



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO DE VIDA LIBRE, Y EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE CRECIMIENTO EN MEDIOS DE CULTIVO A GRAN ESCALA COMO ALTERNATIVA DE BIOFERTILIZANTE EN CULTIVOS DE *Rosa sp.*

Autora

Vanessa Estefania Silva Manosalvas

2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO DE VIDA LIBRE, Y EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE CRECIMIENTO EN MEDIOS DE CULTIVO A GRAN ESCALA COMO ALTERNATIVA DE BIOFERTILIZANTE EN CULTIVOS DE *Rosa* sp.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos para optar por el título de Ingeniería en Biotecnología.

Profesor Guía

MSc. Wilson David Tapia López

Autor:

Vanessa Estefania Silva Manosalvas

Año

2017

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA**

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

---

Wilson David Tapia López

MSc. Gestión y Planificación Ambiental

CC: 1714205281

## **DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO**

“Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos”.

---

Pablo Xavier Elizalde Jiménez

Ingeniero Químico

CC: 1104323983

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR**

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

---

María Alejandra Cruz Salazar  
Master en Ingeniería en Bioprocesos y Biotecnología  
CC: 1719928572

## **DECLARACIÓN DEL ESTUDIANTE**

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

---

Vanessa Estefania Silva Manosalvas

CC:1726723057

## **AGRADECIMIENTO**

En este proceso de culminación de mi formación profesional agradezco con gran admiración y respeto a mis docentes guías MSc. Alejandra Cruz y MSc. Wilson Tapia, por todo el apoyo brindado durante este tiempo. Agradezco a la empresa Florana Farms por permitirme formar parte de su equipo de trabajo para llevar a cabo el presente proyecto. Agradezco a mi madre y hermanos, por ser los principales pilares en mi vida, además de ser las personas que me dieron el incondicional apoyo a lo largo de este tiempo motivándome a seguir adelante. A mis amigos y compañeros de laboratorio, que de una u otra forma colaboraron con lo que necesitaba. Especialmente a Dany Naranjo por compartir sus conocimientos, su incondicional respaldo y guía. Mis sinceros agradecimientos a todos ustedes por ayudarme a alcanzar uno de los grandes

## **DEDICATORIA**

En cada paso de mi vida sin importar cual fuera, he contado con el respaldo de dos personas, que me han brindado todo el amor, ayuda y comprensión que he necesitado, por eso dedico este trabajo a mis hermanos Pablo y Ximena. Especialmente a mi hermano por confiar incondicionalmente en mí, es mi ejemplo a seguir, camina junto a mí enseñándome que ninguna adversidad debe detenerme sin importar cuál sea. Este logro no es solo mío, es nuestro.



## RESUMEN

En el Ecuador, la producción de rosas es uno de los rubros más importantes debido a la contribución de divisas y empleo que genera. Sin embargo, esta actividad posee un alto costo de producción y genera un impacto ambiental debido al uso de productos químicos empleados en mejorar la productividad florícola. Por ello, “Florana Farms”, empresa privada productora de rosas, busca alternativas orgánicas que permitan mantener la calidad de los cultivos, reducir el impacto generado y el costo de producción. La finalidad fue aislar e identificar bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre presentes en suelo agrícola mediante pruebas diferenciales: morfológicas y bioquímicas, además de probar su crecimiento en dos medios de cultivo como alternativa para producción de biofertilizantes. En la presente investigación se empleó suelos de *Polylepis australis* y *Rosa* sp. para el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno, el género de estas se identificó mediante pruebas morfológicas y bioquímicas. En el laboratorio se estudió la capacidad y diferencia de crecimiento de estas bacterias en dos medios de cultivo: caldo nutriente y medio alternativo a base de melaza. La cinética de crecimiento bacteriana se evaluó a través del método directo de la medición de la absorbancia. Se aplicó una prueba estadística t de Student para contraste de dos medias. Con el proceso realizado se logró aislar e identificar 4 cepas de bacterias fijadoras de nitrógeno, dos del género *Azospirillum* (P1, F5) y dos identificadas como *Azotobacter* (PC, PD). Se determinó que no existen diferencias significativas en el crecimiento de *Azospirillum* (F5) en los dos medios de cultivo. En cambio, para el género *Azotobacter* (PD) si existen diferencias significativas en cuanto a crecimiento bacteriano en ambos medios. Se alcanzó una absorbancia de 1.175 nm en el caso de *Azospirillum* y de 0.809 nm para *Azotobacter* en un rango de tiempo de 0 a 53 h en medio formulado a base de melaza. A diferencia del crecimiento que se dio en el caldo nutriente en el cual alcanzan una absorbancia menor, *Azotobacter* de 0.685 nm y *Azospirillum* de 0.590 nm en un rango de tiempo mayor de 0 a 100 h. El medio alternativo a base de melaza es más eficaz para el crecimiento de ambos géneros de bacterias fijadoras de nitrógeno.

## ABSTRACT

In Ecuador, the rose production is one of the most important activities due to the contribution of foreign exchange and the various jobs it generates. However, this activity has a great cost of production and usually comes with a high environmental impact due to the use of chemical products used to improve the florícola production. This made "Florana Farms" a private rose production company, look for organic alternatives which allow keeping the quality of their crops, but also reduce the environmental impact and cost of production. The objective is to identify and isolate certain bacteria which fixate nitrogen and are present within the culture soil by certain differential tests: morphological and biochemical, besides testing their growth on two culture medium as alternative to produce bio-fertilizers. In the following research it was used the soils of *Polylepis australis* and *Rosa* sp. for the bacterial isolation, their genre was identified via the morphological and biochemical tests. Their capacity and growth between the bacteria was determined in the lab by two culture medium: warm nutrient and an alternative medium which was made of molasses. The kinetic bacterial growth was tested by measuring the absorbance levels of the bacteria. A statistical test of t Student was applied to contrast both measurements. When the process finished we managed to isolate and identify 4 different strains of bacteria, two identified which were from the genre *Azospirillum* (P1, F5) and two as *Azotobacter* (PC, PD). It was determined as well that there are no meaningful differences in *Azospirillum's* (F5) growth on both culture mediums. However, for the genre *Azotobacter* (PD) there are notable differences between bacterial growths on both culture mediums. The absorbance level reached was of 1.175 nm in the case of *Azospirillum* and of 0.809 nm para *Azotobacter* within a time ranges from 0 to 53 h in the molasses medium. In contrast, the levels reached in the warm nutrient are less, having *Azotobacter* of 0.685 nm and *Azospirillum* of 0.590 nm which time range were between 0 to 100 h. The alternative medium of molasses is much more effective for the growth of both genres of nitrogen fixative bacteria.

## ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Planteamiento del problema .....	5
1.3. Objetivos: .....	7
1.3.1. Objetivo General .....	7
1.3.2. Objetivos Específicos.....	7
1.4. Justificación de la investigación.....	7
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	10
2.1. Bacterias fijadoras de Nitrógeno.....	10
2.1.1. <i>Azotobacter</i> sp.....	11
2.1.2. <i>Azospirillum</i> sp.....	12
2.1.3. Interacción bacterias y planta (rizósfera) .....	13
2.1.4. Fijación biológica de nitrógeno .....	14
2.1.5. Biofertilizantes.....	18
2.2. Identificación y caracterización de microorganismos benéficos del suelo .....	19
2.2.1. Medios selectivos.....	19
2.2.2. Identificación morfológica .....	21
2.2.3. Pruebas bioquímicas .....	21
2.3.4. Fase de crecimiento de microorganismos .....	23
2.3. Materia prima para producción de BFN a gran escala.....	24
3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL ...	25

3.1. Diagrama de bloques .....	26
<b>4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS .....</b>	<b>27</b>
4.1. Población y muestra .....	27
4.2. Materiales y métodos para la obtención de datos .....	28
4.2.1. Tratamiento de muestras de suelo.....	28
4.2.2. Siembra en medios selectivos: .....	28
4.2.3. Selección de colonias bacterianas.....	29
4.2.3.1. Aislamiento de colonias seleccionadas.....	29
4.2.4. Identificación Bacteriana .....	29
4.2.4.1. Selección de cepas fijas .....	29
4.2.4.2. Tinción Gram .....	30
4.2.4.3. Pruebas Bioquímicas .....	30
4.2.5. Curva de crecimiento microbiano en caldo nutriente .....	31
4.2.6. Curva de crecimiento en medio de cultivo alternativo a base de melaza .....	33
4.3. Evaluación estadística de los resultados.....	33
<b>5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>34</b>
5.1. Aislamiento de muestra del suelo de <i>Polylepis australis</i> y <i>Rosa</i> sp.....	34
5.2. Aislamiento e identificación bacteriana .....	35
5.3. Pruebas bioquímicas .....	39
5.3.1. Tinción Gram .....	39
5.3.2. Pruebas Bioquímicas .....	42

5.4. Crecimiento bacteriano en Caldo Nutriente y Medio Alternativo a base de Melaza .....	47
<b>6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>53</b>
6.1. Conclusiones.....	53
6.2. Recomendaciones .....	53
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>55</b>

## 1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes

En el Ecuador se promueve el cultivo de rosas debido a que esta actividad forma parte del crecimiento de las exportaciones no petroleras del país. La exportación de rosas ecuatorianas contribuye con el 75 % de la exportación total de flores. Actualmente hay alrededor de 4200 hectáreas destinadas al cultivo de flores en el país, ubicadas a 2000 metros sobre el nivel del mar debido a que las condiciones de luz y temperatura favorecen la producción por mantenerse estables durante el año (Arcos, 2015).

Países como Italia, Rusia, España, Ucrania, Estados Unidos, Italia, entre otros son los más interesados en las rosas ecuatorianas, son reconocidas por su atractiva y exclusiva variedad, su belleza y sobre todo su calidad. Las características principales son: su prolongada vida luego de ser cortadas, sus tallos gruesos largos y totalmente verticales, sus colores vivos, diversos y llamativos de los botones de flor (Arcos, 2015).

Expoflores es la “asociación de productores y exportadores de flores” que tienen como objetivo crear un vínculo entre los representantes del sector floricultor ecuatoriano con los miembros internacionales de las cadenas de floricultura. Por medio de esta asociación se establecen convenios con los países internacionales basándose en aspectos ambientales, sociales, y económicos que certifiquen la flor ecuatoriana. Existen 158 fincas involucradas en la producción de flores de verano a nivel nacional, las cuáles brindan regalías significativas, por lo cual es necesario llegar a obtener mejores y nuevas variedades que cumplan con los requerimientos de los grandes países interesados en la compra de flor nacional, como lo es el conseguir variedades que tengan un tiempo de vida prolongado en arreglos (Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones, 2015).

La competencia por mejorar la calidad de las rosas ha motivado a los floricultores a experimentar con la ubicación geográfica de los invernaderos, utilización de químicos y mejoras en las técnicas de cultivo. Sin embargo, la biotecnología podría proporcionar alternativas de fertilización y mejora de producción, utilizando bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) (Teixeira & Rodríguez, 2016).

Estas bacterias pueden ser de vida libre o estar asociadas simbióticamente; de cualquier forma atrapan el nitrógeno presente en la atmósfera para convertir moléculas de nitrógeno no reactivo en amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), el cual tiene mayor disponibilidad para las plantas. Este proceso es conocido como BNF (fijación biológica de nitrógeno) y está catalizado por la enzima nitrogenasa presente en el interior de las bacterias (Bhattacharjee & Singh, 2008).

Una parte del nitrógeno acumulado por las bacterias fijadoras de vida libre se usa para su mantenimiento y crecimiento, otra parte se difunde en el suelo para que de esta forma esté a disposición de las plantas, y el nitrógeno acumulado restante es utilizado por otros microorganismos para descomponer residuos vegetales (Baldani & Baldani, 2005; Martínez, 2011).

Los bioproductos formulados a partir de microorganismos se han convertido en prometedores dentro de la agricultura sustentable, por los beneficios al aplicar biofertilizantes compuestos por microorganismos benéficos como las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre en lugar de químicos. Dentro de los beneficios que se obtendrían de aplicar este tipo de productos se citarían: el mejoramiento de la productividad de la planta por medio de la estimulación hormonal y mediante el suministro de nitrógeno se incrementaría el crecimiento de las plantas (Yu, Liu, Zhu, Liu, & Mao, 2012). Al realizar preparaciones que incluyan mezclas de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre se ayuda a mantener el equilibrio de los suelos reduciendo la pérdida de vitaminas (Armenta, García, & Camacho, 2010).

Las preparaciones que involucran la presencia de este tipo de microorganismos, contienen sustancias biológicamente activas como las auxinas y giberelinas lo cual ayuda a promover la rizogénesis además de inducir el crecimiento, fortaleciendo a la planta en su resistencia biológica contra factores ambientales negativos (Vaitauskien, Šarauskisa, Naujokien, & Liakasb, 2015).

Las BFN de vida libre brindan un efecto positivo sobre las plantas, ya que estos microorganismos pueden sintetizar fitohormonas y vitaminas como la biotina, tiamina, entre otras, creando un mecanismo de acción conjunto entre las sustancias reguladoras del crecimiento y las vitaminas el cual puede estimular la germinación de las semillas y promover el crecimiento de las plantas (Ahmadi-Rad, Gholamhoseini, Ghalavand, Asgharzadeh, & Dolatabadian, 2016).

Se ha visto que la presencia de estas bacterias es alta en la parte adyacente de la rizósfera debido al desprendimiento de compuestos orgánicos que actúan como nutrientes para la planta. Los beneficios generados sobre el crecimiento de las plantas se pueden asumir a la capacidad de absorción radical de los compuestos nitrogenados, los cuales son excretados por los microorganismos (Cuadra, 2010). La acción de los biofertilizantes es variable ya que depende de los microorganismos presentes en el suelo, variedad de la planta, tipo de suelo, condiciones ambientales, entre otros (Armenta et al., 2010).

Los microorganismos que son beneficiosos para las plantas pueden actuar como biofertilizantes clasificados en dos grupos: el primero, por la capacidad para las síntesis de sustancias promotoras del crecimiento, fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de hierro, mejoradoras de tolerancia al estrés causado por metales tóxicos, salinidad, sequía, aplicación excesiva de pesticidas. El segundo grupo engloba a los que tienen la capacidad de reducir o prevenir la acción de patógenos. Los estudios más frecuentes sobre bacterias fijadoras de nitrógeno se han realizado en cultivos de trigo, caña de azúcar, arroz, arándanos y pastos (Sanjuán & Moreno, 2010).



Dentro de los microorganismos que se ha determinado que participan en promover el crecimiento de las plantas, se encuentran bacterias como: *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Alcaligenes*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Bacillus*. Los compuestos reguladores del crecimiento de las plantas que producen las bacterias presentes en la rizósfera son auxinas, citocininas, ácido abscísico, giberelinas, etileno, ácido indolacético (Armenta et al., 2010).

Las bacterias de género *Azospirillum* y *Azotobacter* son bacterias fijadoras de nitrógeno con potencial para actuar como biofertilizantes. Estas bacterias incrementan el número de brotes de flores y postergan la senescencia y abscisión de las flores por medio de la secreción de hormonas vegetales, y mejoran el crecimiento de las plantas (Placencia, 2013). Se ha visto que tienen un mejor efecto sobre las plantas cuando estos dos géneros bacterianos actúan juntos a manera de biofertilizante (Yu et al., 2012). Al causar una respuesta sistémica de la planta por el incremento de nódulos presentes en la raíz, generan mayor actividad nitrogenasa, todo esto debido al aumento de la capacidad de fijación de nitrógeno (Hernández & García, 2015).

Este tipo de bacterias pueden crecer en medios de cultivo alternativos generados a partir de desechos industriales. Grandes industrias alimenticias situadas en el país generan subproductos como la melaza y el suero de leche los cuales pueden ser optimizados como fuentes de carbono y nutrientes para producción bacteriana a gran escala. Estos subproductos al ser considerados como materia orgánica brindan beneficios sobre diversos cultivos de bacterias. Además de dotar de nutrientes y energía para promover el crecimiento de microorganismos también reducen costos en la producción (Ossa, Vanegas, & Badillo, 2010).

Se han obtenido resultados significativos a partir de estudios biotecnológicos que utilizan desechos industriales como medios de cultivos para producción de bacterias como *Lactobacillus* y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* utilizando melaza diluida y suero de leche. Estos desechos tienen la capacidad

de suplir las necesidades específicas de cada microorganismo al optimizar los recursos, haciéndolo rentable para la producción a gran escala además de reducir la contaminación en suelo y agua que puede generar el no tratar estos desechos (León, Calderón, Martínez, Sánchez, & Zulatto, 2013) Una ventaja de un bioproducto con respecto a un fertilizante químico, son sus bajos costos de producción, además del beneficio ecológico ya que permitiría un manejo sustentable de los sistemas agrícolas a partir de prácticas de la agricultura orgánica (Sanjuán & Moreno, 2010).

