes criterios:

- a. Posibilidad de crecimiento y reproducción de *Azolla-Anabaena*
- b. Sectores de buena producción arroceras
- c. Distribución geográfica en el perfil ecuatoriano, (Figura 3.2).

- d. Facilidad de agua, en el caso de Samborondón y Nobol acceso a la cuenca del río Guayas con sus afluentes Daule y Babahoyo y en cuanto al Mangle disponibilidad de agua subterránea.

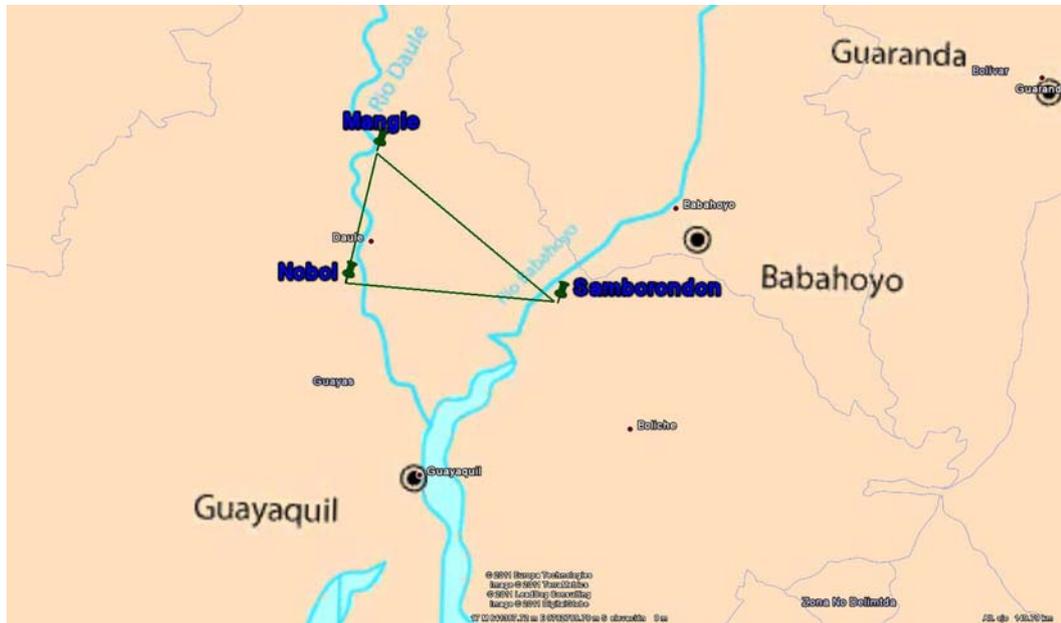


Figura 3.2. Ubicación geográfica de sitios muestreados (Fuente: Google Earth)

3.3.2. Determinación de la línea base edáfica de los sectores en estudio

Metodología de muestreo

Se efectuaron varios recorridos por los sectores de Nobol, El Mangle y Samborondón y se tomaron muestras representativas para ser posteriormente analizadas. La toma de muestras se efectuó el 6 de octubre del 2010, a profundidad de 0 a 0.20 m empleando un barreno para muestreo de suelos agrícolas y una lampa (Figura 3.3). Las muestras fueron colectadas, enfundadas e identificadas, conformando muestras de 1 kg, de las que por cuarteo se destinaron al laboratorio agrícola del Dr. Jorge Fuentes, destacado especialista, para los análisis de aguas, suelos y foliares.



Figura 3.3. Toma de muestras de suelo en sitios de estudio (Fuente: Datos de campo)

Análisis de suelos

El objeto de realizar el análisis de suelo fue determinar las condiciones del suelo inicial y la diferencia de los mismos en el ensayo a emplearse.

Las muestras de suelos para fertilidad química fueron analizadas en el Laboratorio de Análisis de Suelos del Dr. Jorge Fuentes, los métodos empleados se indican en la Tabla 3.3, lo mismo que se explican a continuación.

Tabla 3.3. Métodos empleados en la caracterización del suelo

Parámetro	Método
Análisis mecánico	Densímetro de Bouyoucos
pH	Potenciometría; relación suelo-agua y KCl 1N; 1:2,5
Conductividad Eléctrica	Método Pasta Saturada
Conductividad intercambio catiónico	Percolación Acetato de amonio
Materia Orgánica	Walkley y Black % M.O. = % C x 1,724
Nitrógeno total	Kjeldahl
Fósforo	Azul de Heteropoliácido
Potasio	Fotometría de llama
Calcio	Neutralización ácida
Magnesio	Volumétrico EDTA
Hierro, Manganeso, Zinc, Cobre	Olsen modificado

Fuente: Dr. Jorge Fuentes

a) *Textura* por el método densímetro de Bouyoucos. La textura del suelo hace referencia al tamaño de las partículas del suelo, constituido por arena (0.05 a 2 mm), limo (0.002 a 0.05 mm) y arcilla (menor de 0.002 mm). Esta propiedad determina en gran medida el comportamiento físico y químico del suelo. Este método se basa en medir la densidad de la suspensión del suelo, la cual está en función de la velocidad de sedimentación de cada una de las partículas. La textura y la estructura (arreglo de las partículas de suelo en agregados) son los dos factores que determinan el comportamiento del agua y del aire en el suelo, al afectar la forma, distribución y volumen de la fracción de poros del suelo (Koorevaar, et al., 1983).

b) *pH*: El pH es una de las mediciones más comunes e importantes en los análisis físicos de suelo, ya que controla las reacciones químicas y biológicas en él. La determinación del pH es afectada por varios factores tales como: el tipo y cantidad de constituyentes orgánicos e inorgánicos que contribuyen a la acidez del suelo, la concentración de sales, la relación suelo solución, la presión parcial del bióxido de carbono, etc. Se mide en una pasta con una relación 1:2.5 suelo-agua, utilizando la técnica potenciométrica. Con ella se determina la actividad del ión hidrógeno mediante el uso de un electrodo cuya membrana es sensible al mismo.

c) *Conductividad Eléctrica*. La medida de la conductividad de los extractos obtenidos de un suelo permite establecer una estimación aproximadamente cuantitativa de la cantidad de sales que contiene. La relación suelo-agua tiene influencia sobre la cantidad y composición de las sales extraídas, siendo necesario especificar la relación.

Para obtener la Conductividad Eléctrica del suelo en el extracto de Saturación inicialmente se prepara la pasta saturada; se extrae luego el extracto en un filtro a presión. En el extracto obtenido se lee la conductividad Eléctrica.

d) *Capacidad de intercambio catiónico (CIC) y cationes intercambiables*. Se empleó el método de acetato de amonio a pH 7 (Chapman, 1965), usando el primer filtrado para determinar la concentración de cationes intercambiables de calcio, magnesio, sodio y potasio por fotometría de emisión de llama.

e) La materia orgánica se determinó según Walkley y Black (1934); La materia orgánica tiene como principal componente al carbono, al cual acompañan numerosos elementos en proporción inferior. Es el carbono orgánico el que se determina para posteriormente calcular la materia orgánica. Se aplica la técnica volumétrica del método de Walkley y Black. Esta técnica se basa en una combustión húmeda de la materia orgánica con una mezcla de dicromato de potasio y ácido sulfúrico; valor que indica el grado de acumulación de materia orgánica en un horizonte y se utiliza para diferenciar los suelos orgánicos de los minerales.

f) *Macroelementos*. Estos elementos son esenciales para el crecimiento de las plantas, producción de frutos, entre otros procesos metabólicos, son obtenidos mayoritariamente del suelo y tienen origen mineral, salvo el nitrógeno que tiene origen orgánico o atmosférico.

Los macroelementos se dividen en dos subgrupos, en función al requerimiento de las plantas, e incluyen:

Macroelementos primarios: N (nitrógeno), P (fósforo) y K (potasio).

Macroelementos secundarios: Ca (calcio), S (azufre) y Mg (magnesio).

g) *Microelementos u oligoelementos*. Las plantas tienen poca necesidad de estos elementos, pero no quiere decir que sean menos importantes. Ellos son: B (boro), Zn (zinc), Mn (manganeso), Fe (hierro), Mo (molibdeno) y Cu (cobre). Generalmente los suelos agrícolas tienen suficiente cantidad de estos nutrientes.

Los análisis de humedad del suelo, se realizaron en el Laboratorio de Cromatografía del Instituto de Ciencias Químicas y Ambientales de la Escuela Superior Politécnica del Litoral. Para determinar la humedad del suelo las muestras se colocaron a estufa a 105°C durante 48 horas.

3.3.3. Métodos analíticos empleados en el agua

Semanalmente se realizó análisis al agua de los tratamientos como también al agua adicional, para poder estudiar la variación de las características del agua utilizada en el experimento, hasta un total de seis semanas. Los parámetros determinados incluyeron:

a) *Temperatura*

La temperatura fue determinada mediante el empleo de un termómetro digital OMRON, cuya lectura se puede visualizar en escala Celsius o Fahrenheit.

b) *pH*

Se realizó la medición a temperatura ambiente con un pH-metro EUTECH OAKTON pH 510 (Figura 3.4). El electrodo fue calibrado con disoluciones tampón de pH 4, 7 y 10 antes de realizar las medidas.

c) *Conductividad*

La medida de la conductividad se llevó a cabo a temperatura ambiente con un conductímetro portátil ORION THERMO modelo Russell (Figura 3.5). La conductividad eléctrica (CE) mide la cantidad de sales disueltas en el agua de riego.



Figura 3.4. pH-metro EUTECH OAKTON
(Fuente: Programa Azolla)

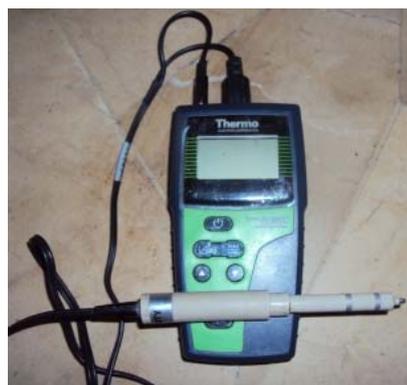


Figura 3.5. Conductímetro
THERMO

d) *Nitrógeno Amoniacal*

El amoníaco fue medido mediante una reacción de 10 mL de muestra con el reactivo Salicilato de Amonio. Posteriormente se procedió a agitar y después de un período de 3 minutos se agregó un segundo reactivo (Cianurato de Amonio), se volvió a agitar la muestra y se dejó reposar nuevamente por 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo necesario, se formó un complejo colorimétrico de color verde y se midió en un espectrofotómetro (HACH) a una longitud de onda de 620 nm. La intensidad de color fue proporcional a la concentración de amoníaco presente en la muestra, tomando como blanco 10 mL de agua destilada y agregando los mismos reactivos que a la muestra.

e) *Nitritos*

La concentración de nitritos fue medida como nitrógeno total de NO_2 . Para ello, a 10 mL de muestra se le agregó el reactivo Nitra Ver 3. Posteriormente se agitó y se dejó reposar. Después de una reacción de 15 minutos se formó un color rosa cuya intensidad era directamente proporcional a la concentración de nitritos presente en la muestra.

Después de llevada a cabo la reacción, la intensidad de color fue medida en HACH a una longitud de onda de 520 nm, el espectrofotómetro ajusta la curva de calibración automáticamente. Se tomaron 10 mL de la misma muestra sin reactivo, la cual se colocó en el aparato y se ajustó la medición a cero.

f) *Nitratos*

Para determinar el contenido de esta especie se agregó el reactivo NitraVer 5 a 10 mL de muestra. Se agitó y se esperó un período de reacción de 5 minutos. Una vez transcurrido el tiempo indicado se procedió a leer en el HACH a una longitud de onda de 520 nm, tomando como blanco 10 mL de la muestra sin reactivo.

La concentración medida es dada en $\text{mg NO}^{-3}\text{-N L}^{-1}$. El rango analítico del colorímetro para el análisis de Nitrato, de acuerdo al fabricante, 0 a $5 \text{ mg NO}^{-3}\text{-N L}^{-1}$. El análisis involucra la reducción de nitrato (NO^{-3}) a nitrito (NO^{-2}) por acción del cadmio y la subsecuente reacción de NO^{-2} con ácido sulfanilico, para dar un producto de color ámbar.

3.3.4. Organismos experimentales

Se recolectaron especies de *Azolla Caroliniana* del sector de San Gabriel Daule las cuales fueron transportadas en bolsas de plástico en condiciones adecuadas para la movilización, posteriormente se aclimataron los helechos recolectados por un par de semanas a las nuevas condiciones.

Una vez alcanzado el tamaño apropiado, se llevó a cabo la distribución del rango de tamaño y peso inicial de los helechos (0.02 a 0.03 gramos) que formarían parte del experimento.

Las muestras obtenidas de *Azolla*, se asignaron al azar a los diferentes tratamientos, sembrándose a una densidad de 3 Azollas/bandeja (Figura 3.6).



Figura 3.6. Selección, pesaje y siembra (Fuente: Investigación de campo)

Los helechos estuvieron en condiciones de temperatura, luminosidad, y humedad relativa idénticas, desde el 06 de octubre de 2010, fecha de inicio de la fase experimental hasta el 19 de noviembre de 2010 cuando los helechos coparon el espejo de agua de las bandejas.

3.3.5. Pruebas preliminares

Se realizaron pruebas iniciales para obtener posibles matrices con los cuales se trabajaría posteriormente, inoculando con un mismo número de *Azolla-Anabanena* y agua potable con los que se establecieron los ensayos indicados en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Ensayo preliminar experimental

#	Tratamiento	Referencia
1	Sin Sedimento	Fig. 3.7. a
2	Sedimento	Fig. 3.7. b
3	Carbón - sedimento	Fig. 3.7. c
4	Carbón	Fig. 3.7. d
5	Nutrientes nitrogenados	Fig. 3.7. e

Sedimento=suelo de sector agrícola

Carbón de cascarilla de arroz (Fuente: Investigación de campo)

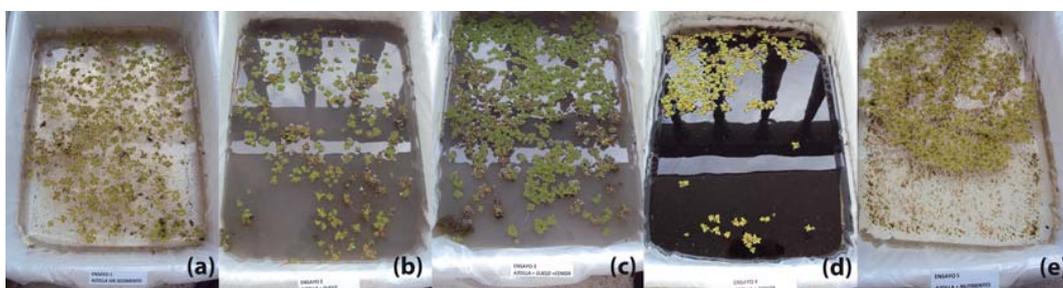


Figura 3.7. *Azolla* en ensayo preliminar **a.** Sin sustrato, **b.** Solo sustrato, **c.** Ceniza-sustrato, **d.** Ceniza, **e.** Nutrientes (Fuente: Autor)

De acuerdo a lo observado en la Figuras 3.7, se concluye mediante simple inspección visual que los ensayos a y b fueron los de mejor rendimiento, tomando en consideración color del hehecho y cantidad de biomasa.

De lo indicado se procedió a realizar las pruebas confirmativas con el ensayo sustrato, con la diferencia que en lugar de agua potable se utilizó agua propia de los sectores a estudiar, considerando que el cloro del agua potable influye en el crecimiento.

3.3.6. Unidad Experimental

El experimento de 6 semanas de duración se realizó en las instalaciones del Programa Azolla del Instituto de Ciencias Químicas y Ambientales (ICQA) de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL).

Éste se llevó a cabo en tinas de plástico con capacidad de 1.60 L, a las cuales se les agregó un recubrimiento de sedimento de los sectores agrícolas, simulando las características de las condiciones de crecimiento del *Azolla* en campo.

Se empleó el colorímetro DR890 marca HACH que mide el desarrollo del color a una longitud de onda determinado para el análisis efectuado de la solución colocada dentro de la celda. En los análisis monitoreados un volumen específico (10 mL) es agregado en las celdas con un sobre de reactivo por un tiempo de acuerdo al parámetro a analizar. La medida de la absorción es convertida a concentración usando una calibración almacenada en el equipo.

Se evaluó la reproducción del *Azolla-Anabananas* agregando 3 unidades del helecho y disponiéndolos en una bandeja de crecimiento con 2 L de agua de río. Las bandejas plásticas tienen un área de 357 cm². La altura de la columna líquida en la bandeja fue mantenida en 5 cm. El experimento se desarrolló en bandejas por triplicado, variando el sedimento con suelo de Mangle, Nobol y Samborondón. El sedimento fue analizado previamente así como el agua empleada.

Semanalmente fueron medidos parámetros de calidad de agua tales como pH, Potencial redox, Conductividad, Temperatura, nitrógeno amoniacal (NH₄⁺), nitritos (NO₂⁻), y nitratos (NO₃⁻). Para ello se utilizaron las técnicas impresas en el manual HACH DR/890 (Anexo), aprobadas por la agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (USEPA).

En el ensayo se trabajó con una tasa de recambio de agua de alrededor del 10 % diario, para compensar la evapotranspiración.

Se realizó una determinación fisiológica de un arroz cultivado con urea y Azolla para saber el rendimiento y efecto de los fertilizantes en el arroz inundado.

3.3.7. Crecimiento

Semanalmente se llevaron a cabo cálculo de área de cada tratamiento para observar el desarrollo de los organismos con respecto al tiempo, así mismo se determinó longitud de raíces.

Se decidió determinar la tasa relativa de crecimiento (TRC) y la tasa de duplicación (TD).

La tasa relativa de crecimiento se determinó mediante la fórmula (Espinoza, 2002):

$$TRC = (\ln P_2 - \ln P_1) / t$$

Donde P_1 y P_2 son el peso seco inicial y final, respectivamente, y t es el periodo de observaciones en días. Los valores son presentados en día⁻¹.

La tasa de crecimiento en términos de duplicación (TD) se calculó mediante el uso de la ecuación de Aziz *et al.* (1983):

$$TD = t / r$$

Donde t = tiempo del crecimiento de *Azolla* en días,

$$r = [\log (w_t / w_0) / 0.301]$$

w_0 y w_t son peso *Azolla* seco inicial y final.

3.3.8. Diseño Experimental

Se utilizó el diseño en bloques completos al azar o randomizados con tres repeticiones (bloques) y 9 tratamientos, en la Tabla 3.5 se resumen.

Tabla 3.5. Delineamiento Experimental

Características	
Tipo de diseño:	DBCA
Número de tratamientos:	9
Número de repeticiones en cada día:	3
Número de días del experimento:	42

Fuente: Autor, 2011

Los tratamientos fueron los establecidos en la Tabla 3.6, los mismos que tuvieron tres (3) repeticiones por tratamiento con agua.

Tabla 3.6. Matriz de tratamientos del *Azolla-Anabaena* en bandejas

Muestras	Tratamiento	Repetición	Sedimento	Matriz	Abreviatura	Simbología
1	1	1	Nobol	Sin nada	SN	T1R1
2	1	2	Nobol	Sin nada	SN	T1R2
3	1	3	Nobol	Sin nada	SN	T1R3
4	2	1	Nobol	Carbón	SN + C	T2R1
5	2	2	Nobol	Carbón	SN + C	T2R2
6	2	3	Nobol	Carbón	SN + C	T2R3
7	3	1	Nobol	Bacterias	SN + B	T3R1
8	3	2	Nobol	Bacterias	SN + B	T3R2
9	3	3	Nobol	Bacterias	SN + B	T3R3
10	4	1	El Mangle	Sin nada	SM	T4R1
11	4	2	El Mangle	Sin nada	SM	T4R2
12	4	3	El Mangle	Sin nada	SM	T4R3
13	5	1	El Mangle	Carbón	SM + C	T5R1
14	5	2	El Mangle	Carbón	SM + C	T5R2
15	5	3	El Mangle	Carbón	SM + C	T5R3
16	6	1	El Mangle	Bacterias	SM + B	T6R1
17	6	2	El Mangle	Bacterias	SM + B	T6R2
18	6	3	El Mangle	Bacterias	SM + B	T6R3
19	7	1	Samborondón	Sin nada	SS	T7R1
20	7	2	Samborondón	Sin nada	SS	T7R2
21	7	3	Samborondón	Sin nada	SS	T7R3
22	8	1	Samborondón	Carbón	SS + C	T8R1
23	8	2	Samborondón	Carbón	SS + C	T8R2
24	8	3	Samborondón	Carbón	SS + C	T8R3
25	9	1	Samborondón	Bacterias	SS + B	T9R1
26	9	2	Samborondón	Bacterias	SS + B	T9R2
27	9	3	Samborondón	Bacterias	SS + B	T9R3

Leyenda de la Tabla 3.6.

S: Sedimento; C: Carbón de cascarilla de arroz; B: Bacterias (Fuente: Investigación de campo)

El carbón se adicionó para agregar carbono al medio, siendo de 40 g por cada ensayo, estimando que ayudaría a mejorar la metabolización de los microorganismos presentes en el suelo y agua, acelerando el crecimiento del *Azolla-Anabaena*.

3.3.9. Factor de estudio experimental

En la Tabla 3.7 se presenta una breve descripción de los datos analizados.

Tabla 3.7. Factor de estudio experimental

Planteamiento del experimento:	Determinación del % N y área para seleccionar la mejor metodología.
Factores de estudio:	Concentración de Nitritos, nitratos, amonio, fosforo, pH, Conductividad
Tratamientos:	Métodos T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8 y T9
Variable de respuesta:	Observar si existe evolución en la fijación del nitrógeno (metabolitos) a través del <i>Azolla</i> , para seleccionar el mejor tratamiento para reproducción de <i>Azolla</i>
Repeticiones:	3 repeticiones 7 semanas dando un total de 21 réplicas.

Fuente: Investigación de campo

3.3.10. Estructura y croquis del diseño experimental

Los nueve tratamientos en estudio fueron asignados en Bloques completos al azar (BCA) en bandejas de plástico cada uno, dispuestos experimentalmente como se indica en Figura 3.8.

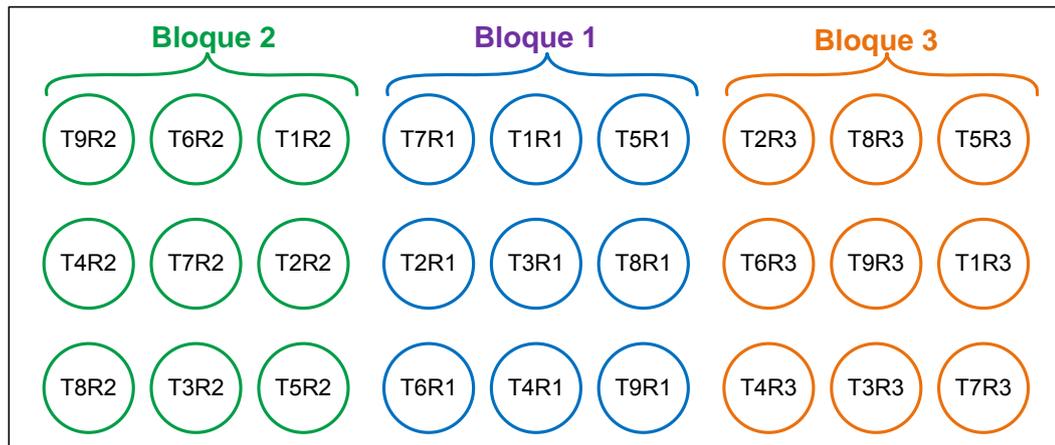


Figura 3.8. Estructura del diseño experimental bloques completos al azar con 9 tratamientos y 3 repeticiones (Fuente: Investigación de campo)

3.3.11. Análisis Estadístico

Para el tratamiento estadístico de los datos de los que constan en el presente trabajo, fue necesario el uso del programa informático; InfoStat (2011) como programa de análisis estadístico, y como hoja de cálculo, MICROSOFT EXCEL 2010 (integrado en el paquete ofimático MICROSOFT OFFICE 2010), programa necesario para la organización, gestión y presentación de los datos.

