



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**



**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

**CARRERA INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

---

“SELECCIÓN DE BACTERIAS DE VIDA LIBRE EFICIENTES EN FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO COMO ALTERNATIVA SUSTENTABLE PARA ECOSISTEMAS TERRESTRES”

---

*Trabajo de Investigación (Graduación), Modalidad: Trabajo Estructurado de Manera Independiente (TEMI) presentado como requisito previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica otorgado por la Universidad Técnica de Ambato a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.*

**Autor:** María Belén Aguilar Borja

**Tutor:** Dr. Carlos Rodríguez. Ph.D

**Ambato - Ecuador**

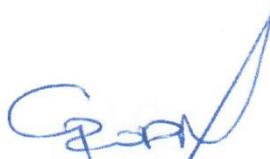
**2015**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

En calidad de Tutor del trabajo de investigación: “SELECCIÓN DE BACTERIAS DE VIDA LIBRE EFICIENTES EN FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO COMO ALTERNATIVA SUSTENTABLE PARA ECOSISTEMAS TERRESTRES”, realizado por la Egda. María Belén Aguilar Borja, certifico que el trabajo fue realizado por la persona indicada.

Considero que dicho informe investigativo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometidos a la evaluación del Tribunal de Grado, que el Honorable Consejo Directivo designe, para su correspondiente estudio y calificación.

Ambato, Mayo del 2015



---

Dr. Carlos Rodríguez M.; Ph.D

**TUTOR DE TESIS**

## AUTORÍA

El presente trabajo de investigación: “SELECCIÓN DE BACTERIAS DE VIDA LIBRE EFICIENTES EN FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO COMO ALTERNATIVA SUSTENTABLE PARA ECOSISTEMAS TERRESTRES”, es absolutamente original, auténtico y personal, en tal virtud, el contenido, efectos legales y académicos que se desprenden del mismo son de exclusiva responsabilidad de la autora.

Ambato, Mayo del 2015

---

María Belén Aguilar Borja

180480179-1

## **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO**

### **UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

Los miembros del tribunal de grado aprueban el presente trabajo de graduación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, Mayo de 2015

Para constancia firman:

---

Ing. Jacqueline Ortiz, Ph.D

**Presidenta Tribunal**

---

Ing. M.Sc. Mirari Arancibia, Ph.D

**Miembro del Tribunal**

---

Ing. Msc. Yunys Pérez

**Miembro del Tribunal**

**Dedicatoria**

*A mi familia, por ser aliento y  
motor de todos mis sueños.*

## **Agradecimiento**

*A la Universidad Técnica de Ambato, especialmente a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos por las vivencias, las lecciones y el apoyo.*

*A mi madre Nancy y mi hermano Paúl; por soñar junto a mí y ser mi equipo incondicional de trabajo.*

*Al Dr. Carlos Rodríguez, mi mentor; por su amistad, paciencia, apoyo y confianza.*

*A todas las personas que directa e indirectamente hicieron posible la realización de este trabajo.*

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

### A. PÁGINAS PRELIMINARES

Tema	i
Aprobación del tutor	ii
Autoría	iii
Aprobación del tribunal de grado	iv
Dedicatoria	v
Agradecimiento	vi
Índice general de contenidos	vii
Índice de Tablas	xii
Índice de anexos	xiii
Resumen	xviii

### B. TEXTO

CAPITULO I	1
EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.1. Tema de investigación	1
1.2. Planteamiento del problema	1
1.2.1. Contextualización	1
1.2.2. Análisis Crítico	4
1.2.3. Prognosis	4
1.2.4. Formulación del problema	5
1.2.5. Preguntas directrices	5
1.3. Justificación	5
1.4. Objetivos	6
1.4.1. General	6
1.4.2. Específicos	7

CAPITULO II	8
MARCO TEÓRICO	8
2.1 Antecedentes investigativos	8
2.1.1 Ecosistemas terrestres	8
2.1.2 El nitrógeno y las plantas	8
2.1.3 Fertilizantes nitrogenados	9
2.1.4 Fijación industrial de nitrógeno por el proceso Haber - Bosch	12
2.1.5 Fijación biológica de nitrógeno (FBN)	13
2.1.6 Microbios fijadores de nitrógeno	14
2.1.7 Nitrogenasa (Nasa)	17
2.1.8 Factores que afectan la fijación de nitrógeno atmosférico	20
2.1.9 Mecanismos de protección de la Nitrogenasa a la inactivación por oxígeno	23
2.1.10 Aislamiento selectivo de bacterias diazótrofes	28
2.1.11 Taxonomía numérica	30
2.2. Fundamentación filosófica	31
2.3 Fundamentación legal	32
2.4. Categorías fundamentales	33
2.5. Hipótesis	33
2.5.1. Hipótesis nula	33
2.5.2. Hipótesis alternativa	33
2.6. Señalamiento de variables de la hipótesis	34
CAPÍTULO III	35
METODOLOGÍA	35
3.1. Enfoque	35
3.2. Modalidad básica de la investigación	35
3.3. Nivel o tipo de investigación	35
3.4. Población y muestra	35
3.5. Operacionalización de variables	35
3.6. Plan de recolección de información	35
3.6.1. Caracterización físico-química de las muestras de suelos	35

3.6.2. Aislamiento de potenciales microorganismos diazótrofas	38
3.6.3. Aislamiento, purificación y almacenamiento de diazótrofos de vida libre	39
3.6.4. Caracterización macroscópica de los cultivos microbiológicos	40
3.6.5. Caracterización microscópica de los cultivos microbiológicos	40
3.6.6. Pruebas fisiológicas de crecimiento microbiológico	41
3.7 Plan de procesamiento y análisis de la información	44
3.7.1 Diseño experimental	44
3.7.2. Taxonomía numérica de datos fenotípicos	46
CAPITULO IV	51
ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	51
4.1. Análisis de los Resultados	51
4.1.1. Caracterización físico-química de las muestras medioambientales	51
4.1.2. Aislamiento selectivo de potenciales microorganismos diazótrofas	51
4.1.3. Aislamiento, purificación y almacenamiento diazótrofos de vida libre	52
4.1.4. Caracterización macroscópica de los cultivos microbianos	53
4.1.5. Caracterización microscópica de los cultivos aislados	53
4.1.6. Pruebas fisiológicas de crecimiento	54
4.1.7. Taxonomía numérica de datos fenotípicos	55
4.2. Interpretación de datos	56
4.2.1. Población y diversidad bacteriana	56
4.2.2. Caracterización fenotípica.	57
4.2.3. Taxonomía numérica de datos fenotípicos	59
4.2.4. Capacidad diazótropa	59
4.2.5. Discusión general de actinomicetes	61
4.2.6. Discusión general del trabajo	62
4.3. Verificación de la hipótesis	64
4.3.1. Hipótesis Nula (HO)	64
4.3.2. Hipótesis Alternante (H1)	64

CAPITULO V	65
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	65
5.1. Conclusiones	65
5.2. Recomendaciones	66
CAPÍTULO VI	67
PROPUESTA	67
6.1. Datos informativos	67
6.1.1. Título	67
6.1.2. Instituciones ejecutoras	67
6.1.3. Beneficiarios	67
6.1.4. Ubicación	67
6.1.5. Tiempo estimado para la Ejecución	67
6.1.6. Equipos técnico responsable	67
6.2. Antecedente de la propuesta	67
6.3. Justificación	68
6.4. Objetivos	68
6.4.1. General	68
6.4.2. Específicos	69
6.5. Análisis de factibilidad	69
6.6. Fundamentación	69
6.7. Metodología – Modelo Operativo	69
6.7.1. Caracterización fisico-química de las muestras medioambientales	69
6.7.2. Aislamiento selectivo de actinomicetes	71
6.7.3. Pruebas fisiológicas de crecimiento	72
6.7.4. Determinación de la capacidad fijadora de nitrógeno	73
6.8. Administración	74
6.9. Previsión de la evaluación	74

BIBLIOGRAFÍA	76
ANEXOS	84

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Demanda mundial de fertilizantes, 2014-2018 (miles de toneladas)	10
Tabla 2. Coeficiente de similitud.	31
Tabla3. Operacionalización de variables	36
Tabla 4. Descripción morfológica de colonias bacterianas de acuerdo a la forma, elevación y margen.	40
Tabla 5. Características de los diferentes tipos de morfología de las cadenas de esporas.	41
Tabla 6. Clasificación de los cultivos según el rango de crecimiento en función de la temperatura de incubación	42
Tabla 7. Clasificación de los cultivos según el rango de crecimiento en función del pH del medio.	43
Tabla 8. Clasificación de los cultivos según el rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo.	44
Tabla 9. Tratamientos en estudio	45
Tabla 10. Esquema del análisis de varianza.	45
Tabla 11. Codificación de la información para las pruebas de taxonomía numérica de datos fenotípicos de bacterias.	46
Tabla 12. Codificación de la información para las pruebas de taxonomía numérica de datos fenotípicos de actinos	48
Tabla 13. Administración	74
Tabla 14. Previsión de la evaluación	74

## ÍNDICE DE ANEXOS

### ANEXO A. DATOS EXPERIMENTALES

**Tabla A1.** Origen de muestras de suelo.

**Tabla A2.** Características físico-química de las muestras medioambientales.

**Tabla A3.** Número de colonias obtenidas de los platos del aislamiento selectivo.

**Tabla A4.** Número de ufc/gramo de suelo seco

**Tabla A5.** Codificación de cultivos bacterianos aislados de ecosistemas terrestres

**Tabla A6.** Codificación de cultivos de actinomicetes aislados de ecosistemas terrestres.

**Tabla A7.** Grupos de color formado por los cultivos bacterianos aislados.

**Tabla A8.** Grupos de color formado por los cultivos de actinomicetes aislados de las muestras

**Tabla A9.** Caracterización microscópica de los cultivos bacterianos aislados.

**Tabla A10.** Caracterización microscópica de los cultivos de actinomicetes aislados.

**Tabla A11.** Clasificación bacteriana de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura.

**Tabla A12.** Clasificación bacteriana de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura de aislamiento.

**Tabla A13.** Clasificación de los cultivos de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura

**Tabla A14.** Clasificación de los cultivos de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura de aislamiento.

**Tabla A15.** Clasificación bacteriana de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo.

**Tabla A16.** Clasificación bacteriana de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo de acuerdo al origen de la muestra.

**Tabla A17.** Clasificación de los cultivos de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo.

**Tabla A18** Clasificación de los cultivos de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo de acuerdo al origen de la muestra

**Tabla A19.** Clasificación bacteriana de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo

**Tabla A20.** Clasificación bacteriana de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo de acuerdo al origen de la muestra.

**Tabla A21.** Clasificación de los cultivos de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo.

**Tabla A22.** Clasificación de los cultivos de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo de acuerdo al origen de la muestra.

**Tabla A23.** Grupos-especies basados en el 90% de similitud a partir de taxonomía numérica de datos fenotípicos de bacterias.

**Tabla A24.** Grupos-especies basados en el 90% de similitud a partir de taxonomía numérica de datos fenotípicos de actinomicetes.

**Tabla A25.** Evaluación de los microorganismos representantes de cada grupo especie de bacterias sometidos a la prueba de Nessler.

**Tabla A26.** Evaluación de los microorganismos representantes de cada grupo especie de actinomicetes sometidos a la prueba de Nessler.

**Tabla A27.** Respuestas a la evaluación cualitativa de Nessler en función del origen de la muestra

## **ANEXO B. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

**Tabla B1.** Análisis de varianza para la diversidad bacteriana.

**Tabla B2.** Separación de medias para la diversidad bacteriana del factor A.

**Tabla B3.** Separación de medias para la diversidad bacteriana de la interacción AxB.

**Tabla B4.** Análisis de varianza para el número de ufc por gramo de suelo seco (ufc/g).

**Tabla B5.** Separación de medias para el número de ufc/gramo de suelo seco del factor A.

**Tabla B6.** Separación de medias para el número de ufc/gramo de suelo seco de la interacción AxB

**Tabla B7.** Matriz de código binario usada para taxonomía numérica de las bacterias aisladas en el presente estudio.

**Tabla B8.** Matriz de código binario usada para taxonomía numérica de las bacterias aisladas en el presente estudio

## **ANEXO C. GRÁFICOS**

**Figura C1.** Número de ufc/g de suelo seco para los tratamientos en estudio.

**Figura C2.** Diversidad bacteriana en cada medio de cultivo, según el origen de la muestra.

**Figura C3.** Diversidad de actinomicetes aislados en cada medio de cultivo, según el origen de la muestra

**Figura C4.** Distribución de las bacterias en función de la tinción de Gram

**Figura C5.** Distribución de las bacterias según su forma celular.

**Figura C6.** Clasificación de las bacterias aisladas de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura de incubación.

**Figura C7.** Clasificación de los actinomicetes aislados de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura de incubación

**Figura C8.** Clasificación de las bacterias aisladas de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo

**Figura C9.** Clasificación de los actinomicetes aislados de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo.

**Figura C10.** Clasificación de las bacterias aisladas de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo.

**Figura C11.** Clasificación de los actinomicetes aislados de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo.

**Figura C12.** Clasificación de los grupos-especie de bacterias según los resultados a la prueba de Nessler.

**Figura C13.** Clasificación de los grupos-especie de actinomicetes según los resultados a la prueba de Nessler.

**Figura C14.** Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad de las bacterias aisladas en este estudio.

**Figura C15.** Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad de los actinomicetes aislados en este estudio

## **ANEXO D. MEDIO DE CULTIVO Y SOLUCIONES**

**TablaD1.** Medio de cultivo libre de nitrógeno Winogradsky

**TablaD2.** Medio de cultivo libre de nitrógeno JMV

**TablaD3.** Agar GYM

**TablaD4.** Agar Nutritivo

**TablaD5.** Buffer de Fosfato di Básico de Sodio y Ácido Cítrico

**TablaD6.** Buffer de Hidróxido de Sodio y Ácido Bórico

## **ANEXO E. TABLA DE COLORES**

**Tabla E1.** Tabla de colores utilizada en la caracterización macroscópica.

## **ANEXO F. FOTOGRAFÍAS**

Toma de muestras

Diluciones seriadas en medio selectivo para determinación de población y diversidad.

Purificación de cepas en estrías compuestas

Caracterización microscópica de actinomicetes- cadena de esporas

## RESUMEN

Ciento trece cultivos puros con posible capacidad fijadora de nitrógeno, fueron aislados a partir de muestras de suelo de diferentes ecosistemas, de los cuales 59 fueron bacterias no filamentosas y 54 actinomicetes. Además se determinó si el origen de la muestra o el medio de cultivo influyen en la población y diversidad microbiológica. La muestra proveniente del suelo de bosque de pino mostró alta densidad poblacional con un valor de  $1,11E+08$  ufc/g de suelo seco y amplia diversidad microbiológica. En cuanto a los medios de cultivo empleados no se obtuvo diferencias estadísticas.

De las cincuenta y nueve bacterias aisladas cuarenta y dos presentaron características mesofílicas, mientras que las diecisiete restantes fueron mesófilas extremas. La población de actinomicetes mostró 78% de individuos mesófilos, 17% de mesófilos extremos y 6% de psicrófilos. En general se obtuvieron 43 cepas de alcalitolerantes, 33 neutrotolerantes y 37 acidófilas. Las cepas aisladas presentaron altos índices de tolerancia a las sales del medio donde se desarrollaron siendo 77% de ellas halófilas extremas y 23% halófilas. Se deduce que las respuestas fisiológicas expresadas fueron a causa de las condiciones medioambientales de los hábitats donde crecen naturalmente así como a las adaptaciones evolutivas. La taxonomía numérica de datos fenotípicos permitió construir dendrogramas, evaluando cuarenta y seis caracteres fenotípicos para bacterias y setenta y cuatro para actinomicetes. A 90% de similitud se obtuvieron veinte y nueve grupos-especie para bacterias y veinte y ocho grupos-especie para actinomicetes, reduciendo así la posibilidad de errores y réplicas innecesarias. Esto podría indicar una gran diversidad biológica y metabólica de estos grupos de bacterias.

De estos 57 grupos-especie, se tomaron representantes a los que se les aplicó la prueba de Nessler a fin de comprobar la fijación biológica de nitrógeno. Veinte y dos grupos-especie de bacterias y 25 grupos-especie de actinomicetes dieron positivo. Es decir, 82,5% de bacterias mostraron capacidad de reducir nitrógeno atmosférico.

Los datos obtenidos en la presente demuestran una amplia distribución de los microorganismos diazótrofos de vida libre en diferentes ecosistemas terrestres y permiten sustentar la base para el posible desarrollo de un bioproducto útil para la agricultura.

## **CAPITULO I**

### **EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

#### **1.1. Tema de investigación**

Selección de Bacterias de Vida Libre Eficientes en Fijación Biológica de Nitrógeno como Alternativa Sustentable para Ecosistemas Terrestres.

#### **1.2. Planteamiento del problema**

##### **1.2.1. Contextualización**

###### **Macro**

La fertilidad de un suelo depende de la manera en que se relacionan sus características físicas, químicas y biológicas (Suquilanda, 1996). Un suelo fértil presta alrededor de 13 nutrientes minerales para el óptimo desarrollo de especies vegetales, sin embargo Huertas (2005), destaca al nitrógeno como el elemento de mayor importancia, debido a las grandes cantidades que de él se requieren para el metabolismo de proteínas, nucleótidos y ácidos nucleicos, necesarios para la formación de nuevos tejidos en raíces, tallos y hojas, permitiendo así el crecimiento y desarrollo vegetal. Además, Brandy (1990), menciona la acción estimulante, de dicho elemento, para la asimilación de otros nutrientes.

A fin de aumentar la productividad agrícola, se ha dado lugar a la aplicación de fertilizantes nitrogenados que se han convertido en la fuente más accesible de éste elemento. Debido a sus altas concentraciones y disponibilidad las plantas reaccionan rápidamente a su aplicación, relegado la fertilización orgánica cuyo nitrógeno no está 100% disponible. De esta manera no solamente se pierden nutrientes sino también agentes microbianos antagonistas de patógenos y otros microorganismos benéficos, dentro de los cuales se encuentran diferentes grupos de bacterias con capacidad para fijar nitrógeno atmosférico (Arauz, 1997; Huertas, 2005).

Debido al incremento en la demanda vegetal y al desgaste del suelo, cada año aumenta la cantidad de fertilizantes empleados, los costos de la producción y los daños medioambientales (Orozco, 1995). Según el último informe de la FAO (2015), el consumo mundial de fertilizantes crecerá un 1,8% anual hasta 2018 sobrepasando los 200.500.00 toneladas 25% más que el registrado en el 2008 y se prevé que la demanda de nitrógeno sintético aumente a razón del 1,4% durante los próximos 3 años, la demanda de este tan importante elemento ha crecido vertiginosamente, por tanto se espera que alcance 119.400.000 toneladas en 2018.

Desde el punto de vista del impacto en el ecosistema Kiehl (1995), indica los beneficios temporales de aplicar fertilizantes sintéticos. Así también, enfatiza que el mal manejo y abuso en la aplicación de químicos nitrogenados produce graves problemas medio ambientales ya que, genera residuos químicos, saliniza suelos y aguas, ocasiona problemas en el drenaje, compacta el suelo y disminuye la actividad microbiana comprometida en el proceso de nutrición vegetal.

### **Meso**

El nitrógeno constituye el 78% de la composición de la atmósfera, mostrándose en su estado molecular ( $N_2$ ), prácticamente inerte en esta forma, debido a su triple enlace e inasequible por los vegetales. La única forma en que los seres vivos pueden aprovechar el nitrógeno atmosférico es mediante la reducción del mismo hasta una forma catiónica de amonio ( $NH_4^+$ ) o aniónica de nitrato ( $NO_3^-$ ) (Zuberer, 1998). Esto ocurre naturalmente por procesos abióticos no controlados o mediante fijación biológica de nitrógeno (FBN), llevada a cabo mediante procesos metabólicos de microorganismos denominados diazótrofos. Los únicos seres vivos capaces de realizar este proceso pertenecen a los Dominios Bacteria y Archaea, representados por 87 especies en dos géneros de arqueas, 38 géneros de bacterias, y 20 géneros de cianobacterias (Baca *et al.*, 2000).

Los microorganismos diazótrofos presentan una amplia diversidad taxonómica, capaces de proliferar independientemente o estableciendo relaciones de simbiosis con raíces de leguminosas (Parsons, 2004). Los mismos que dan lugar a la fijación de nitrógeno gracias

a la actividad del complejo enzimático Nitrogenasa (Nasa), formado por dos metaloproteínas. Además, requiere de la colaboración de otras dos proteínas llamadas ferredoxina y flavodoxina que actúan como donadores de electrones. Emplea también iones inorgánicos de  $Fe^{2+}$ ,  $Mo^{6+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  y  $V^{5+}$  como activadores (Baca *et al.*, 2000).

Por otro lado, Rodríguez *et al.*, (1998), manifiestan que la actividad catalítica del complejo Nasa es inactivada en la presencia de oxígeno. A pesar de ello, los sistemas fijadores de nitrógeno han desarrollado, a lo largo de su evolución, una serie de estrategias fisiológicas, para resguardarse total o parcialmente del oxígeno. Otros factores que afectan la cantidad de nitrógeno fijado son el número de microorganismos diazótrofos, luz, temperatura, humedad, presencia de nitrógeno asimilable, entre otros (Ruíz, 2013).

### **Micro**

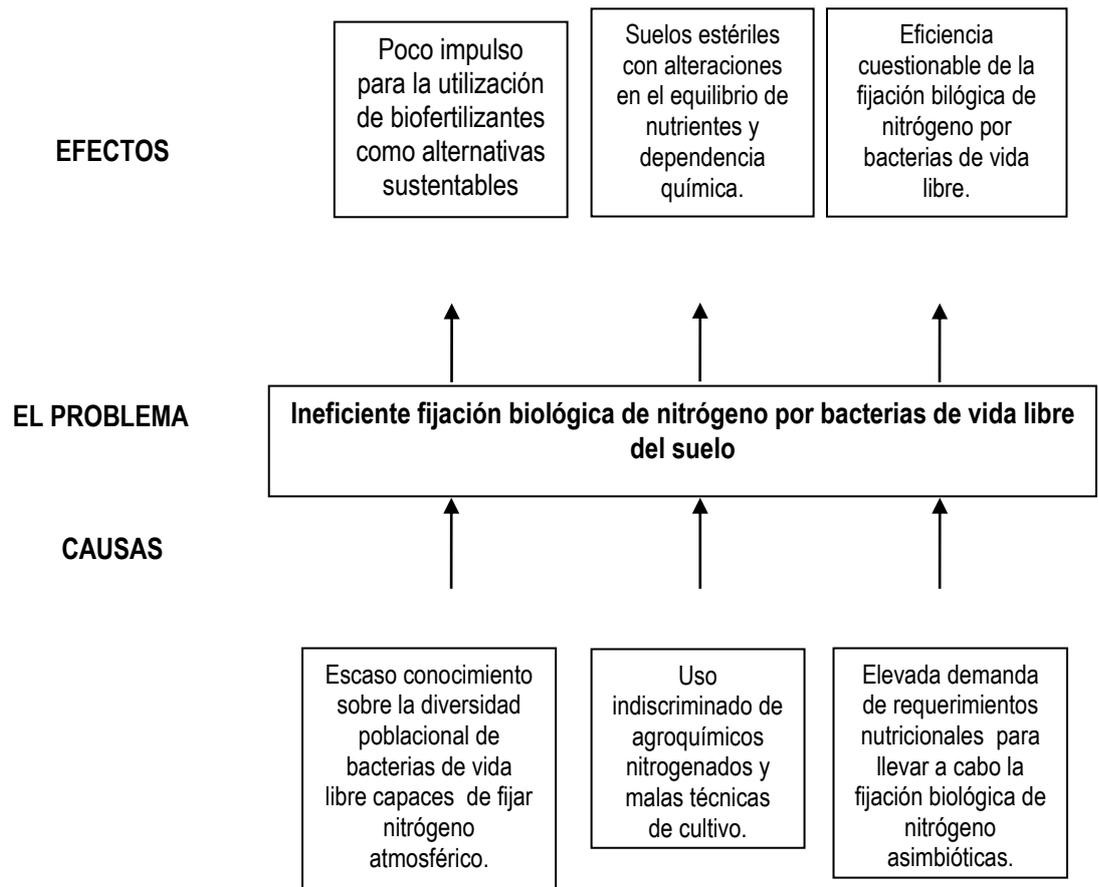
A diferencia de los diazótrofos simbiotes, que benefician directamente a plantas leguminosas, los de vida libre proporcionan al medio, dónde se desarrollen, compuestos nitrogenados que pueden ser aprovechados por todo tipo de especies vegetales, se multiplican rápidamente y proporcionan ventajas como la regulación del crecimiento vegetal, producción de hormonas vegetales y enzimas extracelulares que favorecen a la solubilización de fosfatos y oligoelementos, facilitando la asimilación de estos compuestos (Hernández, 1998).

Las bacterias de vida libre pueden ser anaeróbicas obligadas o facultativas como *Clostridium pasteurianum*, *Klebsiella*, *Desulfovibrio*. Aeróbicas obligadas como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*. Fotosintéticas como bacterias púrpuras sulfurosas y no sulfurosas y bacterias verdes sulfurosas (Allan y Graham, 2002). El género *Azotobacter* representa el grupo de bacterias diazótroficas de mayor interés para la agricultura, *A. chroococcum* es la especie más abundante en los suelos neutros y alcalinos, mientras que *A. beijerinckii* domina en suelos ácidos (Mishustin y Shilnikova, 1969).

Sin lugar a dudas, la aplicación de microorganismos diazótrofos sobre los suelos cultivables genera la activación de los sistemas agrícolas sustentables, por su beneficio ambiental, mitigando el uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos y evitando aumentar la

superficie cultivable, sin mencionar la disminución de los costos de producción (IAB, 2001).

### 1.2.2. Análisis Crítico



### 1.2.3. Prognosis

De no concluirse el presente trabajo investigativo, se perdería la posibilidad de encontrar bacterias de vida libre aptas para la fijación de nitrógeno atmosférico, dejando de lado la posibilidad de promover el desarrollo sostenible de la agricultura. Al ignorar el potencial de dichos microorganismos, como agentes biofertilizantes, se fomentará el uso desmedido de agroquímicos y por tanto a su dependencia, lo cual conllevaría a incrementos económicos en la producción agropecuaria.

De no fomentar la fijación biológica de nitrógeno, se seguirían produciendo casos de fitotoxicidad por las concentraciones cada vez más altas de fertilizantes químicos que demandarían las cosechas y a su vez alteración en la dinámica de nutrientes, ocasionada por la esterilización del suelo. También, en una búsqueda desesperada de soluciones se empezaría a aumentar las superficies de cultivo, lo que llevaría a una pérdida de bosques y páramos y con ellas la desaparición de especies únicas de macro y micro biota.

#### **1.2.4. Formulación del problema**

¿La biodiversidad bacteriana presente en las muestras recolectadas presentará eficiencia en la fijación biológica de nitrógeno?

#### **1.2.5. Preguntas directrices**

¿Cómo se realiza el aislamiento de bacterias asimbióticas con capacidad diazotrófica?

¿Qué parámetros taxonómicos son valorados para determinar la diversidad poblacional de las bacterias con potencial diazotrófico?

¿Cómo se evalúa cualitativamente la eficiencia de fijación de nitrógeno de las bacterias seleccionadas?

### **1.3. Justificación**

La agricultura es considerada pilar fundamental de las actividades económicas, sociales y ambientales y se ha vuelto un desafío sobrellevarla a la par de los requerimientos y exigencias de la población por tanto, la demanda productiva y las malas técnicas de cultivo han ocasionado el deterioro del suelo, afectado en su dinámica nutricional y por consiguiente la disminución de la calidad en la producción vegetal.

Dicho inconveniente ha llevado a los agricultores a intentar reavivar sus tierras proporcionándoles fuentes de nutrientes sintéticos, para incrementar los rendimientos y calidad de los cultivos, efecto que se ha conseguido temporalmente. Sin embargo, ha dejado más secuelas negativas que ventajas. Es por ello que se han desarrollado investigaciones a fin de encontrar un fertilizante amigable con el medio ambiente y que pueda alcanzar e incluso superar los rendimientos de los fertilizantes químicos.

Es así que se proyecta a los microorganismos fijadores de nitrógeno como una alternativa sustentable que disminuya o remplace el empleo de químicos nitrogenados. Dentro de este grupo de microorganismos se han distinguido dos clases: los simbióticos y los asimbióticos o de vida libre, ambos con un amplio potencial para llevar a cabo el proceso de fijación del nitrógeno atmosférico. Aun así, los fijadores simbióticos, a pesar de mostrar buenos rendimientos tienen una limitación genética, ya que estos sólo actúan en interacción con la rizósfera de plantas leguminosas, dejando de lado los cultivos vegetales de otras especies. Esto no ocurre con las bacterias de vida libre, las mismas que sin necesidad de una asociación específica están en la capacidad de asegurar la disponibilidad de nitrógeno en el suelo, a fin de sustituir a los fertilizantes químicos y proporcionar beneficios nutricionales a todo tipo de cultivo.

La identificación y selección de fijadores biológicos asimbióticos de nitrógeno favorecerá a los rendimientos de la producción agrícola y ayudará a reducir los daños medioambientales. Este trabajo investigativo ofrece una alternativa viable y de gran valor para la agricultura sostenible del país. Los resultados obtenidos en el presente estudio proporcionan las bases para el desarrollo de posibles nuevos biofertilizantes de alta calidad y eficiencia, que suplan las necesidades del sector agrícola, de forma que se disminuya la dependencia química y así también, se regenere el equilibrio nutricional del mismo, además de reducir los costos de producción y mantenimiento de cultivo.

Por tanto la presente investigación analizó suelos de cinco ecosistemas diferentes, de donde se seleccionaron diazótrofos de vida libre. Se evaluó y comprobó su eficiencia en la fijación biológica de nitrógeno, demostrado así su extraordinario potencial para el aprovechamiento del nitrógeno atmosférico y sus beneficios sociales, económicos y ambientales principalmente en el sector agrícola.

## **1.4. Objetivos**

### **1.4.1. General**

Seleccionar bacterias de vida libre de cinco ecosistemas diferentes que sean eficientes en la fijación biológica de nitrógeno.

#### **1.4.2. Específicos**

Aislar bacterias de vida libre, con posible capacidad diazotrófica.

Determinar la diversidad poblacional de bacterias, con posible potencial para fijar nitrógeno atmosférico, mediante taxonomía numérica de datos fenotípicos.

Evaluar cualitativamente la fijación biológica de nitrógeno de las cepas de bacterias de vida libre seleccionadas por taxonomía numérica.

## **CAPITULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1 Antecedentes investigativos**

##### **2.1.1 Ecosistemas terrestres**

En general, se considera ecosistema al conjunto de elementos bióticos y abióticos que conforman la biocenosis de una determinada zona geográfica, cuyas condiciones climatológicas y nutricionales, favorecen el desarrollo de las comunidades de organismos vivos. La temperatura, la radiación UV, las precipitaciones, estaciones climatológicas, el tipo de suelo, las condiciones hídricas de humedad, la morfología, la composición mineral, relieve, acceso y ubicación de un determinado ecosistema hacen de él un lugar propicio o no, para el desarrollo no sólo de las comunidades bacterianas sino también de la actividad antropogénica misma que constituye un factor directo en el desarrollo de las comunidades microbiológicas (Álvarez y Jiménez, 2012).

##### **2.1.2 El nitrógeno y las plantas**

El ciclo vital de autótrofos superiores se basa en la absorción de agua y nutrientes minerales del suelo, anhídrido carbónico del aire y energía lumínica del sol, que mediante el proceso metabólico de fotosíntesis hacen posible la catálisis y asimilación de los bioelementos necesarios para su desarrollo. A más de carbono, hidrógeno y oxígeno las plantas demandan otros 13 nutrientes minerales esenciales, mismos que deben ser suministrados por el suelo o fertilizantes, siendo estos orgánicos o sintéticos. Dichos nutrientes se catalogan en principales: nitrógeno, fósforo y potasio, secundarios: calcio, magnesio y azufre y micronutrientes u oligoelementos: bromo, cloro, cobre, hierro, manganeso, molibdeno y zinc (FAO, 2000).

La supervivencia y óptimo desarrollo de las especies vegetales depende principalmente del nitrógeno asimilable disponible en el suelo. La importancia de dicho elemento se fundamenta en su rol metabólico y estructural ya que se encuentra presente en la composición de proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares como vitaminas, fitohormonas, pigmentos, purinas y pirimidinas (Menezes, 2009).

Sin embargo, el 98% del N del suelo se halla en formas no asimilables. Alrededor del 1 al 3% de este elemento, depreciando las pérdidas por volatilización o lixiviación, se encuentra mineralizado y puede considerarse fuente de nutrimento. Por otro lado, el nitrógeno atmosférico representa el 78% del aire, en forma diatómica  $N\equiv N$ , cuyo triple enlace hace de ésta, una molécula prácticamente inerte y por lo tanto no asimilable por las plantas. Para que una especie vegetal pueda usar nitrógeno atmosférico, éste debe ser reducido y fijado en forma de iones amonio ( $NH_4^+$ ) o nitrato ( $NO_3^-$ ) (Menezes, 2009).

En la naturaleza estas transformaciones ocurren en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno, donde la fijación biológica es el principal mecanismo por el cual dicho elemento es reducido a formas asimilables por las plantas, este proceso demanda alta cantidad de energía, representada por 16 a 24 ATP por molécula de  $N_2$  fijada (Frioni, 2006). Un pequeño grupo de microorganismos altamente especializados que incluyen algas, bacterias y actinomicetes (Menezes, 2009) son los encargados de llevar a cabo las transformaciones intermedias, así como la fijación del nitrógeno atmosférico, manteniendo un estado de equilibrio en el ciclo del nitrógeno, fundamental para la vida en la tierra y por tanto conservando ecosistemas microbianos presentes en los medios terrestres y acuáticos (Díaz, 2010).