## **1.2. Planteamiento del problema**

La actividad florícola ecuatoriana inició hace poco más de 30 años y actualmente es la tercera actividad agrícola que genera divisas al país después del camarón y banano. Este sector es una importante fuente de divisas y empleo para el Ecuador, convirtiéndolo en el tercer país exportador de flores, En el 2013, el país exportó un total de 730 millones de dólares y generó empleo de manera directa e indirecta a un aproximado de 115000 personas. Debido a que el Ecuador es un país que contribuye con el 75 % de exportaciones de rosas es necesario buscar alternativas para garantizar que estos cultivos sean de calidad y reduzcan el uso de químicos para controlar plagas o estimular su crecimiento. Al mejorar la producción de rosas en volumen se incrementarían las ganancias lo cual aportaría a la economía del país (Arcos, 2015).

El consumo intensivo de fertilizantes que se utiliza para obtener una flor involucra alrededor de 80 tipos de químicos, los mismos que pueden volatilizarse a la atmósfera generando daños en la salud humana debido a su prolongado tiempo de exposición y efectos en el medio ambiente. Según un estudio realizado por Fundación Natura, del 26 al 62 % de las intoxicaciones causadas por químicos se da en las plantaciones de flores, además de los efectos que se generan en el medio ambiente como la salinización en el suelo (Devine, Eza, Ogusuku, & Furlong, 2008). Además este tipo de productos

generan desprendimiento de gases tóxicos causando daños en la capa de ozono (Lara, Alvarez, & Oviedo, 2013).

Un informe elaborado por la FAO muestra un incremento del 1.8 % del uso de fertilizantes a nivel mundial por año, hasta llegar a alcanzar en el 2018 las 200.5 millones de toneladas de fertilizante utilizado, generando afectaciones en diversos componentes ambientales. En África subsahariana el uso de grandes cantidades de fertilizantes indica que hay pérdida de nutrientes en los suelos destinados para cultivos, los mismos que no se pueden reponer, provocando una pérdida en el rendimiento de los cultivos además de la degradación de la tierra. Por esta razón es importante implementar alternativas que promuevan altos rendimientos de cultivos y eviten causar posibles impactos negativos en el medio ambiente. (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura FAO 2015). Los agroquímicos son altamente responsables de la disminución de la biodiversidad presente en el suelo, lo cual motiva la búsqueda de una agricultura sostenible, empleando alternativas que suplan a los químicos que se utilizan en el cuidado de cultivos de rosa. Mediante la reducción del uso de los mismos por alternativas que muchos desconocen, como es el uso de los microorganismos benéficos (Ahmadi-Rad et al., 2016).

Dentro de América Latina hay alrededor de 800 millones de hectáreas de suelos que necesitan sustituir la fertilización química por alternativas más sustentables, en las cuales se obtenga una producción más constante en el tiempo. Esto es notorio cuando hay ecosistemas que dependen de la fertilización química sin tener suficientes fuentes de materia orgánica que se encuentre en descomposición, por lo que se requiere de la fijación biológica del nitrógeno para hacer este proceso más efectivo incrementando la acción de los microorganismos (Mantilla et al., 2010).

Debido a la baja eficiencia que tienen los fertilizantes químicos se ha incrementado la cantidad de aplicación de los mismos, producto principalmente de la mala adsorción del suelo y baja absorción de las plantas, lo que genera altos costos para la producción. Al aplicar formulaciones microbianas en

cultivos de arvejas, cerezas y albaricoque, se ha observado una mejoría en el rendimiento y calidad de los cultivos y de ahí el interés por utilizarlas en las plantaciones de flores (Vaitauskien et al., 2015).

### **1.3. Objetivos:**

#### **1.3.1. Objetivo General**

Aislar e identificar bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, evaluando la capacidad de crecimiento en medios de cultivo a gran escala como alternativa de biofertilizante en cultivos de *Rosa* sp.

#### **1.3.2. Objetivos Específicos**

- Obtener y purificar bacterias fijadoras de nitrógeno a partir de suelo agrícola aplicando pruebas morfológicas y bioquímicas diferenciales.
- Evaluar dos medios de cultivo para el crecimiento de los microorganismos aislados.

### **1.4. Justificación de la investigación**

Dado a la creciente preocupación por el medio ambiente, han surgido varias alternativas donde se busca el aprovechamiento de los productos orgánicos para dejar a un lado la dependencia de los fertilizantes, con lo que la aplicación de bacterias fijadoras de nitrógeno ganaría una gran importancia dentro de prácticas agrícolas (Vaitauskien et al., 2015).

Dentro de la agricultura ecológica el uso de este tipo de biofertilizantes se considera como alternativa eficiente frente a zonas vulnerables a la contaminación ocasionada por nitratos, donde no es efectiva la aplicación anual

de fertilizantes nitrogenados y es limitada, abriendo camino de esta forma a la acción de las bacterias fijadoras de nitrógeno para su uso en la agricultura (Almario, Mojica, & Cuéllar, 2014).

El uso de bioproductos en reemplazo de fertilizantes químicos convencionales permite tener una agricultura sostenible ya que reduce el impacto económico y ambiental negativo al mejorar la productividad de los cultivos. Los biofertilizantes brindan a los agricultores la oportunidad de aplicar un producto biológico a sus cultivos donde la fijación del nitrógeno tiene lugar cerca del lugar de asimilación. Las alternativas biológicas tienen un tiempo de acción prolongando en relación de los fertilizantes químicos pero un resultado muy satisfactorio a largo plazo (Castro, Burgos, & Parra, 2012).

Una de las ventajas que se obtiene al usar biofertilizantes es una mejor capacidad del suelo para retener agua, mayor actividad microbiana, recuperación de la fertilidad, y control de enfermedades que afectan directamente a la planta como la pudrición de raíces. La acción de los biofertilizantes con estos microorganismos es notoria por un alto rendimiento biológico, capacidad de fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, y producción de sustancias promotoras de crecimiento por parte de las bacterias (Ahmadi-Rad et al., 2016). Es importante mencionar que las bacterias fijadoras de nitrógeno pueden lograr una acción antagonista contra diversos patógenos de las plantas. La selección de los microorganismos nativos de la región en la que se realiza la producción de los bioproductos contribuye con los beneficios para la planta debido a que se promueve su multiplicación en el suelo (Armenta et al., 2010).

De esta forma se consideran a los biofertilizantes como una solución a futuro, apostando por una agricultura sostenible generando efectos positivos junto con la interacción de diversos factores como la asimilación de nutrientes, el efecto fito-hormonal entre otros que se irán haciendo notorios conforme se aplique este tipo de compuestos logrando no solo disminuir el uso de fertilizantes químicos sino también se tendrá plantas sanas, activas metabólicamente,

resistentes a enfermedades que generen gran rendimiento en cosecha, con una calidad final de producto óptima (Hernández & García, 2015).

El desarrollo de alternativas para la fertilización y estimulación de cultivos promueve una actividad agrícola sustentable, económica y ecológicamente favorable. Con el uso de estos microorganismos se obtiene la reducción del uso de insumos externos mejorando la calidad y cantidad de insumos internos, lo que hace que este tipo de productos tengan una mayor demanda comparado con los químicos, en donde grandes mercados internacionales se ven atraídos por ellos (López et al., 2010). Por tanto, esta alternativa genera un producto que garantiza la seguridad y salud de los empleados además de conservar los recursos naturales productivos mejorando los ingresos de los productores (Lara et al., 2013).

La producción y comercialización a gran escala de los bioproductos sustentables a partir del crecimiento de microorganismos en medios de cultivo de bajo costo como la melaza, genera beneficios que se ven reflejados durante la cadena de producción (Ossa et al., 2010).

Al trabajar con microorganismos fijadores de nitrógeno como *Azotobacter* y *Azospirillum* en la producción de biofertilizantes, se desea obtener un bioproducto eficiente y de calidad que permita mejorar y fortalecer el desarrollo de las plantas en diversos cultivos. Optimizando el uso de residuos agroindustriales como fuente nutricional para el desarrollo de los microorganismos durante la producción del biofertilizante se generan menores costos de producción, incrementando las ganancias para los productores y disminuyendo el impacto ambiental que generalmente aumenta al utilizar productos químicos para mejorar los rendimientos de los cultivos.

## 2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Bacterias fijadoras de Nitrógeno

Los microorganismos benéficos del suelo en general se relacionan con el crecimiento de las plantas y evitan procesos infecciosos en tejidos vegetales (Placencia, 2013). Se desarrollan de forma natural en el suelo en ausencia total de nitrógeno, y al estar presente dicho elemento en la atmósfera lo reducen de estado gaseoso a forma de amonio, a fin de mejorar la productividad de las plantas (Martínez, 2011).

Este proceso de fijación de nitrógeno lo realizan los organismos procariotas, gracias al complejo enzimático nitrogenasa que presentan de forma exclusiva (Placencia, 2013). Estos organismos se puede clasificar en los que fijan el nitrógeno en vida libre como las bacterias aerobias *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bijerinckia*, bacterias anaerobias estrictas y facultativas como *Clostridium* y *Klebsiela* y los que realizan esta actividad por medio de asociaciones simbióticas específicas de leguminosas como es el caso de *Rhizobium* (Cuadra, 2010; Hernández & García, 2015) .

Dentro de este grupo están 87 especies divididas en dos géneros: el primero correspondiente a arqueobacterias con 38 especies, y el segundo con 20 géneros pertenecientes a cianobacterias dentro de las cuales se determinaron como diazótrofos. Las especies que presentan mayor eficiencia son las aquellas que tienen asociaciones con las plantas mediante los nódulos en la raíz (Cuadra, 2010).

Bacterias como *Azotobacter*, *Rhizobium* y *Azospirillum*, por sus mecanismos variados de acción son ideales para la biofertilización y su uso en biofertilizantes mejora el rendimiento respecto a fertilizantes nitrogenados inorgánicos (Placencia, 2013). Estos microorganismos son considerados en la agricultura moderna como alternativa para descartar los fertilizantes químicos típicos, contribuyendo con métodos amigables para el ambiente (Hernández &

García, 2015; Rasool et al.,2015). Las BFN empleadas en la biofertilización permiten que el nitrógeno fijado esté disponible de forma directa en la rizósfera, evitando pérdidas a causa de la lixiviación y la desnitrificación (Cuadra, 2010). Si la lixiviación es excesiva se crea riesgos tanto para humanos como animales por la contaminación de ríos, lagos y aguas subterráneas (Hernández & García, 2015).

Además es importante mencionar que al inocular BFN como *Azotobacter* y *Azospirillum* se puede obtener un porcentaje mayor de rendimiento respecto a fertilizantes químicos (Placencia, 2013).

### **2.1.1. *Azotobacter* sp.**

Esta bacteria pertenece a la familia Azotobacteriaceae, las cuales son Eubacterias Gram negativas; que presentan una pared celular conformada por una capa interna de péptidoglicano y una membrana externa. Su reproducción se da por fisión binaria y su hábitat es el agua y suelo (Almeida, 2011). El género *Azotobacter* forma parte de la familia de BFN, las cuales tienen una respiración aeróbica. Este género bacteriano está presente en suelos neutros y básicos mas no se evidencia su presencia en suelos ácidos. El aislamiento de estos microorganismos se realiza en medios selectivos libres de nitrógeno como el medio Ashby (Espín, 2012).

*Azotobacter* es una bacteria de vida libre que presenta colonias ya sean planas, viscosas o pastosas con un diámetro de 5 a 10 mm, y pueden ser incoloras, en tener tonos marrones, verdes, rosas, azules u otros según la especie. Su morfología es variable abarcando forma de cocos o bacilos y se las puede observar como células grandes ovoides cuyo diámetro oscila entre 1.5 - 2.0  $\mu\text{m}$ , que forman cadenas irregulares de distintos tamaños. Ciertas cepas poseen pigmentos que son solubles o insolubles en el agua y pueden formar quistes (Espín, 2012). Su temperatura óptima de crecimiento oscila entre los 20



a 30°C. Estos microorganismos utilizan sales de amonio, nitratos, o aminoácidos como fuentes de nitrógeno. El pH óptimo para su crecimiento y fijación de nitrógeno esta entre pH 7 – 7.5 (Almeida, 2011).

Esta bacteria es considerada como un organismo modelo y es usada por el hombre principalmente en la producción de biopolímeros, aditivos alimenticios y biofertilizantes, debido a que participan en la síntesis de vitaminas y sustancias biológicas activas de las plantas, interviniendo directamente en su crecimiento; además poseen la capacidad para biodegradar cloro de compuestos aromáticos y facilitan la movilidad de metales pesados como el plomo, mercurio y cadmio (Packialakshmi & Riswana, 2014).

### **2.1.2. *Azospirillum* sp.**

El género *Azospirillum* pertenece a la familia de Azospirillaceae. Las bacterias de este género presentan forma de bacilo y en las colonias se disponen a manera de C presentando un tamaño de 2-4 µm. En el microscopio se pueden observar células jóvenes con gránulos refringentes (Lara et al., 2013). Además, son Gram negativas, de respiración aerobia y utilizan como fuente de nitrógeno sustratos como nitrato, amonio y aminoácidos. *Azospirillum* tiene gránulos de poli-β- hidroxibutirato el cual actúa como fuente de reserva y permite adquirir hierro a los sideróforos (Yanet & Cueva, 2010).

Esta bacteria está presente en la zona de la rizósfera de suelos con pH neutro de regiones templadas y tropicales. *Azospirillum* tiene la capacidad de adherirse a las raíces por lo que tiende a colonizar la parte de la elongación celular además de los pelos radiculares. La intensidad con la que se puede encontrar sobre la raíz depende de dos factores: de la concentración de la bacteria y de la especie vegetal con la que se trabaje (Radif & Hassan, 2014).

El aislamiento de estos microorganismos se realiza con medios libres de nitrógeno, de los cuáles el más comúnmente usado es el medio NFb en el cual

según se modifique el pH se aíslan diversas especies. Generalmente en este medio de cultivo se desarrollan las especies *A. lipoferum* y *A. brasilense*, las cuales adoptan un tono rojo escarlata para diferenciarse en el medio (Cardenas et al., 2010).

*Azospirillum* ha sido una de las rizobacterias más estudiadas debido a los distintos efectos positivos que tiene sobre la planta; entre los que se cita la capacidad de fijación de nitrógeno y de estimular el crecimiento de la raíz y la densidad y longitud de los pelos radiculares, mejora el vigor en tallos, hojas y en el proceso floración, además de incrementar el contenido mineral de N, por ello, su potencial de acción como biofertilizante (Hernández & García, 2015; Radif & Hassan, 2014; Lara et al., 2013).

Se ha visto que *Azospirillum* actúa directamente sobre la concentración de ácido indol acético y sobre el ácido indol-3-butírico, además de intervenir en la actividad enzimática en el ciclo del ácido tricarbóxico (Cardenas, Garrido, Bonilla, & Baldani, 2010).

### **2.1.3. Interacción bacterias y planta (rizósfera)**

Las bacterias del suelo muestran una diversidad taxonómica grande, en la cual se notan diversos estilos de vida y tipos de asociación con plantas. Del total de la población de estas bacterias una pequeña parte tiene la capacidad de fijar el nitrógeno (Baca, Soto, & Pardo, 2000).

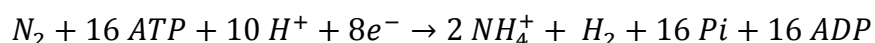
Durante largos años se creía que las BFN tenían efectos benéficos relacionados únicamente con el amonio secretado, pero se ha visto que también producen fitohormonas las cuales contribuyen con un mejor desarrollo de la planta. Además estas bacterias intervienen en la capacidad de absorción de nitrato por parte de la raíz, estimulan el sistema de transporte de nutrientes y permiten solubilizar minerales de fósforo para que estén disponibles para las plantas (Hernández & García, 2015; Cuadra, 2010; Mayz, 2010).

Los exudados de la raíz están conformados por diversas sustancias como aminoácidos y carbohidratos, cuya composición varía por la temperatura o por el contenido de agua de acuerdo a la especie que se encuentre en la rizósfera. (NAIP, 2012).

#### 2.1.4. Fijación biológica de nitrógeno

La fijación biológica de nitrógeno también conocida como diazotrófica, es llevada a cabo por los procariotas gracias a la capacidad que poseen de fijar el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) en amonio el cual es incorporado a la biosfera. Es un proceso importante para ecosistemas tanto terrestres como acuáticos en los cuales no se da una fertilización química, convirtiéndose esta en una de las principales fuentes de nitrógeno, por lo que su dotación en los sistemas agrícolas incrementaría la productividad de las plantas por ser este un componente esencial en la fertilidad del suelo (Charris et al., 2011).

En este proceso los organismos procariotas son capaces de fijar el nitrógeno gracias a la acción del complejo enzimático nitrogenasa. Este complejo presenta una alta sensibilidad al oxígeno y se encarga de catalizar la siguiente reacción:



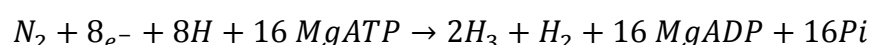
A pesar de la sensibilidad que presentan, poseen la capacidad de adaptarse a distintas condiciones para poder llevar a cabo el proceso de fijación de nitrógeno (Mantilla et al., 2010).