El análisis estadístico realizado constó de las siguientes fases:

Exploración estadística de las variables

Como paso previo al resto de los análisis, se realizó un análisis exploratorio de los datos de cada variable usando técnicas de estadística descriptiva, a fin de conocer el comportamiento de la población y en los que casos en los que fuera necesario una depuración de los datos de la misma.

Comprobación de la normalidad de varianzas de las variables

A continuación se verificó la hipótesis de normalidad de varianzas, para ello se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov. Esta prueba es una alternativa a la prueba de bondad de ajuste Ji-Cuadrado, preferida cuando la muestra es pequeña, la prueba de Kolmogorov es exacta aún para muestras pequeñas, mientras que la prueba Ji-Cuadrado requiere de muestras suficientemente

grande para que la distribución Ji-Cuadrado sea una buena aproximación de la distribución de la estadística de la prueba. El nivel de significación del test para aceptar la hipótesis nula establecida, fue $p \leq 0.05$.

Análisis de la varianza de una vía (ANAVA)

Una vez comprobado que los datos eran normales, se procedió a realizar los análisis de varianza (ANAVA) para verificar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos, para un nivel de probabilidad $p < 0.05$.

Test de comparación múltiple de medias

Una vez realizado el análisis de la varianza, en aquellos casos en los que se encontraron diferencias significativas, se procedió a realizar un test de comparación de medias con el objeto de analizar qué variables eran diferentes entre sí. Para ello se usó el test de Turkey

3.3.12. Planteamiento de hipótesis

Planteamos las siguientes hipótesis:

H1. La fijación del nitrógeno permitirá entender el comportamiento del *Azolla-Anabaena* frente a un cultivo inundado.

H2. Uno de los tratamientos es diferente a los demás en el rendimiento de *Azolla-Anabanena*.

H3. El crecimiento del sistema *Azolla-Anabaena* ocurre en forma exponencial en relación con el tiempo.

H4. La calidad del suelo mejora debido al empleo del helecho *Azolla*.

H5. El agua se enriquece de nitrógeno por las reacciones bioquímicas que desencadena la evolución del *Azolla-Anabaena*.

3.3.13. Nivel de significación y regla de decisión

Habiéndose escogido un nivel de significación del 5%, se aceptará la hipótesis nula si el valor de F calculado corresponde a una probabilidad inferior a dicho nivel, es decir, a $p < 0.05$; caso contrario será rechazada y se aceptará la hipótesis alterna.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La fase experimental de esta tesis comprendió la ejecución de los nueve tratamientos planteados. Los resultados de los análisis permitieron evaluar la fijación nitrogenada del *Azolla* y su transferencia al agua y al sedimento. Por su parte, los resultados del cálculo del área de crecimiento realizados en este estudio permiten establecer comparación con otros estudios de propagación. En este capítulo se presentan los resultados de la parte experimental de este proyecto.

4.1. Comparación de suelo

Como parte inicial del proceso experimental se realizaron análisis de suelo al inicio y al cierre del mismo, para evaluar la biodisposición de las especies agroquímicas del suelo por efecto de la propagación del *Azolla* cuyos resultados se indican en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1 Resultados de análisis de suelos al inicio y cierre del experimento

Condiciones		INICIAL			FINAL		
Parámetro	Unid.	Nobol	Mangle	Samborond.	Nobol	Mangle	Samborond.
Arena	%	17	12	10	7	29	6
Limo		25	35	50	30	28	40
Arcilla		58	53	40	63	43	55
Clase	-----	A	A	AL/FAL	Ap	A	A/AL
DA	gr/cm ³	1.25	1.15	1.40	1.22	1.32	1.17
pH	u.	6.65	7.20	7.20	6.45	6.83	6.42
CE 1:1	mmhos	0.88	1.15	0.88	1.43	1.07	1.15
MO	%	1.04	1.84	1.32	2.29	2.03	2.46
N		0.06	0.11	0.08	0.14	0.12	0.15
CIC	meq /	39.20	38.26	22.14	36.17	24.08	32.84
Na	100 gr	1.18	0.85	0.56	1.42	1.17	1.13
K int.		0.72	0.67	0.27	1.19	0.58	0.99

Ca	ppm	23.52	18.26	12.75	12.39	7.08	10.34
Mg		17.47	17.53	26.25	9.06	6.87	9.31
P		0.64	4.08	2.33	2.12	3.04	6.18
Fe		304.00	295.65	407.14	180.67	175.15	222.95
Mn		196.00	243.48	46.43	140.67	89.16	88.65
Zn		4.32	4.35	2.29	2.66	1.55	3.63
Cu		4.40	6.10	3.00	10.06	4.64	9.74
S		11.00	28.00	28.00	76.60	118.60	72.50

Fuente: Dr. Jorge Fuentes

Según Navas (2000), el nitrógeno de un suelo sin cepa de *Azolla*, tiende a disminuir con el tiempo. Sin embargo el contenido de N en los tratamientos en estudio tienden a aumentar, por lo que se infiere que el *Azolla* están aportando al medio parte del N fijado por la cianobacteria, *Anabaena Azollae*.

Así mismo, analizando el valor de materia orgánica en los sedimentos estudiados se puede notar que al momento de arrancar con la prueba los valores son algo menores, que después de los 42 días de haber estado en tratamiento con *Azolla*.

En el parámetro hierro los valores desciende, que puede deberse a que el *Azolla* para su reproducción necesita ciertos niveles de hierro, el cual los ha absorbido del sedimento donde se desarrolla, por ende los valores se reducen, siendo conforme con los datos de crecimiento.

Cabe anotar que al finalizar el experimento se observó coloración en las bandejas plásticas de un tono rojizo, que puede deberse a la presencia de hierro, donde la intensidad de color disminuye desde el sector de Mangle a Nobol y a Samborondón.



Figura 4.1. Recipientes de la experimentación con disposición rojiza en su fondo

4.2. Crecimiento de *Azolla*

Las *Azollas* seleccionadas se dispusieron en las bandejas de investigación, con la densidad inicial presentada en la Figura 4.2 al cubrirse de *Azolla* el espejo de agua (Figura 4.3) el experimento fue concluido.



Figura 4.2. Disposición del *Azolla* al momento de iniciar la investigación

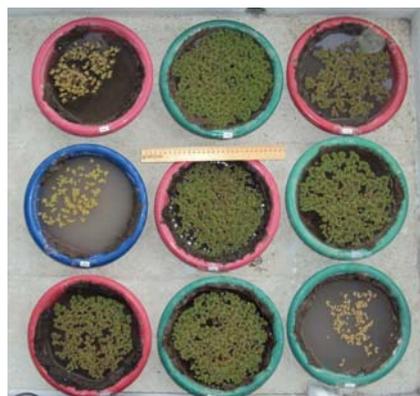


Figura 4.3. Crecimiento de *Azolla* a los 42 días

Para mayor comprensión y facilidad de explicación los nueve tratamientos estudiados se agruparon considerando las categorías: (1) Sector del sedimento (Nobol, Mangle y Samborondón) y (2) Elementos agregados (Sin nada, Carbón y Bacterias).

En la Tabla 4.2 se presentan los datos de rendimiento de *Azolla* en t/h*d, dando la matriz Mangle el menor rendimiento 0.238 t/h*d, promedio de las 9 réplicas, y Samborondón el mayor rendimiento 0.640 t/h*d.

Tabla 4.2. Rendimiento del *Azolla* en la fase experimental

Matriz	t/h*d	Mínima	Máxima
Nobol	0.506	0.358	0.563
Mangle	0.238	0.139	0.464
Samborondón	0.640	0.562	0.764
Sin nada	0.455	0.139	0.672
Carbón	0.464	0.148	0.764
Bacterias	0.464	0.187	0.616

Fuente: Investigación de campo

Los rendimientos reportados (0.640) menores a 1.2 t/h*d determinados por Montaño (2010), se explicarían por el cuidado del cultivo de *Azolla*, en contraste a la experimentación de este estudio que fue al ambiente natural, sin nutrientes y sin protección del sol.

En las Figuras 4.4 y 4.5 se observa en resumen los datos de crecimiento registrados durante el período experimental (día 0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42), para la variable área en cada tratamiento.

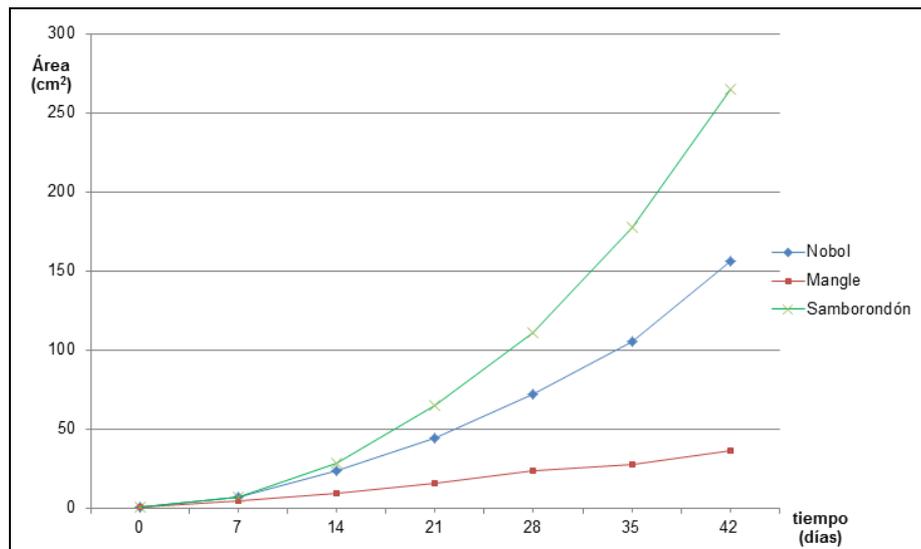


Figura 4.4. Comparación del área crecimiento de *Azolla* en los tratamientos de acuerdo a Sector del sedimento

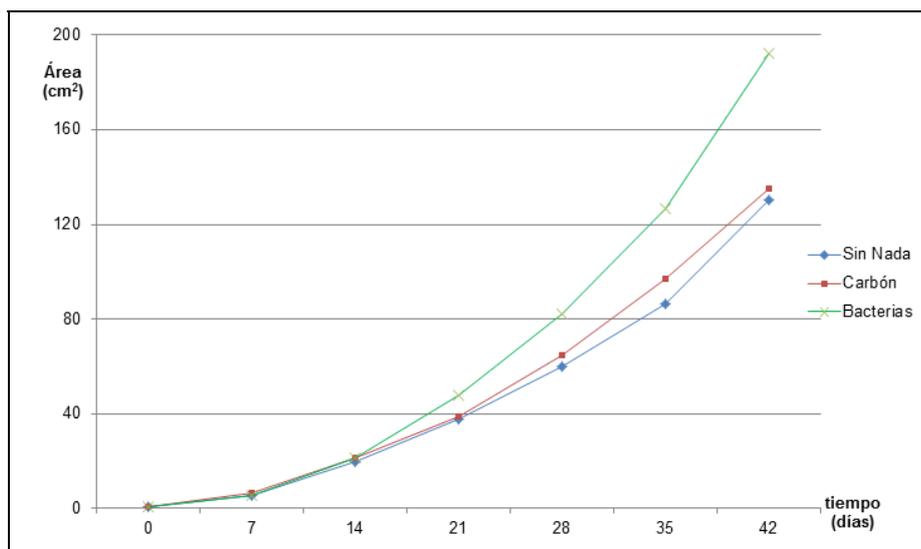


Figura 4.5. Comparación del área crecimiento de *Azolla* en los tratamientos de acuerdo a Elemento agregado

De acuerdo a la Figura 4.4, Sector del sedimento, Samborondón representa el de mayor área desarrollada y Mangle el de menor rendimiento, mientras que en la Figura 4.5, Elemento agregado, el tratamiento con bacterias es el de mayor área, dando resultados similares para el tratamiento Sin nada y Carbón.

En cuanto a los resultados de tiempo de duplicación de la biomasa reportados en la Tabla 4.3, casi todos los tratamientos de la experimentación fueron de 6 días a excepción de Mangle de 10 días, difiriendo poco de lo reportado por Espinoza (2002), de 4 días, siendo estos realizados en recipientes que contenían solución nutritiva de Hoagland y 7.5 días de Mosquera (2002) que realizó un experimento con solución similar al de Espinoza.

Tabla 4.3. Tasa relativa de crecimiento (TRC) y tiempo de duplicación (TD) de *Azolla*

Matriz	TRC(d ⁻¹)	TD (d)
Nobol	0.114	6.08
Mangle	0.063	10.92
Samborondón	0.132	5.25
Sin Nada	0.112	6.19
Carbón	0.115	6.02
Bacterias	0.120	5.77

Fuente: Investigación de campo

En la Tabla 4.4 y 4.5 se presentan los resultados obtenidos con el software estadístico InfoStat en el último período (día 42) del desarrollo del experimento.

Tabla 4.4. Estadística descriptiva del área de *Azolla-Anabaena* a los 42 días del ensayo

TRATAM	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx	Mediana
SM	AREA	3	36.67	2.98	33.9	39.83	36.28
SM + B	AREA	3	48.77	8.29	41.02	57.52	47.78
SM + C	AREA	3	24.51	0.75	23.68	25.14	24.71
SN	AREA	3	119.07	17.66	99.33	133.37	124.52
SN + B	AREA	3	216.2	14.23	199.77	224.65	224.18
SN + C	AREA	3	132.52	10.95	121.87	143.75	131.93
SS	AREA	3	234.91	23.95	220.45	262.56	221.72
SS + B	AREA	3	311.76	25.1	283.1	329.85	322.32
SS + C	AREA	3	247.67	28.91	225.23	280.29	237.48

Fuente: Investigación de campo

Tabla 4.5. Análisis estadístico con el test de Tukey de la variable área de *Azolla-Anabaena* a los 42 días del ensayo

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
AREA	27	1	0.97	12	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	262156.62	10	26215.56	78	<0.0001
BLOQUE	128.46	2	64.23	0.19	0.8279
TRATAM	262027.15	8	32753.39	97.5	<0.0001
Error	5376.05	16	336.00		
Total	267532.67	26			
Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=53.24335					
Error:	336.0031	gl: 16			
TRATAM	Medias	n	E.E.		
SS + B	311.76	3	10.58	A	
SS + C	247.67	3	10.58		B
SS	234.91	3	10.58		B
SN + B	216.20	3	10.58		B
SN + C	132.52	3	10.58		C
SN	119.07	3	10.58		C
SM + B	48.77	3	10.58		D
SM + C	24.51	3	10.58		D
SM	36.67	3	10.58		D
Medias con una letra común no son significativamente diferentes(p<= 0.05)					

Fuente: Investigación de campo

De la Tabla 4.4, y 4.5 se observa y se confirma estadísticamente que:

La media (área promedio) por tratamiento de *Azolla-Anabaena* que presentó el valor más alto corresponde al tratamiento Sedimento de Samborondón más bacterias (SS + B).

La D.E. (desviación estándar) del área de *Azolla-Anabaena* de cada tratamiento presentó la menor dispersión en el tratamiento SM + C, Sedimento de Mangle más Carbón.

El test Tukey formo 4 grupos, siendo el de mejor tratamiento el Sedimento de Samborondón más bacterias (SS + B) con un área promedio de 311.76 cm². El de peor tratamiento es el Mangle que agregando algo o sin nada esta al final de los tratamientos.

4.3. Parámetros físico-químicos

En este acápite se presenta un resumen de los parámetros ambientales pH, Conductividad, registrados durante el período experimental.

En la Figura 4.6 se muestra el comportamiento de los valores de pH del agua inicial y adicionada semanalmente por efecto de la evapotranspiración.

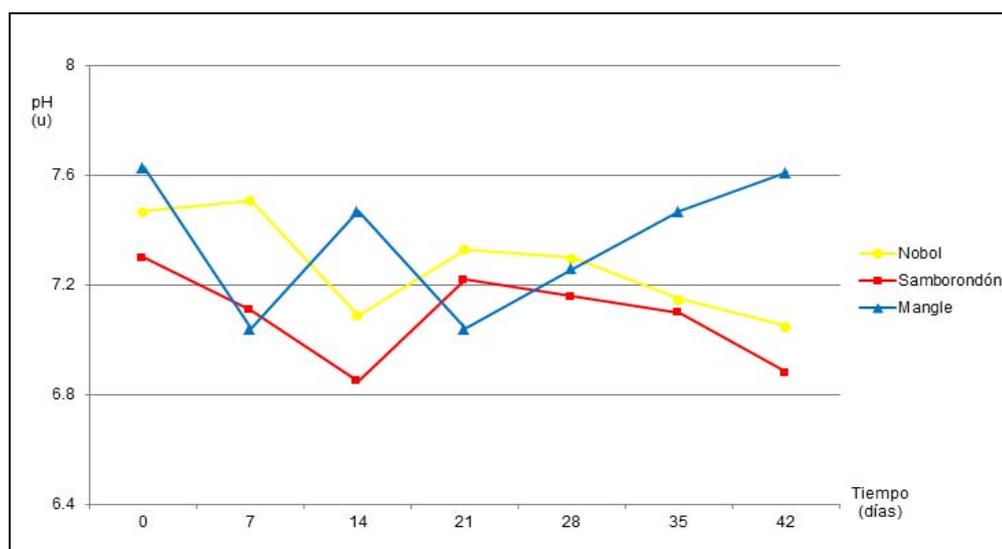


Figura 4.6. Características del pH (u) registrado en el agua agregada por efecto de la evapotranspiración en el transcurso de la investigación

En la Figuras 4.7 se observa un resumen de los datos registrados durante el período experimental (día 7, 14, 21, 28, 35 y 42), para la variable pH en cada tratamiento.

De acuerdo a las Figuras 4.6 y 4.7 los valores de pH se observa tendencia hacia arriba el agua del Sector del Mangle, tipo subterránea, en el restos del agua obtenida de ríos presenta un comportamiento parejo.

En la Figura 4.7 se observa claramente la diferencia en cuanto al valor del pH en el grupo Sector del sedimento en cambio en el grupo Elemento agregado son comunes en los tratamientos utilizados, por lo que no indica que no existe diferencias en cuanto a sustancia agregada pero si al agua empleada.

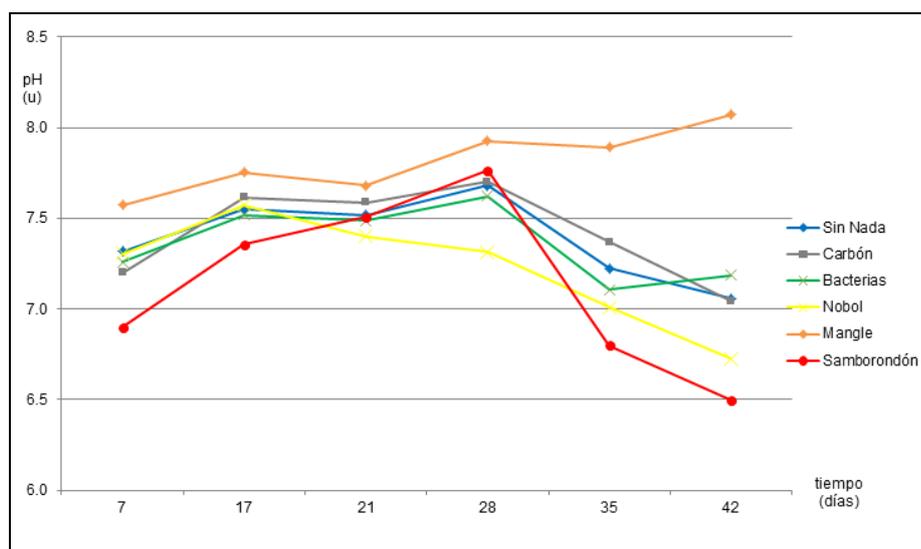


Figura 4.7. Comportamiento del pH (u) en los tratamientos de acuerdo a Sector del sedimento y Elemento agregado en el transcurso de la investigación

En la Tabla 4.6 y 4.7 se presentan los resultados obtenidos con el software estadístico InfoStat en el último período (día 42) del desarrollo del experimento.

Tabla 4.6. Estadística descriptiva pH (u) en el medio acuático a los 42 días del ensayo

TRATAM	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx	Mediana
SM	pH	3	7.97	0.74	7.17	8.64	8.09
SM + B	pH	3	8.29	0.2	8.16	8.52	8.18
SM + C	pH	3	7.96	0.36	7.68	8.37	7.83
SN	pH	3	6.75	0.21	6.52	6.93	6.8
SN + B	pH	3	6.74	0.49	6.28	7.26	6.67
SN + C	pH	3	6.69	0.31	6.39	7.01	6.67
SS	pH	3	6.46	0.31	6.18	6.79	6.42
SS + B	pH	3	6.54	0.23	6.41	6.8	6.41
SS + C	pH	3	6.49	0.25	6.27	6.76	6.43

Fuente: Investigación de campo

Tabla 4.7. Análisis estadístico con el test de Tukey de la variable pH (u) en el medio acuático a los 42 días del ensayo

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
pH	27	0.91	0.86	4.13	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1.51	10	1.45	16.9	<0.0001
BLOQUE	1.26	2	0.63	7.34	0.0055
TRATAM	13.25	8	1.66	19.3	<0.0001
Error	1.37	16	0.09		
Total	15.88	26			
Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.85063					
Error: 0.0858 gl: 16					
TRATAM	Medias	n	E.E.		
SM + B	8.29	3	0.17	A	
SM	7.97	3	0.17	A	
SM + C	7.96	3	0.17	A	
SN	6.75	3	0.17	B	
SN + B	6.74	3	0.17	B	
SN + C	6.69	3	0.17	B	
SS + B	6.54	3	0.17	B	
SS + C	6.49	3	0.17	B	
SS	6.46	3	0.17	B	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes(p<= 0.05)					

Fuente: Investigación de campo

De la Tabla 4.6, y 4.7 se observa y se confirma estadísticamente que:

La media (pH promedio) por tratamiento de *Azolla-Anabaena* que presentó el valor más alto corresponde al tratamiento Sedimento de Mangle más bacterias (SM + B).

La D.E. (desviación estándar) del pH de *Azolla-Anabaena* de cada tratamiento presentó la menor dispersión en el tratamiento SM + B, Sedimento de Mangle más bacterias, muy de cerca del Sedimento de Nobol (SN).

El test de Tukey formo 2 grupos, siendo claramente el grupo del Mangle el de mayor pH promedio. El otro grupo formado por el resto de tratamientos, en condiciones estadísticamente iguales.

