



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

1 de 2

Neiva, 22 de noviembre del 2022

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Ciudad

El (Los) suscrito(s):

WENDY VANESSA BARRIOS LOZANO, con C.C. No. 1075296390.

WILLIAM GENTIL TRUJILLO SOLANO, con C.C. No. 1075300940.

Autor(es) de la tesis y/o trabajo de grado o titulado "**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DIAZÓTROFAS DE VIDA LIBRE PRESENTES EN UN ÁREA DEL SUELO DE UN BOSQUE DE NIEBLA PRIMARIO UBICADO EN EL PARQUE NATURAL REGIONAL CERRO PÁRAMO MIRAFLORES (PNRCPM).**" presentado y aprobado en el año 2022 como requisito para optar al título de LICENCIADO EN CIENCIAS NATURALES: FÍSICA, QUÍMICA Y BIOLOGÍA.;

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.

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
GESTIÓN DE BIBLIOTECAS



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

2 de 2

WENDY VANESSA BARRIOS LOZANO:

Firma: Wendy V. Barrios L.

WILLIAM GENTIL TRUJILLO SOLANO:

Firma: 

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DIAZÓTROFAS DE VIDA LIBRE PRESENTES EN UN ÁREA DEL SUELO DE UN BOSQUE DE NIEBLA PRIMARIO UBICADO EN EL PARQUE NATURAL REGIONAL CERRO PÁRAMO MIRAFLORES (PNRCPM)

AUTOR O AUTORES:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
BARRIOS LOZANO	WENDY VANESSA
TRUJILLO SOLANO	WILLIAM GENTIL

DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
ECHEVERRY HERNÁNDEZ	SONIA
AMOROCHO CRUZ	CLAUDIA MILENA

ASESOR (ES):

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
TORO CASTAÑO	DANIEL RICARDO
VELANDIA MATÍNEZ	YHOANA DANITZA

PARA OPTAR AL TÍTULO DE: LICENCIADO EN CIENCIAS NATURALES: FÍSICA, QUÍMICA Y BIOLOGÍA.

FACULTAD: EDUCACIÓN

PROGRAMA O POSGRADO: LICENCIATURA EN CIENCIAS NAUTAES Y EDUACIÓN AMBIENTAL.

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO

CÓDIGO

AP-BIB-FO-07

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

2 de 3

CIUDAD: NEIVA

AÑO DE PRESENTACIÓN: 2022

NÚMERO DE PÁGINAS: 112

TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):

Diagramas__ Fotografías__ Grabaciones en discos__ Ilustraciones en general__ Grabados__
Láminas__ Litografías__ Mapas__ Música impresa__ Planos__ Retratos__ Sin ilustraciones X Tablas
o Cuadros__

SOFTWARE requerido y/o especializado para la lectura del documento: **Word, Adobe Acrobat o Lector PDF**

MATERIAL ANEXO:

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

PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:

<u>Español</u>	<u>Inglés</u>
1. <u>Bacteria</u>	<u>Bacteria</u>
2. <u>Nitrógeno</u>	<u>Nitrogen</u>
3. <u>Análisis microbiológico</u>	<u>Microbiological analysis</u>
4. <u>Vegetación</u>	<u>Vegetation</u>
5. <u>Ecosistema</u>	<u>Ecosystem</u>

RESUMEN DEL CONTENIDO:

Dada la contribución ambiental que presentan los bosques de niebla y la dificultad que poseen las plantas para emplear el nitrógeno atmosférico en sus procesos esenciales, se tuvo como objetivo principal en esta investigación caracterizar las bacterias fijadoras de nitrógeno (diazótrofas) presentes en el suelo del bosque de niebla cercano al Cerro Páramo Miraflores del Huila, empleando los medios de cultivo selectivos libres de nitrógeno Nfb y Burk. Para lograrlo se le realizó un análisis microbiológico convencional a una muestra de suelo tomada en el PNRCPM, seguidamente se purificaron las bacterias cultivadas y a cada una se le estableció un perfil morfológico y bioquímico recabando la información necesaria durante la identificación y comparación de las cepas al emplear ambos medios de cultivo. En los resultados obtenidos se lograron identificar 57 bacterias diazótropas distribuidas entre los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Geobacillus*, *Clostridium*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Corynebacterium*, *Azotobacter* y *Flavobacterium* con un rango de similitud del 93 al 99.9% de acuerdo a lo propuesto en el manual de Bergey's, también se logró determinar un