Por lo general las bacterias fijadoras de nitrógeno actúan a manera de simbiosis y de vida libre, dotando a la planta de compuestos orgánicos, siendo los principales el fumarato, succinato y malato, los cuales actúan como donadores de electrones necesarios el momento de producir energía (ATP) (Paredes, 2013).

Las bacterias como *Rhizobium* actúan en simbiosis formando nódulos en la parte radicular de las plantas, siendo esta la estructura donde ocurre la fijación biológica (Escobar, Horna, Carreño, & Mendoza, 2011; Ramirez, 2015). Se sabe que durante la simbiosis participan unas estructuras conocidas como bacteroides, dentro de las cuales está presente la enzima nitrogenasa, la cual transforma el  $N_2$  en  $NH_3$  el mismo que se asimila a través de una ruta metabólica en la que participan diversas enzimas promoviendo la formación de otros compuestos que provienen de las asociaciones simbióticas (aminoácidos y proteínas), proceso que ocurre dentro de los nódulos (Hernández & García, 2015; Samuel et al., 2013). La ausencia del oxígeno permite que la enzima nitrogenasa actúe, a través del funcionamiento de los bacteroides, los que promueven la acción de la enzima encargada de secuestrar dicho elemento conocida como leghemoglobina. Esta molécula requiere una gran cantidad de energía (ATP) para realizar sus funciones, energía que proviene de la planta (Ramirez, 2015).

Para que una bacteria de vida libre como *Azospirillum* pueda realizar la fijación de nitrógeno necesita la participación de un grupo de enzimas como nitrogenasa, hidrogenasa, ferredoxina, proceso de fijación que se produce a partir de los exudados radicales cuando los microorganismos colonizan los espacios intracelulares que se dan en el córtex de la raíz (Samuel et al., 2013).

Cuando la fijación biológica es llevada a cabo por esta bacteria, se evidencia un proceso de reducción del  $N_2$  a  $NH_3$  mediante tres pasos: el primero consiste en la reducción del complejo Fe-proteína por medio de los transportadores de electrones, el segundo implica la transferencia de un electrón por medio del complejo Fe-proteína hacia el complejo MoFe-proteína mediante Mg-ATP. Y finalmente el tercero que implica la transferencia del electrón al sitio activo del sustrato ligado al complejo MoFe-proteína (Paredes, 2013).



Los microorganismos diazotrofos como *Azospirillum* presentan un complejo de enzimas nitrogenasas de tipo 1, que depende del molibdeno (Mo), es así que

estas enzimas son codificadas por genes *nif* y únicamente son expresados en presencia de molibdeno. Esta enzima está compuesta por dos proteínas, una dinitrogenasa reductasa que contiene hierro (Fe) y se codifica por los genes *nifH*, y otra proteína que contiene la dinitrogenasa conformada por un cofactor metálico (Fe y Mo) lo cual permite que se dé la reducción del nitrógeno, y esta a su vez es codificada por los genes *nifD* y *nifK* (Paredes, 2013).

Cuando se da un exceso de producción de amonio la expresión de los genes que están relacionados en el proceso de fijación del nitrógeno son inhibidos. La proteína *NifA* realiza la función de activador para el proceso de transcripción de los genes *Nif*, como en el caso de *Azospirillum* esta transcripción se da en presencia del amonio donde *nifA* codifica a *NifA*, manteniendo su producto inactivo. La enzima glutamina sintetasa con la glutamato sintasa conforma el principal mecanismo para asimilar el nitrógeno fijado por bacterias diazotróficas, mecanismo que permite la dotación de glutamato y glutamina los cuales actúan como intermediarios dentro del metabolismo del nitrógeno (Sant'Anna et al., 2011).

Una de las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre como *Azotobacter* además de fijar el nitrógeno es capaz de sintetizar y secretar altas cantidades de sustancias benéficas para la planta como: giberelinas, ácido pantoténico, ácido nicotínico, entre otros los cuales promueven el crecimiento de las plantas. Esta bacteria cuando fija nitrógeno requiere una gran cantidad de energía por lo cual necesita de un proceso eficiente de fosforilación oxidativa, además de generar la necesidad de desarrollar mecanismos de protección para la enzima nitrogenasa debido a la sensibilidad que presenta al oxígeno (Pajares, 2016 Sánchez, 2009).

Así, los mecanismos de protección son dos: conformacional y respiratoria. La protección conformacional tiene lugar cuando se da un incremento de oxígeno generando así la inactivación de la nitrogenasa, cambiando su disposición a un complejo reversible inactivo protegido y dándose la formación de un enlace no covalente entre complejos de Fe y MoFe (Mayz, 2010). En cambio, la

protección respiratoria corresponde al incremento de la tasa respiratoria y un elevado consumo de carbono y energía, sin agotar las reservas de ATP y NADH cuando las células se han adaptado a altas concentraciones de oxígeno. Con el fin de mantener la concentración interna de oxígeno baja durante la protección respiratoria, actúa el citocromo oxidasa junto con NADH, promoviendo el flujo de electrones para generar tasas elevadas de respiración y consumo rápido de oxígeno intracelular. Por lo que la enzima nitrogenasa además de tener la capacidad de reducir el  $N_2$  es capaz de transferir electrones de la reacción a distintos sustratos y romper triples enlaces, actuando adicionalmente como detoxificante del ambiente. La actividad de esta enzima tiene lugar en la raíz, permitiendo que el nitrógeno fijado sea utilizado cuando la planta se encuentra en etapas de reproducción o desarrollo vegetal (Espín, 2012).

La fijación biológica de nitrógeno además de participar en la nutrición de las plantas puede contrarrestar el nitrógeno combinado que se dirige a la atmósfera mediante el proceso de desnitrificación, permitiendo de esta forma desarrollar un rol primordial dentro del ciclo del nitrógeno, dando lugar a la actividad de bacterias fijadoras de vida libre como *Azotobacter* y *Azospirillum*, sintetizando sustancias biológicamente activas, las mismas que estimulan el crecimiento de las plantas. Este proceso de fijación permite promover la biorremediación del suelo dando movilidad a metales pesados presentes en el mismo. De esta forma los sistemas agrícolas aprovechan la acción benéfica que proviene de los microorganismos fijadores de nitrógeno, conociendo cuál de ellos resulta ser el más eficiente, donde se da una asociación provechosa entre el hospedero y la bacteria (Acuña, 2011).

A continuación se explica el proceso de fijación realizado por bacterias fijadoras de nitrógeno, el mismo que se muestra gráficamente en la Figura 1.

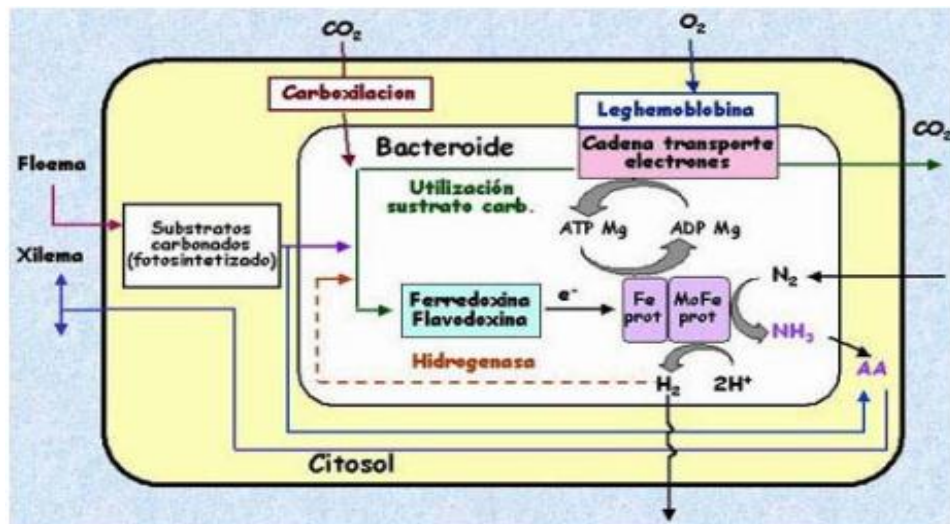


Figura 1. Proceso de fijación biológica del nitrógeno.

### 2.1.5. Biofertilizantes

Los biofertilizantes son inoculantes biológicos conformados por suspensiones bacterianas cuya acción brinda beneficios a los cultivos, puesto que con ello se pretende retomar las condiciones originales del suelo, convirtiéndose en una alternativa amigable con el ambiente al dejar de lado el uso de fertilizantes químicos (Rasool et al., 2015).

Estas formulaciones permiten a las bacterias mantenerse vivas por un año lo cual se traduce en un proceso de regeneración gradual del suelo incrementando su tasa de reproducción al igual que la fijación de nutrientes para la planta por acción del bioproducto. El uso de biofertilizantes en el campo agrícola trae ventajas ecológicas además de satisfacer las necesidades nutricionales de los cultivos de interés (Hernández & García, 2015).

Los microorganismos que conforman el biofertilizante deben ser capaces de fijar el nitrógeno, producir sustancias activas, incrementar la movilización del fósforo y regular la acción de los nutrientes (Sanjuán & Moreno, 2010). Las bacterias que forman parte del inóculo biológico logran establecerse y

multiplicarse hasta conformar grandes poblaciones, las cuales son capaces de producir altas concentraciones de sustancias activas nutritivas que son aprovechadas por las plantas (Packialakshmi & Riswana, 2014).

La aplicación de estas bacterias a manera de biofertilizante es una de las utilidades que presentan este grupo de microorganismos principalmente *Azotobacter* y *Azospirillum*, debido a la capacidad de formar una barrera protectora contra hongos y bacterias patógenos permitiéndole a planta desarrollarse de forma más sana. Facilitan la absorción de oligoelementos al permitir el desarrollo de enzimas que puedan solubilizar fosfatos (Almario et al., 2014). Se ha visto que el proceso de germinación es mejor al ocupar productos orgánicos comparado con la aplicación de productos químicos, mostrándose como alternativa para sustituir progresivamente la fertilización química, (Packialakshmi & Riswana, 2014).

## **2.2. Identificación y caracterización de microorganismos benéficos del suelo**

### **2.2.1. Medios selectivos**

La selección de los medios de cultivo que se desea utilizar depende de la finalidad y del tipo de microorganismo con el que se va a trabajar. Un mecanismo para la identificación de microorganismos en el laboratorio es mediante la observación del crecimiento de los mismos en sustancias artificiales alimenticias (Casado, Torrico, & Medina, 2012). A este material alimenticio se le conoce como medio de cultivo, el cual debe tener nutrientes y factores de crecimiento que permitan el desarrollo del microorganismo, al cual se le debe brindar condiciones adecuadas como: humedad, temperatura, oxígeno, acidez o alcalinidad (Cercenado & Cantón, 2010).

Los distintos medios de cultivo tienen componentes de enriquecimiento como hidratos de carbono que permiten incrementar el valor nutritivo del medio,



además de adicionarle elementos como bilis, suero, sangre, entre otros componentes (Charris et al., 2011). Los colorantes que se adicionan al medio de cultivo actúan como mecanismos de detección para los microorganismos de interés, ya que actúan como inhibidores selectivos para el crecimiento o en la formación de ácido o como indicador de actividades metabólicas o para detectar el crecimiento de bacterias según el color de sus colonias (Velazco, Araque, & Araujo, 2013).

Los medios de cultivo usados para microbiología generalmente contienen fuentes de carbono, fósforo, sales inorgánicas, azufre, nitrógeno, y en ciertos casos se le añade también vitaminas, sales minerales o sustancias que promuevan el crecimiento según sea la necesidad (Moreno & Galvis, 2013).

Es esencial conocer los requerimientos necesarios para el crecimiento del microorganismo, lo cual muestra las condiciones óptimas de trabajo en cuanto a la temperatura, oxígeno, pH y humedad. Lo cual evitará la inhibición, alteración de procesos metabólicos, o la desecación del medio el momento de incubar la muestra (Radif & Hassan, 2014).

En el caso de las bacterias fijadoras de nitrógeno se debe trabajar con medios selectivos sin fuente de nitrógeno, estos medios son Ashby y NFb (nitrogen free broth) adicionado con rojo congo, en los cuales se observa crecimiento entre los 4-7 días de incubación (Moreno & Galvis, 2013).

El medio Ashby permite el crecimiento de *Azotobacter* evidenciando formación de colonias blancas o crema. El medio NFB adicionado con rojo congo permite el crecimiento de *Azospirillum* identificando las colonias con un color rojo escarlata. Estos dos medios selectivos tienen la ventaja de reducir la probabilidad de contaminación con otro tipo de microorganismos (Casado et al., 2012).

Una de las condiciones que se debe tener en cuenta al momento de preparar los medios de cultivo es brindarle al medio una consistencia adecuada para lo cual se puede partir de un medio líquido al que se puede modificar su

composición para obtener medios en estado sólido o semisólido (Almeida, 2011).

### **2.2.2. Identificación morfológica**

La identificación bacteriana comprende un amplio tipo de pruebas, técnicas y métodos. Estos procesos incluyen diversas reacciones con reactivos específicos, medios selectivos, pruebas de tinción, bioquímicas, moleculares entre otras, las cuales permiten identificar las especies y géneros de microorganismos de interés (Ferré, Ferrán, & Jacob, 2011).

Para poder identificar los microorganismos de interés se pueden aplicar métodos basados en el criterio de morfología, los cuales permiten observar la taxonomía y rasgos anatómicos de los diferentes microorganismos y según las observaciones se los puede clasificar (Boua, Fernández, García, Sáez, & Valdezate, 2011).

Otro método se basa en la tinción diferencial en el cual se puede apreciar morfológicamente al microorganismo de interés. Los rasgos obtenidos en este proceso se observan en el microscopio y por lo general son los primeros indicios para la identificación bacteriana. Uno de los métodos de tinción más aplicados es la tinción Gram mediante la cual se puede apreciar la morfología de las bacterias y se las puede clasificar en dos categorías: bacterias Gram positivas o Gram negativas (Ferré et al., 2011).

### **2.2.3. Pruebas bioquímicas**

El papel que desempeñan las pruebas bioquímicas es el de permitir identificar características metabólicas de los microorganismos objeto de estudio. Existen diferentes tipos de pruebas las cuales varían según el tiempo de reacción, en las que se cita a las pruebas rápidas, que tienen una lectura de respuesta de

segundos o minutos. El tiempo de lectura en otro tipo de pruebas toma de 18-48 horas (h) debido al tiempo de incubación que requiere el microorganismo para poder apreciar su actividad (Rasool et al., 2015).

Existen diversas pruebas que permiten observar variaciones en las características metabólicas de ciertos microorganismos. Dentro de estos se encuentra:

La prueba de catalasa que permite determinar si las bacterias tienen la enzima encargada de descomponer el peróxido de hidrógeno. Si existe la presencia de la enzima catalasa se producen burbujas en la muestra y en el caso contrario no se refleja ninguna reacción en la muestra (Velazco et al., 2013).

La prueba de oxidasa identifica la presencia de enzimas encargadas de la oxidación a través de la presencia del citocromo C. Si la oxidación tiene lugar en la muestra se evidencia una coloración azul caso contrario no hay cambio en la coloración (González, Hernandez, & Fócil, 2014).

La prueba Indol permite la detección de la liberación de Indol en el medio de cultivo. Con esta prueba se conoce si la bacteria posee la enzima triptófanoasa y su capacidad de degradación de triptófano. Todas las pruebas anteriormente mencionadas se pueden clasificar dentro del grupo de lectura de respuesta rápida (Rustrián, Ramírez, & Solano, 2013).

La hidrólisis gelatina es una prueba que permite conocer la capacidad proteolítica que posee el microorganismo e identificar la presencia de la enzima encargada de degradar la gelatina.

La prueba de citrato permite conocer si la bacteria utiliza al citrato como única fuente de carbono. Para ello se utiliza un medio de cultivo color verde, en el cual se puede observar un resultado positivo cuando se torna el mismo de un color azul. Si se mantiene el color normal del medio se observa un resultado negativo (Cercenado & Cantón, 2010).

Otra prueba que permite medir la capacidad del microorganismo para hidrolizar la urea, es conocida como la prueba ureasa. Cuando el resultado de esta prueba es positivo se torna el color de medio a fucsia y si el resultado es negativo el color del medio no se altera. La reducción de nitratos permite conocer la capacidad que tiene el microorganismo para reducir nitratos en nitritos, lo que se produce por acción de la enzima nitrato reductasa (Rustrián et al., 2013).

#### **2.3.4. Fase de crecimiento de microorganismos**

La división e incremento del número de estructuras celulares se conoce como crecimiento microbiano. La velocidad con la que las estructuras crecen es el tiempo que le toma a una población bacteriana en duplicarse, la cual varía según el tipo de microorganismo (Haro & Perales, 2015).