En la Figura 4.8 se presenta el comportamiento de los valores Conductividad ($\mu\text{S/cm}$) del agua inicial y adicionada semanalmente por efecto de la evapotranspiración.

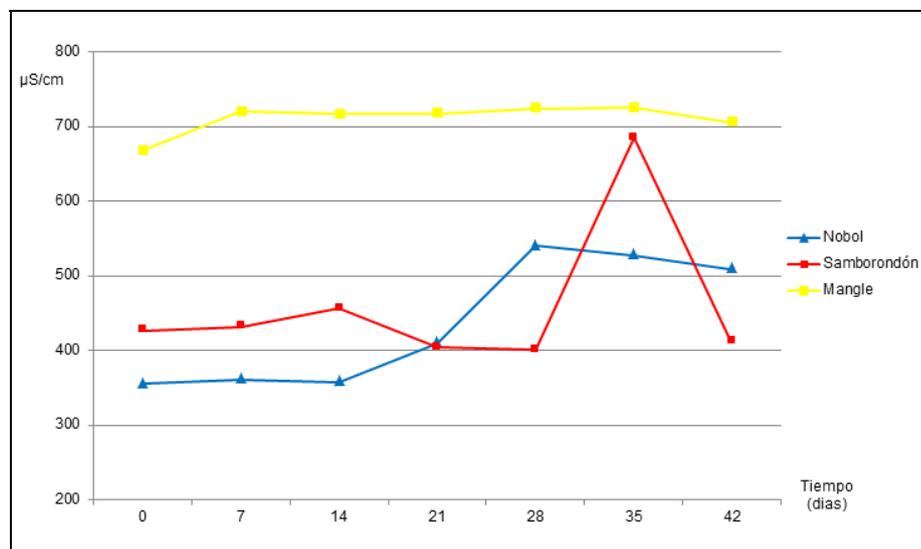


Figura 4.8. Valores de Conductividad ($\mu\text{S/cm}$) registrada en el agua agregada por efecto de la evapotranspiración en el transcurso de la investigación

En la Figuras 4.9 se observa un resumen de los datos registrados durante el período experimental (día 7, 14, 21, 28, 35 y 42), para la variable conductividad en cada tratamiento.

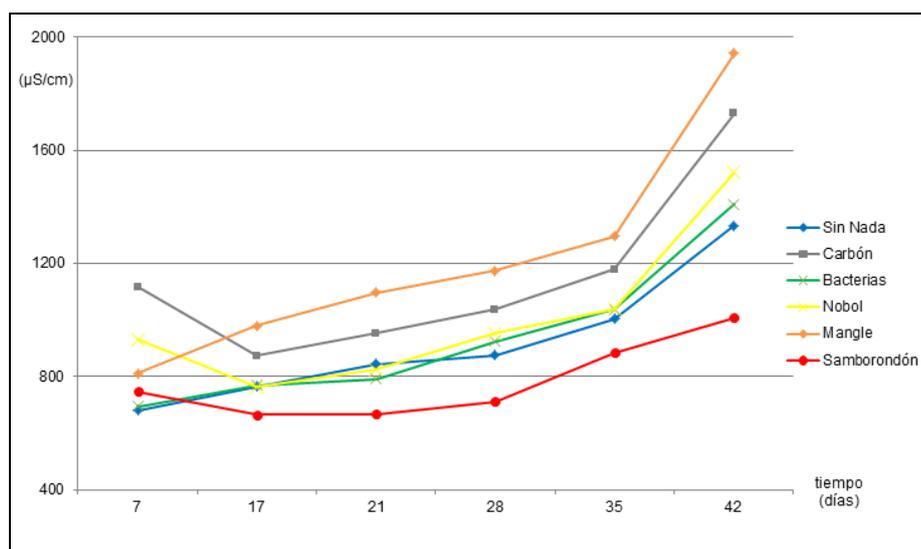


Figura 4.9. Comportamiento de la Conductividad ($\mu\text{S/cm}$) registrada en los tratamientos de acuerdo a Sector del sedimento y Elemento agregado durante el período experimental

De la Figura 4.9 Se observa un incremento en la conductividad de todos los tratamientos, el mismo que puede deberse por mayor presencia de iones; concentración, o movilidad, como también de la temperatura ambiental.

Realizando una comparativa de conductividad y pH de la Figura 4.7 y 4.9 el sector Samborondón tienen la misma tendencia, se encuentran en la parte baja de los tratamientos.

En la Tabla 4.8 y 4.9 se presentan los resultados obtenidos con el software estadístico InfoStat en el último período (día 42) del desarrollo del experimento.

Tabla 4.8. Estadística descriptiva Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$) en el medio acuático a los 42 días del ensayo

TRATAM	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx	Mediana
SM	$\mu\text{S}/\text{cm}$	3	1805.7	49.7	1749.0	1842.0	1826.0
SM + B	$\mu\text{S}/\text{cm}$	3	1810.0	195.2	1588.0	1955.0	1887.0
SM + C	$\mu\text{S}/\text{cm}$	3	2213.3	65.1	2150.0	2280.0	2210.0
SN	$\mu\text{S}/\text{cm}$	3	1502.0	23.3	1477.0	1523.0	1506.0
SN + B	$\mu\text{S}/\text{cm}$	3	1390.7	101.2	1277.0	1471.0	1424.0
SN + C	$\mu\text{S}/\text{cm}$	3	1674.7	281.7	1350.0	1854.0	1820.0
SS	$\mu\text{S}/\text{cm}$	3	862.3	112.1	740.0	960.0	887.0
SS + B	$\mu\text{S}/\text{cm}$	3	1030.3	81.3	937.0	1086.0	1068.0
SS + C	$\mu\text{S}/\text{cm}$	3	1303.0	279.7	994.0	1539.0	1376.0

Fuente: Investigación de campo

Tabla 4.9. Análisis estadístico con el test de Tukey de la variable conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$) en el medio acuático a los 42 días del ensayo

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
$\mu\text{S}/\text{cm}$	27	0.92	0.88	9.86	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4327739	10	432773.93	19.5	<0.0001
BLOQUE	109988.7	2	54994.33	2.48	0.1153
TRATAM	4217751	8	527218.83	23.8	<0.0001
Error	354765.3	16	22172.83		
Total	4682505	26			
Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=432.51					

TRATAM	Medias	n	E.E.				
SM + C	2213.33	3	85.97	A			
SM + B	1810	3	85.97	A	B		
SM	1805.67	3	85.97	A	B		
SN + C	1674.67	3	85.97		B	C	
SN	1502	3	85.97		B	C	
SN + B	1390.67	3	85.97		B	C	D
SS + C	1303	3	85.97			C	D
SS + B	1030.33	3	85.97				D E
SS	862.33	3	85.97				E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Fuente: Investigación de campo

De la Tabla 4.8, y 4.9 se observa y se confirma estadísticamente que:

La media ($\mu\text{S/cm}$ promedio) por tratamiento de *Azolla-Anabaena* que presentó el valor más alto corresponde al tratamiento Sedimento de Mangle más carbón (SM + C).

La D.E. (desviación estándar) de la conductividad del agua *Azolla-Anabaena* de cada tratamiento presentó la menor dispersión en el tratamiento SN, Sedimento de Nobol.

El test de Tukey formo varios grupos, siendo en todos los grupos el de mayor Conductividad promedio el tratamiento formado sedimento más carbón.

4.4. Fijación nitrogenada

En esta sección se presentan los datos obtenidos en la fase experimental a lo largo del ensayo con el colorímetro DR 890 para las especies iónicas del nitrógeno (NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+)

4.4.1. Evaluación del nitrógeno del nitrito

Se presenta el resumen de resultados de los análisis colorimétricos realizados tanto al agua inicial como al agua de los tratamientos. En la Figura 4.10 se presenta una muestra de la reacción del nitrógeno del nitrito después de haber reaccionado con los químicos, se realiza la lectura con el Colorímetro DR890.

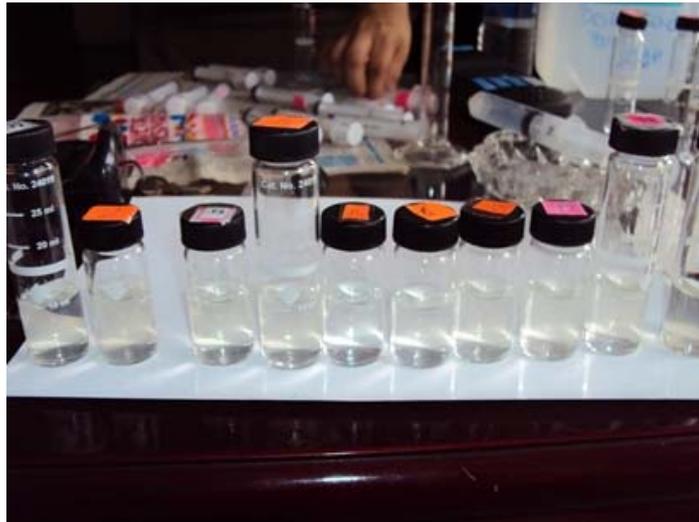


Figura 4.10. Reacción de nitritos para análisis colorimétrico

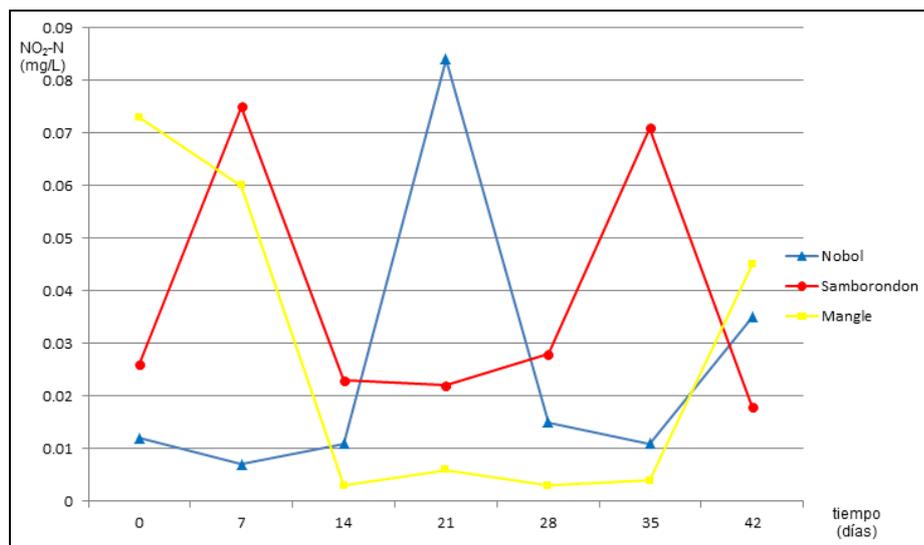


Figura 4.11. Características Nitrógeno del nitrito del agua agregada por efecto de la evapotranspiración en la investigación

En la Figuras 4.12 se observa un resumen de los datos registrados durante el período experimental (día 14, 21, 28, 35 y 42), para la variable nitrógeno del nitrito en cada tratamiento, el día 7 no se registró por falta de implementos.

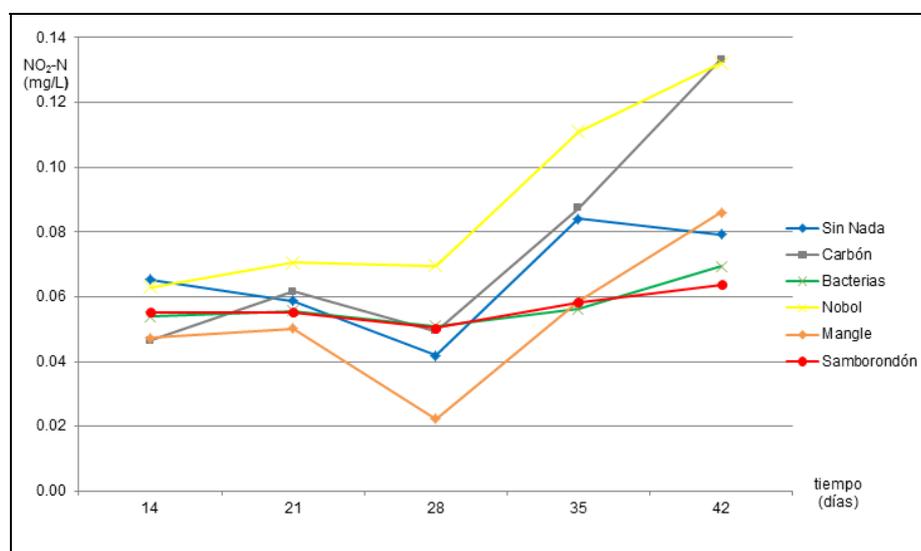


Figura 4.12. Evolución del Nitrógeno del nitrito en el medio acuático del *Azolla-Anabaena* en los tratamientos de acuerdo a Sector del sedimento y Elemento agregado durante el período experimental

Comparando la Figura 4.11 y 4.12 se observa un ligero incremento gradual del Nitrógeno del nitrito.

En la Tabla 4.10 y 4.11 se presentan los resultados obtenidos con el software estadístico InfoStat en el último período (día 42) del desarrollo del experimento.

Tabla 4.10. Estadística descriptiva del Nitrógeno del nitrito en el medio acuático a los 42 días del ensayo

TRATAM	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx	Mediana
SM	NO ₂ -N	3	0.07	0.04	0.03	0.12	0.07
SM + B	NO ₂ -N	3	0.09	0.05	0.03	0.14	0.09
SM + C	NO ₂ -N	3	0.1	0.04	0.06	0.14	0.08
SN	NO ₂ -N	3	0.17	0.05	0.14	0.23	0.14
SN + B	NO ₂ -N	3	0.07	0.03	0.05	0.11	0.05
SN + C	NO ₂ -N	3	0.19	0.01	0.18	0.2	0.19
SS	NO ₂ -N	3	0.02	0.01	0.02	0.03	0.03
SS + B	NO ₂ -N	3	0.05	0.01	0.04	0.06	0.06
SS + C	NO ₂ -N	3	0.11	0.11	0.03	0.24	0.08

Fuente: Investigación de campo

Tabla 4.11. Análisis estadístico con el test de Tukey de la variable Nitrógeno del nitrito en el medio acuático a los 42 días del ensayo

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
NO2-N	27	0.68	0.48	48.9	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.08	10	0.01	3.37	0.015
BLOQUE	0.01	2	4.20E-03	1.84	0.1908
TRATAM	0.07	8	0.01	3.75	0.0117
Error	0.04	16	2.30E-03		
Total	0.11	26			
Test:Tukey Alfa=0.05 DMS= 0.13830					
Error:	0.0023	gl: 16			
TRATAM	Medias	n	E.E.		
SN + C	0.19	3	0.03	A	
SN	0.17	3	0.03	A	
SS + C	0.11	3	0.03	A	B
SM + C	0.10	3	0.03	A	B
SM + B	0.09	3	0.03	A	B
SM	0.07	3	0.03	A	B
SN + B	0.07	3	0.03	A	B
SS + B	0.05	3	0.03	A	B
SS	0.02	3	0.03	B	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes(p<= 0.05)					

Fuente: Investigación de campo

De la Tabla 4.10, y 4.11 se observa y se confirma estadísticamente que:

La media (N-NO₂) por tratamiento de *Azolla-Anabaena* que presenta el valor más alto corresponde al tratamiento Sedimento de Nobol más carbón (SN + C).

La D.E. (desviación estándar) del N-NO₂ del agua *Azolla-Anabaena* de cada tratamiento presentó la menor dispersión el tratamiento de Sedimento de Samborondón (SS) y Sedimento de Samborondón más bacterias (SS + B).

El test de Tukey formo 3 grupos, siendo el grupo de Nobol (SN+C, SN) el de mayor media. Un grupo intermedio que no muestras diferencias significativas entre ellos, y uno al final de los tratamientos diferente al resto (SS)

4.4.2. Evaluación del nitrógeno del nitrato

Se presenta el resumen de resultados de los análisis colorimétricos realizados tanto al agua inicial como al agua de los tratamientos. En la Figura 4.13 se presenta una muestra de la reacción del nitrógeno del nitrito después de haber reaccionado con los químicos, se realiza la lectura con el Colorímetro DR890.



Figura 4.13. Reacción de nitratos para análisis colorimétrico, nótese el precipitado formado

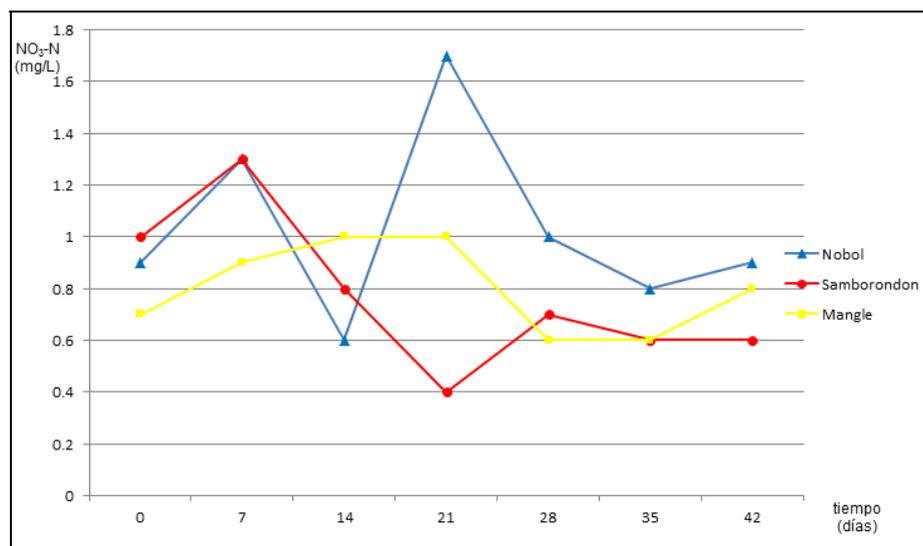


Figura 4.14. Características Nitrógeno del nitrato del agua agregada por efecto de la evapotranspiración en la investigación

En la Figuras 4.15 se observa un resumen de los datos registrados durante el período experimental (día 14, 21, 28, 35 y 42), para la variable nitrógeno del nitrato en cada tratamiento, el día 7 no se registró por falta de implementos.

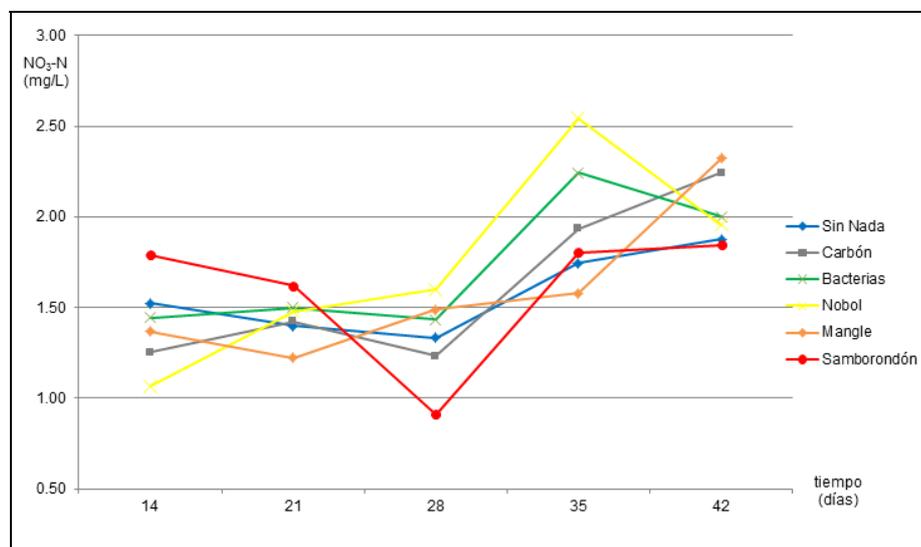


Figura 4.15. Evolución del Nitrógeno del nitrato en el medio acuático del *Azolla-Anabaena* en los tratamientos de acuerdo a Sector del sedimento y Elemento agregado durante el período experimental

En la Tabla 4.12 y 4.13 se presentan los resultados obtenidos con el software estadístico InfoStat en el último período (día 42) del desarrollo del experimento.

Tabla 4.12. Estadística descriptiva del Nitrógeno del nitrato en el medio acuático a los 42 días del ensayo

TRATAM	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx	Mediana
SM	NO3-N	3	2	0.66	1.3	2.6	2.1
SM + B	NO3-N	3	2.53	0.83	1.6	3.2	2.8
SM + C	NO3-N	3	2.43	0.93	1.4	3.2	2.7
SN	NO3-N	3	2.5	0.3	2.2	2.8	2.5
SN + B	NO3-N	3	1.67	0.4	1.3	2.1	1.6
SN + C	NO3-N	3	1.7	0.75	1	2.5	1.6
SS	NO3-N	3	1.13	0.31	0.8	1.4	1.2
SS + B	NO3-N	3	1.8	0.53	1.4	2.4	1.6
SS + C	NO3-N	3	2.6	0.69	1.8	3	3

Fuente: Investigación de campo

Tabla 4.13. Análisis estadístico con el test de Tukey de la variable Nitrógeno del nitrato en el medio acuático a los 42 días del ensayo

Análisis de la varianza						
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV		
NO ₃ -N	27	0.48	0.15	32.47		
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo	6.48	10	0.65	1.48	0.2350	
BLOQUE	0.3	2	0.15	0.35	0.7133	
TRATAM	6.18	8	0.77	1.76	0.1600	
Error	7.02	16	0.44			
Total	13.51	26				
Test: Tukey Alfa=0.05 DMS= 1.92450						
Error: 0.439 gl: 16						
TRATAM	Medias	n	E.E.			
SS + C	2.60	3	0.38	A		
SM + B	2.53	3	0.38	A		
SN	2.5	3	0.38	A		
SM + C	2.43	3	0.38	A		
SM	2.00	3	0.38	A		
SS + B	1.80	3	0.38	A		
SN + C	1.70	3	0.38	A		
SN + B	1.67	3	0.38	A		
SS	1.13	3	0.38	A		
Medias con una letra común no son significativamente diferentes(p<= 0.05)						

Fuente: Investigación de campo

De la Tabla 4.12, y 4.13 se observa y se confirma estadísticamente que:

La media (N-NO₃) por tratamiento de *Azolla-Anabaena* que presenta el valor más alto corresponde al tratamiento Sedimento de Samborondón más carbón (SS + C).

La D.E. (desviación estándar) del N-NO₃ del agua *Azolla-Anabaena* de cada tratamiento presentó la menor dispersión el tratamiento de Sedimento de Nobol (SN).

De acuerdo al test de Tukey el parámetro N-NO₃, estadísticamente no existe diferencia significativa p<= 0.05.

4.4.3. Evaluación del nitrógeno del amoniaco

Se presenta el resumen de resultados de los análisis colorimétricos realizados tanto al agua inicial como al agua de los tratamientos. En la Figura 4.16 se presenta una muestra de la reacción del nitrógeno del nitrito después de haber reaccionado con los químicos, se realiza la lectura con el Colorímetro DR890.



Figura 4.16. Reacción del amonio para análisis colorimétrico

En la Figuras 4.18 se observa un resumen de los datos registrados durante el período experimental (día 14, 21, 28, 35 y 42), para la variable nitrógeno del nitrato en cada tratamiento, el día 7 no se registró por falta de implementos.