índice de riqueza (D_{mg}) de 7,3 siendo mayor en Nfb que en Burk, adicionalmente se registró la presencia de aislamientos capaces de reducir nitratos, de los cuales hubo más en Burk que en Nfb. Al comparar y analizar los resultados obtenidos con los parámetros físico-químicos del suelo, se logró idealizar como registro exploratorio el uso de mecanismos anexos a la fijación de nitrógeno atmosférico realizado por bacterias diazótrofes que contribuye a la fuente de nitrógeno asimilable empleado por la diversa vegetación característica de este ecosistema.

ABSTRACT:

Given the environmental contribution presented by the fog forests and the difficulty the plants have to use atmospheric nitrogen in their basic processes, this investigation had as its main objective to characterize the nitrogen fixing bacteria (diazotrophs) present in the ground of the fog forest near the Cerro Paramo Miraflores in Huila implementing the free nitrogen cultivation means Nfb and Burk. To achieve this, a conventional microbiological analysis was conducted to a sample of the ground taken from the primary fog forest, afterwards, the bacteria was purified and cultivated and a morphologic and biochemical profile was established for each one of them, which allowed us to obtain the necessary information during the identification and comparison of the strains when implementing both cultivation means. In the final results, 57 diazotrophs bacteria were identified and distributed among the genres *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Geobacillus*, *Clostridium*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Corynebacterium*, *Azotobacter* y *Flavobacterium* with a similarity range from 93 % to 99.9 % according to the Bergey's manual, also, the index of richness was achieved (D_{mg}) of 7,3 which was slightly bigger in the Nfb with respect to the Burk. Additionally, the presence of insulations capable of reducing nitrates were registered, this presence was bigger in Burk than in Nfb. By comparing and analyzing the achieved results with the physicochemical parameters of the ground, an exploratory record was idealized regarding the use of annexed mechanisms to the atmospheric nitrogen fixing used by bacteria which contributes to the source of assimilable nitrogen implemented by the diverse vegetation characteristic of this ecosystem.

APROBACION DE LA TESIS

Nombre Presidente Jurado: Juan Manuel Perea Espitia

Firma:

Nombre Jurado: Daniel Ricardo Toro Castaño

Firma:

Nombre Jurado: Yohana Danitza Velandia Martínez

Firma:

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA DE NEIVA

FACULTAD DE EDUCACIÓN

LICENCIATURA EN CIENCIAS NATURALES



**Aislamiento y caracterización de bacterias diazótroficas de vida libre presentes
en un área de suelo de bosque de niebla primario ubicado en el Parque
Natural Regional Cerro Páramo Miraflores (PNRCPM).**

Elaborado por:

WENDY VANESSA BARRIOS LOZANO

WILLIAM GENTIL TRUJILLO SOLANO

Asesorado y Co-asesorado por:

Dra^(C). SONIA ECHEVERRY HERNÁNDEZ

PhD. CLAUDIA MILENA AMOROCHO CRUZ

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DIAZÓTROFAS DE VIDA
LIBRE PRESENTES EN UN ÁREA DEL SUELO DE UN BOSQUE DE NIEBLA
PRIMARIO UBICADO EN EL PARQUE NATURAL REGIONAL CERRO PÁRAMO
MIRAFLORES (PNRCPM).**

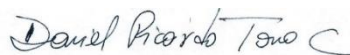
Realizado por:

Wendy Vanessa Barrios Lozano

William Gentil Trujillo Solano

Aprobado por los Jurados:

Daniel Ricardo Toro Castaño



Yohana Danitza Velandia Martínez



Neiva, 31 de agosto de 2022

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos de manera personal a nuestros padres, amigos y a favor de apoyo locativo y financiero a la Universidad Surcolombiana, al Semillero de Investigación en microbiología VIRHOBAC liderado por la profesora Sonia E. Hernández y a los profesores Mauricio Carrillo Ávila, Wilson Cruz y a la profesora Claudia Amorocho, quienes brindaron además de un acompañamiento teórico – práctico, una voz de aliento para hacer todo de la mejor manera sin importar el tiempo que conlleve desarrollar lo propuesto.

INDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
RESUMEN	3
ABSTRACT.....	4
1. ANTECEDENTES	5
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	10
4. JUSTIFICACIÓN	10
5. MARCO TEÓRICO	12
5.1. Nitrógeno	12
5.2. Dinámica del nitrógeno y la fertilidad del suelo.....	13
5.3. Enzima Nitrogenasa.....	16
5.4. Bacterias fijadoras de nitrógeno	18
5.4.1. Phylum Proteobacteria.....	19
5.4.2. Phylum Actinobacteria	19
5.4.3. Phylum Firmicutes.....	19

5.4.4. Phylum Bacteroidetes	19
5.5. Ecosistemas primarios y Bosques de Niebla	20
6. OBJETIVOS	21
6.1. Objetivo General.....	21
6.2. Objetivos específicos	21
7. METODOLOGÍA	22
7.1. Diseño Experimental	22
7.2. Área de muestreo y recolección de la muestra	22
7.1. Análisis fisicoquímico del suelo.....	23
7.2. Análisis microbiológico y caracterización de los aislamientos obtenidos.....	24
7.3. Estimación de riqueza específica y análisis estadístico	27
8. RESULTADOS	28
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	39
10. CONCLUSIONES	56
11. REFERENCIAS.....	58
12. ANEXOS	67

Anexo A. Composición de los medios de cultivo empleados.....	67
Anexo B. Informe S18-27591 realizado por AGROSAVIA	68
Anexo C. Registro detallado del recuento en placa	69
Anexo C. Registro fotográfico de reducción desasimilatoria de nitratos.	72
Anexo D. Descripción teórica de los géneros identificados según “ <i>Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology</i> ” (Brenner <i>et al.</i> , 2010) y perfil microbiológico de los aislamientos obtenidos.....	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Análisis fisicoquímico realizado por agrosavia (informe s18-27591)	29
Tabla 2 Determinación de ufc por gramo de suelo	31
Tabla 3 Datos de riqueza específica (d_{mg}) y riqueza específica por gramo de suelo ($d_{mg/g}$)	36
Tabla 4 Relación entre los valores de riqueza específica d_{mg} y $d_{mg}/$ gramo de suelo	37
Tabla 5 Factores con valor de $p < 0.05$ en la prueba chi-cuadrado.....	39
Tabla 6 Conteo detallado de ufc obtenidas en los medios de cultivo burk y nfb.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Características físicas, químicas y biológicas determinantes en la fertilidad el suelo.....	14
Figura 2 Dinámica del nitrógeno en el suelo.....	15
Figura 3 Ciclo del nitrógeno con respecto al crecimiento y desarrollo vegetal	16
Figura 4 Flujo de la fijación biológica de nitrógeno	18
Figura 5 Delimitación del área de muestreo.....	23
Figura 6 Ecuación para determinar ufc/g	25
Figura 7 Vegetación presente en la toma de muestra.....	28
Figura 8 Relación entre la matriz teórica y práctica.....	33
Figura 9 Relación fenética de los aislamientos caracterizados	34
Figura 10 Morfología celular cepa c23 y de quistes formados por el género azotobacter.....	35
Figura 11 Gráfico de riqueza específica (d_{mg} y $d_{mg}/\text{gramo de suelo}$) entre los medios de cultivo	38
Figura 12 Reducción de nitratos con polvo de zinc	72

