


	<b>GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS</b>					  	
	<b>CARTA DE AUTORIZACIÓN</b>						
<b>CÓDIGO</b>	<b>AP-BIB-FO-06</b>	<b>VERSIÓN</b>	<b>1</b>	<b>VIGENCIA</b>	<b>2014</b>	<b>PÁGINA</b>	<b>1 de 1</b>

Neiva, 11 de enero de 2017

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Ciudad

El (Los) suscrito(s):

Andrea Natalia Joven Quevedo, con C.C. No. 1.075.275.057, Maudi Sorley Medina Orjuela, con C.C. No. 1.075.277.320 autor (es) de la tesis y/o trabajo de grado Titulado Caracterización de microorganismos fijadores de nitrógeno en suelos productivos del municipio de Rivera, Huila, presentado y aprobado en el año 2017 como requisito para optar al título de Ingeniero Agrícola, autorizo (amos) al Centro de Información y Documentación de la Universidad Surcolombiana para que, con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

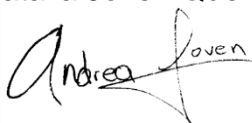
- Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales “open access” y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.
- Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.
- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que, de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores” , los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

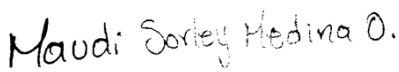
Andrea Natalia Joven Quevedo





Maudi Sorley Medina Orjuela

Firma:



Firma:



	<b>GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS</b>				  		
	DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO						
<b>CÓDIGO</b>	<b>AP-BIB-FO-07</b>	<b>VERSIÓN</b>	<b>1</b>	<b>VIGENCIA</b>	<b>2014</b>	<b>PÁGINA</b>	<b>1 de 4</b>

**TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO:**

Caracterización de microorganismos fijadores de nitrógeno en suelos productivos del municipio de Rivera, Huila

**AUTOR O AUTORES:**

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Jove Quevedo	Andrea Natalia
Medina Orjuela	Maudi Sorley

**DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:**

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Torrente Trujillo	Armando
Orduz Tovar	Sergio Andrés





**ASESOR (ES):**

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Girón Hernández	Lunier Joel
Arévalo Hernández	John Jairo

**PARA OPTAR AL TÍTULO DE:** Ingeniero Agrícola

**FACULTAD:** Ingeniería

**PROGRAMA O POSGRADO:** Agrícola

	<b>GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS</b>					  	
	<b>DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO</b>						
<b>CÓDIGO</b>	<b>AP-BIB-FO-07</b>	<b>VERSIÓN</b>	<b>1</b>	<b>VIGENCIA</b>	<b>2014</b>	<b>PÁGINA</b>	<b>2 de 4</b>

**CIUDAD:** Neiva **AÑO DE PRESENTACIÓN:** 2017 **NÚMERO DE PÁGINAS:** 71

**TIPO DE ILUSTRACIONES** (Marcar con una X):

Diagramas\_x\_ Fotografías\_x\_ Grabaciones en discos\_\_\_ Ilustraciones en general \_x\_ Grabados\_\_\_ Láminas\_\_\_  
 Litografías\_\_\_ Mapas\_\_\_ Música impresa\_\_\_ Planos\_x\_ Retratos\_\_\_ Sin ilustraciones\_\_\_ Tablas o  
 Cuadros\_x\_

**SOFTWARE** requerido y/o especializado para la lectura del documento:

- Pdf

**MATERIAL ANEXO:**

- Tablas
- Graficas

**PREMIO O DISTINCIÓN** (En caso de ser LAUREADAS o Meritoria):

**PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:**

	<u>Español</u>	<u>inglés</u>
1.	Fijación asimbiótica del nitrógeno	Asymiotic fixation of nitrogen
2.	<i>Azotobacter</i>	<i>Azotobacter</i>
3.	Maracuyá	Passion fruit
4.	Cacao	Cocoa
5.	Bacterias promotoras de crecimiento (PGPR)	Growth promoting bacteria (PGPR)
6.	Ciclo del nitrógeno	Nitrogen cycle
7.	Nitrogenasa	Nitrogenase
8.	Pruebas bioquímicas	Biochemical tests
9.	Rizosfera	Rhizosphere
10.	Biofertilizantes	Biofertilizers

**RESUMEN DEL CONTENIDO:** (Máximo 250 palabras)

Los microorganismos son el componente más importante del suelo y los responsables de la dinámica de transformación y desarrollo del mismo. Es por ello, que en el presente estudio se evaluó el efecto de parámetros fisicoquímicos del suelo en dos cultivos (cacao y



## GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS

### DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO



CÓDIGO

AP-BIB-FO-07

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

3 de 4

maracuyá, localizados en el municipio de Rivera-Huila) sobre el crecimiento de bacterias diazótrofes, como también se determinó la incidencia de las cepas bacterianas A2.T y B.2.D sobre el crecimiento de plántulas de maracuyá (durante los 15-35 días del desarrollo vegetativo), determinando las variables de diámetro y altura del tallo, número de hojas, longitud de la raíz principal, peso fresco y seco total; y mediante ANOVA multifactorial se analizaron los datos. Para esto, se tomaron 5 muestras compuestas por cultivo, de las que se obtuvieron 10 morfotipos a los se les determinó su morfología celular y de las colonias, producción de pigmentos, catalasa, oxidasa, indol, y caracterización por kit BD BBL Crystal E/NF. Los resultados mostraron bacterias catalasa y oxidasa positivo, Gram negativas con morfología coco y bacilar, agrupados en cadenas y sarcinas, presencia del mucilago y producción de pigmentos café y amarillo. Por matriz de correlación se relacionó el recuento en placa (UFC/g) en medio Ashbys Mannitol Agar, encontrándose que el porcentaje de carbono (0.94) y azufre (0.8) fue el parámetro de mayor influencia en la presencia de diazótrofes en maracuyá y cacao respectivamente. La cepa A2.T-1 generó un estímulo en el aumento de la altura del tallo (8%) de las plántulas con respecto al testigo.

**ABSTRACT:** (Máximo 250 palabras)

Microorganisms are the most important component of the soil and responsible for the dynamics of its transformation and development. Therefore, in the present study, the effect of soil physicochemical parameters in two crops (cacao and passion fruit, located in the municipality of Rivera-Huila) on the growth of diazotrophic bacteria was evaluated, as well as the incidence of Bacterial strains A2.T and B.2.D on the growth of passion fruit seedlings (during the 15-35 days of vegetative development), determining the variables of stem diameter and height, leaf number, main root length, Total fresh and dry weight; And the multivariate ANOVA was analyzed. For this, 5 samples composed by culture were taken, from which 10 morphotypes were obtained to determine their cellular and colony morphology, pigment production, catalase, oxidase, indole, and characterization by BD BBL Crystal E / NF. The results showed catalase and oxidase positive bacteria, Gram negative with coconut and bacillary morphology, grouped in chains and sarcines, presence of mucilage and production of brown and yellow pigments. By correlation matrix the plate count (UFC / g) in Ashbys Mannitol Agar medium was related, being that the percentage of carbon (0.94) and sulfur (0.8) was the parameter of greatest influence in the presence of diazotrophs in passion fruit and cacao respectively. The strain A2.T-1 generated a stimulus in the increase of the stem height (8%) of the seedlings with respect to the control.



## GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS

### DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO



**CÓDIGO**

**AP-BIB-FO-07**

**VERSIÓN**

**1**

**VIGENCIA**

**2014**

**PÁGINA**

**4 de 4**

#### APROBACION DE LA TESIS

Nombre Presidente Jurado: Armando Torrente Trujillo

Firma: 

Nombre Jurado: Joel Girón Hernández

Firma: 

Nombre Jurado: John Jairo Arévalo Hernández

Firma: 



**CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS FIJADORES DE NITRÓGENO EN SUELOS  
PRODUCTIVOS DEL MUNICIPIO DE RIVERA, HUILA**

**PRESENTADO POR:**

**ANDREA NATALIA JOVEN QUEVEDO  
MAUDI SORLEY MEDINA ORJUELA**

**DIRECTOR:**

**ARMANDO TORRENTE TRUJILLO**

**CODIRECTOR:**

**SERGIO ANDRES ORDUZ TOVAR**

**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
FACULTAD DE INGENIERIA  
PROGRAMA AGRICOLA  
NEIVA  
2017**



**CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS FIJADORES DE NITRÓGENO EN SUELOS  
PRODUCTIVOS DEL MUNICIPIO DE RIVERA, HUILA**

**Requisito como tesis de grado para optar el título de Ingeniero Agrícola**

**PRESENTADO POR:  
ANDREA NATALIA JOVEN QUEVEDO  
MAUDI SORLEY MEDINA ORJUELA**

**DIRECTOR:  
ARMANDO TORRENTE TRUJILLO**

**CODIRECTOR:  
SERGIO ANDRES ORDUZ TOVAR**

**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
FACULTAD DE INGENIERIA  
PROGRAMA AGRICOLA  
NEIVA  
2017**



## DEDICATORIA

### ANDREA NATALALIA JOVEN QUEVEDO

*A Dios por darme la fortaleza y sabiduría para culminar esta etapa de mi vida, a mis padres María Emilse Quevedo y Ever Alberto Joven les dedico todo mi esfuerzo en reconocimiento al sacrificio que han hecho para que yo pueda estudiar; a mi hermano Daniel a quien amo con todo mi corazón por llenar de alegría cada día de mi vida y a Fernando, que este sea uno de muchos logros que podamos compartir juntos. Los amo.*

### MAUDI SORLEY MEDINA ORJUELA

*A Dios, padre creador del universo, a mis padres Elena Orjuela Marroquín y Sixto Alfonso Medina Cruz por su amor y esfuerzo; a mi compañero de vida Jonathan Nogales Pimentel por ser luz, fortaleza y el motivo diario de felicidad, y a mis hermanos Maria Elena Medina Orjuela y Manuel Elkin Medina Orjuela por ser apoyo y fuerza incondicional.*





## AGRADECIMIENTOS

### ANDREA NATALALIA JOVEN QUEVEDO

*A nuestros directores de tesis Sergio Andrés Orduz y Armando Torrente Trujillo por su asesoría, apoyo, tiempo y confianza depositada en nosotras durante todo este proceso.*

*A toda mi familia a la quien amo y agradezco con todo el corazón el amor y el apoyo brindado, en especial a mi abuelita Olga por la confianza y la ayuda que me brindo para poder estudiar esta carrera.*

*Al hombre que amo Yeison Fernando Barrios R. por amarme tanto y creer en mí, por impulsarme a buscar nuevos retos, por enseñarme a tener más paciencia en todo este proceso y por ser una parte fundamental en mi vida y en el desarrollo de esta investigación.*

*A mi compañera de tesis Maudi por los buenos y los malos momentos que pasamos y por la paciencia y el apoyo brindado durante esta travesía que decidimos emprender juntas.*

*A todo equipo de laboratorio de Ciencias del Centro de Formación La Angostura por su colaboración para poder desarrollar este proyecto, en especial al ingeniero William torres por sus enseñanzas y confianza en todo el desarrollo de la investigación.*

*A mi equipo de trabajo del Laboratorito de Suelos de la Universidad Surcolombiana, en especial al ingeniero cesar bolívar por su amistad y por darnos la idea inicial del proyecto.*

*A nuestros jurados de tesis, Joel Girón Hernández y John Jairo Arévalo, por la colaboración brindada*

*A mis compañeros de clases y profesores de la universidad Surcolombiana, por su amistad, colaboración y enseñanza brindada en toda mi carrera universitaria.*

*Y a todas las personas que de alguna forma colaboraron para el desarrollo de nuestra tesis.*

*¡A TODOS INFINITAS GRACIAS!*



## **MAUDI SORLEY MEDINA ORJUELA**

*A Sergio Andrés Orduz por abrirnos las puertas hacia la investigación en el laboratorio de Ciencias del centro de formación La Angostura y su apoyo durante este proceso.*

*A Armando Torrente Trujillo por dirigir el camino durante este proceso.*

*A nuestros jurados de tesis, Joel Girón Hernández y John Jairo Arévalo, por el apoyo y colaboración brindada durante todo este proceso.*

*Al equipo de laboratorio de Ciencias del centro de formación La Angostura por permitirnos desarrollar este proyecto, en especial al ingeniero William por su apoyo incondicional.*

*Al laboratorito de suelos de la universidad Surcolombiana por brindarnos la posibilidad de desarrollar una fase del proyecto allí, facilitando los equipos y reactivos.*

*A mi compañera de tesis Natalia quien con sus palabras, colaboración y paciencia impulso el desarrollo de este proyecto.*

*A Jonathan Nogales quien con sus palabras, motivación y apoyo impulso el desarrollo del proyecto durante este proceso.*

*A mis compañeros de clases por su amistad y colaboración.*

## RESUMEN

Los microorganismos como parte viva son el componente más importante del suelo y los responsables de la dinámica de transformación y desarrollo del mismo. Un suelo fértil es aquel que contiene una reserva adecuada de elementos nutritivos disponibles para la planta, o una población microbiana que libere nutrientes como el nitrógeno que permitan un óptimo desarrollo vegetal. Es por ello, que en el presente estudio se evaluó como se ve afectado el crecimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno por las condiciones fisicoquímicas que presenta el suelo de dos coberturas vegetales (cacao y maracuyá) en el municipio de Rivera-Huila, como también se determinó el efecto generado en el crecimiento de plántulas de maracuyá por las cepas bacterianas A2.T y B.2.D.

Para tal fin se tomaron 5 muestras compuestas para cada cobertura, de las que se obtuvieron 10 morfotipos, a los cuales se les determinó su morfología celular y de las colonias, producción de pigmentos, catalasa, oxidasa, indol, y características de su metabolismo mediante el kit BD BBL Crystal E/NF; se relacionó el recuento en placa en el medio Ashbys Mannitol Agar de los microorganismos (UFC/g) con las características físicas y químicas del suelo mediante matriz de correlación, y por análisis de varianza simple (ANOVA) se observó a través de las medias de Fisher si se presentaban diferencias significativas en los parámetros evaluados entre los cultivos.

Así mismo, en el bioensayo se inocularon las cepas A2.T y B2.D en suelo estéril y se determinaron las variables biométricas de diámetro del tallo (DT), número de hojas (NH), altura del tallo (AT), longitud de la raíz principal (LR), peso fresco total (PF) y peso seco total (PS), durante el desarrollo vegetativo 1 (entre los días 15 a 35 días del ciclo fenológico) en plántulas de maracuyá. Se realizaron pruebas de ANOVA multifactorial para observar las interacciones de la incidencia en el crecimiento de las plantas con el tipo de tratamiento en el tiempo.

Los resultados mostraron bacterias catalasa y oxidasa positivo, Gram negativas con morfología coco y bacilar, agrupados en cadenas y sarcinas, algunas cepas produjeron pigmentos café y amarillo, y en las colonias se observó la presencia del mucilago de protección producido en las bacterias del género *Azotobacter*. Además se encontró que de las variables químicas determinadas en el cultivo de maracuyá el porcentaje de carbono fue el parámetro de mayor influencia (correlación 0.94) en la presencia de diazótrofos; en cuanto al cacao se obtuvo una correlación directa muy alta entre el crecimiento bacteriano con el azufre (0.8). La cepa A2.T-1 generó un estímulo en el aumento de la altura del tallo y el peso fresco total de las plántulas evaluadas en el bioensayo con respecto a las plántulas testigo en un 8 y 33.8% respectivamente.

**Palabras claves:** Fijación asimbiótica de nitrógeno, *Azotobacter*, Maracuyá, biofertilizantes, nitrogenasa.

## ABSTRACT

Microorganisms as a living part are the most important component of the soil and those responsible for the dynamics of its transformation and development. A fertile soil is one that contains a suitable reserve of nutrients available to the plant, or a microbial population that releases nutrients such as nitrogen that allow optimum plant development. This is why, in the present study, the growth of nitrogen-fixing bacteria was affected by the physicochemical conditions of the soil of two vegetable cover crops (cacao and passion fruit) in the municipality of Rivera-Huila, as well as Determined the effect generated in the growth of passion fruit seedlings by bacterial strains A2.T and B.2.D.

To this end, 5 composite samples were taken for each cover, from which 10 morphotypes were obtained, to which they were determined their cellular and colony morphology, pigment production, catalase, oxidase, indole, and characteristics of their metabolism through The BD BBL Crystal E / NF kit; The plaque count in the Ashbys Mannitol Agar medium of the microorganisms (UFC / g) was correlated with the physical and chemical characteristics of the soil by correlation matrix, and by simple variance analysis (ANOVA) was observed through the means of Fisher if there were significant differences in the parameters evaluated between the cultures.

In the bioassay, the strains A2.T and B2.D were inoculated in sterile soil and the biometric variables of stem diameter (DT), number of leaves (NH), stem height (AT), length of The main root (LR), total fresh weight (PF) and total dry weight (PS), during vegetative development 1 (between days 15 and 35 days of the phenological cycle) in passion fruit seedlings. Multivariate ANOVA tests were performed to observe the interactions of the incidence on plant growth with the type of treatment over time.

The results showed catalase and oxidase positive bacteria, Gram negative with coconut and bacillary morphology, grouped in chains and sarcines, some strains produced brown and yellow pigments, and in the colonies was observed the mucilage of protection produced in the bacteria of the genus *Azotobacter*. In addition, it was found that of the chemical variables determined in passion fruit culture, the percentage of carbon was the parameter of greatest influence (correlation 0.94) in the presence of diazotrophs; In cocoa, a very high direct correlation between bacterial growth and sulfur (0.8) was obtained. The A2.T-1 strain generated a stimulus in the increase of the stem height and the total fresh weight of the seedlings evaluated in the bioassay with respect to the control seedlings in 8 and 33.8% respectively.

**Keywords:** *Asbiotic fixation of nitrogen, Azotobacter, Passionflower, biofertilizers, nitrogenase.*

## TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN .....	14
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN .....	16
3. ANTECEDENTES.....	18
4. MARCO TEÓRICO .....	20
4.1. Maracuyá.....	20
4.2. Cacao.....	21
4.3. El Nitrógeno y las plantas .....	21
4.4. Rizósfera .....	22
4.5. Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN).....	23
4.6. Microorganismos fijadores de nitrógeno atmosférico.....	24
4.6.1. Microorganismos diazotróficos simbióticos .....	24
4.6.2. Microorganismos diazotróficos asimbióticos.....	25
4.7. Método de identificación y caracterización de microorganismos empleando kit BD BBL Crystal E/NF 25	
5. OBJETIVOS .....	28
5.1. Objetivo General .....	28
5.2. Objetivos Específicos.....	28
6. METODOLOGÍA .....	29
6.1. Lugar de muestreo.....	29
6.2. Muestreo del suelo .....	29
6.3. Procesamiento de muestras .....	30
6.3.1. Pruebas fisicoquímicas del suelo.....	30
6.3.2. Aislamiento primario de bacterias.....	35
6.4. Aislamiento secundario o Purificación.....	36
6.4.1. Crioconservación de cepas en caldo nutritivo con glicerol y skim milk al 30% .....	36
6.4.2. Pigmentación de los aislamientos.....	37
6.5. Caracterización macroscópica.....	37
6.6. Caracterización microscópica.....	37
6.7. Pruebas bioquímicas primarias.....	38
6.7.1. Catalasa .....	38
6.7.2. Oxidasa.....	38



6.7.3.	Prueba De Sulfuro Indol Movilidad (SIM) .....	39
6.8.	Caracterización bioquímica por kit BBL Crystal E/NF .....	39
6.9.	Evaluación de la incidencia de las cepas de microorganismos potencialmente fijadores de nitrógeno en el crecimiento de plántulas de maracuyá.....	39
6.9.1.	Preparación de los inóculos bacterianos.....	39
6.9.2.	Montaje del bioensayo con semillas de maracuyá .....	41
6.9.3.	Efecto de las bacterias con potencial promotor del crecimiento en plántulas de maracuyá.....	41
6.10.	Análisis estadístico de los datos .....	42
7.	RESULTADOS .....	43
7.1.	Porcentaje de recuperación método de terrón para bacterias fijadoras de nitrógeno .....	43
7.2.	Aislamiento y crecimiento de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno .....	43
7.3.	Caracterización de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre .....	44
7.4.	Relación de los parámetros fisicoquímicos del suelo con el crecimiento de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno .....	51
7.5.	Evaluación de la incidencia de las cepas de microorganismos potencialmente fijadores de nitrógeno en el crecimiento de plántulas de maracuyá.....	55
8.	CONCLUSIONES .....	60
9.	RECOMENDACIONES .....	61
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	62
11.	ANEXOS.....	67