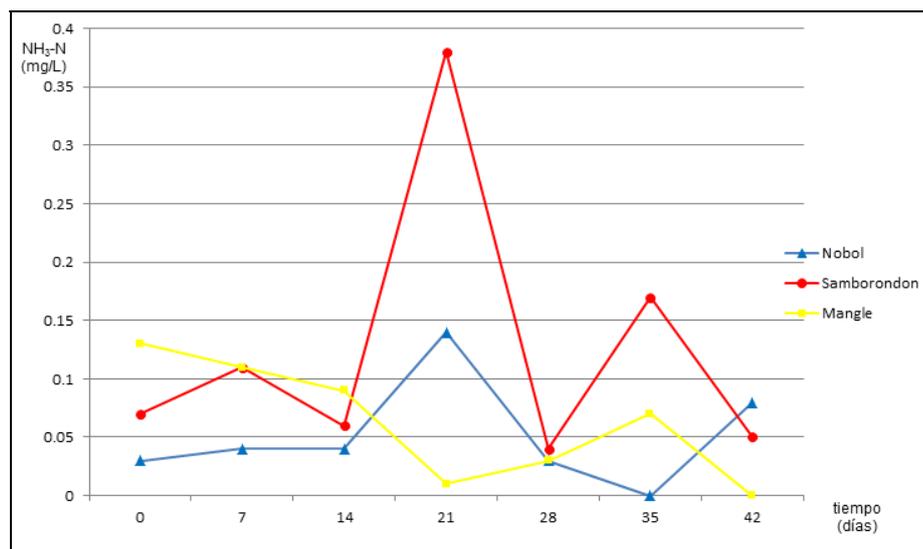


Figura 4.17. Evolución del Nitrógeno del amoniaco del agua agregada por efecto de la evapotranspiración en la investigación

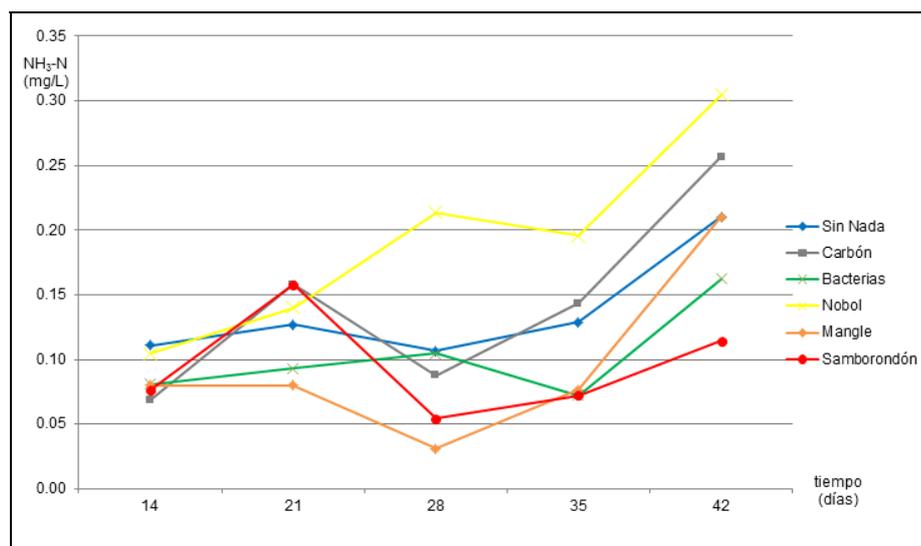


Figura 4.18. Evolución del Nitrógeno del amoníaco en el medio acuático del *Azolla-Anabaena* en los tratamientos de acuerdo a Sector del sedimento y Elemento agregado durante el período experimental

En general, la pequeña variación de la concentración de $N-NH_3$ en el agua durante del proceso de la *Azolla-Anabaena* puede atribuirse a pérdidas de amoníaco por volatilización, inmovilización del nitrógeno por la flora acuática y adsorción de $N-NH_4$ en los sitios de intercambio del suelo.

En la Tabla 4.14 y 4.15 se presentan los resultados obtenidos con el software estadístico InfoStat en el último período (día 42) del desarrollo del experimento.

Tabla 4.14. Estadística descriptiva del Nitrógeno del amoníaco en el medio acuático a los 42 días del ensayo

TRATAM	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx	Mediana
SM	NH3-N	3	0.22	0.18	0.07	0.42	0.16
SM + B	NH3-N	3	0.07	0.02	0.05	0.08	0.08
SM + C	NH3-N	3	0.34	0.19	0.14	0.51	0.38
SN	NH3-N	3	0.52	0.21	0.31	0.73	0.52
SN + B	NH3-N	3	0.33	0.26	0.05	0.56	0.38
SN + C	NH3-N	3	0.31	0.08	0.22	0.36	0.34
SS	NH3-N	3	0.14	0.11	0.01	0.21	0.20
SS + B	NH3-N	3	0.09	0.06	0.04	0.16	0.06
SS + C	NH3-N	3	0.12	0.04	0.08	0.15	0.13

Fuente: Investigación de campo

Tabla 4.15. Análisis estadístico con el test de Tukey de la variable Nitrógeno del amoníaco en el medio acuático a los 42 días del ensayo

Análisis de la varianza						
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV		
NH3-N	27	0.65	0.43	60.5		
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo	0.61	10	0.06	2.99	0.0249	
BLOQUE	0.08	2	0.04	1.89	0.1830	
TRATAM	0.54	8	0.07	3.26	0.0211	
Error	0.33	16	0.02			
Total	0.94	26				
Test: Tukey Alfa=0.05 DMS= 0.41654						
Error: 0.0206 gl: 16						
TRATAM	Medias	n	E.E.			
SN	0.52	3	0.08	A		
SM + C	0.34	3	0.08	A	B	
SN + B	0.33	3	0.08	A	B	
SN + C	0.31	3	0.08	A	B	
SM	0.22	3	0.08	A	B	
SS	0.14	3	0.08	A	B	
SS + C	0.12	3	0.08	A	B	
SS + B	0.09	3	0.08	B		
SM + B	0.07	3	0.08	B		
Medias con una letra común no son significativamente diferentes(p<= 0.05)						

Fuente: Investigación de campo

De la Tabla 4.14, y 4.15 se observa y se confirma estadísticamente que:

La media (N-NH₃) por tratamiento de *Azolla-Anabaena* que presenta el valor más alto corresponde al tratamiento Sedimento de Nobol (SN).

La D.E. (desviación estándar) del N-NH₃ del agua *Azolla-Anabaena* de cada tratamiento presentó la menor dispersión el tratamiento de Sedimento de Mangle más bacterias (SM + B).

De acuerdo al test de Tukey para el parámetro N-NH₃, formo tres grupos, dos extremos con diferencias claramente diferentes y un intermedio. El grupo de Nobol (SN+C, SN) el de mayor media. El grupo intermedio no muestras diferencias significativas. El tratamiento con la menor media el de Sedimento mangle más bacterias (SM + B).

4.5. Balance de masa del nitrógeno en el sistema experimental

El Balance del nitrógeno (BN) en el ensayo experimental se calcula en base a al sedimento de los sectores usados como sustrato, es decir Nobol, Mangle y Samborondón, en las matrices suelo, foliar y agua.

4.5.1. Balance del nitrógeno en el suelo

El balance de nitrógeno reportado es el obtenido de los cambios en Nitrógeno Total (N_t) en el suelo, considerando como entradas el Nitrógeno inicial propio del suelo, y el final aportado por el sistema *Azolla-Anabaena*, al cerrar el experimento.

Se emplea la siguiente expresión para el cálculo del nitrógeno en el suelo:

$$\frac{[N_f - N_i](g\ N)}{100\ (g\ W_s)} \times \frac{100\ (g\ W_h - H)}{100\ (g\ W_h)} \times \frac{W_h\ (g)}{1\ (g)} \times \frac{1000\ (mg)}{1\ (g)} = N_t\ (mg)$$

En la Tabla 4.16. se presentan un resumen del nitrógeno biodispuesto en el suelo en los 42 días de desarrollo del ensayo.

Tabla 4.16. Resumen del nitrógeno biodispuesto en el suelo durante el ensayo

Condiciones	Simb.	Unid.	Nobol	Mangle	Samborondón
Nitrógeno inicial	N _i	(%)	0.06	0.11	0.08
Nitrógeno final	N _f	(%)	0.14	0.12	0.15
Peso suelo húmedo	W _h	(g)	782.00	781.50	782.20
Humedad	H	(%)	42.38	25.66	45.03
Nitrógeno Total	N _t	(mg)	360.47	58.09	300.98

Fuente: Investigación de campo

4.5.2. Balance del nitrógeno foliar

Los helechos fueron analizados para determinar la cantidad de nitrógeno fijado.

El BN fue la diferencia entre la masa inicial y la final, considerando el % de nitrógeno total final para ambos.

Se emplea la siguiente expresión para el cálculo del nitrógeno foliar del *Azolla-Anabaena* obtenida en el ensayo:

$$[W_f - W_i](g) \times \frac{N_f (g N)}{100 (g A_s)} \times \frac{10 (g A_s)}{100 (g A_h)} \times \frac{1000 (mg)}{1 (g)} = N_t (mg)$$

En la Tabla 4.17 se presentan los resultados del nitrógeno foliar del *Azolla-Anabaena*.

Tabla 4.17. Resumen del nitrógeno foliar fijado durante el ensayo

Condiciones	Simb.	Unid.	Nobol	Mangle	Samborondón
Nitrógeno foliar	N _f	(%)	2.20	2.00	2.30
Peso inicial H	W _i	(g)	0.03	0.03	0.03
Peso final H	W _f	(g)	33.02	3.96	70.76
Humedad	H	(%)	90%	90%	90%
Nitrógeno Total	N _t	(mg)	72.58	7.86	162.68

Fuente: Investigación de campo

4.5.3. Balance del nitrógeno acuático

De los datos presentados, no se puede establecer con certeza la disposición del nitrógeno específica realizado por el Sistema *Azolla-Anabaena* en el medio acuífero, considerando además que al haber otro medio como el sedimento que este también influenciando el comportamiento de los especies iónicas nitrogenadas.

En este punto realizaremos un balance considerando como entradas el Nitrógeno inicial del agua, y así mismo el final, en este sentido sumaremos los valores de las tres especies iónicas estudiadas (NH₄⁺, NO₂⁻, NO₃⁻) en el medio acuático, como Nitrógeno Total. El Nitrógeno orgánico se considerará inexistente.

Se emplea la siguiente expresión para el cálculo del nitrógeno total en el agua:

$$\frac{N_i(\text{mg})}{L} \times V_i(\text{L}) - \frac{N_i(\text{mg})}{L} \times V_i(\text{L}) - \frac{N_7(\text{mg})}{L} \times V_7(\text{L}) - \frac{N_{\dots}(\text{mg})}{L} \times V_{\dots}(\text{L}) = N_t(\text{mg})$$

En la Tabla 4.18 se indica la calidad del agua inicial, final y agregada promedio para cada uno de los tratamientos

Tabla 4.18. Calidad del agua nitrogenada empleada en todas las fases del experimento

Condiciones	Simb.	Unid.	Nobol	Mangle	Samborondón
Nitrógeno inicial	N _g	(mg/L)	0.942	0.903	1.096
Nitrógeno día 7	N ₇	(mg/L)	1.347	1.070	1.485
Nitrógeno día 14	N ₁₄	(mg/L)	0.651	1.093	0.883
Nitrógeno día 21	N ₂₁	(mg/L)	1.924	1.016	0.802
Nitrógeno día 28	N ₂₈	(mg/L)	1.045	0.633	0.768
Nitrógeno día 35	N ₃₅	(mg/L)	0.811	0.674	0.841
Nitrógeno Final	N _f	(mg/L)	3.18	2.02	2.62
Volumen inicial H	V _i	(L)	1.60	1.60	1.60
Volumen día 7	V ₇	(L)	1.20	1.20	1.20
Volumen día 14	V ₁₄	(L)	1.20	1.20	1.20
Volumen día 21	V ₂₁	(L)	1.00	1.00	1.00
Volumen día 28	V ₂₈	(L)	0.90	0.90	0.90
Volumen día 35	V ₃₅	(L)	0.50	0.50	0.50
Volumen final	V _f	(L)	1.50	1.50	1.50
Nitrógeno Total	N _t	(mg)	-4.145	-1.191	-2.579

Fuente: Investigación de campo

El nitrógeno negativo es debido que al adicionar agua por asunto de la evapotranspiración también se arrastraban iones nitrogenados que se asumen que han sido transferidos al suelo.

Se realiza el balance global del sistema empleado de acuerdo a la expresión:

$$\text{Nitrógeno Total fijado por el } Azolla = N_{\text{suelo}} + N_{\text{foliar}} + N_{\text{agua}}$$

En la tabla 4.19 se presenta el resumen del nitrógeno total fijado para cada matriz (suelo, foliar y agua), en los 42 días de iniciado la experimentación.

Tabla 4. 19. Balance global del Nitrógeno total fijado en los 42 días de desarrollo del estudio

Matriz\Sector	Nobol (mg)	Mangle(mg)	Samborondón (mg)
Suelo	360.47	58.09	300.98
Foliar	72.58	7.86	162.68
Agua	-4.145	-1.191	-2.579
Nitrógeno Total	428.9	64.76	461.08
Área (cm ²)	357	357	357
Días (d)	42	42	42
Nitrógeno fijado (kg N / h*d)	2.86	0.43	3.07

(Fuente: Investigación de campo)

Se llega a definir que el *Azolla-Anabaena* fija 3.07 kg N /h*d en el tratamiento con sedimento de Samborondón seguido de Nobol 2.86 kg N /h*d, por lo que se puede indicar sin problemas que el promedio es de 3.0 kg N /h*d, exceptuando el sector del Mangle cuyo resultado queda lejos de los otros sectores.

4.6. Ensayo práctico de fertilización orgánica y tradicional en el arroz (*Oryza sativa*)

Se realizó determinación fisiológica a tres muestras de arroz fertilizado con *Azolla* fresca y otra con urea en lotes de Mangle y Samborondón, de acuerdo a las partes indicadas en la Figura 4.19.

Al evaluar los cambios fisiológicos que ocurren en los granos de arroz (*Oryza sativa*), pueden obtenerse diferencias en el rendimiento, al usar diferente fertilizantes.

Las parcelas fueron cultivadas con los demás fertilizantes agrícolas, fosforo y potasio.

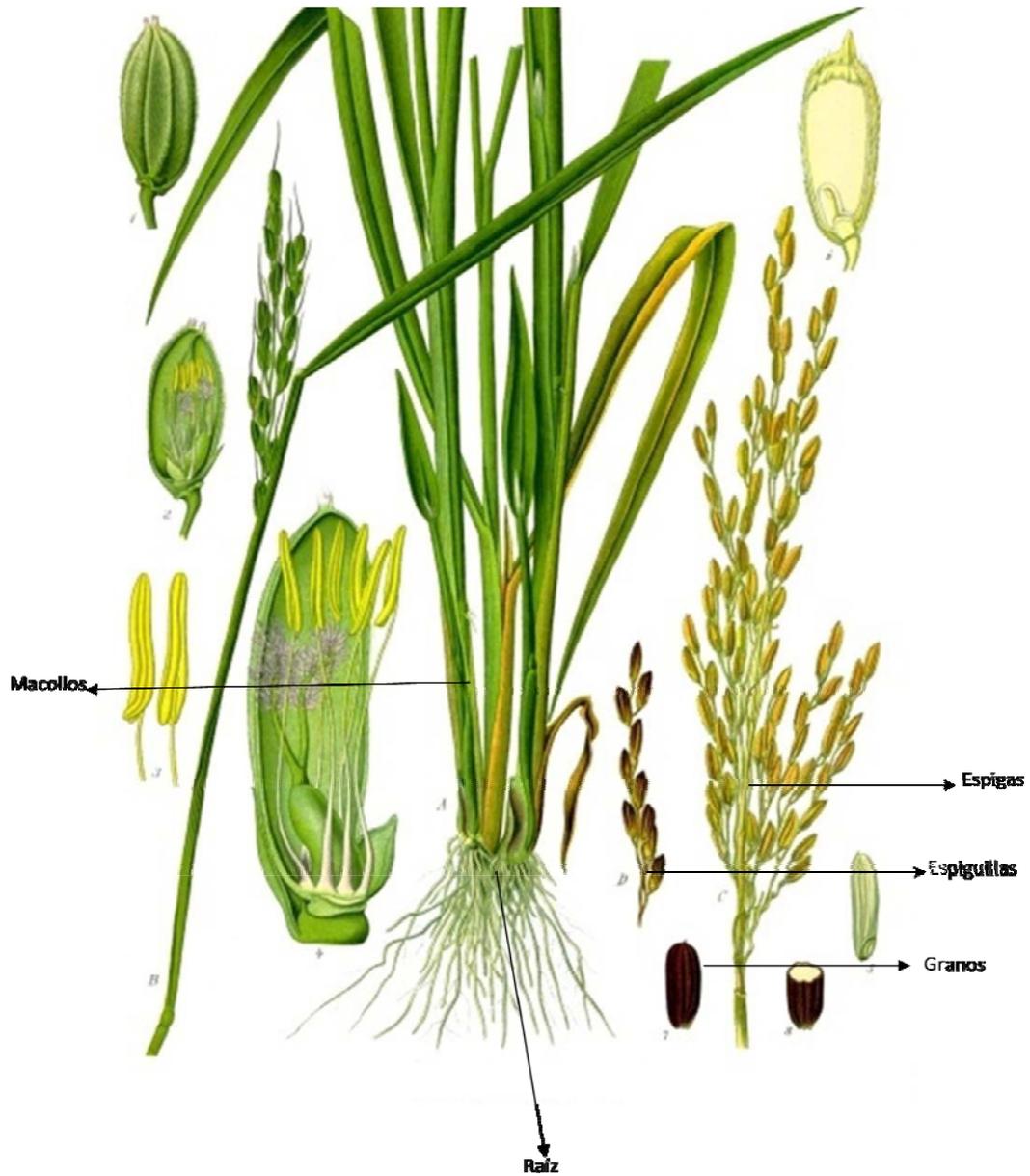


Figura 4.19. Identificación de las partes principales en la planta de *Oryza sativa*

La producción de arroz fertilizado con *Azolla* en Mangle fue 4.37 t/h y Samborondón 4.76 t/h, y 4.93 y 5.21 t/h, en el fertilizado con urea. Comparándolos con la media de cosecha nacional de 3.92 t/h en arroz paddy y al promedio de cosecha mundial (4.17 t/h) en el año 2010, el arroz cosechado con *Azolla* presenta un aumento por lote cosechado, aun cuando en sus producciones con urea son menores.

En las Tablas 4.20 y 4.21 se presentan los resultados de las determinaciones fisiológicas realizadas durante el invierno del 2011 en los sectores de Mangle y Samborondón.

Tabla 4.20. Variedad de arroz INIAP 14 producción el Mangle

Fertilizante	Peso total (g)	Largo planta (cm)	Macollo (u)	Espiga (u)	Espiguilla (u)	Grano (u)	AP (g)	PA (g)	AP (%)	PA (%)
Urea	84	80	23	23	390	1777	40	44	47.62	52.38
Azolla	103	83	35	31	386	1875	55	47	52.82	47.18

AP = Arroz paddy, PA = Panca (Fuente: Investigación de campo)

Tabla 4.21. Variedad de arroz SGO-667 (Capirona) producción Samborondón

Fertilizante	Peso total (g)	Largo planta (cm)	Macollo (u)	Espiga (u)	Espiguilla (u)	Grano (u)	AP (g)	PA (g)	AP (%)	PA (%)
Urea	296	122	25	23	612	2433	92	204	31.08	68.92
Azolla	119	92	15	15	316	1954	56	63	47.56	52.44

AP = Arroz paddy, PA = Panca (Fuente: Investigación de campo)

De acuerdo a los datos de las tablas 4.20 y 4.21, los arrozales con urea presentan pancas con mayor volumen (60%), contrariamente el porcentaje en pesos de los granos de arroz que disminuye (40%); mientras que el arrozal cultivado con el sistema *Azolla-Anabaena* el porcentaje en peso de los granos es mayor (50.2%) siendo menor en las pancas (49.8%).

Por lo que se considera que la urea es rápidamente asimilada por los macollos de la planta, por lo que presenta mayor porcentaje en la panca, y el nitrógeno del *Azolla* es más lento permitiendo una mejor absorción en la planta y distribución en el grano de arroz.

V. CONCLUSIONES RECOMENDACIONES

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Del estudio se desprende que de los sectores estudiados, el de Mangle presenta el de menor rendimiento en crecimiento y obtención de nitrógeno en condiciones naturales, el cual puede deberse a la calidad de agua y a lo mejor en cuanto a disponibilidad de hierro que en estudios requiere la *Azolla* para una mejor reproducción. Mejorando su ambiente en fósforo y hierro podría esperarse mejores resultados.

El sistema *Azolla-Anabanea* en los tratamientos de Samborondón y Nobol fijo 3.0 kg N /h*d que son sectores agrícolas por excelencia, siendo el tiempo de duplicación de *Azolla* alrededor de 6 días sin necesidad de agregar compuestos fosforados.

Continuar usando al helecho, no solo como pienso, sino también usarlo en la preparación de abonos, por la rápida propagación y composición nitrogenada que presenta, tomando en consideración el continuo aumento de costos en los fertilizantes nitrogenados y la necesidad de aplicar una agricultura orgánica, conduciendo una mejora en el ambiente.

El porcentaje en peso es mayor en los granos de arroz fertilizados con *Azolla-Anabaena* (50.2%) en comparación del 40.2% en el cultivado con urea, contrariamente a la distribución en la panca, siendo 60% en el sembrado con urea y 49.8% en el plantado con *Azolla*, lo que da a entender que el nitrógeno artificial va directamente a la panca de arroz siendo en realidad un desperdicio para el agricultor.

De acuerdo a los resultados presentados, el agua donde se desarrolla el *Azolla-Anabaena* puede ser utilizado en la mezcla de aplicaciones foliares, por el enriquecimiento del medio.

5.2. Recomendaciones

Desarrollar investigación sobre la capacidad del *Azolla-Anabaena* de absorber metales pesados, como cadmio, níquel, cromo entre otros, que sería de gran utilidad en el tratamiento de residuos industriales.

Realizar un nuevo ensayo, empleado agua destilada en la que se agregue nutrientes únicamente en base de fósforo y potasio, sin utilizar sustrato y evaluar nuevamente la fijación del *Azolla* en esta condición, siendo que al parecer el suelo absorbe más rápido el nitrógeno de lo que el *Azolla-Anabaena* fija.

Tener precaución en el descenso del nivel de agua, debido a la evapotranspiración, que las *Azolla-Anabaena* no queden pegadas al recipiente, lo cual conduciría a la muerte del helecho.

Al agregar el contenido de sobres de reactivos para el análisis, sacudirlos bien para que no quede reactivo en los mismos, y a su vez en errores de medición.

Continuar con la aplicación de *Azolla-Anabaena* en los cultivos de arroz, por la facilidad de sombra y agua que presentan al *Azolla*, tradicionalmente cultivados en suelos inundados, representando un beneficio al agricultor, al medioambiente y al consumidor.

Así también emplear el helecho en la fertilización de cultivos orgánicos, sea en forma fresca o en seco, por la fijación nitrogenada que desarrolla, como por su fácil propagación natural.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAPÍTULO VI

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZIZ, T. AND WATANABE, I., 1983. Influence of nutrients on the growth and mineral composition of *Azolla pinnata*. *Bangladesh J. Bot.*, 12 (2): 166-170.