### **2.1.3 Fertilizantes nitrogenados**

#### **Fertilizantes nitrogenados de síntesis química**

La producción agrícola, hasta mediados del siglo XX, se efectuaba de manera tradicional, es decir utilizando técnicas ancestrales y productos naturales. Sin embargo en la segunda mitad de dicho siglo se llevó a cabo la revolución agraria y con ella aumentó la demanda de productos vegetales tanto para la industria como el consumo regular. Por tales motivos aparecen en el mercado los primeros fertilizantes sintéticos como una innovación prometedora, la misma que atrajo a los agricultores volviéndolos testigos de los efectos en primer plano asombrosos, al aumentar los rendimientos en la producción en respuesta de los estímulos químicos que ocasionaban en las plantas (Sinergia, 2006).

La demanda en la producción agraria ha venido incrementándose cada vez más, por tal motivo los agricultores se han visto presionados a usar fertilizantes químicos como alternativa rápida para incrementar la producción vegetal (Plascencia, 2013). Además, la aplicación irracional y desmedida de dichos compuestos nitrogenados sintéticos no solo

permite que los cultivos se desarrollen, sino también las malas hierbas. Esto provoca la aparición de plagas y enfermedades y por consecuencia al surgimiento de plaguicidas también de origen químico, cuya aplicación dejó un suelo débil y estéril (Sinergia, 2006). A más de ello los cultivos solo absorben alrededor de un 20 a 40% de fertilizante aplicado, el resto se pierde por diferentes rutas. Es así que los fertilizantes químicos han traído consigo cuantiosas pérdidas económicas y altos niveles de contaminación ambiental como eutrofización, contaminación de aire y debilitamiento del suelo (Duxbury, 1994).

Como se muestra en la Tabla 1, la demanda de fertilizantes es cada vez más elevada. La adición sistemática de dichos fertilizantes, ha creado dependencia en los suelos, es así que hoy en día para obtener los mismos resultados conseguidos décadas atrás es necesario incrementar la dosis de 20 unidades a 240 unidades de fertilizante. El uso de nitrógeno sintético en los últimos 40 años ha aumentado de 3.5 millones a 80 millones de toneladas, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (Sinergia, 2006).

Sin embargo, Ruiz *et al.*, (2008), mencionan que el efecto de un fertilizante sintético no solo depende de los nutrientes que contiene, sino de ciertas características de composición, manejo, riego, técnicas de cultivo, etc.

**Tabla 1. Demanda mundial de fertilizantes 2014-2018 (miles de toneladas)**

Año	2014	2015	2016	2017	2018
Nitrógeno (N)	113 147	115 100	116 514	117 953	119 418
Fosfato (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	42 706	43 803	44 740	45 718	46 648
Potasio (K <sub>2</sub> O)	31 042	31 829	32 628	33 519	34 456
Total (N+ P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> +K <sub>2</sub> O)	186 895	190 732	193 882	197 190	200 522

**Fuente:** FAO, 2015.

El manejo inadecuado de la fertilización química, con altas dosis, baja calidad de nutrientes y la forma en que los abonos se suministran, alteran la bioquímica de la planta y al suelo. Además, los abonos químicos traen consigo efectos secundarios y alteraciones como la disminución de oligoelementos y materia orgánica, así como la resistencia a enfermedades. Vessey (2003), añade el deterioro de recursos naturales, agua, aire y suelo, pérdidas en la diversidad microbiológica, disminución de los recursos forestales, erosión del suelo, cambios climáticos y reducción de la superficie cosechable, que incluso puede conllevar problemas sociales y económicos.

## **Biofertilizantes nitrogenados**

En general un biofertilizante puede ser considerado desde abonos verdes, estiércoles, residuos orgánicos de actividades antropogénicas hasta residuos animales en descomposición. También se puede incluir cualquier sustancia biológica que albergue células vivas latentes, incluyendo aquellos microorganismos eficientes en fijación de nitrógeno, solubilización y potenciación de nutrientes, de manera que incrementen los niveles de nutrientes esenciales para el desarrollo y rendimiento de los cultivos. Los biofertilizantes pueden ser inoculados directamente al suelo, cultivos o semillas, sin generar pérdidas, y pueden reemplazar total o parcialmente el uso de fertilizantes sintéticos (Bojórquez *et al.*, 2010; Whelan, 2013).

Los microorganismos que dan origen a los biofertilizantes pueden clasificarse en dos grupos: microbios con la capacidad de generar sustancias metabólicas que promuevan el crecimiento y desarrollo de especies vegetales fijando nitrógeno atmosférico, solubilizando hierro y fósforo inorgánico, además optimizando la tolerancia al stress por sequía, salinidad, metales pesados y sustancias tóxicas, como pesticidas. El segundo grupo incluye microorganismos capaces de prevenir o mermar los efectos de enfermedades causadas por patógenos (Bashan y Holguín, 1998).

Muchos microorganismos que actúan como biofertilizantes poseen un amplio espectro de acción, como por ejemplo *Bacillus subtilis* mencionado por Gupta *et al.*, (2000), que produce auxinas capaces de promover el crecimiento de tomate e inducir resistencia sistémica contra *Fusarium oxysporum*, evitando que se genere marchitez y pudrición de las raíces. Al ser productos naturales, su utilización no deja residuos tóxicos ni implica riesgos para la salud ni el medio ambiente (Whelan, 2013).

A pesar de ser productos altamente beneficiosos para la producción agraria, su aplicación no ha sido ampliamente difundida, ya que al ser inoculantes inocuos se requiere de un cuidadoso manejo para no disminuir su efectividad. Además, en muchas zonas agrarias existe renuencia a usar microorganismos como biofertilizantes ya que se los asocia con enfermedades (Bashan, 2008). Es por ello que para introducir satisfactoriamente estos bioinsumos en la producción vegetal, los gobiernos junto con las empresas que los

producen deben respaldar y capacitar a los agricultores sobre factores climatológicos, de campo y de manejo que facilitan la correcta utilización de biofertilizantes y optimicen los beneficios que prestan (Whelan, 2013).

Whelan (2013), manifiesta además que la implementación de biofertilizantes en los sistemas de producción agrícola trae grandes beneficios sin ejercer un impacto perjudicial sobre el ambiente, ya que a más de promover el desarrollo vegetal, los fertilizantes naturales son considerados una herramienta biotecnológica que genera beneficios tangibles, es amigable con el ambiente, y por ser socioeconómico y culturalmente aceptables contribuyen al desarrollo sustentable.

#### **2.1.4 Fijación industrial de nitrógeno por el proceso Haber - Bosch**

El proceso Haber-Bosch, es el mecanismo más popular de síntesis industrial de fertilizantes nitrogenados, mismo que genera amoníaco a gran escala mediante la reacción directa entre nitrógeno gaseoso tomado del aire e hidrógeno gaseoso proveniente de hidrocarburos ( $\text{CH}_4$ ) en presencia de un catalizador, en los inicios, se usaba uranio, osmio o níquel hoy en día se lleva a cabo con un catalizador heterogéneo a base de Hierro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), la reacción nitrógeno - hidrogeno se da en proporción 1:3 a una temperatura de 350 - 550 °C y a 140 - 320 atm de presión lo que ocasiona el rompimiento del triple enlace  $\text{N}\equiv\text{N}$ , y por lo tanto la reducción de la molécula diatómica de  $\text{N}_2$  generando así dos moléculas de  $\text{NH}_3$  (Rodríguez *et al.*, 2011 ; Baca *et al.*, 2000).

La FBN se enfrenta a las mismas barreras energéticas, pero gracias a la acción del complejo enzimático Nitrogenasa (Nasa) se desarrolla en condiciones ligeras de: temperatura ambiente y presión parcial de  $\text{N}_2$  de 0.78 atm (Baca *et al.*, 2000).

La contaminación provocada por las sustancias de desecho del proceso Haber-Bosch afecta a las personas, al aire, la tierra y las fuentes de agua, como consecuencia de la producción y uso de fertilizantes químicos nitrogenados en la ganadería y la agricultura industrial (Rodríguez *et al.*, 2011).

### 2.1.5 Fijación biológica de nitrógeno (FBN)

Halbleib y Ludden (2000) definen la fijación biológica de nitrógeno como un proceso metabólico exclusivo de microorganismos denominados diazotróficos, mismos que incluyen bacterias heterótrofas aerobias, anaerobias y anaerobias facultativas, bacterias quimioautótrofas y microorganismos fotosintéticos tanto bacterias como cianobacterias. Dicho mecanismo consiste en la conversión del gas nitrógeno presente en el aire ( $N_2$ ) hasta su forma más reducida, es decir iones amonio ( $NH_4^+$ ) o iones nitrato ( $NO_3^-$ ) y su incorporación a los sistemas de producción agraria (Baca *et al.*, 2000). Los microorganismos capaces de llevar a cabo este mecanismo tienen en común el complejo enzimático Nitrogenasa, formado por la Fe-proteína y la Fe-Mo-proteína, este complejo procesa el nitrógeno gaseoso en sucesivos ciclos que lo reducen (Abela, 2007).

La FBN es llevada a cabo por diferentes géneros bacterianos diazotróficos que se clasifican según la relación que establecen con las plantas: fijadores de vida libre, rizosféricos o asociativos y endófitos o simbióticos, es así que las plantas se ven beneficiadas de la FBN cuando dichos microorganismos mueren y liberan el nitrógeno o aprovechando de la asociación microorganismo-planta. (Frioni, 2006; Willems *et al.*, 2003).

La ruptura del triple enlace de cada molécula de  $N_2$  genera la reducción hasta  $NH_4^+$  sin embargo, es un proceso altamente demandante de energía, con un gasto de alrededor de 16 a 24 moléculas de ATP por  $N_2$  convertido (Frioni, 2006), la demanda y forma energética dependerá de las condiciones en las que se encuentre el microorganismo, es así que, las asociaciones bacteria-planta aprovechan la energía producida por fotosíntesis realizada por la planta, mientras que los fijadores de vida libre deben tomar la materia orgánica del medio y transformarla en energía (Abela, 2007).

Por lo tanto, para que la FBN ocurra debe darse bajo estrictas condiciones y regulaciones como: disponibilidad de fuente de energía, presencia de elementos como el azufre, hierro, molibdeno, vanadio y manganeso que forman parte de la estructura de la enzima nitrogenasa y son necesarios como coenzimas, equilibrio hídrico, protección contra el oxígeno y control de inhibidores (Fu y Burris 1989; Zimmer y Mendel, 1999; Serraj *et al.*,

1999). Bajo el cumplimiento de dichos parámetros la reducción de nitrógeno atmosférico puede desarrollarse con normalidad según la reacción:



Mostrándose similar al proceso Haber-Bosch ( $\text{N}_2 + 3\text{H}_2 \rightarrow 2\text{NH}_3^+$ , 500°C y 350 atm), método comercial de la producción de amoníaco para nitrogenados químicos.

La FBN aporta aproximadamente con la mitad del nitrógeno requerido por los cultivos a nivel mundial, el restante es suministrado por los fertilizantes nitrogenados sintetizados en su mayoría por el método Haber Bosch, con un gasto energético del 1% de la energía total consumida a nivel mundial (Abela, 2007).

Burns y Hardy (1975), estimaron que la fijación de nitrógeno a nivel mundial alcanzaría los 275 millones de toneladas anuales, de los cuales 30 corresponden al ciclo biogeoquímico, 70 a fijación industrial y 175 al proceso de fijación biológica, y aunque la fijación simbiótica es más eficiente con 80% está limitada a un determinado grupo de especies vegetales.

### **2.1.6 Microbios fijadores de nitrógeno**

Banerjee *et al.*, (2006), mencionan que los microorganismos fijadores de nitrógeno comprenden un grupo de bacterias denominadas diazotróficas, mismas que se están incluidas en el grupo conocido como (PGPR) o bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Alrededor de 87 especies de 2 géneros de archaea, 38 géneros de bacterias y 20 géneros de cianobacterias han sido catalogados como fijadores de nitrógeno (Zahran, 2001).

Según la relación que presenten los microbios fijadores de nitrógeno con las plantas pueden clasificarse en: fijadores de vida libre, asociativos y simbióticos abarcando bacterias, cianobacterias, actinomicetes y arqueas, microorganismos procariotas con requerimientos ambientales diferentes unos de otros, sean estos temperatura, pH y humedad, además el tipo de respiración, siendo aerobias o anaerobias facultativas u obligadas, difieren también según la fuente de carbono en autótrofas o heterótrofas, sin embargo todas ellos tienen la capacidad de reducir el nitrógeno atmosférico (Rodríguez *et al.*, 2011) al tener en común el complejo enzimático Nitrogenasa, que los hace altamente

especializados, dando lugar a la catálisis de la reacción de reducción del  $N_2$  a  $NH_4^+$  usando energía metabólica, ATP, a temperatura y presión normales (Becana y Bedmar, 1991).

### **Microorganismos diazotróficos asociativos no simbióticos**

Rodríguez *et al.*, (2011), nombran a los microorganismos rizosféricos asociativos como fijadores de nitrógeno que infectan la zona radical de ciertas plantas, sin provocar cambios morfológicos, y aprovechan los exudados radiculares para su óptimo crecimiento y desarrollo debido a la presencia de carbohidratos y aminoácidos, cuyas concentraciones varían según el tipo de planta y las condiciones abióticas a las que ha sido expuesta.

Los fijadores rizosféricos generalmente se asocian con gramíneas como arroz, trigo, sorgo y maíz, la contribución de nitrógeno fijado de dichas interacciones no leguminosas es notable y de gran impulso económico. Entre los géneros de bacterias que corresponden a este mecanismo de fijación se nombran *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Azoarcus*, *Acetobacter*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Paenibacillus* y *Pseudomonas*. (Döbbelaere *et al.*, 2002). Estos diazótrofos se extienden desde hábitats acuáticos hasta terrestres, hay registros de su presencia en zonas árticas y de trópico (Barraquío *et al.*, 2000).

### **Microorganismos diazotróficos simbióticos**

La FBN por bacterias simbiontes se ha reportado sólo en leguminosas y plantas actinorizas como: aliso, olivo, arrayán, pino, etc. Esta asociación se lleva a cabo por medio de estructuras diferenciadas producidas por la planta hospedera denominadas nódulos localizados en las raíces de las especies vegetales en cuyo interior se alojan las bacterias diazotróficas, esta asociación es bilateral ya que los microorganismos toman ácidos orgánicos de las plantas como fuente de carbono y energía, además el sistema de protección contra el oxígeno es suministrado por la planta, mientras las bacterias entregan en respuesta compuestos nitrogenados como los ureidos y amidas de reserva que son entregados directamente al xilema (Baca *et al.*, 2000; Espín, 2002).

La organogénesis de la estructura nodular se lleva a cabo por la interacción microorganismo – planta mediante un intercambio de señales químicas, para lo cual es indispensable que se dé la infección del micro simbiote en los pelos radiculares de la planta, provocando su curvatura y así la penetración de la bacteria hasta el córtex radical dando lugar a lo que se conoce como hilo de infección, lugar donde se desarrollaran los microorganismos. En respuesta a la infección la planta produce sustancias de tipo flavonoide mismas que son excretadas en los exudados radiculares y captadas por las bacterias hospederas, dichas sustancias activan los genes de nodulación del micro simbiote (genes nod) los mismos que inducen la producción de sustancias con efecto mitógeno (factores de nodulación) y se da lugar a la formación del meristemo nodular. La producción de los factores de nodulación induce, a distancia, la división celular bacteriana a nivel del córtex. (Baca *et al.*, 2000).

Existe una gran diversidad de diazótrofos de simbiosis, sin embargo la mayoría lo es con respecto a plantas leguminosas como los géneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium* y *Rhizobium* junto con otros grupos tales como *Methylobacterium*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium* (Valverde *et al.*, 2005) y *Shinella*, bacterias como *Burkholderia* y *Cupriavidus* (Chen *et al.*, 2001). Sin embargo, existen algunos microorganismos capaces de realizar fijación de nitrógeno por simbiosis en plantas no leguminosas, árboles, entre los cuales destacan actinomicetes como *Frankia* (Baca *et al.*, 2000) y cianobacterias unicelulares o filamentosas como *Nostoc* y *Anabaena* (Cassan *et al.*, 2001).

### **Microorganismos diazotróficos de vida libre**

Las bacterias diazótrofes asimbióticas o de vida libre, llevan a cabo el mecanismo de fijación biológica de nitrógeno sin interactuar directamente con ninguna especie vegetal en particular, y a más de proporcionar nitrógeno en formas asimilables para todo tipo de especies vegetales, favorecen el desarrollo de la zona radicular (Cassan *et al.*, 2001) por su producción adicional de sustancias reguladoras del crecimiento como: alginatos, poli- $\alpha$ -hidroxibutirato (Horan *et al.*, 1983), fitohormonas como: auxinas, citoquininas y giberelinas (González *et al.*, 2008).

Los fijadores de vida libre requieren altas cantidades energéticas para llevar a cabo la FBN, parte de esa energía es suministrada indirectamente por las plantas, ya que las bacterias toman los exudados radiculares como fuente de carbono y por tanto de energía, para llevar a cabo sus acciones metabólicas (Horan *et al.*, 1983). La capacidad de fijación de  $N_2$  por las bacterias de vida libre varía en función de varios factores como: la composición del medio (M.O.), el pH del suelo, la temperatura, aireación, la presencia de nitrógeno combinado, la naturaleza de las fuentes de carbono, los oligoelementos y de la acción de organismos antagónicos en el medio (Zuberer, 1998).

Sin embargo, a lo largo de la evolución, estos microorganismos han desarrollado diferentes mecanismos de adaptación y protección del complejo Nitrogenasa (Cassan *et al.*, 2001), sin embargo el nitrógeno fijado no es entregado directamente a la planta y sólo puede ser aprovechado después de la muerte y lisis celular (Frioni, 2006).

Estas bacterias se encuentran distribuidas en todos los hábitats. Entre los principales géneros fijadores de nitrógeno de vida libre Rodríguez *et al.*, (2011) mencionan *Azotobacter*, *Azotococcus*, *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Chromatium*, *Chlorobium*, *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* y *Klebsiella*.

### **2.1.7 Nitrogenasa (Nasa)**

Baca *et al.*, (2000) mencionan que todos los organismos diazotróficos llevan a cabo la fijación biológica de nitrógeno gracias a la presencia y actividad del complejo enzimático Nitrogenasa. Por tanto esta enzima es la responsable de la FBN, aunque sea considerada inespecífica (Ramos, 2009) por su capacidad de reducir otras moléculas dotadas también por un triple enlace como es el caso de los cianuros ( $N\equiv C$ ) y el acetileno ( $HC\equiv CH$ ). Están catalogadas como oxidoreductasas, dentro de la clasificación enzimática, por su capacidad de reducir el  $N_2$  a  $NH_4^+$  (Chan y Jongsun, 1993).

El complejo enzimático Nasa es un heterodímero formado por dos subunidades metaloproteicas, una grande y otra pequeña (Flores *et al.*, 2012). La subunidad grande o componente I, conocido como dinitrogenasa es un heterotetrámero de aproximadamente 220kDa formado, a su vez, por dos tipos de subunidades  $\alpha_2\beta_2$ . Posee dos centros metálicos sulfoférricos ( $4Fe - 4S$ ) conocidos como agrupamientos P unidos por enlaces covalentes a residuos de cisteína de ambas subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y dos grupos hierro –

molibdeno como cofactores y parte de su centro activo (FeMo Co) ligados a la subunidad  $\alpha$ , su composición metálica es de 2Mo, 30Fe y 30S (Baca *et al.*, 2000; Postgate, 1982).

El componente II o subunidad pequeña se denomina dinitrogenasa reductasa es un homodímero de aproximadamente 68kDa (Baca *et al.*, 2000) formado por dos subunidades idénticas ( $\alpha_2$ ) unidas entre sí por un grupo sulfuríferico y que emplea hierro (Fe Co) como cofactor. (Postgate, 1982).

La síntesis y activación de la enzima nitrogenasa está regulada a nivel de la transcripción y la expresión de un cluster de genes denominado Nif, dependiente de la disponibilidad de nitrógeno en el medio donde se desarrolle el microorganismo (Gadkari *et al.*, 1992). Postgate (1982), menciona que la subunidad  $\alpha$  del componente I está codificada por el gen NifD, mientras que el gen responsable de la síntesis de la subunidad  $\beta$  es el NifK, por otro lado el componente II es codificado por el gen NifH. Baca *et al.*, (2000) indican que la FBN está codificada por aproximadamente 20 genes que a más de estar involucrados en la síntesis estructural del complejo enzimático, ayudan a la maduración de la Nasa, síntesis de cofactores, transporte de molibdeno y procesos de regulación.

El mecanismo de acción de la Nitrogenasa (Figura 1) depende, en principio, de la colaboración de proteínas no hémicas, ferredoxina o flavodoxina, que actúan como donadores de electrones de bajo potencial y reductores naturales de la Nasa (Ramos, 2009; Baca *et al.*, 2000), además de la hidrólisis de ATP que está acoplada a la transferencia de electrones ( $e^-$ ) hacia el componente I y de un ambiente anaerobio (Baca *et al.*, 2000).

La captación de electrones donados, ya sea por la ferredoxina o la flavodoxina, tiene lugar en el complejo II por lo cual es reducido y cambia su conformación al unirse a dos moléculas de ATP lo que le permite acoplarse al complejo I y traspasar los electrones cedidos por las proteínas no hémicas hacia los cúmulos P, en ese momento se reduce la dinitrogenasa, además se produce hidrólisis del ATP lo que provoca la separación de los complejos, posteriormente ocurre una transferencia interna de electrones desde las agrupaciones P hacia los cofactores del centro activo (FeMo Co) del componente I lo que sugiere un cambio conformacional para dar lugar a la unión con el sustrato ( $N_2$ ) el que a su vez es receptor final de los electrones y protones transferidos por el componente I rompiendo su triple enlace y reduciéndolo hasta amonio (Sánchez, 2009; Hernández, 1998; Ramos, 2009).

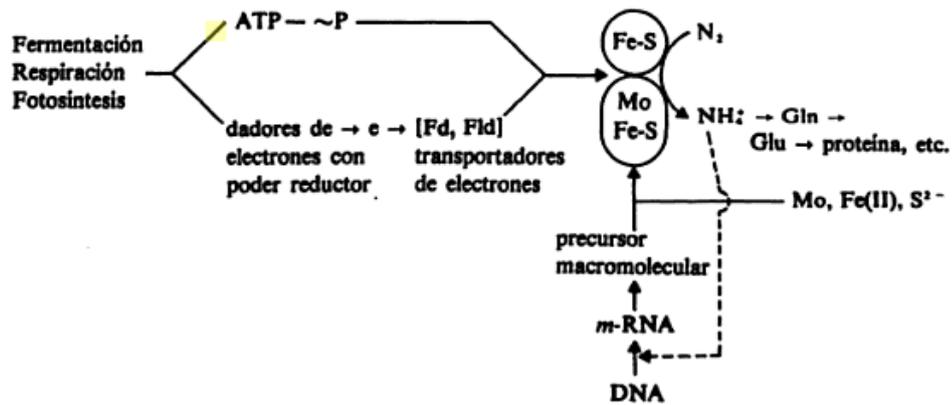


Figura 1. Mecanismo de acción del complejo enzimático Nitrogenasa (Ochiai, 2003).

La reducción de una molécula de N<sub>2</sub> genera dos moléculas de NH<sub>3</sub><sup>+</sup> para lo que se requieren 8e<sup>-</sup> y por tanto un mínimo de 16 ATP además dicha reacción está acoplada a la reducción de H<sup>+</sup> a H<sub>2</sub>, es así que se produce una molécula de H<sub>2</sub> por molécula de N<sub>2</sub> reducido (Hornick *et al.*, 2007).

La mayoría de los microorganismos diazótrofos fijan nitrógeno bajo la acción de la Nitrogenasa dependiente de molibdeno sin embargo Fallik *et al.*, (1992), y Frioni (2006), aseguran que la baja disponibilidad de Mo induce a la síntesis de Nitrogenasas alternativas dependientes de vanadio o hierro como cofactores y se hallan codificadas en los genes *vnf* y *anf* respectivamente.

Baca *et al.*, (2000) hacen referencia a la bacteria diazótropa de vida libre *Azotobacter vinelandii* como el individuo donde se reconocieron por primera vez las tres Nitrogenasas, la convencional dependiente de Mo codificada por el gen *Nif* y presente en todos los diazótrofos. La Nasa de vanadio conformado, también, por dos componentes: la dinitrogenasa-2 que es un hexámero de 240kDa con tres subunidades diferentes ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$ ), contiene 2V, 23Fe y 20S por molécula y el componente 2 conocido como dinitrogenasa reductasa-2, un dímero de subunidades idénticas ( $\alpha_2$ ) con una masa molecular de aproximadamente 62kDa, compuesta por 4Fe y 4S por dímero. La tercera Nasa alternativa es conocida como Nitrogenasa sujeta de hierro también conformada por dos componentes, su dinitrogenasa-3 es un tetrámero de dos subunidades distintas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y su dinitrogenasa reductasa-3 es un dímero de 65kDa de subunidades idénticas ( $\alpha_2$ ), pero a diferencia de las demás, presenta un gasto energético de ATP mayor. Ruiz *et al.*, (2008), señalan que su presencia se ha registrado también en *Rhodobacter capsulatus*. A pesar

que difieren en el catión hexacoordinado representativo del cofactor (Fe M Co) de sus sitios activos, son estructural, mecánica, y filogenéticamente relacionadas.

### **2.1.8 Factores que afectan la fijación de nitrógeno atmosférico**

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso altamente sensible que puede ser influenciado por una serie de factores que alteran la capacidad reductora de N<sub>2</sub> tanto en microorganismos simbióticos como de vida libre. Algunos de los factores del medio, inciden en la especificidad y accionar del complejo enzimático Nasa así como en la cantidad de nitrógeno fijado (Ruiz *et al.*, 2008).

#### **Metales presentes en el complejo enzimático**

De acuerdo con el metal presente en el centro activo se distinguen tres Nitrogenasas (FeMo, FeV y FeFe), cuya diferencia radica en el catión hexacoordinado presente en el cofactor Fe-M del componente II. Los efectos que produce la simple diferencia de la especie atómica que habita en el sitio de interés, se deben generalmente a su estado de oxidación, la influencia del carácter electrónico del catión presente, repercute no sólo en las propiedades magnéticas, sino también en las estructurales y consecuentemente en la reactividad disminuyendo en orden de Mo > V > Fe (Ruiz *et al.*, 2008).

#### **Flujo de electrones**

El flujo de electrones mínimo que debe correr durante la reacción es de 8e<sup>-</sup>, de ser más alto el proceso se optimiza, por otro lado, si el número de electrones está por debajo del mínimo se obtendrá H<sub>2</sub> como único producto de la reacción (Ruiz *et al.*, 2008).

#### **Condiciones del medio**

Barraquio *et al.*, (2000), nombran al régimen hídrico y la humedad de los suelos, como factores determinantes de la diversidad y tamaño de la población de diazótrofos, así como de la actividad del complejo enzimático, ambos factores se favorecen en condiciones de alta humedad.

Además la presencia indispensable e irremplazable de nutrientes minerales, sin los cuales no puede llevarse a cabo la síntesis ni actividad del complejo enzimático, como son: el catión del cofactor (FeM Co) sea este Mo, V o Fe, iones magnesio, azufre, hierro como

parte del componente I de la Nasa (UNC, 2008). Sin embargo los microorganismos diazótrofos son altamente sensibles a la presencia de metales pesados en el medio donde se desarrollan, por lo que son considerados como biosensores indicadores de la toxicidad de dichos elementos (Zimmer y Mendel, 1999).

Por otro lado, las bacterias diazótroficas están en capacidad de fijar  $N_2$  en condiciones tanto en alcalinas como acidas, sin embargo la actividad de la Nitrogenasa se ve incrementada en pH próximo a la neutralidad (UNC, 2008).

Así también Glick (1995), indica que la actividad de la Nitrogenasa, así como la población bacteriana se ven incrementadas en presencia de altos niveles de materia orgánica.

Ochiai (2003), señala a la temperatura como un factor determinante de la actividad de la Nasa, ya que como complejo enzimático de estructura proteica es sensible a los cambios calóricos, menciona además que la energía de activación aparente del proceso de fijación de  $N_2$  es de 14 Kcal/mol por encima de los  $20^\circ C$  y de 35 a 50Kcal por debajo de dicha temperatura, lo que confirma la sensibilidad de la enzima a bajas temperaturas pudiendo llegar a inactivarse. Ruiz (2013), indica que a pesar del buen rendimiento de la Nitrogenasa a temperaturas relativamente altas, al ser una enzima proteica su actividad empieza a decrecer por desnaturalización a partir de los  $25^\circ C$ .

### **Exudados radiculares**

Los exudados radiculares son secretados por el ápice de las raíces, pelos y sitios de emergencia de raíces laterales, su composición depende de la especie vegetal, son los encargados de la calidad y cantidad de nutrientes en la rizósfera, y por tanto determinan número y diversidad de comunidades microbiológicas ya que son tomados como fuente de carbono y energía, especialmente por diazótrofos de vida libre para llevar a cabo todos sus procesos metabólicos, incluyendo la FBN (Rodríguez, 2001; Ruiz, 2013).

### **Fuente energética**

Un potente inhibidor de la actividad de la Nitrogenasa es el compuesto energético ADP, si la relación la relación ATP: ADP es igual o inferior a 0.5 esta se ve suprimida de su actividad catalítica. Por tanto la acción enzimática es directamente proporcional a la cantidad de energía suministrada al sistema (UNC, 2008).

En el caso de diazótrofos fotosintéticos, la luz es un factor determinante en la capacidad de fijación de nitrógeno ya que la ausencia o bajos niveles de la misma impide la producción de energía (ATP) y el poder reductor, indispensables para el accionar enzimático (UNC, 2008).

### **Acción de la hidrogenasa**

Ruiz *et al.*, (2000), postulan la reutilización del H<sub>2</sub>, producido de manera simultánea que el NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, para incrementar la eficiencia de fijación, es así que la presencia y acción de la hidrogenasa provee de una fuente adicional de energía y poder reductor para la FBN y actúa como mecanismo de protección ante otros factores.

### **Fuentes alternativas de nitrógeno**

El mismo nitrógeno puede actuar como represor de la decodificación de los genes Nif (Frioni, 2006), siempre que este se halle en formas combinadas en el suelo (Reade *et al.*, 1999) como: glutamina u otros aminoácidos, nitrato, urea (Olivares, 2006) u otras fuentes de nitrógeno que resulten metabólicamente más accesibles, incluso el mismo NH<sub>3</sub><sup>+</sup> en altas concentraciones limita la FBN.

Los mecanismos inhibitorios producidos por los compuestos nitrogenados no son iguales para todos los diazótrofos (Fu y Burri, 1989). Puede impedir la nodulación en el caso de organismos simbióticos, inhibir el funcionamiento del complejo enzimático (Reade *et al.*, 1999) o producir una modificación covalente en el componente II de la Nitrogenasa (Frioni, 2006). Sin embargo los microorganismos han creado mecanismos de protección como por ejemplo *Azotobacter chroococcum* que hace un rebalanceo en la asimilación de C:N lo que también se ha corroborado en condiciones *in-vitro* con *Gluconacetobacter diazotrophicus* que al incrementar la fuente de carbono (glucosa), en su medio de cultivo, el microorganismo cambió la cuantificación de C:N asimilado protegiéndose así contra la inhibición compuestos nitrogenados (Döbereiner *et al.*, 1995).

### **Presencia de oxígeno**

La Nitrogenasa es lábil a la presencia de oxígeno mermando su actividad al desnaturalizar y oxidar sus cofactores. Frioni (2006), señala que la vida media de este complejo

enzimático en el aire es del orden de décimas de segundo. Según lo señalado por Soto y Baca (2001), ambos componentes de la Nasa son inactivados: la dinitrogenasa reductasa con un tiempo de vida medio ( $t_{1/2}$ ) en el aire de 30 a 45 segundos mientras que la FeMo-proteína posee un  $t_{1/2}$  en aire de 10 minutos. Sin embargo los microorganismos diazótrofos han desarrollado, a lo largo de su evolución, mecanismos de protección como adaptaciones metabólicas o estructurales con el fin de proteger a la Nitrogenasa de la oxidación y llevar a cabo la FBN en cualquier tipo de ambiente (Olivares, 2006).

### **2.1.9 Mecanismos de protección de la Nitrogenasa a la inactivación por oxígeno**

A pesar de la inactivación del complejo enzimático Nasa ocasionada por la presencia de gas oxígeno los microorganismos diazotróficos han desarrollado diferentes adaptaciones o estrategias de protección contra el oxígeno.

#### **Protección respiratoria**

Esta estrategia ocurre a nivel de la cadena respiratoria donde el principal involucrado es el citocromo oxidasa terminal, cuya función es reducir el  $O_2$  a  $H_2O$  (Dingler *et al.*, 1988), incrementando la tasa respiratoria, es decir genera energía y disminuye la concentración intracelular de  $O_2$  (Soto y Baca, 2001) protegiendo los procesos anaerobios de fijación de nitrógeno donde la concentración óptima de  $O_2$  para la Nitrogenasa es de 30nM (Juty *et al.*, 1997). Algunos diazótrofos que emplean esta estrategia de protección son: *Azotobacter vinelandii* aerobia, *Klebsiella pneumoniae* aerobio facultativo, *Gluconacetobacter diazotrophicus* aerobio (Soto y Baca, 2001).

#### **Protección conformacional**

Cuando hay limitaciones en la fuente de carbono o la protección respiratoria está bajo estrés oxidativo, la célula sintetiza un compuesto proteico nombrado como Shethna o FeS II a la que se le atribuye la función protectora del compuesto enzimático Nasa durante el periodo de estrés de  $O_2$ , dicha proteína, homodímero con agrupaciones  $2Fe_2S_2$ , se une a la Nasa formando un complejo inactivo reversible cambiando el flujo de  $e^-$  dentro de la enzima así como su estado redox, cuando la concentración de oxígeno disminuye el complejo se disocia en Shethna y Nasa recuperando su actividad catalítica (Scherings *et al.*, 1983).

Se ha comprobado la función protectora de la proteína Shethna modificando dos residuos de lisina de su amino terminal, lo que ocasiona vulnerabilidad de la Nasa frente a la acción del oxígeno. Por lo que se piensa que estos residuos están implicados en las interacciones electrostáticas responsables de la unión del complejo inactivo temporal. De igual manera el cambio de un residuo de histidina influye en el estado redox de la proteína FeS II, solo cuando está oxidada está en capacidad de formar el complejo Shethna-Nasa (Lou, *et al.*, 1999). Se ha comprobado este mecanismo de protección en *Azotobacter vinelandii* y *Azotobacter chroococcum* (Soto y Baca 2001).