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. a) Cultivo de <i>Passiflora edulis</i> en la finca La Sevilla. b) Fuente hídrica que abastece el cultivo de maracuyá. ....	20
Figura 2. Cultivo de <i>Theobroma cacao</i> en la finca La Sevilla. ....	21
Figura 3. Mecanismos implicados en el aumento de la disponibilidad y la absorción de nutrientes. Fuente: (Rengel y Marschner, 2005).....	22
Figura 4. Sistema BD BBL Crystal E/NF ID. a) tubo de fluido del inóculo b) bases y c) tapa del panel BD BBL Crystal E/NF.....	26
Figura 5. Puntos aleatorios en los lotes de cacao y maracuyá ubicados en la finca la Sevilla del municipio de Rivera. ....	29
Figura 6. Muestreo de suelo rizosférico de maracuyá (punto A1). a) Muestra de 575 gramos de suelo, b) Profundidad de muestreo, c) Transporte de las muestras en nevera de icopor.....	30
Figura 7. Montaje para la determinación de pH.....	31
Figura 8. a) Montaje para la determinación de fosforo en el suelo b) desarrollo del color con $\text{SnCl}_2$ , c) espectrofotómetro.....	31
Figura 9. Montaje para la determinación de carbono orgánico. ....	32
Figura 10. Montaje para determinación de azufre en suelos. ....	32
Figura 11. Montaje para la determinación de la CIC. ....	33
Figura 12. Montaje para la determinación de hierro. ....	33
Figura 13. Determinación de densidad aparente del suelo. ....	34
Figura 14. Picnómetro para la determinación de la densidad real del suelo. ....	35
Figura 15. Aislamiento por gránulos de suelo. a) Siembra de terrones en Ashbys Mannitol Agar, b) gránulos mucilaginosos después de incubación.....	35
Figura 16. Esquema del método de diluciones seriadas. ....	36
Figura 17. Representación esquemática de siembra por superficie.....	36
Figura 18. Representación esquemática de Siembra por triple estría.....	36
Figura 19. Criopreservación de cepas aisladas. a) Inoculación de cepas en caldo nutritivo con glicerol y skim milk, b) Freezer Wisd a $-80^\circ\text{C}$ . ....	37

Figura 20. Coloración en Ashbys Mannitol Agar de la cepa A2.T. ....	37
Figura 21. Porta objetos con colonias teñidas para ser observadas en microscopio. ....	38
Figura 22. Montaje prueba de catalasa.....	38
Figura 23. Prueba positiva de oxidasa.....	38
Figura 24. Prueba de Sulfuro Indol Movilidad (SIM). a) Montaje de la prueba, b) resultado negativo (-) para indol y c) resultado positivo para indol. ....	39
Figura 25. Montaje de preparación de solución con la cepa bacteriana a inocular. ....	40
Figura 26. Patrones de MacFarland.....	40
Figura 27. Curva de calibración de turbidez de MacFarland. ....	40
Figura 28. Montaje del bioensayo con semillas de maracuyá. ....	41
Figura 29. Evaluación del efecto de las bacterias con potencial promotor del crecimiento de maracuyá. ..	41
Figura 30. Porcentaje de recuperación por terrones para cada punto de muestreo. ....	43
Figura 31. Unidades formadoras de colonia por gramo de suelo (UFC/g) para cada punto de muestreo. ...	44
Figura 32. Morfología de la colonia de la cepa. ....	45
Figura 33. Medias e intervalos basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un 95% de confianza relacionando el crecimiento bacteriano con los parámetros químicos analizados a) pH, b) carbono, c) Capacidad de intercambio catiónico, d) fósforo, e) azufre, f) boro y g) hierro. ....	53
Figura 34. Medias e intervalos basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un 95% de confianza relacionando los parámetros de crecimiento evaluados en plántulas de maracuyá. a) Diámetro del tallo (DT), b) longitud de la raíz principal (LR), c) número de hojas (NH), d) peso fresco total (PF), e) altura del tallo (AT) y f) peso seco total (PS). ....	56
Figura 35. Variación de peso fresco total en plántulas de maracuyá para los diferentes tratamientos. ....	57
Figura 36. Variación del peso seco total en plántulas de maracuyá para los diferentes tratamientos. ....	57
Figura 37. Variación de la altura del tallo en plántulas de maracuyá para los diferentes tratamientos.....	58
Figura 38. Variación de la longitud de la raíz principal en plántulas de maracuyá para los diferentes tratamientos. ....	59



## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía del maracuyá.....	20
Tabla 2. Taxonomía del cacao.....	21
Tabla 3. Bacterias Fijadoras de nitrógeno.....	24
Tabla 4. Bacterias que forman asociaciones fijadoras.....	24
Tabla 5. Reactivos y principios empleados en el sistema E/NF ID BBL Crystal.....	26
Tabla 6. Morfología de las colonias encontradas para las cepas aisladas.....	45
Tabla 7. Pigmentación producida por las colonias en Ashbys Mannitol Agar.....	46
Tabla 8. Caracterización microscópica de la morfología bacteriana de las cepas potencialmente fijadoras de nitrógeno.....	46
Tabla 9. Resultado de pruebas bioquímicas primarias.....	48
Tabla 10. Resultados de la caracterización bioquímica por kit BBL CRYSTAL E/ NF.....	49
Tabla 11. Propiedades químicas del suelo evaluadas en los puntos de muestro para los cultivos de maracuyá y cacao.....	51
Tabla 12. Propiedades físicas del suelo evaluadas en los puntos de muestreo para los cultivos de maracuyá y cacao.....	51
Tabla 13. Matriz de correlación para los parámetros en el cultivo de maracuyá.....	52
Tabla 14. Matriz de correlación para los parámetros en el cultivo de cacao.....	54
Tabla 15. Concentración de microorganismos por turbidez de McFarland.....	55

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Medio Ashbys Mannitol Agar (Rao, 1977).....	67
Anexo 2. Caldo nutritivo para crioconservación de cepas de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno.....	67
Anexo 3. Pigmentación producida por las colonias en Ashbys Mannitol Agar.....	68
Anexo 4. Medio SIM (Oxoid™).....	69



Anexo 5. Registro fotográfico de los resultados en las reacciones generados por el comportamiento metabólico de las bacterias frente a los sustratos del kit BBL CRYSTAL E/ NF. ....69

**LISTA DE ECUACIONES**

Ecuación 1. Reacción general de fijación de nitrógeno, (Camelo, 2010) .....23

Ecuación 2. Porcentaje de recuperación de bacterias diazótrofes aerobias asimbióticas (Jiménez, 2007) ..35

Ecuación 3. Modelo matemático que relaciona el crecimiento microbiano de bacterias aisladas del cultivo de maracuyá en función de parámetros químicos del suelo. ....54

Ecuación 4. Modelo matemático que relaciona el crecimiento microbiano de bacterias aisladas del cultivo de cacao en función de parámetros químicos del suelo.....54

## 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente en el sector agrícola se emplean fertilizantes químicos para la incorporación artificial de nutrientes al suelo; no obstante, el abuso en la utilización de estos, genera residuos que producen daños en él, cómo salinización, compactación, mal drenaje, disminución de la biota y por tanto una reducción en la actividad microbiana implicada en la nutrición vegetal (Escobar, Horna, Carreño, y Mendoza, 2011), que con el paso del tiempo propicia una disminución en los rendimientos de los cultivos a causa del desequilibrio nutricional provocado en él (Lara, Liliana, y Oviedo, 2011).

Debido a que las plantas cuando crecen en condiciones naturales son colonizadas por diversas comunidades microbianas, muchos de estos microorganismos establecen relaciones no patogénicas microorganismo-planta, formando una asociación de manera natural en la rizosfera del suelo, e incluso pueden favorecer su crecimiento y resistencia a limitaciones bióticas (frente a patógenos) y abióticas (sequía, salinidad, etc.) (Pinilla y Sarmiento, 2010). Es por esto que la agricultura ecológica presenta una alternativa a la aplicación de fertilizantes químicos con uno de sus elementos más valiosos, los biofertilizantes; estos son preparados a partir de células latentes o vivas que cumplen funciones específicas en los cultivos, como por ejemplo, la descomposición de residuos orgánicos, la desintoxicación con plaguicidas, la supresión de enfermedades en las plantas, el aporte de nutrientes al suelo, la fijación biológica del nitrógeno (FBN) (Alfonso, Leyva, y Hernández, 2005) y la producción de compuestos bioactivos (V. R. Martínez, 2002).

El nitrógeno es un nutriente que su proceso de fijación está sujeto a una multiplicidad de cambios en sus formas químicas, fundamentalmente por la acción de los microorganismos del suelo. Aunque este elemento tiene efectos benéficos en la fertilidad y nutrición vegetal existe una preocupación por la acumulación de nitratos en las aguas subterráneas y superficiales debido a que aún se está aplicando el nutriente en forma química (Varela, Rueda, y Munevar, 2013).

A los microorganismos que fijan el nitrógeno atmosférico se les conoce como diazótrofos; estos han sido descritos y estudiados en microbiología de suelos y el desarrollo de productos biológicos comerciales desde el siglo pasado (Flores, Contreras, Reyes, y Rodríguez, 2012). Existen varios tipos de microorganismos que habitan en el suelo y fijan nitrógeno en condiciones aerobias, estas bacterias se encuentran dentro del phylum *Proteobacteria* y pertenecen a los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Derrxia*, *Azomonas* y *Beijerinckia* (Madigan, Martinko, y Parker, 1999); y entre las especies más utilizadas como biofertilizantes corresponden al género de *Azotobacter*, *Rhizobium* y *azospirillum*, las cuales se caracterizan por crecer en suelos con altos contenidos de materia orgánica y pH cercanos a la neutralidad (Jiménez, 2007). Las especies como *Azotobacter* son bacterias de vida libre que colonizan las raíces y promueven el crecimiento vegetal, la síntesis de fitohormonas, disolución y mineralización de los fosfatos, además están directamente involucradas en el aumento de la absorción de nitrógeno a través de la FBN, (Ahemad y Kibret, 2014; Reyes y Valery, 2007).

Debido a la importancia que representa estos microorganismos, este estudio pretende obtener un acercamiento en el conocimiento de la microbiota presente en suelo rizosférico de los cultivos de maracuyá y cacao en el municipio de Rivera, a través de la caracterización fenotípica de cepas de microorganismos diazótrofos, así como su relación con los parámetros fisicoquímicos del suelo, y su posterior inoculación en plantas de maracuyá de tal forma que se pueda dar una contribución al



desarrollo de alternativas sostenibles como los potenciales biofertilizantes, orientadas a aumentar la productividad de los cultivos en la región.

## 2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La actividad biológica de los suelos es un factor fundamental en el logro de cultivos de alto rendimiento, debido a la asociación microorganismos-suelo-planta que mejora la producción y ejerce control del medio ambiente; permitiendo el mantenimiento de la biodiversidad y la sostenibilidad de los ecosistemas (Carvajal y Mera, 2010).

En general, se considera que la microbiota del suelo, está conformada principalmente por bacterias y hongos, los cuales juega un papel importante en la fertilidad, reciclaje de nutrientes, evolución, estructura y conservación del mismo (Reyes y Valery, 2007). Sin embargo, en el manejo agronómico de los diferentes tipos de cultivos existen factores que alteran el equilibrio presente en los suelos, como lo es la fertilización química de los cultivos; aunque estos insumos agrícolas, aumentan la productividad en los primeros años de uso, al transcurrir el tiempo, esta no se sostiene y origina además alteraciones en la microbiota del suelo, como también grandes contaminaciones a otros tipos de hábitat, como lo son las fuentes hídricas (E. Martínez, López, Ormeño, y Moles, 2013). Esto debido que a consecuencia de la aplicación continua de estos nutrientes se origine el fenómeno de eutrofización que para el caso del agua genera producción de toxinas por determinadas algas y modificación de las características del hábitat debido a la transformación del conjunto de plantas acuáticas (FAO, 2016).

Otras de las consecuencias producidas por los compuestos nitrogenados agregados a partir de los fertilizantes químicos es la producción de nitratos (entre otros compuestos inorgánicos), que, aunque son esenciales para la nutrición vegetal, también pueden ser contaminantes del medio ambiente. Los nitratos son altamente solubles y no son retenidos por las cargas negativas de los coloides del suelo, de modo que se mueven libremente con el agua de drenaje, a través del perfil del suelo, hacia los acuíferos (Martínez, Ojeda, Hernández, Martínez, y Quezada, 2011).

Una de las alternativas que actualmente se están implementando para contrarrestar los efectos nocivos de los fertilizantes químicos en la agricultura, son los llamados biofertilizantes los cuales son productos tecnológicos elaborados con microorganismos benéficos que promueven el crecimiento de las plantas y contribuyen a la disponibilidad y proporción de nutrientes (Martínez et al., 2013). Sin embargo, en la práctica y manejo de biofertilizantes, se presenta un inconveniente de gran importancia y es el desconocimiento de las especies presentes en los agroecosistemas, que no permiten explotar de manera adecuada este recurso y darle un eficiente uso en la agricultura (Alfonso, Leyva, y Hernández, 2005), dado que los microorganismos empleados como biofertilizantes proceden de condiciones edafológicas y climáticas específicas que favorecen su crecimiento y actividad, lo que hace que la eficiencia de los biofertilizantes disminuya o sea nula si su aplicación se da en condiciones diferentes, por lo cual es de vital importancia el uso de microorganismos (nativos) propios del suelo donde se van a utilizar (Escobar et al., 2011).

Diversos estudios han demostrado la importancia de identificar los integrantes de la comunidad microbiana para hacer un buen uso de los biofertilizantes en la aplicación de los cultivos, garantizando efectos positivos en las plantas con la aplicación de estos como inoculantes (Alfonso et al., 2005), por ejemplo Pinilla y Moreno (2010) realizaron un estudio con la soja sudamericana la cual fue biofertilizada en su mayoría con microorganismos de alta calidad demostrando que su dependencia a la aplicación de fertilizantes químicos nitrogenados resulto ser mucho menor.

Otras investigaciones llevadas a cabo han aislado cepas de bacterias diazótrofes en diversos cultivos y evaluado su capacidad fijadora de nitrógeno en diversos bioensayos, como los reportados por Argüello y Moreno (2014); quienes aislaron bacterias fijadoras de nitrógeno en el cultivo de cacao y confirmaron la capacidad de las bacterias diazótrofes para convertir el nitrógeno no disponible a la forma  $\text{NH}_3$  y exudarlo al medio, presentando una relación directa en el desarrollo de las hojas, tallo y raíces de las plantas evaluadas en el bioensayo. Reyes y Valery (2008) aislaron cepas de bacterias fijadoras de especies como *Brachiaria decumbens*, *B. humidicola*, *Phaseolus vulgaris* y *Theobroma cacao*, las cuales fueron inoculadas en cultivos de pimentón y maíz, obteniendo en el pimentón, el aumento de la germinación y el peso seco con todas las cepas evaluadas y el porcentaje de N con la mayoría de ellas, mientras que el maíz presentó una tendencia más selectiva que el pimentón en la germinación, y en la promoción del crecimiento, evidenciándose que para la selección de bioinóculos debe considerarse el cultivo y las condiciones de fertilidad de los suelos donde se intenten aplicar.

A nivel nacional existen investigaciones llevadas a cabo en los departamentos de Boyacá (Jiménez, 2007), Cundinamarca (Obando, 2012), Santander (Moreno y Galvis, 2013), Amazonas (Mantilla-Paredes et al., 2009), entre otros, pero a nivel departamental las investigaciones de microorganismo diazótrofes son casi nulas; sin embargo, las políticas departamentales y nacionales están llamadas a liderar la implementación de agricultura sostenible fundamentada en el uso de biofertilizantes, generando el menor impacto ambiental posible, lo que abre la puerta a la realización de investigaciones en la región en pro del mejoramiento de la agricultura ecológica en la zona (Secretaría de Agricultura del Huila). Por otro lado, cabe resaltar que, aunque existen investigaciones en cacao, en el cultivo de maracuyá no se reportan investigaciones de microorganismos diazótrofes, no existen estudios previos de la población microbiana en el área de estudio, además de la gran importancia de los cultivos de cacao y maracuyá como apuestas productivas del municipio de Rivera y la región. Por consiguiente, esta investigación tiene una mayor relevancia al aportar nueva información relacionada con la diversidad microbiana presente en estos suelos, apostándole a nuevas investigaciones relacionadas con la caracterización de microorganismos y su uso potencial con el fin de generar desarrollo e innovación en el sector a largo plazo.

Es por esta razón que en el presente proyecto de tesis se busca dar respuesta a las siguiente pregunta de investigación: **¿Existe algún tipo de relación entre los parámetros fisicoquímicos del suelo con la presencia poblacional de microorganismos fijadores de nitrógeno en los cultivos de cacao y maracuyá; y que efecto se genera en el crecimiento de plántulas de maracuyá al ser inoculadas por dichas bacterias?**

### 3. ANTECEDENTES

Diversos estudios han demostrado que los microorganismos presentes en el suelo interactúan con las raíces de las plantas y los constituyentes del suelo en la rizosfera del suelo (Barea, Pozo, Azcón, y Azcón, 2005); pero es hasta 1949 que Serge Winogradsky en San Petersburgo reportó la primera cepa bacteriana aislada capaz de fijar nitrógeno en estado libre (Bruijn, 2015). Clavijo, Chipana, Centeno, Zúñiga, y Guillén (2002) encontraron una correlación entre el crecimiento de las bacterias con la materia orgánica, fósforo, el pH del suelo, tipo de riego y profundidad de la raíz en su investigación en la cual aislaron, caracterizaron e identificaron bacterias diazotróficas de la rizosfera del cultivo del olivo en Perú; identificaron molecularmente especies de *Novosphingobium scionense*, *Novosphingobium resinovorum*, *Burkholderia metallica*, *Rhizobium massiliae* y *Klebsiella pneumoniae*.

En su tesis de maestría Rubio (2003), caracterizó molecular y funcionalmente bacterias del género *Azotobacter* aisladas de suelos de la República Argentina, demostrando la gran diversidad genética de estas bacterias en dichos suelos; así mismo, que la producción de auxinas sería el principal mecanismo de acción de las cepas aisladas para estimular el crecimiento temprano de las plántulas de trigo, sin embargo recomienda estudios más profundos que relacionen la producción de fitohormonas por parte de las bacterias con las respuestas observadas en las plantas.

Alfonso et al. (2005) demostraron que los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* y *Streptomyces*, forman parte de la comunidad microbiana de la rizosfera del tomate, siendo *Azospirillum* el género predominante. Además evaluaron en un bioensayo la efectividad agrobiológica de *Azospirillum*, del que se obtuvo un efecto positivo en la inoculación artificial de esta rizobacteria en el crecimiento de las plantas de tomate con un rendimiento agrícola superior al 11% con respecto a las plantas testigo.

En Boyacá, Jiménez Avella (2007), aisló en medio Ashby Sacarosa cepas de microorganismos diazotófos de cultivos de brócoli, calabacín, coliflor, espinaca, tomate y zanahoria. A estas cepas aisladas les realizó caracterización molecular mediante un análisis de restricción del DNAr 16s amplificado, encontrando bacterias de las especies *A. vineladii*, *A. chroococcum*, *A. negricans* y *A. paspali*. En este mismo año, se reportó la investigación llevada a cabo por Lara Mantilla, Villalba Anaya y Oviedo Zumaqué; en la que se aislaron bacterias diazotróficas de los géneros *Azotobacter sp* y *Azospirillum sp* obtenidas de la rizosfera de cultivos de plátano, pastos, maíz y de rastrojos en el municipio de San Carlos; y a través del método colorimétrico de Berthelot (fenol-hipoclorito) cuantificaron la producción del ion amonio generada por cada cepa aislada, prueba en la que se destacó por su eficiencia en la fijación de nitrógeno el género *Azotobacter sp* con 5.1743 mg/l de amonio y *Azospirillum sp* con 4.6741 mg/l de amonio.

Estudios como el de Reyes y Valery (2007) determinaron el efecto de la fertilidad del suelo sobre la microbiota y la promoción del crecimiento del maíz con *Azotobacter sp*, como resultado las densidades poblacionales microbianas totales y disolventes de fosfatos se vieron afectados por las condiciones fisicoquímicas del suelo, como el pH y el contenido de materia orgánica del suelo; así mismo se encontró relación entre la ecología rizosférica y la especie vegetal es propia de cada especie vegetal.

Rojas Sierra y Moreno-Sarmiento (2008) en su estudio partieron de una cepa de *Azotobacter sp* aislada de suelos dedicados a la producción arrocerá del Tolima, con el fin de evaluar diferentes formulaciones de prototipos de un biofertilizante para el mismo cultivo, las cuales se realizaron al mezclar la bacteria fijadora



de nitrógeno en diferentes relaciones con sustancias húmicas, Polietilenglicol, Carbopol® y quelatos; uno de los prototipos empleados en esta investigación evidenció un efecto benéfico sobre la producción con 8500 kg/ha respecto a la obtenida por el testigo de 7625 kg/ha.

Las bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto fueron objeto de investigación por Obando Castellanos et al. (2010), quienes evaluaron el efecto de las épocas de lluvia y sequía sobre la población de microorganismos pertenecientes a los géneros *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* y *Burkholderia* en eucalipto, como también la influencia del estrato de la muestra (suelo rizosférico, raíces y hojas) en la presencia poblacional de dichas bacterias. Como resultado los investigadores no encontraron variación en el tamaño de la población de las especies por efecto del estado del clima; sin embargo se presentó diferencias estadísticamente significativas en los diferentes estratos de la muestra que para el caso de los aislamientos presuntivos de *Herbaspirillum sp* y *Azospirillum sp* la mayor población se encontraba en las raíces y suelo rizosférico respectivamente.

En 2011 Escobar et al., aislaron bacterias fijadoras de nitrógeno de cultivos de tomate, lechuga, cebolla, espinaca, zanahoria y betarraga; de las cuales obtuvieron cuatro cepas de *Azotobacter sp* productoras de ácido indolacético y solubilizadoras de roca fosfórica que al ser evaluadas en el crecimiento de tomate influenciaron de manera positiva en el desarrollo vegetativo, disminuyendo el número de días a la floración e incrementando la altura, volumen radicular y materia seca total de las plantas.