INTRODUCCIÓN

Si bien es cierto que los microorganismos fueron las primeras formas de vida capaces de existir sin la presencia de los organismos superiores; su presencia y su participación en los principales procesos biogeoquímicos, sigue siendo un factor de interés para muchos ecólogos, ya que reiteradamente estos ciclos, terminan por definir el equilibrio de un ecosistema, por lo que el aislamiento y la caracterización de los microorganismos que intervienen allí, continúan considerándose como un factor relevante para el análisis y la preservación de cualquier ecosistema. (Panke *et al.*, 2015)

Por otra parte, los bosques de niebla, también conocidos como bosque mesófilo de montaña o comúnmente en el contexto colombiano como bosque alto andino, son ecosistemas muy característicos de algunas zonas, ya que además de participar activamente con el ciclo del agua, la recarga de cuerpos hídricos e incluso con la captura de carbono, son ecosistemas en los que se encuentra gran parte de flora y fauna endémica de una región, por lo que terminan siendo considerados de gran interés a nivel internacional, regional y local para determinar la riqueza natural de un país (García de la Cruz *et al.*, 2014). Sin embargo, debido a las continuas problemáticas de orden social y a la creciente actividad del sector agropecuario en Colombia, el estudio exploratorio de diversos ecosistemas primarios, incluyendo los bosques de niebla que hacen parte del Parque Natural Regional Cerro Páramo Miraflores (PNRCPM) tienden a ser muy limitados. (Moreno *et al.*, 2017)

Por más de que los reportes de endemismo en flora y/o fauna de un ecosistema suelen ser más comunes que los reportes de microorganismos; en esencia, la dinámica de un ecosistema incluyendo la de los bosques de niebla, se encuentran relacionadas directa e indirectamente con la

presencia de los ciclos biogeoquímicos (ciclo del carbono, fósforo, azufre, etc...) en especial con la del ciclo del nitrógeno, ya que en la actualidad, la presencia de este elemento en el suelo sigue siendo definido como un factor limitante para el desarrollo vegetal, pues aunque resulte paradójico por ser uno de los elementos esenciales que más abunda en el planeta, solo puede ser incorporado al medio de forma natural y sin repercusión alguna mediante la fijación biológica de nitrógeno, con la ayuda de algunos microorganismos como las bacterias diazótrofes (Etchvers *et al.*, 2000), las cuales pueden encontrarse bajo una simbiosis directa en la rizosfera de las plantas o de forma libre en el suelo a granel. (Navarro B. & Navarro G., 2003)

Con base a la contribución ambiental que le proporcionan las bacterias diazótrofes de vida libre a un ecosistema, a la “poca dependencia” que poseen estos microorganismos para desarrollarse con respecto a una especie vegetal en particular (Atlas & Bartha, 2002), junto con el posicionamiento de Colombia en el 2016 como el segundo país más megadiverso del mundo en flora, fauna y ecosistemas, y a la conservación en la que se encuentra el PNRCPM según los registros de la CAM (2018); se desarrolló la presente investigación, no solo para establecer uno de los primeros reportes microbiológicos en cuanto a bacterias diazótrofes presentes en un área del bosque de niebla dentro del PNRCPM, sino también, para dar a conocer parte del potencial que en teoría pueden proporcionar los aislamientos obtenidos en pro al mejoramiento de producciones sostenibles.

RESUMEN

Dada la contribución ambiental que presentan los bosques de niebla y la dificultad que poseen las plantas para emplear el nitrógeno atmosférico en sus procesos esenciales, se tuvo como objetivo principal en esta investigación caracterizar las bacterias fijadoras de nitrógeno (diazótrofas) presentes en el suelo del bosque de niebla cercano al Cerro Páramo Miraflores del Huila, empleando los medios de cultivo selectivos libres de nitrógeno Nfb y Burk. Para lograrlo se le realizó un análisis microbiológico convencional a una muestra de suelo tomada entre los municipios de Gigante y Garzón, seguidamente se purificaron las bacterias cultivadas y a cada una se le estableció un perfil morfológico y bioquímico recabando la información necesaria durante la identificación y comparación de las cepas al emplear ambos medios de cultivo. En los resultados obtenidos se lograron identificar 57 bacterias diazótrofas distribuidas entre los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Geobacillus*, *Clostridium*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Corynebacterium*, *Azotobacter* y *Flavobacterium* con un rango de similitud del 93 al 99.9% de acuerdo a lo propuesto en el manual de Bergey's, también se logró determinar un índice de riqueza (D_{mg}) de 7,3 siendo mayor en Nfb que en Burk, adicionalmente se registró la presencia de aislamientos capaces de reducir nitratos, de los cuales hubo más en Burk que en Nfb. Al comparar y analizar los resultados obtenidos con los parámetros físico-químicos del suelo, se logró idealizar como registro exploratorio el uso de mecanismos anexos a la fijación de nitrógeno atmosférico realizado por bacterias diazótrofas que contribuye a la fuente de nitrógeno asimilable empleado por la diversa vegetación característica de este ecosistema.