### **Autoprotección**

En ocasiones, que la célula no puede aplicar las estrategias antes mencionadas, la misma Nitrogenasa es quien reduce el O<sub>2</sub> presente en el medio evitando así su inactivación, sin embargo este mecanismo demanda un constante y elevado gasto energético ATP. Thorneley y Ashby (1989), mencionan que esta reacción se lleva a cabo gracias a la intervención del componente dinitrogenasa reductasa dando como productos tóxicos, el radical superóxido O<sub>2</sub><sup>-</sup> o bien H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que finalmente son eliminados por la acción de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa. Se ha descrito este proceso en *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter caulinodans* y varias cianobacterias (Soto y Baca, 2001).

### **Barrera física de alginato**

Soto y Baca (2001), indican que algunos microorganismos sintetizan alginato, polisacárido de alto peso molecular, constituido por ácido L-gulurónico, cuya función principal es proteger a la célula de estrés mecánico y desecación. Las altas concentraciones de O<sub>2</sub> estimulan su producción formando una cápsula compacta y gruesa alrededor de la célula, misma que actúa como barrera en la transferencia de oxígeno protegiendo así la Nasa de la inactivación por este gas. Se ha observado este mecanismo de resguardo en *Azotobacter vinelandii*.

### **Mecanismos de protección en cianobacterias**

Soto y Baca (2001), consideran tres mecanismos básicos de protección ante el oxígeno desarrollados por estos microorganismos.

### **Separación de mecanismos (fotosíntesis y nitro fijación) en células diferenciadas del organismo filamentoso**

Algunas cianobacterias filamentosas sufren cambio a nivel estructural, bioquímico y genético, mediante los cuales se originan los heteroquistes, células especializadas sin capacidad reproductiva (Saier, 2000). La diferenciación parte de las células vegetativas del procarionta, algunos de los factores que inducen dicho proceso son: bajo nivel de  $N_2$ , fuente lumínica, fisiología celular y la comunicación intercelular, el proceso de diferenciación tarda aproximadamente 24 horas y consta de tres etapas (Cai *et al.*, 1997; Golden y Yoon, 1998; Ernst *et al.*, 1992). En la etapa inicial se da lugar a la activación de el gen regulador NtcA, la producción de proteasas serina HtrR y la difusión de PatS mediante un péptido inhibidor que actúa como molécula señalizador y controla el número de heteroquistes por filamento (una célula diferenciada cada diez vegetativas) (Luque y Herrero, 1994). La etapa intermedia es de maduración y formación de la envoltura celular compuesta por glicolípidos, lipopolisacáridos y polisacáridos que ayudan a retardar la difusión gaseosa (Ernst *et al.*, 1992).

Finalmente en la última etapa se da lugar a la inactivación del fotosistema II y la Rubisco así como la degradación del pigmento ficobiliproteína, de manera que se evita la captación lumínica y la generación de  $O_2$  (Golden y Yoon, 1998). Además el oxígeno residual es consumido durante la respiración celular. Es así que la FBN tiene lugar en los heteroquistes y los productos de la reacción son transferidos a las células vegetativas próximas (Soto y Baca, 2001).

### **Separación temporal del complejo enzimático Nitrogenasa**

Esta estrategia de protección, conocida como control circadiano, se observa tanto en cianobacterias filamentosas como unicelulares, siempre que no presenten heteroquistes y se desarrollen en fotoperiodos luz/obscuridad (Bergman *et al.*, 1997), siendo que, al final de la fase lumínica, tenga lugar la síntesis de la Nasa, regulada por la disponibilidad de fuente de carbono, ATP y poder reductor, misma que presentará actividad a lo largo de la fase oscura y empezará su degradación, dependiente de actividad catalítica específica, en las últimas horas de la misma (Reade *et al.*, 1999).

Se piensa que la proteólisis de la Nitrogenasa en últimas horas de la fase oscura depende además de la disminución del consumo de O<sub>2</sub>. Este mecanismo refleja la presencia activa o no de la dinitrogenasa reductasa (Villbrandt *et al.*, 1992), donde su recambio representa el equilibrio entre la síntesis y degradación del complejo enzimático. En el período lumínico la Fe-proteína se muestra inactiva por una modificación postraduccional y se activa al entrar en fase oscura. Se ha evidenciado esta habilidad protectora en *Gloeothoece*, *Cyanothece*, *Klebsiella pneumoniae*, *Oscillatoria limosa*, *Trichodesmium* y *Plectonema boryanum* (Soto y Baca, 2001).

### **Eliminación metabólica del oxígeno**

Tanto las cianobacterias heteroquísticas como las unicelulares diazotróficas pueden elevar la actividad respiratoria a fin de proteger a la Nitrogenasa tanto del oxígeno atmosférico como el producido por fotosíntesis (Peschek *et al.*, 1991). Así también la oxidación del hidrógeno atmosférico por la acción de hidrolasas promueve la eliminación de O<sub>2</sub> del sistema y la generación de ATP y poder reductor recuperando, en parte, la energía consumida por la Nasa para generar H<sub>2</sub> (Boison *et al.*, 2000). Se ha descrito este mecanismo en *Gloeothoece*, *Cyanothece*, *Nostoc*, *Anabaena mirabilis*, *Azotobacter vinelandii* y *Azotobacter chroococcum* (Soto y Baca, 2001).

### **Estructuras diferenciadas**

Se ha encontrado esta estrategia de protección contra el oxígeno paradójicamente en *Azoarcus* bacteria aeróbica estricta, capaz de fijar nitrógeno en condiciones de microaerofilia generando energía y llevando a cabo la FBN simultáneamente con una concentración máxima de oxígeno disuelto (DOC) de 35nM. *Azoarcus* pasa por un proceso de diferenciación, con cambios en su morfología y fisiología, denominado hiperinducción donde la célula desarrolla una membrana interna llamada diazosoma (Hurek *et al.*, 1995), donde se localiza la dinitrogenasa reductasa, y los componentes de la cadena respiratoria, generando protección respiratoria con la implementación de una oxidasa terminal (Soto y Baca, 2001).

### **Protección en la simbiosis**

Los diazótrofos que fijan nitrógeno mediante la simbiosis con plantas de tipo leguminosas han adoptado tres tipos de mecanismos donde involucran estrategias físicas, fisiológicas y bioquímicas.

### **Nodulación**

Bergense (1997), indica que la FBN ocurrida dentro de los nódulos está en función del aporte de O<sub>2</sub>, de forma que para evitar que decaiga la actividad de la Nitrogenasa por difusión de este gas hacia las células infectadas, se ha creado un mecanismo de regulación de DOC en el citoplasma, considerando que las células vegetales infectadas forman un tejido compacto que presenta más mitocondrias que otros tejidos vegetales dando cabida a miles de diazótrofos por célula vegetal, el córtex interno de los nódulos restringe la difusión del gas (Minchin, 1997) y además los niveles de leghemoglobina (Lb) evitan el aporte excesivo de O<sub>2</sub> hacia el interior de los nódulos, permitiendo el ingreso de O<sub>2</sub> libre suficiente para que ocurra la respiración celular (Soto y Baca, 2001).

### **Transporte de oxígeno**

El oxígeno que ingresa a las células infectadas oxida a la leghemoglobina presente (de 3 a 4 mM de Lb) de manera que se equilibra su concentración dentro del citosol y es transferido a las mitocondrias para contribuir a la fosforilación oxidativa de la célula. De manera que las mitocondrias de las células infectadas desempeñan un rol protector consumiendo el O<sub>2</sub> y energizando los simbiosomas para permitir el transporte de nutrientes (Bergensen, 1997).

### **Oxidasa terminal**

En condiciones de estrés por oxígeno los microorganismos inducen la síntesis y acción de oxidasas respiratorias que poseen una elevada afinidad por dicho gas, manteniendo un metabolismo óptimo siempre que no haya limitaciones en la fuente de carbono y energía, puede desarrollarse en condiciones de anoxia parcial. Algunos diazótrofos emplean más de una oxidasa, como es el caso de *Azorhizobium caulinodans* en el que actúan cinco diferentes oxidasas para su respiración aeróbica y micro aeróbica (Minchin, 1997; Soto y Baca, 2001).

### **2.1.10 Aislamiento selectivo de bacterias diazótroficas**

Debido a la naturaleza de la investigación y las particularidades de los microorganismos estudiados, es importante realizar aislamiento selectivo con el fin de detectar y aislar cepas bacterianas de interés con características en común, de manera que se identifique fácilmente la presencia de bacterias diazótroficas. Los cultivos selectivos presentan características específicas (composición, pH, aditivos o restricciones especiales y condiciones respiratorias) mismas que promueven el crecimiento del microorganismo de estudio.

La composición del medio de cultivo selectivo depende de las demandas nutricionales del microbio de interés así como las características génicas, que a su vez determinan sus condiciones fisiológicas y su capacidad para usar y transformar los elementos nutricionales suministrados *in vitro*. La provisión de carbono debe ser abundante, ya que el mecanismo de FBN es altamente demandante de energía (Reyes, 2011).

Para llevar a cabo el aislamiento selectivo de microorganismos diazótroficos es fundamental que el medio de cultivo sea libre de nitrógeno, ya que los compuestos nitrogenados inhiben la expresión del gen *Nif* y por tanto la actividad de la Nitrogenasa, de manera que los microorganismos que crezcan en ausencia de dicho elemento sugerirán poseer la capacidad para fijar nitrógeno atmosférico (Döbereiner *et al.*, 1995). Garrido (2007), menciona que los medios selectivos para diazótroficos pueden ser líquidos, sólidos o semisólidos, estos últimos permiten el desarrollo de fijadores microaerófilicos.

Döbereiner *et al.*, (1995), manifiestan que a pesar de no colocar una fuente directa de nitrógeno en un medio selectivo para diazótroficos, siempre habrá la presencia de trazas de este elemento aportadas por los reactivos e incluso por el agua destilada, lo que podría ocasionar el crecimiento de organismos que utilicen el nitrógeno combinado. Es por eso que al estudiar diazótroficos resulta propicio asegurarse, por otro método, que presenten la capacidad fijadora.

En ocasiones se coloca en los medios sustancias indicadoras de la actividad metabólica del organismo de interés que generan cambios visibles o de coloración en el medio, esta

estrategia es conocida como aislamiento selectivo diferencial (Garrido, 2007). Como por ejemplo Reyes (2011), describe su trabajo con *Azospirillum* de muestras de suelo y raíces de maíz, mismas que aisló en medio selectivo NfB (Nitrogen free Broth) sólido y semisólido con azul de bromotimol, la coloración normal del medio es verde, misma que se torna azul como resultado positivo del aislamiento de diazótrofos, sin embargo como métodos de corroboración utiliza: la tinción de gránulos de poli B hidroxibutirato, forma celular y tinción de Gram. Además controla los factores que podrían afectar el cultivo de dicho diazótrofo como: temperatura entre 32 y 36°C y pH entre 6,8 y 7,0.

Por otro lado Lara *et al.*, (2007), trabajaron con *Azotobacter* y *Azospirillum* mismas que fueron cultivados en medios selectivos, por género, es decir Burk's, Asbhy y Jensen's para *Azotobacter* y Burk's, NfB y rojo congo para *Azospirillum*. En las colonias obtenidas, identificaron características fisiológicas y bioquímicas de diazótrofos como: pigmentos extracelulares, morfología de la célula (forma, elevación, margen, superficie y opacidad), coloración Gram y producción de ácidos señalada por cambios en la coloración del medio. Flores *et al.*, (2012), comprobaron la presencia de diazótrofos según el crecimiento y asimilación de diferentes fuentes de carbono como: benzoato, fenol y glicerol y como ensayos de comprobación: prueba de la catalasa, de Nessler y producción de ácido 3-indolacético.

Menezes (2009), rescata algunas características fisiológicas estándar para identificar diazótrofos, la coloración de la mayoría de colonias va del blanco al blanco-crema, algunas muestran dispersión de pigmento amarillo-verdoso y microscópicamente se han registrado solamente bacilos Gram negativos de longitud variable.

Si bien estas técnicas convencionales ayudan a identificar diazótrofos por sus características macro y microscópicas así como metabólicas, no son útiles a la hora de determinar la especie o cepa precisa con la cual se trabaja, es por eso que Moreno y Galvis (2013), después de aislar nitro fijadores en los medios Winogradsky y Ashby emplearon la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) como método de soporte, identificando la secuencia del gen Nif, además de detallar a nivel molecular las bacterias que encontraron en muestras de suelo rizosférico en cultivos de interés agronómico. Peña

y Reyes (2007) manifiestan también haber usado técnicas genéticas para tener una caracterización íntegra y confiable de las cepas en su estudio, de los géneros *Rhizobium* y *Azospirillum* aisladas de la rizósfera de la lechuga y endófitas de las semillas del mismo cultivo, secuenciando el ADN ribosomal 16S.

Moratto *et al.*, (2005), sugieren la utilización de técnicas analíticas para el reconocimiento de diazótrofos como lo es el sistema analítico de paneles de identificación rápida BBL Crystal y pruebas bioquímicas como técnicas complementarias, ensayo de la oxidasa, fermentación de lactosa, glucosa, maltosa y sacarosa, reducción de nitratos, rojo de metilo, ensayo de Voges-Proskauer, de citrato, de TSI (triple azúcar hierro), de LIA (agar lisina- hierro), de SIM (medio selectivo inductor de brotes) e hidrólisis de gelatina.

Moreno y Galvis (2013), aclaran que los individuos de una misma especie no necesariamente presentan las mismas condiciones genéticas, bioquímicas y toxicológicas, y que organismos de diferente especie pueden ser muy similares en los mismos aspectos.

#### **2.1.11 Taxonomía numérica**

La clasificación de organismos en grupos o taxones en base a la similitud de sus características o sus rasgos evolutivos es conocida como taxonomía numérica (Díaz, 2010) es decir, es la evaluación de los caracteres fenotípicos de una población en específico, registrados en sistema binario, donde cada individuo toma el nombre de unidad taxonómica operacional (OTU) y se comparan mediante coeficientes matemáticos de similitud a fin de reconocer cuales comparten mayor similitud, en la Tabla 2. se muestran los más utilizados para la construcción de dendrogramas (Ferrari *et al.*, 1995).

Los datos fenotípicos, procedentes de las pruebas realizadas, son ingresados en un software especializado, que origina matrices comparativas de los grados de similitud de las bacterias de estudio. Posteriormente, mediante dendrogramas, se visualiza la consistencia o no de los agrupamientos realizados (Valverde, 2003).

Núñez *et al.*, (2004), indican que los coeficientes matemáticos de semejanza hacen referencia a las distancias taxonómicas, mismas que dependerán del tipo de investigación

que se efectúe para estudios de caracterización morfológica, o distancias genéticas. El cálculo estadístico de la distancia es necesario para realizar un análisis de taxones, ya que inicialmente se compara cada OTU, seguidamente se comprueban las semejanzas entre agrupaciones.

**Tabla 2. Coeficiente de similaridad.**

Coeficiente	Expresión
Coeficiente de similaridad simple (SsM)	$\frac{a+b}{a+b+c+d}$
Coeficiente de Jaccard (J)	$\frac{a}{a+b+c}$

**Fuente:** Moura et al., 1999.

Cuando en el cálculo de la distancia se obtiene un valor que tiende a 0, las OTU estudiadas presentan una mayor similitud, lo que indica que tiene un nivel de similitud del 100 %. Por el contrario, entre más se aleja de 0 mayor es el grado de desigualdad (Núñez *et al.*, 2004), sin embargo, al ser un método que involucra caracteres fenotípicos, no se lo considera totalmente confiable, es por ello que Vandamme *et al.*, (1996), recomiendan utilizar taxonomía polifásica, que abarca información de caracteres fenotípicos, genotípicos y filogenéticos.

## 2.2. Fundamentación filosófica

La investigación científica es un proceso del pensamiento humano que implica una descripción profunda de su objeto de estudio, la explicación de las causas que determinan su desarrollo, la aproximación predictiva del desenvolvimiento de sus variables de estudio, la valoración de las implicaciones ontológicas de los mismos, así como la justificación y discusión de su análisis.

Por tanto la investigación científica debe buscar las causas intrínsecas y extrínsecas de su objeto de análisis, es decir buscar una respuesta integral al estudio postulado, por tanto, la presente investigación adopta la filosofía integral postulada por Ken Wilber, una ideología

dinámica antes que estática, crítica antes que dogmática, humanista antes que oscurantista, y realista antes que utópica.

Dicha filosofía dinámica e integral de la investigación científica, hace justicia tanto a la observación como a la teoría, a la construcción como a la crítica, al aspecto básico como al aplicado, a la estructura lógica como a la dinámica metodológica de la investigación.

La filosofía integral reconoce que la investigación científica es multifacética, que tiene un lado teórico y otro empírico, que es universal en cuanto a su método y su finalidad, aun cuando en cada región posea objetos o temas típicos, se ocupa tanto de la naturaleza como del hombre, y que tiene supuestos filosóficos tanto como resultados de importancia estadística.

### **2.3 Fundamentación legal**

El estudio de la presente investigación se apoya en los, a continuación mencionados, artículos de la Constitución del Ecuador establecida en el 2008 y vigente hasta el momento:

**Art. 14.-** Se declara de interés público la preservación del ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país, la prevención del daño ambiental y la recuperación de los espacios naturales degradados.

**Art. 15.-** El Estado promoverá, en el sector público y privado, el uso de tecnologías ambientalmente limpias y de energías alternativas no contaminantes y de bajo impacto.

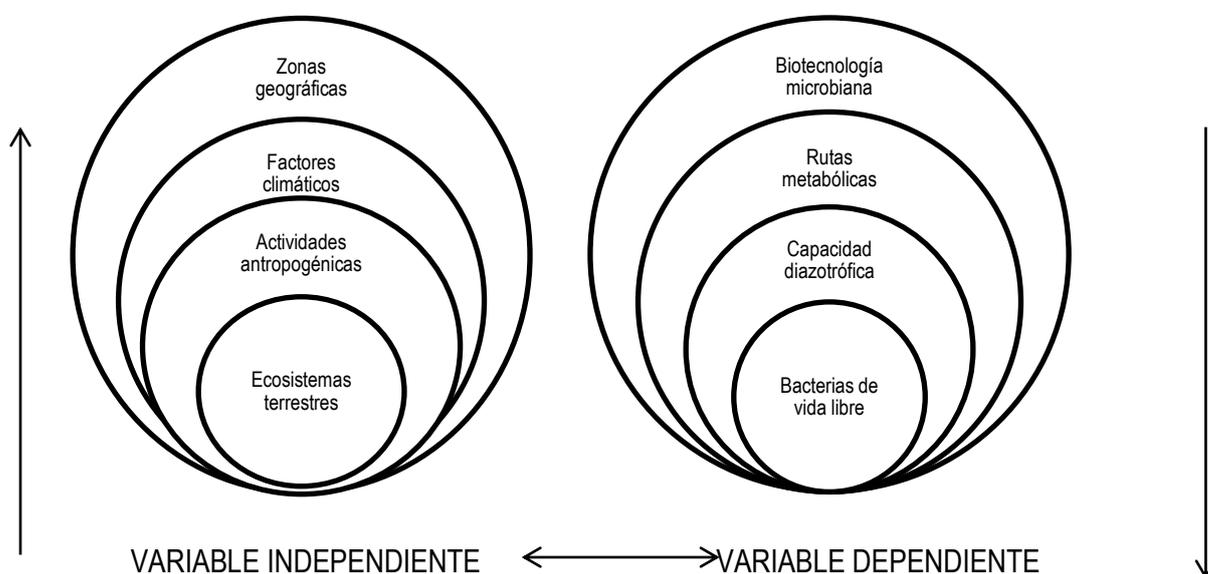
**Art. 400.-** El Estado ejercerá la soberanía sobre la biodiversidad, cuya administración y gestión se realizará con responsabilidad intergeneracional. Se declara de interés público la conservación de la biodiversidad y todos sus componentes, en particular la biodiversidad agrícola y silvestre y el patrimonio genético del país.

**Art. 409.-** Es de interés público y prioridad nacional la conservación del suelo, en especial su capa fértil. Se establecerá un marco normativo para su protección y uso sustentable que prevenga su degradación, en particular la provocada por la contaminación, la desertificación y la erosión.

En áreas afectadas por procesos de degradación y desertificación, el Estado desarrollará y estimulará proyectos de forestación, reforestación y revegetación que eviten el monocultivo y utilicen, de manera preferente, especies nativas y adaptadas a la zona.

**Art. 413.-** El Estado promoverá la eficiencia energética, el desarrollo y uso de prácticas y tecnologías ambientalmente limpias y sanas, así como de energías renovables, diversificadas, de bajo impacto y que no pongan en riesgo la soberanía alimentaria, el equilibrio ecológico de los ecosistemas ni el derecho al agua.

## 2.4. Categorías fundamentales



## 2.5. Hipótesis

### 2.5.1. Hipótesis nula

Las bacterias diazóticas de vida libre seleccionadas de las muestras recolectadas de diferentes ecosistemas terrestres no son eficientes en la fijación biológica de nitrógeno.

### 2.5.2. Hipótesis alternativa

Las bacterias diazóticas de vida libre seleccionadas de las muestras recolectadas de diferentes ecosistemas terrestres son eficientes en la fijación biológica de nitrógeno.

## **2.6. Señalamiento de variables de la hipótesis**

- Número de unidades formadoras de colonias de bacterias por gramo de muestra (ufc/g).
- Diversidad de colonias en los medios de cultivo
- Aislamiento selectivo y purificación de bacterias diazótrofes
- Caracterización macroscópica y microscópica de los aislamientos.
- Pruebas fisiológicas de crecimiento bacteriano a diferentes rangos de temperatura, pH y salinidad

## **CAPÍTULO III**

### **METODOLOGÍA**

#### **3.1. Enfoque**

Enfoque cualitativo

#### **3.2. Modalidad básica de la investigación**

Modalidad experimental.

#### **3.3. Nivel o tipo de investigación**

Básico exploratorio.

#### **3.4. Población y muestra**

Se estudiaron muestras de suelos de 5 diferentes ecosistemas, los detalles de cada muestra se señalan en la Tabla A1 (Anexo A). El muestreo se llevó a efecto con la ayuda de un barreno, en condiciones estériles, a profundidad de 15 cm de tierra de la zona rizosférica, previa remoción de la capa superficial (hojarasca y materia orgánica en descomposición). Para el trabajo experimental se realizaron muestras compuestas para cada ecosistema registrado.

#### **3.5. Operacionalización de variables**

(Ver página siguiente)

#### **3.6. Plan de recolección de información**

##### **3.6.1. Caracterización físico-química de las muestras de suelos**

###### **Determinación del pH y conductividad de las muestras**

Para determinar el pH y conductividad de las muestras, se pesó 20 gramos de suelo y se añadieron 50 ml de agua destilada, dicha suspensión se mantuvo en agitación 5 minutos y en reposo por una hora. Una vez transcurrido ese tiempo se procedió a tomar las lecturas correspondientes de las muestras, con la ayuda de un pH-metro y un conductímetro previamente calibrados.

**Tabla3. Operacionalización de variables**

HIPÓTESIS	VARIABLE	CONCEPTO	INDICADOR	ÍNDICES	INTRUMENTOS
La biodiversidad de bacterias diazótrofes de vida libre presente en las muestras recolectadas de diferentes ecosistemas es escasa o nula.	<b>Independiente:</b> Ecosistemas terrestres	Población y diversidad microbiana en las diferentes muestras recolectas.	Probabilidad de obtener bacterias diazótrofes disímiles.	Número de UFC/g	Calculadora
			Grupos-especie identificados en los dendrogramas respectivos de acuerdo al porcentaje de similitud	Similitud mayor al 80% indican miembros de un mismo grupos-especie	Software estadístico NTSys. Microsoft Excel
	<b>Dependiente:</b> Diversidad de diazótrofes de vida libre	Características fenotípicas como respuesta de la expresión visible de los genes de cada individuo.	Características macroscópicas	Descripción morfológica de colonias bacterianas de acuerdo a la forma, elevación y margen. Producción de pigmentos difusible y coloración de las colonias.	Tabla de colores. Microsoft Excel.
			Características microscópicas.	Tinción de Gram, Cápsulas y endoesporas. Visualización celular de forma y tipo.	Microscopio

**Tabla3. Continuación...**

			Características fisiológicas	Valores de pH y Temperatura	pH-metro Incubadoras
		Tipo de metabolismo en cada una de las bacterias aisladas	Halotolerancia	Crecimiento o no de colonias bacterianas a distintas concentraciones de NaCl en el medio.	Incubadoras
			Crecimiento positivo en medios de cultivo carentes de nitrógeno	Captación o no de nitrógeno atmosférico y producción o no de iones amonio por parte de las células bacterianas.	Incubadoras

Elaborado por: **Ma. Belén Aguilar Borja, 2015.**

### **Determinación del porcentaje de humedad de las muestras**

La humedad de las muestras de suelo se calculó por el diferencial de peso, entre una misma muestra, húmeda, y después de haberse secado en la estufa hasta obtener un peso constante.

Es así que para la determinación del porcentaje de humedad se pesaron previamente las cápsulas de porcelana a usarse, mismas donde se colocó 5 gramos de cada una de las muestras, se registró el peso total (Peso 1). Las cápsulas de porcelana que contenían las muestras fueron colocada en una estufa y sometidas a 105° C por 24 horas. Al retirar las muestras se las dejó enfriar en un desecador y se procedió a pesarlas nuevamente (Peso 2). Por tanto el porcentaje de humedad fue determinado mediante la siguiente fórmula, restando el peso de las cápsulas:

$$\% \text{Humedad} = \frac{\text{Peso}_1 - \text{Peso}_2}{\text{Peso}_2} \cdot 100$$

### **Determinación del porcentaje de materia orgánica de las muestras**

La evaluación del porcentaje de materia orgánica de las muestras se llevó a cabo por el método de calcinación, este método determinó el contenido total de materia orgánica contenida en el suelo, completo o en fracción. Se calculó mediante el diferencial de peso entre los valores registrados antes y después de calcinar una muestra, esta diferencia de peso equivale a la cantidad de materia orgánica que se perdió de la muestra por efecto de la calcinación.

Para ello, previamente se pesaron los crisoles a utilizarse, donde se colocaron 5 gramos de cada muestra, mismas que fueron colocadas en una estufa y se les aplicó 105°C por 24 horas. Pasado este tiempo se sacaron las muestras y dejaron enfriar en un desecador, una vez climatizadas se procedió a pesar (Peso 1). Posteriormente las muestras fueron ingresadas en una mufla, a 400°C por 3 horas. Al finalizar este periodo se dejó enfriar y se tomó el peso final (Peso 2). El porcentaje de materia orgánica fue determinado mediante la siguiente fórmula, descontando el peso de los crisoles:

$$\%M.O = \frac{\text{Peso}_1 - \text{Peso}_2}{\text{Peso}_2} \cdot 100$$

### **3.6.2. Aislamiento de potenciales microorganismos diazótrofes**

#### **Determinación de la población y diversidad microbiológica**

Se usó el método de difusión en placa y diluciones seriadas para determinar el número de unidades formadoras de colonias (ufcs) por gramo de cada muestra.

Para preparar la dilución inicial 1/10 se pesó 10 gramos de cada suelo y se colocó en botellas junto con 90ml de agua de llave previamente esterilizada.

La suspensión fue agitada manualmente durante 1 hora. Pasado éste tiempo se prepararon las diluciones 1/10<sup>2</sup>, 1/10<sup>3</sup>, 1/10<sup>4</sup> y 1/10<sup>5</sup> de cada muestra. Cien microlitros (100 µl), de cada dilución, fueron colocados y difundidos sobre la superficie de las cajas petri que contenían medio Winogradsky y medio JMV (Anexo D), cada uno de ellos suplementado con Nistatin, a una concentración de 75 ug/ml, y ajustado su pH a 6,5.

Las cajas inoculadas fueron debidamente rotuladas, selladas y puestas a incubación a 26°C durante 5 días. Pasado el tiempo de incubación se procedió a contar el número de colonias de microorganismos presentes en cada una de las cajas y se registró el número de colonias diferentes. El número de ufc por gramo de suelo se calculó para aquellas

diluciones en las que el número de colonias se encontraba en un rango entre 30 hasta 300, usando la siguiente fórmula:

$$UFC/g \text{ de muestra} = \frac{N * FD * Vt}{Vi * S}$$

Dónde:

**N** Número de colonias

**FD** Dilución en la cual se contó N (Ej: Conteo realizado en la dilución 1/10<sup>3</sup>, FD= 1x10<sup>3</sup>)

**Vt** Volumen de la dilución 1/10, en mililitros

**Vi** Volumen inoculado, en mililitros

**S** Cantidad en gramos de la muestra utilizada para preparar la dilución 1/10

### **3.6.3. Aislamiento, purificación y almacenamiento de diazótrofos de vida libre**

Se seleccionaron los platos petri que mostraron crecimiento visible y diversidad de colonias de bacterias, para proceder con el aislamiento selectivo y purificación de las cepas con posible capacidad nitro-fijadora.

Con ayuda de un palillo o asa de punta, debidamente estéril, se tomaron las colonias diferenciadas, mismas que fueron inoculadas en estría simple en cajas bipetri que contenían medio Winogradsky y medio JMV y fueron llevados a incubación a 26°C, durante una semana. Pasado este tiempo se evaluó el crecimiento de las cepas mediante código binario, asignándose 1 para crecimiento positivo y 0 en ausencia de crecimiento.

Las cepas que mostraron crecimiento en los medios de cultivo libres de nitrógeno se les consideró, en primera instancia, bacterias diazótrofes, es decir con la capacidad de fijar N<sub>2</sub> atmosférico. Los cultivos que se mostraron puros fueron repicados en estría compuesta en platos individuales con el mismo medio de cultivo del que precedían, respectivamente. Aquellas cepas que pasado el tiempo de incubación mostraron características de pureza, fueron etiquetadas y posteriormente almacenadas en tubos plásticos eppendorf conteniendo glicerol al 20% (w/v), 1 ml para actinomicetes y 1.25 ml para bacterias y almacenados a -10°C en un congelador, para su preservación a largo plazo.

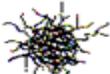
### 3.6.4. Caracterización macroscópica de los cultivos microbiológicos

Los cultivos puros obtenidos se agruparon de acuerdo a la coloración y morfología de las colonias, los que se determinaron usando una tabla estándar de colores (Anexo E). Las características generales de las colonias fueron descritas de acuerdo a la Tabla 4. Aquellas cepas que presentaron características macroscópicas similares fueron ubicadas en un mismo grupo-especie.

### 3.6.5. Caracterización microscópica de los cultivos microbiológicos

Se determinó la morfología celular además, las cepas fueron clasificadas por tinción de Gram y se verificó la presencia de esporas y cápsulas. Para cada tinción se prepararon frotis de cada cultivo, extendiendo uniformemente una pequeña muestra del microorganismo sobre una gota de agua destilada, formando una película delgada que fue secada al aire y se fijada al portaobjetos por acción de calor moderado.

**Tabla 4. Descripción morfológica de colonias bacterianas de acuerdo a la forma, elevación y margen**

<b>Forma</b>	 Circular	 Irregular	 Lentijuela	 Filamentosa	 Rizoide
<b>Elevación</b>	 Plana		 Convexa		 Umbonada
<b>Margen</b>	 Entero	 Ondulado	 Lobado	 Filamentoso	 Rizado

Fuente: Garzón, 2013.

Con lo que a los actinomicetes corresponde, se determinó la morfología de la cadena de esporas, para lo cual, previamente se aisló cada cepa en estría simple a partir de un cubre objetos inclinado en el medio de cultivo, los cubreobjetos con el micelio adherido fueron colocados sobre un portaobjetos, los bordes fueron sellados con laca transparente de manera que el micelio quede fijo en contacto con el portaobjetos. Se observaron las

cadena de esporas usando un microscopio con el lente de inmersión 100X y se determinó el tipo de estructura en base a la Tabla 5.

**Tabla 5. Características de los diferentes tipos de morfología de las cadenas de esporas.**

Símbolo	Tipo	Descripción
S	Espiral	Cadenas de esporas formando espirales abiertas o cerradas en el micelio aéreo.
R	Rectas	Cadenas de esporas rectas, cortas o largas.
RA	Incompletas	Cadenas de esporas en forma de ganchos, espiral incompleta u ondulada.
M	Esporas simples	Esporas individuales aparecen en las hifas del micelio aéreo.

Fuente: Philips, 1994

### 3.6.6. Pruebas fisiológicas de crecimiento microbiológico

#### Rango de crecimiento en función de la temperatura

Se inocularon 3 µl de suspensiones de células previamente preparadas, sobre la superficie cajas petri con el medio de cultivo en el que presentaron los mejores resultados de crecimiento. Los platos inoculados fueron incubados a temperaturas de 4, 20, 28, 37 °C durante una semana. Transcurrido el tiempo de incubación se observó la presencia o no de las cepas y se registró el crecimiento mediante código binario, asignándose 1 para crecimiento positivo y 0 en ausencia de crecimiento. Se determinó el tipo de microorganismo según el rango de crecimiento en función a temperatura siguiendo la clasificación establecida en la Tabla 6 que se muestra a continuación.

**Tabla 6. Clasificación de los cultivos según el rango de crecimiento en función de la temperatura de incubación.**

Temperaturas de incubación °C				Clasificación
4	26	37	50	
+	+	+	+	Mesófilo extremo
+	+	+	-	Mesófilo
+	+	-	-	Psicrótrofo
+	-	-	-	Psicrófilo

**Fuente:** Garzón, 2013.

### **Rango de crecimiento en Función del pH**

Se inocularon 3 µl de las suspensiones de células sobre la superficie cajas petri con el medio de cultivo en el que presentaron los mejores resultados de crecimiento, ajustado a los pHs a 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, y 9.5. El pH se ajustó con la ayuda de sistemas de búferes, para evitar cambios en el mismo debido al metabolismo de los microorganismos. Las cajas fueron incubadas a 26°C durante una semana. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluaron las cajas, registrando el crecimiento. Esta evaluación se realizó mediante código binario, asignándose 1 para crecimiento positivo y 0 en ausencia de crecimiento.

La clasificación de las bacterias en función del pH del medio de cultivo fue establecido a partir de la Tabla 7.