En Espinal (Tolima) Guzmán, Obando, Rivera y Bonilla (2012) aislaron bacterias diazotróficas de los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum* a partir de la rizósfera de cultivos de algodón y mediante la técnica de reducción de acetileno determinaron la promoción del crecimiento vegetal y por el método colorimétrico de Salkowsky la producción de índoles; en estas pruebas resaltaron las cepas de *Azotobacter* presentando en la reducción de acetileno entre 206.43 a 460.60 nmol C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> ml<sup>-1</sup> .h<sup>-1</sup> y producción de índoles de 19.87 a 20.08 µg.mL<sup>-1</sup>, recomendado estas cepas para estudios de evaluación como principio activo en futuros inoculantes para el algodón.

A partir de cultivos de pastos, café, caña de azúcar, maíz y frutales, Moreno y Galvis (2013) aislaron bacterias diazotróficas determinadas en la identificación molecular como *Stenotrophomonas maltophilia* y *Azotobacter vinelandii*; con estas cepas realizaron un ensayo en invernadero para evaluar su efecto fertilizante en plantas de maíz en el cual los aislados identificados como *S. maltophilia* por PCR, presentaron los mejores resultados en la emergencia de las plantas, el diámetro del tallo y la longitud de las hojas y tallos, convirtiendo estas bacterias como potencial biofertilizante.

Jara Carreño (2015) en su investigación caracterizó e identificó cepas nativas del género *Azotobacter* y su efecto en co-inoculación con *Rhizobium* en tomate de mesa, todos los aislados. Dentro de la caracterización morfológica de las colonias evaluó la tinción al Gram, crecimiento, color, producción de mucilago, bordes y elevación. Los mejores resultados para los parámetros de altura y número de hojas obtenidos en el bioensayo lo presentó el tratamiento en el que se inoculó *Rhizobium sp*; así mismo, para la variable de número de flores a los 60 días el tratamiento con *Azotobacter vinelandii* mas *Rhizobium sp* se destacó; como también encontró un incremento en el número de frutos a los 60 y 75 días con la inoculación de *Azotobacter vinelandii*. Con respecto al peso fresco del fruto como variable que da nociones a un posible aumento en la producción, el mejor tratamiento correspondió al que se aplicó como inoculo *Azotobacter vinelandii* con 39.95 g en promedio por fruto.



## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1. MARACUYÁ

El maracuyá o también conocido por murukuyá y parchita amarilla, es una planta leñosa y perenne, requiere de soporte o tutor para enredarse, presenta tallos verdes, acanalados, glabros, con hojas de lámina palmada, generalmente con tres lóbulos; flores solitarias, axilares, fragantes y muy vistosas (Ver Figura 1); esta planta esta categorizada dentro del grupo taxonómico que se presenta en la Tabla 1. El fruto es una baya globosa, de color rojo intenso o amarillo cuando maduro, punteado, liso, el cual contiene numerosas semillas rodeadas de un arilo de pulpa, jugoso, amarillento, aromático y con un sabor agridulce (Corpoica, 2001).

**Tabla 1.** Taxonomía del maracuyá.

<b>Orden</b>	<i>Malpighiales</i>
<b>Familia</b>	<i>Passifloraceae</i>
<b>Género</b>	<i>Passiflora</i>
<b>Especie</b>	<i>Passiflora edulis</i>

Fuente: (Corpoica, 2001)

El crecimiento óptimo se presenta en temperaturas entre 24 y 28°C, requiere de suelos ricos en materia orgánica, fértiles, profundos y con drenaje suficiente, con un pH entre 5.5 y 8.0; la producción en suelos a valores de pH altos se explica, por su tolerancia a la salinidad. El exceso de humedad favorece el desarrollo de enfermedades radicales, como la pudrición seca del cuello de raíz, causada por el hongo *Fusarium sp.*, la cual puede producir una destrucción total del cultivo; los suelos que favorecen el cultivo son de textura franca con alta capacidad de retención de agua, porque suministran a la planta los niveles de humedad que este demanda (Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas, 2009).



**Figura 1.** a) Cultivo de *Passiflora edulis* en la finca La Sevilla. b) Fuente hídrica que abastece el cultivo de maracuyá.

La deficiencia en nitrógeno en el cultivo de maracuyá produce plantas pequeñas, menor número de ramas, las cuales además son muy finas con tendencia al crecimiento apical, se manifiesta un amarillamiento generalizado de las hojas (García Torres, 2002). Este cultivo requiere 150 Kg/Ha de nitrógeno y se produce en las zonas de vida Bosque espinoso subtropical, bosque muy seco tropical y bosque seco tropical (Gobernación del Huila, 2006).

## 4.2.CACAO

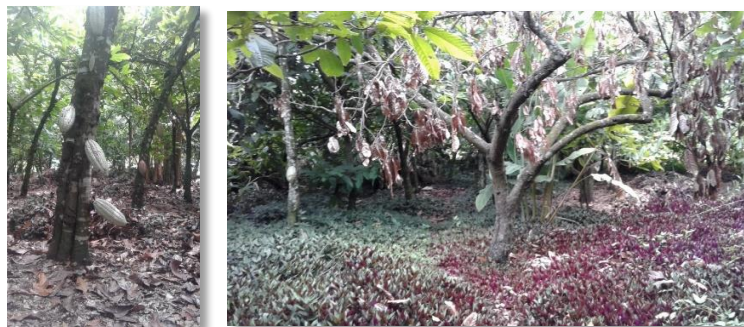
El cacao (*Theobroma cacao L.*) es explotado comercialmente para la producción de semillas principalmente destinadas a la fabricación de chocolate con un gran potencial en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica (Ver cultivo en la Figura 2). Entre los problemas que afectan la producción mundial se encuentran los fitosanitarios, falta de inversión, envejecimiento de las plantaciones e inadecuada fertilización (Rojas y Sacristán 2009). El cacao es una planta perenne que pertenece al grupo taxonómico que se describe en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Taxonomía del cacao

<b>Orden</b>	<i>Malvales</i>
<b>Familia</b>	<i>Esterculiaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Theobroma</i>
<b>Especie</b>	<i>Cacao</i>

Fuente: (Gustavo, 1986)

La temperatura media para una mejor producción fluctúa entre 25 y 26°C, en suelos que comprenden desde suelos arcillosos agregados hasta franco-arenosos (FA). Uno de los factores esenciales para el crecimiento de las raíces del cacao es una buena aeración, es decir, una renovación permanente del oxígeno del suelo (Paredes, 1989). La microflora y fauna del suelo contribuyen eficazmente a la evolución del mismo, pues tienen una gran capacidad para transformar la materia orgánica, especialmente a altas temperaturas; si esta temperatura está por encima de los 25 °C, el equilibrio de la descomposición y acumulación se altera y el suelo rápidamente puede quedarse sin materia orgánica (Gustavo, 1986).



**Figura 2.** Cultivo de *Theobroma cacao* en la finca La Sevilla.

## 4.3.EL NITRÓGENO Y LAS PLANTAS

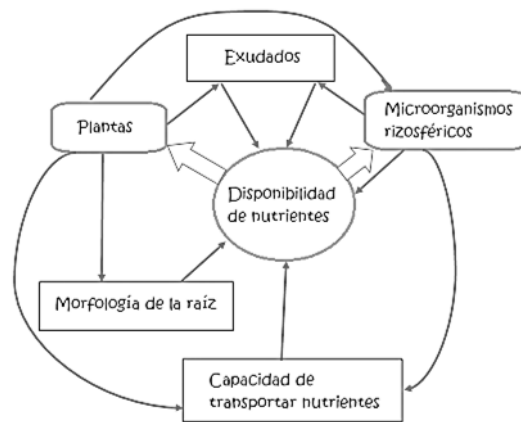
En la atmósfera el nitrógeno (N) constituye hasta un 78% de los gases (Obando, 2012), sin embargo es una fuente nutritiva muy escasa, puesto que el nitrógeno molecular (N<sub>2</sub>) no es fácilmente asimilable por las plantas debido a que es difícil de romper el triple enlace que une a los átomos que forman la molécula; la forma de aprovechar el nitrógeno atmosférico es a través de un proceso metabólico denominado Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN) (Lara et al., 2007).

Entre los diecisiete elementos esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas, el nitrógeno es considerado el más importante. Las funciones específicas que cumple el nitrógeno se relacionan con la síntesis de moléculas esenciales tales como ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas, clorofilas y alcaloides, por otro lado la función como agente osmótico asociada al efecto del ion nitrato y a otras formas reducidas del nitrógeno, en la reducción del potencial hídrico de la vacuola, dentro del proceso de osmoregulación (Cárdenas, Sánchez, Farías, y Peña, 2004).

En las plantas el nitrógeno es el cuarto elemento más abundante (Pérez, 2014), además de ser, después del agua, el principal limitante para el desarrollo de las mismas (Fernández, de María, y de Felipe, 2002). Con el propósito de garantizar la producción se ha venido incrementando el uso de fertilizantes nitrogenados en los cultivos, se prevé un aumento de 1.4 por ciento cada año hasta el 2018 en el uso mundial del nitrógeno en la agricultura, los principales demandantes de este recurso en América Latina serán Brasil, Argentina, México y Colombia (FAO, 2015), no obstante, el abuso y mal manejo en la utilización de fertilizantes nitrogenados implica riesgos de contaminación ambiental (Cárdenas et al., 2004).

#### 4.4. RIZÓSFERA

El término “rizosfera” fue propuesto por Hiltner en 1904, quien observó por primera vez la acumulación de microorganismos en la zona radical (Mayz, 2004). La rizosfera hace referencia al volumen de suelo influenciado por las raíces de las plantas o materiales producidos por las mismas. En la rizosfera interactúan tres componentes independientes, rizosfera (suelo), rizoplano y raíz. La Rizosfera es la región del suelo influenciada por las raíces mediante la liberación de sustratos que afectan la actividad microbiana, el rizoplano hace referencia a la superficie de la raíz más partículas del suelo fuertemente adheridas y la raíz, se concibe como componente en el cual microorganismos endófitos colonizan los tejidos de la raíz (Barea et al., 2005).



**Figura 3.** Mecanismos implicados en el aumento de la disponibilidad y la absorción de nutrientes.

Fuente: (Rengel y Marschner, 2005)

En la raíz de las plantas se sintetizan, acumulan y secretan productos químicos denominados exudados, estos modifican las propiedades fisicoquímicas del suelo, por tanto regulan la actividad microbiana en la rizosfera. Por otro lado, la actividad microbiana en la rizosfera afecta el enraizamiento y el suministro de nutrientes

disponibles para las plantas, debido a que los microorganismos metabolizan una fracción de las moléculas orgánicas producidas por la raíz como fuente de carbono y nitrógeno, posteriormente son reintegradas moléculas de fácil absorción para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Figura 3) (Ahemad y Kibret, 2014).

#### 4.5.FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO (FBN)

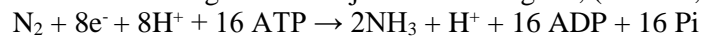
Proceso por el cual los microorganismos del suelo conocidos como microorganismos fijadores de nitrógeno o diazótrofos (Lara et al., 2007), convierten el nitrógeno ( $N_2$ ) en amoníaco ( $NH_4^+$ ), mediado por el complejo enzimático llamado nitrogenasa presente en estos organismos fijadores (Mayz, 2004).

La nitrogenasa está constituida por dos metaloproteínas: I) hierro-molibdeno-proteína (Mo-Fe-Proteína) y II) hierro-proteína; requiere además de la colaboración de dos proteínas: ferredoxina y flavodoxina. La ferredoxina transporta los electrones a la nitrogenasa y llegan a la hierroproteína, esta activa a la Mo-Fe-proteína y se produce la reducción de nitrógeno, siendo luego fijado como compuesto aminado (Lara et al., 2007).

Dean y Jacobson en 1992 definió la nitrogenasa como una metaloenzima de dos componentes, i) dinitrogenasa reductasa que es la proteína de hierro y ii) dinitrogenasa que tiene un cofactor de metal. Dinitrogenasa reductasa proporciona electrones con alta potencia, mientras que la reducción de dinitrogenasa utiliza estos electrones para reducir  $N_2$  a  $NH_3$ . Basado en el cofactor de metal se han identificado tres sistemas de fijación N diferentes a) Mo-nitrogenasa, b) V-nitrogenasa y c) Fe-nitrogenasa. Estructuralmente, el sistema de fijación de nitrógeno varía entre los diferentes géneros bacterianos. La mayoría fijación biológica de nitrógeno se lleva a cabo por la actividad de la nitrogenasa molibdeno, que se encuentra en todos los diazótrofos.

Son destacadas entre las bacterias de vida libre o asociativas que fijan el nitrógeno atmosférico por su potencial como biofertilizantes, los géneros dentro del grupo de aerobias, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerinckia* y *Derrxia*; en las aerobias facultativas se distinguen *Bacillus*, *Enterobacter* y *Pseudomonas*; y los géneros anaerobios, *Clostridium*, *Desulfovibrio* y *Metanobacterium* (Díaz, Ferrera, Almaraz, y Alcántar, 2001).

**Ecuación 1.** Reacción general de fijación de nitrógeno, (Camelo, 2010)



La Ecuación 1 presenta la reacción general de fijación de nitrógeno, esta reacción demanda grandes cantidades de energía (ATPs electrones y  $H^+$ ) que se adquieren a partir de la oxidación respirativa de sustratos carbonáceos liberados por las plantas, estos compuestos no siempre están fácilmente disponibles para los microorganismos debido a la elevada competencia que existe en la rizosfera (Álvarez, 2012).

Pedraza et al. en el 2010 señala que la fijación biológica del nitrógeno es considerado el segundo proceso biológico más importante en el planeta después de la fotosíntesis, junto con la descomposición de la materia orgánica; asimismo este proceso es importante en la fertilidad del suelo, como un mecanismo de reposición del nitrógeno que es perdido a través de la desnitrificación, absorción de los cultivos, percolación y erosión (Jara, 2015).

#### 4.6. MICROORGANISMOS FIJADORES DE NITRÓGENO ATMOSFÉRICO

Uno de los grupos funcionales más importantes del suelo lo componen las bacterias fijadoras de  $N_2$ , debido a que son los únicos organismos que tienen la nitrogenasa, enzima que reduce el  $N_2$  a través de la FBN (Álvarez, 2012; Bruinsma, 2003).

Los microorganismos de este grupo, están generalmente asociados con la rizosfera del suelo de muchas plantas estableciendo relaciones asimbióticas o de vida libre, o se pueden encontrar microorganismos en asociación más específica que viven dentro de las raíces, hojas y otros tejidos de plantas como endófito (Massena y dos Santos, 2015). La fijación efectuada por microorganismos de vida libre se denomina fijación asimbiótica, y la realizada por microorganismos en asociación a especies leguminosas es llamada fijación simbiótica (Jara, 2015).

En la Tabla 3 se presentan los principales grupos de microorganismos asimbióticos fijadores de nitrógeno y en la Tabla 4 se describen algunos ejemplos de las asociaciones que forman los microorganismos que fijan el nitrógeno de manera simbiótica.

**Tabla 3.** Bacterias Fijadoras de nitrógeno.

Bacterias	Quimiótrofas	Fotótrofas
Anaerobias	<i>Clostridium</i> , <i>Desulfotomaculum</i> , <i>Desulfovibrio</i> , <i>Methanosarcina</i>	<i>Chromatium</i> , <i>Thiopedia</i> , <i>Ectothiorhodospira</i>
Anaerobias facultativas	<i>Klebsiella</i> , <i>Citrobacter enterobacter</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Propionibacterium</i>	<i>Rhodospirillum</i> y <i>Rhodopseudomonas</i>
Aerobias o microaerófilas	<i>Azospirillum</i> , <i>Aquaspirillum</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Azomonas</i> , <i>Beijerinckia</i> , <i>Derrxia</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Thiobacillus</i> , <i>Corynebacterium</i>	<i>Gloeocapsa</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Calotrix</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Spirulina</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Lyngbya</i> .

Fuente: (Fernández et al., 2002)

**Tabla 4.** Bacterias que forman asociaciones fijadoras.

Tipos de asociación	Géneros bacterianos
Rizocenosis	<i>Azospirillum</i> , <i>Azotobacter</i> y <i>Bacillus</i> con raíces de gramíneas
	<i>Beijerinckia</i> con raíces de caña de azúcar
Simbiosis asociativas	<i>Anabena</i> con hojas de <i>Azolla anabaenae</i>
	<i>Nostoc</i> con raíces de musgos y hepáticas
	<i>Calotrix</i> con hongos (líquenes)
Rizoendosimbiosis	<i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> y <i>Sinorhizobium</i> en raíces de leguminosas
	<i>Azorhizobium</i> en raíces y tallos de <i>Sesbania rostrada</i>
	<i>Frankia</i> con raíces de Angiospermas no leguminosas

Fuente: (Fernández et al., 2002)

##### 4.6.1. Microorganismos diazotróficos simbióticos

Son aquellas bacterias capaces de fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis con las raíces de plantas leguminosas, estas se hospedan en los nódulos presentes en raíces tomando ácidos orgánicos de las plantas y aportando compuestos nitrogenados como los ureidos y las amidas de reserva. Se han



definido en 9 géneros, 40 especies de bacterias que forman nódulos en leguminosas, sin embargo, existen bacterias simbióticas que pueden colonizar otras plantas; tal es el caso de *Rhizobium leguminosarum* y cepas fotosintéticas de *Bradyrhizobium sp.* encontradas en raíces de arroz y *Rhizobium etli* en raíces de maíz (Obando, 2012).

#### 4.6.2. Microorganismos diazotróficos asimbióticos

Microorganismos que tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico sin formar una simbiosis con la planta, porque cuentan con diferentes mecanismos de protección del complejo nitrogenasa; además de fijar el nitrógeno atmosférico, estas bacterias favorecen el desarrollo radical de la planta a través de la producción de reguladores de crecimiento, por consiguiente contribuyen a una mayor absorción de nutrientes por parte de la planta (Jara, 2015).

La mayoría de bacterias fijadoras de nitrógeno no están asociadas a las plantas y fijan nitrógeno por beneficio propio (Camelo, 2010); estas pueden habitar en la rizosfera, rizoplano y el interior de los tejidos vegetales sin formar estructuras especializadas (nódulos), entre los géneros más representativos de este grupo se reportan *Azospirillum*, *Azotococcus*, *Beijerinckia*, *Azotomonas*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Acetobacter*, *Chromatium*, *Chlorobium*, *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* y *Clostridium*, entre otros (Álvarez, 2012; Obando, 2012).

Bacterias de los géneros *Azotobacter sp*, *Azospirillum sp*, *Pseudomonas sp*, *Enterobacter sp* y *Klebsiella sp* son eficientes fijadoras asimbióticas de nitrógeno y contribuyen sustancialmente a que los agricultores disminuyan la aplicación de fertilizantes nitrogenados conservando el ambiente (Lara et al., 2007). Las especies más estudiadas son *Azotobacter vinelandii* (aerobio obligado), *Klebsiella pneumoniae* (anaerobio facultativo), *Clostridium pasteurianum* (anaerobio obligado), *Rhodobacter capsulatus* (bacterias fotosintética) y varias especies de *Anabaena* y *Nostoc* (cianobacterias formadoras de heteroquistes) (Camelo, 2010).

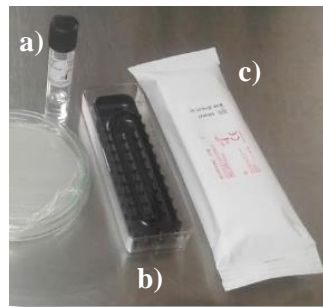
Se han reportado con la aplicación de microorganismos asimbióticos, incrementos del 5 a 30 % en los rendimientos de caña de azúcar, maíz, arroz, trigo y gramíneas forrajeras (Obando, 2012), además de una disminución en el uso de fertilizantes nitrogenados (Lara et al., 2010). La capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico por las bacterias de vida libre está limitada por factores que condicionan el medio, como el pH, la temperatura y aireación del suelo, concentración de microelementos, naturaleza de las fuentes de carbono, presencia del nitrógeno combinado y acción de organismos antagónicos (Lara et al., 2010). Es posible que el nitrógeno fijado por los microorganismos asimbióticos no esté disponible inmediatamente para ser usado por las plantas, sino que quede inmovilizado en la biomasa microbiana del suelo o en la materia orgánica (Rubio, 2003).

#### 4.7. MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS EMPLEANDO KIT BD BBL CRYSTAL E/NF

Las pruebas bioquímicas son test químicos aplicados a los microorganismos de los cuales son conocidas las reacciones generadas, de tal manera que permite caracterizar el metabolismo de las bacterias que son objeto de identificación. Algunas de estas pruebas evalúan presencia de una enzima y su lectura se realiza en pocos segundos o hasta horas, como también existen pruebas que requieren para su lectura el crecimiento del

microorganismo con incubación previa, con el fin detectar componentes metabólicos o la sensibilidad del microorganismo a una sustancia (Fernández Olmos, García de la Fuente, Saéz Nieto, y Valdezate Ramos, 2010).

El sistema BD BBL Crystal E/NF ID incluye tests para la fermentación, oxidación, degradación e hidrólisis de diversos sustratos; en la Figura 4, se observan los tres componentes del sistema, la tapa contiene 30 sustratos deshidratados y la base dispone de 30 pocillos para reacción; el fluido del inóculo es una solución preparada al mezclar 8.50 g de NaCl, 0.8372 g de ácido 3-morfolinpropanosulfónico y agua purificada hasta 1000 ml (Becton Dickinson and Company, 2015). La aplicación de este kit se realiza depositando el inóculo del análisis en la base, luego se tapa e incuba por 24 horas; este es el encargado de rehidratar los sustratos, se forma con la bacteria objeto de estudio y el fluido.



**Figura 4.** Sistema BD BBL Crystal E/NF ID. **a)** tubo de fluido del inóculo **b)** bases y **c)** tapa del panel BD BBL Crystal E/NF.