Palabras Clave: Bacterias, nitrógeno, análisis microbiológico, vegetación y ecosistema.

ABSTRACT

Given the environmental contribution presented by the fog forests and the difficulty the plants have to use atmospheric nitrogen in their basic processes, this investigation had as its main objective to characterize the nitrogen fixing bacteria (diazotrophs) present in the ground of the fog forest near the Cerro Paramo Miraflores in Huila implementing the free nitrogen cultivation means Nfb and Burk. To achieve this, a conventional microbiological analysis was conducted to a sample of the ground taken from the primary fog forest, afterwards, the bacteria was purified and cultivated and a morphologic and biochemical profile was established for each one of them, which allowed us to obtain the necessary information during the identification and comparison of the strains when implementing both cultivation means. In the final results, 57 diazotrophs bacteria were identified and distributed among the genres *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Geobacillus*, *Clostridium*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Corynebacterium*, *Azotobacter* y *Flavobacterium* with a similarity range from 93 % to 99.9 % according to the Bergey's manual, also, the index of richness was achieved (Dmg) of 7,3 which was slightly bigger in the Nfb with respect to the Burk. Additionally, the presence of insulations capable of reducing nitrats were registered, this presence was bigger in Burk than in Nfb. By comparing and analyzing the achieved results with the physicochemical parameters of the ground, an exploratory record was idealized regarding the use of annexed mechanisms to the atmospheric nitrogen fixing used by bacteria which contributes to the source of assimilable nitrogen implemented by the diverse vegetation characteristic of this ecosystem.

Key Words: Bacteria, nitrogen, microbiological analysis, vegetation and ecosystem.

1. ANTECEDENTES

Los bosques de niebla son parte de los ecosistemas más diversos que se caracterizan por los altos niveles de humedad, neblina y diversas temperaturas durante todo el año, convirtiéndolo en un ecosistema altamente vulnerable a la deforestación y tala masiva por su gran diversidad florística, tal como lo define García de la Cruz *et al.* (2014), que realizaron una investigación titulada “*Bosque de niebla: importancia, situación y actual manejo*” en la que afirman que: la composición florística de estos bosques no es uniforme proponiendo y evidenciando una variedad de alrededor de 6.790 especies vegetales presentes en este bosque, de las cuales un gran número pertenecen a géneros de especies tropicales, aun cuando no realizan ningún tipo de estudio microbiológico, la gran biodiversidad en especies vegetales, se las atribuyen a factores microambientales.

Ahora, si bien en Colombia existen pocos estudios que aporten a la identificación de bosques de niebla, se destaca el trabajo de Moreno *et al.* (2017), quienes realizaron una investigación titulada “*Evaluación del estado de los bosques de niebla y de la meta 2010 en Colombia*” donde describen los aspectos generales de los bosques de niebla, incluyendo su definición, distribución, composición florística y faunística, conservación y presencia en el Sistema Nacional de Áreas Protegidas y el contexto socioeconómico de los municipios donde se localizan en Colombia, como también hacen una aproximación a la importancia para el bienestar humano, con énfasis en los bienes y servicios ambientales derivados, y algunos aspectos de valoración económica, así como las amenazas y los impactos sobre estos ecosistemas. Además se evidencia una investigación realizada en el Huila por Diaz & Ladino (2018) titulada “*Estructura y composición del ensamble de mamíferos terrestres y voladores de la franja altoandina y de subpáramo en el parque natural regional cerro páramo miraflores*” en donde realizaron una

caracterización vegetal de la franja altoandina y de subpáramo en el Municipio de Garzón, Huila para evaluar si existe relación en el recambio de especies y las coberturas vegetales muestreadas, lo que aporta información importante sobre el estado de conservación de estos ecosistemas.