### **Rango de crecimiento en Función de la salinidad (Halotolerancia)**

Se inoculó 3 µl de las suspensiones de células en la superficie cajas petri con el medio de cultivo en el que presentaron los mejores resultados de crecimiento al que se añadió 1, 5, 10, 15 y 30% de NaCl (w/v).

**Tabla 7. Clasificación de los cultivos según el rango de crecimiento en función del pH del medio.**

pH del medio					Clasificación
4.5	5.5	6.5	7.5	8.5	
+	+	+	-	-	Acidófilo
-	+	+	+	-	Neutrotolerante
-	-	+	+	-	Neutrófilo
-	+	+	+	+	Alcalitolerante
-	-	-	+	+	Alcalófilo

**Fuente:** Garzón, 2013.

Las cajas fueron incubadas a 26°C durante una semana. Transcurrido este tiempo se evaluaron las cajas, observando el crecimiento de microbiano. Esta evaluación se realizó mediante código binario, asignándose 1 para crecimiento positivo y 0 en ausencia de crecimiento.

La clasificación de las bacterias en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo fue establecido a partir la Tabla 8.

### **Capacidad fijadora de nitrógeno**

Se verificó la capacidad fijadora de nitrógeno, mediante estimación cualitativa de nitrógeno amoniacal producido por las cepas seleccionadas para lo cual, previamente se reactivaron las cepas representantes de cada grupo taxonómico, inoculándose en cajas petri con el medio de cultivo en el que presentaron los mejores resultados de crecimiento, se incubaron a 26°C durante una semana, pasado este tiempo se colocó el contenido puro de cada caja en tubos bacteriológicos que contenían 10ml de medio de cultivo líquido Winogradsky, libre de nitrógeno, e incubados a 26°C con agitación constante durante una semana, pasado este tiempo se tomó 1ml de cada tubo y se le añadió cinco gotas de reactivo de Nessler, se agitó y dejó reposar por 5 minutos.

Para determinar la producción de ion amonio, se observó el viraje de color a amarillo, se empleó como blanco negativo el medio de cultivo. Esta evaluación se realizó mediante código binario, asignándose 1 para presencia de nitrógeno amoniacal y 0 en ausencia de ion amonio.

**Tabla 8. Clasificación de los cultivos según el rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo.**

NaCl (%)			Clasificación
1	5	10	
+	-	-	Halófilo débil
+	+	-	Halófilo
+	+	+	Halófilo extremo

**Fuente:** Garzón, 2013

### 3.7 Plan de procesamiento y análisis de la información

#### 3.7.1 Diseño experimental

Se estudiaron dos factores, usando un diseño A x B con dos repeticiones. Los factores en estudio fueron:

**Factor A:** Muestras recolectadas

**a1** Suelo de páramo

**a2** Suelo de bosque de pinos

**a3** Suelo férrico amazónico

**a4** Suelo de cultivos orgánicos

**a5** Suelo de arrozal

**Factor B:** Medio de cultivo

**b<sub>1</sub>** Winogradsky

**b<sub>2</sub>** JMV

En la Tabla 9 se muestran los tratamientos producto de la combinación de los factores en estudio.

**Tabla 9. Tratamientos en estudio.**

A: Muestras recolectadas	B: Medio de Cultivo	Tratamientos
Suelo de páramo	Winogradsky	a1b1
Suelo de páramo	JMV	a1b2
Suelo de bosque de pinos	Winogradsky	a2b1
Suelo de bosque de pinos	JMV	a2b2
Suelo férrico amazónico	Winogradsky	a3b1
Suelo férrico amazónico	JMV	a3b2
Suelo de cultivos orgánicos	Winogradsky	a4b1
Suelo de cultivos orgánicos	JMV	a4b2
Suelo de arrozal	Winogradsky	a5b1
Suelo de arrozal	JMV	a5b2

Elaborado por: **Ma. Belén Aguilar Borja, 2014.**

Se utilizaron 5 muestras compuestas formadas individualmente a partir de suelo de páramo, de bosque de pino, férrico amazónico, de cultivos orgánicos y de arrozal. A partir de ellas se prepararon diluciones, mismas que fueron inoculadas sobre cajas petri que contenían los dos medios de cultivo estériles, se trabajó por duplicado. Las cajas fueron incubadas a temperatura de 26°C por 5 días. Con los resultados obtenidos se realizó el análisis de varianza para la población y diversidad de bacterias diazotróficas. El esquema del análisis de varianza se muestra en la Tabla 10. En caso de encontrar diferencias significativas entre los tratamientos se procedió a separar las medias mediante la prueba de Tukey al 5% de significancia.

**Tabla 10. Esquema del análisis de varianza.**

Fuente de Variación	Grados de libertad
Factor A	(a - 1)
Factor B	(b - 1)
AB	(a-1) (b-1)
Error	(ab)-1
Total	abr-1

### 3.7.2. Taxonomía numérica de datos fenotípicos

Con los resultados de las pruebas fenotípicas se construyó una base de datos, en código binario, con el número de pruebas o características estudiadas, la información se procesó en el software estadístico NTSys, en el que primeramente se calculó los porcentajes de similitud entre las diazótrofias aisladas, usando el coeficiente de similitud simple ( $S_{SM}$ ). Finalmente los porcentajes fueron utilizados para construir un dendrograma mediante el uso del algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) del mismo programa. Una vez obtenido éste diagrama, se identificó grupos-especie basados en una similitud mayor al 90%. Aquellas que comparten este valor de similitud se consideraron como miembros de un mismo grupo-especie.

**Tabla 11. Codificación de la información para las pruebas de taxonomía numérica de datos fenotípicos de bacterias.**

#	Prueba	Descripción	Código
1	Forma de la colonia	Circular	Cir
		Irregular	Irr
		Filamentosa	Fil
2	Elevación de la colonia	Plana	Pla
		Convexa	Con
		Umbonada	Umb
3	Margen de la colonia	Entero	Ent
		Ondulado	Ond
		Lobado	Lob
		Filamentoso	Fim
4	Coloración de la colonia	Cristal	209
		Amarillo real	553
		Amarillo oro	505
		Amarillo Limón	504
		Naranja	517
		Salmon	518

Tabla 11. Continuación...

		Blanco	519
		Marfil	529
		Amarillo cadmio	536
		Amarillo piel	538
		Melocotón	566
		Amarillo Canario	589
5	Forma celular	Bacilo	B
		Coco	C
		Diplococo	Dc
		Estreptobacilo	Eb
6	Tinción de Gram	Positivo	G+
		Negativo	G-
7	Cápsulas	Presencia	Cap
8	Esporas	Presencia	Esp
9	Temperatura de Incubación	4°C	4°C
		20°C	20°C
		28°C	28°C
		37°C	37°C
		50°C	50°C
10	Rango de crecimiento en función del pH	3,5	3,5
		4,5	4,5
		5,5	5,5
		6,5	6,5
		7,5	7,5
		8,5	8,5
		9,5	9,5

**Tabla 11. Continuación...**

11	Rango de crecimiento en función de la Salinidad	1%	1%
		5%	5%
		10%	10%
		15%	15%

**Tabla 12. Codificación de la información para las pruebas de taxonomía numérica de datos fenotípicos de actinos.**

#	PRUEBA	DESCRIPCION	CODIGO
1	Forma de la colonia	Circular	Cir
		Irregular	Irr
		Filamentosa	Fil
2	Elevación de la colonia	Plana	Pla
		Convexa	Con
		Umbonada	Umb
3	Margen de la colonia	Entero	Ent
		Ondulado	Ond
		Lobado	Lob
		Filamentoso	Fim
		Rizado	Riz
4	Coloración del micelio del sustrato	Marfil	529
		Rosa	537
		Amarillo piel	538
		Siena natural	539
		Sepia	551
		Melocotón	566
		Cappuccino	585
		Coral	586
		Lavanda	587
		Verde manzana	802
		Guayaba quemada	805

Tabla 12. Continuación...

5	Coloración del micelio aéreo	Rojo escarlata	508
		Tierra tostada	514
		Blanco	519
		Amarillo piel	538
		Violeta cobalto	540
		Verde oliva	545
		Verde pino	546
		Vino	565
		Rosa te	567
		Verde pistache	570
		Cappuccino	585
		Rojo quemado	588
6	Coloración de la espora	Rojo escarlata	508
		Verde musgo	513
		Tierra tostada	514
		Blanco	519
		Plata	533
		Violeta cobalto	540
		Rosa te	567
		Verde pistache	570
		Ocre oro	573
		Gris lunar	574
		Cappuccino	585
		Lavanda	587
Rojo quemado	588		
7	Pigmento difusible	Tierra tostada	514
		Marrón	531
		Violeta cobalto	540

Tabla 12. Continuación...

		Vino	565
		Cappuccino	585
		Rojo quemado	588
		Jacarandá	807
8	Cadena de esporas	Recta	Riz
		Espiral	S
		Incompletas	RA
		Esporas simples	M
9	Temperatura de incubación	4°C	4°C
		20°C	20°C
		28°C	28°C
		37°C	37°C
		50°C	50°C
10	Rango de crecimiento en función del pH	3,5	3,5
		4,5	4,5
		5,5	5,5
		6,5	6,5
		7,5	7,5
		8,5	8,5
		9,5	9,5
11	Rango de crecimiento en función de la Salinidad	1%	1%
		5%	5%
		10%	10%
		15%	15%

## CAPITULO IV

### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

#### 4.1. Análisis de los Resultados

##### 4.1.1. Caracterización físico-química de las muestras medioambientales

En la Tabla A2 (Anexo A), se muestran los valores de pH, conductividad, porcentaje de humedad y porcentaje de materia orgánica de las distintas muestras de suelo utilizadas.

##### 4.1.2. Aislamiento selectivo de potenciales microorganismos diazótrofes

###### Determinación de la población y diversidad microbiológica

El conteo del número de colonias con posible potencial diazotrófico se muestran en la Tabla A3 (Anexo A), la misma incluye la diversidad de actinomicetes de las distintas muestras medioambientales estudiadas. Se puede observar los detalles para diversidad en las figuras C2 y C3 (Anexo C)

El análisis de varianza para la diversidad bacteriana se muestra en la Tabla B1 (Anexo B) donde se visualiza diferencia altamente significativa para el factor A (origen de la muestra), mientras que para la interacción AB (origen de la muestra + medio de cultivo) se indica baja diferencia significativa, por tanto, la separación de las medias para la diversidad bacteriana del factor A (origen de la muestra), mostrada en la Tabla B2 (Anexo B) revela a la muestra MB2 como el origen de una amplia diversidad microbiológica de interés ( $a_2$ ; 74) y a la muestra MB1 con la más baja diversidad microbiológica ( $a_1$ ; 32). En la Tabla B3 (Anexo B) se presenta la separación de medias para la diversidad de la interacción AB (origen de la muestra + medio de cultivo) indicando que el mejor tratamiento fue  $a_2b_2$  (suelo de bosque de pinos + JMV) presentando 78 diferentes colonias de microorganismos con posible potencial diazotrófico y opuestamente señala al tratamiento  $a_1b_2$  (suelo de paramo + JMV) con el nivel más bajo de diversidad con apenas 31 colonias diferentes.

En la Tabla A4 (Anexo A) se indica el número de unidades formadoras de colonias (ufcs) por gramo de suelo seco, lo cual se ilustra en la Figura C1 (AnexoC). El análisis de

varianza del número de ufc/g de suelo seco se muestra en la Tabla B4 (Anexo B) revelando alta diferencia significativa para el factor A (origen de la muestra) por tanto, la separación de las medias para el número de ufc/g de suelo seco del factor A (origen de la muestra) expuesta en la Tabla B5 (Anexo B), destaca a la muestra MB2 con el más alto número de ufc/ g de suelo seco ( $a_2$ ;  $1,05E+08$ ), mientras que la muestra MB4 mostró los valores más bajos de población microbiana ( $a_4$ ;  $3,66E+06$ ). La separación de medias para el número de ufc/g de suelo seco de la interacción AB (origen de la muestra + medio de cultivo), revelada en la Tabla B6 (Anexo B), señala al tratamiento  $a_2b_2$  (suelo de bosque de pinos + JMV) con el mayor número de ufc/g suelo seco ( $a_2b_2$ ;  $1,11E+08$ ) y opuestamente al tratamiento  $a_4b_1$  (Suelo de cultivos orgánicos + Winogradsky) con la más baja población bacteriana ( $a_4b_1$ ;  $3,50E+06$ ).

Cabe recalcar que el factor B (medio de cultivo) no presentó diferencia significativa para ninguno de los análisis de varianza.

#### **4.1.3. Aislamiento, purificación y almacenamiento diazotrofos de vida libre**

Ciento trece cepas microbianas fueron aisladas y purificadas a partir de los platos del aislamiento selectivo, de los cuales 59 presentaron características de bacterias y 54 de actinomicetes. En lo que respecta a los cultivos bacterianos, se aislaron 29 bacterias y 30 actinomicetes en medio Winogradsky (W) y 30 bacterias y 24 actinomicetes en medio JMV. En lo referente a cultivos aislados a partir del origen de la muestra, se aislaron 22 bacterias y 7 actinomicetes en suelo de pajonal del páramo ( $a_1$ ), 8 bacterias y 11 actinomicetes en suelo de bosque de pino ( $a_2$ ), 6 bacterias y 15 actinomicetes en suelo ferroso de playa de río ( $a_3$ ), 8 bacterias y 8 actinomicetes en suelo de monocultivo orgánico de maíz ( $a_4$ ) y 15 bacterias y 13 actinos en suelo de arrozal de estación húmeda ( $a_5$ ).

La Tabla A5 (Anexo A) muestra la codificación e información complementaria utilizada, para cada uno de los cultivos bacterianos aislados, purificados y almacenados, obtenidos de los diferentes tratamientos del presente estudio. La codificación e información complementaria utilizada para los 54 actinomicetes aislados se muestra en la Tabla A6 (Anexo A).

#### **4.1.4. Caracterización macroscópica de los cultivos microbianos**

La Tabla A7 (Anexo A) muestra los grupos bacterianos en función del color de sus colonias. Se presentan 12 grupos de diferente coloración, el grupo 7, correspondiente al color Marfil, presenta el mayor número de miembros con 25 bacterias por otro lado, se muestran 5 grupos conformados por un solo individuo el 1, 4, 6, 9 y 12.

En lo que a la caracterización macroscópica de actinomicetes corresponde, se muestra la formación de grupos en la Tabla 8 (Anexo A) en función del color del micelio de sustrato, color del micelio aéreo, color de las esporas, y el color del pigmento difusible. Presentándose 11 grupos en función del color del micelio de sustrato, siendo el más cuantioso el grupo 3 correspondiente al color Amarillo piel con 27 miembros por otro lado se muestran 8 grupos conformados por un solo individuo el 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10 y 11.

En cuanto al color del micelio aéreo se formaron 12 grupos donde el mayor número de miembros recae en el grupo 3 correspondiente al color Blanco con 37 cepas, por otro lado se muestran 8 grupos conformados por un solo individuo el 1, 2, 4, 6, 7, 10, 11 y 12.

El color de las esporas se generó 13 grupos donde el grupo 4 correspondiente al color Blanco presentó el mayor número de individuos con 22 actinomicetes, por otro lado se muestran 5 grupos conformados por un solo individuo el 1, 2, 3, 8 y 13. Finalmente se evaluó la presencia de pigmento difusible, siendo que solo 8 cepas mostraron esta característica metabólica a las que se clasificó en función del color del pigmento en 7 grupos, donde el grupo 3 correspondiente al color Violeta cobalto mostró 2 miembros y los restantes tan solo un individuo.

Para determinar las características de coloración, tanto para las cepas bacterianas como para los actinomicetes, se empleó la Tabla E1 (Anexo E).

#### **4.1.5. Caracterización microscópica de los cultivos aislados**

La Tabla A9 (Anexo A) muestra la caracterización microscópica para las 59 cepas bacterianas aisladas. En cuanto a la forma celular 22 individuos presentaron forma bacilar, 35 cocoide, 1 diplococoide y 1 estreptobacilar, los detalles se observan en la Figura C% (Anexo C).

En lo que respecta a las pruebas de tinción, se evidenciaron 42 cepas Gram positivas y 17 Gram negativas, se observan los detalles en la Figura C4 (Anexo C), 14 cepas fueron reportadas como Bacilos Gram+ a las cuales se les aplicó la tinción de endosporas donde 3 cepas mostraron respuesta positiva (MB-012, MB-034 y MB-040). La tinción de cápsulas se efectuó a las 59 cepas, de las cuales 5 mostraron respuesta positiva (MB-012, MB-026, MB-027, MB-040 y MB-048).

La caracterización microscópica de actinomicetes se reporta en la Tabla A10 (Anexo A) donde se señala la presencia de 23 cultivos con cadena de esporas rectas, 12 espirales, 14 de cadenas incompletas y 5 con esporas simples.

#### **4.1.6. Pruebas fisiológicas de crecimiento**

##### **Rango de crecimiento en función de la temperatura**

La clasificación bacteriana de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura de incubación se muestra en la Tabla A11 (Anexo A). De los 59 cultivos 17 se clasificaron como Mesófilos extremos y 42 como Mesófilos.

En lo referente a los cultivos de actinomicetes, la Tabla A13 (Anexo A) muestra que de los 54 cultivos 9 se clasifican como Mesófilos extremos, 42 como Mesófilos y 3 como Psicrótrofos. Los detalles se observan en las figuras C6 y C7 (Anexo C).

##### **Rango de crecimiento en función del pH**

La clasificación bacteriana de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo se muestra en la Tabla A15 (Anexo A). De los 59 cultivos 14 se clasificaron como Acidófilos, 23 como Neutrotolerantes y 23 como Alcalitolerantes.

En lo referente a los cultivos de actinomicetes, la Tabla A17 (Anexo A) muestra que de los 54 cultivos 23 se clasificaron como Acidófilos, 10 como Neutrotolerantes y 21 como Alcalitolerantes. Los detalles se observan en las figuras C8 y C9 (Anexo C).

##### **Rango de crecimiento en función de la salinidad**

La clasificación bacteriana de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo se muestra en la Tabla A19 (Anexo A). De los 59 cultivos 11 se clasificaron como Halófilos y 48 como Halófilos extremos.

En lo referente a los cultivos de actinomicetes, la Tabla A21 (Anexo A) muestra que de los

54 cultivos 15 se clasificaron como Halófilos y 38 como Halófilos extremos. Los detalles se observan en las figuras C10 y C11 (Anexo C).

#### **Capacidad fijadora de nitrógeno**

Los resultados de la prueba de Nessler se presentan para bacterias no filamentosas en la Tabla A25 (Anexo A), donde se evidencian los resultados de cada representante de grupo-especie, siendo que de 29 grupos-especie, 22 marcaron positivo y 7 negativo como se indica en la Figura C12 (Anexo C).

Los resultados para actinomicetes se indican en la Tabla A26 (Anexo A) donde de 28 grupos-especie 25 dieron positivo para la prueba de fijación biológica de nitrógeno mediante coloración por Nessler y tan solo tres cepas contrastaron como negativas mostrado en la Figura C13 (Anexo C).

Los porcentajes de individuos positivos en función del origen de la muestra se observan en la Tabla A27 (Anexo A).

#### **4.1.7. Taxonomía numérica de datos fenotípicos**

A partir de los datos de taxonomía numérica de pruebas fenotípicas mostrada en la Tabla B7 (Anexo B) y con base en el coeficiente de similaridad simple (SsM) al 90% se diseñó el dendrograma para las bacterias seleccionadas con posible capacidad diazotrófica Figura C12 (Anexo C), expuesto en la Figura C14 (Anexo C), donde se identificaron 29 grupos especies, de los cuales 18 grupos presentaron más de un representante, mientras que los 11 grupos restantes fueron resaltados como cultivos individuales. El grupo más amplio fue el 19 con 6 miembros. La Tabla A23 (Anexo A), muestra los 29 grupos especies con sus respectivos integrantes.

En el caso de los actinomicetes, el dendrograma basado en el coeficiente de similaridad simple (SsM) al 90% y calculado a partir de los datos de taxonomía numérica de las pruebas fenotípicas Figura C13 (Anexo C), presentes en la Tabla B8 (Anexo B), se muestra en la Figura C15 (Anexo C), donde se identificaron 35 grupos especie, de los cuales 12 grupos presentaron más de un representante, mientras que los 16 grupos restantes fueron señalados como cultivos individuales. El grupo más amplio fue el 22 con 7 miembros. En la Tabla A24 (Anexo A) se indican los grupos especies de actinomicetes con sus respectivos miembros.

Algo notable de resaltar son los microorganismos con similitud más allá del 90% y que no corresponden a la misma muestra de suelo, la muestra MB005 perteneciente a suelo de pajonal de páramo presenta una similitud al 96% con la muestra MB035 proveniente del suelo ferroso amazónico y un caso de similitud al 100% entre la muestra MB044 correspondiente al suelo de monocultivo orgánico de maíz y las muestras MB054 y MB056 procedentes de suelo de arrozal. En cuanto a los consorcios de actinomicetes que presentan más del 90% de similaridad se han evidenciado 4 grupos con 94.3% de similaridad, un grupo con 95.8% de similitud y dos grupos con similitud al 97% que no proceden del mismo lugar de muestreo.

## **4.2. Interpretación de datos**

### **4.2.1. Población y diversidad bacteriana**

En lo que respecta al factor A (origen de la muestra) el valor más alto de unidades formadoras de colonias (ufc) se presentó en la muestra de suelo de bosque de pino, opuestamente a la muestra proveniente de suelos de monocultivo orgánico de maíz que registró los valores más bajos de población microbiológica. Es indudable que las condiciones de cada ecosistema terrestre son completamente diferentes, principalmente sus características fisicoquímicas, mismas que influyen directamente en la población microbiológica de interés, Vessey (2003) corrobora dicho supuesto manifestando que los factores medioambientales de cada ecosistema inciden directamente en la presencia, distribución y metabolismo de los microorganismos diazotófos.

En cuanto al pH de las muestras medioambientales se nota claramente la influencia de este factor reflejada en el número de ufc ya que a mayor concentración de grupos oxidrilo, la población microbiológica se ve reducida, resaltado en la muestra de suelos de monocultivo orgánico de maíz que registró pH 9, clasificándose como suelo altamente alcalino y presentando los valores más bajos de ufs/g de suelo seco, opuesta a esta muestra se encuentra la proveniente de suelo de bosque de pino que mostró el pH más bajo con 4,51 y una densidad microbiológica alta. Delgado (2008), menciona que se han encontrado una mayor cantidad de diazotófos no simbióticos en suelos ácidos, pero que tienen un mejor desenvolvimiento a pH neutros. Sin embargo, se han reportado especies

que pueden crecer desde pH alrededor de 5.5 tales como *A. chroococcum* y *A. vinelandii* (Saribay, 2003).

Por otra parte, la diversidad microbiológica puede apreciarse en términos de variedad estructural y funcional, y se ve influenciada principalmente por los mecanismos de adaptabilidad así como por la disponibilidad de nutrientes, por tanto es probable que la disposición de sales minerales reflejada en los valores de conductividad influya directamente en la diversidad microbiológica, Romero *et al.*, (2009), reportan valores de hasta 800 son considerados no salinos, y no tienen efectos nocivos sobre cultivos o microorganismos, por lo tanto la muestra compuesta de suelo de bosque de pino presenta el valor relativamente más alto de conductividad con 82 $\mu$ s y también presenta una amplia diversidad microbiológica.

Estadísticamente, el factor B (medio de cultivo) no ejerció diferencia significativa tanto en la población como en la diversidad de colonias aisladas ya que ambos son selectivos para diazótrofos, brindando los nutrientes estrictamente necesarios para el desarrollo de dichos microorganismos.

#### **4.2.2. Caracterización fenotípica.**

Según la evaluación de las pruebas fenotípicas aplicadas se obtuvieron 42 cepas Gram positivas y 17 Gram negativas, de estas últimas 8 son bacilos, característica fenotípica propia de bacterias diazóticas como lo sustentan (Garrido, 2007; Menezes, 2009 y Díaz, 2010). A pesar de que un alto número de estudios encajan a los diazótrofos dentro de esta característica morfológica, ciertos investigadores como (Hernández, 2009 y Álvarez, 2012) resaltan la presencia de bacilos Gram positivos en sus estudios sobre diazótrofos la mayoría de ellos correspondientes al género *Bacillus*.

#### **Rango de crecimiento en función de la temperatura**

Los datos de crecimiento en función de la temperatura señalan a la mayoría de microorganismos aislados como mesófilos, es probable que dicha característica esté relacionada con la temperatura del ecosistema del cual provienen las muestras, en todo

caso, esta condición es propia de los diazótrofos que muestran su mejor desarrollo de 26 a 28°C, es decir en su mayoría son mesófilos (Todar, 2006). Sin embargo Abela (2007), menciona la existencia de cepas de diazótrofos resistentes a temperaturas y pH extremos. Sustentando la presencia de microorganismos mesófilos extremos, mayoritariamente en las muestras de suelo férrico amazónico y de arrozal, presumiblemente por las condiciones térmicas de las regiones de las cuales provienen. Así como para los microorganismos clasificados como psicrótrofos que se presentaron en las muestras provenientes de condiciones climáticas frías como son los suelos de páramo y los suelos de monocultivo de maíz. Cabe mencionar que las cepas de característica psicrótrofa fueron todos actinomicetes.

### **Rango de crecimiento en función del pH**

El pH óptimo para el desarrollo de microorganismos diazótrofos es ligeramente ácido con tendencia a la neutralidad (Delgado, 2008), de manera que de acuerdo al factor A (origen de la muestra) y al crecimiento en función del pH del medio, se aislaron 37 cepas de acidófilas y 33 cepas con característica neutrotolerante excluyendo a las cepas provenientes de las muestras de suelo de monocultivo orgánico de maíz y de arrozal donde se expresaron solamente alcalitolerantes. Presumiblemente el pH de los ecosistemas de los cuales provienen las muestras es el factor que limita los resultados ya que en las muestras de suelo con pHs por encima de la neutralidad no se evidenciaron microorganismos acidófilos o neutrotolerantes.

### **Rango de crecimiento en función de la salinidad**

La clasificación de los microorganismos aislados de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl proyectó resultados inusuales, ya que la mayoría de cepas muestran resistencia a altas concentraciones de sal donde el 77% de cepas se presentaron como halófilos extremos y los aislados restantes como halófilos, los valores de conductividad de las muestras son valores relativamente bajos por lo que llevarían a pensar en una halotolerancia débil, lo que hace difícil explicar los resultados obtenidos, sin embargo es posible que estos estén estrechamente relacionados a la evolución y adaptación metabólica de los microorganismos en cuestión, que es conservada en su genoma hasta que son expuestos a condiciones que los obliguen a expresar dicha

adaptación, asimilando los cambios del entorno y generando una regulación osmótica que permita soportar altos niveles de NaCl en el medio de cultivo. Así lo sustentan Ramírez et al., (2006), manifestando que la membrana citoplasmática es modificada cuando detecta cambios en la concentración de sales, produciéndose una adaptación de la composición lipídica de las membranas celulares que incluye modificaciones en el tipo de fosfolípidos y en el tipo de ácidos grasos que forman parte de los lípidos frente a una nueva situación de estrés osmótico.

#### **4.2.3. Taxonomía numérica de datos fenotípicos**

Con base en los dendrogramas generados a partir de los datos de taxonomía numérica de pruebas fenotípicas al 90% de similitud aplicadas a los microorganismos aislados con posible capacidad diazotrófica se identificaron 29 grupos para bacterias al evaluar 46 aspectos fenotípicos y respuestas fisiológicas, mientras que para actinomicetes se registraron 35 grupos con la evaluación de 74 pruebas taxonómicas lo que ha permitido reducir considerablemente la probabilidad de errores y repeticiones innecesarias, de haberse tomado como guía de trabajo las agrupaciones por color como característica fenotípica más notable. Algo notable de resaltar son los microorganismos con similitud más allá del 90% y que no corresponden a la misma muestra de suelo, en cuanto a los consorcios de bacterias se distinguieron dos grupos- especie con el 96% de similitud y en los dendrogramas de actinomicetes resaltaron 4 grupos- especie con el 94.3%, dos con el 95.8% y dos con el 97% de similitud, lo que demuestra la amplia distribución microbiológica en los ecosistemas terrestres, así como la adaptabilidad y evolución de estos seres a condiciones totalmente opuestas. No hay que descartar la posibilidad de alguno de estos microorganismos haya sido transportado voluntaria o involuntariamente de un ecosistema a otro mediante actividad antropogénica.

#### **4.2.4. Capacidad diazotrofa**

De los 29 grupos-especie de bacterias y de los 28 grupos-especies de actinomicetes, se registraron como positivos 22 grupos-especies de bacterias y 25 grupos-especies de actinomicetes, lo que comprueba el potencial diazotrófico de los miembros de los grupos-especie cuyos representantes dieron positivo al reaccionar con Nessler, que en presencia de iones amoniacos, se descompone formando yoduro de dimercurio amonio reflejándose

su presencia por la tonalidad amarilla-marrón que toma la muestra evaluada (Gutiérrez, 1994). Estos resultados indican una amplia distribución de microorganismos diazótrofos de vida libre en diferentes ecosistemas terrestres y es altamente probable que hayan desarrollado estrategias genéticas y metabólicas para adaptarse a las condiciones medioambientales bajo las cuales sobreviven.

El estudio demuestra además, que no se puede tomar como única prueba de la capacidad diazotrófica el crecimiento microbiológico en medios de cultivo sin nitrógeno asimilable, porque es posible el crecimiento de microorganismos que no sean diazótrofos y que obtengan nitrógeno de alguna otra fuente como lo indican Döbereiner *et al.*, (1995), que manifiestan que a pesar de no colocar una fuente directa de nitrógeno en un medio selectivo para diazótrofos, siempre habrá la presencia de trazas de este elemento aportadas por los reactivos e incluso por el agua destilada, lo que podría ocasionar el crecimiento de organismos que utilicen el nitrógeno combinado.

Es así, que a pesar que autores como Garrido (2007), y Reyes (2011), han usado el crecimiento en medios selectivos como prueba suficiente de sus investigaciones e incluso la presente muestra individuos con los mismos comportamientos, no es posible asumir la capacidad de fijación biológica de nitrógeno en ellos.

Es por eso que al estudiar diazótrofos resulta propicio asegurarse, por otro método, que presenten la capacidad de fijación biológica de nitrógeno. Por lo tanto, si bien estas técnicas convencionales ayudan a identificar diazótrofos por sus características metabólicas, no son útiles a la hora de asegurar dicha capacidad o de determinar la especie o cepa precisa con la cual se trabaja, es por eso que Moreno y Galvis (2013), después de aislar nitro fijadores en los medios Winogradsky y Ashby emplearon la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) como método de soporte, identificando la secuencia del gen *Nif*, además de detallar a nivel molecular las bacterias que encontraron en muestras de suelo rizosférico en cultivos de interés agronómico. De forma que es preponderante se dé lugar a la caracterización molecular de los 57 grupos-especie aislados e identificados como diazótrofos, aislando el gen *Nif* que determina esta condición, a fin de complementar su diferenciación. Además es preciso determinar cuantitativamente el ion amonio producido por las cepas de interés.

El 16% de individuos evaluados reportaron negativo a la evaluación cualitativa de Nessler, es decir 11 miembros de 10 grupos-especie, tanto de bacterias como de actinomicetes no presentaron la capacidad de fijación biológica de nitrógeno, a pesar de haber mostrado crecimiento en medio libre de nitrógeno. Se han planteado varias posibilidades que expliquen dicha eventualidad, de manera que es posible que las cepas Nessler-negativas hubiesen necesitado mayor tiempo de crecimiento debido a condiciones propias de sus metabolismos de forma que el tiempo de generación no fue suficiente para que produzcan una cantidad de amonio detectable por la prueba estimativa de Nessler. Por otro lado se piensa que el metabolismo de estos microorganismos pueda hacer una transformación rápida de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), lo que explicaría que no hayan podido ser detectadas como diazótrofos, ya que la prueba de Nessler es diseñada específicamente para amonio. Por lo que se sugiere que en estudios posteriores se realice una prueba para determinación de nitratos para los individuos que dieron negativa a la evaluación estimativa de amonio.

Según el número de representantes microbiológicos registrados, se determinó que la muestra proveniente de suelo de pajonal posee una población y diversidad diazótropa de vida libre mayor en relación a las otras muestras con 26%, mientras que el suelo de monocultivo orgánico de maíz presenta el menor número de positivos con 12 individuos. Lo inusual de estos resultados es el 17% de representantes positivos provenientes de la muestra de suelo de bosque de pinos, que en un estudio previo se mostró como origen del mayor número de población y diversidad microbiológica, lo que lleva a suponer que a pesar de presentar un alto índice de microorganismos, este presentaba una baja población diazótropa y que es posible que hayan mostrado crecimiento a pesar de haberse inoculado en medios libres de nitrógeno presumiblemente por la presencia de pequeñas cantidades de dicho elemento.

#### **4.2.5. Discusión general de actinomicetes**

De las ciento trece cepas aisladas 54 correspondieron a bacterias filamentosas, aunque hay registros de actinomicetes con capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico, estos presentan una desventaja metabólica que incurre en su aprovechamiento industrial, y es

que por su condición estructural su tiempo de maduración es prácticamente el doble que el de una bacteria común. Por otro lado se manifiesta que su capacidad diazotrófica está sujeta estrictamente a plantas actinorrizas como: aliso, olivo, arrayán, pino, etc. Como lo sustenta la investigación de Rodríguez *et al.*, (1984), la fijación biológica de nitrógeno de actinomicetes muestra alta eficiencia especialmente en el ámbito forestal, no se ha comprobado su infección en plantas no actinorrizas. Dentro del orden actinobacteria, varios estudios han demostrado la capacidad diazotrófica en los géneros *Agromyces* (Hernandez, 2009), *Frankia* (Mirza *et al.*, 2009), *Micromonospora* (Valdés *et al.*, 2005) *Streptomyces* (Ribbe *et al.*, 1997).

#### **4.2.6. Discusión general del trabajo**

El objeto de la presente investigación fue seleccionar microorganismos de vida libre eficientes en la fijación biológica de nitrógeno, partiendo de muestras de suelo de cinco ecosistemas diferentes, para lo cual se estableció una metodología acorde, que permitió dar cumplimiento de los objetivos trazados en función de dos factores de estudio importantes para el desarrollo de la investigación, el origen de la muestra y el medio de cultivo.