Una forma de representar el crecimiento que tienen las bacterias es mediante una curva de crecimiento, la cual permite determinar de forma periódica la cantidad de células viables presentes en un medio previamente inoculado. La curva de crecimiento bacteriano está conformada por diversas fases de crecimiento (Aguilar, Espinoza, & Cabanilla, 2015). Dentro de ellas está la fase lag donde las células pueden tener un proceso de adaptación a las nuevas condiciones del medio, además las mismas son pobres en enzimas y metabolitos. La fase exponencial permite a las células microbianas que inicien un crecimiento estable. En la fase estacionaria no se nota el incremento neto de microorganismos. Durante la fase de muerte se puede notar el decrecimiento del número de microorganismos vivos y un incremento de la tasa de mortalidad (Sarmiento, Hazel, & Cárdenas, 2013).

### **2.3. Materia prima para producción de BFN a gran escala**

Los medios de cultivo alternativos para la producción a nivel industrial buscan cumplir los requerimientos nutricionales que permitan el crecimiento óptimo de los microorganismos mediante una fuente de bajo costo. Estas fuentes son abundantes en el mercado y de bajo costo de producción, las cuáles se pueden obtener de materias primas como los subproductos de procesos alimenticios como es el caso de la melaza y el suero de leche (León et al., 2013).

A pesar de que los requerimientos de nutrición de los microorganismos son específicos para cada una de las especies, se ha visto que la melaza y el suero de leche son considerados como una de las fuentes ricas en nutrientes que permiten el crecimiento de bacterias, por lo cual se requiere formular estos medios de cultivo alternativos en base a las condiciones y necesidades específicas de los microorganismos para poder optimizar y generar rendimientos altos en cuanto al crecimiento de las bacterias y de esta forma generar una producción sustentable a partir de un medio rentable (León et al., 2013).

La caña de azúcar es una gramínea de la cual se puede obtener un jugo con alto contenido en sacarosa, del cual se puede obtener azúcar y una miel conocida como melaza. La melaza es un tipo de miel semilíquida de aspecto marrón oscuro y viscoso, generalmente utilizada en la industria alimenticia. Está formada por nutrientes como azúcares reductores (5 %), proteínas (3 %), sacarosa (60 %), agua (16 %), grasa (0.4 %) y cenizas (9 %) que pueden ser aprovechados en la producción de biomasa donde participan microorganismos como bacterias y levaduras (Aguilar et al., 2015).

### 3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

En este trabajo experimental se planteó cuatro tratamientos formados de dos medios de cultivo y dos cepas bacterianas como se aprecia en la Tabla 1. Para cada uno de los tratamientos se realizaron 3 repeticiones para determinar si hay diferencia de crecimiento entre los medios.

Se utilizó un diseño completamente al azar en el arreglo de las unidades experimentales en el ensayo.

Tabla 1.

*Tratamientos realizados en el trabajo experimental.*

<b>Cepa de trabajo</b>	<b>Medio de cultivo</b>	<b>Condiciones</b>
<b><i>Azospirillum</i> sp. (F5)</b>	Medio alternativo a base de melaza	*T°: 28 °C; pH: 7; agitación
<b><i>Azotobacter</i> sp. (PD)</b>	Medio alternativo a base de melaza	T°: 28 °C; pH: 7; agitación
<b><i>Azospirillum</i> sp. (F5)</b>	Caldo Nutriente	T°: 28 °C
<b><i>Azotobacter</i> sp. (PD)</b>	Caldo Nutriente	T°: 28 °C

Nota; T°: Temperatura.

### 3.1. Diagrama de bloques

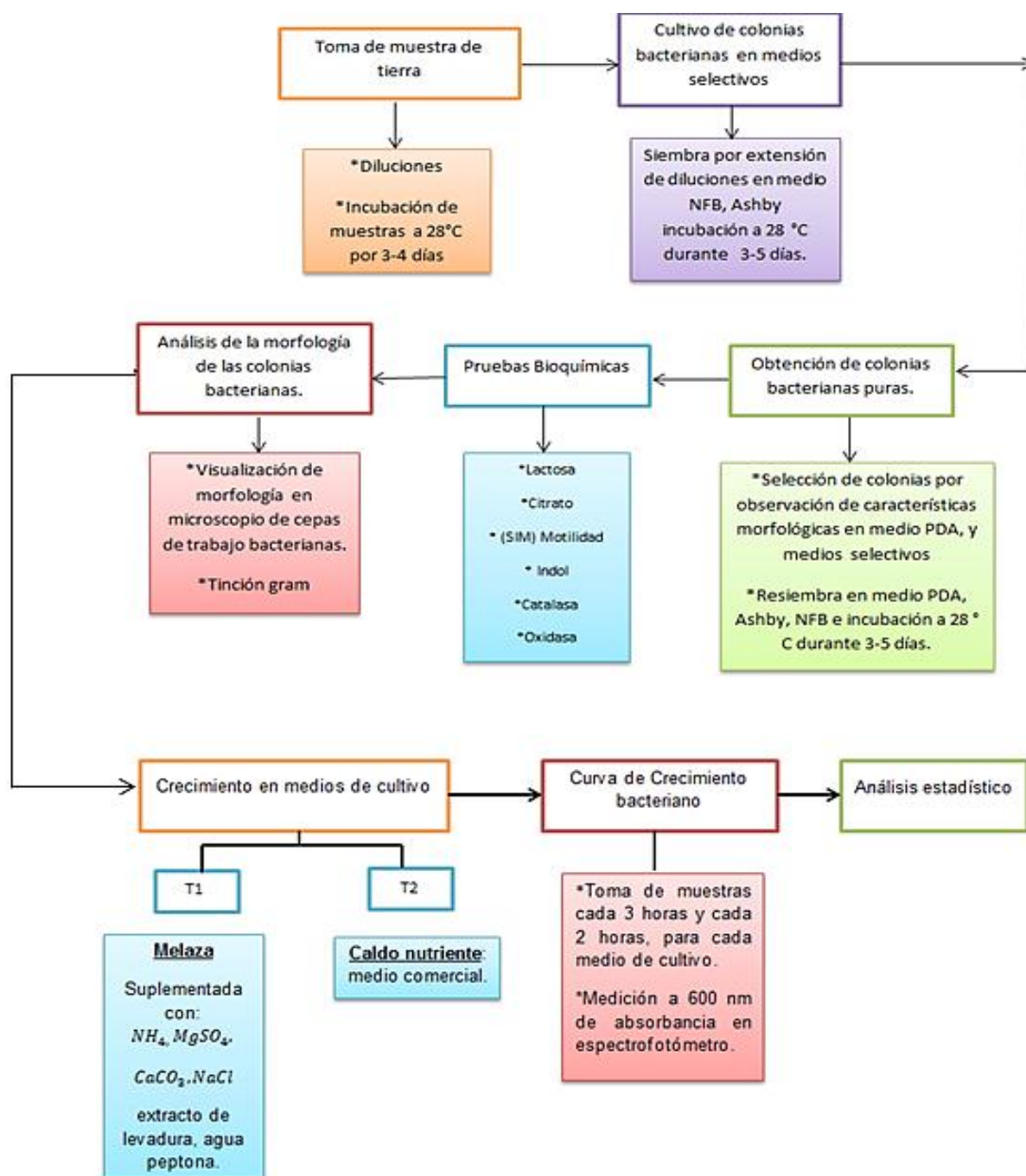


Figura 2. Diagrama de bloques del procedimiento de aislamiento e identificación de bacterias fijadoras de nitrógeno, y la evaluación de medios de cultivo para producción a gran escala.

## 4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS

### 4.1. Población y muestra

La empresa “Florana Farms”, ubicada en el cantón Pedro Moncayo, provincia de Pichincha, busca desarrollar productos orgánicos en sus laboratorios que ayuden a mejorar la sanidad de los cultivos de rosas. Dentro de la finca de la empresa se tomaron tres muestras de suelo en dos tipos de plantas: *Polylepis australis* (M1) y *Rosa* sp. (M2). La muestra M3 se formó mezclando suelo de M1 y M2. Se seleccionaron plantas de *Rosa* sp. sanas y vigorosas y se tomó una muestra de suelo por planta con la utilización de un barreno y se colocó la misma en una funda estéril. Se utilizó como referencia la metodología utilizada por Gómez, Ramírez, Veloz, Gasca, & Herrera, 2014, añadiendo algunas modificaciones. En la Figura 3 se muestra como se llevó a cabo el procedimiento de muestreo de suelo.



Figura 3. Procedimiento de muestreo para el suelo de *Polylepis australis* y *Rosa* sp.



## 4.2. Materiales y métodos para la obtención de datos

### 4.2.1. Tratamiento de muestras de suelo

Las muestras de suelo fueron llevadas al laboratorio donde se homogenizaron para evitar la presencia de conglomerados facilitando de esta forma su disolución en agua. Una vez homogenizadas, se unificó en una sola muestra las tres muestras de suelo de *Polylepis australis*, repitiendo el procedimiento para el suelo de *Rosa* sp. (Lara et al., 2013).

De las muestras unificadas se dividió en la mitad cada una de ellas posteriormente se tomó una mitad del suelo de *Polylepis australis* y se etiquetó como M1, y lo mismo se realizó con la muestra de suelo de *Rosa* sp, pero en este caso se la etiquetó como M2. Las restantes mitades de las muestras de *Polylepis australis* y *Rosa* sp. se mezclaron obteniendo la muestra M3. Tanto de M1, M2 y M3 se tomó 20 g de suelo, los que fueron colocados en matraces con 60 mL de agua destilada. Esta mezcla se llevó a agitación durante 15 minutos (Carranza, Rivera, Chaves, & Arias, 2013).

Pasado este tiempo se tomó 1000  $\mu\text{L}$  de cada una de las tres mezclas, las cuales se colocaron en microtubos de 1.5 mL. Esto se realizó para aplicar la técnica de dilución y siembra por extensión en placa con medio PDA utilizada por Aquiahuatl et al., 2012, para cada muestra de M1, M2 y M3, se trabajó con duplicados para cada una. Las placas sembradas con las muestras antes mencionadas se llevaron a incubación a 28°C durante 2 días, lo cual permitió seleccionar los microorganismos de interés (Lara et al., 2013).

### 4.2.2. Siembra en medios selectivos:

Debido a que los medios selectivos no son comerciales sino preparados bajo un protocolo, se procedió a probar con las mismas muestras de suelo que fueron sembradas en medio PDA. Para lo cual se tomaron 400  $\mu\text{L}$  de las

diluciones antes preparadas para realizar una siembra por extensión en medios libres de nitrógeno Ashby y NFB para cada una de las muestras de suelo (M1, M2, M3), dejándolos en incubación por 3 días a 28°C (Aquiahuatl et al., 2012).

#### **4.2.3. Selección de colonias bacterianas**

Pasado el tiempo de incubación para las muestras sembradas en PDA de las muestras M1, M2 y M3, se procedió a seleccionar las colonias que tienen características morfológicas de bacterias fijadoras de nitrógeno. Se seleccionó las colonias de forma redonda de color azul transparente y color rosa (NAIP, 2012).

##### **4.2.3.1. Aislamiento de colonias seleccionadas**

A las colonias bacterianas seleccionadas, se las sembró mediante la técnica de estriado en medio Ashby, NFB y PDA. Una vez inoculadas se incubó las muestras del medio Ashby y NFB durante 4 días y las del PDA por 3 días.

#### **4.2.4. Identificación Bacteriana**

##### **4.2.4.1. Selección de cepas fijas**

Pasado el tiempo de incubación se descartaron las colonias que no cumplían con las características visuales de los microorganismos de interés. Las características a considerar para la selección de las cepas bacterianas, se basaron en el trabajo de Almeida 2011 y NAIP, 2012.

**En medio PDA:** Colonias redondas de color blanco, crema o rosa, colonias con bordes azules, después de un tiempo de incubación de 1-2 días.

**En medio Ashby:** Colonias redondas blancas, transparentes, con o sin relieve, después de un tiempo de incubación de 4-6 días.

**En medio NFB adicionado con rojo congo:** Colonias redondas de color rojo escarlata, rojo opaco o rosa, después de un tiempo de incubación de 4-6 días.

Las cepas seleccionadas nuevamente se inocularon utilizando el método de estriado por agotamiento en medio PDA, con la finalidad de tener cepas fijas de trabajo y así poder realizar las distintas pruebas de identificación bacteriana.

#### **4.2.4.2. Tinción Gram**

Para poder identificar bacterias Gram positivas y negativas se partió del protocolo establecido por López et al., 2014. Al finalizar el proceso de tinción se observó las muestras en el microscopio utilizando lentes de 4X, 10X y 100X. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada una de las cepas fijas en cada medio.

#### **4.2.4.3. Pruebas Bioquímicas**

Para las pruebas bioquímicas se utilizaron medios comerciales, los cuales fueron preparados según las instrucciones del fabricante, trabajando por triplicado para cada una de las muestras. Se siguió el proceso de siembra establecido por Perilla, 2003 para las pruebas de lactosa, citrato y el medio SIM. Se aplicó estas pruebas por triplicado para cada uno de los medios de cultivo a las cuáles se las dejó incubar por 3 días para observar los resultados.

Para la prueba catalasa y oxidasa se colocó una gota de agua destilada en un portaobjeto y con un asa de siembra redonda se tomó una parte de una colonia bacteriana para realizar un frotis. Inmediatamente después se colocó 4 gotas de peróxido de hidrogeno para la prueba de catalasa y para la oxidasa se

utilizó tiras comerciales. Esta prueba se realizó por triplicado para cada cepa fija que se encontraba en los distintos medios de cultivo.

#### 4.2.5. Curva de crecimiento microbiano en caldo nutriente

En base a las pruebas de identificación antes realizadas se pudieron seleccionar las cepas de trabajo, identificándolas como P1, F5 para el género *Azospirillum*, y PC y PD para el género *Azotobacter*. De estas cepas al azar se seleccionó un ejemplar de cada género para evaluar el crecimiento bacteriano según los tratamientos establecidos.

Las cepas F5 y PD fueron seleccionadas para la evaluación de crecimiento, para lo cual fueron previamente sembradas en sus respectivos medios selectivos, mediante la técnica de extensión. De las placas de la dilución  $10^{-4}$  se tomaron colonias bacterianas con un asa de siembra para cada ejemplar bacteriano, las cuales fueron colocadas en 150 mL de caldo nutriente, dejando estos inóculos incubar durante 3 días a 28 °C, tal como se muestra en la Figura 4.

Para la evaluación del crecimiento bacteriano se partió del inóculo previamente obtenido en caldo nutritivo. Con el fin de evaluar el crecimiento bacteriano se prepararon dos matraces (A y B) por cepa de trabajo, los cuales contenían 250 mL de medio de cultivo. Para poder conocer la cantidad necesaria de inóculo para cada matraz se tomaron 5 mL de cultivo con inóculo y se leyó su absorbancia a 600 nm; dato que permite aplicar la Ecuación 1 para conocer el volumen de inóculo necesario.

$$OD_1 \cdot V_1 = OD_2 \cdot V_2$$

$$V_1 = \frac{0,05(250)}{Abs\ 600} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Según el valor obtenido en la ecuación se retiró dicha cantidad de los 250 mL de medio de cultivo y se añadió esta misma cantidad de inóculo. Una vez inoculadas las 2 cepas de trabajo en caldo nutriente se tomaron muestras desde el día 1 hasta el día 5, durante cuatro horas definidas cada día (7 am -10 am -13 pm -16 pm). Para evaluar el crecimiento se tomó una muestra de 5 mL de cada inóculo con el fin de medir la absorbancia con un espectrofotómetro a 600 nm.

Debido al tiempo prolongado de crecimiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno se inocularon dos matraces, de la siguiente forma:

Matraz A: inóculo a las 8 am en el día 1.

Matraz B: inóculo a las 16 pm en el día 1.



*Figura 4.* Incubación de cepas bacterias F5, PD en caldo nutriente.

#### 4.2.6. Curva de crecimiento en medio de cultivo alternativo a base de melaza

Para la preparación del inóculo se formuló un medio alternativo a base de melaza utilizado por Castro, 2014 con algunas variaciones. El medio a base de melaza está formado por  $15 \text{ g L}^{-1}$  de melaza, 1 L agua destilada,  $0.17 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl;  $0.10 \text{ g L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ ;  $0.0082 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4$ ;  $3.5 \text{ g L}^{-1}$  de extracto de levadura;  $5.0 \text{ g L}^{-1}$  de agua peptona y  $0.05 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$ , se verificó que el pH del medio sea neutro para poder trabajar con el mismo. Con las cepas de trabajo F5 y PD se preparó un inóculo inicial en este medio alternativo, y se repitió el mismo proceso aplicado para evaluar el crecimiento bacteriano en caldo nutriente. Para la evaluación del crecimiento en este medio se trabajó con 100 mL de medio alternativo, dejándolo incubar por 3 días con agitación y  $28^\circ\text{C}$ , como se observa en la Figura 5.



Figura 5. Incubación de cepas bacterianas F5, PD en medio a base de melaza.