ANDERSSON, K.K, HOOPER, A.B., 1983. O₂ and H₂O are each the source of one O in NO₂ produced from NH₃ by *Nitrosomonas*:N evidence. *FEBS Letters* 164, 236-240.

AYANS J.E., 1975. Salt Transport in Irrigated Soils, Ph.D. Dissertation, Colorado State University., USA.

BOZIMOWSK D., ARTISS J.D. AND ZAK B., 1983. Spectrophotometric comparison of several reactions used for cerebrospinal fluid protein determinations. *Microchemical Journal*.

CASTILLO Y CÁRDENAS, 1990 "Biología molecular de la fijación simbiótica del nitrógeno. Perspectivas biotecnológicas". Universidad de Córdoba.

CARRAPICO, 2010. *Azolla* as a superorganism. its implication in Symbiotic Studies, University of Lisbon. Centre for Environmental Biology, Lisboa, Portugal

Cox P. A., 1995. *The Elements on Earth: Inorganic Chemistry in the Environment*. Oxford University Press, Oxford.

ESPINOZA, Y. y GUTIERREZ, R., 2003. Variabilidad intraespecifica de *Azolla* filiculoides, colectadas en la zona centro-occidental de Venezuela. *Rev. Fac. Agron.* [online]., vol.20, no.2 [citado 04 Agosto 2011], p.156-167.

FAURE G. AND MENSING T. M., 2005. *Isotopes Principles and Applications*. Third Edition, John Wiley & Sons Inc. New Jersey.

GUERRERO SOFÍA, MONTAÑO MARIANO, FERNÁNDEZ EDUARDO, CARRAPIÇO FRANCISCO, 2009. *Azolla Caroliniana* en el nanoambiente, ESPOL, Guayaquil (No publicado).

HABER-SCHAIM, 1977 *Curso de introducción a las ciencias físicas*. Edición Tercera. Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey.

HOLLOCHER, T.C., TATE, M.E., NICHOLAS, D., 1981. Oxidation of ammonia by *Nitrosomonas europaea*. Definitive O tracer evidence that hydroxylamine formation involves a monooxygenase. *Journal of Biological Chemistry* 256.

HOLLOCHER, 1984 Heterotrophic nitrification among denitrifiers. *Applied and Environmental Microbiology*, and *Environmental Microbiology*.

INFOSTAT, 2011. Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.

GILPIN, 2006. Gilpin L. 2006. The Environment. The nitrogen cycle. Disponible en www.lifesciences.napier.ac.uk/teaching/env/index.html . [Consultado el 20 de junio 2011].

JORGENSEN PETER M. Y LEÓN-YANEZ SUSANA, 1999. Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador, NHBS Mailorder Bookstore UK, Missouri BG, USA.

KEENEY D.R., WALSH L.W., 1972. Available Nitrogen in rural ecosystems. Sources and fate. Hortscience., Vol. 7, No. 3.

KIRK AND OTHMER, 2000. Enciclopedia de Tecnología Química Tomo 2 Fourth Edition. Wiley , New York.

KUMAR S., NICHOLAS D. J. D., WILLIAMS E. H., 1983. Definite ^{15}N NMR evidence that water serves as source of 'O' during nitrite oxidation by *Nitrobacter agilis*. FEBS Letters 152,71-74.

KÜPPERS, H., 2002. Fundamentos de la teoría de los colores. España: Editorial Gustavo Gili. (ISBN 986-887-203-2).

KUZNETSOV S.I., 1970. Microflora of Lakes and their Geochemical Activities. Leningrad , Izdatel' Stvo Naudaka, p. 440.

LUMPKIN T. A., AND WATANABE I., 1989. Classification of *Azolla* spp., section *Azolla*. Euphytica 43: 223--232.

LUMPKIN, T.A., 1991. *Azolla*: morfología de la simbiosis. Departamento de microbiología, IRRI.

LUMPKIN T.A., 1993 *Azollaceae* Wettstein. Editorial Committee, eds. Flora of North America. Vol 2. Oxford Pages 338–342 University Press, New York.

MONTAÑO ARMIJOS. M., 2004. Aplicación de la simbiosis diazotrófica entre *Azolla* y *Anabaena* como abono verde para el cultivo del arroz en el litoral ecuatoriano, Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Ministerio de agricultura y ganadería/Programa de Modernización de los Servicios Agropecuarios (MAG/PROMSA), Quito.).

MONTAÑO ARMIJOS. M, 2008. Converting Rice Fields into Green Fertilizer Factories, 2008 GLOBAL DEVELOPMENT MARKETPLACE SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR DEVELOPMENT, Banco Mundial, Washington.

MONTAÑO ARMIJOS. M, 2010a. *Azolla* en el mejoramiento de la salud, la economía y el medioambiente. (ESPOL). Disponible en <http://www.dspace.espol.edu.ec>. [Consultado el 30 de julio 2011].

MONTAÑO ARMIJOS. M, 2010b. Desarrollo del recurso Azolla Anabaena y aplicaciones en los sectores agrícola, pecuario, y acuícola, Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)-Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT), Quito.

MOSQUERA J., CALDERÓN A., 2002. Evaluación de parámetros bioquímicos y morfogenéticos en la simbiosis Azolla Filiculoides – Anabaena Azollae como respuesta a la interacción de la calidad de luz y dos niveles de nitrógeno. Ecología Aplicada, diciembre, año/vol. 1, número 001 Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.pp. 89-94.

OAKS, A. (1994) Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. Can. J. Bot. 72.

OLIVARES J., 2008. Fijación Biológica de Nitrógeno. Disponible en <http://www.eez.csic.es/~olivares/ciencia/fijacion/nitrogenasa.html>. [Consultado el 20 de junio 2011].

PETERS G.A., & MAYNE B.C., 1974 The Azolla-Anabaena azollae relationship.I. Initial characterization of the association. Plant Physiol 53: 813-819.

PETERS G.A., 1983 The Azolla-Anabaena relationship Plant. Phys. Elsevier. Holanda.

PETERS, G.A., 1985. Aspects of nitrogen and carbon interchange in the Azolla-Anabaena symbiosis. Elsevier Sc. Publ.

PETERS, G.A. & MEEKS, J.C., 1989. The Azolla-Anabaena symbiosis: basic biology. En: Annu. Rev. Plant physiology. Plant Mol. Biol. Annual reviews Inc. Richmond, USA.

POTTER, N., 1970. La ciencia de los Alimentos. Edutex, México D.F.

SAUNDERS & FOWLER, 1992. The supraspecific taxonomy and evolution of the fern genus Azolla (Azollaceae). Plant Systematics and Evolution 184: 175-193.

SAWYER C.N., MCCARTY P.L. AND PARKIN G.F., 1994. Chemistry for Environmental Engineering.(Fourth Edition). McGraw-Hill, New York.

SEVILLANO, F., SUBRAMANIAN, P. & RODRIGUEZ-BARRUECO, C., 1984. La asociación simbiótica fijadora de nitrógeno atmosférico Azolla-Anabaena. An CEBA Vol. II.

SMIL V. 2000. Feeding the World: A Challenge for the Twenty-First century. MIT Press, Cambridge, MA.

SPRENT, J.I., 1979. The biology of nitrogen fixing organisms. Mac-Graw-Hill, London.

SPRENT J. Y SPRENT P., 1990 Sprent J. y Sprent P., 1990 Nitrogen fixing organisms: pure and applied aspects. 1990 pp. Chapman and Hall Ltd., London.

SVENSON, H. K. 1944. The new world species of Azolla. Amer. Fern J. 34, 69-84.

STEVENSON, F.J., 1986. The nitrogen cycle in soil: Global and ecological aspects. en: Cycles of soil: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients. New York. John Wiley & Sons, Inc.

TAIZ, L. AND ZEIGER, E. 2006. Plant Physiology. Tercera Edición. Volumen 1 Sinauer Associates, Inc., Publishers.

WATANABE I., 2000. Biological Nitrogen Fixation and its Use in Agriculture, JICA, Cantho University.

WATANABE, I., 1982. Azolla-Anabaena symbiosis – Its physiology and use in tropical agriculture. In: microbiology of tropical soils and plant productivity (eds.) Y.R. Dommergues and H.G. Dlem, Dr. W. Junk publishers, London.

CAPÍTULO VI

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

INFOSTAT, 2011. Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.

CARRAPICO, 2010. Azolla as a superorganism. its implication in Symbiotic Studies, University of Lisbon. Centre for Environmental Biology, Lisboa, Portugal.

MONTAÑO ARMIJOS. M, 2010a. Azolla en el mejoramiento de la salud, la economía y el medioambiente. (ESPOL). Disponible en <http://www.dspace.espol.edu.ec>. [Consultado el 30 de julio 2011].

MONTAÑO ARMIJOS. M, 2010b. Desarrollo del recurso Azolla Anabaena y aplicaciones en los sectores agrícola, pecuario, y acuícola, Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)-Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT), Quito.

GUERRERO SOFÍA, MONTAÑO MARIANO, FERNÁNDEZ EDUARDO, CARRAPIÇO FRANCISCO, 2009. Azolla Caroliniana en el nanoambiente, ESPOL, Guayaquil (No publicado).

OLIVARES J., 2008. Fijación Biológica de Nitrógeno. Disponible en <http://www.eez.csic.es/~olivares/ciencia/fijacion/nitrogenasa.html>. [Consultado el 20 de junio 2011].

MONTAÑO ARMIJOS. M, 2008. Converting Rice Fields into Green Fertilizer Factories, 2008 GLOBAL DEVELOPMENT MARKETPLACE SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR DEVELOPMENT, Banco Mundial, Washington.

GILPIN, 2006. Gilpin L. 2006. The Environment. The nitrogen cycle. Disponible en www.lifesciences.napier.ac.uk/teaching/env/index.html . [Consultado el 20 de junio 2011].

TAIZ, L. AND ZEIGER, E. 2006. Plant Physiology. Tercera Edición.Volumen 1 Sinauer Associates, Inc., Publishers.

FAURE G. AND MENSING T. M., 2005. Isotopes Principles and Applications. Third Edition, John Wiley & Sons Inc. New Jersey.

MONTAÑO ARMIJOS. M., 2004. Aplicación de la simbiosis diazotrófica entre Azolla y Anabaena como abono verde para el cultivo del arroz en el litoral ecuatoriano, Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Ministerio de agricultura y ganadería/Programa de Modernización de los Servicios Agropecuarios (MAG/PROMSA), Quito.).

ESPINOZA, Y. y GUTIERREZ, R., 2003. Variabilidad intraespecifica de *Azolla filiculoides*, colectadas en la zona centro-occidental de Venezuela. Rev. Fac. Agron. [online]., vol.20, no.2 [citado 04 Agosto 2011], p.156-167.

KÜPPERS, H., 2002. Fundamentos de la teoría de los colores. España: Editorial Gustavo Gili. (ISBN 986-887-203-2).

MOSQUERA J., CALDERÓN A., 2002. Evaluación de parámetros bioquímicos y morfogenéticos en la simbiosis *Azolla Filiculoides* – *Anabaena Azollae* como respuesta a la interacción de la calidad de luz y dos niveles de nitrógeno. Ecología Aplicada, diciembre, año/vol. 1, número 001 Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.pp. 89-94.

KIRK AND OTHMER, 2000. Enciclopedia de Tecnología Química Tomo 2 Fourth Edition. Wiley , New York.

SMIL V. 2000. Feeding the World: A Challenge for the Twenty-First century. MIT Press, Cambridge, MA.

WATANABE I., 2000. Biological Nitrogen Fixation and its Use in Agriculture, JICA, Cantho University.

JORGENSEN PETER M. Y LEÓN-YANEZ SUSANA, 1999. Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador, NHBS Mailorder Bookstore UK, Missouri BG, USA.

Cox P. A., 1995. The Elements on Earth: Inorganic Chemistry in the Environment. Oxford University Press, Oxford.

OAKS, A. 1994. Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. Can. J. Bot. 72.

SAWYER C.N., MCCARTY P.L. AND PARKIN G.F., 1994. Chemistry for Environmental Engineering.(Fourth Edition). McGraw-Hill, New York.

LUMPKIN T.A., 1993 *Azollaceae* Wettstein. Editorial Committee, eds. Flora of North America. Vol 2. Oxford Pages 338–342 University Press, New York.

SAUNDERS & FOWLER, 1992. The supraspecific taxonomy and evolution of the fern genus *Azolla* (*Azollaceae*). Plant Systematics and Evolution 184: 175-193.

LUMPKIN, T.A., 1991. *Azolla*: morfología de la simbiosis. Departamento de microbiología, IRRI.

CASTILLO Y CÁRDENAS, 1990 “Biología molecular de la fijación simbiótica del nitrógeno. Perspectivas biotecnológicas”. Universidad de Córdoba.

SPRENT J. Y SPRENT P., 1990 Sprent J. y Sprent P., 1990 Nitrogen fixing organisms: pure and applied aspects. 1990 pp. Chapman and Hall Ltd., London.

LUMPKIN T. A., AND WATANABE I., 1989. Classification of *Azolla* spp., section *Azolla*. *Euphytica* 43: 223--232.

PETERS, G.A. & MEEKS, J.C., 1989. The *Azolla*-*Anabaena* symbiosis: basic biology. En: *Annu. Rev. Plant physiology. Plant Mol. Biol.* Annual reviews Inc. Richmond, USA.

STEVENSON, F.J., 1986. The nitrogen cycle in soil: Global and ecological aspects. en: *Cycles of soil: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients.* New York. John Wiley & Sons, Inc.

PETERS, G.A., 1985. Aspects of nitrogen and carbon interchange in the *Azolla*-*Anabaena* symbiosis. Elsevier Sc. Publ.

HOLLOCHER, 1984 Heterotrophic nitrification among denitrifiers. *Applied and Environmental Microbiology, and Environmental Microbiology.*

SEVILLANO, F., SUBRAMANIAN, P. & RODRIGUEZ-BARRUECO, C., 1984. La asociación simbiótica fijadora de nitrógeno atmosférico *Azolla*-*Anabaena*. *An CEBA Vol. II.*

AZIZ, T. AND WATANABE, I., 1983. Influence of nutrients on the growth and mineral composition of *Azolla pinnata*. *Bangladesh J. Bot.*, 12 (2): 166-170.

ANDERSSON, K.K, HOOPER, A.B., 1983. O₂ and H₂O are each the source of one O in NO₂ produced from NH₃ by *Nitrosomonas*:N evidence. *FEBS Letters* 164, 236-240.

KUMAR S., NICHOLAS D. J. D., WILLIAMS E. H., 1983. Definite ¹⁵N NMR evidence that water serves as source of 'O' during nitrite oxidation by *Nitrobacter agilis*. *FEBS Letters* 152, 71-74.

BOZIMOWSK D., ARTISS J.D. AND ZAK B., 1983. Spectrophotometric comparison of several reactions used for cerebrospinal fluid protein determinations. *Microchemical Journal.*

PETERS G.A., 1983 The *Azolla*-*Anabaena* relationship *Plant. Phys.* Elsevier. Holanda.

WATANABE, I., 1982. *Azolla*-*Anabaena* symbiosis – Its physiology and use in tropical agriculture. In: *microbiology of tropical soils and plant productivity* (eds.) Y.R. Dommergues and H.G. Dlem, Dr. W. Junk publishers, London.

SPRENT, J.I., 1979. *The biology of nitrogen fixing organisms.* Mac-Graw-Hill, London.

HOLLOCHER, T.C., TATE, M.E., NICHOLAS, D., 1981. Oxidation of ammonia by *Nitrosomonas europaea*. Definitive O tracer evidence that hydroxylamine formation involves a monooxygenase. *Journal of Biological Chemistry* 256.

HABER-SCHAIM, 1977 Curso de introducción a las ciencias físicas. Edición Tercera. Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey.

AYANS J.E., 1975. Salt Transport in Irrigated Soils, Ph.D. Dissertation, Colorado Estate University., USA.

PETERS G.A., & MAYNE B.C., 1974 The Azolla-Anabaena azollae relationship.I. Initial characterization of the association. Plant Physiol 53: 813-819.

KEENEY D.R., WALSH L.W., 1972. Available Nitrogen in rural ecosystems. Sources and fate. Hortscience., Vol. 7, No. 3.

KUZNETSOV S.I., 1970. Microflora of Lakes and their Geochemical Activities. Leningrad , Izdatel' Stvo Naudaka, p. 440.

POTTER, N., 1970. La ciencia de los Alimentos. Edutex, México D.F.

SVENSON, H. K. 1944. The new world species of Azolla. Amer. Fern J. 34, 69-84.

ABREVIATURAS

ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
°C	Grados Celsius
cal	Calorías
CIC	Conductividad de Intercambio Catiónico
cm	Centímetros lineales
cm ²	Centímetros cuadrados
cm ³	Centímetros cúbicos
CV	Coefficiente de variación
C ₆ H ₁₂ O ₆	Glucosa
CO ₂	Dióxido de carbono
CO ₃ ⁼	Bicarbonato
d	día
DA	Densidad Aparente
D.E.	Desviación Estándar
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
g	Gramos
gl	Grados de libertad
g/L	Gramos por litro
GDH	Glutamato deshidrogenasa
h	Hectárea
H ₂	Hidrógeno molecular
J/g°K	Joules por gramo por grados Kelvin
ICQA	Instituto de Ciencias Químicas y Ambientales.
Kg	Kilogramos
L	Litros

m ³	Metros cúbicos
m	Metros lineales
mg	Miligramos
mg/L	Miligramos por litro
mm	Mililitros
Máx	Máximo
meq	Miliequivalentes
Mín	Mínimo
MO	Materia Orgánica
n	número
N	Nitrógeno
N ₂	Nitrógeno molecular
NO ₂ ⁻	Ión Nitrito
NO ₃ ⁻	Ión Nitratos
NH ₄ ⁺	Ión Amonio
N-NO ₂	Nitrógeno del nitrito
N-NO ₃	Nitrógeno del nitrato
N-NH ₃	Nitrógeno del amoniaco
nm	Nanómetros
ppm	Partes por millón
pH	Potencial hidrógeno
PROMSA	Programa de Modernización de los Servicios Agropecuarios
PO ₄	Ión Fosfato
spp	todas las especies del género
t	Toneladas métricas
TRC	Tasa relativa de crecimiento
TD	tiempo de duplicación
μS/cm	MicroSiemens por centímetro
UTM	Coordenadas transversal de Mercator
V	Voltios
%	Tanto por ciento

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Esporangio. El esporangio es la estructura de las plantas, hongos o algas que produce y contiene las esporas.

Esporocarpo. Grupo de esporangios en los Helechos acuáticos; recubierto por un indusio (Salviniales) o una pinna endurecida (Marsileales). Contiene los micro y megasporangios.

Espigas. Grupo de espiguillas nacidas en el nudo superior del tallo. La rama primaria de la panoja se divide en otras ramas secundarias y, a veces, terciarias. Estas últimas son las que llevan las espiguillas. Las ramas pueden estar dispuestas solas o por parejas.

Espiguilla. El pedúnculo o pedicelo es la última ramificación de la panícula; puede estar unido a una o más espiguillas.

Gloquidio. Pelo en forma de gancho que permite la fijación. *Azolla* sp.

Macollo. El tallo se forma de nudos y entrenudos alternados, siendo cilíndrico, nudoso, glabro y de 60-120 cm. de longitud.

Macroesporangio. Megasporangio. Esporangio en el cual se forman las macrosporas.

Macrosporocarpo. Estructura presente en lo Helechos que contiene los megasporocarpos.

Másula. Grupo de microsporangios que llevan gloquidios en *Azolla*.

Megaspora. Macrospora. Espora originada por meiosis a partir de un megasporocito y que desarrollará un gametofito femenino en las plantas heterosporadas. Generalmente tiene mayor tamaño que una microspora

Microespora. Espora producida por meiosis en un microsporangio, producirá un gametofito masculino. Presente en las plantas heterosporadas. Generalmente tiene tamaño menor que la megaspora.

Nitrogenasa: Es el complejo enzimático responsable de la conversión de nitrógeno atmosférico en amoníaco, formado por dos componentes proteicos.

Nitrobacter. Bacterias aerobias que convierten los nitritos en nitrato.

Nitrosomas. Bacterias nitrificadoras de tipo aeróbico, que convierten el amonio en nitrito mediante la oxidación del mismo.

ANEXOS

Métodos colorimétricos Hach Dr890

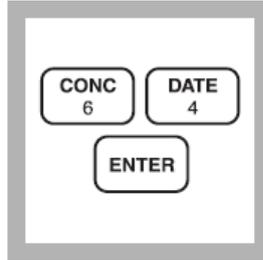
Nitrógeno del amoníaco (0 a 0.5 mg/L $\text{NH}_3\text{-N}$)



1. Ingrese el número del programa almacenado para Nitrógeno de amoníaco.

Presione: **PRGM**

La pantalla mostrará: **PRGM?**



2. Presione: **64 ENTER**
La pantalla mostrará **mg/L, $\text{NH}_3\text{-N}$** y el icono **ZERO**.

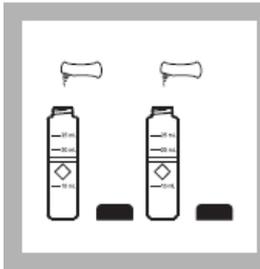
Nota: Para formas alternativas (NH_3 , NH_4), pulse el botón **CONC**.



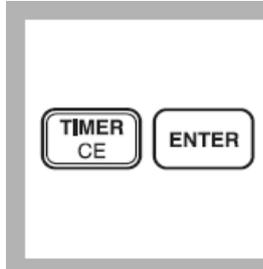
3. Llene una celda con 10 ml de agua desionizada (blanco)



4. Llene una segunda celda con 10 ml de muestra.

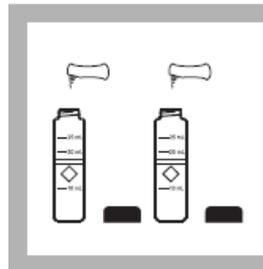


5. Añada el contenido de un sobre de Salicilato de amonio a cada celda. Tape ambas celdas y agite hasta disolver.



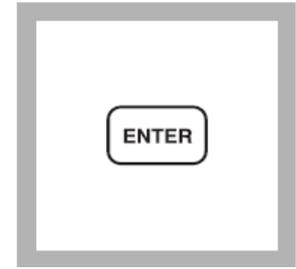
6. Presione: **TIMER ENTER**

Una reacción de tres minutos empezará.



7. Después de que el cronometro suene añada el contenido de un sobre de Cianurato de amonio a cada celda. Tape las celdas y agite hasta disolver el reactivo

Nota: Color verde se forma si el amoníaco está presente.



8. La pantalla mostrará:

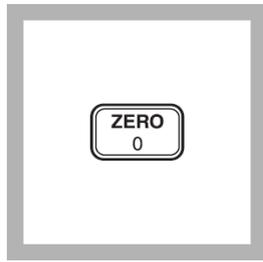
15:00 TIMER 2

Presione: **ENTER**

Una reacción de 15 minutos comenzará.