En el aislamiento selectivo de microorganismos con posible capacidad diazotrófica se obtuvo un alto número de colonias independientes a las que se les aplicó un filtro de características fenotípicas y respuestas fisiológicas basado en una metodología de análisis estadístico de resultados, a fin de separar las cepas aisladas en grupos de alta similitud, mismos que compartieron el 90% de características evaluadas. La determinación de población y diversidad resaltó a la muestra proveniente de suelo de bosque de pino como la mejor para ambos aspectos, las características fisicoquímicas de cada ecosistema son factores altamente influyentes en el número y diversidad de microorganismos presentes, así como de sus características metabólicas, es probable que factores climatológicos, disponibilidad de oxígeno y nutrientes, además de las actividades antropogénicas de cada ecosistema incidan directa o indirectamente en los resultados.

Se obtuvieron aislamientos puros de ciento trece cepas microbiológicas de las cuales el 52% se reportaron como bacterias y el 48% como actinomicetes. De las ciento trece cepas 59 correspondieron a bacterias, de las cuales el 34% provino de suelos de pajonal de

páramo, 14% de suelo de bosque de pino, 10% de suelo ferroso amazónico, 14% de suelo de monocultivo orgánico de maíz y 25% de suelo de arrozal.

De las 54 cepas restantes correspondientes a actinomicetes 13% provino de suelos de pajonal de páramo, 20% de suelo de bosque de pino, 28% de suelo ferroso amazónico, 15% de suelo de monocultivo orgánico de maíz y 24% de suelo de arrozal.

La caracterización macro y microscópica ayudó a visualizar a las cepas que más se acoplaron a las características fenotípicas propias de los microorganismos diazotófos que se han reportado en su mayoría como bacilos Gram negativos, sin capsula ni producción de endosporas, mesófilos neutrotolerantes y con alta resistencia osmótica de sales, esta característica halotolerante motiva a ahondar en investigaciones de adaptabilidad y sobrevivencia microbiológica ya que el origen de los individuos aislados presentaron bajos índices de sales disueltas lo que induciría a creer en una halotolerancia débil.

La construcción de dendrogramas a partir de las características fenotípicas y respuestas fisiológicas evaluadas y considerando el coeficiente de similaridad del 90% agrupó a las cepas aisladas en 29 grupo especie de bacterias y 35 grupo especie de actinomicetes, varios grupos fueron recuperados como cultivos individuales. Por tanto, se indica una amplia distribución de los microorganismos diazotófos en diferentes ecosistemas y es altamente probable que hayan desarrollado estrategias génicas y metabólicas para adaptarse a las condiciones medioambientales bajo las cuales sobreviven.

Es propicio llevar a cabo la caracterización molecular de las cepas seleccionadas como diazotófos para confirmar los resultados preliminares obtenidos en los dendrogramas.

La determinación de la capacidad diazotrófica evaluada con el reactivo de Nessler arroja resultados interesantes, que ayudan a reafirmar la presencia de una amplia biodiversidad de bacterias con la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico presentes en ecosistemas terrestres de ubicación, condiciones geográficas y ambientales e incluso características fisicoquímicas diferentes. Además el alto porcentaje de grupos-especies que dieron positiva a la evaluación cualitativa de la prueba de Nessler anuncian amplias posibilidades agroindustriales.

### **4.3. Verificación de la hipótesis**

#### **4.3.1. Hipótesis nula ( $H_0$ )**

Las bacterias diazótroficas de vida libre seleccionadas de las muestras recolectadas de diferentes ecosistemas terrestres no son eficientes en la fijación biológica de nitrógeno.

#### **4.3.2. Hipótesis alternante ( $H_1$ )**

Las bacterias diazótroficas de vida libre seleccionadas de las muestras recolectadas de diferentes ecosistemas terrestres son eficientes en la fijación biológica de nitrógeno.

Después del análisis de los resultados obtenidos de población y diversidad de los cultivos aislados y su respuesta a la prueba de Nessler, se acepta la hipótesis alternante ( $H_1$ ) afirmando que en las muestras recolectadas de diferentes ecosistemas terrestres está presente una amplia biodiversidad de microorganismos asimbióticos eficientes en fijación biológica de nitrógeno atmosférico.

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

- Se aislaron 59 bacterias y 54 actinomicetes con posible capacidad fijadora de nitrógeno de las cinco muestras de ecosistemas terrestres empleadas.
- La muestra proveniente de suelo de bosque de pino del caserío San Juan de la provincia de Chimborazo mostró resultados altamente significativos de población y diversidad bacteriana.
- El factor de estudio B, medio de cultivo, no mostró diferencia significativa, es decir que no influye en los resultados de población y diversidad bacteriana.
- Mayoritariamente se obtuvieron bacterias Gram positivas de forma cocoide y actinomicetes con cadenas de esporas rectas.
- Del total de microorganismos aislados en su mayoría se presentaron mesófilos, 33% acidófilos, 29% neutrotolerantes y 38% alcalitolerantes y altamente resistentes a concentraciones elevadas de sal. Dichas respuestas de las pruebas de fisiológicas pueden deberse a las condiciones propias de los orígenes de las muestras, así como a los mecanismos de adaptabilidad.
- Taxonómicamente, se identificaron 29 grupos especies de bacterias, de los cuales 18 grupos presentaron más de un representante, mientras que los 11 grupos restantes fueron resaltados como cultivos individuales. El grupo más amplio fue el 19 con 6 miembros. En el caso de los actinomicetes, se identificaron 35 grupos especie, de los cuales 12 grupos presentaron más de un representante, mientras que los 16 grupos restantes fueron señalados como cultivos individuales.
- La capacidad diazotrófica de las colonias aisladas fue positiva en 22 grupos-especie de bacterias y 25 grupos-especie de actinomicetes, a pesar que las ciento trece cepas fueron crecidas inicialmente en medios de cultivo libres de nitrógeno 10 grupos-especie no presentaron respuesta positiva.

## 5.2. Recomendaciones

- Realizar pruebas para determinación de nitratos para los individuos que dieron negativa a la evaluación estimativa de amonio.
- Identificar molecularmente de los genes Nif, lo que reafirme la capacidad diazotrófica de las cepas seleccionadas.
- Determinar cuantitativamente de la actividad de la Nitrogenasa para comparar los rendimientos de la fijación biológica de nitrógeno con la aplicación de productos sintéticos.
- Identificar la especie de los microorganismos aislados mediante el análisis del gen 16S rRNA
- Implementar un banco de germoplasma de microorganismos diazótrofos de importancia agroindustrial, biotecnológica y ambiental.
- Evaluar la eficiencia de fijación de las cepas seleccionadas in-situ, en un campo de producción vegetal de alto interés agrícola.

## **CAPÍTULO VI**

### **PROPUESTA**

#### **6.1. Datos informativos**

##### **6.1.1. Título**

Aislamiento de bacterias de vida libre eficientes en fijación biológica de nitrógeno de ecosistemas terrestres

##### **6.1.2. Instituciones ejecutoras**

Universidad Técnica de Ambato

##### **6.1.3. Beneficiarios**

Investigadores y estudiantes universitarios del Ecuador. Industrias agrarias. Centros e instituciones de investigaciones microbiológicas y agropecuarias que se encuentren relacionadas a la obtención de nuevos productos con aplicación biotecnológica.

##### **6.1.4. Ubicación**

Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.  
Av. Los Chasquis y Río Payamino. Ciudadela Huachi Chico. Ambato-Ecuador.

##### **6.1.5. Tiempo estimado para la Ejecución**

Seis meses

##### **6.1.6. Equipos técnico responsable**

Investigadores, docentes y estudiantes que se encuentren trabajando en la diversidad biológica y selección de microorganismos diazótrofos aislados de ecosistemas terrestres.

#### **6.2. Antecedente de la propuesta**

Durante los últimos años, la demanda de productos vegetales ha aumentado en cantidad y calidad, por tanto los sectores agroindustriales se han visto presionados a usar fertilizantes químicos como alternativa rápida para el mejoramiento productivo. Sin embargo el uso indiscriminado de nitrogenados sintéticos ha dado como consecuencia el deterioro

medioambiental de los recursos naturales y desequilibrio en la micro fauna generando una dependencia química y consecuencias nefastas en aspectos sociales, económicos y salubres. A fin de contrarrestar este problema, es imperativo seleccionar microorganismos capaces de fijar nitrógeno atmosférico que no dependan directamente de una especie vegetal específica, de manera que se erradiquen los daños medioambientales y se devuelva el equilibrio ambiental a todo los ecosistemas de interés agroindustrial.

La investigación “Selección de bacterias de vida libre eficientes en fijación biológica de nitrógeno como alternativa sustentable para ecosistemas terrestres” es base de la solución a tan grave problema ambiental, ya que demostró una alta densidad poblacional y diversidad biológica de microorganismos capaces de aprovechar el nitrógeno atmosférico volviéndolo asimilable por todo tipo de especies vegetales de manera que se remplace el uso de nitrificantes químicos. Y se combata los dañinos efectos medioambientales que estos han dejado a lo largo del tiempo.

### **6.3. Justificación**

El estudio “Selección de bacterias de vida libre eficientes en fijación biológica de nitrógeno como alternativa sustentable para ecosistemas terrestres”, reveló una amplia variedad de microorganismos diazótrofos presentes en las diferentes muestras de suelos utilizados. Hecho que sustenta la metodología para aislar y seleccionar bacterias de vida libre con capacidad diazotrófica en ecosistemas terrestres, de manera que dichas técnicas puedan aplicarse en cualquier ecosistema y así extenderse sobre todo tipo de cultivo de interés industrial, propiciando la generación de biofertilizantes nitrogenados, que a más de suplir los requerimientos de nitrógeno de las plantas, promuevan la asimilación de otros nutrientes, produzcan sustancias bioactivas y actúen como promotores del crecimiento vegetal.

### **6.4. Objetivos**

#### **6.4.1. General**

Generar un protocolo de aislamiento de microorganismos diazótrofos de vida libre presentes en ecosistemas terrestres.

#### **6.4.2. Específicos**

Aislar selectivamente microorganismos de vida libre con capacidad de fijar nitrógeno atmosférico de varias muestras de suelo provenientes de diferentes ecosistemas.

Determinar las condiciones óptimas de cultivo para el desarrollo in vitro de microorganismos diazótrofos de vida libre procedentes de diferentes ecosistemas terrestres.

#### **6.5. Análisis de factibilidad**

En base a los resultados señalados en la investigación “Selección de bacterias de vida libre eficientes en fijación biológica de nitrógeno como alternativa sustentable para ecosistemas terrestres” se asegura la viabilidad de esta propuesta y el cumplimiento de objetivos. Además los la investigación en la cual se fundamenta la presente propuesta direccionará al desarrollo de nuevos biofertilizantes a fin de dar solución al problema medioambiental generado por los nitrogenados químicos

#### **6.6. Fundamentación**

La base científica para la formulación de la siguiente propuesta recae en la investigación “Selección de bacterias de vida libre eficientes en fijación biológica de nitrógeno como alternativa sustentable para ecosistemas terrestres”.

#### **6.7. Metodología – Modelo Operativo**

##### **6.7.1. Caracterización físico-química de las muestras medioambientales**

###### **Determinación del pH y Conductividad de las muestras**

Para determinar el pH y conductividad de las muestras, se pesará 20 gramos de suelo y se añadirá 50 ml de agua destilada, dicha suspensión se mantendrá en agitación 5 minutos y en reposo por una hora. Una vez transcurrido ese tiempo se procederá a tomar las lecturas correspondientes de las muestras, con la ayuda de un pH-metro y un conductímetro previamente calibrados.

### **Determinación del porcentaje de humedad de las muestras**

La humedad de las muestras de suelo se calculará por el diferencial de peso, entre una misma muestra, húmeda, y después de haberse secado en la estufa hasta obtener un peso constante.

Es así que para la determinación del porcentaje de humedad se pesarán previamente las cápsulas de porcelana a usarse, mismas donde se colocarán 5 gramos de cada una de las muestras, se registrará el peso total (Peso 1). Las cápsulas de porcelana que contengan las muestras se colocarán en una estufa y se las someterá a 105° C por 24 horas.

Al retirar las muestras se las dejará enfriar en un desecador y se procederá a pesarlas nuevamente (Peso 2). Por tanto el porcentaje de humedad será determinado mediante la siguiente fórmula y restando el peso de las cápsulas:

$$\% \text{Humedad} = \frac{\text{Peso}_1 - \text{Peso}_2}{\text{Peso}_2} \cdot 100$$

### **Determinación del porcentaje de materia orgánica**

La evaluación del porcentaje de materia orgánica de las muestras se llevará a cabo por el método de calcinación, este método determinará el contenido total de materia orgánica que posee el suelo, completo o en fracción. Se calcula mediante el diferencial de peso entre los valores registrados antes y después de calcinar una muestra, esta diferencia de peso equivale a la cantidad de materia orgánica que se perdió de la muestra por efecto de la calcinación.

Para ello, previamente se pesarán los crisoles a utilizarse, donde se colocarán 5 gramos de cada muestra, mismas que serán colocadas en una estufa y se les aplicará 105°C por 24 horas. Pasado este tiempo se sacarán las muestras y dejarán enfriar en un desecador, una vez climatizadas se procederá a pesar (Peso 1). Posteriormente las muestras serán ingresadas en una mufla, a 400°C por 3 horas. Al finalizar este periodo se dejará enfriar y se tomará el peso final (Peso 2). El porcentaje de materia orgánica será determinado mediante la siguiente fórmula y descontando el peso de los crisoles:

$$\% \text{M.O} = \frac{\text{Peso}_1 - \text{Peso}_2}{\text{Peso}_2} \cdot 100$$

## 6.7.2. Aislamiento selectivo de actinomicetes

### Determinación de la población y diversidad de actinomicetes

Cada una de las muestras compuestas se utilizará para determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFCs) por gramo de muestra y por tanto de la diversidad bacteriana. Para ello se usará el método de difusión en placa y diluciones. Para preparar la dilución inicial 1/10 se pesará 10 gramos de cada suelo y se colocará en botellas junto con 90ml de agua de llave previamente esterilizada. La suspensión será agitada manualmente durante 1 hora. Pasado éste tiempo se prepararán las diluciones 1/102 y 1/103 de cada muestra. Cien microlitros (100 µl), de cada dilución, se colocarán y difundirán sobre la superficie de las cajas Petri que contendrán medio Winogradsky y medio JMV (Anexo A), cada uno de ellos suplementado con nistatin, a una concentración de 75 µg/ml, y ajustado su pH a 6,5. Las cajas inoculadas deberán ser debidamente rotuladas, selladas y puestas a incubación a 28°C durante 4 a 5 días. Pasado el tiempo de incubación se procederá a contar el número de colonias de bacterias presentes en cada una de las cajas, adicionalmente se registrará el número de colonias diferentes. El número de ufc por gramo de suelo se calculará para aquellas diluciones en las que el número de colonias se encuentre en un rango entre 30 hasta 300, usando la siguiente fórmula:

$$\text{ufc/g de suelo} = \frac{N \times FD \times Vt}{Vi \times S}$$

Dónde:

**N** Número de colonias

**FD** Dilución en la cual se contó N (Ej: Conteo realizado en la dilución 1/103, FD = 1x103)

**Vt** Volumen de la dilución 1/10, en mililitros

**Vi** Volumen inoculado, en mililitros

**S** Cantidad en gramos de la muestra utilizada para preparar la dilución 1/10

### Aislamiento, purificación y almacenamiento de actinomicetes

Se seleccionarán los platos Petri que muestren crecimiento visible y diversidad de colonias de bacterias, para proceder con el aislamiento selectivo y purificación de las cepas con posible capacidad nitro-fijadora. Con ayuda de un palillo o asa de punta, debidamente estériles, se tomarán las colonias diferenciadas, mismas que serán inoculadas por estría simple en cajas tetrapetri que contengan medio Winogradsky y medio JMV y serán llevados a incubación a la temperatura óptima de crecimiento para diazótrofos, durante una

semana. Pasado este tiempo se evaluará el crecimiento de las cepas mediante código binario. A la bacteria que presente crecimiento, se asignará 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0.

Las cepas que muestren crecimiento en los medios de cultivo libres de nitrógeno se las considerará, en primera instancia, bacterias diazótrofes, es decir con la capacidad de fijar N<sub>2</sub> atmosférico.

Los cultivos que se muestren puros serán repicados en estría compuesta en platos individuales con el mismo medio de cultivo del que precedan, respectivamente. Aquellas cepas que pasado el tiempo de incubación muestren características de pureza, serán etiquetados y posteriormente almacenados en tubos plásticos eppendorf que contengan 1 mililitro de glicerol al 20% (w/v) y almacenados a -10°C en un congelador, para su preservación a largo plazo.

### **Caracterización macroscópica**

Los cultivos puros obtenidos se agruparán de acuerdo a la coloración y morfología de las colonias, los que se determinarán usando una tabla estándar de colores. Se describirán las características generales de cada colonia como forma, margen y elevación. Aquellas cepas que presenten características macroscópicas similares serán ubicadas en un mismo grupo.

### **Caracterización microscópica**

Las cepas puras se usarán para preparar muestras que serán observadas bajo el microscopio. Se determinará el tamaño y forma de la célula bacteriana, así como la tinción de Gram, presencia de esporas y cápsulas. Para cada tinción se prepararán placas de cada cultivo, es decir se realizarán frotis en agua, donde las muestras bacterianas serán extendidas uniformemente en una película delgada, posteriormente se dejarán secar al aire y se fijarán por acción de calor moderado.

### **6.7.3. Pruebas fisiológicas de crecimiento**

#### **Rango de crecimiento en Función de la Temperatura**

Se inoculará 3 µl de suspensiones de células previamente preparadas, sobre la superficie cajas tetrapetri con el medio de cultivo que presente los mejores resultados de crecimiento. Los platos inoculados serán incubados a temperaturas de 4, 20, 28, 37 °C durante 3 días. Transcurrido el tiempo de incubación se observará la presencia o no de las bacterias y se

evaluará su crecimiento mediante código binario, si la bacteria presenta crecimiento, se le asignará 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0. Se determinará el tipo de microorganismo en según el rango de crecimiento en función a temperatura

#### **Rango de crecimiento en Función del pH**

Se inoculará 3 µl de las suspensiones de células sobre la superficie cajas tetrapetri con el medio de cultivo que presente los mejores resultados de crecimiento., ajustado a los pHs a 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, y 9.5. El pH se ajustará con la ayuda de sistemas de búferes, para evitar cambios en el mismo debido al metabolismo de los microorganismos. Las cajas serán incubadas de acuerdo a la temperatura óptima de crecimiento de las bacterias, determinada en el ítem anterior. El tiempo de incubación será de una semana. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluarán las cajas para observar el crecimiento de bacterias. Esta evaluación se realizará mediante código binario. A la bacteria que presente crecimiento, se asignará 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0.

#### **Rango de crecimiento en Función de la salinidad**

Se inoculará 3 µl de las suspensiones de células en la superficie cajas tetrapetri con el medio de cultivo que presente los mejores resultados de crecimiento que contendrá 1, 5, 10, 15 y 30% de NaCl (w/v). Las cajas serán incubadas de acuerdo a la temperatura óptima de crecimiento de las bacterias, el tiempo de incubación será de una semana. Transcurrido este tiempo se evaluarán las cajas para observar el crecimiento de bacterias. Esta evaluación se realizará mediante código binario. Si la bacteria presente crecimiento, se asignará 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0.

#### **6.7.4. Determinación de la capacidad fijadora de nitrógeno**

Se verificará la capacidad fijadora de nitrógeno, mediante estimación cualitativa de nitrógeno amoniacal producido por las cepas seleccionadas, para lo cual, previamente se reactivarán las cepas representantes de cada grupo taxonómico, inoculándose en cajas petri con el medio de cultivo en el que presentaron los mejores resultados de crecimiento, incubadas a 26°C durante una semana, pasado este tiempo se colocará el contenido puro de cada caja en tubos bacteriológicos que contengan 10ml de medio de cultivo liquido Winogradsky, libre de nitrógeno, e incubados a 26°C con agitación constante durante una

semana, pasado este tiempo se tomará 1ml de cada tubo y se le añadirá dos gotas de reactivo de Nessler, se agitará y dejará reposar por 5 minutos

Para determinar la producción de ion amonio, se observará el viraje de color amarillo a anaranjado, esta evaluación se realizará mediante código binario, asignándose 1 para presencia de nitrógeno amoniacal y 0 en ausencia de ion amonio

## 6.8. Administración

**Tabla 13. Administración**

Indicadores a mejorar	Situación actual	Resultados esperados	Actividades	Responsables
Metodologías para la determinación exacta de la eficiencia de producción de ión amonio de los microorganismos con capacidad diazotrófica.	Limitada aplicación de actinomicetes diazótrofos en zonas de interés agroindustrial.  Interferencia de factores externos en la eficiencia de fijación biológica de nitrógeno.	Identificación de altos rendimientos de nitrógeno fijado por bacterias de vida libre.  Generación de biofertilizantes a base de microorganismos diazótrofos de vida libre con alto potencial biotecnológico.	Caracterización fenotípica de las bacterias aisladas.  Pruebas fisiológicas y bioquímicas de las bacterias aisladas.  Verificación de la actividad de la Nitrogenasa in situ	Docentes Investigadores Estudiantes

## 6.9. Previsión de la evaluación

**Tabla 14. Previsión de la evaluación**

Preguntas básicas	Explicación
¿Quiénes solicitan evaluar?	Docente Investigador

**Tabla 14. Continuación...**

¿Por qué evaluar?	Provee de información sobre la estructura, metabolismo, estrategias de adaptación y protección e intereses y aplicaciones industriales acerca de los microorganismos diazótrofos de vida libre presentes en ecosistemas terrestres.
¿Para qué evaluar?	Para establecer la biodiversidad de microorganismos diazótrofos de vida libre distribuidos en los ecosistemas terrestres de interés agrario, así como sus estrategias metabólicas.
¿Qué evaluar?	Características fenotípicas y respuestas fisiológicas a partir de taxonomía numérica. Capacidad diazotrófica.
¿Quién evalúa?	Docente
¿Cuándo evaluar?	Al finalizar las pruebas de taxonomía numérica. Al obtener cambios de color visibles al aplicar el reactivo de Nessler
¿Cómo evaluar?	Realizando una matriz de código binario. Generando análisis de varianza para los factores de interés. Evaluando la similitud de las cepas aisladas. Aplicando una metodología selectiva para los microorganismos de interés.
¿Con qué evaluar?	Software NTSYS Programa estadístico Infostat

## BIBLIOGRAFÍA

1. **ABELA, J. 2007.** Importancia y función de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) en el cultivo de la soya. Manual de difusión técnica de soya. Págs. 127-134.
2. **ACUNA, O. 2006.** La fijación biológica de nitrógeno: El caso de la caña de azúcar. Centro de Investigaciones Agronómicas. Universidad de Costa Rica. Págs. 662-665.
3. **ALLAN, D.; GRAHAM, P. 2002.** Biology and fertility: symbiotic nitrogen fixation. Disponible en: <http://www.soils.agri.umn.edu/academics/classes/soil3612/SymbioticNitrogenFixation/Other.htm>
4. **ÁLVAREZ, S.; JIMÉNEZ, C. 2012.** Diseño y construcción de un micro ecosistema cerrado. Ecodolium - Parque tecnológico de Galicia. Págs. 5-8
5. **ARAUZ, F. 1997.** Hacia un uso racional de los plaguicidas sintéticos: Una perspectiva agroecológica. Agronomía Costarricense. Págs. 19-23
6. **BACA, B.; SOTO, L.; PARDO, M. 2000.** Fijación biológica de nitrógeno. Revista elementos. Págs. 39- 49
7. **BANERJEE, M.; YESMIN, L.; VESEY, J. 2006.** Plant-growth-promoting Rhizobacteria as biofertilizers and biopesticides. Handbook of microbial biofertilizers. Págs. 137- 181.
8. **BARRAQUIO, W.; SEGUBRE, E.; GONZALEZ, M.; VERMA, S.; JAMES, E.; LADHA, J.; TRIPATHI, A. 2000.** Diazotrophic enterobacteria: What is their role in the rhizosphere of rice. Págs. 93-118.
9. **BÁSCONES, E.; IMPERIAL, T.; RUÍZ, A.; PALACIOS, J. 2000.** Generation of new hydrogen-recycling Rhizobiaceae strains by introduction of a novel hup minitransposon. Págs. 92-99.
10. **BASHAN, Y. 2008.** El uso de inoculantes microbianos como una importante contribución al futuro de la agricultura mexicana. Págs.7-24
11. **BASHAN, Y.; HOLGUÍN, G. 1998.** Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. Págs. 1225-1228.

12. **BECANA, M.; BEDMAR, E. 1991.** Metabolismo del nitrato y oxígeno en nódulos de leguminosas. Colección Nuevas Tendencias. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, España. Págs. 19-23.
13. **BERGENSEN, F. 1997.** Regulation of nitrogen fixation in infected cells of leguminous root nodules in relation to O<sub>2</sub> supply. Págs.189-203.
14. **BERGMAN, B.; GALLON, A.; RAI, N.; STAL, J. 1997.** N<sub>2</sub> fixation by non-heterocystous cyanobacteria. Pág.139.
15. **BOISON, G.; BOTHE, H.; SCHMITZ, O. 2000.** Transcriptional analysis of hydrogenase genes in the cyanobacteria *Anacystis nidulans* and *Anabaena variabilis* monitored by RT-PCR. Pág. 40.
16. **BOJÓRQUEZ, A.; GARCÍA, C.; CAMACHO, J. 2010.** Role of biofertilizers in the agricultural development in México. Revista de sociedad, cultura y desarrollo sustentable, vol. 6. Págs. 51-56.
17. **BRADY, N. 1990.** The nature and properties of soils. Págs. 3-9.
18. **BURNS, R.; HARDY, R. 1975.** Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. Págs. 50-53.
19. **CAI, Y.; WOLK, C. 1997.** *Anabaena* sp. Strain PCC 7120 respond to nitrogen deprivation with a cascade- like sequence of transcriptional activators. Págs. 267-271.
20. **CASSÁN, F.; BOTTINI, R.; SCHNEIDER, G.; PICCOLI, P. 2001.** *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* hidrolize conjugates of GA20 and metabolize the resultant aglycones to GA1. Págs. 53-58.
21. **CENTRO DE INVESTIGACIONES Y APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS (IAB). 2001.** Biofertilizantes. Valencia, España. Disponible en: <http://www.iabiotec.com/respuestas.htm>
22. **CHAN, M.; JONGSUN, K. 1993.** The nitrogenase FeMo-cofactor and P--cluster pair: Págs. 792-794.
23. **CHEN, W.; LAEVENS, S.; LEE, T.; COENYE, T.; DE VOS, P.; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. 2001.** Isolated from root nodules of Mimosa species and sputum of a cystic fibrosis patient. Págs. 29-35.
24. **CORONADO, M. 2002.** Agricultura orgánica vs agricultura convencional. Disponible en <http://www.ciedperu.org/manuales/organico>.

25. **DÍAZ, C. 2010.** Aislamiento, caracterización y selección de rhizobia autóctonos que nodulan habichuela roja (*Phaseolus vulgaris L.*), en la República Dominicana. Universidad de León – Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad. Págs. 12, 42-43.
26. **DINGLER, C.; KUHLA, J.; WASSINK, H.; OELZE, J. 1988.** Level and activities of nitrogenase proteins in *Azotobacter vinelandii* grown at different dissolved oxygen concentrations. Págs. 148-152.
27. **DÖBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. 2002.** Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. Revista Biology and Fertility of Soils. Págs. 284-297.
28. **DÖBEREINER, J.; ALEF, K.; NANNIPIERI, P. 1995.** Isolation and identification of aerobic nitrogen-fixing bacteria from soil and plants. Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Págs.134-141.
29. **DUXBURY, J. 1994.** The significance of agricultural sources of greenhouse gases. Págs. 151-163
30. **ERNST, A.; BLACK, T.; CAI, Y.; PANOFF, J.; TIWARI, D.; WOLK, D. 1992.** Synthesis of nitrogenase in mutants of the cyanobacterium *Anabaena* sp. affected in heterocyst development or metabolism. Pág. 25.
31. **ESPIN, G. 2002.** Biología de *Azotobacter vinelandii*. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en [www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO\\_09/Capitulo09.pdf](http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_09/Capitulo09.pdf)
32. **FALLIK, E.; OKON, E.; EPSTEIN, A.; GOLDMAN, M. 1992.** Identification and quantification of IAA and IBA in *Azospirillum brasilense*-inoculated maize roots. Págs. 147-153.
33. **FERRARI, M.; SPIRITO, S.; SABALZA, M. 1995.** Taxonomía numérica: Su aplicación al análisis de los resultados de una evaluación. Revista brasileira de ensino de física vol. 17. Págs.159 - 164
34. **FLORES, A.; CONTRERAS, J.; REYES, M.; RODRÍGUEZ, R. 2012.** Aislamiento e identificación de cepas nativas del suelo mexicano del género *Azotobacter*. Revista científica de la universidad autónoma de Coahuila vol 4. Págs. 32- 38.

35. **FRIONI, L. 2006.** Microbiología básica, ambiental y agrícola. Universidad de la república oriental de Uruguay. Págs. 169-210.
36. **FU, H.; BURRI, R. 1989.** Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. Revista de bacteriología. Págs. 68-75.
37. **GADKARI, D.; SARJIYA, A.; MEYER, O. 1992.** Azide, cyanide and nitrite are new substrates of the oxygen dependent nitrogenase of the thermophilic bacterium. Págs. 30-45.
38. **GARRIDO, M. 2007.** Aislamiento e identificación de bacterias diazotróficas rizosféricas y endófitas asociadas a suelos y pastos del valle y sabana del cesar en dos épocas climáticas. Universidad militar de Nueva Granada. Págs. 20- 22, 38.
39. **GARZÓN, D. 2013.** Determinación de la biodiversidad microbiana en ecosistemas glaciares de la Antártida. Pág. 18-26.
40. **GLICK, B. 1995.** The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Págs 109-117.
41. **GOLDEN, G.; YOON, H. 1998.** Heterocyst formation in *Anabaena*. Pág. 23.
42. **GONZÁLEZ, T.; CAPANHARO, J.; LEMOS, E. 2008.** Genetic characterization and nitrogen fixation capacity of *Rhizobium* strains on common bean. Págs. 77-84.
43. **GUPTA, V.; BOCHOW, H.; DOLEJ, S.; FISCHER, I. 2000.** Plant growth-promoting *Bacillus subtilis* strain as potential inducer of systemic resistance in tomato against *Fusarium* wilt. Págs. 145-154.
44. **HALBLEIB, C.; LUDDEN, P. 2000.** Regulation of biological nitrogen fixation. Pág. 130.
45. **HEONSANG, J.; JONGTAEK, P.; HYUNOOK, K. 2013.** Determination of  $\text{NH}_4^+$  in environmental water with interfering substances using the modified Nessler method. Hindawi Publishing Corporation. Págs. 1-8.
46. **HERNÁNDEZ, G. 1998.** Adaptación de cepas de *Rhizobium*, fertilizantes fosfóricos y genotipos de frijol común con alta eficiencia de fijación simbiótica del nitrógeno y uso del fósforo en Cuba. Pág. 102.
47. **HORAN, N.; JARMAN, T.; DAWES, E. 1983.** Studies of some enzymes of aliginic acid biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* grown in continuous culture. Págs. 67-73.

48. **HORNICK, L.; PETERS, L.; HUGENHOLTZ, P. 2007.** *Azotobacter vinelandii*: Tree of life. Disponible en [http://genome.jgipsf.org/draft\\_microbes/azovi/azovi.home.html](http://genome.jgipsf.org/draft_microbes/azovi/azovi.home.html)
49. **HUERTAS, V. 2005.** Fertilización de suelos. Págs. 4-6.
50. **HUREK, T.; MONTAGU, M.; KELLENBERG, E.; REINHOLD, B. 1995.** Induction of complex intracytoplasmic membranes related to nitrogen fixation in *Azoarcus* sp. Pág. 18.
51. **JUTY, N.; MOSHIRI, F.; MERRICK, M.; ANTHONY, C.; HILL, S. 1997.** The *Klebsiella pneumoniae* cytochrome bd' terminal oxidase complex and its role in microaerobic nitrogen fixation. Págs. 143, 267-269.
52. **KARG, T.; REINHOLD, B. 1996.** Global changes in protein composition of N<sub>2</sub>-fixing *Azoarcus* sp, strain BH72 upon diazosome formation.
53. **KIEHL, J. 1995.** Fertilizantes orgánicos. Editorial Ceres. Pág. 492.
54. **LARA, C.; VILLALBA, M.; OVIEDO, L. 2007.** Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos- Córdoba, Colombia. Revista colombiana de Biotecnología, vol. 9. Págs. 6-12
55. **LOU, J.; MOSHIRI, M.; JOHNSON, M.; LAFFERTY, D.; SORKIN, A. 1999.** Mutagenesis studies of the FeSII protein of *Azotobacter vinelandii*: Roles of histidine and lysine residues in the protection of nitrogenase from oxygen damage. Págs.63-71.
56. **LUQUE, I.; FLORES, E.; HERRERO, A.1994.** Molecular mechanism for the operation control in cyanobacteria. Págs. 62-69.
57. **MENEZES, A. 2009.** Aislamiento y caracterización de bacterias diazótroficas asociadas a maíz (*Zea mays*) variedad PAU 817. Págs. 4-8, 16-18
58. **MEUNCHANG, S.; PANICHSAKPATANA, S.; WEAVER, R. 2005.** Inoculation of sugar mill by-products compost with N<sub>2</sub> fixing bacteria. Springer. Págs. 219-225.
59. **MINCHIN, F. 1997.** Regulation of oxygen diffusion in legume nodules. Págs. 881-888.
60. **MISHUSTIN, E.; SHILNIKOVA, V. 1969.** The biological fixation of atmospheric nitrogen by free-living bacteria.
61. **MORATTO, C.; MARTÍNEZ, L.; VALENCIA, H.; SÁNCHEZ, J. 2005.** Efecto del uso del suelo sobre hongos solubilizadores de fosfato y bacterias diazotróficas en

- el páramo de Guerrero-Cundinamarca. Universidad Nacional de Colombia. Págs. 299-303.
62. **MORENO, L.; GALVIS, F. 2013.** Potencial biofertilizante de bacterias diazótroficas aisladas de muestras de suelo rizosférico. Revista pastos y forrajes, vol. 36. Págs. 33-38.
  63. **NÚÑEZ, C.; RODRÍGUEZ, J.; NIETO, R.; BARRIENTOS, A. 2004.** Construcción de dendrogramas de taxonomía numérica mediante el coeficiente de distancia  $\chi^2$ . Revista Chapingo serie horticultura. Págs. 229-239
  64. **OCHIAI, E. 2003.** Bioinorganic Chemistry an Introduction. Editorial reverté. Págs. 295-310.
  65. **OLIVARES, J. 2006.** Fijación biológica de nitrógeno. Estación experimental del Zaidín-Granada. Disponible en <http://www.eez.csic.es/~olivares/ciencia/fijacion/index.html>.
  66. **ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO). 2000.** Estrategias en materia de fertilizantes. Págs. 21-23, 35-37, 70.
  67. **ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO). 2005.** Tendencias mundiales actuales y perspectivas de los fertilizantes al 2009/10. Págs. 7-26.
  68. **ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO). 2008.** Los fertilizantes y su uso. Págs. 6, 12- 15, 53.
  69. **ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO). 2015.** World fertilizer trends and outlook to 2018 trends and out. Págs. 2, 8-10,15-19.
  70. **OROZCO, F. 1995.** Impacto ambiental de los fertilizantes en la agricultura con énfasis en el cultivo de papa. Problemática ambiental del sector agropecuario en Colombia, Universidad Nacional de Colombia.
  71. **PEÑA, H.; REYES, I. 2007.** Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa L.*). Revista Interciencia vol. 32. Págs. 559-564
  72. **PESCHEK, G.; VILLGRATER, K.; WASTYN, M. 1991.** Respiratory protection of the nitrogenase in dinitrogen-fixing cyanobacteria. Revista Plant Soil. Págs. 17-24.