A pesar de que se ha realizado una amplia investigación en bacterias fijadoras de nitrógeno en suelos del sector productivo y apoyados en la poca investigación de este grupo funcional en suelos forestales primarios y/o poco intervenidos, Cordero *et al.* (2017) en su estudio titulado “Comunidad microbiana rizosférica de *Caesalpinia spinosa* (Mol.) Kuntze en zonas conservadas y deforestadas del bosque de niebla Atiquipa en Perú” identifican y caracterizan bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, los cuales pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Enterobacter*, entre otros con lo cual atestiguan la presencia de por lo menos un género microbiano fijador de nitrógeno, debido al desarrollo vegetal con que cuenta un bosque de niebla primario.

Con ello es difícil descartar la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno en bosques de niebla, aun cuando Olimpa *et al.* (2013) en su trabajo acerca de la dinámica de grupos funcionales microbianos durante el compostaje mesofílico en residuos industriales y aplicación de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, aíslan algunos géneros de *Pseudomonas*. perteneciente a las Nfb que coinciden con lo registrado por Cordero *et al.* (2017) según su estudio titulado “Comunidad microbiana rizosférica de *Caesalpinia spinosa* (Mol.) Kuntze en zonas conservadas y deforestadas del bosque de niebla Atiquipa en Perú” estos géneros pueden emplearse solos o en mezclas para proporcionar el crecimiento y desarrollo de las plantas, atestiguan la presencia de por lo menos un género fijador de nitrógeno debido al desarrollo vegetal con que cuenta un bosque de niebla primario.

Además, se evidencia una investigación realizada por Lara *et al.* (2007) titulada “*Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos, Córdoba*” donde aislaron microorganismos de los géneros *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp, de la rizósfera de zonas cultivadas y de rastrojo (zonas sin cultivar), mediante caracteres fisiológicos y bioquímicos en medios de cultivos Burk y Nfb y se realizó una evaluación de la capacidad fijadora de nitrógeno de las poblaciones aisladas, medida indirectamente a través de la cuantificación del ión amonio.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con el fin de mejorar la economía y suplir la demanda alimenticia a nivel mundial, muchos países tercermundistas como lo es en el caso de Colombia, suelen establecer los pilares de su economía principalmente en la explotación minera y en la exportación de productos agropecuarios, haciendo que poco a poco se vayan abarcando más extensiones de “suelos productivos”, dejando a su vez, la alteración, deterioro e incluso extinción de diversos ecosistemas y claramente, la zona relacionada al bosque de niebla cercano al PNRCPM no es la excepción, pues la principal actividad económica de las familias presentes allí, se concentra principalmente en la producción agropecuaria, donde se han observado malas prácticas con respecto al uso y manejo del suelo, ya que se han registrado evidencias de quemas agrícolas como parte de la preparación del suelo para el desarrollo de sus procesos (Puentes C., 2020).

A raíz de la fertilidad observada en estos suelos, junto con el desconocimiento de algunos agricultores y la continua demanda del sector agrícola, no solo se han reducido las extensiones correspondientes al bosque de niebla primario, sino que también, muy seguramente se han visto alteradas las comunidades microbianas que habitan allí, pues al realizar todas estas actividades, se emplean aditivos o abonos sintéticos que terminan afectando el índice de materia orgánica (MO), del cual dependen directamente las plantas y muchos microorganismos que reflejan la fertilidad y productividad propia de un ecosistema. (Castillo *et al.*, 2016)

Al mismo tiempo, en lo que respecta a la explotación minera, algunos autores como Alimonda *et al.*, (2017), manifiestan una serie de conflictos que se han ido generando a raíz de “*la especialización productiva hacia el sector primario...*” (p.351); en donde muchos países de América Latina y Países Andinos (PA) han apostado un crecimiento económico, político y social.