Los test se basan en la degradación o utilización de sustratos específicos por parte de los microorganismos que son detectados con indicadores, los principios aplicados con cada ingrediente activo en cada pocillo se muestra en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Reactivos y principios empleados en el sistema E/NF ID BBL Crystal.

Ingrediente Activo	Principio
Arabinosa	La utilización de carbohidratos produce un descenso de pH y un cambio en el indicador (rojo fenol)
Manosa	
Sacarosa	
Melibiosa	
Ramnosa	
Sorbitol	
Manitol	
Adonitol	
Galactosa	
Inositol	
p-n-p-fosfato	La hidrólisis enzimática del glucósido libera p-nitrofenol amarillo
p-n-p $\alpha$ - $\beta$ -glucósido	
p-n-p- $\beta$ -galactósido	
Prolina nitroanilida	La hidrólisis enzimática del sustrato amida incoloro libera p nitroanilina de color amarillo
p-n-p bis-fosfato	La hidrólisis enzimática del glucósido incoloro aril sustituido o éster de fosfato libera p-nitrofenol amarillo
p-n-p-xilósido	

Ingrediente Activo	Principio
p-n-p- $\alpha$ -arabinósido	
p-n-p-fosforilcolina	
p-n-p- $\beta$ -glucurónido	
p-n-p-N-acetil glucosamidina	
g-L-glutamil p nitroanilida	La hidrólisis enzimática del sustrato amida incoloro libera p nitroanilina de color amarillo
Esculina	La hidrólisis de la esculina produce un precipitado negro en presencia de iones férricos
p-nitro-DL-fenilalanina	La desaminación oxidativa de la fenilalanina produce un color pardo en presencia de iones férricos
Urea	La hidrólisis de la urea y el amonio resultante cambia el color del indicador de pH (azul de bromotimol)
Glicina	La degradación de la glicina libera metabolitos alcalinos que cambian el color del indicador de pH (azul de bromotimol)
Citrato	La degradación del citrato libera metabolitos alcalinos que cambian el color del indicador de pH (azul de bromotimol)
Ácido malónico	La degradación del malonato libera metabolitos alcalinos que cambian el color del indicador de pH (azul de bromotimol)
Cloruro de trifenil tetrazolio	La reducción del compuesto de tetrazolio produce la formación de un formazán rojo
Arginina	El catabolismo anaerobio produce una elevación del pH y un cambio en el color del indicador (púrpura bromocresol)
Lisina	

Fuente: (Becton Dickinson and Company, 2015)



## 5. OBJETIVOS

### 5.1.OBJETIVO GENERAL

Caracterizar fenotípicamente microorganismos fijadores asimbióticos de nitrógeno aislados de suelo rizosférico en cultivos de maracuyá y cacao en la finca La Sevilla localizada en el municipio de Rivera-Huila.

### 5.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar cepas nativas de microorganismos diazótrofos en suelos dedicados a la producción de cacao y maracuyá en el municipio de Rivera.
- Identificar fenotípicamente las cepas de microorganismos diazótrofos aislados.
- Determinar que parámetros fisicoquímicos del suelo influyen en la presencia poblacional de bacterias fijadoras de nitrógeno.
- Evaluar la incidencia en el crecimiento del maracuyá en condiciones de plántula a la inoculación de las bacterias diazotróficas aisladas.

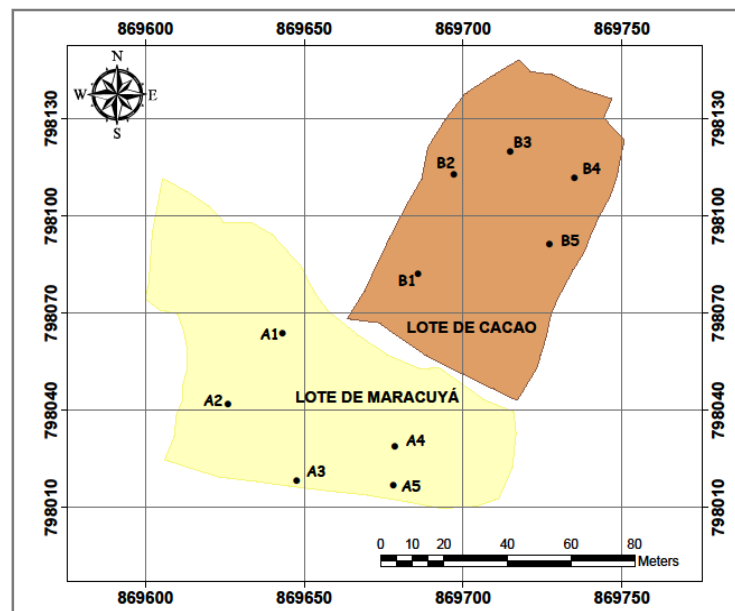
## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. LUGAR DE MUESTREO

El muestreo de suelo rizosférico se llevó a cabo para dos cultivos, cacao (*Theobroma cacao*) y maracuyá (*Passiflora edulis*), situados en la finca la Sevilla del municipio Rivera, localizada en las coordenadas geográficas  $2^{\circ} 46' 9.03''N$  y  $74^{\circ} 14' 58.79''W$ , a 700 msnm con una temperatura media anual de  $25^{\circ}C$  (Alcaldía de Rivera, 2016). La finca cuenta con 0.63 Ha cultivadas en cacao y 0.52 Ha en maracuyá

### 6.2. MUESTREO DEL SUELO

Para la toma de muestras de suelos fueron tomados 5 puntos aleatorios por predio, obtenidos mediante el software libre QGIS 2.14.3 (Ver Figura 5).



**Figura 5.** Puntos aleatorios en los lotes de cacao y maracuyá ubicados en la finca la Sevilla del municipio de Rivera.

Por otro lado el procedimiento de toma de muestras del análisis microbiológico se realizó con base a la metodología recomendada por el IGAC (2006), en la cual se especifica que para cada punto se debe tomar una muestra compuesta de la mezcla de tres puntos dentro del área aferente a las raíces de la planta, con un peso de aproximadamente 500 g (Ver Figura 6a) a una profundidad de 15 a 20 cm de la rizosfera (Ver Figura 6b), retirando previamente la capa superficial cubierta por arvenses y hojarasca.



**Figura 6.** Muestreo de suelo rizosférico de maracuyá (punto A1). **a)** Muestra de 575 gramos de suelo, **b)** Profundidad de muestreo, **c)** Transporte de las muestras en nevera de icopor.

Las muestras de suelo fueron dispuestas en bolsas estériles de polietileno, rotulando cada una de ellas de acuerdo al punto de toma de muestra y al tipo de cultivo, las muestras denominadas con la letra A hacen referencia a las que se obtuvieron del cultivo de maracuyá, y las denominadas con la letra B a las tomadas del cultivo de cacao, seguidas de un número del 1 al 5 de acuerdo a la ubicación geográfica del punto de muestreo. Posteriormente se transportaron en nevera hermética de poliestireno 4°C (Ver Figura 6c) para así regular el crecimiento o alteración de los microorganismos que habitan en el suelo.

### 6.3. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

La etapa de aislamiento, purificación, caracterización e identificación de las cepas se efectuaron en el Laboratorio de Ciencias Básicas del Centro de Formación Agroindustrial la Angostura-Sena. El análisis fisicoquímico de las muestras de suelo se realizó en el Laboratorio de Suelos de la Universidad Surcolombiana en Neiva.

En el proceso de caracterización de las bacterias diazótrofes se empleó el medio de cultivo selectivo Ashbys Mannitol Agar, preparado por componentes (HiMedia Laboratories, 2015) como lo recomienda HiMedia Laboratories en su guía técnica del 2015 (Ver Anexo 1), según (Subba Rao, 1977) este es un medio de cultivo para especies de *Azotobacter sp.* que emplean el manitol y el nitrógeno atmosférico como fuente carbono y nitrógeno respectivamente.

Dada las condiciones de crecimiento establecidas para las bacterias de vida libre o no simbióticas aisladas en el medio selectivo Ashbys Mannitol Agar se comparó las cepas bacterianas obtenidas con el género de *Azotobacter*, con el fin de hacer un acercamiento en la identificación de los microorganismos fijadores de nitrógeno presentes en la rizosfera de los suelos analizados.

#### 6.3.1. Pruebas fisicoquímicas del suelo

Se determinaron los parámetros químicos de pH, fósforo, carbono orgánico, azufre, boro, CIC y hierro; como también los parámetros físicos de textura, densidad aparente y densidad real, aplicando los métodos recomendados por el IGAC en su libro Métodos Analíticos del Laboratorio (IGAC, 2006).

##### 6.3.1.1. Determinación de pH

Para la determinación del pH, siguiendo la metodología se tomaron 20 g de suelo, los cuales se depositaron en un recipiente y se le adiciono 20 ml de agua destilada para garantizar la relación 1.1 (peso/volumen). Las

muestras se agitaron por 20 minutos en agitador reciproco EBERBACH, y seguidamente se dejaron en reposo por media hora. La medición se llevó a cabo mediante un potenciómetro Thermo Scientific Orion 4-Star Plus (Ver Figura 7). El equipo fue calibrado por medio de buffers adecuados (pH 4,00, pH 7,00 y pH 10,00) y posteriormente se procedió a la medición del valor del pH de cada una de las muestras.



**Figura 7.** Montaje para la determinación de pH.

#### 6.3.1.2. Determinación de Fosforo

La determinación del fósforo se realizó por el método de Bray II y cuantificación empleando como reductor el cloruro estañoso. Para ello se tomaron 2.85 g de suelo y se agregó 20 ml de solución extractante (fluoruro de amonio y ácido clorhídrico 0.1N), se agitaron por 40 s en agitador reciproco EBERBACH y se procedió a filtrar (Ver Figura 8 a). Para la cuantificación se tomaron 2 ml del filtrado se agregó 6 ml de agua, 2ml de ácido cloromolibdico y 1ml de cloruro estañoso, y se esperó 10 minutos para el desarrollo del color (Ver Figura 8b). La lectura tanto de las muestras como del blanco de proceso se hizo en el espectrofotómetro DR 5000™ UV-Vis (Ver Figura 8c), trabajando con una longitud de onda de 650 nm.



**Figura 8.** a) Montaje para la determinación de fósforo en el suelo b) desarrollo del color con  $\text{SnCl}_2$ , c) espectrofotómetro.

#### 6.3.1.3. Determinación de carbono orgánico

El carbono orgánico se realizó mediante el método de oxidación húmeda o método de walkley y black, el cual se basa en la correlación del dicromato de potasio en medio ácido y su cantidad gastada para la oxidación de la materia orgánica y la formación en el proceso de oxidación del  $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ . Para el presente estudio se pesaron entre 0.1 y 1 g de suelo (la cantidad tomada dependió del contenido de materia orgánica), al cual se le agregaron bajo campana de extracción, 5 ml de dicromato de potasio, 10 ml de ácido sulfúrico

concentrado y 75 ml de agua destilada, y se dejó atemperar. Finalmente se agregó 1 ml de ácido ortofosforico. El método de cuantificación se hizo por titulación con sulfato ferroso 1N en presencia de ortofenantrolina como indicador, hasta obtener un color rojo vino tinto que da fin a la prueba (Ver Figura 9).



**Figura 9.** Montaje para la determinación de carbono orgánico.

#### 6.3.1.4. Determinación de azufre

El azufre del suelo se determinó por el método de extracción con fosfato monocalcico a 0.008M y cuantificación turbidimetrica. Para ello se tomó 10 g de suelo y se agregó 25 ml de solución extractora agitando por 10 minutos en agitador reciproco EBERBACH para luego filtrar. Para la cuantificación se tomó una alícuota de 10 ml del filtrado y posteriormente se agregan 10 ml de solución inicial acida de azufre y 4 ml de reactivo turbidimetrico. Para la lectura de azufre tanto de las muestras como del blanco de proceso se hizo en el espectrofotómetro DR 5000™ UV-Vis, trabajando con una longitud de onda de 420 nm (Ver Figura 10).



**Figura 10.** Montaje para determinación de azufre en suelos.

#### 6.3.1.5. Determinación de la capacidad de intercambio catiónico

La capacidad de intercambio catiónico de las muestras se realizó por el método de saturación con acetato de amonio 1N y pH 7 (Ver Figura 11); para ello se pesó 5 g de suelo y se agregó 30 ml de acetato de amonio, dejándolo en contacto por 18 horas. Después de transcurrido el tiempo se filtró sin dejar secar con lavados de acetato de amonio hasta llegar a 100 ml. A continuación, se lavó el exceso de amonio con etanol al 96%. Para la cuantificación a las muestras que permanecen en el embudo se les agregó 50 ml de cloruro de sodio



al 10% y finalmente al filtrado se le agregó 20 ml de formaldehído. Seguidamente se tituló con NaOH 0.2 N en presencia de fenolftaleína como indicador hasta que se presentara cambio de color a rosa pálido.



**Figura 11.** Montaje para la determinación de la CIC.

#### 6.3.1.6. Determinación del boro

Para la determinación del boro se usó el método de extracción con agua caliente y cuantificación colorimétrica con azometina-H. Para ello, en un balón se adicionaron 20 g de suelo, se adiciono 39.5 ml de agua, 0.5 ml de cloruro de bario al 10% y 0.3 g de carbón activado. A continuación, se llevó a la aplancha de calentamiento hasta el primer signo de ebullición en donde se esperó 5 minutos más y finalmente se filtró. Para la cuantificación se tomó 5 ml del extracto filtrado y se agregó 2 ml de solución buffer y 2 ml de azometina-H y se esperó 40 minutos para el desarrollo del color, Finalmente se traspasó a celdas de colorimetría para ser leído la concentración del boro en el espectrofotómetro DR 5000™ UV-Vis, con una longitud de onda de 430 nm.

#### 6.3.1.7. Determinación de hierro

Para extraer el hierro del suelo, se pesó 20 g de muestra y se agregó 40 ml de DTPA (Ácido Dietilén-Triamino-Pentaacético), a continuación se puso en agitación por 2 horas en el agitador reciproco EBERBACH para finalmente ser filtradas. La cuantificación se realizó con el equipo de absorción atómica contraAA® 300 de la marca Analytik Jena, realizando una curva de calibración con patrones de 1, 2 y 3 ppm y diluciones a las muestras que lo requerían (Ver Figura 12).



**Figura 12.** Montaje para la determinación de hierro.

### 6.3.1.8. Textura del suelo

La textura se determinó por el método de Bouyoucos, para el cual se tomaron 100 g de muestra de suelo y se transfirieron a un recipiente plástico, seguidamente se adicionaron 10 ml de solución dispersante y finalmente fueron agitadas 2 horas en agitador reciproco EBERBACH. Trascurrido el tiempo se transfirió toda la suspensión a una probeta y se aforo a 1l. A continuación, se introdujo una varilla de agitación y se agito vigorosamente a lo largo de toda la suspensión seguidamente se sumergió el hidrómetro y se tomó la lectura junto con la temperatura; pasadas dos hora se volvió a tomar la segunda lectura con el hidrómetro al igual que la temperatura, finalmente se realizaron los respectivos cálculos para determinar la textura de las muestras.

### 6.3.1.9. Densidad aparente

La densidad aparente se realizó tomando en campo muestras con cilindros biselados que fueron llevados a la estufa de secado digital GEMMY, a 105°C por 24 horas para finalmente ser pesada y así determinar la masa del suelo. Por otro lado se midieron las dimensiones del cilindro (Ver Figura 13) para poder determinar su volumen y conocer la densidad aparente de las muestras.



**Figura 13.** Determinación de densidad aparente del suelo.

### 6.3.1.10. Densidad real

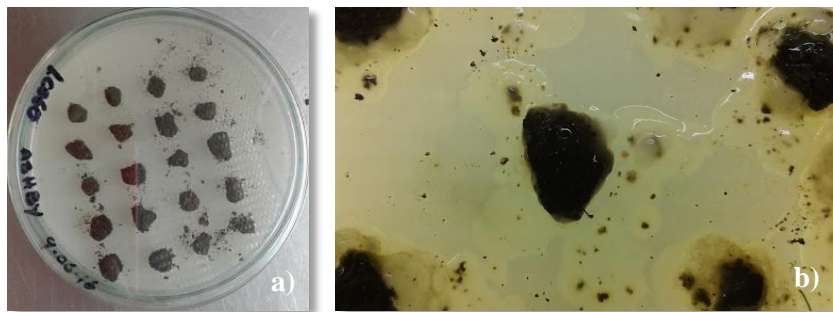
Para la determinación de la densidad real se tomó un picnómetro de 25 ml, vacío y completamente limpio, se pesó en balanza analítica OHAUS AR2140 y se registró el peso, seguidamente se agregaron 2 g de suelo y se pesó el picnómetro más el suelo, a continuación se agregó agua destilada hasta llenas una tercera parte del recipiente, después de ello se dejó el picnómetro dentro del desecador por dos horas. Pasado el tiempo se agregó agua destilada hasta 2/3 partes del volumen del recipiente y nuevamente de dejo en el desecador pero solo una hora. Finalizado el tiempo se llenó completamente y se pesó todo el conjunto (Ver Figura 14), para terminar el proceso se vació todo el contenido del picnómetro para llenarlo únicamente de agua y tomar el peso final para realizar los respectivos cálculos.



**Figura 14.** Picnómetro para la determinación de la densidad real del suelo.

### 6.3.2. Aislamiento primario de bacterias

Se realizaron dos tipos de aislamiento Primario para cada muestra de suelo obtenida en los cultivos; el primero utilizando la técnica de gránulos de suelo y el segundo por técnica de diluciones seriadas. La técnica de gránulos de suelo (Aquilanti, Favilli, y Clementi, 2004) fue realizada por duplicado, colocando de manera equidistante 20 gránulos de suelo en el medio de cultivo Ashbys Mannitol Agar (Ver Figura 15a), incubadas por 5 días a 30 °C en incubadora Binder BD53, con el fin de observar alrededor de los gránulos colonias mucilaginosas translúcidas (Ver Figura 15b).



**Figura 15.** Aislamiento por gránulos de suelo. **a)** Siembra de terrones en Ashbys Mannitol Agar, **b)** gránulos mucilaginosos después de incubación.

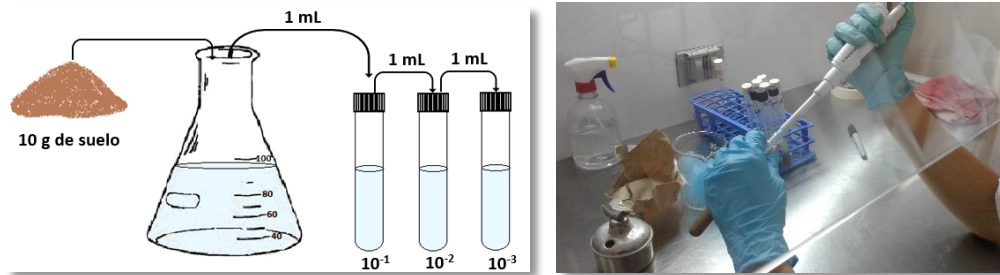
Al transcurrir el tiempo de incubación se determinó mediante el recuento de los gránulos con colonias el porcentaje de recuperación de bacterias diazótrofes aerobias asimbióticas para cada cultivo (Ver Ecuación 2).

**Ecuación 2.** Porcentaje de recuperación de bacterias diazótrofes aerobias asimbióticas (Jiménez, 2007)

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{N^{\circ} \text{ de gránulos mucilaginosos}}{\text{total de gránulos}} \times 100$$

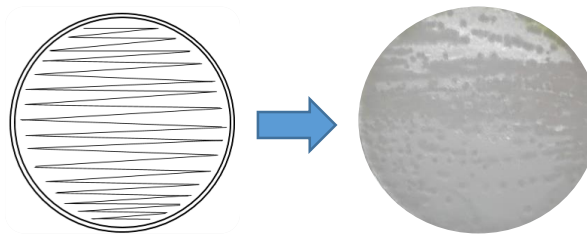
Por otro lado, se realizaron diluciones de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-3}$  en cacao y  $10^{-1}$  a  $10^{-2}$  en maracuyá para el aislamiento primario por técnica de diluciones seriadas. La solución madre fue preparada con 10 g de suelo en 90 ml de solución salina al 0.86%; para la dilución  $10^{-1}$  se tomó 1 ml de la solución madre en 9 ml de solución salina, la siguiente dilución ( $10^{-2}$ ) se preparó al tomar 1 ml de la dilución anterior en 9 ml de la solución salina y así sucesivamente como se muestra en el esquema de la Figura 16.





**Figura 16.** Esquema del método de diluciones seriadas.

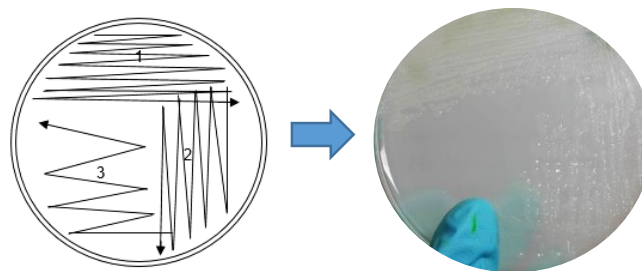
Las diluciones se sembraron por superficie masivamente con asa de platino (Ver Figura 17) por duplicado en el medio de cultivo e incubaron por 5 días a 30 °C, transcurrido este tiempo se observó el crecimiento en el medio, morfología de la colonia y recuento en placa.