73. **PLASCENCIA, R. 2013.** Asociación de cepas fijadoras de nitrógeno de vida libre, con recursos genéticos de pastos para zonas áridas. Págs. 5-10, 24-27.
74. **POSTGATE, J. 1982.** The fundamentals of nitrogen fixation. Pág. 252.
75. **RAMOS, A. 2009.** Fijación de nitrógeno. Disponible en [www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/11nutrientes.htm](http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/11nutrientes.htm)
76. **READE, J.; DOUGHERTY, H.; ROGERS, J.; GALLON, J. 1999.** Synthesis and proteolytic degradation of nitrogenase in cultures of the unicellular cyanobacterium.
77. **REYES, A. 2011.** Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp., y evaluación de su capacidad para suplir las necesidades de nitrógeno en el cultivo de maíz, (*Zea mays*) semihidropónico con dos sustratos diferentes bajo invernadero. Págs. 17-20, 23, 50-53.
78. **RODRÍGUEZ, C.; SEVILLANO, F.; SUBRAMANIAM, P. 2011.** La fijación de nitrógeno atmosférico una biotecnología en la producción agraria. Págs. 17-30.
79. **RUIZ, B.; CAMPOS, J.; BARBA, N. 2008.** Cofactor FeMco (M = Mo, V, Fe) en la nitrogenasa. Revista educación química. Págs. 34-40
80. **RUIZ, M. 2013.** Identificación y evaluación de la eficiencia en la fijación de nitrógeno atmosférico de la cepa Bg1 en condiciones de laboratorio, e invernadero en el cultivo de rosa (*Rosa* sp. Var. Ravel). Escuela superior politécnica de Chimborazo. Págs. 20, 33.
81. **RUIZ, T.; IMPERIAL, J.; PALACIOS J. 2000.** Hidrogenasas de las bacterias que nodulan leguminosas. Revista Horizon Scientific, pages. 489-507
82. **SAIER, M. 2000.** Bacterial diversity and the evolution of differentiation. Pág. 343.
83. **SCHERINGS, G.; HAAKER, H.; WASSINK, A.; VEEGER, C. 1983.** On the formation of an oxygen tolerant three component nitrogenase complex from *Azotobacter vinelandii*. Págs. 135, 191-199.
84. **SERRAJ, R.; SINCLAIR, T.; PURCELL, L. 1999.** Symbiotic N<sub>2</sub> fixation response to drought. Págs. 143-155.
85. **SINERGIA. 2006.** Impactos ambientales en agricultura. Revista Life. Págs. 2-11.
86. **SOTO, L.; Y BACA, B. 2001.** Mecanismos de protección de la nitrogenasa a la inactivación por oxígeno. Revista latinoamericana de microbiología.

87. **SUQUILANDA, M. 1996.** Agricultura orgánica. Ediciones UPS. Fundación para el desarrollo agropecuario.
88. **THORNELEY, R.; ASHBY, G. 1989.** Oxidation of nitrogenase iron protein by dioxygen without inactivation could contribute to high respiration rates of *Azotobacter* species and facilitate nitrogen fixation in other aerobic environments.
89. **UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA (UNC). 2008.** Diversidad vegetal: fijación de nitrógeno. Disponible en <http://unc-biologia.blogspot.com/2008/12/diversidad-vegetal-1-fijacion-del.html>
90. **VALVERDE, A. 2003.** Taxonomía polifásica de poblaciones de microorganismos que establecen simbiosis con *Phaseolus vulgaris*. Universidad de Salamanca – Dep. de microbiología y genética. Págs. 39, 47, 52.
91. **VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ, E.; IGUAL, J. 2005.** Rhizobium tropici IIA nodulates common bean in Portugal. XIII national meeting of the Spanish society of nitrogen fixation II Portuguese-Spanish congress on nitrogen fixation. Págs. 45-46.
92. **VESSEY, K. 2003.** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Revista Plant Soil. Págs. 571-586.
93. **VILLBRANDT, M.; STAL, L.; BERGMAN, B.; KRUMBEIN, W. 1992.** Immunolocalization and western blot analysis of nitrogenase in *Oscillatoria limosa* during a light-dark cycle.
94. **WHELAN, A. 2013.** Bioinsumos, un giro hacia la sustentabilidad. Revista alimentos argentinos en colaboración de la Secretaria de agricultura, ganadería y pesca. Págs. 13-18.
95. **WILLEMS, A.; FERNÁNDEZ, M.; MUÑOZ, E.; GORIS, J.; MARTÍNEZ, E.; TORO, N.; GILLIS, M. 2003.** Description of new ensifer strains from nodules and proposal to transfer ensifer adhaerens cassida. Págs.120–127.
96. **ZAHARAN, H. 2001.** Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. J. Biotechnol. Págs. 91, 143-153.
97. **ZIMMER, W.; MENDEL, R. 1999.** Molybdenum metabolism in plants. Plant Biology. Págs. 160-168.
98. **ZUBERER, D. 1998.** Biological dinitrogen fixation: Introduction and nonsymbiotic. Principles and applications of soil microbiology. New Jersey.

# **ANEXO A**

## **DATOS EXPERIMENTALES**

**Tabla A1.** Origen de muestras de suelo.

<b>Código</b>	<b>Muestra Compuesta</b>	<b>Lugar de Recolección</b>	<b>Fecha de Recolección</b>
<b>PPMB1</b>	Suelo de pajonal del páramo	Río Colorado en la provincia de Chimborazo	30-may-14
<b>PPMB2</b>			
<b>PPMB3</b>			
<b>BPMB1</b>	Suelo de bosque de pino	Caserío de San Juan en la provincia de Chimborazo}	30-may-14
<b>BPMB2</b>			
<b>FAMB1</b>	Suelo ferroso amazónico	Playas de los ríos; Pano en la provincia de Napo y Puyo de la provincia de Pastaza	14-jun-14
<b>FAMB2</b>			
<b>FAMB3</b>			
<b>RCOMB1</b>	Suelo de monocultivo orgánico de maíz	Caserío El Rosario del sector Terremoto de la provincia de Tungurahua	20-jun-14
<b>RCOMB2</b>		Caserío San Fernando de la parroquia Pasa, de la provincia de Tungurahua	29 – junio -2014
<b>RCOMB3</b>			
<b>AHMB1</b>	Suelo de arrozal de estación húmeda	Vía Durán Tambo a orillas del río Babahoyo en la provincia del Guayas.	12-ago-14

**Tabla A2.** Características físico-química de las muestras medioambientales.

<b>Muestra</b>	<b>pH</b>	<b>Conductividad (µs)</b>	<b>% Humedad</b>	<b>% Materia Orgánica</b>
MB1	4,77	25,7	45,9171699	14,9195803
MB2	4,51	82	36,8790086	15,3913698
MB3	4,63	33,7	49,61	20,130594
MB4	9	54,8	18,9654764	2,41706506
MB5	8,84	11,78	56,2613319	4,9235829

**Tabla A3.** Número de colonias obtenidas de los platos del aislamiento selectivo.

Muestra	Medio	Dilución	Repetición	Número de colonias		
				Bacterias	Actinomicetes	Total
MB1	Winogradsky	1/1000	R1	51	6	57
			R2	47	8	55
		1/10000	R1	28	3	31
			R2	31	3	34
		1/100000	R1	4	0	4
			R2	2	0	2
	JMV	1/1000	R1	33	7	40
			R2	35	8	43
		1/10000	R1	22	8	30
			R2	26	5	31
		1/100000	R1	1	0	1
			R2	4	0	4
MB2	Winogradsky	1/1000	R1	147	108	255
			R2	133	96	229
		1/10000	R1	43	26	69
			R2	49	22	71
		1/100000	R1	9	7	16
			R2	10	4	14
	JMV	1/1000	R1	105	104	209
			R2	203	84	287
		1/10000	R1	48	34	82
			R2	49	24	73
		1/100000	R1	6	9	15
			R2	5	8	13
MB3	Winogradsky	1/1000	R1	79	36	115
			R2	78	30	108
		1/10000	R1	25	11	36
			R2	24	8	32
		1/100000	R1	3	0	3
			R2	2	1	3
	JMV	1/1000	R1	49	27	76
			R2	49	33	82
		1/10000	R1	25	13	38
			R2	21	9	30
		1/100000	R1	1	1	2
			R2	0	0	0

**Tabla A3. Continuación...**

MB4	Winogradsky	1/1000	R1	38	23	61
			R2	45	27	72
		1/10000	R1	27	5	32
			R2	25	6	31
		1/100000	R1	18	2	20
			R2	16	2	18
	JMV	1/1000	R1	41	15	56
			R2	43	26	69
		1/10000	R1	28	3	31
			R2	32	6	38
1/100000		R1	16	1	17	
		R2	19	1	20	
MB5	Winogradsky	1/100	R1	221	47	268
			R2	243	54	297
		1/1000	R1	137	14	151
			R2	149	7	156
		1/10000	R1	55	5	60
			R2	39	3	42
	JMV	1/1000	R1	254	43	297
			R2	253	59	312
		1/10000	R1	165	14	179
			R2	119	13	132
		1/100000	R1	27	8	35
			R2	24	6	30

**Tabla A4. Número de ufc/gramo de suelo seco**

Muestra	Medio	Dilución	Repetición	UFC/g suelo seco
MB1	Winogradsky	1/10000	R1	5,16E+07
			R2	5,66E+07
	JMV	1/10000	R1	4,99E+07
			R2	5,16E+07

**TABLA A4 Continuación...**

MB2	Winogradsky	1/10000	R1	9,84E+07
			R2	1,01E+08
	JMV	1/10000	R1	1,17E+08
			R2	1,04E+08
MB3	Winogradsky	1/10000	R1	6,43E+07
			R2	5,72E+07
	JMV	1/10000	R1	6,79E+07
			R2	5,36E+07
MB4	Winogradsky	1/10000	R1	3,55E+06
			R2	3,44E+06
	JMV	1/10000	R1	3,44E+06
			R2	4,22E+06
MB5	Winogradsky	1/10000	R1	1,23E+07
			R2	8,64E+06
	JMV	1/10000	R1	7,20E+06
			R2	6,17E+06

**Tabla A5. Codificación de cultivos bacterianos aislados de ecosistemas terrestres**

Código	Muestra	Medio	Dilución	Repetición
MB-001	pajonal del páramo	JMV	1/1000	R2
MB-002	pajonal del páramo	JMV	1/10000	R2
MB-003	pajonal del páramo	JMV	1/1000	R2
MB-004	pajonal del páramo	JMV	1/10000	R1
MB-005	pajonal del páramo	JMV	1/10000	R1
MB-006	pajonal del páramo	JMV	1/1000	R2
MB-007	pajonal del páramo	JMV	1/10000	R1
MB-008	pajonal del páramo	JMV	1/100000	R1
MB-009	pajonal del páramo	JMV	1/10000	R2
MB-010	pajonal del páramo	W	1/1000	R2
MB-011	pajonal del páramo	W	1/1000	R1

**Tabla A5. Continuación...**

MB-012	pajonal del páramo	W	1/1000	R1
MB-013	pajonal del páramo	W	1/1000	R1
MB-014	pajonal del páramo	W	1/1000	R1
MB-015	pajonal del páramo	W	1/10000	R2
MB-016	pajonal del páramo	W	1/10000	R1
MB-017	pajonal del páramo	W	1/1000	R2
MB-018	pajonal del páramo	W	1/10000	R2
MB-019	pajonal del páramo	W	1/10000	R2
MB-020	pajonal del páramo	W	1/10000	R1
MB-021	pajonal del páramo	W	1/100000	R2
MB-022	pajonal del páramo	W	1/10000	R1
MB-023	bosquete de pino	JMV	1/10000	R2
MB-024	bosquete de pino	JMV	1/10000	R1
MB-025	bosquete de pino	JMV	1/100000	R1
MB-026	bosquete de pino	JMV	1/100000	R1
MB-027	bosquete de pino	JMV	1/10000	R1
MB-028	bosquete de pino	W	1/100000	R1
MB-029	bosquete de pino	W	1/10000	R1
MB-030	bosquete de pino	W	1/100000	R2
MB-031	ferroso de playa	JMV	1/10000	R1
MB-032	ferroso de playa	JMV	1/10000	R1
MB-033	ferroso de playa	W	1/1000	R2
MB-034	ferroso de playa	W	1/1000	R2
MB-035	ferroso de playa	W	1/10000	R1
MB-036	ferroso de playa	W	1/10000	R2
MB-037	monocultivo orgánico	JMV	1/100000	R1
MB-038	monocultivo orgánico	JMV	1/1000	R1
MB-039	monocultivo orgánico	JMV	1/1000	R1
MB-040	monocultivo orgánico	JMV	1/10000	R2

**Tabla A5. Continuación...**

MB-041	monocultivo orgánico	W	1/10000	R2
MB-042	monocultivo orgánico	W	1/1000	R1
MB-043	monocultivo orgánico	W	1/100000	R1
MB-044	monocultivo orgánico	W	1/1000	R2
MB-045	arrozal	JMV	1/10000	R2
MB-046	arrozal	JMV	1/10000	R2
MB-047	arrozal	JMV	1/10000	R1
MB-048	arrozal	JMV	1/100	R1
MB-049	arrozal	JMV	1/1000	R1
MB-050	arrozal	JMV	1/1000	R2
MB-051	arrozal	JMV	1/10000	R2
MB-052	arrozal	JMV	1/10000	R2
MB-053	arrozal	JMV	1/10000	R2
MB-054	arrozal	W	1/10000	R1
MB-055	arrozal	W	1/10000	R1
MB-056	arrozal	W	1/1000	R2
MB-057	arrozal	W	1/100	R2
MB-058	arrozal	W	1/10000	R2
MB-059	arrozal	W	1/10000	R1

**Tabla A6. Codificación de cultivos de actinomicetes aislados de ecosistemas terrestres.**

Código	Muestra	Medio	Dilución	Repetición
MB-061	pajonal del páramo	JMV	1/10000	R2
MB-062	pajonal del páramo	W	1/1000	R1
MB-064	pajonal del páramo	W	1/1000	R2
MB-065	pajonal del páramo	W	1/1000	R2
MB-066	pajonal del páramo	W	1/10000	R1
MB-067	pajonal del páramo	W	1/10000	R1

**Tabla A6. Continuación...**

MB-069	pajonal del páramo	W	1/10000	R1
MB-070	bosquete de pino	JMV	1/10000	R1
MB-071	bosquete de pino	JMV	1/10000	R1
MB-072	bosquete de pino	W	1/10000	R2
MB-073	bosquete de pino	W	1/10000	R2
MB-074	bosquete de pino	W	1/10000	R2
MB-075	bosquete de pino	W	1/10000	R1
MB-076	bosquete de pino	W	1/100000	R1
MB-077	bosquete de pino	W	1/10000	R2
MB-078	bosquete de pino	W	1/10000	R2
MB-079	bosquete de pino	W	1/100000	R1
MB-080	bosquete de pino	W	1/100000	R1
MB-081	ferroso de playa	JMV	1/1000	R1
MB-082	ferroso de playa	JMV	1/10000	R1
MB-083	ferroso de playa	JMV	1/10000	R1
MB-084	ferroso de playa	JMV	1/10000	R2
MB-085	ferroso de playa	JMV	1/1000	R1
MB-086	ferroso de playa	JMV	1/10000	R2
MB-087	ferroso de playa	JMV	1/10000	R2
MB-088	ferroso de playa	JMV	1/1000	R2
MB-089	ferroso de playa	W	1/10000	R1
MB-090	ferroso de playa	W	1/10000	R1
MB-091	ferroso de playa	W	1/10000	R1
MB-092	ferroso de playa	W	1/10000	R1
MB-093	ferroso de playa	W	1/10000	R1
MB-094	ferroso de playa	W	1/10000	R1
MB-095	ferroso de playa	W	1/1000	R2
MB-096	monocultivo orgánico	JMV	1/10000	R1
MB-097	monocultivo orgánico	JMV	1/10000	R2
MB-098	monocultivo orgánico	JMV	1/10000	R2

**Tabla A6. Continuación...**

MB-099	monocultivo orgánico	JMV	1/10000	R2
MB-100	monocultivo orgánico	JMV	1/10000	R2
MB-101	monocultivo orgánico	W	1/10000	R2
MB-102	monocultivo orgánico	W	1/1000	R1
MB-103	monocultivo orgánico	W	1/1000	R1
MB-105	arrozal	JMV	1/10000	R2
MB-106	arrozal	JMV	1/10000	R2
MB-109	arrozal	JMV	1/1000	R1
MB-110	arrozal	JMV	1/1000	R1
MB-111	arrozal	JMV	1/1000	R1
MB-112	arrozal	JMV	1/10000	R2
MB-113	arrozal	JMV	1/10000	R2
MB-114	arrozal	JMV	1/10000	R1
MB-115	arrozal	W	1/10000	R1
MB-116	arrozal	W	1/10000	R1
MB-117	arrozal	W	1/10000	R1
MB-118	arrozal	W	1/10000	R1
MB-119	arrozal	W	1/1000	R2

**Tabla A7. Grupos de color formado por los cultivos bacterianos aislados.**

Grupo	Color	Códigos
1	Cristal	MB-038
2	Amarillo oro	MB-006; MB-041
3	Amarillo Limón	MB-042; MB-039; MB-037
4	Naranja	MB-023
5	Salmon	MB-058; MB-057; MB-052; MB-048; MB-028; MB-021; MB-017
6	Blanco	MB-055

**Tabla A7. Continuación...**

7	Marfil	MB-056; MB-054; MB-047; MB-045; MB-044; MB-040; MB-036; MB-035; MB-034; MB-033; MB-032; MB-029; MB-025; MB-024; MB-022; MB-020; MB-018; MB-014; MB-013; MB-012; MB-008; MB-007; MB-005; MB-004; MB-002
8	Amarillo cadmio	MB-049; MB-019; MB-003
9	Amarillo Real	MB-026
10	Amarillo piel	MB-059; MB-053; MB-051; MB-050; MB-046; MB-043; MB-030; MB-011; MB-010; MB-009
11	Melocotón	MB-031; MB-027; MB-015; MB-001
12	Amarillo Canario	MB-016

**Tabla A8.** Grupos de color formado por los cultivos de actinomicetes aislados de las muestras.

<b>Grupo</b>	<b>Color Micelio de Sustrato</b>	<b>Códigos</b>
1	Marfil	MB-062, MB-066, MB-069, MB-070, MB-082, MB-096, MB-099, MB-100, MB-102, MB-103, MB-105, MB-114, MB-115, MB-117, MB-119
2	Rosa	MB-098
3	Amarillo piel	MB-061, MB-064, MB-065, MB-067, MB-071, MB-073, MB-074, MB-075, MB-077, MB-078, MB-079, MB-080, MB-084, MB-085, MB-086, MB-088, MB-091, MB-092, MB-093, MB-095, MB-097, MB-106, MB-109, MB-110, MB-112, MB-113, MB-118
4	Siena natural	MB-094
5	Sepia	MB-072
6	Melocotón	MB-101, MB-090, MB-083, MB-081
7	Cappuccino	MB-089

**Tabla A8. Continuación...**

8	Coral	MB-087
9	Lavanda	MB-076
10	Verde manzana	MB-116
11	Guayaba quemada	MB-111
<b>Grupo</b>	<b>Color Micelio Aéreo</b>	<b>Códigos</b>
1	Rojo escarlata	MB-087
2	Tierra tostada	MB-067
3	Blanco	MB-062, MB-064, MB-065, MB-069, MB-070, MB-071, MB-072, MB-073, MB-074, MB-075, MB-076, MB-077, MB-078, MB-080, MB-082, MB-083, MB-084, MB-085, MB-086, MB-088, MB-090, MB-091, MB-094, MB-096, MB-097, MB-101, MB-102, MB-103, MB-109, MB-110, MB-112, MB-114, MB-115, MB-116, MB-117, MB-118, MB-119
4	Amarillo piel	MB-066
5	Violeta cobalto	MB-093, MB-099, MB-105, MB-106
6	Verde oliva	MB-081
7	Verde pino	MB-061
8	Vino	MB-089, MB-095, MB-111
9	Rosa te	MB-092, MB-113
10	Verde pistache	MB-079
11	Cappuccino	MB-098
12	Rojo quemado	MB-100
<b>Grupo</b>	<b>Color de las esporas</b>	<b>Códigos</b>
1	Rojo escarlata	MB-087
2	Verde musgo	MB-118
3	Tierra tostada	MB-067

**Tabla A8. Continuación...**

4	Blanco	MB-061, MB-062, MB-064, MB-069, MB-070, MB-073, MB-078, MB-080, MB-081, MB-082, MB-089, MB-092, MB-093, MB-095, MB-096, MB-109, MB-110, MB-111, MB-112, MB-113, MB-114, MB-116
5	Plata	MB-071, MB-090, MB-094, MB-097, MB-103, MB-115, MB-117
6	Violeta cobalto	MB-099, MB-105, MB-106
7	Rosa te	MB-065, MB-076
8	Verde pistache	MB-079
9	Ocre oro	MB-077, MB-119, MB-091
10	Gris lunar	MB-074, MB-083, MB-084, MB-086, MB-088, MB-102
11	Cappuccino	MB-085, MB-098
12	Lavanda	MB-066, MB-072, MB-075, MB-101
13	Rojo quemado	MB-100
<b>Grupo</b>	<b>Color del pigmento difusible</b>	<b>Códigos</b>
1	Tierra tostada	MB-067
2	Marrón	MB-081
3	Violeta cobalto	MB-093, MB-095
4	Vino	MB-089
5	Cappuccino	MB-079
6	Rojo quemado	MB-092
7	Jacarandá	MB-072

**Tabla A9.** Caracterización microscópica de los cultivos bacterianos aislados.

Código	FORMA				TINCIÓN			
	Bacilos	Cocos	Diplococos	Estreptobacilos	Gram		Cápsulas	Endosporas
					G+	G-		
MB-001	+	-	-	-	+	-	-	-
MB-002	+	-	-	-	-	+	-	-
MB-003	-	+	-	-	+	-	-	-
MB-004	-	+	-	-	+	-	-	-
MB-005	-	+	-	-	-	+	-	-
MB-006	-	+	-	-	-	+	-	-
MB-007	+	-	-	-	+	-	-	-
MB-008	-	+	-	-	+	-	-	-
MB-009	-	+	-	-	-	+	-	-
MB-010	-	+	-	-	+	-	-	-
MB-011	+	-	-	-	-	+	-	-
MB-012	+	-	-	-	+	-	+	+
MB-013	-	+	-	-	-	+	-	-
MB-014	+	-	-	-	-	+	-	-
MB-015	-	+	-	-	+	-	-	-
MB-016	-	+	-	-	+	-	-	-
MB-017	-	+	-	-	+	-	-	-
MB-018	-	+	-	-	+	-	-	-
MB-019	+	-	-	-	-	+	-	-
MB-020	-	+	-	-	+	-	-	-
MB-021	-	+	-	-	+	-	-	-
MB-022	+	-	-	-	-	+	-	-
MB-023	-	+	-	-	+	-	-	-
MB-024	+	-	-	-	-	+	-	-
MB-025	+	-	-	-	+	-	-	-

**Tabla A9. Continuación...**

MB-026	-	+	-	-	+	-	+	-
MB-027	-	+	-	-	+	-	+	-
MB-028	-	+	-	-	+	-	-	-
MB-029	-	+	-	-	-	+	-	-
MB-030	-	+	-	-	+	-	-	-
MB-031	-	+	-	-	-	+	-	-
MB-032	-	-	+	-	+	-	-	-
MB-033	+	-	-	-	+	-	-	-
MB-034	+	-	-	-	+	-	-	+
MB-035	-	+	-	-	-	+	-	-
MB-036	-	+	-	-	+	-	-	-
MB-037	-	+	-	-	+	-	-	-
MB-038	-	+	-	-	+	-	-	-
MB-039	-	+	-	-	+	-	-	-
MB-040	+	-	-	-	+	-	+	+
MB-041	-	+	-	-	+	-	-	-
MB-042	-	+	-	-	+	-	-	-
MB-043	+	-	-	-	+	-	-	-
MB-044	-	+	-	-	+	-	-	-
MB-045	+	-	-	-	+	-	-	-
MB-046	+	-	-	-	-	+	-	-
MB-047	-	+	-	-	-	+	-	-
MB-048	-	+	-	-	-	+	+	-
MB-049	+	-	-	-	-	+	-	-
MB-050	-	+	-	-	+	-	-	-
MB-051	-	+	-	-	+	+	-	-
MB-052	+	-	-	-	+	-	-	-
MB-053	+	-	-	-	+	-	-	-
MB-054	-	+	-	-	+	-	-	-
MB-055	-	-	-	+	+	-	-	-

**Tabla A9. Continuación...**

MB-056	-	+	-	-	+	-	-	-
MB-057	+	-	-	-	+	-	-	-
MB-058	+	-	-	-	+	-	-	-
MB-059	+	-	-	-	+	-	-	-

**Tabla A10. Caracterización microscópica de los cultivos de actinomicetes aislados.**

Código	Forma de la cadena de esporas
	Recta
MB-061	Recta
MB-062	Espiral
MB-064	Recta
MB-065	Recta
MB-066	Incompleta
MB-067	Recta
MB-069	Incompleta
MB-070	Recta
MB-071	Incompleta
MB-072	Incompleta
MB-073	Recta
MB-074	Espora simple
MB-075	Incompleta
MB-076	Recta
MB-077	Recta
MB-078	Recta
MB-079	Recta
MB-080	Recta
MB-081	Espiral
MB-082	Espora simple
MB-083	Recta

**Tabla A10. Continuación...**

MB-084	Recta
MB-085	Incompleta
MB-086	Incompleta
MB-087	Espiral
MB-088	Recta
MB-089	Incompleta
MB-090	Incompleta
MB-091	Incompleta
MB-092	Incompleta
MB-093	Espiral
MB-094	Recta
MB-095	Recta
MB-096	Recta
MB-097	Espiral
MB-098	Espiral
MB-099	Espiral
MB-100	Espora simple
MB-101	Recta
MB-102	Recta
MB-103	Recta
MB-105	Espiral
MB-106	Recta
MB-109	Espora simple
MB-110	Espora simple
MB-111	Espiral
MB-112	Incompleta
MB-113	Recta
MB-114	Incompleta
MB-115	Recta
MB-116	Incompleta

**Tabla A10. Continuación...**

MB-117	Espiral
MB-118	Espiral
MB-119	Espiral

**Tabla A11. Clasificación bacteriana de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura.**

Código	Temperatura (°C)					Clasificación
	4°C	20°C	28°C	37°C	50°C	
MB-001	+	+	+	+	-	Mesófilo
MB-002	+	+	+	+	-	Mesófilo
MB-003	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-004	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-005	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-006	+	+	+	+	-	Mesófilo
MB-007	+	+	+	+	-	Mesófilo
MB-008	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-009	-	+	+	+	+	Mesófilo Extremo
MB-010	+	+	+	+	+	Mesófilo Extremo
MB-011	+	+	+	+	-	Mesófilo
MB-012	+	+	+	+	+	Mesófilo Extremo
MB-013	+	+	+	+	-	Mesófilo
MB-014	+	+	+	+	-	Mesófilo
MB-015	+	+	+	+	-	Mesófilo
MB-016	+	+	+	+	-	Mesófilo
MB-017	+	+	+	+	-	Mesófilo
MB-018	+	+	+	+	-	Mesófilo
MB-019	+	+	+	+	-	Mesófilo
MB-020	+	+	+	+	-	Mesófilo
MB-021	+	+	+	+	-	Mesófilo

Tabla A11. Continuación...

MB-022	+	+	+	+	+	Mesófilo Extremo
MB-023	+	+	+	+	-	Mesófilo
MB-024	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-025	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-026	+	+	+	+	-	Mesófilo
MB-027	+	+	+	+	-	Mesófilo
MB-028	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-029	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-030	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-031	+	+	+	+	+	Mesófilo Extremo
MB-032	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-033	-	+	+	+	+	Mesófilo Extremo
MB-034	-	+	+	+	+	Mesófilo Extremo
MB-035	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-036	-	+	+	+	+	Mesófilo Extremo
MB-037	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-038	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-039	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-040	+	+	+	+	+	Mesófilo Extremo
MB-041	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-042	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-043	+	+	+	+	+	Mesófilo Extremo
MB-044	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-045	-	+	+	+	+	Mesófilo Extremo
MB-046	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-047	-	+	+	+	+	Mesófilo Extremo
MB-048	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-049	+	+	+	+	-	Mesófilo
MB-050	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-051	-	+	+	+	+	Mesófilo Extremo

**Tabla A11. Continuación...**

MB-052	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-053	-	+	+	+	+	Mesófilo Extremo
MB-054	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-055	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-056	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-057	-	+	+	+	+	Mesófilo Extremo
MB-058	-	+	+	+	+	Mesófilo Extremo
MB-059	-	+	+	+	+	Mesófilo Extremo

**Tabla A12.** Clasificación bacteriana de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura de aislamiento.

Clasificación global		Mesófilo Extremo	Mesófilo
		17	42
En función del factor A (origen de la muestra)	MB1	4	18
	MB2	0	8
	MB3	4	2
	MB4	2	6
	MB5	7	8
En función del factor B (medio de cultivo)	W	10	20
	JMV	7	22
En función de las interacciones (origen de la muestra + medio de cultivo)	a1b1	3	10
	a1b2	1	8
	a2b1	0	3
	a2b2	0	5
	a3b1	3	1
	a3b2	1	1

**Tabla A12. Continuación...**

	a4b1	1	3
	a4b2	1	3
	a5b1	3	3
	a5b2	4	5

**Tabla A13. Clasificación de los cultivos de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura.**

Código	Temperatura (°C)					Clasificación
	4°C	20°C	28°C	37°C	50°C	
MB-061	+	+	+	+	-	Mesófilo
MB-062	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-064	+	+	+	+	+	Mesófilo Extremo
MB-065	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-066	+	+	+	-	-	Psicrótrofo
MB-067	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-069	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-070	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-071	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-072	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-073	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-074	+	+	+	+	-	Mesófilo
MB-075	-	+	+	+	+	Mesófilo Extremo
MB-076	+	+	+	+	+	Mesófilo Extremo
MB-077	+	+	+	+	+	Mesófilo Extremo
MB-078	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-079	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-080	-	+	+	+	+	Mesófilo Extremo
MB-081	+	+	+	+	-	Mesófilo
MB-082	-	-	+	+	+	Mesófilo Extremo

Tabla A13. Continuación...

MB-083	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-084	+	+	+	+	-	Mesófilo
MB-085	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-086	+	+	+	+	-	Mesófilo
MB-087	-	+	+	+	+	Mesófilo Extremo
MB-088	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-089	+	+	+	+	-	Mesófilo
MB-090	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-091	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-092	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-093	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-094	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-095	-	+	+	+	+	Mesófilo Extremo
MB-096	+	+	+	+	-	Mesófilo
MB-097	-	+	+	-	-	Psicrótrofo
MB-098	-	+	+	-	-	Psicrótrofo
MB-099	+	+	+	+	-	Mesófilo
MB-100	+	+	+	+	-	Mesófilo
MB-101	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-102	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-103	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-105	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-106	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-109	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-110	-	+	+	+	+	Mesófilo Extremo
MB-111	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-112	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-113	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-114	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-115	-	+	+	+	-	Mesófilo

**Tabla A13. Continuación...**

MB-116	+	+	+	+	-	Mesófilo
MB-117	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-118	-	+	+	+	-	Mesófilo
MB-119	+	+	+	+	-	Mesófilo

**Tabla A14.** Clasificación de los cultivos de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura de aislamiento.

Clasificación global		Mesófilo Extremo	Mesófilo	Psicrótrofo
		9	42	3
En función del factor A (origen de la muestra)	MB1	1	5	1
	MB2	4	7	0
	MB3	3	12	0
	MB4	0	6	2
	MB5	1	12	0
En función del factor B (medio de cultivo)	W	6	23	1
	JMV	3	19	2
En función de las interacciones (origen de la muestra + medio de cultivo)	a1b1	1	4	1
	a1b2	0	1	0
	a2b1	4	5	0
	a2b2	0	2	0
	a3b1	1	6	0
	a3b2	2	6	0
	a4b1	0	3	0
	a4b2	0	3	2
	a5b1	0	5	0
	a5b2	1	7	0

**Tabla A15.** Clasificación bacteriana de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo.

Código	pH							Clasificación
	3,5	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	9,5	
MB-001	+	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-002	-	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
MB-003	+	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-004	+	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-005	-	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-006	+	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
MB-007	-	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
MB-008	-	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
MB-009	-	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
MB-010	+	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-011	-	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
MB-012	+	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-013	-	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
MB-014	+	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
MB-015	+	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
MB-016	-	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-017	-	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
MB-018	+	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-019	-	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
MB-020	-	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
MB-021	+	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-022	-	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-023	-	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
MB-024	-	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
MB-025	+	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-026	-	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
MB-027	-	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante

**Tabla A15. Continuación...**

MB-028	-	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
MB-029	+	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-030	+	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
MB-031	-	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
MB-032	+	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
MB-033	-	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
MB-034	-	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
MB-035	-	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-036	+	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-037	-	-	-	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-038	-	-	-	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-039	-	-	-	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-040	-	-	-	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-050	-	-	+	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-051	-	-	-	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-052	-	-	+	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-053	-	-	+	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-054	-	-	-	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-055	-	-	+	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-056	-	-	-	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-057	-	-	+	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-058	-	-	+	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-059	-	-	-	+	+	+	+	Alcalitolerante

**Tabla A16.** Clasificación bacteriana de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo de acuerdo al origen de la muestra.