#### 4.3. Evaluación estadística de los resultados

Se utilizó la prueba t de Student para contrastar el crecimiento bacteriano obtenido en los distintos tratamientos. Para el procesamiento de datos se utilizó el software estadístico IBM SPSS Statistics 23.

## 5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Aislamiento de muestra del suelo de *Polylepis australis* y *Rosa* sp.

En la Figura 6 se aprecia las colonias obtenidas de las distintas muestras de suelo M1, M2 y M3 con respecto a su selección basada en las características morfológicas mencionadas en la metodología. Se pudo obtener un total de 10 cepas de trabajo, de las cuales 4 provienen de M1, 3 de M2 y 3 de M3; de las cuales por características morfológicas de interés se ensayó con las colonias de la muestra M1. Este hecho puede estar relacionado con el pH que presenta el suelo, ya que plantas como *Polylepis australis* se desarrollan en suelos alcalinos (pH neutro a levemente alcalino que oscila entre 7- 8), lo que permite que mayor cantidad de microorganismos fijadores de nitrógeno, como las bacterias, se desarrollen (Almeida, 2011; Ojeda, Toledo, Hernández, Machado, & Furrázola, 2015). Por ejemplo se cita a la especie fijadora de nitrógeno, *Azospirillum doebereineriae*, cuyo crecimiento y mecanismo de acción son óptimos en un pH entre 6 a 7.8 (Cárdenas et al., 2010).

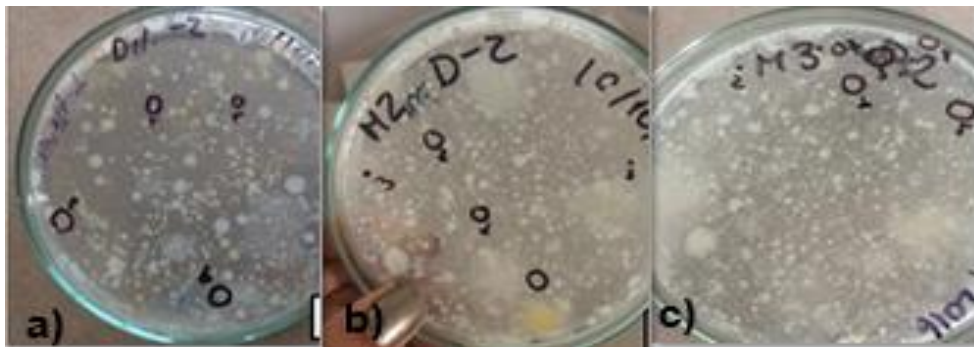


Figura 6. Selección de colonias bacterias, para su posterior aislamiento en medios selectivos.

- a) muestra M1.
- b) muestra M2.
- c) muestra M3.

## 5.2. Aislamiento e identificación bacteriana

En la Figura 7 se puede observar las 10 cepas de trabajo seleccionadas en los distintos medios de cultivo, las que se obtuvieron a partir de la siembra y aislamiento de las colonias de las muestras M1, M2, M3. Las características de estas colonias se describen en la Tabla 2, a partir de estas se pudo confirmar la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno de interés.

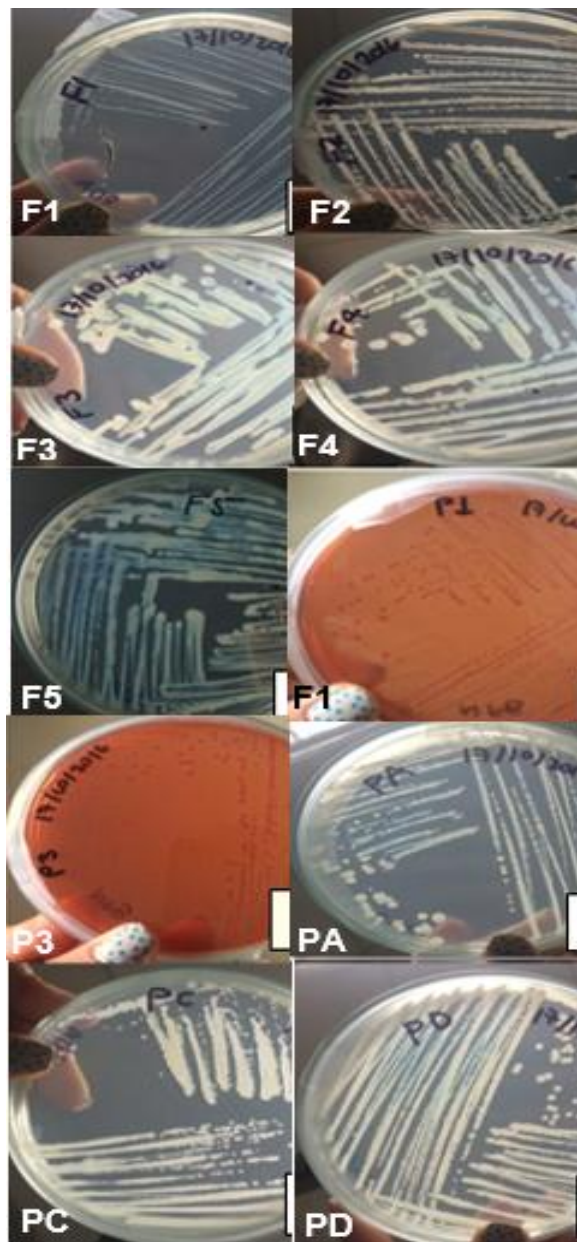
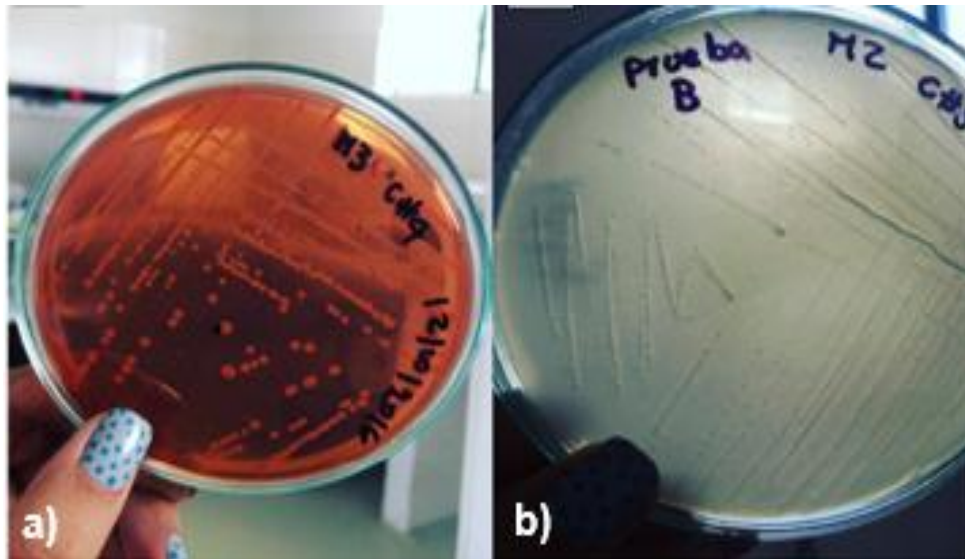


Figura 7. Cepas de trabajo en distintos medios de cultivo.



En la Figura 8 se muestra las características macroscópicas del crecimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno en medios selectivos Ashby y NFB adicionado con rojo congo.



*Figura 8.* Crecimiento de bacterias en medios selectivos.  
a) *Azospirillum* en medio NFB adicionado con rojo congo.  
b) *Azotobacter* en medio Ashby.

Tabla 2.

*Caracterización macroscópica de cepas bacterianas de trabajo en diferentes medios de cultivo.*

<b>CEPA</b>	<b>PDA</b>	<b>Ashby</b>	<b>NFB con Rojo Congo</b>
<b>F1</b>	Colonias redondas, pequeñas, con borde azul	Crecimiento nulo	Crecimiento nulo
<b>F2</b>	Colonias blancas, bordes irregulares	Colonias muy pequeñas, transparentes	Colonias pequeñas, redondas de color rojo opaco
<b>F3</b>	Colonias color crema con borde azul	Crecimiento nulo	Crecimiento leve
<b>F4</b>	Colonias color crema con borde azul	Crecimiento nulo	Crecimiento leve, coloración rosa-blanca
<b>F5</b>	Colonias crema color crema con borde azul	Crecimiento leve	Colonias redondas color rojo escarlata – crecimiento abundante
<b>P1</b>	Colonias color crema, borde azul	Crecimiento nulo	Colonias redondas pequeñas de color rojo escarlata
<b>P3</b>	Colonias blancas redondas de tamaño mediano, con borde azul.	Crecimiento nulo	Colonias rosa- rojas pequeñas
<b>PA</b>	Colonias grandes con forma de quiste, borde irregular, coloración blanca – crema	Crecimiento leve	Colonias pequeñas de color rosa - blanco
<b>PC</b>	Colonias redondas color crema – amarillo	Crecimiento abundante, colonias pequeñas transparentes	Colonias color rojo oscuro
<b>PD</b>	Colonias color crema – blanco con borde azul	Crecimiento abundante	Crecimiento leve, color rosa - blanco

El uso de medios selectivos específicos libres de nitrógeno permitió el crecimiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno de interés, como el medio Ashby que permite el crecimiento del género bacteriano *Azotobacter*, mostrando colonias redondas de aspecto transparente (Murumkar, Borkar, & Chimote, 2013; Moreno & Galvis, 2013). Tal como se muestra en el trabajo de Villacorta, 2013 en el crecimiento *Azotobacter* en Ashby presenta colonias viscosas color crema y transparentes; coincidiendo con el trabajo realizado por Sarmiento et al., 2013, donde se muestra el crecimiento de colonias viscosas con relieve, transparentes y de color crema en medio Ashby. Los resultados de los autores citados coinciden con los obtenidos en particularmente en la cepa F2, PC y PD de la presente investigación (Tabla 2), pues las cepas mencionadas forman colonias con aspecto transparente por lo que se presumiría que es *Azotobacter*.

El medio NFB adicionado con rojo congo es otro medio selectivo libre de nitrógeno que permite el crecimiento de bacterias del género *Azospirillum* en las cuales se evidencian colonias redondas, medianas o grandes, de bordes lisos y de color: rojo escarlata, rojo oscuro o rosa, debido a la capacidad que tienen las bacterias de absorber el colorante y teñirse de este color (Charris et al., 2011). En el trabajo realizado por Rueda et al., 2016 en medio NFB para *Azospirillum* obtiene colonias con las mismas características antes mencionadas. Las cepas F2, F4, F5, P1, P3, PA, PC y PD (Tabla 2) coinciden con las características de color obtenidas por los autores mencionados por lo que el género obtenido en la presente investigación sería *Azospirillum*.

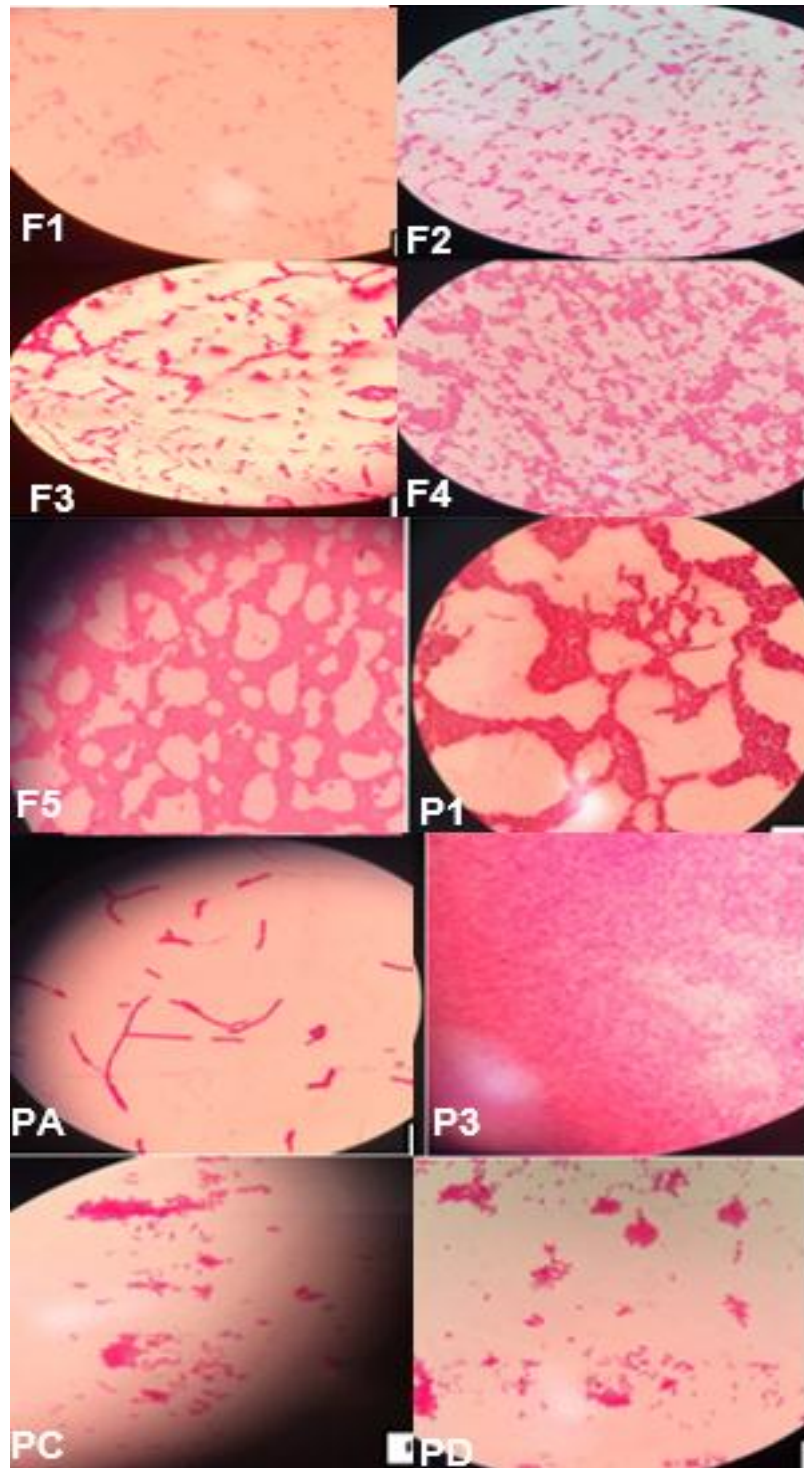
*Azospirillum* es una bacteria aerobia que en medio PDA crece formando colonias redondas de color blanco o rosa (NAIP, 2012). Por otro lado Pérez & Casas, 2005; Almeida, 2011; obtienen también colonias con las mismas características antes descritas. Se puede apreciar particularmente que las cepas F2, P3 y PA concuerdan con las descripciones dadas por los autores citados, por lo que los microorganismos obtenidos pertenecerían al grupo de las bacterias de fijadoras de nitrógeno.

En un estudio realizado por Gonzales, 2015 se emplearon medios selectivos específicos (Ashby y NFB), se ejecutaron pruebas morfológicas y análisis moleculares y se identificaron bacterias fijadoras de nitrógeno (*Azotobacter* y *Azospirillum*) aisladas a partir de los suelos de maíz en Loja. Las cepas P1, F5, PD y PC aisladas en el presente estudio presentaron características macroscópicas de colonias rojas o transparentes según el medio selectivo con presencia de mucosidad en algunos casos y sin irregularidad en los bordes resultado que concuerda con lo obtenido en la investigación citada.

### **5.3. Pruebas bioquímicas**

#### **5.3.1. Tinción Gram**

Los resultados de la tinción Gram realizada a las cepas aisladas en PDA en la presente investigación muestran diversas morfologías a nivel microscópico, dentro de estos se pueden identificar: bacilos alargados y cortos, a manera de cadena o red, además se pueden evidenciar la presencia de cocos, y a su vez la combinación de estas dos formas morfológicas (Figura 9). De las 10 cepas aisladas 9 fueron Gram negativas F1, F2, F3, F4, F5, P1, PA, PC, PD (coloración rosa), y una fue Gram positiva P3 (coloración morada). En la Figura 9 y Tabla 3 se pueden identificar las características descritas anteriormente. Las bacterias Gram negativas se caracterizan por tener una pared más rígida y una capa de mucopéptido más delgada que las bacterias Gram positivas, lo cual le permite retener el colorante que da la coloración rosa – fucsia, lo que se produce porque no se retiene en el citoplasma el complejo formado por el colorante cristal- violeta y el lugol ya que este es extraído por acción del alcohol acetona, dejando así incoloro al citoplasma permitiendo la acción del colorante fucsina sobre el mismo (López et al., 2014).



*Figura 9.* Resultado de tinción Gram enfocado en aumento 1000X (100X lente objetivo y 10X lente ocular).