**Figura 17.** Representación esquemática de siembra por superficie.

#### 6.4. AISLAMIENTO SECUNDARIO O PURIFICACIÓN

El aislamiento secundario se realizó partiendo de las colonias obtenidas por las técnicas empleadas en el aislamiento primario, para tal fin se seleccionaron colonias del método de diluciones con características representativas, de los terrones se tomó una asada para cada punto sembrado. Las seleccionadas fueron sembradas en Ashbys Mannitol Agar por agotamiento como se indica en el esquema de la Figura 18, e incubadas por 5 días a 30 °C, transcurrido este tiempo se verifico morfología y tinción Gram para observar la pureza del cultivo. Las siembras por agotamiento se repitieron hasta obtener un cultivo puro.

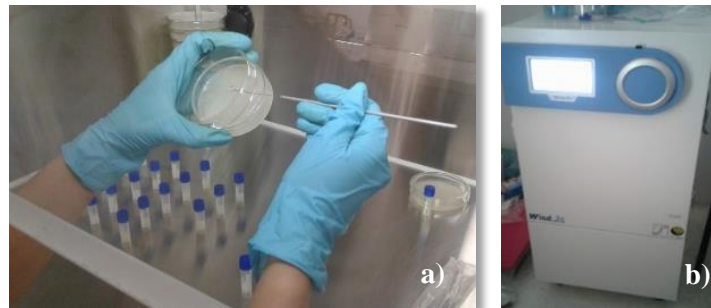


**Figura 18.** Representación esquemática de Siembra por triple estría.

##### 6.4.1. Crioconservación de cepas en caldo nutritivo con glicerol y skim milk al 30%

Se sembró por superficie en Ashbys Mannitol Agar una colonia de cada cepa aislada, las cuales fueron incubadas por 3 días a 30°C. El cultivo obtenido fue depositado en crioviales (Ver Figura 19a) que contenían 1 ml de caldo nutritivo preparado con glicerol y skim milk al 30% (Ver Anexo 2), los crioviales que

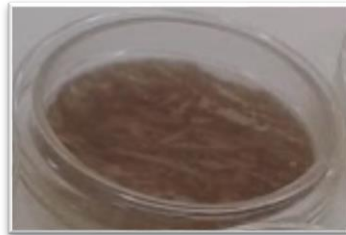
contenían las cepas a conservar se almacenaron en un Freezer Wisd a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se preservaron en el banco de cepas del Laboratorio de Ciencias Básicas del Centro Agroindustrial la Angustura (Ver Figura 19b).



**Figura 19.** Criopreservación de cepas aisladas. a) Inoculación de cepas en caldo nutritivo con glicerol y skim milk, b) Freezer Wisd a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 6.4.2. Pigmentación de los aislamientos

Las colonias de cada cepa aislada fueron sembradas en Ashbys Mannitol Agar por superficie y después de 7 días de incubación se presentó pigmentación como se observa en la Figura 20 en que se muestra la coloración café para la cepa A2.



**Figura 20.** Coloración en Ashbys Mannitol Agar de la cepa A2.T.

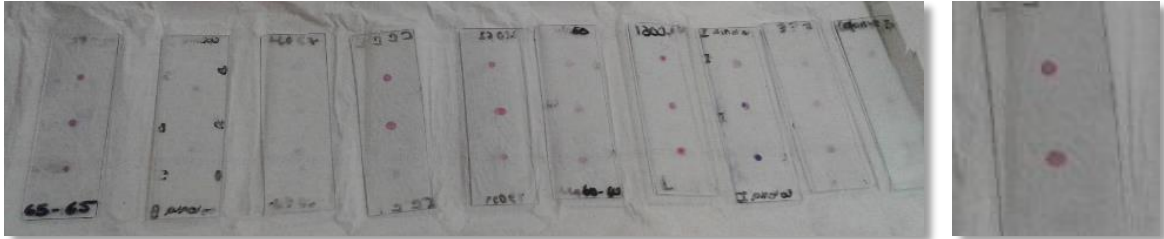
#### 6.5. CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA

Del cultivo en Ashbys Mannitol Agar se observó de las cepas aisladas las características de crecimiento de las colonias a nivel macroscópico, reportando características tales como, color, forma, borde, relieve, tamaño y consistencia; estas se presentaron bajo la clasificación establecida por (Toro, 2005).

#### 6.6. CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA

A través de la Tinción Gram se realizó una primera clasificación de las colonias aisladas crecidas en Ashbys Mannitol Agar. La tinción se llevó a cabo de acuerdo a la metodología establecida por el IGAC (2006), la cual establece que a partir de un cultivo de 72 h a  $30^{\circ}\text{C}$ , se tomó una colonia y se hace un frotis en un portaobjetos totalmente estéril con para fijarlo. La película bacteriana se cubrió con cristal violeta, permitiendo la reacción durante 1 min. Luego se lavó ligeramente con agua el portaobjetos inclinado durante pocos segundos. Posteriormente se agregó lugol, durante un minuto. Se lavó ligeramente con agua el portaobjetos inclinandolo durante pocos minutos. A continuación, se cubrió con una película de etanol (95 %) sobre el portaobjetos inclinado durante un período no mayor a 30 segundos hasta que ya no se observó

ninguna coloración violeta. Luego se enjuago ligeramente con agua el portaobjetos inclinado con el fin de eliminar el etanol, y se cubrió el portaobjetos con fucsina durante 3 minutos. Finalmente se dejó secar para poder ser observadas en el microscopio y poder determinar colores, morfología y agrupación de las células (Figura 21).



**Figura 21.** Porta objetos con colonias teñidas para ser observadas en microscopio.

## 6.7. PRUEBAS BIOQUÍMICAS PRIMARIAS

### 6.7.1. Catalasa

Esta prueba bioquímica se implementó para comprobar la presencia del enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. Con un asa platino de aro se transfirió una colonia pura de 72 horas y se depositó en un portaobjetos totalmente estéril. Después se agregó con una pipeta Pasteur una gota de  $H_2O_2$  al 30%. La presencia de gas o efervescencia indica positivo para catalasa.



**Figura 22.** Montaje prueba de catalasa

### 6.7.2. Oxidasa

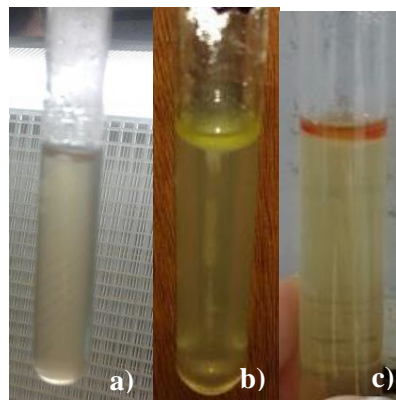
El procedimiento consistió en transferir con un asa de siembra estéril una colonia pura de 72 horas a tiras de papel que contienen reactivo para amino-N-dimetil-anilina. La coloración azul indico resultado positivo para oxidasa.



**Figura 23.** Prueba positiva de oxidasa

### 6.7.3. Prueba De Sulfuro Indol Movilidad (SIM)

Esta prueba se utiliza para determinar si la bacteria a través de triptofanasas puede degradar el triptófano a indol, si hay producción de  $H_2S$  a partir de aminoácidos azufrados y comprobar si el microorganismo es móvil. La prueba se realizó en tubos de ensayo 13x100 mm con 5 ml de medio de cultivo SIM (Ver Anexo 4), haciendo una siembra por punzación profunda usando un aza recta, abarcando un tercio de la profundidad del medio de cultivo desde la superficie (Ver Figura 24a), y posteriormente se llevó a incubación por 72 horas a 30 °C. Para movilidad, se reportó como resultado positivo la presencia de turbidez más allá de la línea de crecimiento; y un crecimiento localizado solamente en la línea de siembra se reportó como resultado de movilidad negativo. En la producción de sulfuros se tuvo en cuenta la presencia de precipitados de color oscuro y para el indol se agregó unas gotas de reactivo de Kovacs (alcohol isoamilo, *p*-dimetilaminobenzaldehído y ácido clorhídrico concentrado) con el que el indol producido reacciona generando una coloración rosa intensa (Ver Figura 24c) en la superficie del caldo de cultivo siendo positiva la prueba y negativo si no se genera coloración alguna (Ver Figura 24b).



**Figura 24.** Prueba de Sulfuro Indol Movilidad (SIM). a) Montaje de la prueba, b) resultado negativo (-) para indol y c) resultado positivo para indol.

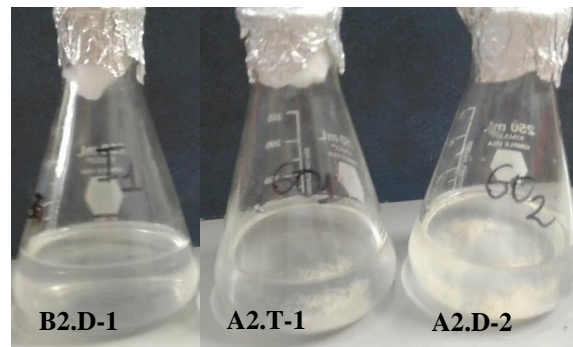
### 6.8. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA POR KIT BBL CRYSTAL E/NF

La caracterización bioquímica se llevó a cabo utilizando el kit BBL CRYSTAL E/ NF. Para ello se tomó una colonia pura y se depositó en el tubo del inoculo del kit, luego se agito e incubo por 24 horas, después de este tiempo se examinan los pocillos para observar cambios de color (Ver Anexo 5). Los cambios de color se producen como resultado de actividades metabólicas de los microorganismos.

### 6.9. EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA DE LAS CEPAS DE MICROORGANISMOS POTENCIALMENTE FIJADORES DE NITRÓGENO EN EL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE MARACUYÁ

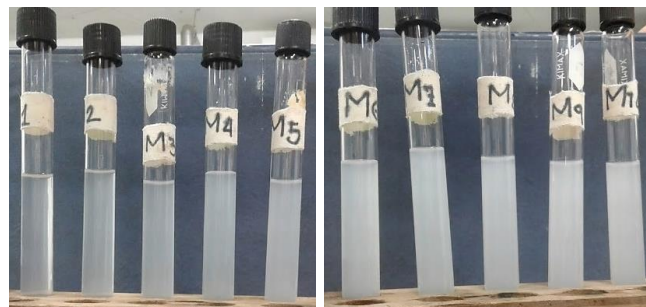
#### 6.9.1. Preparación de los inóculos bacterianos

Las cepas B2.D y A2.T fueron seleccionadas como inóculos para ser evaluadas en el bioensayo; dichas cepas se activaron de aquellas que se encontraban crioconservadas y mediante la siembra por superficie en medio Ashbys Mannitol Agar se obtuvo el cultivo microbiano tras incubarlo por 3 días a 30 °C.

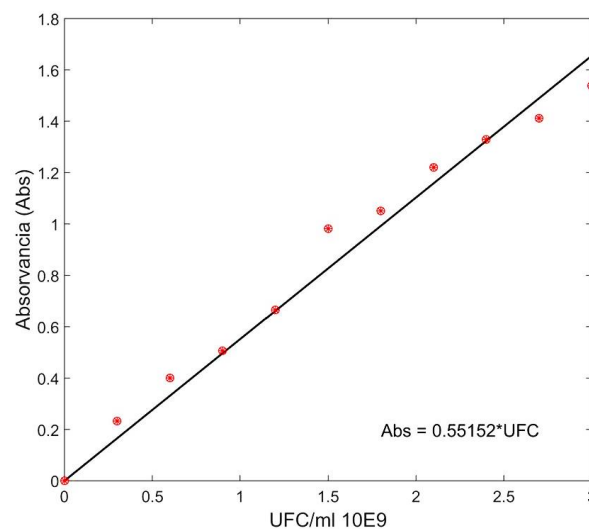


**Figura 25.** Montaje de preparación de solución con la cepa bacteriana a inocular.

La preparación del inóculo se realizó al tomar el cultivo y mezclarlo en 100 ml de solución salina al 0.86% estéril, esta solución se agitó de forma constante con agitador recíproco (EBERBACH) durante 3 días para liberar las células del exopolisacárido, preparando 3 inóculos bacterianos con diferente concentración de microorganismos (Ver Figura 25), para la cepa A2.T se tomaron dos concentraciones la primera con una caja del cultivo bacteriano, la segunda con dos, y en el caso de la cepa B2.D tan solo se tomó una caja. Al momento de la inoculación se determinó el crecimiento bacteriano por espectrofotometría en el equipo DR 5000™ UV-Vis a 560 nm y se midió la concentración con referencia a la curva establecida con los estándares de turbidez de McFarland.



**Figura 26.** Patrones de MacFarland.



**Figura 27.** Curva de calibración de turbidez de MacFarland.



En el espectrofotómetro se calibro la curva con los patrones de turbidez de McFarland (Ver Figura 26), generando la curva de calibración que se muestra en la Figura 27.

### 6.9.2. Montaje del bioensayo con semillas de maracuyá

Se llevaron a cabo 4 tratamientos en base a las concentraciones y las cepas seleccionadas. El suelo (Tierra especial de Jarditec) previamente esterilizado en autoclave a 121° C por 20 minutos, se inoculo aplicando 100 ml del caldo bacteriano diluido para 700 g de suelo que contenía cada bandeja, el inoculante fue diluido con agua común a razón de 5 ml de caldo de cultivo bacteriano y 95 ml de agua. Por otro lado, las semillas no recibieron ningún tipo de tratamiento adicional a la imbibición de agua por 24 horas antes de la siembra. Finalmente, se sembraron 32 semillas por bandeja, una semilla en cada alvéolo y una bandeja para cada tratamiento (Ver Figura 28).



Figura 28. Montaje del bioensayo con semillas de maracuyá.

### 6.9.3. Efecto de las bacterias con potencial promotor del crecimiento en plántulas de maracuyá

Para la determinación del efecto de las bacterias con potencial promotor del crecimiento en plántulas de maracuyá se evaluaron 6 parámetros, diámetro del tallo (DT), número de hojas (NH), altura del tallo (AL), longitud de la raíz principal (LR), peso fresco total (PF) y peso seco total (PS). Los parámetros se midieron en etapa de vivero correspondiente a la fase vegetativa 1 del cultivo de maracuyá en la cual la plántula emerge, registrando valores entre el día 15 al 35 del ciclo vegetativo en intervalos de 5 días tomando muestras por triplicado para cada tratamiento (Ver Figura 29).



Figura 29. Evaluación del efecto de las bacterias con potencial promotor del crecimiento de maracuyá.

## 6.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

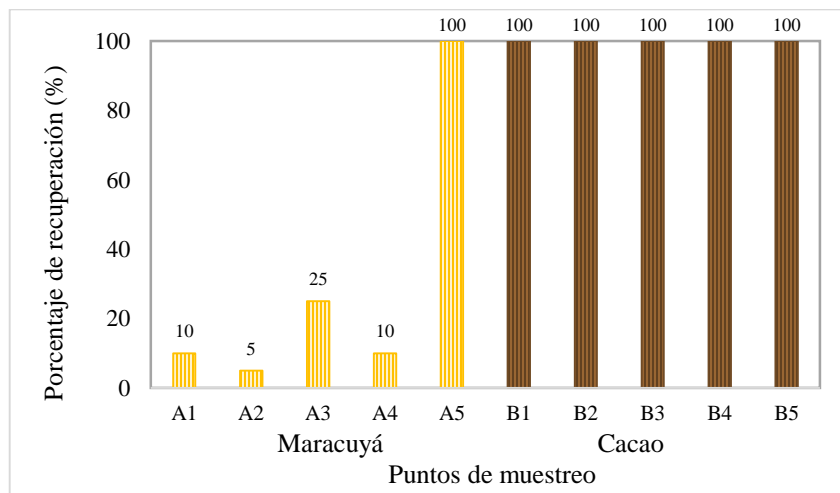
El análisis de los parámetros fisicoquímicos del suelo se llevó a cabo mediante un análisis de varianza ANOVA simple con ayuda del software de análisis de datos estadístico y gráfico Statgraphics Centurion XVI con el fin de observar si se presentaban diferencias significativas en los parámetros evaluados entre los cultivos; además se realizó un análisis de regresión multivariable empleando el software Matlab R.2010b, y mediante la matriz de correlación se determinó el coeficiente de correlación entre los parámetros, para finalmente por regresión lineal aplicando el método de mínimos cuadrados determinar la ecuación característica que relaciona los parámetros químicos con el crecimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno para cada cultivo. En cuanto al análisis del bioensayo con plántulas de maracuyá se realizaron pruebas de ANOVA multifactorial para observar las interacciones de la incidencia en el crecimiento de las plantas con el tipo de tratamiento en el tiempo. Las diferencias entre medias fueron consideradas significativas cuando  $p < 0.05$ ; en todos los casos se utilizó la prueba de análisis de medias e intervalos de Fisher (LSD), con un nivel de confianza del 95%.



## 7. RESULTADOS

### 7.1. PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN MÉTODO DE TERRÓN PARA BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO

Las muestras resultaron positivas a la presencia de microorganismos fijadores de nitrógeno al aplicar la técnica de terrones de suelo como se observa en la Figura 30. Al transcurrir el tiempo de incubación se formaron halos transparentes alrededor de algunos gránulos consecuencia de la solubilización del carbonato de calcio presente en el medio de cultivo Ashbys Mannitol Agar (Guzmán et al., 2012). Todos los puntos de muestreo en el cultivo de cacao presentaron un porcentaje de recuperación del 100 %. Caso contrario ocurrió en el cultivo de maracuyá el cual presentó un porcentaje de recuperación promedio del 30%; muy similar a los resultados obtenidos por Jiménez, (2007) en donde reportó un porcentaje de recuperación promedio de 36.4% en cultivos como zanahoria, tomate, brócoli entre otros. Lo que podría indicar que en el cacao comparado con el maracuyá y con lo reportado por dicho estudio posiblemente tiene una mayor presencia de microorganismos fijadores de nitrógeno.

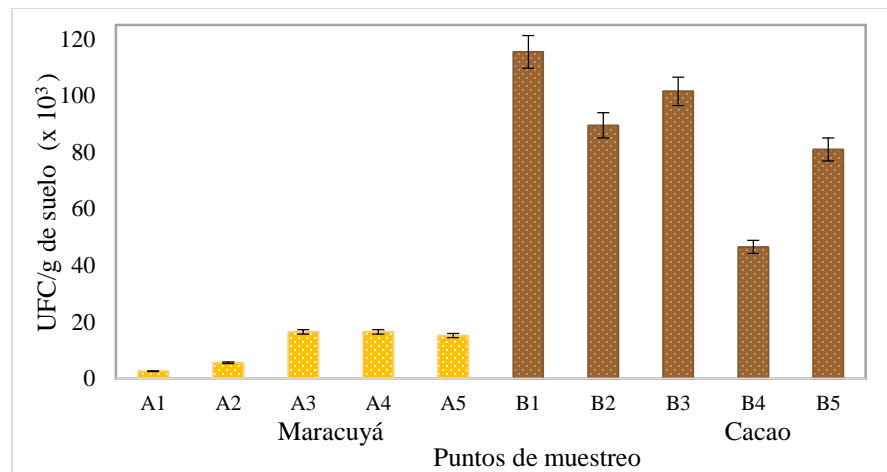


**Figura 30.** Porcentaje de recuperación por terrones para cada punto de muestreo.

### 7.2. AISLAMIENTO Y CRECIMIENTO DE BACTERIAS POTENCIALMENTE FIJADORAS DE NITRÓGENO

Dado que en todas las muestras se presentó crecimiento poblacional de diazótrofos por técnica de terrones, se procedió a realizar la técnica de diluciones en todos los puntos. El crecimiento de microorganismos potencialmente fijadores de nitrógeno, aislados por técnica de diluciones seriadas y sembrados en el medio de cultivo Ashbys Mannitol Agar, fue notablemente mayor en el cultivo de cacao con respecto al cultivo de maracuyá al transcurrir los 5 días de incubación, como se ve expresado en un mayor recuento (UFC/g de suelo) para los cultivos bacterianos obtenidos a partir de las muestras de suelo provenientes del cultivo de cacao, tal como se observa en la Figura 31.

El recuento de la población microbiana en promedio fue de  $86.8 \times 10^3$  y  $11.2 \times 10^3$  UFC/g de suelo para el cultivo de cacao y maracuyá respectivamente, la mayor presencia poblacional (UFC/g de suelo) encontrada en cacao concuerda con el porcentaje de recuperación donde los puntos correspondientes a este cultivo fueron mayores con respecto al cultivo de maracuyá. Esto se puede deber a las condiciones en las que se encontraba el cultivo de cacao, pues este contaba con una proporción de hojarascas mucho mayor, la cual favorece el incremento de la materia orgánica del suelo, contribuyendo al establecimiento de una alta cantidad de biomasa microbiana.



**Figura 31.** Unidades formadoras de colonia por gramo de suelo (UFC/g) para cada punto de muestreo.

Los resultados obtenidos en el crecimiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno en el medio de cultivo Ashbys, fueron menores en comparación a los reportados por Chennappa et al. (2014), quienes aislaron diazótrofos del cultivo de arroz con un crecimiento en dicho medio entre  $0.8 \times 10^4$  y  $2.0 \times 10^5$  UFC/g de suelo, de acuerdo a esto se podría inferir que existe una relación entre el crecimiento de bacterias diazótroficas con las condiciones propias del suelo de procedencia de las muestras.

### 7.3. CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO DE VIDA LIBRE

Se aislaron 10 cepas de microorganismos diazótrofos, las cuales se codificaron con el nombre del punto de muestreo en que se obtuvieron seguido de las letras D o T, estas últimas hacen alusión al tipo de aislamiento del cual provienen, 'D' referente a la técnica de dilución y 'T' a la siembra directa por terrones.