Clasificación global	Acidófilo	Neutrotolerante	Alcalitolerante
	14	23	22

**Tabla A16. Continuación...**

En función del factor A (origen de la muestra)	MB1	10	12	0
	MB2	2	7	0
	MB3	2	4	0
	MB4	0	0	7
	MB5	0	0	15
En función del factor B (medio de cultivo)	W	9	11	10
	JMV	5	12	12
En función de las interacciones (origen de la muestra + medio de cultivo)	a1b1	6	7	0
	a1b2	4	5	0
	a2b1	1	2	0
	a2b2	1	5	0
	a3b1	2	2	0
	a3b2	0	2	0
	a4b1	0	0	4
	a4b2	0	0	4
	a5b1	0	0	6
	a5b2	0	0	8

**Tabla A17. Clasificación de los cultivos de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo.**

Código	pH							Clasificación
	3,5	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	9,5	
MB-061	+	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-062	-	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-064	-	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
MB-065	+	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-066	-	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
MB-067	-	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-069	-	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante

**Tabla A17. Continuación...**

MB-070	+	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-071	-	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
MB-072	-	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-073	-	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-074	+	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-075	-	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-076	-	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-077	-	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
MB-078	-	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-079	-	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-080	+	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-081	-	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
MB-082	-	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-083	-	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-084	+	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-085	+	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
MB-086	-	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-087	+	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-088	+	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
MB-089	-	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-090	-	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-091	+	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-092	-	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
MB-093	-	+	+	+	+	-	-	Neutrotolerante
MB-094	-	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-095	-	+	+	+	-	-	-	Acidófilo
MB-096	-	-	-	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-097	-	-	-	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-098	-	-	+	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-099	-	-	-	+	+	+	+	Alcalitolerante

**Tabla A17. Continuación...**

MB-100	-	-	-	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-101	-	-	-	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-102	-	-	+	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-103	-	-	-	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-105	-	-	-	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-106	-	-	-	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-109	-	-	+	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-110	-	-	-	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-111	-	-	-	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-112	-	-	+	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-113	-	-	-	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-114	-	-	-	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-115	-	-	+	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-116	-	-	-	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-117	-	-	-	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-118	-	-	-	+	+	+	+	Alcalitolerante
MB-119	-	-	-	+	+	+	+	Alcalitolerante

**Tabla A18**

Clasificación de los cultivos de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo de acuerdo al origen de la muestra.

Clasificación global		Acidófilo	Neutrotolerante	Alcalitolerante
		23	10	21
En función del factor A (origen de la muestra)	MB1	4	3	0
	MB2	9	2	0
	MB3	10	5	0
	MB4	0	0	8
	MB5	0	0	13

**Tabla A18. Continuación...**

En función del factor B (medio de cultivo)	W	16	6	8
	JMV	7	4	13
En función de las interacciones (origen de la muestra + medio de cultivo)	a1b1	3	3	0
	a1b2	1	0	0
	a2b1	8	1	0
	a2b2	1	1	0
	a3b1	5	2	0
	a3b2	5	3	0
	a4b1	0	0	3
	a4b2	0	0	5
	a5b1	0	0	5
	a5b2	0	0	8

**Tabla A19.** Clasificación bacteriana de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo.

Código	NaCl %				Clasificación
	1%	5%	10%	15%	
MB-001	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-002	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-003	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-004	+	+	-	-	Halófilo
MB-005	+	+	-	-	Halófilo
MB-006	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-007	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-008	+	+	-	-	Halófilo
MB-009	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-010	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-011	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-012	+	+	+	+	Halófilo Extremo

Tabla A19. Continuación...

MB-013	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-014	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-015	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-016	+	+	-	-	Halófilo
MB-017	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-018	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-019	+	+	-	-	Halófilo
MB-020	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-021	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-022	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-023	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-024	+	+	-	-	Halófilo
MB-025	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-026	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-027	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-028	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-029	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-030	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-031	+	+	-	-	Halófilo
MB-032	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-033	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-034	+	+	-	-	Halófilo
MB-035	+	+	-	-	Halófilo
MB-036	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-037	+	+	-	-	Halófilo
MB-038	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-039	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-040	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-041	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-042	+	+	+	+	Halófilo Extremo

**Tabla A19. Continuación...**

MB-043	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-044	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-045	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-046	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-047	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-048	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-049	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-050	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-051	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-052	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-053	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-054	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-055	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-056	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-057	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-058	+	+	-	-	Halófilo
MB-059	+	+	+	-	Halófilo Extremo

**Tabla A20.** Clasificación bacteriana de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo de acuerdo al origen de la muestra.

Clasificación global		Halófilo	Halófilo Extremo
		11	48
En función del factor A (origen de la muestra)	MB1	5	17
	MB2	1	7
	MB3	3	3
	MB4	1	7
	MB5	1	14

**Tabla A20. Continuación...**

En función del factor B (medio de cultivo)	W	5	25
	JMV	6	23
En función de las interacciones (origen de la muestra + medio de cultivo)	a1b1	2	11
	a1b2	3	6
	a2b1	0	3
	a2b2	1	4
	a3b1	2	2
	a3b2	1	1
	a4b1	0	4
	a4b2	1	3
	a5b1	1	5
	a5b2	0	9

**Tabla A21.** Clasificación de los cultivos de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo.

Código	NaCl %				Clasificación
	1%	5%	10%	15%	
MB-061	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-062	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-064	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-065	+	+	-	-	Halófilo
MB-066	+	+	-	-	Halófilo
MB-067	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-069	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-070	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-071	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-072	+	+	-	-	Halófilo
MB-073	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-074	+	+	-	-	Halófilo

Tabla A21. Continuación...

MB-075	+	+	-	-	Halófilo
MB-076	+	+	-	-	Halófilo
MB-077	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-078	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-079	+	+	-	-	Halófilo
MB-080	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-081	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-082	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-083	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-084	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-085	+	+	-	-	Halófilo
MB-086	+	+	-	-	Halófilo
MB-087	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-088	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-089	+	+	-	-	Halófilo
MB-090	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-091	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-092	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-093	+	+	-	-	Halófilo
MB-094	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-095	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-096	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-097	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-098	+	+	-	-	Halófilo
MB-099	+	+	-	-	Halófilo
MB-100	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-101	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-102	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-103	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-105	+	+	+	-	Halófilo Extremo

**Tabla A21. Continuación...**

MB-106	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-109	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-110	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-111	+	+	-	-	Halófilo
MB-112	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-113	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-114	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-115	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-116	+	+	+	-	Halófilo Extremo
MB-117	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-118	+	+	+	+	Halófilo Extremo
MB-119	+	+	-	-	Halófilo

**Tabla A22.** Clasificación de los cultivos de actinomicetes de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo de acuerdo al origen de la muestra.

Clasificación global		Halófilo	Halófilo Extremo
		15	38
En función del factor A (origen de la muestra)	MB1	2	5
	MB2	5	6
	MB3	4	11
	MB4	2	5
	MB5	2	11
En función del factor B (medio de cultivo)	W	10	20
	JMV	5	18
En función de las interacciones (origen de la muestra + medio de cultivo)	a1b1	2	4
	a1b2	0	1
	a2b1	5	4

**Tabla A22. Continuación...**

	a2b2	0	2
	a3b1	2	5
	a3b2	2	6
	a4b1	0	3
	a4b2	2	2
	a5b1	1	4
	a5b2	1	7

**Tabla A23. Grupos - especies basados en el 90% de similitud a partir de taxonomía numérica de datos fenotípicos de bacterias.**

Grupo -especie	Miembros del grupo
1	MB-001, MB-007
2	MB-002, MB-014, MB-011, MB-022
3	MB-006, MB-013
4	MB-009
5	MB-019, MB-024
6	MB-003, MB-030, MB-029, MB-036
7	MB-015, MB-021, MB-023
8	MB-018
9	MB-004, MB-008, MB-005, MB-035
10	MB-017, MB-028
11	MB-010
12	MB-016
13	MB-020, MB-026
14	MB-027
15	MB-031
16	MB-033, MB-034
17	MB-012

**Tabla A23. Continuación...**

18	MB-025, MB-032
19	MB-037, MB-041, MB-044, MB-054, MB-056, MB-047
20	MB-038, MB-039
21	MB-042
22	MB-048
23	MB-055
24	MB-040
25	MB-043, MB-045
26	MB-050, MB-051
27	MB-052, MB-058
28	MB-053, MB-059, MB-057
29	MB-046, MB-049

**Tabla A24. Grupos - especies basados en el 90% de similitud a partir de taxonomía numérica de datos fenotípicos de actinomicetes.**

Grupo -especie	Miembros del grupo
1	MB-061
2	MB-067, MB-095
3	MB-062, MB-082
4	MB-069, MB-070
5	MB-064, MB-077
6	MB-065, MB-091
7	MB-080
8	MB-094
9	MB-086
10	MB-071, MB-090, MB-072, MB-075
11	MB-073, MB-078, MB-074, MB-084, MB-088, MB-083
12	MB-085
13	MB-079
14	MB-089
15	MB-092

**Tabla A24. Continuación...**

16	MB-076
17	MB-066
18	MB-081
19	MB-093
20	MB-096, MB-114
21	MB-100
22	MB-101, MB-102, MB-115, MB-103, MB-117, MB-118, MB-119
23	MB-109, MB-112, MB-113, MB-116
24	MB-099, MB-105, MB-106
25	MB-111
26	MB-097, MB-110
27	MB-098
28	MB-087

**Tabla A25. Evaluación de los microorganismos representantes de cada grupo especie de bacterias sometidos a la prueba de Nessler**

Representante evaluado		Prueba de Nessler
Grupo especie	Microorganismo	
1	MB-007	-
2	MB-002	+
	MB-022	
3	MB-006	+
4	MB-009	+
5	MB-024	+
6	MB-003	-
	MB-036	
7	MB-021	+
8	MB-018	+
9	MB-004	+
	MB-035	

**Tabla A25 Continuación...**

10	MB-017	-
11	MB-010	+
12	MB-016	+
13	MB-026	+
14	MB-027	-
15	MB-031	+
16	MB-033	+
17	MB-012	+
18	MB-032	+
19	MB-037	+
	MB-044	
	MB-047	
20	MB-038	+
21	MB-042	+
22	MB-048	-
23	MB-055	+
24	MB-040	-
25	MB-045	+
26	MB-050	+
27	MB-058	+
28	MB-059	-
29	MB-046	+

**Tabla A26.** Evaluación de los microorganismos representantes de cada grupo especie de actinomicetes sometidos a la prueba de Nessler

Representante evaluado		Prueba de Nessler
Grupo especie	Microorganismo	
1	MB-061	+
2	MB-067	+
3	MB-082	+
4	MB-069	+
5	MB-077	+
6	MB-065	+
7	MB-080	+
8	MB-094	+

Tabla A26 Continuación...

9	MB-086	-
10	MB-071	+
	MB-075	
11	MB-073	+
	MB-074	
	MB-083	
12	MB-085	+
13	MB-079	+
14	MB-089	+
15	MB-092	-
16	MB-076	+
17	MB-066	+
18	MB-081	+
19	MB-093	+
20	MB-114	-
21	MB-100	+
22	MB-101	+
	MB-115	+
	MB-117	+
	MB-119	+
23	MB-109	+
	MB-116	
24	MB-105	+
25	MB-111	+
26	MB-110	+
27	MB-098	+
28	MB-087	+

**Tabla A27.** Respuestas a la evaluación cualitativa de Nessler en función del origen de la muestra

Origen de la muestra	Positivos a Nessler	%
MB1	15	26
MB2	10	17
MB3	12	21
MB4	7	12
MB5	14	24
Total de positivos	58	84
Total individuos testeados	69	100

# **ANEXO B**

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

**Tabla B1.** Análisis de varianza para la diversidad bacteriana.

Fuente de variación	g.l	SC	CM	Fc	Probabilidad	
A	4	5,04E+03	1,26E+03	48,1	<0,0001	**
B	1	2,00E+01	2,00E+01	0,76	0,405	-
AxB	4	3,92E+02	9,79E+01	3,74	0,0466	*
Error	9	2,36E+02	2,62E+01			
Total	19	5,74E+03				

\*\* Altamente significativa

\* Significante

-No significativa

**Tabla B2.** Separación de medias para la diversidad bacteriana del factor A.

MUESTRAS	Diversidad	Rango	
MB1	32	A	
MB4	33	A	
MB3	34	A	
MB5	42	A	
MB2	74		B

**Tabla B3.** Separación de medias para la diversidad bacteriana de la interacción AxB.

AxB	Descripción	Diversidad	Rango		
a1b2	Suelo de páramo + JMV	31	A		
a4b1	Suelo de cultivos orgánicos + Winogradsky	32	A		
a5b2	Suelo de arrozal + JMV	33	A		
a1b1	Suelo de páramo + Winogradsky	33	A		
a3b2	Suelo férrico amazónico + JMV	34	A		
a3b1	Suelo férrico amazónico + Winogradsky	34	A		
a4b2	Suelo de cultivos orgánicos + JMV	35	A		
a5b1	Suelo de arrozal + Winogradsky	51	A	B	
a2b1	Suelo de bosque de pinos + Winogradsky	70		B	C
a2b2	Suelo de bosque de pinos + JMV	78			C

**Tabla B4.** Análisis de varianza para el número de ufc por gramo de suelo seco (ufc/g).

Fuente de variación	g.l	SC	CM	Fc	Probabilidad	
A	4	2,7778E+16	6,94451E+15	321,48	<0,0001	**
B	1	3,2E+12	3,2E+12	0,15	0,7093	-
AxB	4	1,39101E+14	3,47752E+13	1,61	0,2536	*
Error	9	1,94415E+14	2,16016E+13			
Total	19	2,81571E+16				

\*\* Altamente significativa

\* Significante

-No significativa

**Tabla B5.** Separación de medias para el número de ufc/gramo de suelo seco del factor A.

MUESTRAS	Ufc/g suelo seco	Rango		
MB4	3,66E+06	A		
MB5	8,58E+06	A		
MB1	5,24E+07		B	
MB3	6,08E+07		B	
MB2	1,05E+08			C

**Tabla B6.** Separación de medias para el número de ufc de la interacción AxB.

AxB	Descripción	Ufc/g suelo seco	Rango		
a4b1	Suelo de cultivos orgánicos + Winogradsky	3,50E+06	A		
a4b2	Suelo de cultivos orgánicos + JMV	3,83E+06	A		
a5b2	Suelo de arrozal + JMV	6,69E+06	A		
a5b1	Suelo de arrozal + Winogradsky	1,05E+07	A		
a1b2	Suelo de páramo + JMV	5,08E+07		B	
a1b1	Suelo de páramo + Winogradsky	5,41E+07		B	
a3b1	Suelo férrico amazónico + Winogradsky	6,08E+07		B	
a3b2	Suelo férrico amazónico + JMV	6,08E+07		B	
a2b1	Suelo de bosque de pinos + Winogradsky	9,97E+07			C
a2b2	Suelo de bosque de pinos + JMV	1,11E+08			C

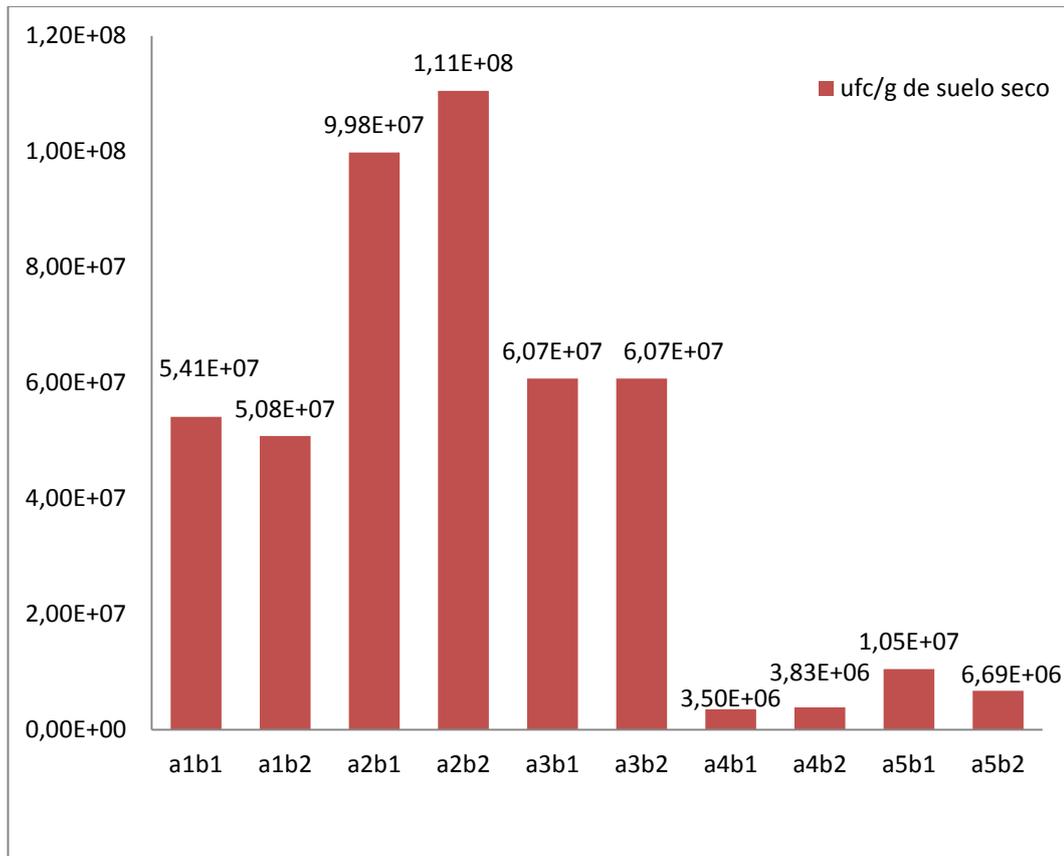




# **ANEXO C**

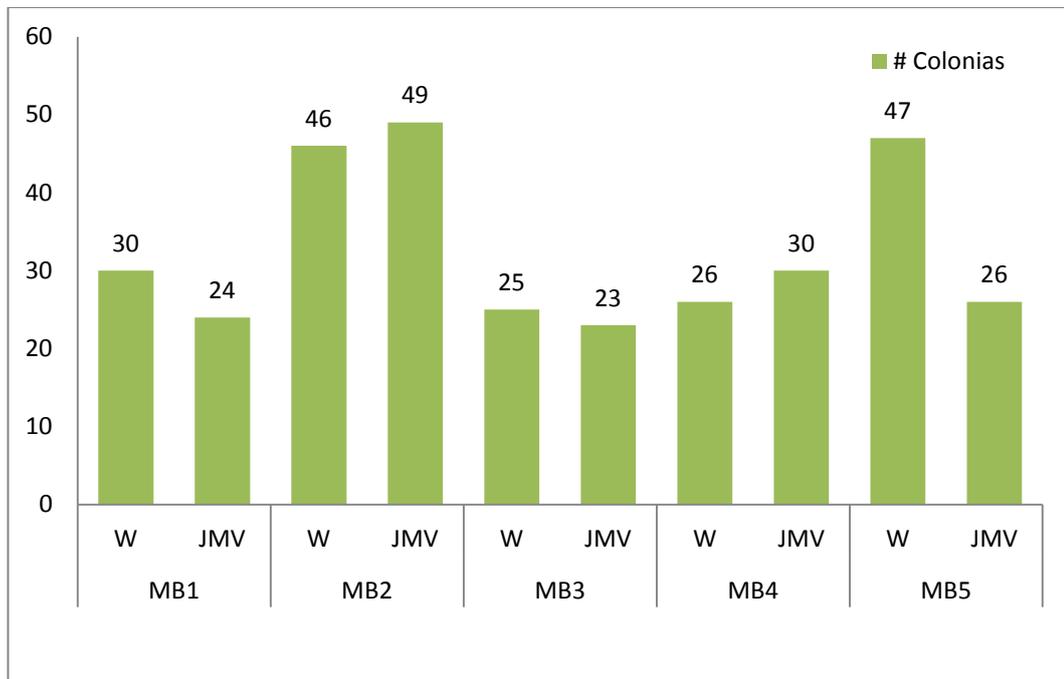
## **GRÁFICOS**

**Figura C1.** Número de ufc/g de suelo seco para los tratamientos en estudio.

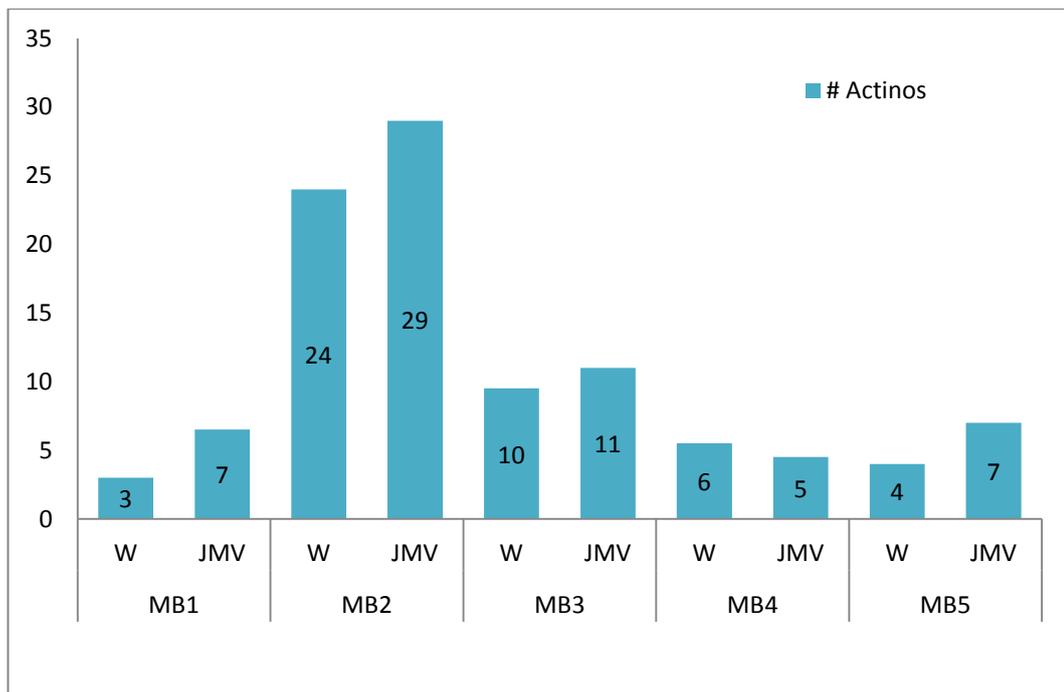


Tratamiento	Descripción
a1b1	Suelo de páramo + Winogradsky
a1b2	Suelo de páramo + JMV
a2b1	Suelo de bosque de pinos + Winogradsky
a2b2	Suelo de bosque de pinos + JMV
a3b1	Suelo férrico amazónico + Winogradsky
a3b2	Suelo férrico amazónico + JMV
a4b1	Suelo de cultivos orgánicos + Winogradsky
a4b2	Suelo de cultivos orgánicos + JMV
a5b1	Suelo de arrozal + Winogradsky
a5b2	Suelo de arrozal + JMV

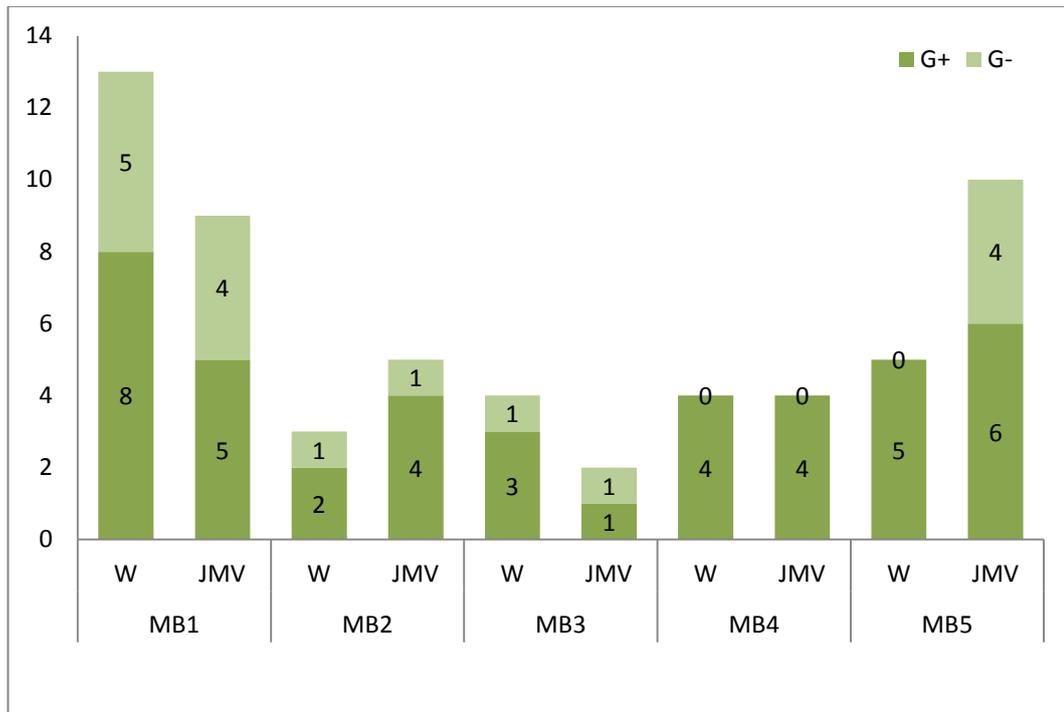
**Figura C2.** Diversidad bacteriana en cada medio de cultivo, según el origen de la muestra.



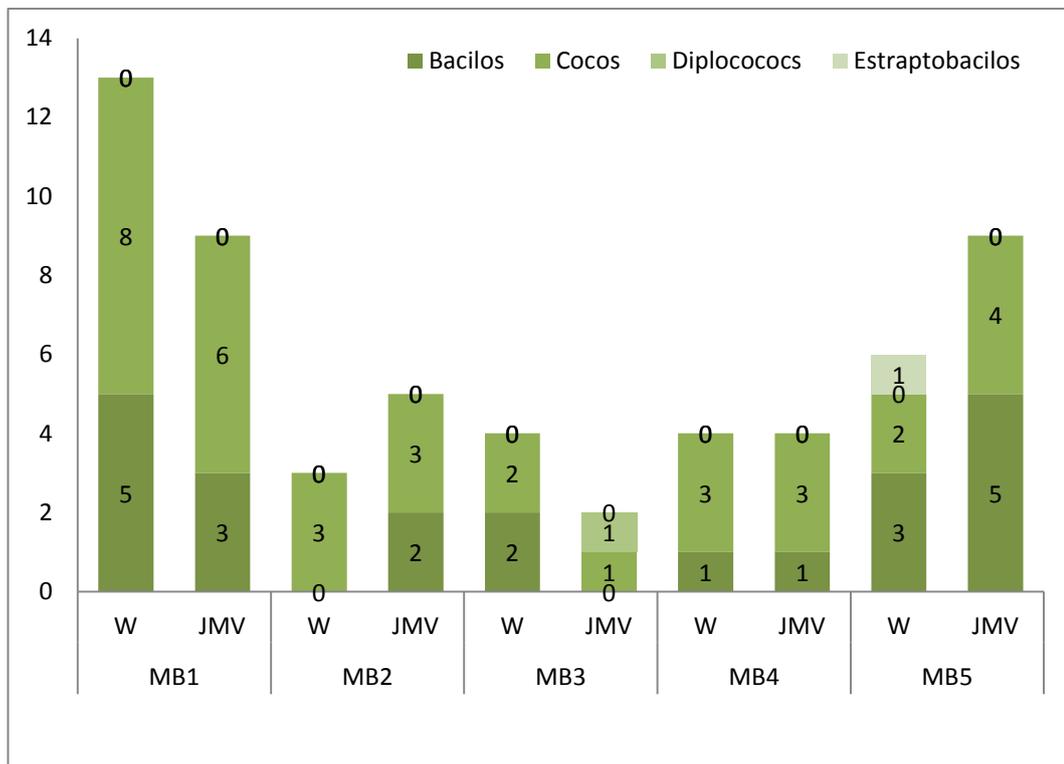
**Figura C3.** Diversidad de actinomicetes aislados en cada medio de cultivo, según el origen de la muestra.



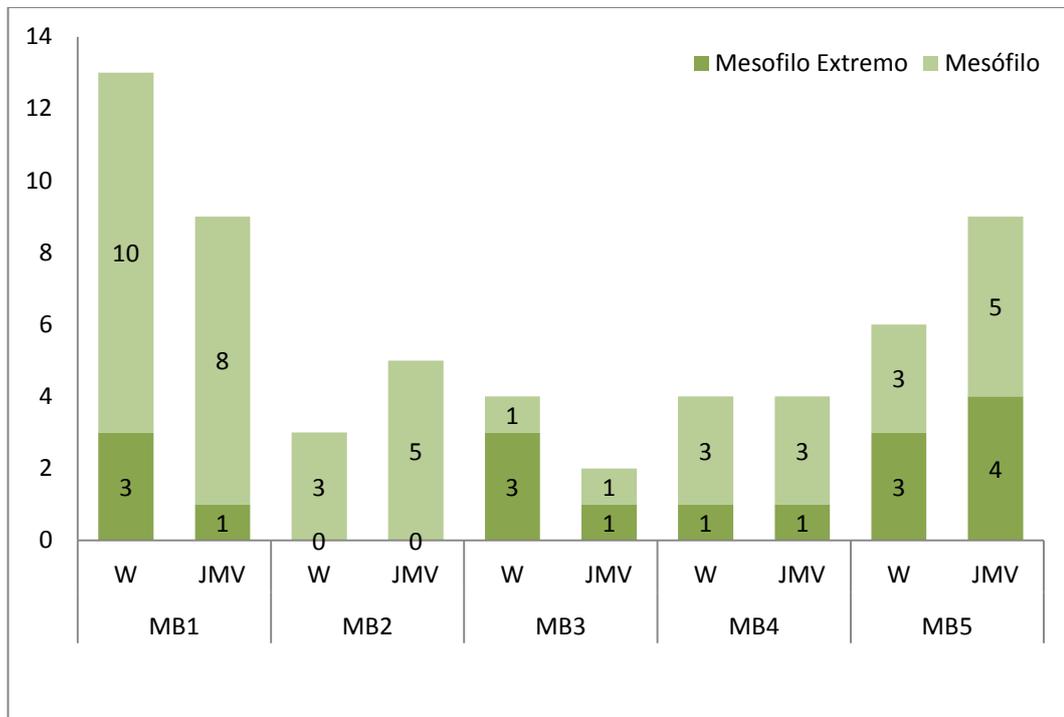
**Figura C4.** Distribución de las bacterias en función de la tinción de Gram.



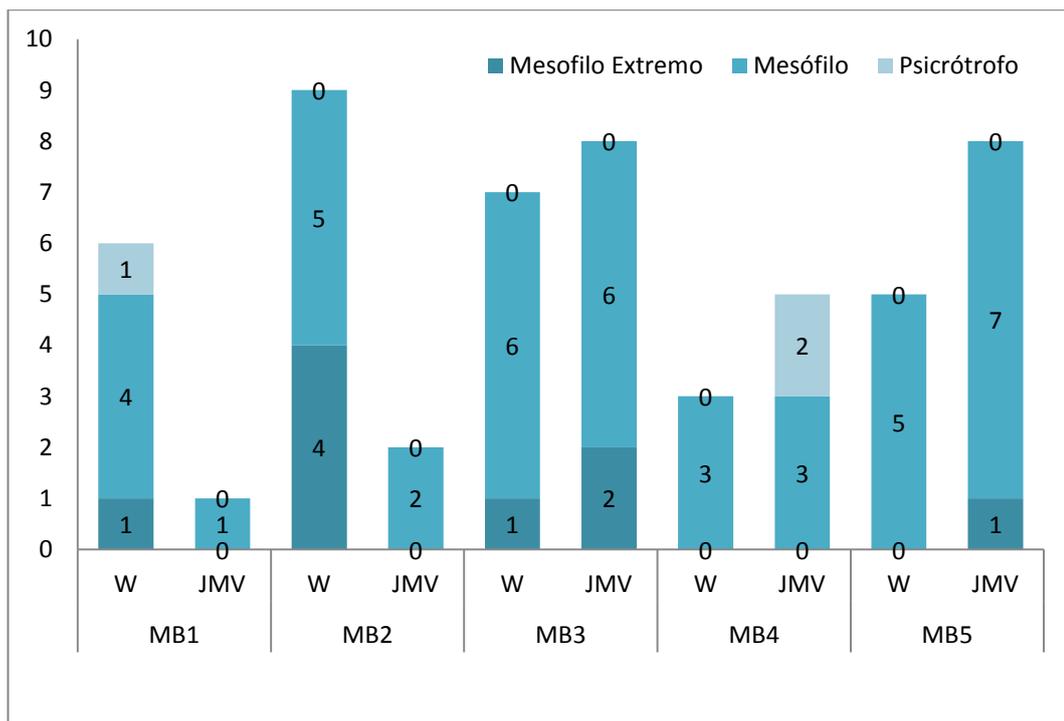
**Figura C5.** Distribución de las bacterias según su forma celular.