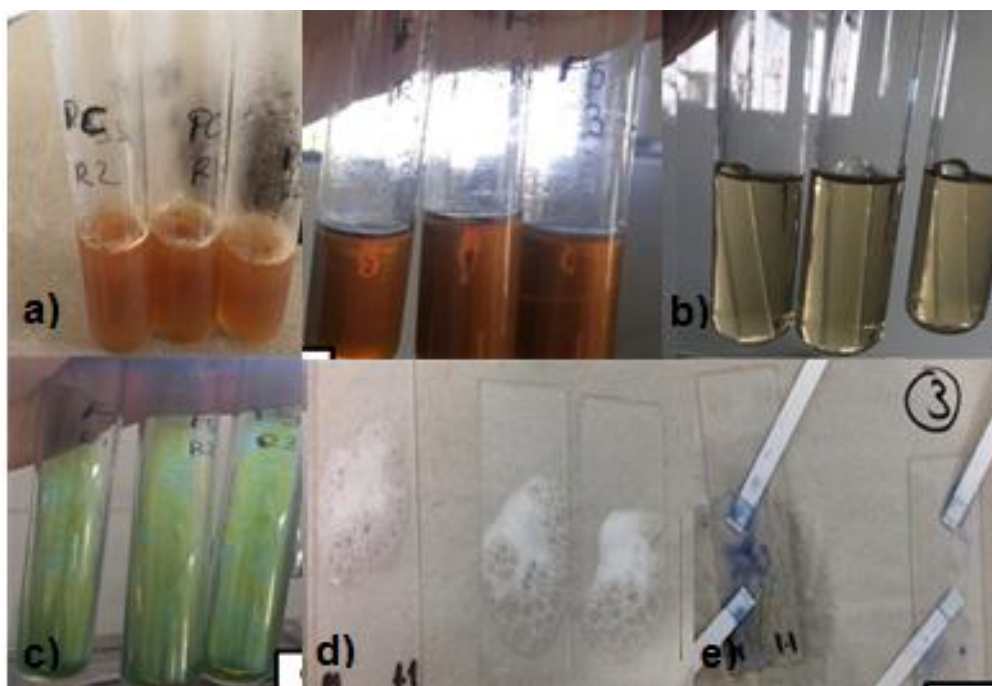
En el aislamiento de microorganismos fijadores de nitrógeno a partir de suelos productores de maíz realizado por Gonzales, 2015 se pudo observar a nivel microscópico que el crecimiento de los microorganismos para el género *Azotobacter* se presentaba a manera de bacilos y cocos, mostrando además que la forma de los bacilos podía ser larga o corta. Estos resultados se pudieron obtener al realizar una tinción Gram, lo cual también indicó que estos microorganismos eran Gram negativos al igual que los microorganismos aislados en la presente investigación. A pesar de que los resultados que se obtienen en este trabajo muestran la formación agrupaciones a manera de cadena o red, se coincide con los resultados antes mencionados por el autor.

Mientras, en el 2011 en un estudio realizado por Massena, Santos, & Pedraza para ver el potencial que tiene *Azospirillum* como promotor del crecimiento de las plantas durante su caracterización, se pudo determinar a nivel microscópico la presencia de bacterias Gram negativas al realizar una tinción Gram lo que concuerda con lo obtenido en la presente investigación. En otros trabajos en los que también se realiza aislamiento a partir del suelo de bacterias fijadoras de nitrógeno también muestran resultados similares a los antes mencionados como es el caso de Escobar, Horna, Carreño, & Mendoza, 2011, en el cual obtienen bacterias Gram negativas con una morfología de bacilos grandes al realizar la caracterización de cepas nativas del género *Azotobacter*.

Se confirmó esta morfología también con el trabajo de León & Rojas en el 2015, donde se presentan bacilos grandes y gruesos al realizar tinción Gram en bacterias fijadoras de nitrógeno pertenecientes al género *Azotobacter* con potencial promotor para el crecimiento vegetal, aislado de maíz también. Otro de los resultados que se muestran en esta investigación es la morfología de cocos en bacterias Gram negativas, que coinciden con el estudio realizado por Sarmiento et al., 2013.

### 5.3.2. Pruebas Bioquímicas

En la Figura 10 y Tabla 3 se puede observar las características macroscópicas de los resultados de las distintas pruebas bioquímicas realizadas.



*Figura 10.* Resultados de pruebas bioquímicas.

- a) medio SIM.
- b) caldo lactosa.
- c) citrato.
- d) prueba catalasa.
- e) prueba oxidasa.

Tabla 3.

*Resultados de pruebas bioquímicas y morfológicas.*

CEPA DE TRABAJO	GRAM	CATALASA	CITRATO	INDOL	MOTILIDAD	OXIDASA	LACTOSA
<b>F1</b>	-	+	+-	-	+	+	-
<b>F2</b>	-	+	+-	-	+	+	-
<b>F3</b>	-	+	+-	-	+	+	-
<b>F4</b>	-	+	+-	-	+	+	-
<b>F5</b>	-	+	+-	-	+	+	-
<b>P1</b>	-	+	+-	-	+	+	-
<b>P3</b>	+	+	+-	-	-	+	-
<b>PA</b>	-	-	+-	-	+	+	-
<b>PC</b>	-	+	+-	-	+	+	-
<b>PD</b>	-	+	+-	-	+	+	-

Como se muestra en la Tabla 3 y Figura 10 (E), la prueba de oxidasa muestra resultados positivos para las 10 cepas de trabajo ensayadas, resultado que se evidencia cuando tiene lugar el proceso de oxidación, cambiando la coloración de la tira de blanca a azul. Se puede determinar que las bacterias evaluadas tienen la capacidad de utilizar el oxígeno en la producción de energía, lo que se debe principalmente a que estos microorganismos poseen un citocromo C oxidasa (Koneman, Giovanniello, Klajn, & Preciado, 2008).

En la prueba de catalasa se pueden determinar resultados positivos para 9 de las cepas de trabajo excepto la cepa PA la cual fue negativa, como se muestra en la Tabla 3 y Figura 10 (D). La prueba de catalasa es positiva en la mayor



parte de bacterias aerobias, lo que se evidencia mediante el desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno por acción que tiene la enzima catalasa sobre el peróxido de hidrógeno descomponiéndolo en oxígeno y agua (Koneman et al., 2008).

Para determinar las bacterias que poseen la capacidad de usar el citrato como su única fuente de carbono y el uso de sales de amonio como fuente de nitrógeno, se utiliza la prueba de citrato. Esta prueba posee un indicador de pH que se torna de un color verde a azul, lo que permite conocer si el resultado es positivo o negativo (Britania, 2015). En la presente investigación los resultados para la prueba de citrato son positivo – negativos debido a que se evidencia el crecimiento de las bacterias en el medio y también por la coloración que adquieren con los dos colores anteriormente mencionados, resultado que se muestra en la Tabla 3 y Figura 10 (C). Mediante el resultado obtenido en dicha prueba no se puede determinar si las bacterias fijadoras de nitrógeno tienen la capacidad de usar el citrato como fuente de carbono y las sales amoniacaes como fuente de nitrógeno. Esto debido a que las 10 cepas de trabajo mantuvieron tanto el color verde como el azul durante las 48 horas ensayadas, y además durante 7 días más (tiempo de constatación de resultados).

Mediante la prueba indol en medio SIM se puede detectar la presencia de la enzima triptofanasa, lo cual se manifiesta por la formación de un halo sobre la muestra. En esta prueba bioquímica se da la degradación del triptófano debido a la liberación del indol presente en la muestra bacteriana por acción de la enzima triptofanasa, la cual se manifiesta por acción del reactivo Kovac, formando un halo incoloro – amarillo en la muestra cuando el resultado es negativo (Britania, 2011).

A partir de la descripción mencionada se pudo identificar que las 10 cepas de trabajo si presentaron la formación de un halo sin cambiar la coloración en el medio, estableciéndose un resultado negativo para la prueba de indol como se muestra en la Tabla 3 y Figura 10 (A) Además, en el medio SIM se puede

verificar la motilidad de las bacterias por el crecimiento expandido del lugar de siembra que se observa en la Figura 10 (A). Para este caso 9 de las cepas bacterianas de trabajo muestran resultado positivo para esta prueba a excepción de la P3 la cual generó un resultado negativo como se aprecia en la Tabla 3.

En el trabajo realizado por Radif & Hassan, 2014 para ver la capacidad que tiene *Azospirillum brasiliense* para producir enzimas hidrolíticas aisladas a partir de suelos en plantas como trigo, arroz y cebada, se caracterizaron bacterias fijadoras de nitrógeno a partir de sus características morfológicas en microscopio y por pruebas bioquímicas, obteniendo resultados negativos para la prueba lactosa e indol, y positivos en oxidasa y catalasa. Dichos resultados mencionados para el estudio de Radif & Hassan, 2014 , concuerdan con los obtenidos en la presente investigación, en donde todas las cepas de trabajo fueron positivas para oxidasa y catalasa (excepto la cepa PA en la prueba de catalasa) y negativas para la prueba de indol y lactosa.

Además, los resultados de la presente investigación también se relacionan con los obtenidos por Jiménez, 2007 donde se logró un resultado positivo para la prueba de oxidasa y catalasa, resultados que se obtuvieron al aplicar métodos bioquímicos y moleculares (restricción del ADN ribosomal 16S) para la identificación de cepas nativas colombianas de *Azotobacter*. Sin embargo, los resultados del autor antes mencionado difieren con los de la presente investigación en la motilidad de los microorganismos debido a que en el trabajo citado se evidencia la ausencia de motilidad en las distintas especies del género *Azotobacter*, mientras en la presente investigación 9 cepas de trabajo presentaron motilidad.

En este caso es importante mencionar que en la presente investigación se identificó por género bacteriano y no por especie y por ello la diferencia en cuanto a motilidad, caso que se corrobora con el estudio realizado por Radif & Hassan, 2014. Adicionalmente, según NAIP, 2012 y Moreno, Rojas, & Bonilla,

2011 el género bacteriano *Azotobacter* puede o no presentar motilidad, lo cual depende de la especie con la que se esté trabajando.

El estudio que más se correlaciona con los resultados de la presente investigación es el realizado por Pérez & Casas, 2005 en el cual se puede ver que los resultados de las pruebas morfológicas y bioquímicas aplicadas para la caracterización de cepas comerciales de *Azospirillum* usadas para evaluar la interacción con cultivos de caña de azúcar indican resultados positivos para la prueba: oxidasa y catalasa, citrato positivo-negativo, indol negativo, lactosa negativo, además de que las bacterias presentan motilidad.

La evaluación del efecto de *Azospirillum* spp y *Azotobacter* spp sobre el desarrollo de la fresa en sistemas hidropónicos sometidos a distintos niveles de nitrógeno realizada por Rueda et al. en el 2016 respalda los resultados obtenidos, al aplicar técnicas de identificación morfológica a nivel microscópico y macroscópico empleando pruebas bioquímicas. Mostrando así la similitud del resultado positivo para la prueba catalasa, y a su vez se ve la variación del resultado positivo-negativo para la prueba Indol con el resultado obtenido en la presente investigación. En base a los resultados de morfología y pruebas bioquímicas que se muestran en esta investigación se puede inferir que el aislamiento e identificación de las bacterias fijadoras de nitrógeno pertenecen al género bacteriano *Azospirillum* y *Azotobacter*, inferencia que se hace en base a las características descritas en el trabajo de Charris et al., 2011 y Rasool, Asghar, Jamil, & Rehman, 2015.

A partir de estos resultados se clasificaron las cepas según la similitud de características morfológicas y criterio basado en bibliografía de López et al., 2014; Rueda et al. en el 2016; Charris et al., 2011 y Rasool et al., 2015, obteniendo así cuatro cepas de trabajo definitivas, dos para el género *Azospirillum* (F5, P1) y dos para el género *Azotobacter*. (PC, PD), de las cuales se seleccionó una al azar, F5 para el primer caso y PD en el segundo y con las mismas se evaluó el crecimiento en distintos medios de cultivo (caldo nutriente y medio alternativo a base de melaza).

#### 5.4. Crecimiento bacteriano en Caldo Nutriente y Medio Alternativo a base de Melaza

A continuación se muestra el crecimiento bacteriano de las cepas de trabajo F5 y PD, en caldo nutriente durante su incubación por 5 días a 28°C, y el crecimiento bacteriano en un medio alternativo formulado a base de melaza, durante una incubación de 3 días a 28°C con agitación.

En la Tabla 4 se muestra que el medio alternativo formulado a base de melaza permite un eficaz crecimiento para las bacterias fijadoras de nitrógeno *Azotobacter* y *Azospirillum* con valores de absorbancia de 1.175 nm y 0.809 nm, respectivamente medido en un rango de tiempo de 0 a 53 h. Por el contrario, para el caldo nutriente el crecimiento es menor dentro de un mayor rango de tiempo, donde se obtuvo valores de absorbancia de 0.590 nm y 0.685 nm para las cepas F5 y PD, respectivamente.

Tabla 4.

*Promedio del crecimiento de la bacteria Azospirillum (cepa F5) y la bacteria Azotobacter (cepa PD) en caldo nutriente y medio alternativo formulado a base de melaza.*

Cepa de trabajo	Medio de cultivo	Tiempo (h)	Absorbancia (nm)
<b><i>Azospirillum</i> sp. (F5)</b>	Caldo nutriente	0 - 100	0.590
<b><i>Azotobacter</i> sp. (PD)</b>	Caldo nutriente	0 - 100	0.685
<b><i>Azospirillum</i> sp. (F5)</b>	Melaza	0 - 53	1.175
<b><i>Azotobacter</i> sp. (PD)</b>	Melaza	0 - 53	0.809

Por otro lado, ensayos en los que se utiliza melaza para el crecimiento de microorganismos como el realizado por Aguilar et al., 2015 evaluando el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en un medio a base de melaza suplementado con fósforo y nitrógeno para evitar deficiencia de los mismos, muestran que este subproducto es excelente para producir biomasa de *S. cerevisiae*. Además, en el trabajo realizado por Contreras, López, Reyes, & Cárdenas, 2011, en el cual usan la melaza como caldo fermentador para los microorganismos *Sphingomonas paucimobilis* y *Bacillus megaterium*, se evidenció el incremento de la producción bacteriana, proyectando el uso de este desecho a una producción a gran escala; esto se debe a que las bacterias utilizan la melaza como fuente de carbono por tanto de energía incrementando de esta forma el crecimiento (Gallardo & Matus, 2007). La bibliografía mencionada corrobora el resultado obtenido en cuanto a la existencia de una diferencia entre el crecimiento bacteriano del género *Azospirillum* y *Azotobacter*, mostrando en la presente investigación que el crecimiento de los microorganismos fijadores de nitrógeno tienen un mejor desarrollo en un medio alternativo a base de melaza que en caldo nutriente.

Se puede observar en la curva de crecimiento de *Azospirillum* en caldo nutriente (Figura 11A) se encuentran en un estado de latencia durante las primeras 16 h alcanzando la fase exponencial entre las 20 a 82 h de incubación, manteniéndose en fase estacionaria de las 82 a 92 h y finalmente decayendo el crecimiento bacteriano a partir de las 92 h de incubación.

En el caso de la misma bacteria en el medio alternativo a base de melaza el estado de latencia tiene lugar dentro de las primeras 4 h, alcanzando la fase exponencial del microorganismo entre las 6 a 47 h de incubación, manteniéndose en fase estacionaria por 3 h, y finalmente decayendo el crecimiento bacteriano a partir de las 49 h de incubación, tal como se muestra en la Figura 11(B).

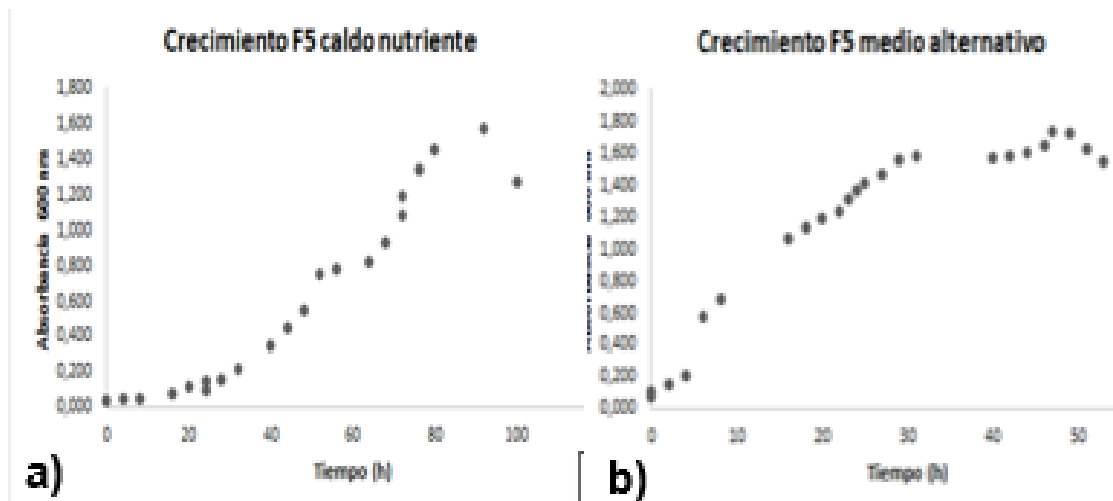


Figura 11. Cinética de crecimiento de la cepa bacteriana *Azospirillum* (F5).

a) Crecimiento en caldo nutriente.

b) Crecimiento en medio alternativo a base de melaza.