Los morfotipos de colonia encontrados se describen en la Tabla 6, en general se observó el crecimiento de colonias translúcidas mucilaginosas con elevación convexa, de tamaño mediano y pequeño; así mismo la forma de las colonias varía desde circulares, fusiforme hasta irregulares. El color translucido de las colonias obtenidas es concordante con lo descrito en el manual de Bergey's en el que se indica para las especies del género *Azotobacter* pueden ser grisácea, blanco o translúcido (Breed, Murray, y Smith, 1957). Así mismo, las colonias crecidas en medio con carbohidratos, en este caso manitol, presentan una apariencia brillante con elevación debido a la abundancia del material capsular (Madigan et al., 1999).

**Tabla 6.** Morfología de las colonias encontradas para las cepas aisladas.

Muestra	Forma	Borde	Tamaño (mm)
A1.T	Fusiforme	Ondulado	0.7
A1.D	Fusiforme	Entero	1
A2.T	Irregular	Ondulado	1.3
A4.T	Fusiforme	Ondulado	1.2
A5.T	Irregular	Ondulado	2.4
B2.T	Fusiforme	Ondulado	1.1
B2.D	Fusiforme	Ondulado	0.8
B3.T	Irregular	Ondulado	1.6
B4.D	Circular	Entero	3
B5.D	Fusiforme	Entero	3

A: Maracuyá, B: Cacao, Número: Posición del punto de muestreo, D: Aislada por diluciones seriadas, T: Aislada por terrón de suelo.

El complejo nitrogenasa es extremadamente sensible al oxígeno, de forma que queda rápidamente inactivado ante la presencia de este gas; por tal motivo bacterias diazótrofes del género *Azotobacter* al ser aerobias poseen mecanismos para la protección de este complejo enzimático; tales como, eliminar rápidamente el O<sub>2</sub> por una tasa alta de respiración, produciendo capas mucilaginosas que retardan la entrada del oxígeno a la célula (Madigan et al., 1999) y la protección conformacional en la cual la nitrogenasa se une con proteínas protectoras (Castillo et al., 2005). La característica de formar grandes capsulas y capas mucoides de este género bacteriano se observó en las cepas aisladas (Ver Figura 32), esta información se ha corroborado por Jiménez (2007) en su estudio “Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de *Azotobacter spp.* mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal 16S”, encontrando colonias mucilaginosas traslucidas que efectivamente mediante secuenciación del gen 16S correspondían a dicho género, estos resultados de morfología de las colonias son congruentes con los obtenidos en la presente investigación.



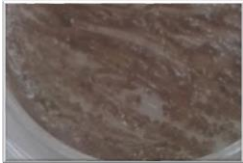


**Figura 32.** Morfología de la colonia de la cepa.

Al transcurrir 7 días de incubación a 30°C se observó la pigmentación de las cepas aisladas en Ashbys Mannitol Agar (Ver Anexo 3); como se muestra en la Tabla 7, las cepas A2.T evidenciaron una coloración café un poco más oscura que la cepa A1.T, pigmentación típica de *Azotobacter chroococcum* y *Azotobacter indicus*, especies que pueden tomar una coloración marrón oscuro o pigmento negro y marrón claro respectivamente; para el caso de las cepas A4.T y B2.D no generaron pigmentos en el medio de cultivo, por

consiguiente se relacionan estas probablemente a *Azotobacter agilis* que no reporta pigmentación (Breed et al., 1957); la pigmentación amarilla observada en la cepa A1.D es característico en *Azotobacter Vinelandii* (Jiménez, 2007).

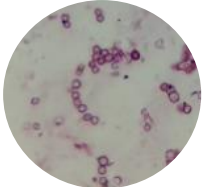
**Tabla 7.** Pigmentación producida por las colonias en Ashbys Mannitol Agar.

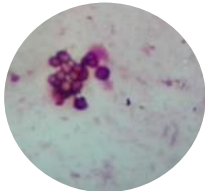
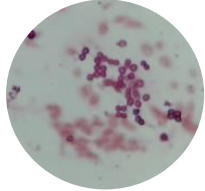
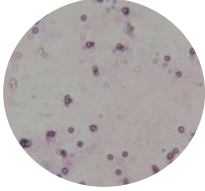
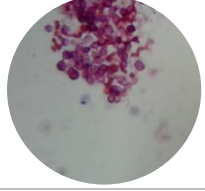


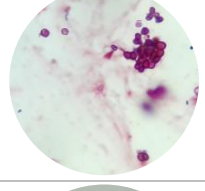
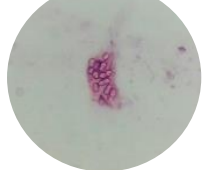
Cepa	Pigmentación	Color
A1.T		Café
A1.D		Amarillo
A2.T		Café

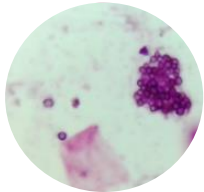
A: Maracuyá, Número: Posición del punto de muestreo, D: Aislada por diluciones seriadas, T: Aislada por terrón de suelo.

Las bacterias pertenecientes a *Azotobacter* son Gram negativas (Breed et al., 1957) y el pleomorfismo es común en este grupo, habiéndose descrito una gran variedad de formas celulares (Madigan et al., 1999). De las muestras analizadas se obtuvieron 10 cepas Gram negativas, de las cuales un 60% son cocos agrupados en diplococos, estreptococos, estafilococos, y sarcinas; el otro 30 % son cocobacilares y tan solo una cepa aislada del cultivo de cacao correspondiente al 10 % de las encontradas, presento forma bacilar, como se muestra en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Caracterización microscópica de la morfología bacteriana de las cepas potencialmente fijadoras de nitrógeno.

Cepa	Tinción Gram	Descripción
A1.T		Cocos Gram negativos, agrupados en cadenas

Cepa	Tinción Gram	Descripción
A1.D		Cocobacilos Gram negativos, agrupados en forma de Estafilococos
A2.T		Cocos Gram negativos, agrupados en cadenas
A4.T		Cocos Gram negativos
A5.T		Cocos Gram negativos, agrupados en cadenas
B2.T		Cocobacilos Gram negativos, agrupados en forma de Sarcinas
B2.D		Cocobacilos Gram negativos agrupados en forma de Diplococos
B3.T		Cocos Gram negativos agrupados en forma de Sarcinas
B4.D		Bacilos Gram negativos

Cepa	Tinción Gram	Descripción
B5.D		Cocos Gram negativos agrupados en forma de Sarcinas

A: Maracuyá, B: Cacao, Número: Posición del punto de muestreo, D: Aislada por diluciones seriadas, T: Aislada por terrón de suelo.

En cuanto a las pruebas bioquímicas primarias, se obtuvo en la prueba cualitativa de indol que los morfotipos aislados de suelo rizosférico, presentaron diferencias en la capacidad para producir este compuesto; se formó un anillo de color rojo intenso en el morfotipos A4.T, A5.T, B2.T, B2.D, B3.T e incoloro en las cepas A1.T, A1.D, A2., B4.D, B5.D. Según Salgado, (2006), la formación de un anillo de color rojo es indicio de la presencia de índoles. Para especies del genero *Azotobacter*, Kasa, Modugapalem, y Battini (2015) reportan que son indol positivo, lo que quiere decir que poseen la enzima triptofanasa y son capaces de hidrolizar y deaminar triptófano con la producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco.

Las especies de *Azotobacter* en general presentan movilidad por medio de numerosos flagelos peritricos, sin embargo, en especies como *Azotobacter agilis* no siempre son móviles (Breed et al., 1957); de acuerdo a esto el 40% de las cepas caracterizadas presentaron movilidad (Ver Tabla 9) concordante con los resultados obtenidos por (Kasa et al., 2015) (2015); el 60% restante de las cepas no son móviles, similar a los resultados reportados por Guzmán et al. (2012) para este género. Estos resultados permiten destacar la importancia de las características fenotípicas propias de estos microorganismos, debido a que algunos autores indican que la falta de motilidad por parte de algunas especies de *Azotobacter* puede ser benéfico cuando se realizan inoculaciones en semilla o raíz, ya que se asegura su establecimiento y desarrollo en el sitio de inoculación (Van Veen y Heijnen, 1994).

**Tabla 9.** Resultado de pruebas bioquímicas primarias

Muestra	Indol	Movilidad	H <sub>2</sub> S	Catalasa	Oxidasa
A1.T	-	-	-	+	+
A1.D	-	-	-	+	+
A2.T	-	+	-	+	+
A4.T	+	+	-	+	+
A5.T	+	-	-	+	+
B2.T	+	-	-	+	+
B2.D	+	-	-	+	+
B3.T	+	+	-	+	+
B4.D	-	-	-	+	+
B5.D	-	+	-	+	+

A: Maracuyá, B: Cacao, Número: Posición del punto de muestreo, D: Aislada por diluciones seriadas, T: Aislada por terrón de suelo.

Por otro lado, las cepas asiladas resultaron ser oxidasa y catalasa positivo, características propias del genero *Azotobacter*; la reacción favorable a la catalasa en el mencionado genero, evidencia las ventajas ceñidas a este proceso bioquímico. Según Dobbelaere et al. (2003), algunas enzimas antioxidantes como la superóxido





Ingrediente activo	A1.D	A1.T	A2.T	A4.T	A5.T	B2.D	B2.T	B3.T	B4.D	B5.D
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ácido malónico	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Cloruro de trifenil tetrazolio	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginina	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
Lisina	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+

A: Maracuyá, B: Cacao, Número: Posición del punto de muestreo, D: Aislada por diluciones seriadas, T: Aislada por terrón de suelo.

También se evidencia la capacidad que tienen la mayoría de los aislamientos, el 80 % de las cepas caracterizadas, para hidrolizar la urea a amonio y utilizarla como fuente de nitrógeno. Según Holt et al., (1994), se ha determinado que la urea puede ser hidrolizada y ser empleada como fuente de amonio por diversas bacterias; además que la actividad de la ureasa, es importante para los microorganismos que viven en suelos ácidos (pH 4), porque los protege de condiciones adversas (Castellanos y Ramos, 2014).

En cuanto a la degradación de la glicina, Rivera et al. (2010) encontraron que herbicidas como el Glifosato (N-(fosfonometil) glicina) no mostraron un efecto negativo sobre la viabilidad de *A. chroococcum*, lo cual permite el uso de dicha bacteria como biofertilizante sin restricciones; además de reportarse *Azotobacter sp.* entre los organismos degradadores de plaguicidas, señaladas de utilizarlos como sustratos, ya sea metabolizando las moléculas o usándolas como nutriente y fuente de energía. De las cepas aisladas, el 30% degradan la glicina, lo cual podría sugerir que estas bacterias poseen esta característica estudiada en *A. chroococcum* y su uso como potenciales biofertilizantes se podría generarse sin producir antagonismos con el mencionado herbicida; de estos microorganismos, 2 son aislados de la cepa A1, que además presentan la pigmentación típica de esta especie bacteriana.

Por otro lado, el 80% de las cepas resultaron ser positivo en la hidrólisis de p-n-p-N-acetil glucosamidina; las  $\beta$ -glucosidasas son enzimas que poseen actividad hidrolítica y transferasa o transglucosidasa, poseen diversas aplicaciones en la biosíntesis de oligosacáridos, producción de etanol utilizando residuos agrícolas y en la industria de vinos (Alarcón, Alarcón, Manríquez, Siles, y Aliaga, 2011).

Los aminoácidos pueden inhibir la actividad de la nitrogenasa, ya que son fuentes de nitrógeno y no todos los aminoácidos son metabolizados por las bacterias de la misma manera; para el caso de L-lisina y L-arginina se utilizan para crecer y no afectan a la actividad de la enzima nitrogenasa, pero en el caso de L-serina y L-alanina inhiben la actividad de esta enzima (Massena, dos Santos, Dos, y Teixeira, 2006). El 80 % de las cepas bacterianas caracterizadas a través del catabolismo anaerobio (comprende la degradación de moléculas orgánicas en ausencia de oxígeno); tienen la capacidad de metabolizar los aminoácidos de lisina y arginina, este comportamiento metabólico se puede deber a lo anteriormente mencionado, en donde los aislados bacterianos podrían emplear los aminoácidos L-lisina y L-arginina como fuente de nitrógeno en condiciones anaerobias para su crecimiento, del tal manera que no se altere la actividad del complejo enzimático en la fijación biológica del nitrógeno.

Finalmente el 40% de las cepas tienen la capacidad de producir desaminación oxidativa de la L-fenilalanina; dicho aminoácido se puede transformar, por medio de una reacción catalizada por la enzima fenilalanina hidroxilasa, en tirosina. La presencia de las enzimas del grupo de las hidroxilasas permiten que especies como *Azotobacter chroococcum* degraden plaguicidas cloro-aromáticos contaminantes como el Endosulfan (Flores, González, Aguilar, y Rodríguez, 2015).

#### 7.4.RELACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS DEL SUELO CON EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS POTENCIALMENTE FIJADORAS DE NITRÓGENO

En la Tabla 11 y Tabla 12 se muestran los resultados obtenidos en el análisis de los parámetros químicos y físicos del suelo respectivamente; de acuerdo a estos, se tiene que el cultivo de maracuyá presenta un pH, % carbono, CIC más bajos en comparación al suelo en cacao. Este se caracterizó por tener mayor concentración de carbono orgánico y una mayor presencia poblacional de microorganismos fijadores como se mencionó anteriormente. En conjunto estos factores podrían contribuir a una mayor dinámica de nutrientes por medio de la descomposición de la materia orgánica presente a formas más simples para efectos de su inmovilización y mineralización (Mantilla-Paredes et al., 2009), de esta manera se da una mejor aireación en la capa superficial del suelo mejorando su estructura física (microambiente ideal para la colonización de bacterias aerobias potencialmente fijadoras) (Cardona 2004).

**Tabla 11.** Propiedades químicas del suelo evaluadas en los puntos de muestro para los cultivos de maracuyá y cacao.

Puntos de muestreo	pH	Carbono (%)	CIC (meq/100g)	P (ppm)	S (ppm)	B (ppm)	Fe (mg/kg)
A1	5	1.193	8.368	91.748	20.997	0.864	34.500
A2	5.8	1.336	5.706	87.843	13.482	0.384	32.510
A3	6	1.645	8.152	12.190	14.037	0.888	26.000
A4	5.3	1.520	5.339	88.544	23.357	0.744	31.640
A5	6.5	1.472	1.526	34.271	7.043	0.312	37.580
B1	7.1	4.145	10.332	41.182	16.443	0.624	29.968
B2	6.6	5.973	17.065	9.524	14.088	0.792	31.965
B3	6.9	4.768	11.925	10.661	11.562	0.936	31.194
B4	6.7	3.663	8.829	8.147	9.450	0.336	25.194
B5	6.9	5.070	13.868	8.964	13.458	0.576	32.322

A: Maracuyá, B: Cacao, Número: Posición del punto de muestreo.

En cuanto a las propiedades físicas, los suelos analizados son franco arenosos (FA), en maracuyá se presentan suelos ligeros y por su valor de densidad aparente un poco por encima de 1.6 g/cc y porosidad baja indica que es un suelo pesado, ligeramente compactado y por consiguiente con pocos espacios porosos. Por otro lado el suelo dedicado a la producción cacaotera presenta una densidad aparente cercana a la unidad lo que indica presencia de buenos niveles de materia orgánica, una mayor porosidad que permite un mejor drenaje y aireación del suelo, catalogándolo como un suelo ideal para la agricultura.

**Tabla 12.** Propiedades físicas del suelo evaluadas en los puntos de muestreo para los cultivos de maracuyá y cacao.

Puntos de muestreo	%Arenas	%Arcillas	%Limos	Dr (g/cc)	Da (g/cc)	Porosidad (%)
A1	79.5	11.7	8.8	2.12	1.63	23.113
A2	79.5	12.7	7.8	2.12	1.63	23.113
A3	74.5	13.7	11.9	2.12	1.63	23.113
A4	78.5	13.7	7.8	2.6	1.63	37.308
A5	79.5	11.7	8.8	2.65	1.63	38.491
B1	80.5	10.7	8.8	1.92	1.27	33.854

Puntos de muestreo	%Arenas	%Arcillas	%Limos	Dr (g/cc)	Da (g/cc)	Porosidad (%)
<b>B2</b>	78.5	11.7	9.8	1.75	1.27	27.429
<b>B3</b>	79.5	11.7	8.8	1.87	1.27	32.086
<b>B4</b>	79.5	11.7	8.8	2.57	1.27	50.584
<b>B5</b>	79.5	10.7	9.8	2.43	1.27	47.737

A: Maracuyá, B: Cacao, Número: Posición del punto de muestreo.

Por otro lado, se realizó un análisis de varianza con el fin de observar si se presentaban diferencias significativas de las medias de cada uno de los parámetros analizados entre cultivos, debido a que el suelo es heterogéneo y las condiciones de manejo en cada cultivo estudiado son diferente, se analizó las correlaciones para cada cultivo por separado. El pH del suelo oscilo entre el rango de 5 a 6.5 y 6.6 a 7.1 para maracuyá y cacao respectivamente, presentando un crecimiento de la población microbiana menor en maracuyá con respecto al cultivo de cacao, esto se debe a que los géneros, como es el caso de *Azotobacter* que tiene un crecimiento óptimo en pH neutros, entre 7.2 y 8.2. (Ver Figura 33a).

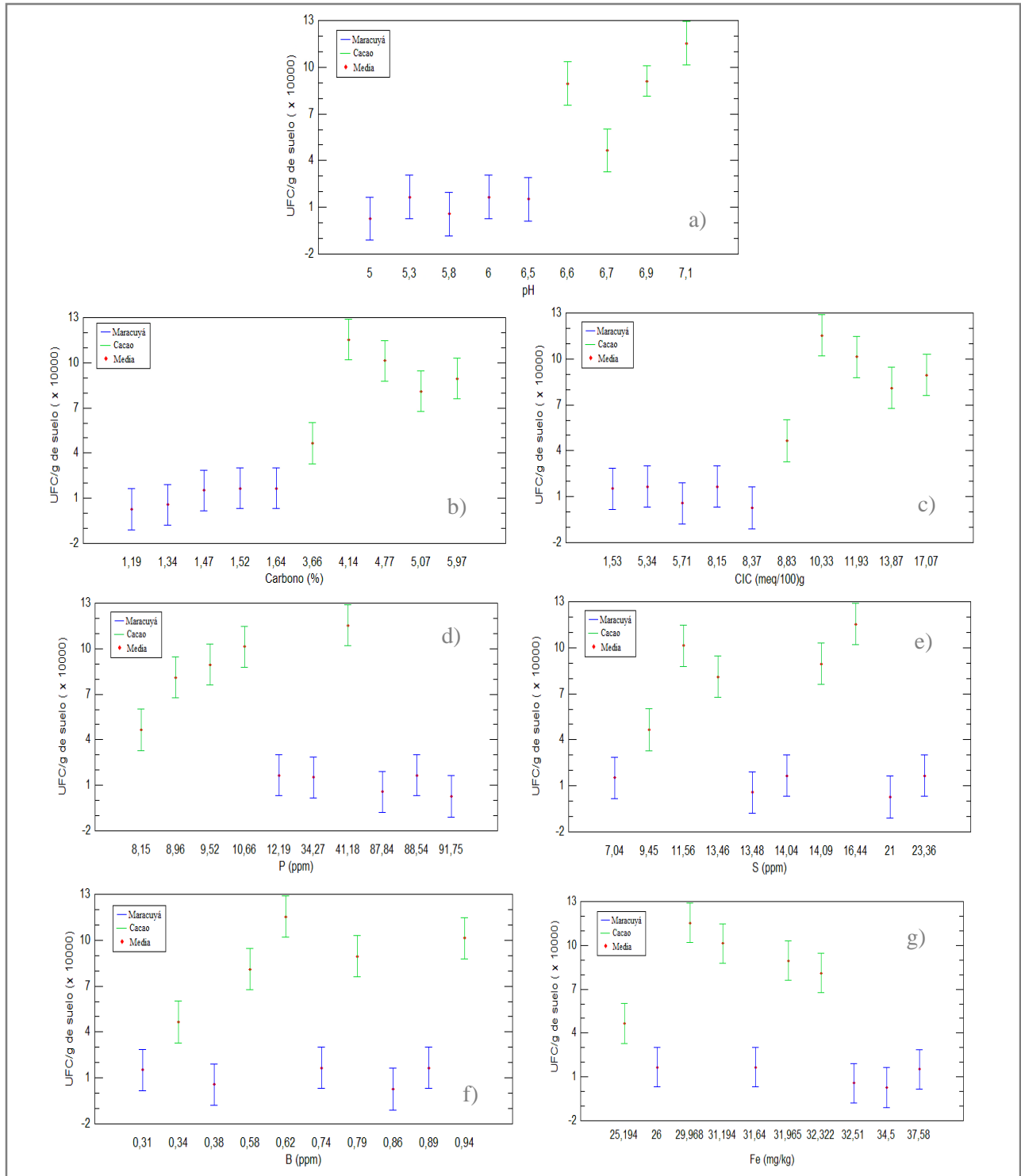
En el caso del carbono, el suelo cultivado con maracuyá presenta en promedio 1.433 % de Carbono orgánico (CO), este varía entre 1.193 a 1.645 %; así mismo, el suelo dedicado a cacao tiene en promedio 4.724 % de CO y varía entre 4.145 a 5.973 % CO. Debido a que el cacao esta implementado como cultivo tradicional y el de maracuyá se encuentra bajo producción, esto pudiese indicar un agotamiento progresivo de los niveles de materia orgánica del suelo (MOS) en los niveles de producción intensiva.