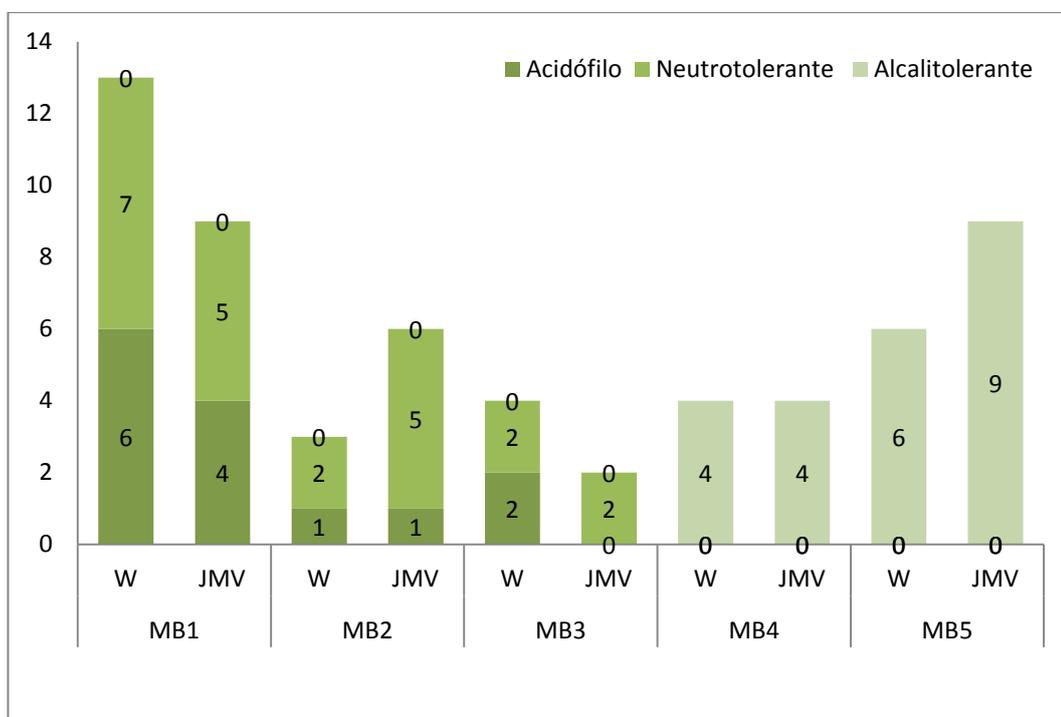
**Figura C6.** Clasificación de las bacterias aisladas de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura de incubación.



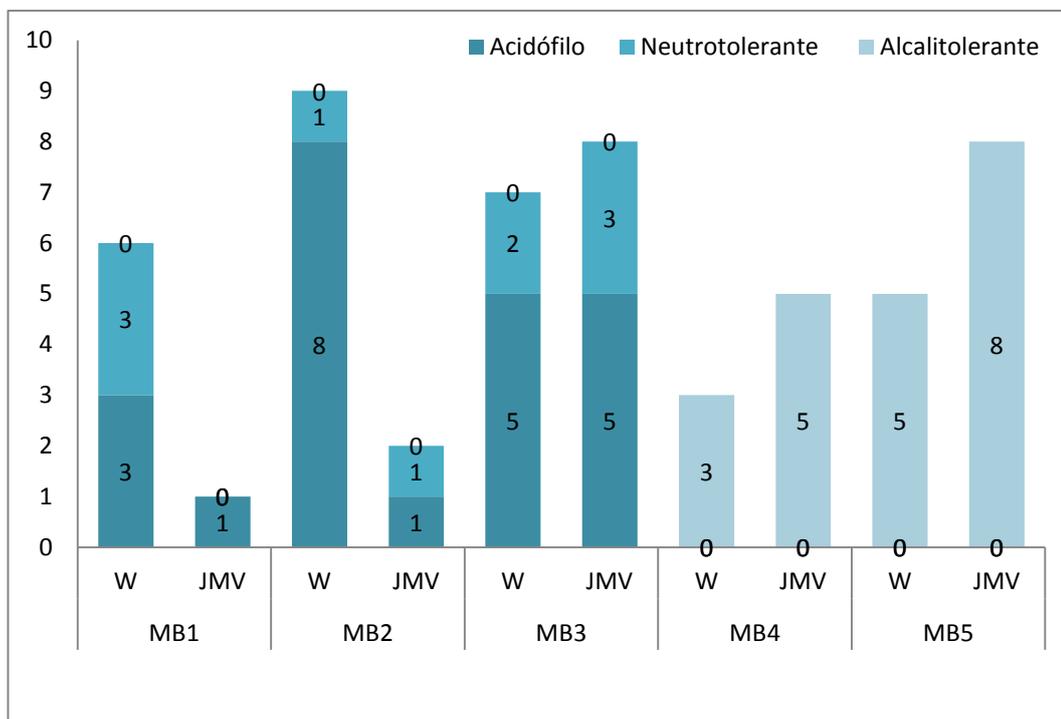
**Figura C7.** Clasificación de los actinomicetes aislados de acuerdo al rango de crecimiento en función de la temperatura de incubación.



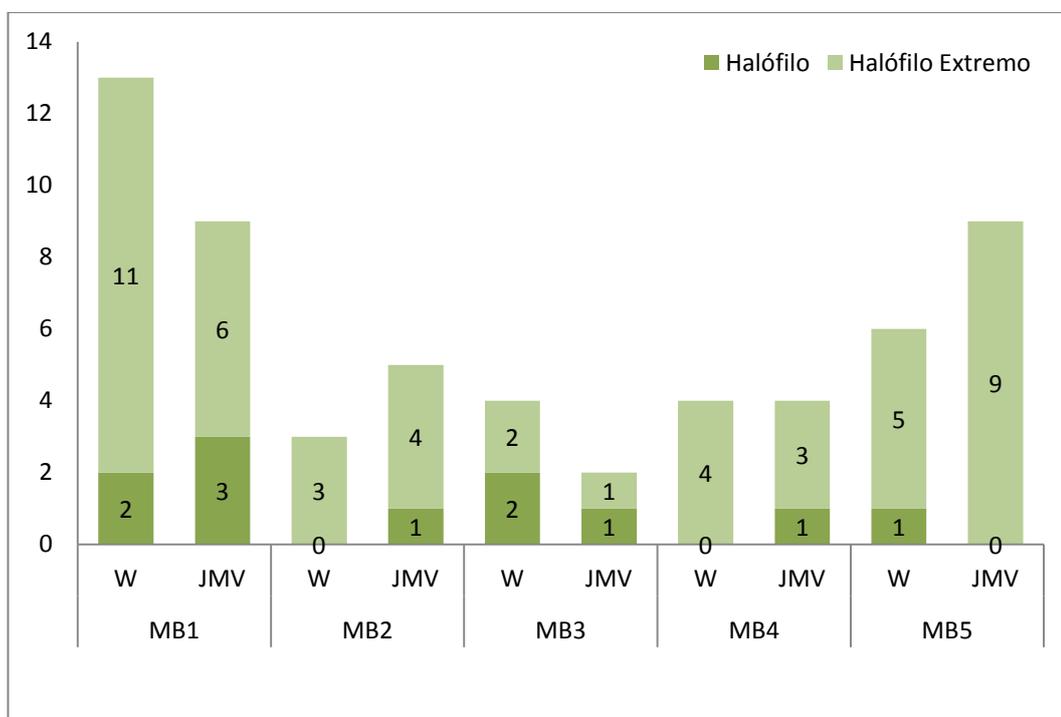
**Figura C8.** Clasificación de las bacterias aisladas de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo.



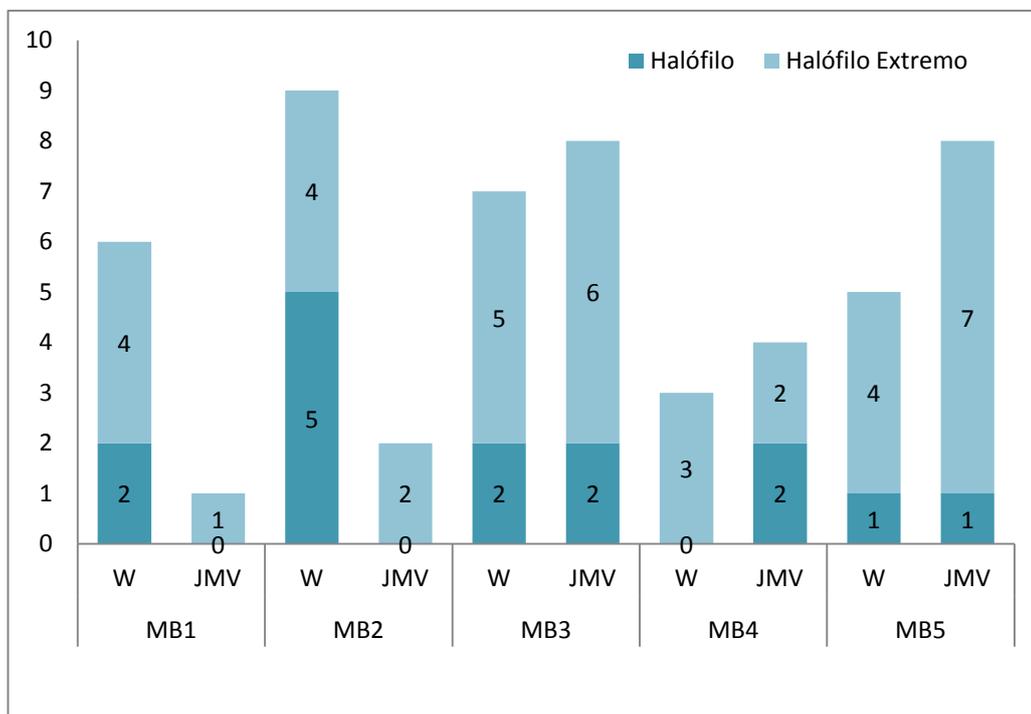
**Figura C9.** Clasificación de los actinomicetes aislados de acuerdo al rango de crecimiento en función del pH del medio de cultivo.



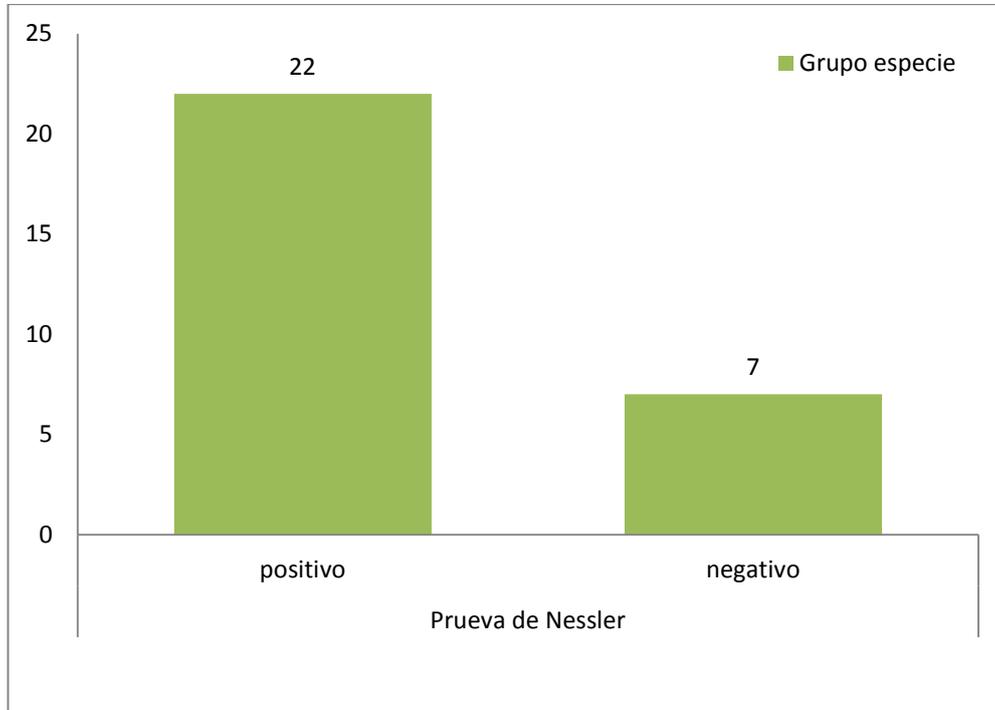
**Figura C10.** Clasificación de las bacterias aisladas de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo.



**Figura C11.** Clasificación de los actinomicetes aislados de acuerdo al rango de crecimiento en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo.



**Figura C12.** Clasificación de los grupos especie de bacterias según los resultados a la prueba de Nessler



**Figura C13.** Clasificación de los grupos especie de actinomicetes según los resultados a la prueba de Nessler

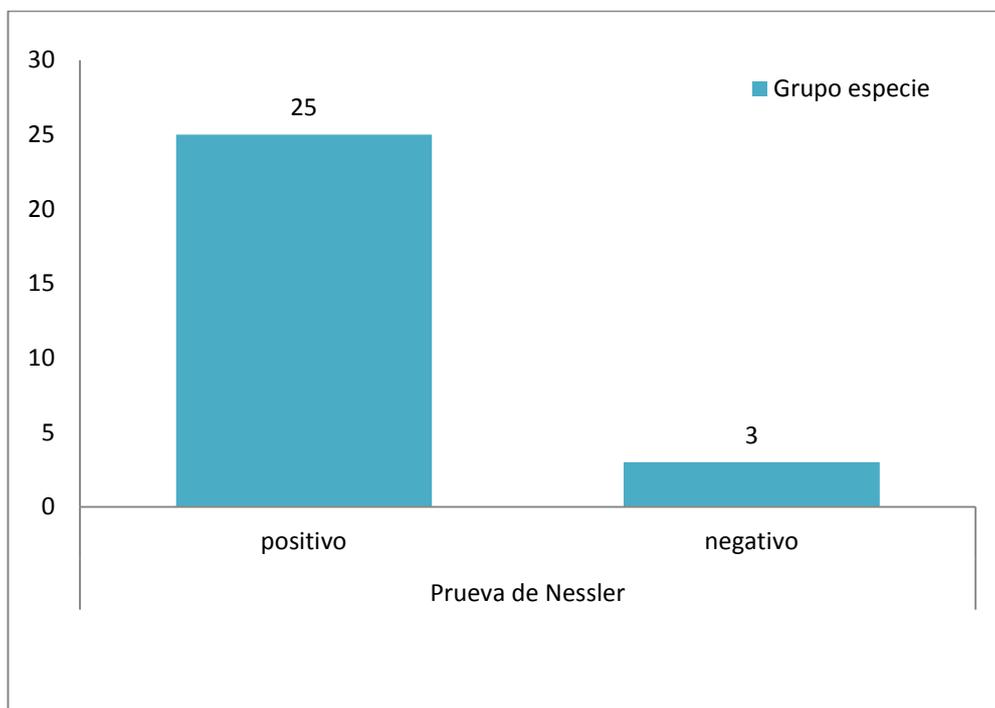


Figura C14. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de las bacterias aisladas en este estudio.

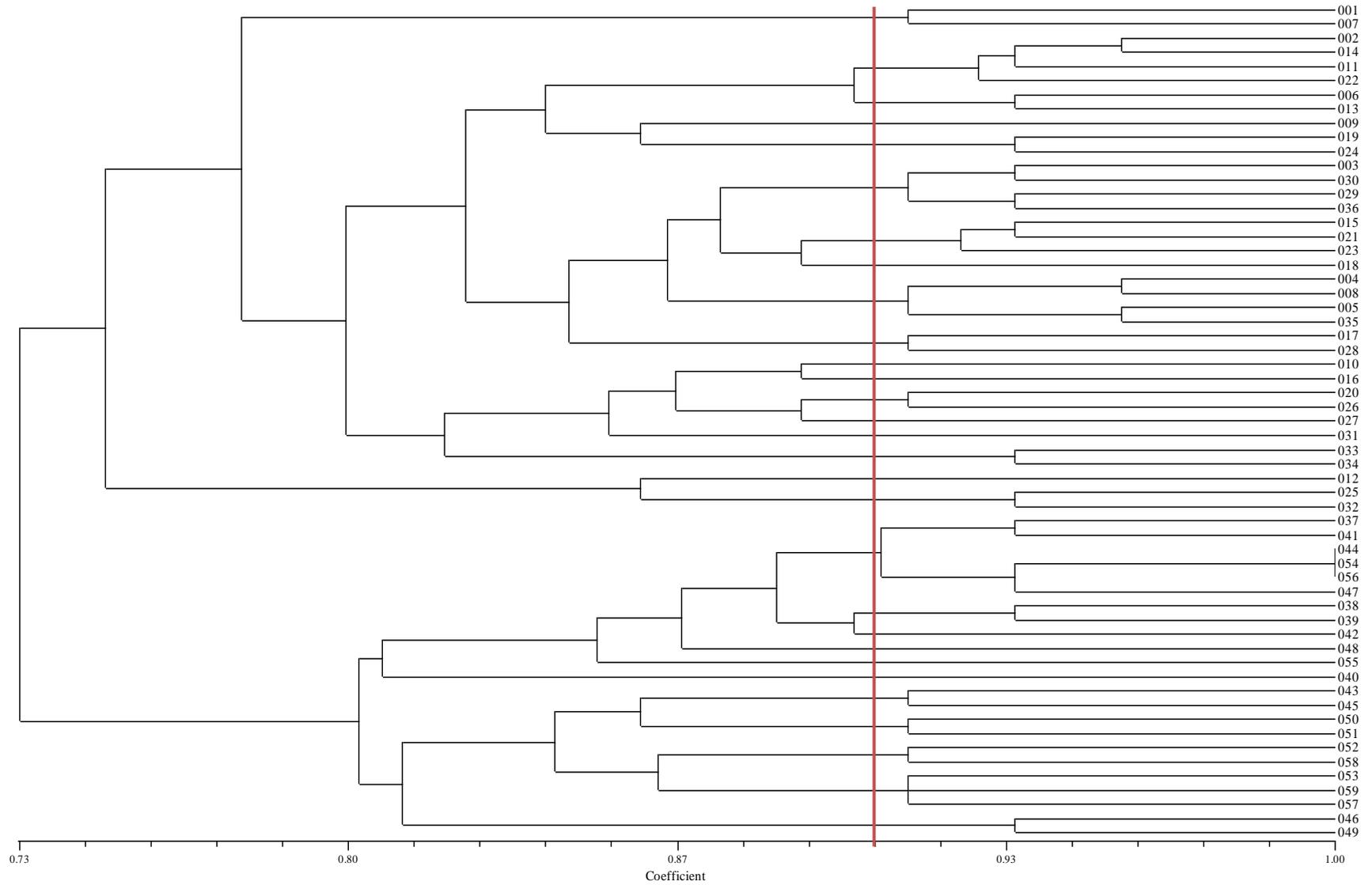
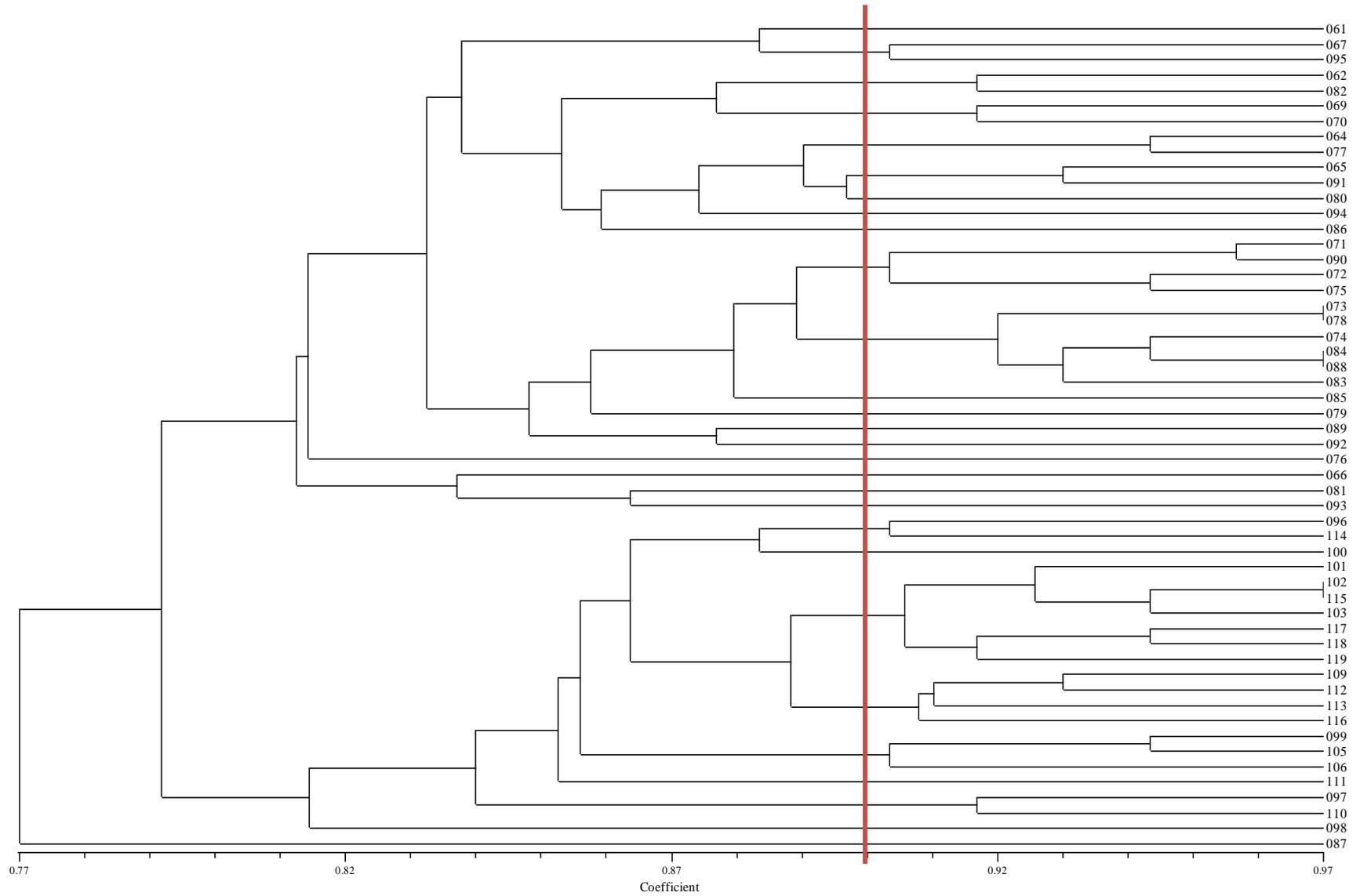


Figura C15. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de los actinomicetes aislados en este estudio.



# **ANEXO D**

## **MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES**

**TablaD1.** Medio de cultivo libre de nitrógeno Winogradsky

<b>Winogradsky: pH 6,5</b>			
Sacarosa	10g/L	Solución mineral	
CaCO <sub>3</sub>	0,1 g/L	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50g/L
Agar	15 g/L	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	25g/L
Solución mineral	5ml	NaCl	25g/L
		FeSo <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1g/L
		NaMoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	1g/L
		MnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O	1g/L
Completar el volumen para 1000ml de agua destilada.			

**TablaD2.** Medio de cultivo libre de nitrógeno JMV

<b>JMV: pH: 6,5</b>					
Manitol	3 g/L	Solución de micronutrientes		Solución de vitaminas	
Sacarosa	2 g/L	CuSO <sub>4</sub>	0.04 g/L	Biotina	10mg/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 ml (sol10%)	ZnSO <sub>4</sub>	1.20 g/L	Piridoxal-HCl	20mg/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15 ml (sol 10%)	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.40 g/L	Completar el volumen para 1000ml de agua destilada. Refrigerar.	
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.2 g/L	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1.00 g/L		
NaCl	0.1 g/L	MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	1.175 g/L		
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.02 g/L	Completar el volumen para 1000ml de agua destilada.			
Agar	15 g/L				
Solución de micronutrientes	2 ml				
Solución de vitaminas	1 ml				

**TablaD3. Agar GYM**

Agar GYM	
Glucosa	4 g/L
Extracto de levadura	10 g/L
Extracto de malta	10 g/L
CaCO <sub>3</sub>	2 g/L
Agar	15 g/L
Agua destilada	1000 ml

**TablaD4. Agar Nutritivo**

Agar Nutritivo (AN)	
Agar Nutritivo	23 g/L
Agua destilada	1000 ml

**TablaD5. Buffer de Fosfato di Básico de Sodio y Ácido Cítrico**

Solución de Ácido Cítrico 0.1 M (PM: 210.14 g)		
Solución de Fosfato di Básico de Sodio 0.2 M (PM: 141.98 g)		
Volumen final: 100 ml		
pH	0.1 M Ácido Cítrico (ml)	0.2 M Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (ml)
4.5	54.57	45.43
5.5	43.13	56.87
6.5	29.04	70.96
7.5	7.62	92.38

**TablaD6. Buffer de Hidróxido de Sodio y Ácido Bórico**

Solución de Hidróxido de Sodio 0.2 M (PM: 40.00 g)		
Solución de Ácido Bórico 0.2 M (PM: 61.80 g)		
Volumen final: 100 ml		
pH	0.2 M Ácido Bórico (ml)	0.2 M NaOH (ml)
8.5	75.00	25.00

# **ANEXO E**

## **TABLA DE COLORES**

Tabla E1. Tabla de colores utilizada en la caracterización macroscópica.

Mates - Ref.: 04140, 04125 y 04106															
															
															
															
															
Metálicos - Ref.: 04340															
															
Fluorescentes - Ref.: 04040															
															

**ACRILEX®**

# **ANEXO F**

## **FOTOGRAFÍAS**

## Toma de muestras



Suelo de pajonal de páramo



Suelo de monocultivo orgánico de maíz



Suelo férrico amazónico

## Diluciones seriadas en medio selectivo para determinación de población y diversidad.



Pajonal de páramo, JMV, dilución  $10^4$ , R1



Pajonal de páramo, JMV, dilución  $10^4$ , R2



Bosque de pinos, JMV, dilución  $10^4$ , R2



Bosque de pinos, JMV, dilución  $10^5$ , R1



Bosque de pinos, JMV, dilución  $10^6$ , R1



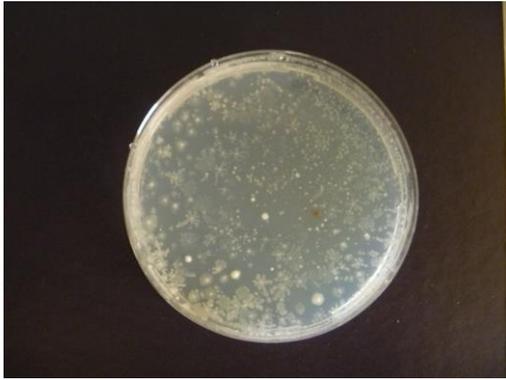
Férrico amazónico, W, dilución  $10^4$ , R2



Férrico amazónico, W, dilución  $10^5$ , R2



Cultivos orgánicos, W, dilución  $10^4$ , R1



Cultivos orgánicos, JMV, dilución  $10^5$ , R2



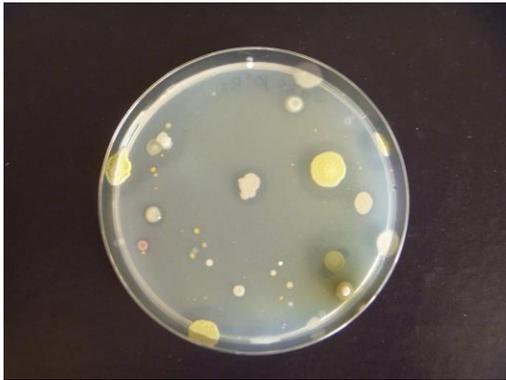
Cultivos orgánicos, JMV, dilución  $10^8$ , R2



Arrozal, JMV, dilución  $10^4$ , R2



Arrozal, JMV, dilución  $10^5$ , R2

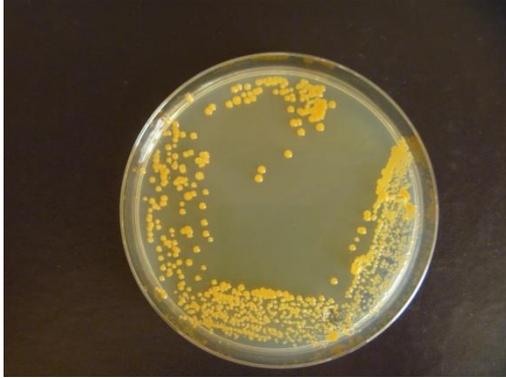


Arrozal, W, dilución  $10^5$ , R2

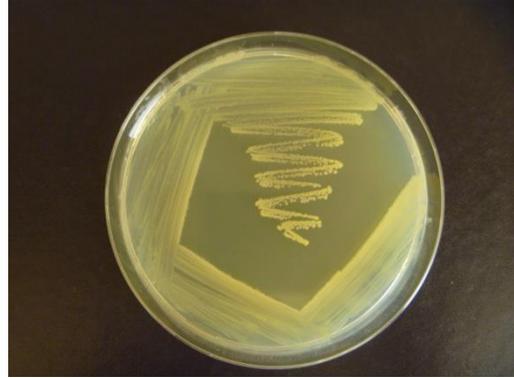


Arrozal, W, dilución  $10^8$ , R2

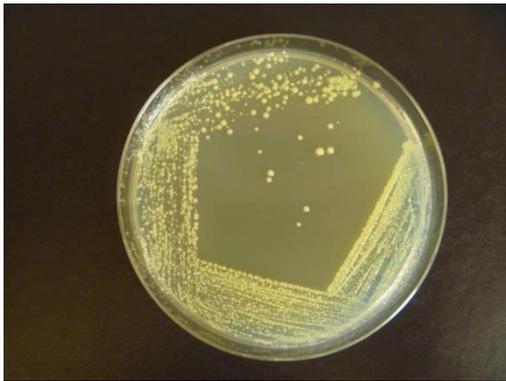
**Purificación de cepas en estrías compuestas**



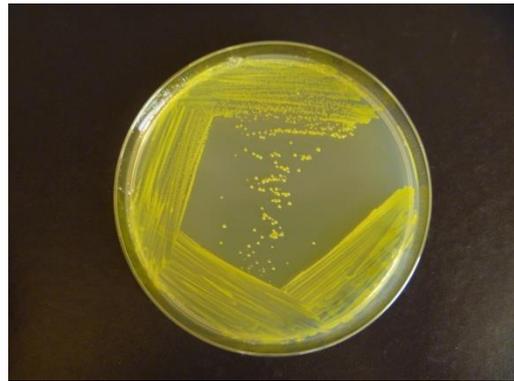
AN, MB1, JMV 001



AN, MB1, JMV 009



AN, MB2, W 028



AN, MB4, JMV 039



AN, MB4, W 043



GYM, MB1, W, 066



GYM, MB3, JMV, 084



GYM, MB3, JMV, 088



GYM, MB3, JMV, 094

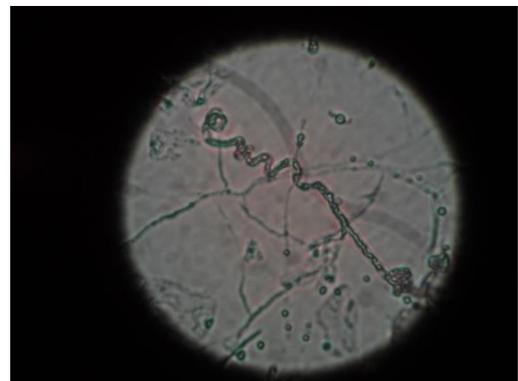


GYM, MB3, JMV, 093

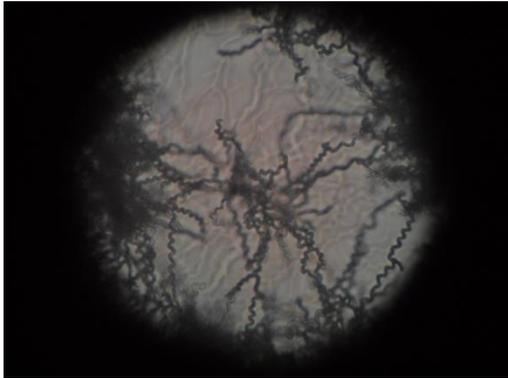
### Caracterización microscópica de actinomicetes- cadena de esporas



MB1-066, W, Incompleta, RA, 100x



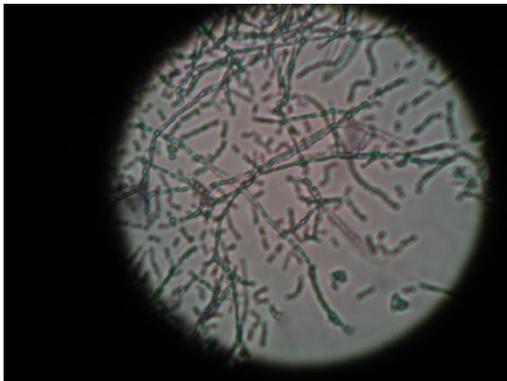
MB1-069, W, Incompleta, RA, 100x



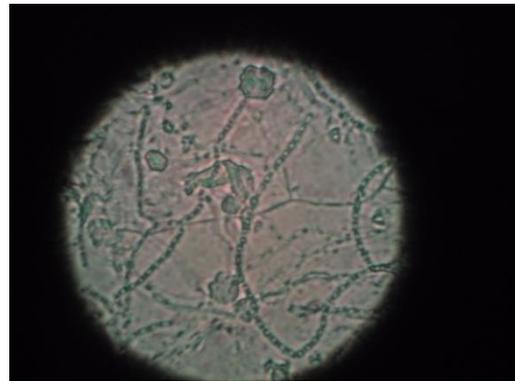
MB2-071, JMV, Incompleta, RA, 100x



MB1-061, JMV, Recta, R, 100x



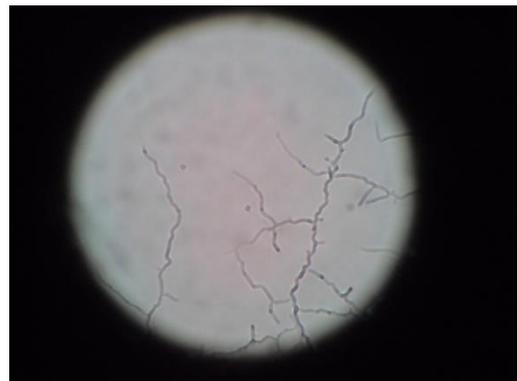
MB2-079, W, Recta, R, 100x



MB3-094, W, Recta, R, 100x



MB5-119, W, Espiral, S, 1000x



MB4-100, JMV, Simple, M, 1000x