Para el caso de *Azotobacter*, se puede identificar que el estado de latencia en el crecimiento de los microorganismos en caldo nutriente (Figura 12A) se produce en las primeras 8 h y la fase exponencial se alcanza aproximadamente entre las 16 a 82 h de incubación, manteniéndose en fase estacionaria alrededor de las 82 a 88 h y reduciéndose el crecimiento bacteriano a partir de las 92 h de incubación.

En el crecimiento en medio alternativo a base de melaza del mismo género de bacteria, las 6 primeras horas se da el estado de latencia, mientras que la fase exponencial se produce entre las 8 a 32 h de incubación. La fase estacionaria tiene lugar entre las 32 a 40 h y el crecimiento bacteriano decae a partir de las 46 h de incubación, tal como se muestra en la Figura 12(B).

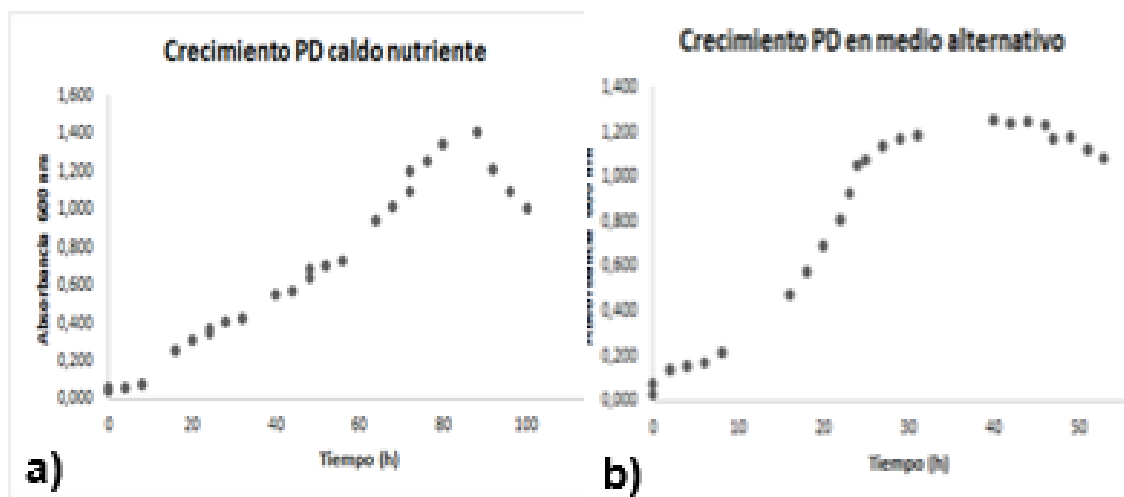


Figura 12. Cinética de crecimiento de la bacteria *Azotobacter* (PD).

a) Crecimiento en caldo nutriente.

b) Crecimiento en medio alternativo a base de melaza.

En la Tabla 5 se puede observar los resultados obtenidos al comparar el crecimiento de cada cepa de trabajo, tanto en caldo nutriente como en medio alternativo a base de melaza, aplicando una prueba t-Student.

Tabla 5.

Resultado de la prueba t-Student al comparar el crecimiento bacteriano en distintos medios de cultivo.

Cepa de Trabajo	Valor t	Grados de libertad (gl)	Valor P
<b><i>Azospirillum</i> sp. (F5)</b>	-3.702	44.992	0.001
<b><i>Azotobacter</i> sp. (PD)</b>	-0.987	47.355	0.329

Con un nivel de significancia de 0.05 en la prueba t- Student el contraste para los medios de cultivo a base de melaza y caldo nutriente muestran que en la cepa de trabajo F5 se obtiene un valor  $P= 0.001$ , lo cual indica que existe una diferencia significativa entre la absorbancia a 600 nm entre los medios antes mencionados. En el caso de la cepa de trabajo PD se obtiene un valor  $P$  de 0.329, lo cual indica que no se presenta una diferencia significativa para la misma variable en los medios de cultivo evaluados.

Por otro lado, otro factor que influye en el crecimiento bacteriano, además de la formulación del medio alternativo, es la agitación que se le brinda al inóculo. Este proceso promueve la transferencia de nutrientes, genera una distribución de aire óptima, homogeniza todos los elementos que conforman el medio de cultivo y mejora la asimilación de los mismos (Pedraza, Pérez, Cortés, & Arias, 2011; Contreras et al, 2011). Por lo que al evaluar medios alternativos suplementados con estos elementos nutricionales con agitación, tal como se realizó en la presente investigación, se ve que hay un mejor aprovechamiento de las fuentes nutricionales teniendo una mayor producción de células viables y de biomasa.

Se pudo ver en términos generales que el tiempo en el que las bacterias fijadoras de nitrógeno *Azotobacter* y *Azospirillum* aisladas en la presente investigación alcanzan la fase exponencial es dentro de las 8 - 47 h de incubación, en medio alternativo a base de melaza y entre 16 a 80 h en caldo nutritivo, determinando así que la fase de mayor interés para la producción a gran escala es la exponencial. Este interés es debido no sólo al corto tiempo en el que se alcanza la fase exponencial, sino que esto implica mayor biomasa y rendimiento bacteriano, como lo demuestra el trabajo realizado por Trejo, 2012, en donde la generación de productos extra celulares y el máximo crecimiento de *Azotobacter vinelandii* en medio Burk modificado se da en la fase exponencial. Este estudio permite corroborar los resultados de la presente investigación, pues el máximo crecimiento bacteriano y el tiempo que se alcanza la fase exponencial se dio en un periodo de 20 a 82 horas para



*Azospirillum* (absorbancia de 1.450 nm) y de 16 a 82 horas para *Azotobacter* (absorbancia de 1.350 nm), ambos en caldo nutriente.

Por otra parte, Hernández et al., 2012 probó diversas fuentes de carbono para la producción masiva de *Azotobacter* sp, determinando que el tratamiento con melaza para la formulación de un medio alternativo presenta la mayor concentración bacteriana en la fase exponencial a las 24 h además de presentar la más alta velocidad específica de crecimiento. De esta manera, se corrobora la similitud con la presente investigación, pues el género *Azotobacter* como *Azospirillum* presentan un porcentaje de crecimiento bacteriano de 96.51 % y 95.51 %, respectivamente mayor durante la fase exponencial en este medio alternativo a base de melaza en comparación del crecimiento en caldo nutritivo donde se presentó un porcentaje menor en un rango de tiempo mayor (95.33 % y 90.21 % para ambos géneros bacterianos, respectivamente).

Los resultados que se muestran al evaluar el crecimiento bacteriano realizado por Cotoa, 2012 constatan la proximidad a los obtenidos en el presente estudio en cuanto al desarrollo de las fases de crecimiento de los microorganismos fijadores de nitrógeno, teniendo que la fase de latencia se da entre las 4 a 11 h para llegar a la fase exponencial Otro de los aislados bacterianos de microorganismos fijadores de nitrógeno de la investigación del mismo autor presentó un comportamiento distinto, notando que la fase de adaptación se da durante las 5 primeras horas de incubación, dentro de las 6-18 h se da la fase exponencial y la muerte celular se da a las 23 h de haber iniciado el cultivo, llegando a una producción máxima de 15 h del cultivo casi al final de la fase exponencial (Cotoa, 2012).

## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1. Conclusiones

Mediante la aplicación de medios selectivos específicos, pruebas morfológicas y bioquímicas se pudo aislar e identificar bacterias fijadoras de nitrógeno pertenecientes al género bacteriano *Azotobacter* y *Azospirillum* a partir del suelo de *Polylepis australis* y *Rosa* sp.

Las pruebas macroscópicas, morfológicas y bioquímicas permitieron aislar, identificar y obtener 4 cepas de bacterias de trabajo, 2 pertenecientes al género *Azotobacter* y 2 pertenecientes al género *Azospirillum*.

En la cinética de crecimiento de la bacteria F5 perteneciente al género *Azospirillum* la fase exponencial se produce entre las 20 a 82 h en caldo nutriente mientras que en medio alternativo a base de melaza se da entre 6 a 47 h. En la cinética de crecimiento de la bacteria PD referente al género *Azotobacter*, el punto máximo de su fase exponencial está entre las 16 a 82 h en caldo nutriente, mientras que en medio alternativo a base de melaza se produce entre las 8 a 32 h de incubación.

El medio alternativo formulado en base a melaza muestra ser eficaz para el crecimiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno, donde se alcanzó una absorbancia de 1.175 nm para *Azospirillum* y de 0.809 nm para el género *Azotobacter* en un tiempo de 0 a 53 h. A diferencia del caldo nutriente donde se logró una absorbancia menor que en el caso de *Azospirillum* fue de 0.590 nm y con *Azotobacter* de 0.685 nm dentro de rango de tiempo mayor (0 a 100 h).

### 6.2. Recomendaciones

Identificar las cepas bacterianas con técnicas moleculares para establecer las especies correspondientes a los géneros estudiados en la presente investigación.

Probar medios alternativos a base de desechos como el suero de leche para contrastar los resultados obtenidos con el medio a base de melaza. De esta manera se podría determinar según la cinética de crecimiento y costo, la opción más rentable para una producción a gran escala.

Evaluar la cinética de crecimiento aplicando técnicas directas e indirectas como la gravimetría (peso seco) y la densidad óptica, para determinar con precisión el comportamiento de los microorganismos de interés.

Realizar ensayos de formulación y producción de un biofertilizante conformado por un consorcio bacteriano con capacidad de incrementar la disponibilidad y absorción de nutrientes para de esta forma promover el desarrollo vegetativo en distintos cultivos y que sea aplicado de forma directa en el suelo o en la semilla.

## REFERENCIAS

- Aguilar, J., Espinoza, M., & Cabanilla, J. (2015). Evaluación de la cinética de crecimiento de *saccharomyces cerevisiae* utilizando un medio de cultivo a base de melaza de caña y suero lácteo. *Agroind Sci*, 5(1), 37-47. Doi: 10.17268/agroind.science.2015.01.04
- Ahmadi-Rad, S., Gholamhoseini, M., Ghalavand, A., Asgharzadeh, A., & Dolatabadian, A. (2016). *Foliar application of nitrogen fixing bacteria increases growth and yield of canola grown under different nitrogen regimes*. *Rhizosphere*, 9-22. doi: 10.1186/1754-6834-6-140
- Almario, F., Mojica, P., & Cuéllar, S. (2014). *Tecnologías Relacionadas con Biofertilizantes*. Bogotá: Banco de patentes SIC. Recuperado el 12 de Mayo de 2017 de <https://issuu.com/quioscosic/docs/biofertilizantes>
- Almeida, E. (2011). *Ficha Técnica Cepa Azotobacter chroococcum*. Tolima: BioCultivos. Recuperado el 13 de Septiembre de 2016 de <http://www.biocultivos.com.co/dctos/Ficha+Tecnica+Azotobacter+Chroococcum.pdf>
- Arcos, C. (2015). *Pro Ecuador-Ministerio de Comercio Exterior*. Flores Ecuatorianas. Recuperado el 09 de Mayo de 2017 de <http://www.proecuador.gob.ec/exportadores/sectores/flores/>
- Acuña, O. (2011). *La Fijación Biológica de Nitrógeno: el Caso de la Caña de Azúcar*. Costa Rica: Centro de Investigaciones Agronómicas . Recuperado el 11 de Diciembre 2016 de <http://redi.uta.edu.ec/bitstream/123456789/12943/1/BQ.%2071.pdf>
- Armenta, A., García, C., & Camacho, R. (2010). Biofertilizantes en el Desarrollo Agrícola De México. *Ra Ximhai*, 6(1), 51-56. Recuperdo el 23 de Noviembre de 2016 de <http://4www.redalyc.org/articulo.oa?id=46112896007>

- Baca, B., Soto, L., & Pardo, P. (2000). Fijación biológica de nitrógeno. *Elementos de Ciencia y Cultura*, 38(4), 43-49. Recuperado el 15 de Octubre de 2016 de [https://www.researchgate.net/profile/Beatriz\\_Baca/publication/26419291\\_Fijacion\\_biologica\\_de\\_nitrogeno/links/5425d0990cf2e4ce9406f744/Fijacion-biologica-de-nitrogeno.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Beatriz_Baca/publication/26419291_Fijacion_biologica_de_nitrogeno/links/5425d0990cf2e4ce9406f744/Fijacion-biologica-de-nitrogeno.pdf)
- Baldani, J., & Baldani, V. (2005). *History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 77(3), 549-579. doi: <http://dx.doi.org/10.15580/GJAS.2013.2.010313354>
- Bhattacharjee, R., & Singh, A. (2008). *Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. Appl Microbiol Biotechnol*, 80, 199-209. doi: 10.1007/s00253-008-1567-2
- Boua, G., Fernández, A., García, C., Sáez, J., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 29(8), 601–608. doi:10.1016/j.eimc.2011.03.012
- Britania. (2011). *Indol Reactivo*. Caba-Argentina: Laboratorios Britania S.A. Recuperado el 02 de Marzo de 2017 de [http://www.britanialab.com/productos/180\\_hoja\\_tecnica\\_es.pdf](http://www.britanialab.com/productos/180_hoja_tecnica_es.pdf)
- Britania. (2015). *Simmons Citrato Agar*. Caba-Argentina: Laboratorios Britania S.A. Recuperado el 27 de Abril de 2017 de <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/simmonscitagar.htm>
- Cardenas, D., Garrido, M., Bonilla, R., & Baldani, V. (2010). Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. en pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) del Valle del Cesar. *Pastos y Forrajes. Pastos y Forrajes*, 33(3), 10-23. Recuperado el 10 de Febrero de 2017 de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03942010000300005&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942010000300005&lng=es&tlng=es).

- Carranza, F., Rivera, P., Chaves, C., & Arias, M. (2013). Análisis bacteriológico del arroz con leche expendido en el Área Metropolitana de Costa Rica. *Journal of the Costa Rican Distance Education University*, 5(2), 289-295. doi: 10.1016/j.syapm.2004.12.007.
- Casado, C., Torrico, G., & Medina, M. (2012). *Medios de Cultivo UIDE*. Buenos Aires: INTA. Recuperado el 26 de Noviembre de 2017 de <http://repositorio.uide.edu.ec/bitstream/37000/410/1/T-UIDE-0389.pdf>
- Castro, D. (2014). "Evaluación preliminar de soportes para la producción de inoculantes de *Azotobacter* spp bajo condiciones de laboratorio e invernadero, tumbaco, Pichincha." universidad central del ecuador-facultad de ciencias agrícolas. Recuperado el 02 de Marzo de 2017 de: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/2470/1/T-UCE-0004-54.pdf>
- Castro, J., Burgos, G., & Parra, K. (2012). "*Diagnóstico y Propuesta de Negocio Para el Cultivo de Mora Orgánica en El Municipio Del Colegio*". Bogotá. Recuperado el 23 de Abril de 2017 de <http://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/1032432167-2013.pdf>
- Cercenado, E., & Cantón, R. (2010). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Montevideo: Seimc. Recupero el 16 de Diciembre del 2016 de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia17.pdf>
- Charris, S., Parada, V., Rivera, K., & Acevedo, C. (2011). Caracterización de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno de Buchones de Agua *Eichhornia Crassipes* Ubicados en la Universidad de Santander. *Microbiología Industrial*, 5(2), 35-42. Recuperado el 09 de Octubre de 2017 de <https://timoncar.jimdo.com/ecolog%C3%ADa-microbiana/>
- Contreras, B., López, S., Reyes, J., & Cárdenas, D. (2011). Producción de un inoculante a base de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Grupo de Investigación Ambiente y Vida, 16(2), 20-29. doi: 10.1007/BF00010355.

Cotoa, K. (2012). Selección de bacterias con capacidad promotora de crecimiento en frijol a partir del banco microorganismos de la rizósfera CIIDIR 003. Sinaloa: Centro Interdisciplinario de investigación para el desarrollo integral regional. Recuperado el 03 de Diciembre de 2017 de <http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/13059/Karla%20Cota%20Ochoa.pdf?sequence=1>

Cuadra, P. (2010). Organismos fijadores de nitrógeno en Leguminosas de Navarra. Pamplona: Universidad Pública de Navarra. Recuperado el 12 de Septiembre de 2016 de [http://www.unavarra.es/herbario/leguminosas/htm/organismos\\_fijadores\\_L.htm](http://www.unavarra.es/herbario/leguminosas/htm/organismos_fijadores_L.htm)

Devine, G., Eza, D., Ogusuku, E., & Furlong, M. (2008). Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Revista Peruana Medicina Experimental Salud Publica*, 25(1), 74-100. doi: 10.1128/AEM.66.2.783-787.2000.

Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones. (2015). Flores de verano. Pro ecuador. Recuperado el 19 de Septiembre de 2017 de [http://www.proecuador.gob.ec/wpcontent/uploads/2015/06/PROEC\\_AS2015\\_FLORES\\_VERANO.pdf](http://www.proecuador.gob.ec/wpcontent/uploads/2015/06/PROEC_AS2015_FLORES_VERANO.pdf)

Escobar, C., Horna, Y., Carreño, C., & Mendoza, G. (2011). Caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* spp. y su efecto en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill. "tomate" en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 2(1), 39-49. Recuperado el 25 de Abril de 2016 de <http://w.redalyc.org/articulo.oa?id=357633697005>

Espín, G. (2012). Biología de *Azotobacter vinelandii*. En G. Espín, *CIFN* (págs. 67-82). Cuernavaca: UNAM. Recuperado el 29 de Noviembre de 2016 de <http://www.scielo.org.mx/pdf/tl/v32n4/2395-8030-tl-32-04-00273>

- Ferré, C., Ferrán, L., & Jacob, J. (2011). Evaluación de la utilidad de la tinción de Gram esputo para el manejo de la neumonía en urgencias. *IDIBELL*, 23(2), 108-111. doi: 10.1002/jobm.201000342.
- Gallardo, J., & Matus, L. (2007). *Aplicación de la inmovilización celular en el desarrollo de un producto de interés agronómico*. Instituto Politécnico Nacional - Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. Recuperado el 07 de Enero de 2017 de <http://www.protcuem.gob.mx/swb/work/models/economia/Resource/1363/1/images/ANEXO3A-OFERTAACADEMICANACIONAL.pdf>
- González, A., Hernandez, M., & Fócil, R. (2014). Detección y caracterización de bacterias fijadoras de nitrógeno de un suelo cultivado con *Eucaliptus* sp. *KUXULKAB*, 10(39), 25-32. doi: 10.15446/rev.colomb.biote
- Gonzalez, R. (2015). *Aislamiento y Caracterización de Bacterias Diazotróficas del Género Azotobacter, y su Efecto Sobre el Crecimiento y Desarrollo en Maíz, Variedad Iniap 182, en la Estación Experimental la Argelia*. Loja: Universidad Nacional de Loja Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables. Recuperado el 20 de Abril de 2017 de <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/12274>
- Haro, S., & Perales, J. (2015). Cinética de consumo de nutrientes y crecimiento de un bloom de microalgas en un fotobiorreactor High Rate Algae Pond (HRAP). *Tecnol. cienc. agua*, 6(3), 15-31. Recuperado el 23 de Septiembre de 2016 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=353541047002>
- Hernández, M., Córdova, Y., Ojeda, M., Gómez, S., Martínez, G., & Ruiz, D. (2012). "Evaluación de Inoculantes para el Crecimiento Máximo de Bacteria Fijadora de Nitrógeno". México, D. F: X Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular. doi: 10.1094/MPMI.2001.14.3.358.



- Hernández, T., & García, C. (2015). Bacterias fijadoras de nitrógeno en agricultura, alternativa al uso de fertilización nitrogenada inorgánica. Salamanca: Investigación y Desarrollo Agroalimentario. Recuperado el 19 de Noviembre de 2016 de <http://www.ideagro.es/index.php/noticias/78-bacterias-fijadoras-de-nitrogeno-en-agricultura-alternativa-al-uso-de-fertilizacion-nitrogenada-inorganica>
- Jiménez, D. (2007). Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de *Azotobacter* sp. Mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal 16S. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana Microbiología Industrial. Recuperado el 05 de Marzo de 2017 de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis14.pdf>
- Koneman, E., Giovanniello, O., Klajn, D., & Preciado, M. (2008). Introducción a la microbiología: Parte I. En Diagnóstico Microbiológico (págs. 38,39,40,611, 613). Buenos Aires: Panamericana. Recuperado el 17 de Enero de 2017 de <https://books.google.fr/books?id=Nxb3iETuwpIC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
- Lara, C., Alvarez, A., & Oviedo, L. (2013). Impacto de Inoculación con la Bacteria Nativa *Azospirillum* sobre *Oryza sativa* L. en Córdoba–Colombia. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(2), 37-45. Recuperado el 18 de Septiembre de 2016 de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1692-35612013000200005&script=sci\\_abstract&lng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1692-35612013000200005&script=sci_abstract&lng=es)
- León, L., & Rojas, L. (2015). Determinación del potencial promotor del crecimiento vegetal de *Azotobacter* spp. aislados de la rizósfera de malezas en cultivos de maíz (*Zea mays* L.). *Scientia Agropecuaria*, 6(4), 247 – 257. Recuperado el 22 de Noviembre de 2016 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=357643270002>

- León, D., Calderón, B., Martínez, A., Sánchez, E., & Zulatto, A. (2013). Formulación y optimización de un medio de cultivo económico para *Lactobacillus* con potencial probiótico aislado del pulque. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria*, 12(2), 133-144. doi: 10.1016/0038-0717(80)90021-8.
- López, L., Hernández, M., Colín, C., Silvestre Ortega, G. C., & Franco, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *CENIAQ*, 3(1), 10-18. doi: 10.1038/nbt960.
- López, M., Martínez, R., Brossard, M., Bolívar, A., Alfonso, N., Alba, A., & Pereira, H. (2010). Efecto de Biofertilizantes Bacterianos sobre el Crecimiento de un Cultivar de Maíz en Dos Suelos Contrastantes Venezolanos. *Agronomía Tropical*, 58(4), 391-401. Recuperado el 20 de Diciembre de 2016 de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342012000200006&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342012000200006&lng=es&tlng=es).
- Mantilla, A., Cardona, G., Peña, C., Murcia, U., Rodríguez, M., & Zambrano, M. (2010). Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia colombiana. *Revista de Biología Tropical*, 4(57), 915-927. doi: 10.15446/rev.colomb.biote
- Martínez, E. (2011). Perspectivas de investigación en microbiología. En M. General, *CIFN* (págs. 56-58). Cuernavaca: UNAM. Recuperado el 17 de Marzo de 2017 de <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/informes/Informe2002.pdf>
- Massena, V., Santos, R., & Pedraza, R. (2011). *What Is Expected from the Genus Azospirillum as a Plant Growth-Promoting Bacteria*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 9(2), 123-137. doi: 10.1073/pnas.89.12.5685.

- Mayz, J. (2010). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista Científica UDO Agrícola*, 4(1), 1-20. Recuperado el 04 de Octubre de 2017 de <http://udoagricola.orgfree.com/V4UDOAg/V4UDOAg.pdf>
- Moreno, L., & Galvis, F. (2013). Potencial biofertilizante de bacterias diazótrofes aisladas de muestras de suelo rizosférico. *Pastos y Forrajes*, 36(1), 33-37. doi: 10.15446/acag
- Moreno, A., Rojas, D., & Bonilla, R. (2011). Aplicación de diseños estadísticos secuenciales en la identificación de fuentes nutricionales para *Azotobacter chroococcum* AC1. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 11(2), 151-158. doi: 10.1099/ijs.0.038075-0
- Murumkar, D., Borkar, S., & Chimote, V. (2013). *Diversity for Cell Morphology, Nitrogenase Activity and DNA Profile of Azospirillum species present in Rhizosphere Soils of Six Different Physiographic Regions of Maharashtra. Journal of Biotechnology*, 8(4), 16-25. doi: 10.1093/molbev/msr121
- NAIP. (2012). *Beneficial Microorganisms In Agriculture*. Colorado: B.Sc Agriculture. Recuperado el 20 de Enero de 2017 de [https://www.fsa.usda.gov/Internet/FSA\\_File/naip\\_info\\_sheet\\_2015.pdf](https://www.fsa.usda.gov/Internet/FSA_File/naip_info_sheet_2015.pdf)
- Ojeda, L., Toledo, L., Hernández, C., Machado, Y., & Furrázola, E. (2015). Influencia de la aplicación de *Azospirillum lipoferum* en *Megathyrsus maximus* vc. guinea tobiatá en un suelo Pardo Grisáceo. *Pastos y Forrajes*, 39(1), 27-31. Recuperado el 13 de Diciembre de 2016 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=269145163003>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura . (Febrero de 2015). *Nuevas opciones para suelos sanos*. El uso de fertilizantes sobrepasará los 200 millones de toneladas en 2018. Recuperado el 25 de Marzo de 2017 de <http://www.fao.org/news/story/es/item/277654/icode/>

- Ossa, J., Vanegas, M., & Badillo, Á. (2010). Evaluación de la Melaza de Caña como Sustrato para el Crecimiento de *Lactobacillus Plantarum*. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 13(1), 97-104. doi: 10.1007/BF01734359
- Packialakshmi, N., & Riswana, A. (2014). *Comparative Study of Vermicast and Charcoal Used as a Carrier Inoculums to the Biofertilizer Preparation*. *BMR Biotechnology*, 1(1), 1-6. Recuperado el 25 de Octubre de 2016 de [http://bmrjournals.com/uploads/89f1fc857b2b3b76a01abc2cd963869216f98044a508dc1e521863df7473a593/Manuscript/2016-07-15\\_04-21-08-AMBT14%2005.pdf](http://bmrjournals.com/uploads/89f1fc857b2b3b76a01abc2cd963869216f98044a508dc1e521863df7473a593/Manuscript/2016-07-15_04-21-08-AMBT14%2005.pdf)
- Pajares, S. (03 de Mayo de 2016). *Oikos*. La cascada del nitrógeno ocasionada por actividades humanas. Recuperado el 04 de Febrero de 2017 de [http://web.ecologia.unam.mx/oikos3.0/index.php?option=com\\_content&view=article&id=185:nitrogeno-y-actividades-humanas&catid=8:articulos&Itemid=150](http://web.ecologia.unam.mx/oikos3.0/index.php?option=com_content&view=article&id=185:nitrogeno-y-actividades-humanas&catid=8:articulos&Itemid=150)
- Paredes, M. C. (2013). *Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas*. Buenos Aires: Universidad Católica Argentina, Facultad de Ciencias Agrarias. Recuperado el 16 de Septiembre de 2016 de <http://web.ecologia.unam.mx/oikos3.0/index.php/articulos/de-la-milpa-a-la-mesa/8-articulos/185-nitrogeno-y-actividades-humanas>
- Pedraza, A., Pérez, • M., Cortés, I., & Arias, L. (2011). Evaluación de un Biofermento de Preparación Local para el Abonamiento Orgánico del Tomillo (*Thymus vulgaris*), Romero (*Rosmarinus officinalis*) y Orégano (*Origanum vulgare*). *Universidad Militar Nueva Granada*, 7(1), 10-31. doi: 10.1093/sysbio/20.4.406.
- Pérez, J., & Casas, M. (2005). Estudio De La Interacción Planta-Azospirillum en el Cultivo Caña De Azúcar (*Saccharum sp.*). *Cultivos Tropicales*, 26(4), 15-19. Recuperado el 05 de Marzo de 2017 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193216160002>

- Perilla, M. (2003). *Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo*. Georgia: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades Atlanta. Recuperado el 30 de Enero de 2017 de [http://www.who.int/drugresistance/infosharing/WHO-CDS\\_CSR\\_RMD\\_2003\\_6\\_Manual\\_Laboratorio.pdf](http://www.who.int/drugresistance/infosharing/WHO-CDS_CSR_RMD_2003_6_Manual_Laboratorio.pdf)
- Placencia, R. (2013). *Asociación de cepas fijadoras de nitrógeno de vida libre, con recursos genéticos de pastos para zonas áridas*. Texcoco: Investigación de Ciencias Agrícolas. Recuperado el 13 de Febrero de 2017 de [http://www.biblio.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/10521/2139/1/Plascencia\\_Jimenez\\_R\\_MC\\_Ganaderia\\_2013.pdf](http://www.biblio.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/10521/2139/1/Plascencia_Jimenez_R_MC_Ganaderia_2013.pdf)
- Radif, H., & Hassan, S. (2014). *Detection of hydrolytic enzymes produced by Azospirillum brasiliense isolated from root soil*. *World Journal Of Experimental Biosciences*, 2(2), 36-40. doi: 2313-3937
- Ramirez, P. (2015). *El ciclo de la vida y los microbios - arquitecto del universo. Rhizobium, plantas y nitrógeno*. Recuperado el 24 de Abril de 2017 de <http://microbiosjuansiguenza.blogspot.com/2015/01/31-rhizobium-plantas-y-nitrogeno.html>
- Rasool, L., Asghar, M., Jamil, A., & Rehman, S. (2015). *Identification Of Azospirillum Species From Wheat Rhizosphere*. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 25(4), 1018-7081. Recuperado el 13 de Marzo de 2017 de <http://www.thejaps.org.pk/docs/v-25-04/24.pdf>
- Rueda, D., Valencia, G., Soria, N., Rueda, B., Manjunatha, B., Kundapur, R., & Selvanayagam, M. (2016). *Effect of Azospirillum spp. and Azotobacter spp. on the growth and yield of strawberry (Fragaria vesca) in hydroponic system under different nitrogen levels*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(1), 48-54. doi: 10.7324/JAPS.2016.600108

- Rustrián, E., Ramírez, D., & Solano, G. (2013). Estudio preliminar de identificación bioquímica de Enterobacterias en heces de Coyote (*Canis latrans*) en vida salvaje. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria*, 12, 121-132. doi: 10.2307/2408678
- Samuel, C., Mepivoseth, C., Raúl, C., Cristian, L., Juan, P., José, V., & Sergio, S. (2013). Fijación biológica de nitrógeno por cuatro fabáceas en suelos ácidos de Tabasco, México. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo*, 1(45). Recuperado el 01 de Noviembre de 2016 de [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1853-86652013000100001&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1853-86652013000100001&lng=es&tlng=es).
- Sánchez, Y. (2009). La fijación biológica de nitrógeno por microorganismos; su importancia en la agricultura y conservación del medio ambiente. *CIENCIACIERTA*. Recuperado el 20 de Octubre de 2016 de <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/CienciaCierta/CC19/CC19fijacion.html>
- Sanjuán, J., & Moreno, N. (2010). Aplicación de insumos biológicos: una oportunidad para la agricultura sostenible y amigable con el medioambiente. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1), 4-7. Recuperado el 17 de Enero de 2017 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77617786001>
- Sant'Anna, F., Luiz, A., Cecagno, R., Luciano, R., Franciele, S., Maicon, M., Irene, S. (2011). *Genomic insights into the versatility of the plant growth-promoting bacterium Azospirillum amazonense*. *BMC Genomics*, 12(409), 1-14. doi:10.1186/1471-2164-12-409
- Sarmiento, Y., Hazel, A., & Cárdenas, D. (2013). Evaluación de la estabilidad de *Trichoderma* sp. y *Azotobacter* sp. conservados por diferentes métodos. *Rev. Colomb. Biotecnología*, 15(1), 150-158. doi: 10.15446/rev.colomb.biote

- Teixeira, H., & Rodríguez, S. (2016). *Identification of symbiotic nitrogen-fixing bacteria from three Africanleguminous trees in Gorongosa National Park. Systematic and Applied Microbiology*, 36(1), 350-358. doi: 10.1016/j.syapm.2016.05.004
- Trejo, A. (2012). *Influencia de la tensión de oxígeno disuelto sobre la síntesis y actividad de las alginato liasas extracelulares de Azotobacter vinelandii*. Xalapa: Universidad Veracruzana - Facultad De Ingeniería Química. Recuperado el 23 de Septiembre de 2016 de [http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJOS/A\\_REA\\_V/OV-3.pdf](http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJOS/A_REA_V/OV-3.pdf)
- Vaitauskien, K., Šarauskisa, E., Naujokien, V., & Liakasb, V. (2015). *The nitrogen-fixing bacteria accumulate nitrogen from the air. One part of the nitrogen is used by the bacteria for maintenance and growth, one part of the nitrogen enters the soil in a readily available form for plants, and the final part of the accumula*. Recuperado el 11 de Abril de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2137115/pdf/ehp0115-a0579a.pdf>
- Velazco, J., Araque, M., & Araujo, E. (2013). *Clinica, Bacteriología- Bioanálisis. CODEPRE*. Recuperado el 20 de Diciembre de 2014 de [http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/37247/1/talento\\_humano\\_ff\\_b.pdf](http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/37247/1/talento_humano_ff_b.pdf)
- Villacorta, S. (2013). *Efecto de Azotobacter chroococcum y Bradyrhizobium yuanmingense sobre el crecimiento de Capsicum annum L. var longum "páprika" en condiciones de Laboratorio*. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo Facultad de Ciencias Biológicas. Recuperado el 04 de Abril de 2017 de <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/3682>
- Yanet, P., & Cueva, F. (2010). *Potencialidades de Azospirillum como inoculante para la agricultura. Cultivos Tropicales*, 3(10), 31-41. Recuperado el 21 de Diciembre 2016 de <http://www.redalyc.org/pdf/1932/193218120004.pdf>

Yu, X., Liu, X., Zhu, T.-H., Liu, G.-H., & Mao, C. (2012). Co-inoculation with phosphate-solubilizing and nitrogen-fixing bacteria on. ELSEVIER, 112-117. doi: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v15n2.36303>