En la Figura 33 se presenta el comportamiento de las medias con la diferencia mínima significativa (LSD) al 95% de confianza, en estas se muestra como las medias entre cultivos no se traslapan, lo cual podría indicar que se presentan diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento con respecto a las condiciones químicas del suelo para cacao y maracuyá.

En la Tabla 13 se presenta la matriz de correlación de los parámetros analizados referentes al cultivo de maracuyá, en la que se encontraron las correlaciones que posee el crecimiento de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno con las variables químicas determinadas; se obtuvo una correlación lineal directa muy alta entre el crecimiento con el porcentaje de carbono (0.94), correlación alta inversa entre el crecimiento bacteriano con el fosforo (-0.64), correlación moderada directa entre el crecimiento con el pH (0.52), correlación baja inversa para la capacidad de intercambio catiónico (-0.39), hierro (-0.32) y azufre (-0.21), y por ultimo una correlación muy baja con el boro (0.01).

**Tabla 13.** Matriz de correlación para los parámetros en el cultivo de maracuyá.

	pH	Carbono	CIC	P	S	B	Fe	UFC/g
pH	1	0.53	-0.67	-0.76	-0.94	-0.64	0.11	0.52
Carbono	0.53	1	-0.16	-0.74	-0.24	0.11	-0.58	0.94
CIC	-0.67	-0.16	1	0.15	0.60	0.84	-0.67	-0.39
P	-0.76	-0.74	0.15	1	0.65	-0.01	0.35	-0.64
S	-0.94	-0.24	0.60	0.65	1	0.70	-0.26	-0.21
B	-0.64	0.11	0.84	-0.01	0.70	1	-0.63	0.01
Fe	0.11	-0.58	-0.67	0.35	-0.26	-0.63	1	-0.32
UFC/g	0.52	0.94	-0.39	-0.64	-0.21	0.01	-0.32	1



**Figura 33.** Medias e intervalos basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un 95% de confianza relacionando el crecimiento bacteriano con los parámetros químicos analizados a) pH, b) carbono, c) Capacidad de intercambio catiónico, d) fósforo, e) azufre, f) boro y g) hierro.

De lo anterior se deduce que para el crecimiento de los microorganismos diazotófos los parámetros químicos de mayor incidencia son el porcentaje de carbono, fósforo y el pH. Esto debido a que el fósforo por ejemplo, estimula el metabolismo del carbono, la manipulación y la fijación de nitrógeno (Sabra et al., 1999); por otro lado, el carbono orgánico estimula el metabolismo de los microorganismos ya que al tener buena disponibilidad de carbohidratos que facilitan el crecimiento de estas bacterias fijadoras de nitrógeno. El modelo matemático que describe el comportamiento del crecimiento bacteriano en maracuyá partiendo de las condiciones químicas del suelo se presenta en la Ecuación 3.

**Ecuación 3.** Modelo matemático que relaciona el crecimiento microbiano de bacterias aisladas del cultivo de maracuyá en función de parámetros químicos del suelo.

$$\frac{UFC}{g} = 5874.24324 \text{ pH} - 2267.82435 \text{ CIC} - 138.215516 \text{ P} + 1271.13004 \text{ S} - 631.390794 \text{ Fe}$$

La matriz de correlación de los parámetros analizados en el cultivo de cacao se presenta en la Tabla 14, en esta se encontró una correlación directa muy alta entre el crecimiento bacteriano con el azufre (0.8), seguida de una correlación alta directa entre el crecimiento con el boro (0.72), hierro (0.67), fósforo (0.66) y pH (0.64); así mismo una correlación baja directa del crecimiento con carbono (0.31) y Capacidad de intercambio catiónico (0.24); por consiguiente las variables de mayor incidencia en el crecimiento son el azufre, boro, hierro, fósforo y el pH del suelo. En la Ecuación 4 se muestra el modelo matemático obtenido que describe el comportamiento del crecimiento bacteriano en cacao partiendo de las condiciones químicas del suelo.

**Tabla 14.** Matriz de correlación para los parámetros en el cultivo de cacao.

	pH	Carbono	CIC	P	S	B	Fe	UFC/g
pH	1	-0.40	-0.44	0.76	0.52	0.09	0.18	0.64
Carbono	-0.40	1	0.99	-0.34	0.34	0.64	0.82	0.31
CIC	-0.44	0.99	1	-0.34	0.35	0.55	0.78	0.24
P	0.76	-0.34	-0.34	1	0.74	-0.01	0.01	0.66
S	0.52	0.34	0.35	0.74	1	0.31	0.60	0.80
B	0.09	0.64	0.55	-0.01	0.31	1	0.74	0.72
Fe	0.18	0.82	0.78	0.01	0.60	0.74	1	0.67
UFC/g	0.64	0.31	0.24	0.66	0.80	0.72	0.67	1

**Ecuación 4.** Modelo matemático que relaciona el crecimiento microbiano de bacterias aisladas del cultivo de cacao en función de parámetros químicos del suelo.

$$\frac{UFC}{g} = -24384.3233 \text{ pH} + 4745.0903 \text{ CIC} + 4418.65189 \text{ P} - 19098.6736 \text{ S} + 12402.3288 \text{ Fe}$$

## 7.5.EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA DE LAS CEPAS DE MICROORGANISMOS POTENCIALMENTE FIJADORES DE NITRÓGENO EN EL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE MARACUYÁ

En la Tabla 15 se pueden observar los resultados de concentración para cada tratamiento con bacterias fijadoras de nitrógeno obtenidos a partir de la escala de turbidez de McFarland. La mayor concentración fue la obtenida por la cepa A2T-2 con  $0.63 \times 10^9$  UFC/ml; cabe resaltar que este resultado nos brinda una aproximación en la cantidad de microorganismos que se van a inocular; sin embargo, no se garantiza que dicha cantidad sea de bacterias viables. A partir de la absorbancia generada por las suspensiones de los inóculos se determinaron las UFC/ml mediante la ecuación del ajuste en la curva de McFarland.

**Tabla 15.** Concentración de microorganismos por turbidez de McFarland.

Tratamiento	Cepa	Concentración (UFC/ml $\times 10^9$ )
Testigo	-	-
T1	A2.T-1	0.33
T2	A2.T-2	0.63
T3	B2.D-1	0.11

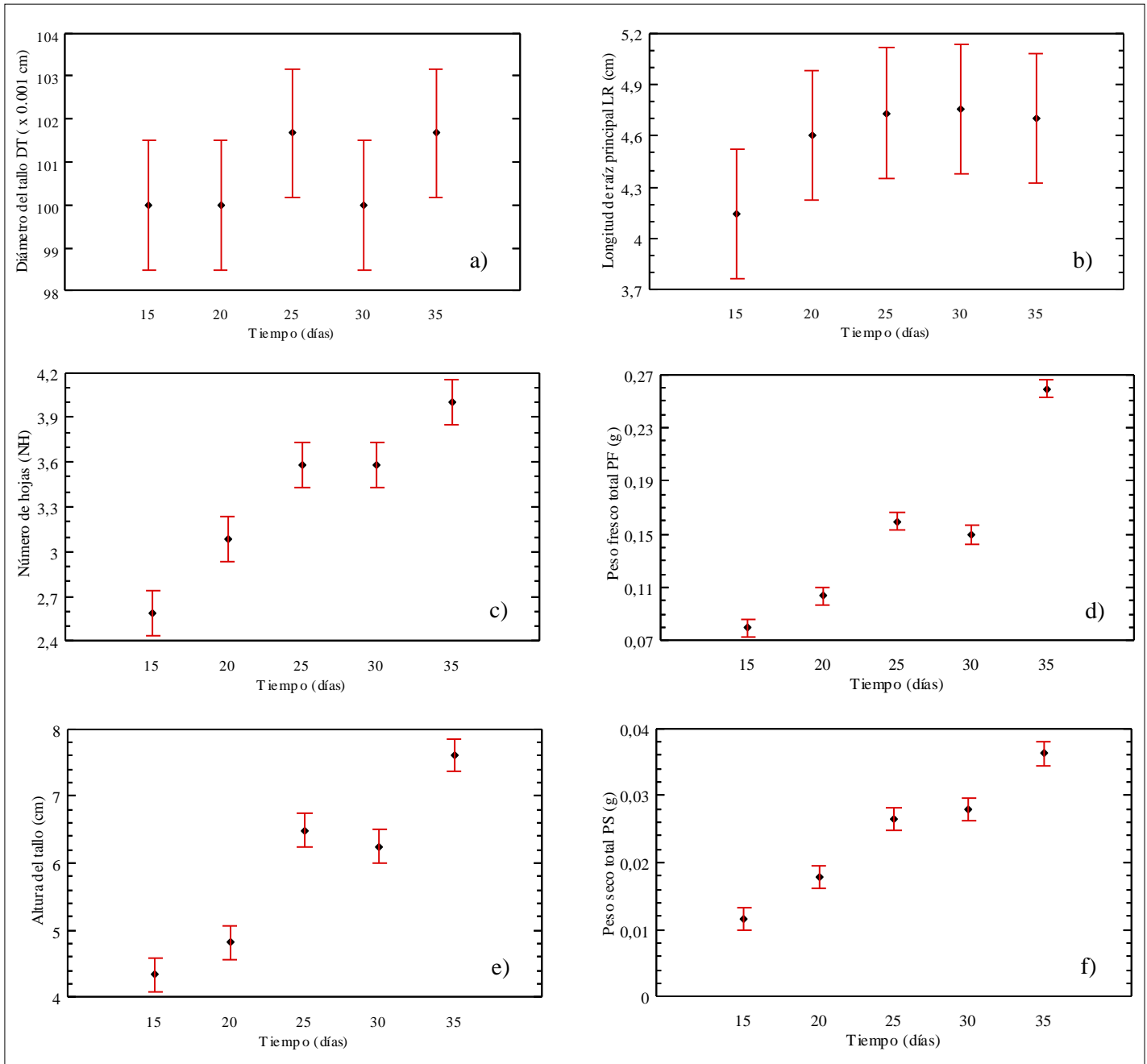
A: Maracuyá, B: Cacao, Número: Posición del punto de muestreo, D: Aislada por diluciones seriadas y T: Aislada por terrón de suelo.

Los resultados de los análisis biométricos se muestran en la Figura 34, y corresponden al valor promedio de cada parámetro en el tiempo. Para el caso del diámetro de tallo (cm). Se evaluó este parámetro entre los 15 a 35 días del ciclo vegetativo en todos los tratamientos, encontrándose que esta variable no presentó un incremento y se mantuvo en 0.1 cm; por consiguiente no se presentó diferencias significativas entre los tratamientos (Ver Figura 34a).

La longitud de la raíz principal (cm) no presentó diferencias significativas durante el tiempo evaluado según las medias de Fisher (Ver Figura 34b); sin embargo, si se aprecian diferencias en el comportamiento de respuesta de los tratamientos (Ver Figura 38); así mismo, en la cantidad de hojas (No.) se observó el brote de las hojas cotiledonales paralelamente en todos los tratamientos durante este tiempo y no se presentaron diferencias significativas en este parámetro (Ver Figura 34c).

Por otro lado, el peso fresco total (g) evidencio diferencias significativas en el tiempo evaluado exceptuando el periodo que comprende los 25 y 30 días en donde no presentó diferencias según el análisis de medias e intervalos de Fisher (Ver Figura 34d); como también se observó que a medida que transcurre el tiempo la altura del tallo (cm) aumenta independientemente del tratamiento o testigo evaluado con una excepción en los 25 y 30 días del ensayo, como se puede muestra en la Figura 34e. En lo referente al peso seco de las plantas (g) se presentó un incremento constante en el tiempo; no obstante, a los 25 y 30 días no se presentó diferencias significativas en las medias de los tratamientos (Ver Figura 34f).

Los resultados de la investigación demostraron que los parámetros biométricos más representativos para cada uno de los tratamientos, son los correspondientes a peso seco, peso fresco, altura de tallo y longitud de raíz principal.

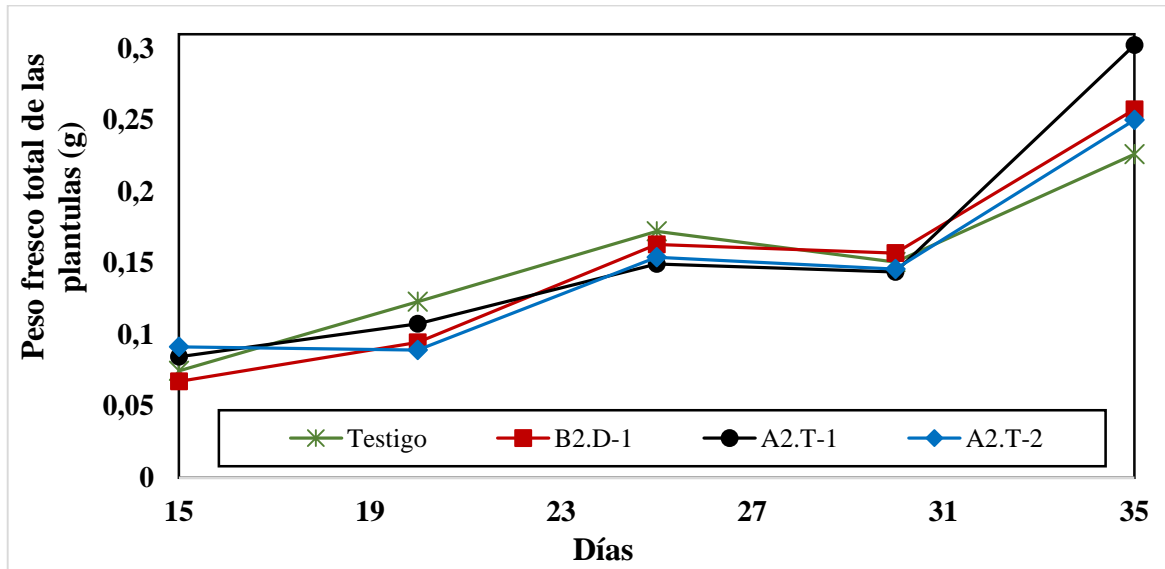


**Figura 34.** Medias e intervalos basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un 95% de confianza relacionando los parámetros de crecimiento evaluados en plántulas de maracuyá. a) Diámetro del tallo (DT), b) longitud de la raíz principal (LR), c) número de hojas (NH), d) peso fresco total (PF), e) altura del tallo (AT) y f) peso seco total (PS).

Se denota un aumento en el peso fresco total (PF) de las plántulas de maracuyá al transcurrir el tiempo, con una tendencia similar en todos los tratamientos como se muestra en la Figura 35. En los 25 y 30 días no se

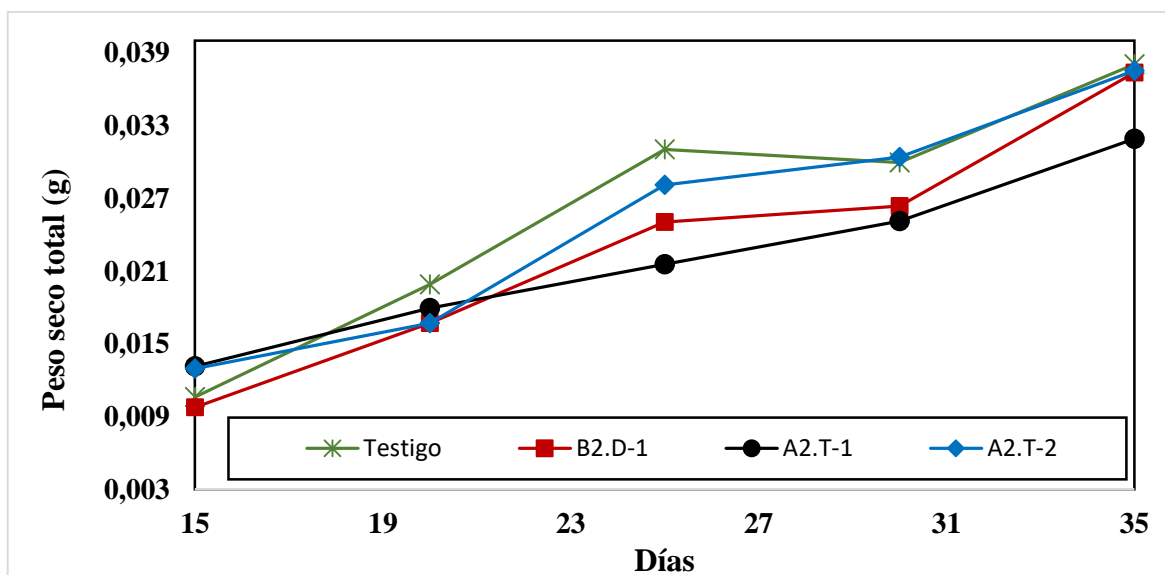


observó una diferencia significativa en el peso; sin embargo, al final del ensayo los tratamientos inoculados por bacterias fijadoras resultaron tener un mayor peso fresco frente al tratamiento testigo, siendo mayor para el tratamiento inoculado con la cepa A2.T-1 (0.30 g).



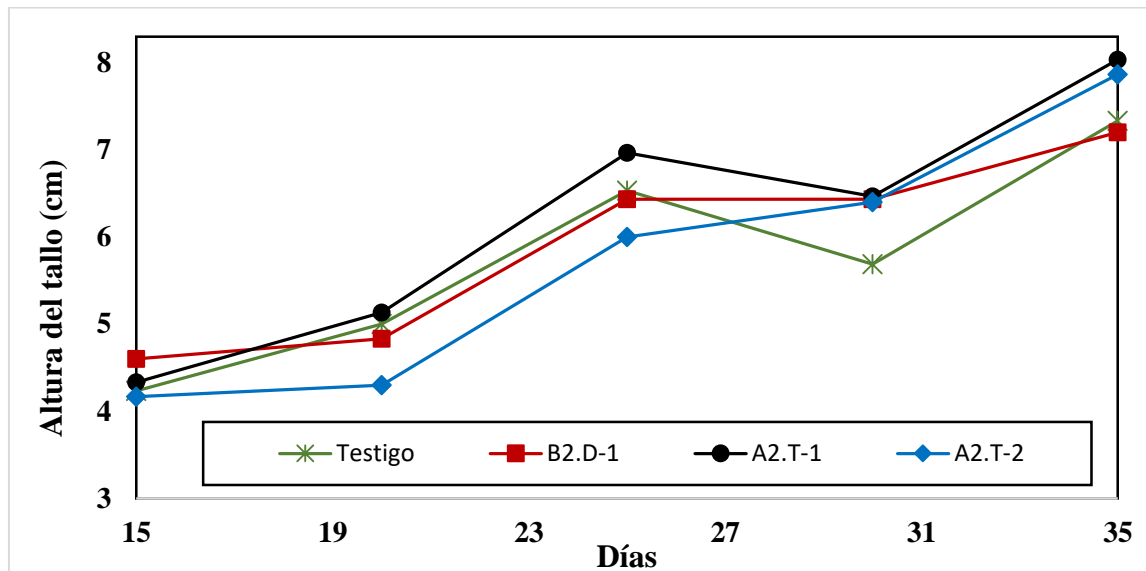
**Figura 35.** Variación de peso fresco total en plántulas de maracuyá para los diferentes tratamientos.

Al igual que el peso fresco, el peso seco total (PS) presentó un incremento durante el desarrollo vegetativo de las plántulas de maracuyá (Ver Figura 36); sin embargo, contrario al parámetro anterior al final del ensayo, el mayor peso seco lo obtuvo el tratamiento testigo (0.038 g) y el menor peso fue el inoculado por la cepa A2.T-1 (0.037 g). Lo anterior puede sugerir que esta diferencia entre peso fresco a peso seco puede deberse a la evaporación de agua y volatilización de algunos nutrientes.



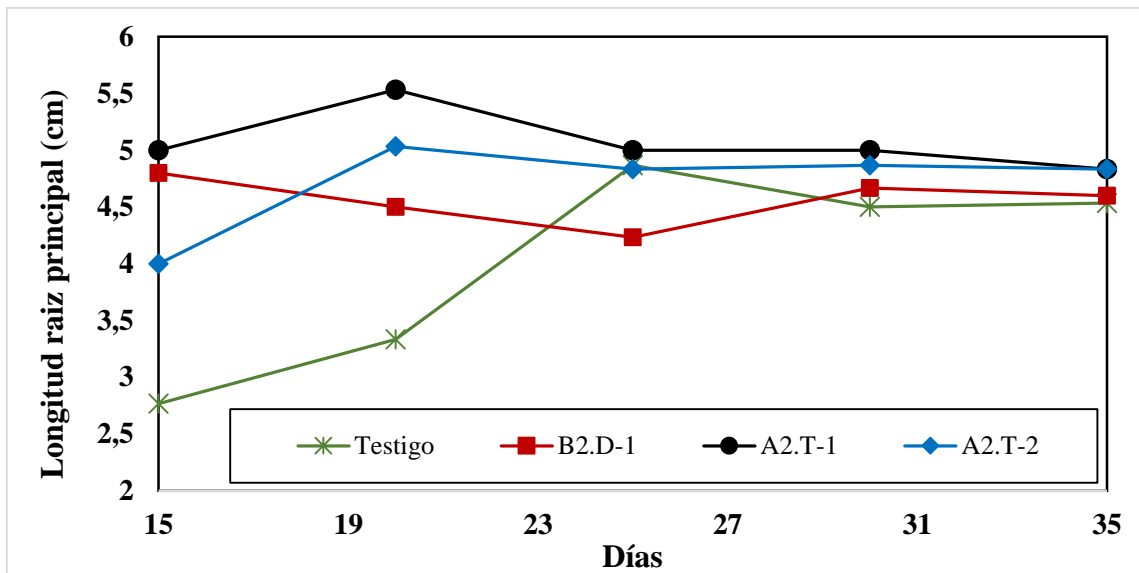
**Figura 36.** Variación del peso seco total en plántulas de maracuyá para los diferentes tratamientos.