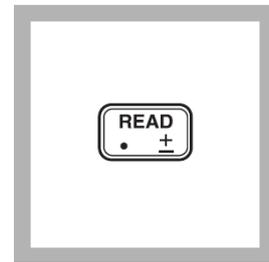
9. Después de que el temporizador suene, coloque el blanco en el soporte de la celda. Cubra la celda del blanco con la tapa del instrumento



10. Presione: **ZERO**
El cursor se moverá a la derecha, a continuación, se mostrará en la pantalla: **0.00 mg/L, $\text{NH}_3\text{-N}$**



11. Coloque la muestra preparada en el soporte de la celda. Cubra la celda de la muestra con la tapa del instrumento.



12. Presione: **READ**
El cursor se moverá a la derecha, se mostrará en la pantalla el resultado en mg/L $\text{NH}_3\text{-N}$

Métodos colorimétricos Hach Dr890

Nitrato, Rango bajo (0 a 0.350 mg/L NO₂⁻N)

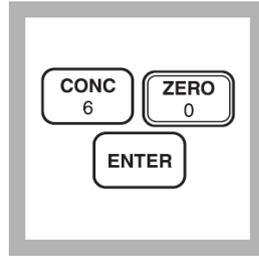


1. Ingrese el número del programa almacenado para el Nitrógeno de nitrato (NO₂⁻-N) utilizando el polvo en sobre.

Presione: **PRGM**

La pantalla mostrará:
PRGM?

Nota: Para más precisión, seleccione un Blanco reactivo corrector usando agua desionizada



2. Pulse: **60 ENTER**
La pantalla mostrará **mg/L, NO₂-N** y el icono de **ZERO**.

Nota: Para la forma alternativa (NO₂⁻, NaNO₂), pulse el botón **CONC**.

Nota: Ajuste el pH de las muestras antes del análisis.

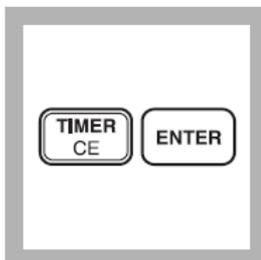


3. Llene dos celdas con 10 ml de muestra cada uno. En una celda coloque la muestra preparada, en la otra el blanco. Ponga el blanco a un lado.



4. Añadir el contenido de un sobre de NitriVer 3 Nitrato en una celda (la muestra preparada). Tape la celda y agite hasta disolver.

Nota: La precisión no es afectada por el polvo no disuelto



5. Presione:

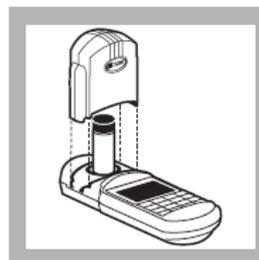
TIMER ENTER

Comenzará una reacción por un período de 15 minutos. Agite la muestra vigorosamente hasta que el cronómetro suene.

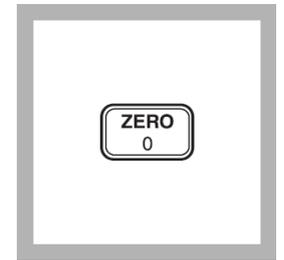
Nota: Un color rosado se desarrolla si existe nitrato



6. Cuando el temporizador suene, limpiar la superficie de la celda de residuos de líquido o huellas digitales.



7. Coloque el blanco en el soporte de la celda. Cubra la celda de la muestra con la tapa del instrumento.



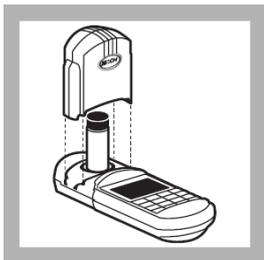
8. Presione: **ZERO**
El cursor se moverá a la derecha, a continuación, se mostrará en la pantalla:

0,000 mg /L NO₂-N

Nota: Si el reactivo blanco de corrección está en la pantalla puede parpadear "límite".

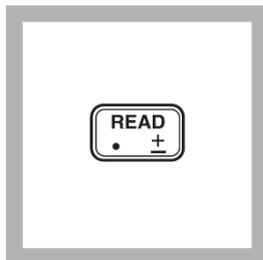
Métodos colorimétricos Hach Dr890

Nitrito, Rango bajo (0 a 0.350 mg/L NO₂⁻N)



9. Coloque la muestra preparada en el soporte de la celda. Cubra la celda de la muestra con la tapa del instrumento.

Nota: Lea la muestra dentro de los dos minutos después de que el temporizador suene.



10. Presione: **READ**

El cursor se moverá a la derecha, a continuación, se mostrará en la pantalla el resultado en mg /L NO₂-N

Métodos colorimétricos Hach Dr890

Nitrato, Rango medio (0 a 5.0 mg/L NO₃⁻N)

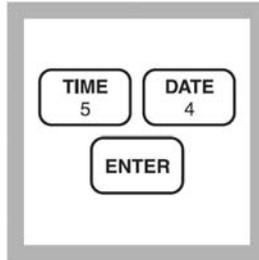


1. Ingrese el número del programa almacenado para el rango medio de Nitrógeno de nitrato, utilizando el polvo en sobre.

Presione: **PRGM**

La pantalla mostrará:
PRGM?

Nota: Para más precisión, seleccione un Blanco reactivo corrector usando agua desionizada



2. Presione: **54 ENTER**
La pantalla mostrará **mg/L, NO₃-N** y el icono de **ZERO**.

Nota: Para la forma alternativa (NO₃), pulse el botón **CONC**.

Nota: Ajuste el pH de las muestras antes del análisis.

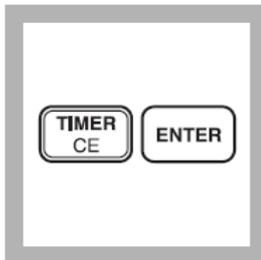


3. Llene dos celdas con 10 ml de muestra cada uno. En una celda coloque la muestra preparada, en la otra el blanco. Ponga el blanco a un lado.



4. Añadir el contenido de un sobre de NitraVer 5 Nitrato en una celda (la muestra preparada). Tape la celda.

Nota: Es necesario quitar todo el polvo de la bolsa de aluminio, tocando varias veces hasta que no salga más polvo.



5. Presione:

TIMER ENTER

Comenzará una reacción por un período de un minuto. Agite la muestra vigorosamente hasta que el cronómetro suene.



6. Después de que el cronómetro suene, la pantalla mostrará: **5:00 TIMER 2**

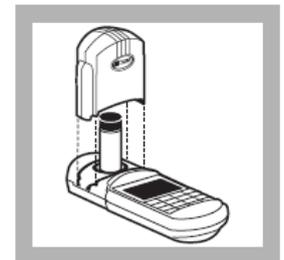
Presione: **ENTER**

Una reacción de cinco minutos comenzará.

Nota: Un depósito de cadmio se mantendrá después del Reactivo NitraVer 5 Nitrato en polvo se disuelve y no afectará a los resultados de la prueba.



7. Después de que el temporizador suena, limpiar residuos de líquido o huellas digitales.

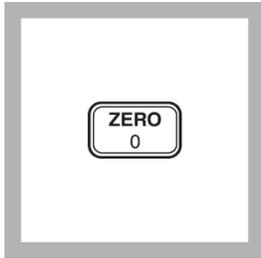


8. Coloque el blanco en el soporte de la celda. Cubra la celda de la muestra con la tapa del instrumento.

Métodos colorimétricos Hach Dr890

Nitrato, Rango medio (0 a 5.0 mg/L NO₃⁻N)

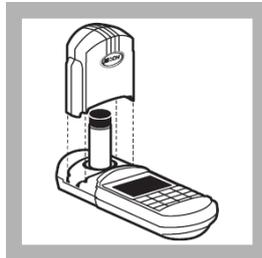
Nota: Un color ámbar se desarrollará si nitrógeno nitrato está presente.



9. Presione: ZERO
El cursor se moverá a la derecha, a continuación, se mostrará en la pantalla:

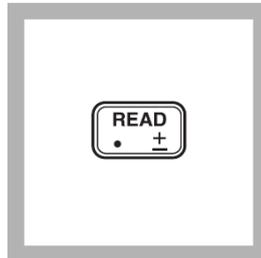
0,0 mg /L NO₃-N

Nota: Si el reactivo blanco de corrección está en la pantalla puede parpadear "límite".



10. Coloque la muestra preparada en el soporte de la celda. Cubra la celda de la muestra con la tapa del instrumento.

Nota: Lea la muestra dentro de los dos minutos después de que el temporizador suene.



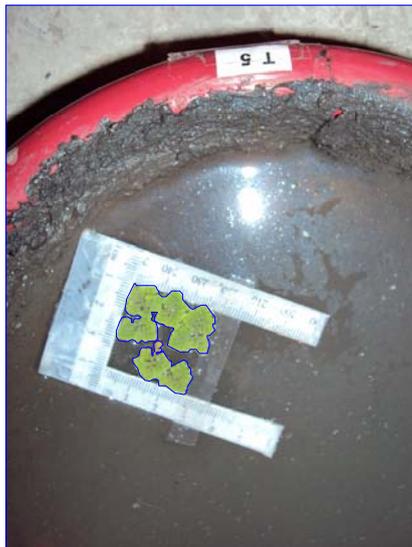
11. Presione: READ
El cursor se moverá a la derecha, a continuación, se mostrará en la pantalla el resultado en mg /L NO₃-N

Nota: El tiempo de agitación y la técnica influyen en el color. Resultados bajos suelen ocurrir si la agitación no es lo suficientemente vigorosa. Para resultados más precisos, hacer ensayos consecutivos en una solución estándar y ajustar el tiempo de agitación en ± 1 minuto para obtener el resultado correcto. Vea la sección Comprobación de la precisión para obtener más información

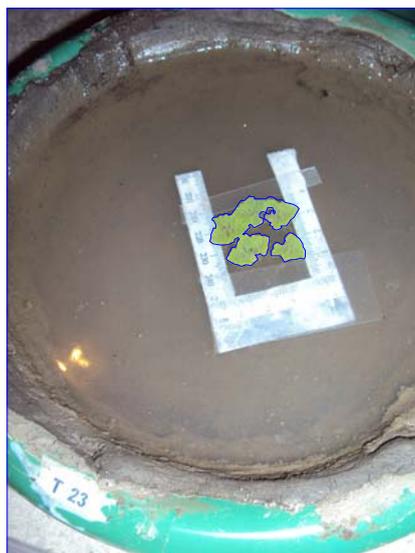
Determinación del área de crecimiento del *Azolla-Anabaena*
Día 7 (a)



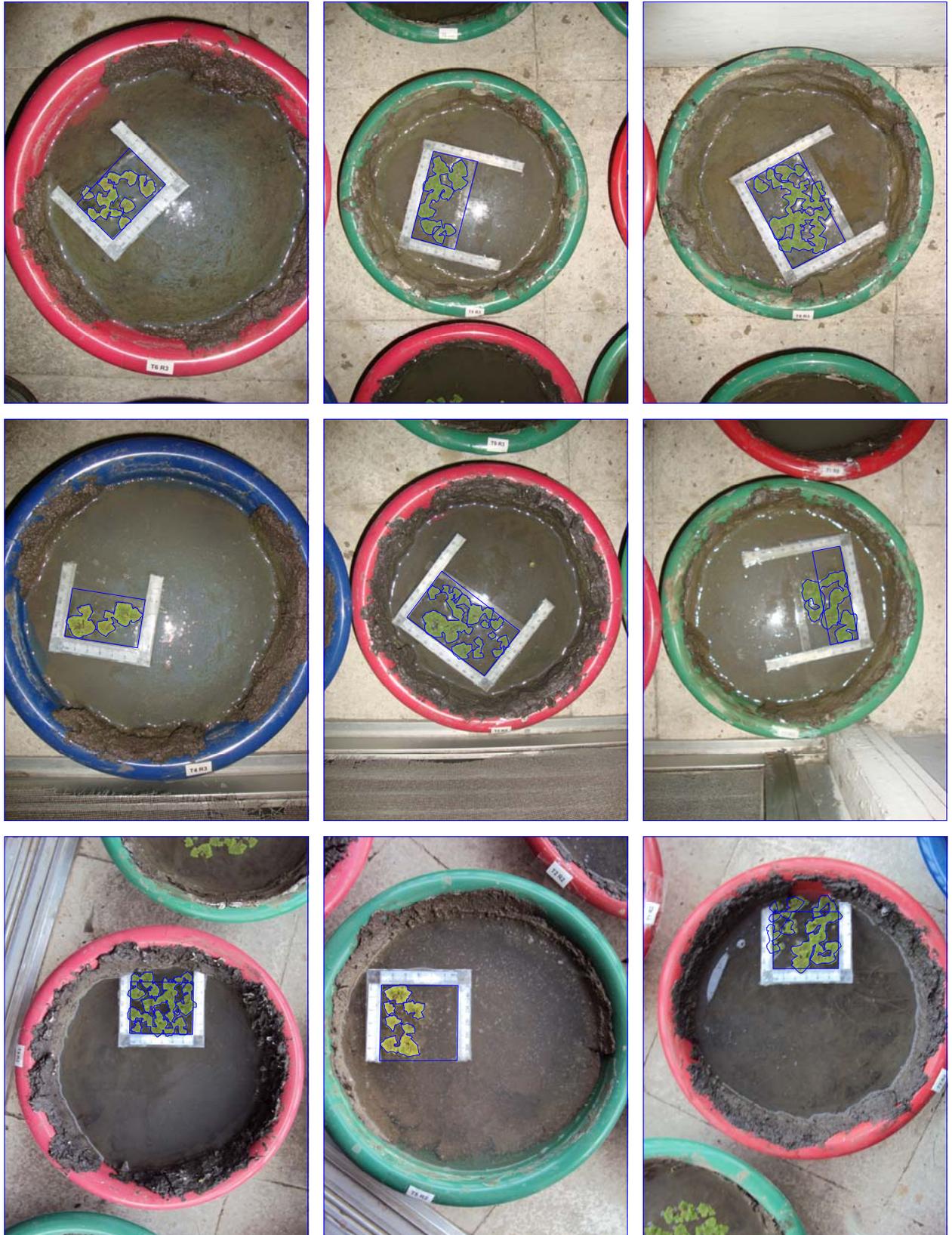
Determinación del área de crecimiento del *Azolla-Anabaena*
Día 7 (b)



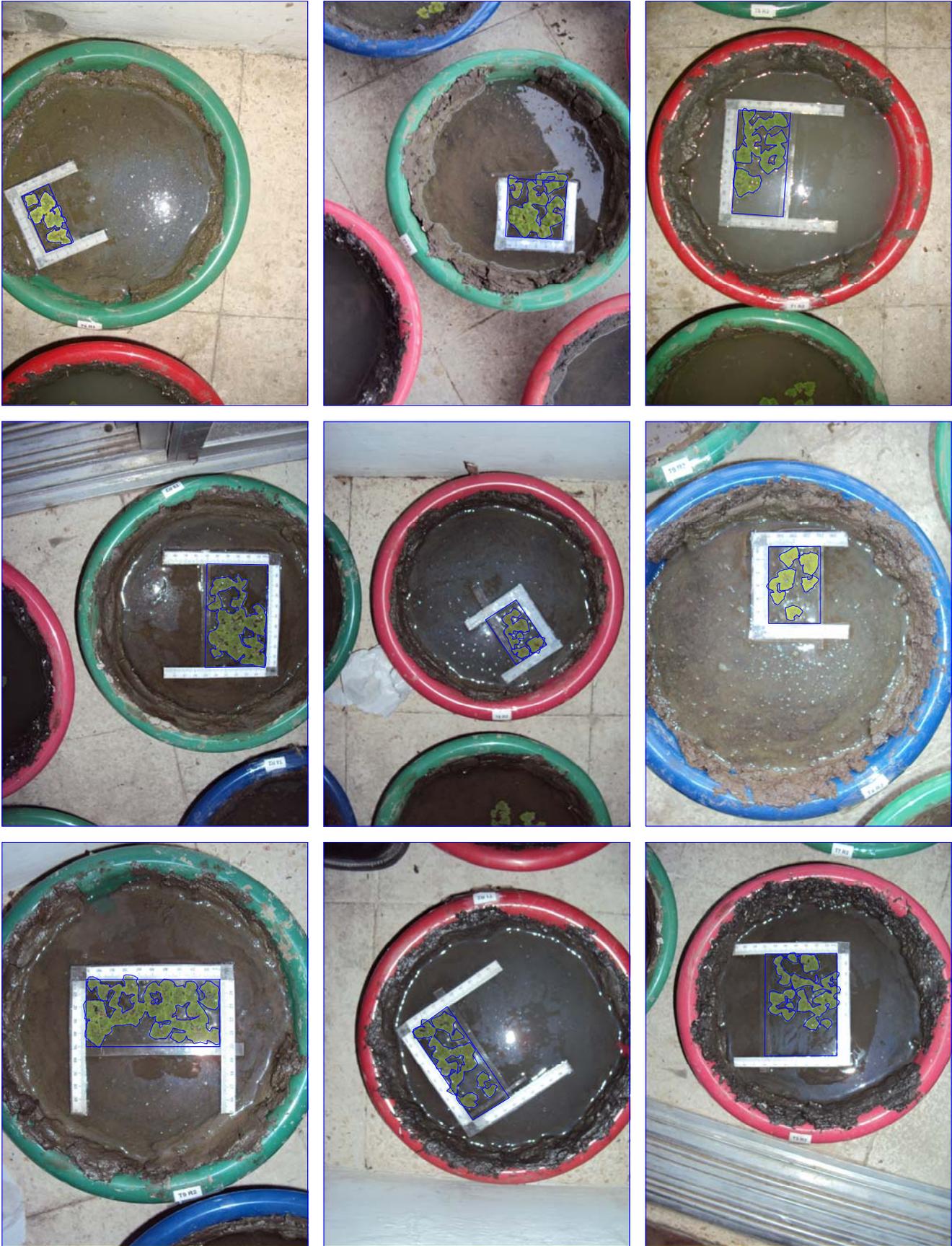
Determinación del área de crecimiento del *Azolla-Anabaena*
Día 7 (c)



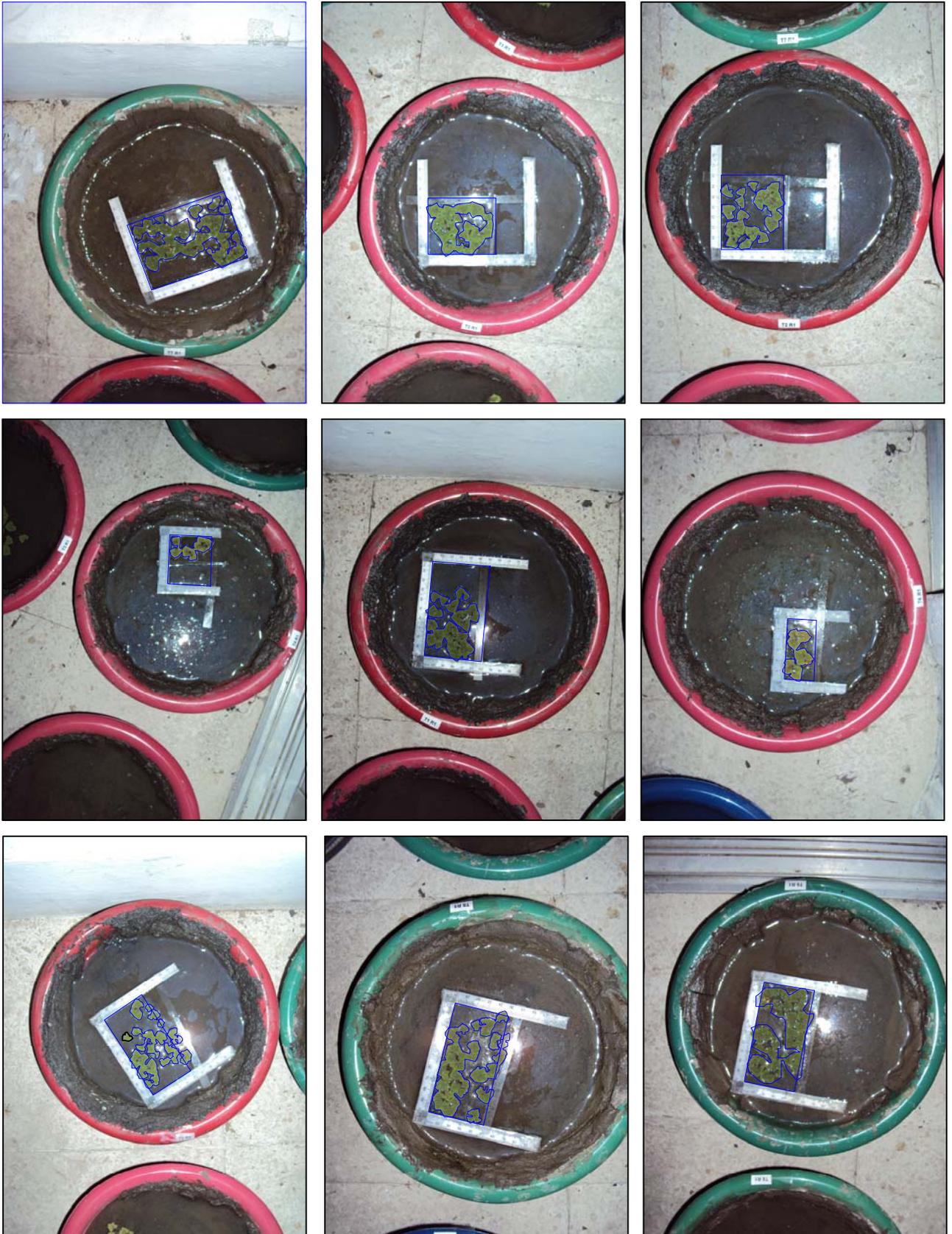
Determinación del área de crecimiento del *Azolla-Anabaena*
Día 14 (a)



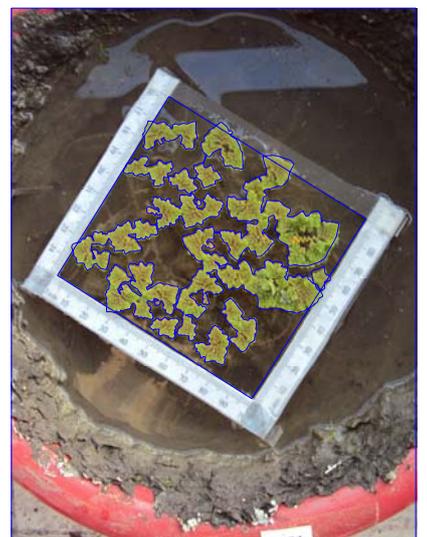
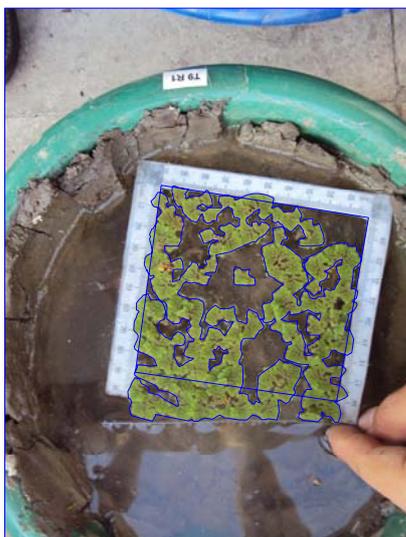
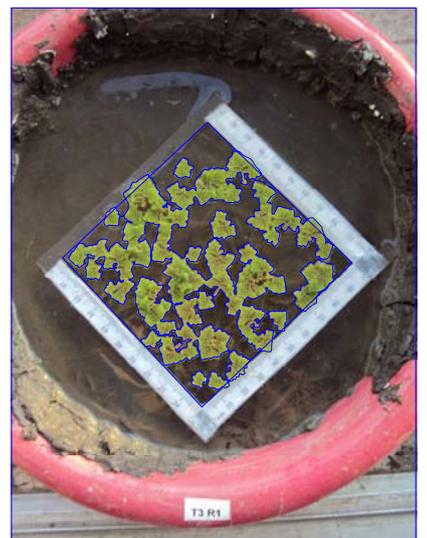
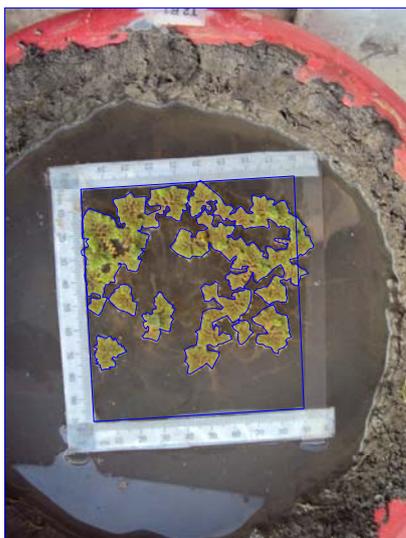
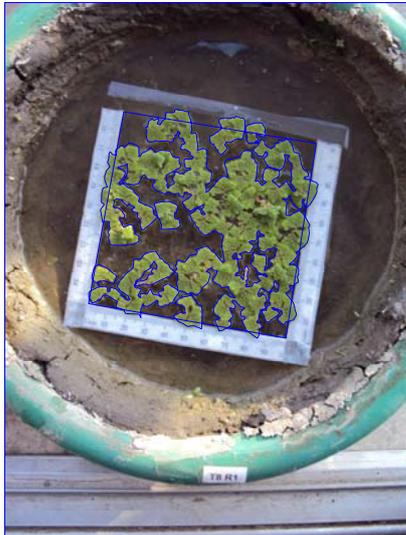
Determinación del área de crecimiento del *Azolla-Anabaena*
Día 14 (b)



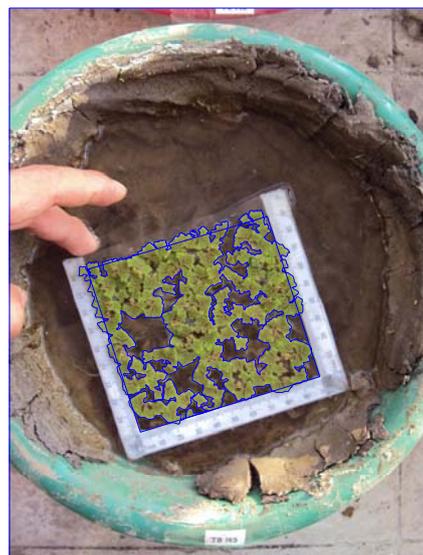
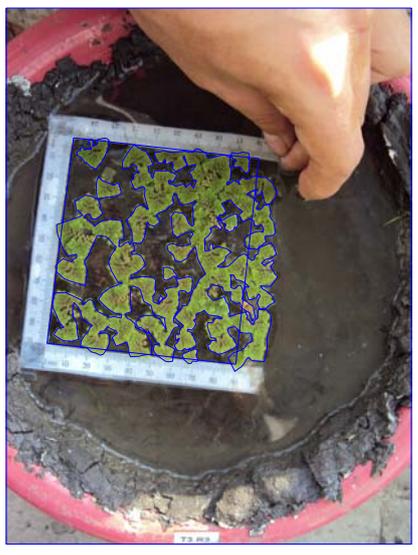
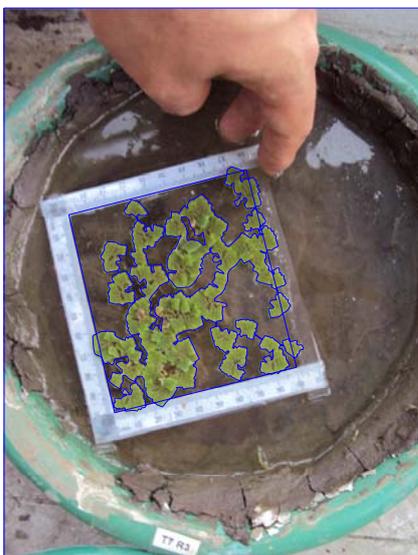
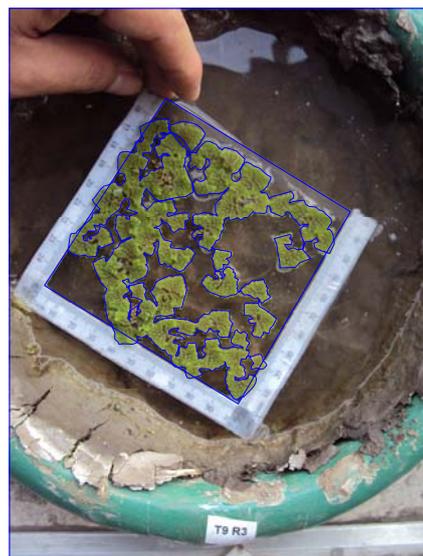
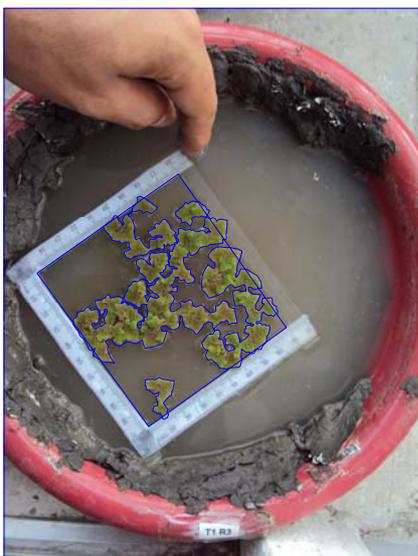
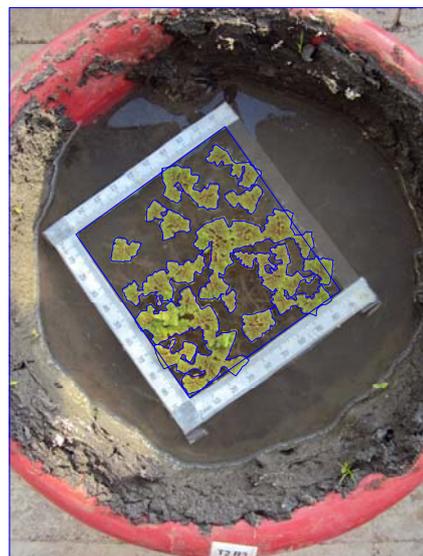
Determinación del área de crecimiento del *Azolla-Anabaena*
Día 14 (c)



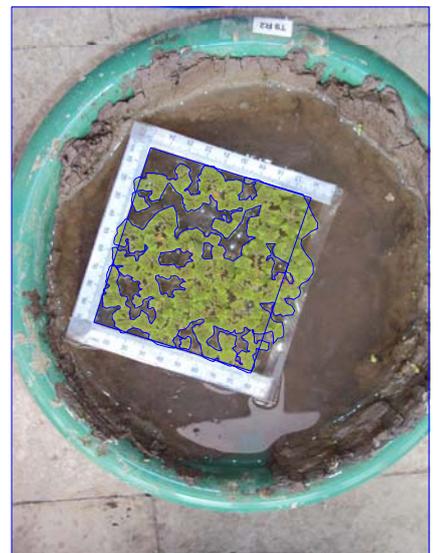
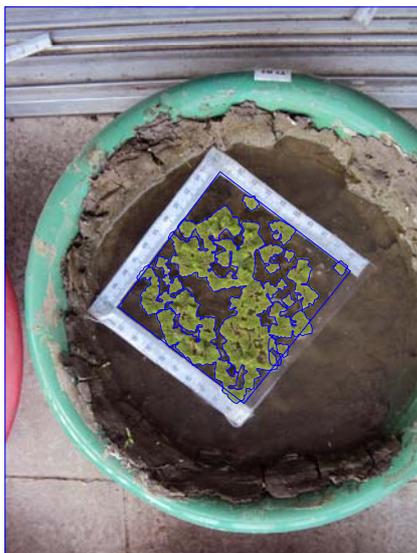
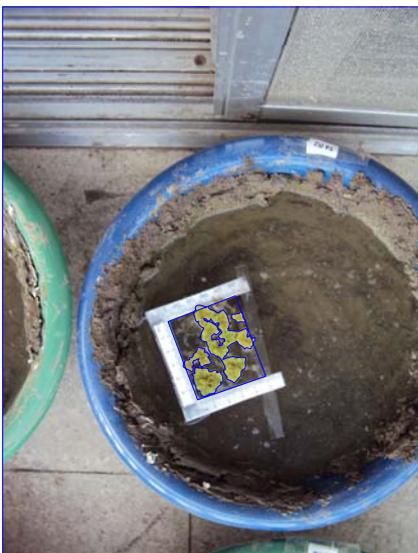
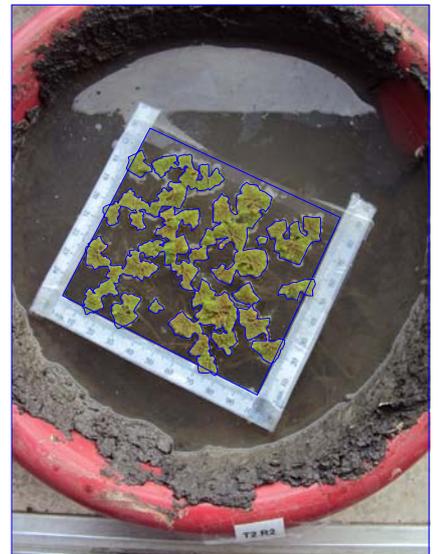
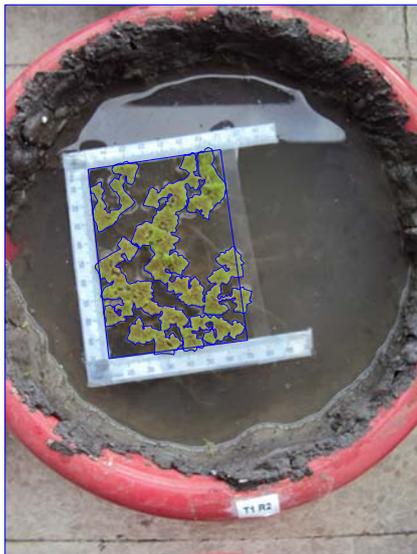
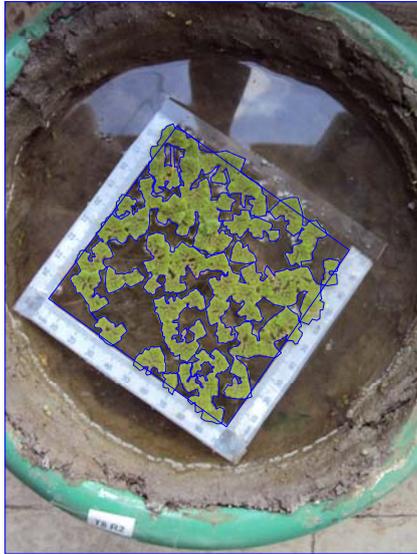
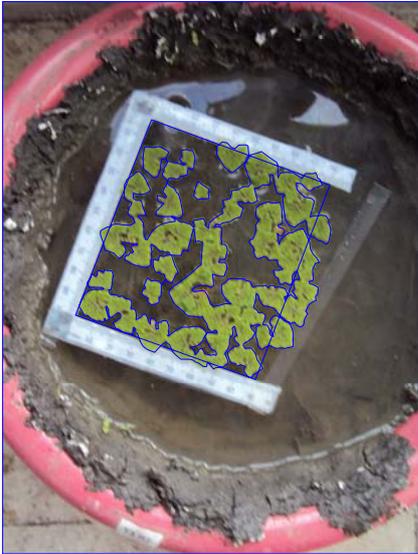
Determinación del área de crecimiento del *Azolla-Anabaena*
Día 21 (a)



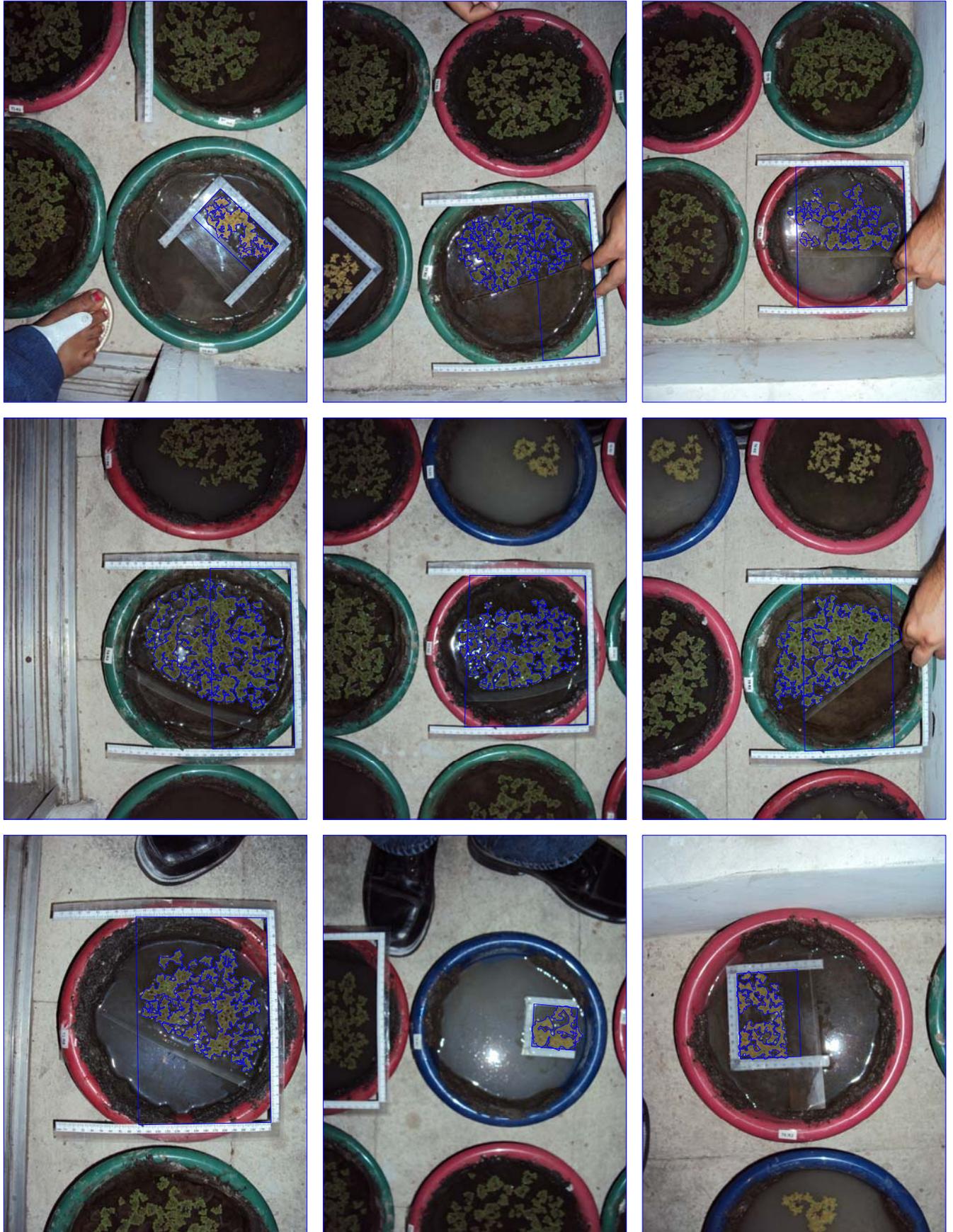
Determinación del área de crecimiento del *Azolla-Anabaena*
Día 21 (b)



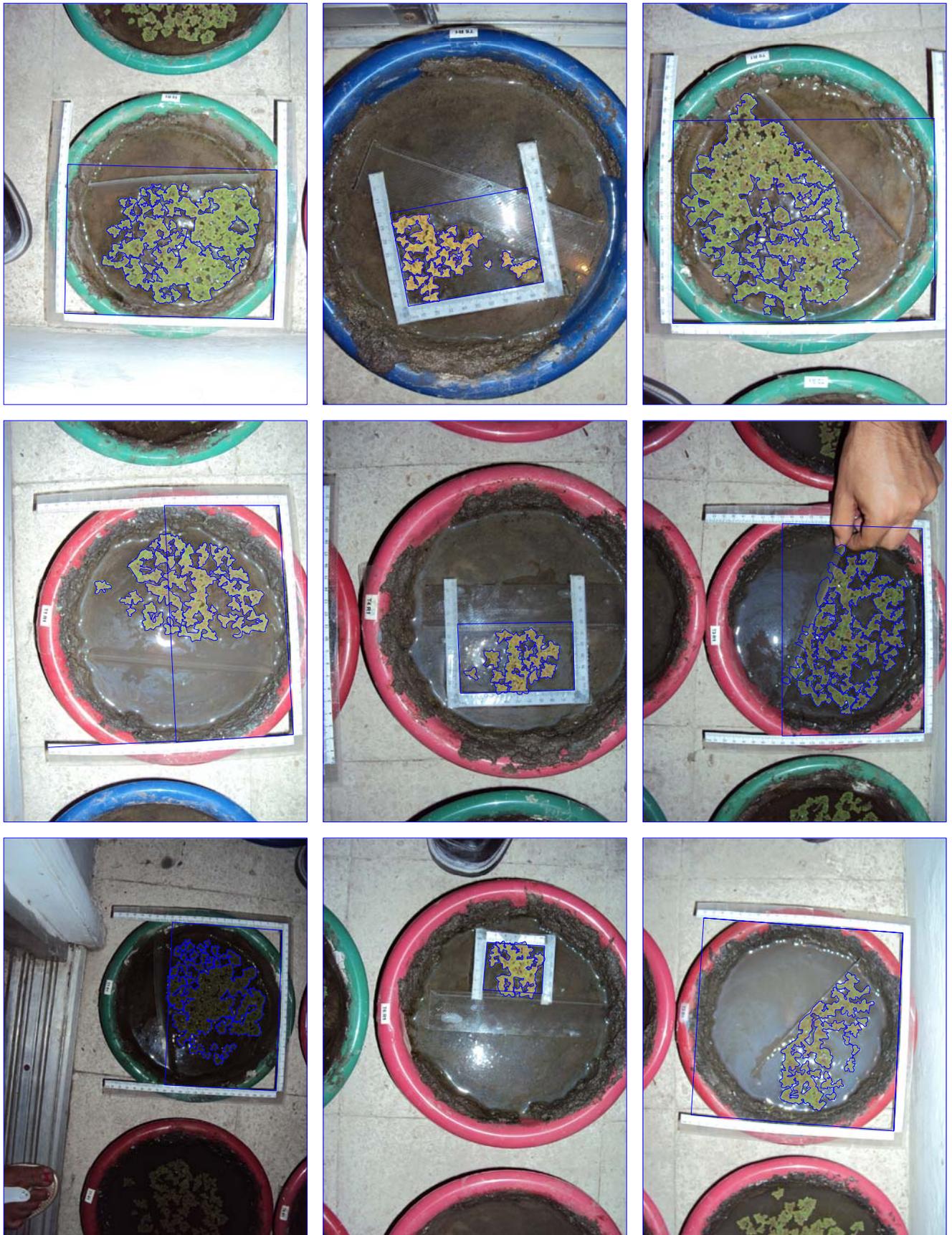
Determinación del área de crecimiento del *Azolla-Anabaena*
Día 21 (c)



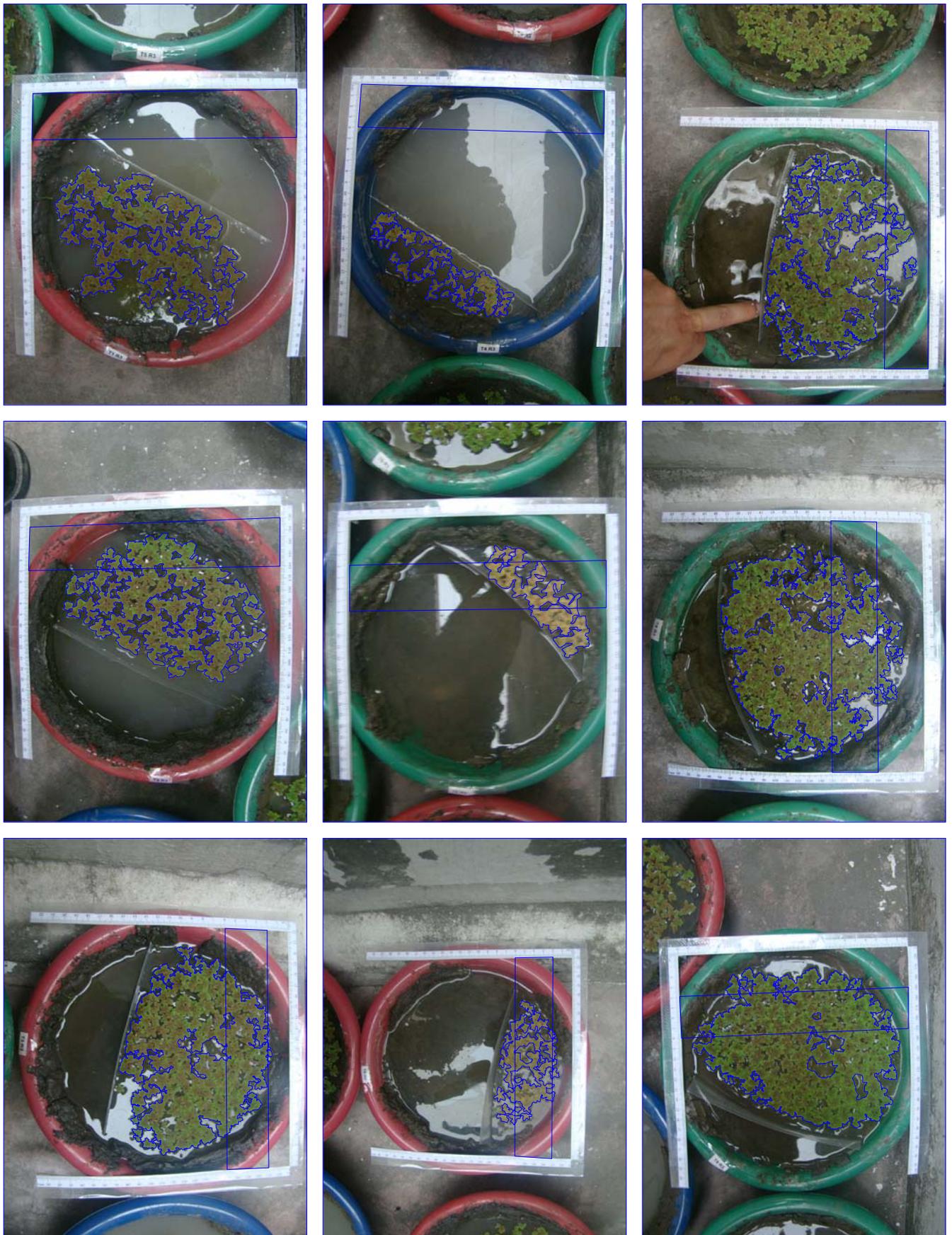
Determinación del área de crecimiento del *Azolla-Anabaena*
Día 28 (a)