Los tratamientos A2.T-1 y A2.T-2 presentaron mayor longitud del tallo con un valor superior a 7.9 cm en promedio, en comparación con los demás tratamientos cuyos valores fueron inferiores a 7.3cm al final del bioensayo (Ver Figura 37). El aumento en el tamaño de la planta en suelo inoculado con las cepas, evidencia el efecto positivo que ejercen sobre las plántulas de maracuyá, lo que permite inferir que estos microorganismos estimulan la eficiencia de las plantas en la acumulación de reservas para posteriores estadios como la floración (Borrego *et al.*, 2000).



**Figura 37.** Variación de la altura del tallo en plántulas de maracuyá para los diferentes tratamientos.

Los valores de la longitud de la raíz principal en los tratamientos con inoculo, fueron mayores que el testigo en los primeros 20 días del ensayo, a los 25 días presentaron una leve disminución para finalmente estabilizarse hasta el final del bioensayo (Ver Figura 38). La promoción del crecimiento por las bacterias estimula la densidad y longitud de los pelos radicales aumentando así la cantidad de raíces en las plantas; se incrementa la capacidad de absorción de agua y nutrientes, y permite que las plantas sean más vigorosas, productivas y tolerantes a condiciones climáticas adversas Díaz, et al, (2001); sin embargo, no se pudo observar este crecimiento de la raíz, esto pudo deberse a que en el bioensayo, las plántulas crecieron bajo la restricción de espacio proporcionado por el alveolo.



**Figura 38.** Variación de la longitud de la raíz principal en plántulas de maracuyá para los diferentes tratamientos.

Finalmente, la aplicación de los bioinoculante al suelo permite aumentar la población microbiana presente en la rizosfera, contribuyendo a una mayor actividad nutricional para las plantas (Alfonso et al., 2005), como una alternativa amigable con el ambiente.

## 8. CONCLUSIONES

Los microorganismos aislados fueron catalasa y oxidasa positivo, de morfología coco y bacilar, Gram negativos, agrupados en cadenas y sarcinas.

Las cepas A1.T y A2.T mostraron pigmentación café y la cepa A1.D pigmentos de color amarillo, indicando que posiblemente fuesen *A. chroococcum* y *A. Vinelandii* respectivamente.

Los morfotipos de colonia de las cepas bacterianas aisladas en medio selectivo Ashbys Mannitol Agar fueron colonias translucidas, mucilaginosas con elevación convexa, de tamaño mediano y pequeño; con forma que varía desde circulares, fusiforme hasta irregulares.

El porcentaje de carbono en el suelo del cultivo de maracuyá fue el parámetro de mayor influencia (correlación de 0.94) en la presencia poblacional de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno para dicho cultivo. Por otro lado, el azufre presentó una correlación (0.8) para el cultivo de cacao con relación al crecimiento de microorganismos diazotófos en el suelo de cacao como parámetro más influyente.

El Anova multifactorial ( $-P < 0.05$ ) indicó que los tratamientos tienen un efecto estadísticamente significativo sobre los parámetros AT, LR, PF y PS en el tiempo; contrario en los parámetros DT y NH, donde los tratamientos no presentaron una incidencia significativa ( $-P < 0.05$ ).

Las cepas A2.D y B2.T aisladas y clasificadas como posibles fijadoras de nitrógeno, presentaron potencial como bacterias promotoras del crecimiento vegetal al ser evaluado su accionar sobre el desarrollo de plántulas de maracuyá. Adicionalmente, la cepa A2.T-1 aislada del cultivo de maracuyá, evidenció un estímulo en el aumento de la altura del tallo de las plántulas evaluadas en el bioensayo con respecto a las plántulas testigo en un 8 durante el periodo evaluado en el presente estudio.

## 9. RECOMENDACIONES

Determinar molecularmente la especie a la que pertenecen los microorganismos utilizados en el presente estudio.

Realizar bioensayos en todo el ciclo fenológico del cultivo de maracuyá en campo, para determinar el efecto de los microorganismos en el aumento de la producción y en las variables de crecimiento tales como, peso fresco y seco total, altura del tallo, longitud de la raíz principal, área foliar y color.

Es necesario realizar estudios sobre la capacidad fijadora de nitrógeno y la capacidad productora de hormonas vegetales de las bacterias para poder seleccionar las de mejor rendimiento.

Realizar un estudio en el que se determine el efecto como biofertilizantes de las cepas A1 y B4 que degradan la glicina, evaluando posteriormente el efecto de algunos herbicidas sobre la viabilidad de estas.

A pesar de los numerosos estudios que mencionan el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno (en especial de *Azotobacter*) de diferentes ambientes, se espera que el presente estudio brinde una visión de la importancia que poseen las bacterias de este género debido al uso actual y potencial de las mismas como PGPR y recurso biotecnológico. Además de eso que sea una línea base en la incursión a la industria agrícola, la implementación de bioinoculantes para mejora de los rendimientos en cultivos productivos del Huila, como lo es el maracuyá.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Ahemad, M., y Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1), 1–20. <http://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Alarcón, E. C., Alarcón, E. C., Manríquez, N. R., Siles, E. T., y Aliaga, M. T. Á. (2011). Producción de  $\beta$ -glucosidasas por cultivos de bacterias termófilas indígenas del altiplano boliviano. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(1), 66–72. Retrieved from <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/22940>
- Alfonso, E. T., Leyva, Á., y Hernández, A. (2005). Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 7(2), 47–54. Retrieved from <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/498/893>
- Álvarez, C. L. (2012). *Identificación y caracterización bioquímica, morfológica y molecular de microorganismos cultivables asociados a la rizosfera y al sustrato de plantas de vainilla*. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/6848/>
- Aquilanti, L., Favilli, F., y Clementi, F. (2004). Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(9), 1475–1483. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.04.024>
- Argüello-Navarro, A. Z., y Moreno-Rozo, L. Y. (2014). Evaluación del potencial biofertilizante de bacterias diazótroficas aisladas de suelos con cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta Agronómica*, 63(3), 1–9.
- Barea, J.-M., Pozo, M. J., Azcón, R., y Azcón, C. (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56(417), 1761–1778. <http://doi.org/10.1093/jxb/eri197>
- Becton Dickinson and Company. (2015). *BBL™ Crystal™ Identification Systems, Enteric/Nonfermenter ID Kit*.
- Breed, R. S., Murray, E. G. D., y Smith, N. R. (1957). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Igarss 2014. <http://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Bruijn, F. J. De. (2015). One Hundred Years Discovery of Nitrogen-Fixing Rhizobacteria. In *Diazotrophic Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Nonlegumes Nitrogen-Fixing Rhizobacteria AND NON-SYMBIOTIC NITROGEN*.
- Bruinsma, J. (2003). *World agriculture: Towards 2015/2030 an FAO perspective*. Rome.
- Camelo, R. M. (2010). *Desarrollo tecnológico de un biofertilizante con base en la bacteria diazotrófica Azotobacter chroococcum*.
- Cárdenas, R., Sánchez, J. M., Farías, R., y Peña, J. . (2004). Los aportes de nitrógeno en la agricultura. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 10(2), 173–178.
- Carvajal, J., y Mera, A. C. (2010). Fertilización biológica: técnicas de vanguardia para el desarrollo agrícola sostenible. *Producción + Limpia*, 5 (2):77.

- Castellanos, J., y Ramos, Y. (2014). Caracterización de bacterias oxidadoras de amonio aisladas del humedal de la planta de tratamiento de aguas residuales de la Universidad de Boyacá. *Investigación, Innovación E Ingeniería*, (1), 82–94.
- Castillo, F., Roldán, M. D., Blasco, R., Huertas, M. J., Caballero, F. J., Moreno, C., y Martínez, M. (2005). *Biotecnología ambiental*.
- Chennappa, G., Adkar, C. R., Suraj, U., Tamilvendan, K., y Sreenivasa, M. Y. (2014). Pesticide tolerant Azotobacter isolates from paddy growing areas of northern Karnataka, India. *World J Microbiol Biotechnol*, 30, 1–7. <http://doi.org/10.1007/s11274-013-1412-3>
- Clavijo, C., Chipana, V., Centeno, J., Zúñiga, D., y Guillén, C. (2002). Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias diazotróficas de la rizósfera del cultivo de Olea europea “Olivo” en Tacna Perú. *Ecología Aplicada*, 11(2), 89–102. Retrieved from <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v11n2/a06v11n2.pdf>
- Corpoica. (2001). *Frutales de clima cálido*.
- Díaz, P., Ferrera, R., Almaraz, J. J., y Alcántar, G. (2001). Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal en lechuga. *Terra Latinoamericana*, 19(4), 327–335. Retrieved from <http://www.chapingo.mx/terra/contenido/19/4/art327-335.pdf>
- Escobar, C., Horna, Y., Carreño, C., y 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, 39–49.
- FAO. (2015). *World fertilizer trends and outlook to 2018*. Food and Agriculture Organization of United Nations.
- FAO. (2016). Capítulo 3- Los fertilizantes, en cuanto contaminantes del agua. Retrieved December 15, 2016, from <http://www.fao.org/docrep/W2598S/w2598s05.htm>
- Fernández, M., de María, N., y de Felipe, M. R. (2002). Fijación biológica de nitrógeno : factores limitantes. *Ciencia Y Medio Ambiente - CCMA - CSIC*, 195–202.
- Fernández Olmos, A., García de la Fuente, C., Saéz Nieto, J. A., y Valdezate Ramos, S. (2010). *Metodos de Identificacion Bacteriana en el Laboratorio de Microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica* (Vol. 37). <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Flores, A. C., Contreras, J. C., Reyes, M. H., y Rodríguez, R. (2012). Aislamiento e identificación de cepas nativas del suelo mexicano del género Azotobacter. *Revista Científica de La Universidad Autónoma de Coahuila*, 4(8), 32–41.
- Flores, A. C., González, V., Aguilar, C., y Rodríguez, R. (2015). Azotobacter : una bacteria con potencial como biofertilizante eco-amigable. In *Biofertilizantes microbianos*.
- García Torres, M. A. (2002). Maracuyá Amarillo, 3–31.
- Gobernación del Huila. (2006). *Manual técnico del cultivo de maracuya (Passiflora edulis L) en el departamento del Huila* (Vol. Primera Ed).
- Gustavo, E. (1986). *Curso sobre el cultivo de cacao*.
- Guzmán, A., Obando, M., Rivera, D., y Bonilla, R. (2012). Selección y caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón (Gossypium hirsutum).



- Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 182–190. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fuay&AN=85945255&lang=es&site=ehost-live>
- HiMedia Laboratories. (2015). Ashbys Mannitol Agar. *Technical Data*.
- IGAC. (2006). *Métodos analíticos del laboratorio de suelos*.
- Jara, S. T. (2015). *Caracterización e identificación de cepas nativas del género Azotobacter y su efecto en co-inoculación con Rhizobium en tomate de mesa*.
- Jiménez, D. J. (2007). *Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de Azotobacter spp. mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal 16S*.
- Kasa, P., Modugapalem, H., y Battini, K. (2015). Isolation, screening, and molecular characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolates of Azotobacter and Trichoderma and their beneficial activities. *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine*, 6(2), 360–363. <http://doi.org/10.4103/0976-9668.160006>
- Laboratorios Britania S.A. (2015). Simmons Citrato Agar, 2.
- Lara, C., Lara Mantilla, C., García Támara, L. P., García, L. P., Oviedo, L. E., y Oviedo Zumaqué, L. E. (2010). Medio de cultivo utilizando residuos-sólidos para el crecimiento de una bacteria nativa con potencial biofertilizante. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1), 103–112.
- Lara, C., Liliana, G. T., y Oviedo, L. E. (2011). Efecto biofertilizante del preparado: residuos vegetales-bacteria nativa diazotrofa, sobre las variables biométricas en plántulas de Rhanus sativus. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(1), 156–162.
- Lara, C., Villalba, M., y Oviedo, L. E. (2007). Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(2), 6–14. Retrieved from <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/711>
- Madigan, M., Martinko, J., y Parker, J. (1999). *Brock, Biología de los microorganismos*. Retrieved from <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=AGRINLP.xis&method=postyformato=2&ycantidad=1&yexpresion=mf&n=001145>
- Mantilla-Paredes, A. J., Cardona, G. I., Peña-Venegas, C. P., Murcia, U., Rodríguez, M., y Zambrano, M. M. (2009). 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*, 57(4), 915–927.
- Martínez, E., López, M. G., Ormeño, E., y Moles, A. C. (2013). Manual teórico-práctico Los Biofertilizantes y su uso en la Agricultura.
- Martínez, V. R. (2002). Biofertilización y producción agrícola sostenible. Retos y perspectivas. In *XIII Congreso Científico del INCA. Programa y resúmenes*.
- Massena, V., y dos Santos, K. R. (2015). Nitrogen fixing bacteria in the family Acetobacteraceae and their role in agriculture. *Journal of Basic Microbiology*, 55, 931–949. <http://doi.org/10.1002/jobm.201400898>
- Massena, V., dos Santos, K. R., Dos, R., y Teixeira, S. (2006). Fixação Biológica de Nitrogênio – Estado da Arte. *Miolo\_Biota.pmd*, 151–180.

- Mayz, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista Científica UDO Agrícola*, 4(1), 1–20.
- Moreno, L., y Galvis, F. (2013). Biofertilizer potential of diazotrophic bacteria isolated from samples of rhizospheric soil. *Pastos Y Forrajes*, 36(1), 38–42.
- Moreno, L. Y., y Galvis, F. (2013). Potencial biofertilizante de bacterias diazótropas aisladas de muestras de suelo rizosférico. *Pastos Y Forrajes*, 36(1), 33–37. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fuayAN=91532603&lang=es&site=ehost-live>
- Obando, D. M. (2012). *Respuesta fisiológica del frijol Caupí (Vigna unguiculata (L.) Walp) a la coinoculación de bacterias diazotróficas de los generos Azotobacter y Rhizobium en suelos del departamento del Cesar.*
- Obando, D. M., Burgos, L. B., Rivera, D. M., Rubiano, M. F., Divan, V. L., y Bonilla, R. R. (2010). Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus sp.*) en Codazzi, Cesar (Colombia). *Acta Biol. Colomb.*, 15(3), 107–120.
- Oxoid Microbiology Products. (2016a). CM0435, S.I.M. Medium | Oxoid - Product Detail. Retrieved December 23, 2016, from [http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM0435y](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0435y)
- Oxoid Microbiology Products. (2016b). CM1135, infusión cerebro corazón CALDO | Oxoid - Detalle de los productos. Retrieved December 23, 2016, from [http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM1135yorg=3yc=UK&lang=EN](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1135yorg=3yc=UK&lang=EN)
- Paredes, A. (1989). *El cultivo del cacao.*
- Pascual, J. A., Moreno, J., Ros, M., y Vargas, M. del C. (2015). *Aspectos biológicos de la estabilización aeróbica.*
- Pérez, J. P. (2014). *Uso de los fertilizantes y su impacto en la producción agrícola.* Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/39459/1/71782231.2014.pdf>
- Rao, S. (1977). *Soil Microorganisms and Plant Growth.* Oxford and IBH Publishing Co., India.
- Rengel, Z., y Marschner, P. (2005). Nutrient availability and management in the rhizosphere: Exploiting genotypic differences. *New Phytologist*, 168(2), 305–312. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01558.x>
- Reyes, I., y Valery, A. (2007). Efecto de la fertilidad del suelo sobre la Microbiota y la Promoción del Crecimiento del Maíz (*Zea mays L.*) con *azotobacter spp.* *Bioagro*, 19(3), 117–126.
- Rivera, D., Camelo, M., Estrada, G., Obando, M., y Bonilla, R. (2010). Efecto de diferentes plaguicidas sobre el crecimiento de *Azotobacter chroococcum*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1), 94–102.
- Rojas, J., y Moreno, N. (2008). Producción y formulación de prototipos de un biofertilizante a partir de bacterias nativas asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa*). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(2), 50–62.
- Rubio, E. J. (2003). *Caracterización molecular y funcional de bacterias del género Azotobacter aisladas de suelos de la República Argentina. El rol de las auxinas en la respuesta a la inoculación de trigo.*
- Sanjuán, J., y 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. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77617786001>

Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas. (2009). *Cultivo , poscosecha y comercialización de las pasifloráceas en Colombia : maracuyá , granadilla , gulupa y curuba.*

Subba Rao. (1977). *Soil Microorganisms and Plant Growth.* India: Oxford and IBH Publishing Co.

Toro, D. R. (2005). *Manual para la introducción al laboratorio de microbiología - Google Books.* Retrieved from <https://books.google.com.co/books?id=KjwNmqlz5-YCypg=PA14ydg=clasificacion+de+la+morfologia+de+las+coloniasyhl=es-419ysa=Xyved=0ahUKEwiNtMmO4t3QAhVDRSYKHdR8B5kQ6AEIJzAC#v=onepageyq=clasificacion+de+la+morfologia+de+las+coloniasyf=false>

Varela, A., Rueda, D., y Munevar, F. (2013). Organismos del suelo. In *Ciencia del suelo principios básicos* (p. 440).

## 11. ANEXOS

### Anexo 1. Medio Ashbys Mannitol Agar (Rao, 1977).

Para su preparación se adiciona las cantidades descritas de cada uno de los componentes en 1000 ml de agua destilada, calentar hasta hervir y esterilizar en autoclave a 15 psi y 121 ° C por 15 minutos. Mezclar bien y verter en placas de petri estériles.

Componentes	g/l
Mannitol / benzoato	20
Fosfato dipotásico	0.2
Sulfato de Magnesio	0.2
Cloruro de Sodio	0.2
Sulfato de Potasio	0.1
Carbonato de Calcio	5
Agar	15

pH (25°C) = 7.4 ± 0.2

### Anexo 2. Caldo nutritivo para crioconservación de cepas de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno.

Se preparó 30 ml de caldo nutritivo BHI, para esto se utilizó 0.39 g del caldo en 30 ml de agua destilada; partiendo de esta solución se mezclaron Glicerol y Skim milk al 30% cada uno en soluciones diferentes que conforman el caldo nutritivo para la crioconservación de las cepas; la primera tomando 2.25 g de Skim milk en 15 ml de caldo BHI, y para la segunda se tomó 2.25 ml de glicerol en 12.125 ml de caldo BHI. Las dos soluciones se autoclavarón por 15 minutos a 121 ° C y posteriormente se mezclaron antes de depositar a los crioviales el inóculo.



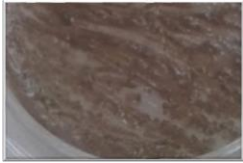





El caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI) de Oxoid™ (Oxoid Microbiology Products, 2016b) está constituido de los componentes que se describen a continuación:



Componentes	g/l
sólidos de infusión de cerebro	12.5
sólidos de infusión de corazón de res	5.0
peptona proteosa	10.0
Glucosa	2.0
Cloruro de sodio	5.0
fosfato disódico	2.5

pH 7,4 ± 0,2 @ 25 ° C

Su preparación se realiza Disolviendo 37 g en 1 litro de agua destilada, mezclar bien y esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos.

**Anexo 3. Pigmentación producida por las colonias en Ashbys Mannitol Agar.**

<b>Cepa</b>	<b>Pigmentación</b>	<b>Color</b>
<b>A1.T</b>		Café
<b>A1.D</b>		Amarillo
<b>A2.T</b>		Café
<b>A4.T</b>		Incolora
<b>A5.T</b>		Beige
<b>B2.T</b>		Beige
<b>B2.D</b>		Incolora
<b>B3.T</b>		Beige

Cepa	Pigmentación	Color
B4.D		Beige
B5.D		Beige

A: Maracuyá, B: Cacao, Número: Posición del punto de muestreo, D: Aislada por diluciones seriadas, T: Aislada por terrón de suelo.


#### Anexo 4. Medio SIM (Oxoid™)

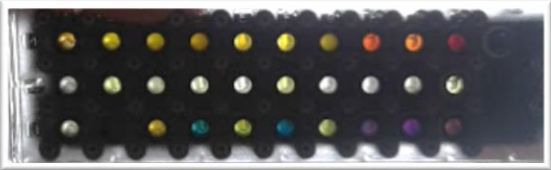





Suspender 30 g del medio en 1 litro de agua destilada y hervir para disolver completamente el medio, luego esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 ° C y por ultimo servir en tubos de ensayo (Oxoid Microbiology Products, 2016a).

Componentes	g/l
Tryptone	20.0
Peptone	6.1
Ferrous ammonium sulphate	0.2
Sodium thiosulphate	0.2
Agar	3.5



pH  $7.3 \pm 0.2$  @ 25°C

**Anexo 5. Registro fotográfico de los resultados en las reacciones generados por el comportamiento metabólico de las bacterias frente a los sustratos del kit BBL CRYSTAL E/NF.**

Cepa	Sistema BD BBL Crystal E/NF ID
A1.1	

Cepa	Sistema BD BBL Crystal E/NF ID
A1.2	
A2	
A4	
A5	
B2.1	
B2.2	
B3	



Cepa	Sistema BD BBL Crystal E/NF ID
B4	
B5	

A: Maracuyá, B: Cacao, Número: Posición del punto de muestreo.