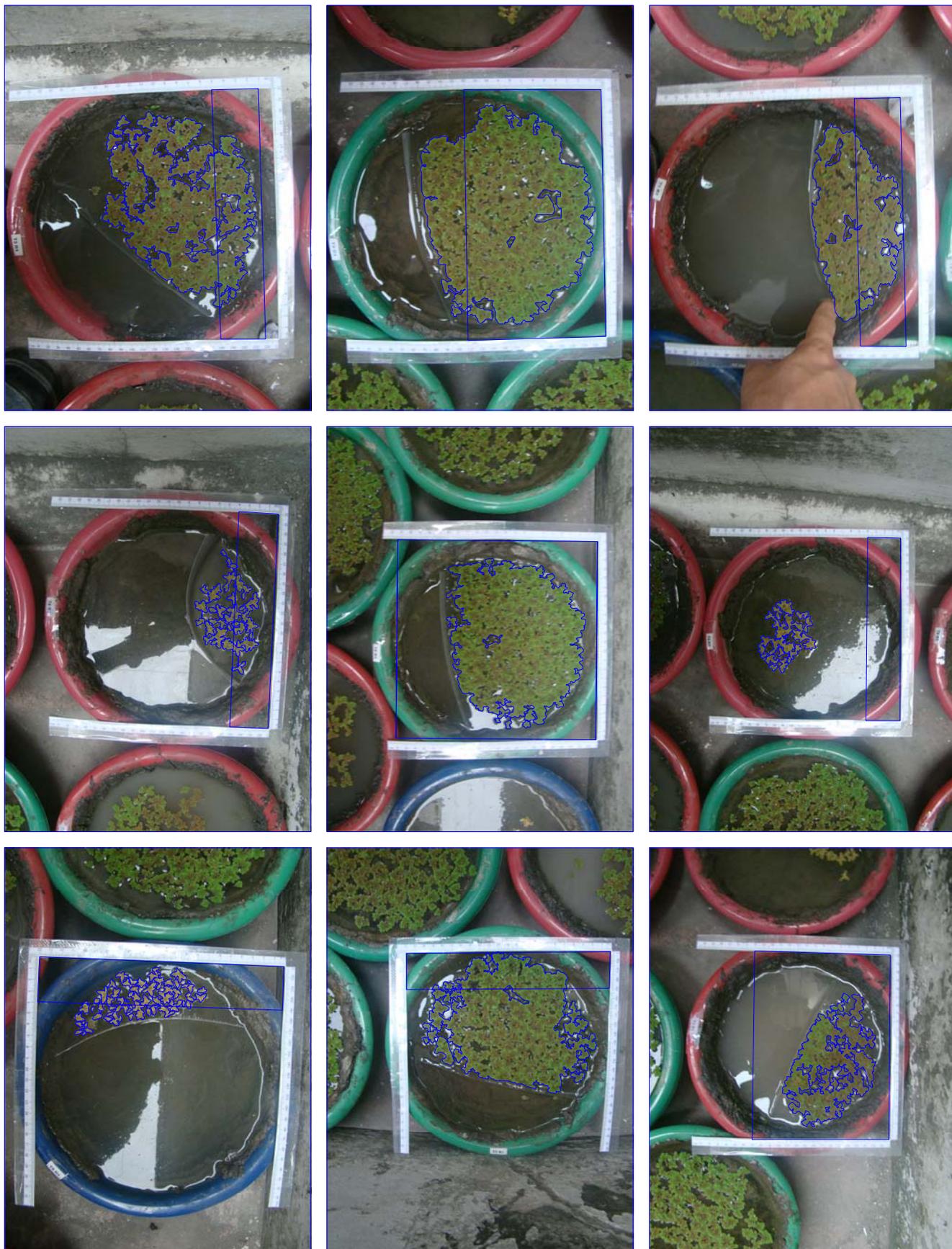
Determinación del área de crecimiento del *Azolla-Anabaena*
Día 28 (b)



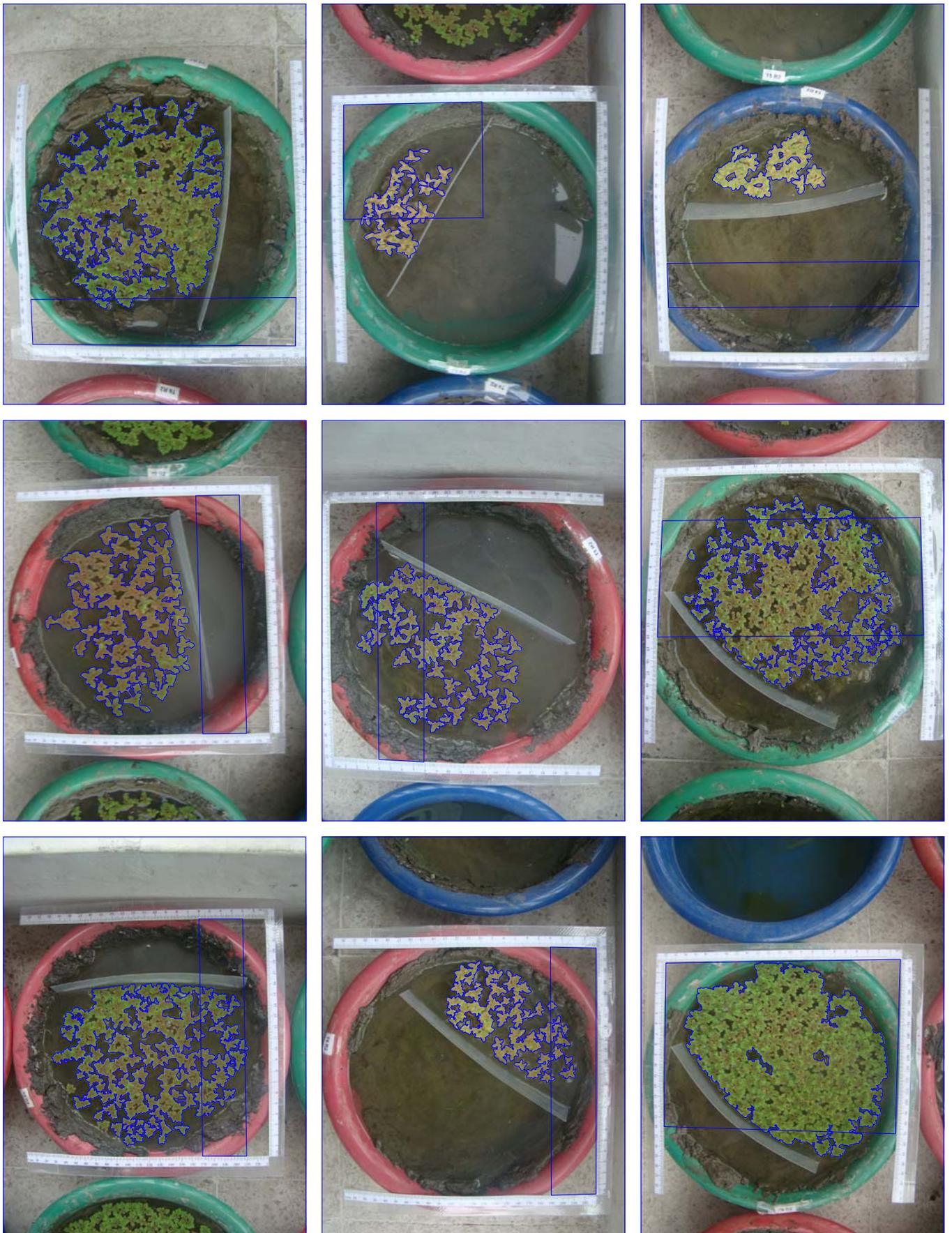
Determinación del área de crecimiento del *Azolla-Anabaena*
Día 35 (a)



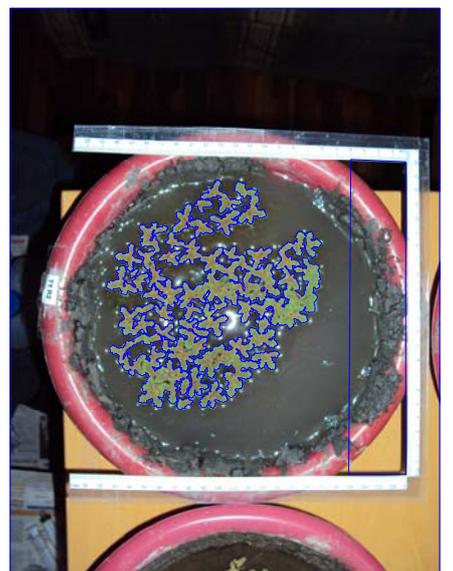
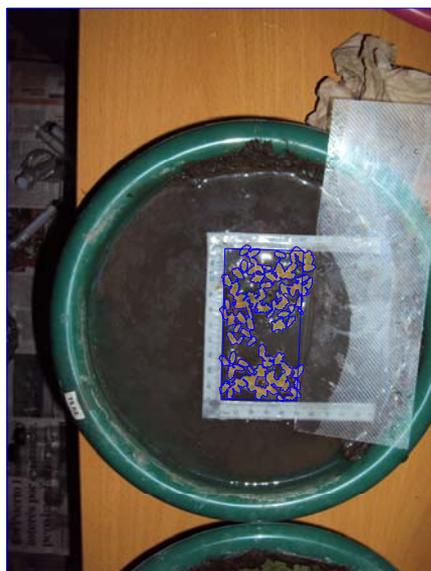
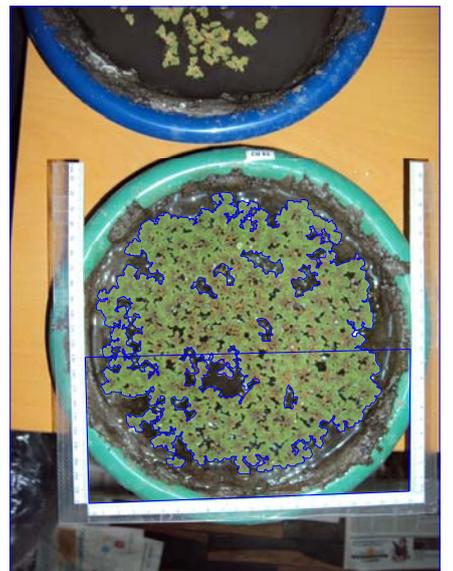
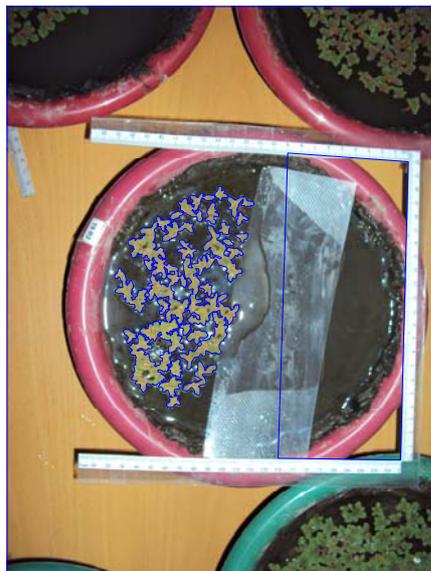
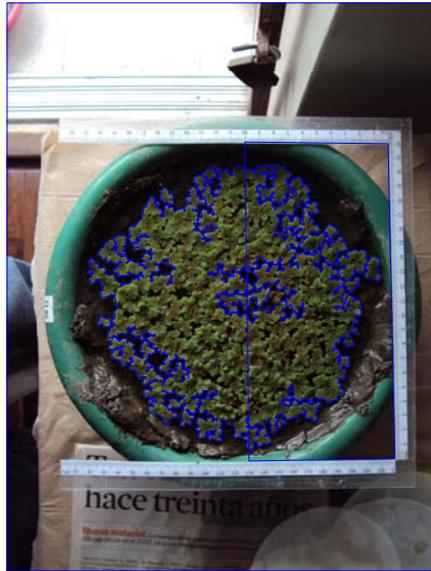
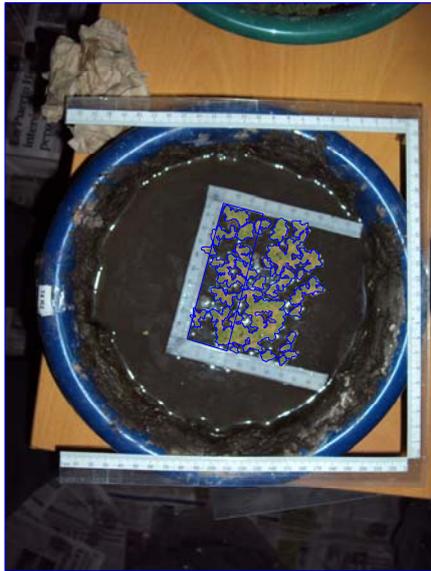
Determinación del área de crecimiento del *Azolla-Anabaena*
Día 35 (b)



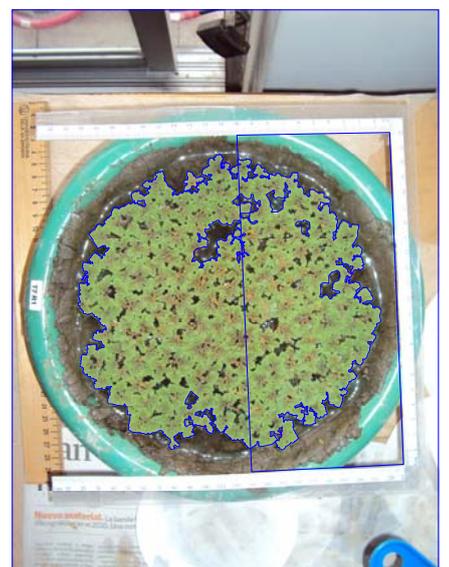
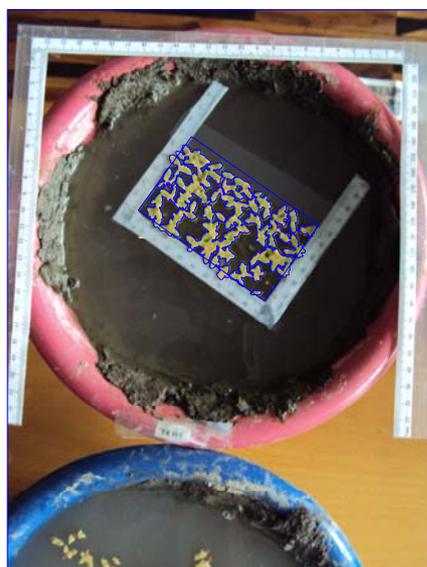
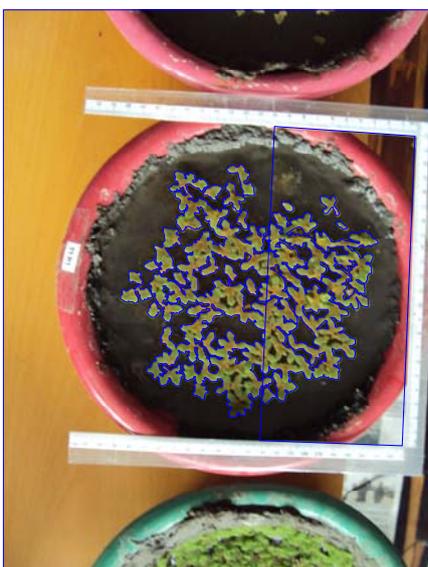
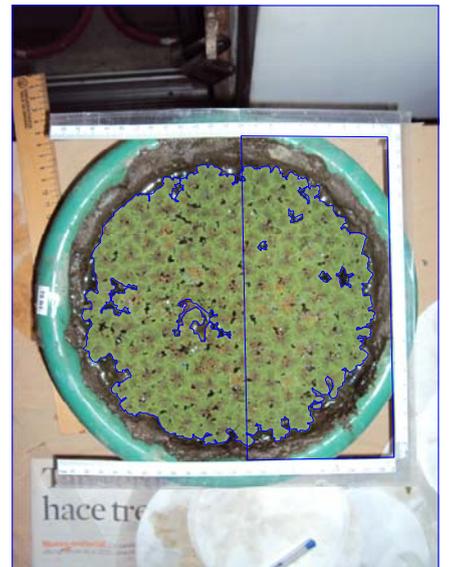
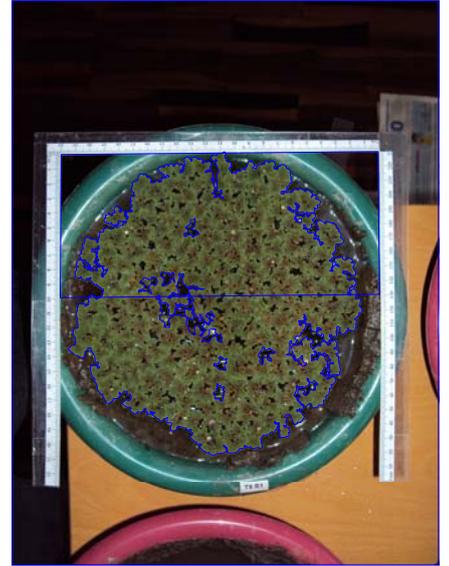
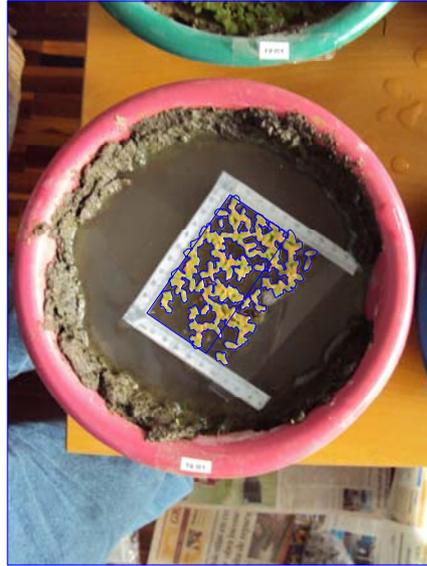
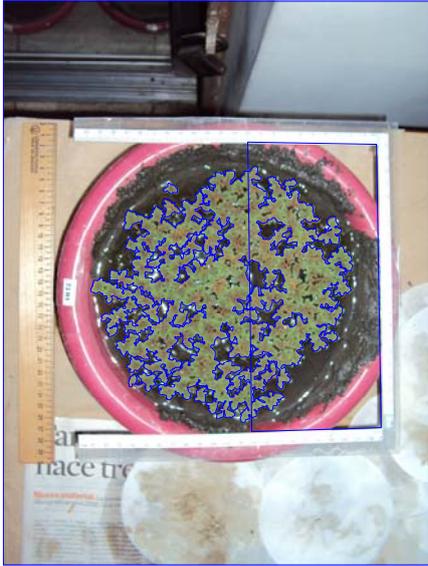
Determinación del área de crecimiento del *Azolla-Anabaena*
Día 35 (c)



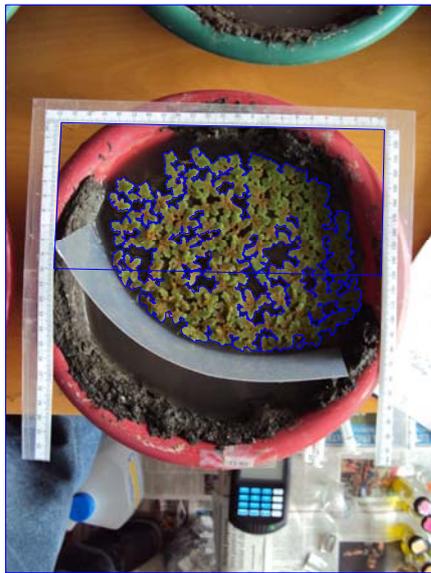
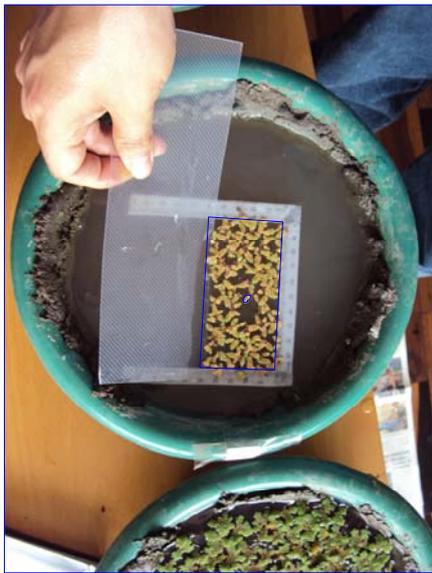
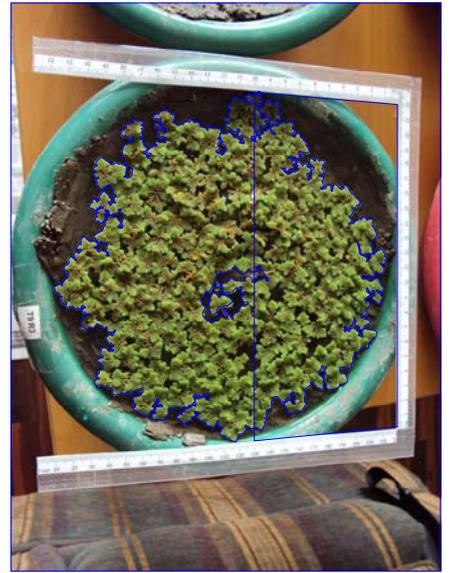
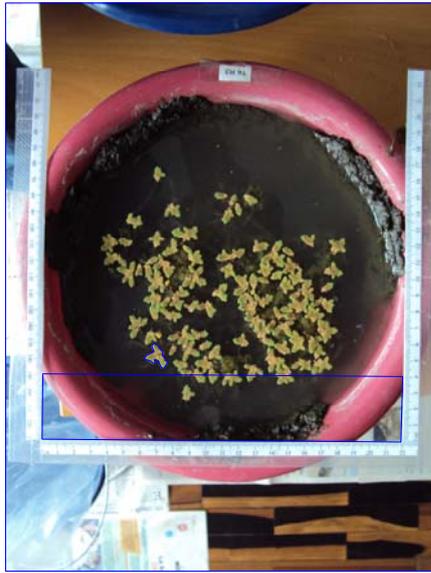
Determinación del área de crecimiento del *Azolla-Anabaena*
Día 42 (a)



Determinación del área de crecimiento del *Azolla-Anabaena*
Día 42 (b)



Determinación del área de crecimiento del *Azolla-Anabaena*
Día 42 (c)



Dr. Jorge E. Fuentes C.

Laboratorio de Análisis Agrícola / R.U.C.: 1700811134001

Urdesa norte Av. 4ta.#203 y calle 2da.

Telefono: 2387310 / 088675672

Guayaquil - Ecuador

Composición química de nutrientes en tejido vegetal

Propietario:

Propiedad:

Localidad:

Solicitado por: Ing. Mariano Montaña

Cultivo

AZOLLA

Variedad:

Ingreso:

23 de noviembre/2010

Salida:

20 de diciembre/2010

Prmt.	Unid.	A		B		C	
		2010156	# 1	2010157	2	2010158	3
N	%	2.20		2.00		2.30	
P	en	0.43		0.41		0.42	
K	mstra.	1.30		1.40		1.30	
Na	seca	0.48		0.44		0.47	
Ca		0.40		0.32		0.28	
Mg		0.28		0.32		0.24	
Fe	ppm	22000		19000		18000	
Mn	en	650		850		580	
Zn	mstra.	110		98		95	
Cu	seca	28		25		27	
H	%bph	90.4		92.3		91.5	
H	%bps	946		1194.1		692.9	