Dentro de estos conflictos, se encuentra la explotación de combustibles fósiles en el PNRCPM, pues tal como lo expone Puentes C. (2020), aún existe cierta incertidumbre relacionada con la explotación de combustibles fósiles en estas áreas, ya que

“Actualmente la Agencia Nacional de Hidrocarburos - ANH tiene vigente desde el 2008 una concesión con General Energy PLC para exploración y producción de hidrocarburos en un bloque denominado VSM-32, que presenta superposición con parte del área protegida...” (CAM., 2018, p.101)

sin embargo, aunque el Ministerio de Medio Ambiente en el 2011 mediante la Resolución 1609, retiró la concesión VSM-32 del área o la porción que formaba parte de la Zona de Reserva Forestal de la Amazonía y del PNRCPM; la explotación de las demás áreas que se encuentran contiguas a estos ecosistemas, terminan por alterar la integridad de los mismos.

Para finalizar con las problemáticas de orden político y social que afectan directamente la integridad y conservación primaria del PNRCPM, cabe resaltar que, en la actualidad, los bosques de niebla se han catalogado como ecosistemas frágiles y ampliamente amenazados debido a su gran riqueza natural, ya que suelen ser ecosistemas que albergan una gran diversidad de flora y fauna, en donde un gran número de estas especies resultan estar amenazadas, en peligro de extinción o verse afectadas en su interior, permitiendo catalogar estos ecosistemas como Hotspots a nivel mundial (Moreno *et al.*, 2017) y aunque resulten ser claras dichas problemáticas, en la actualidad los estudios exploratorios con relación a la caracterización de las comunidades microbianas edáficas de un bosque de niebla primario siguen siendo muy limitados.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son las bacterias diazótroficas de vida libre encargadas de sostener la biodiversidad de flora presente en un bosque de niebla primario y qué diferencias se pueden observar al emplear los medios de cultivo Nfb y Burk para su aislamiento?

4. JUSTIFICACIÓN

La razón principal por la que se realizó la identificación de las bacterias diazótroficas presentes en un área de suelo de bosque primario ubicado en el PNRCPM, fue la de establecer un registro preliminar de dichos microorganismos en este ecosistema, ya que los registros relacionados con el aislamiento de estas comunidades en ecosistemas primarios tienden a ser escasos, puesto que en muchas ocasiones suelen ser áreas de difícil acceso para la toma de muestras (Panke *et al.*, 2015) o en su defecto, como lo es el caso del PNRCPM, suelen estar amenazadas por diferentes actividades agrícolas (Puentes C. 2020) que en resumen, terminan alterando la microbiota edáfica de dicho ecosistema que en la actualidad, han sostenido uno de los ecosistemas más ricos y prometedores de endemismo en flora y fauna. (CAM, 2018)

Aunque algunos autores describen la capacidad que poseen los microorganismos fijadores de nitrógeno para adaptarse y recuperarse reiteradamente en cualquier medio sin importar las condiciones en las que este se pueda encontrar (Beltrán *et al.*, 2017), otros autores como Cordero *et al.*, (2017), sin refutar del todo la premisa anterior, demostraron que independientemente de la técnica empleada para la recuperación de un ecosistema, existen cepas nativas que difícilmente se pueden recuperar con la revegetalización o restauración del mismo. Dicha investigación, no solo

sigue respaldando la importancia del aislamiento y la identificación de las comunidades microbianas presentes en un ecosistema y más en un ecosistema primario para la preservación del mismo, sino que también, este tipo de investigaciones amplía el registro de microorganismos eficientes e incluso promueve el uso potencial de estos en diferentes aplicaciones.

Pues como es de saberse, las bacterias diazótroficas poseen la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico en una molécula esencial y de fácil absorción que durante mucho tiempo, ha contribuido al desarrollo y sostenimiento vegetal de un ecosistema, debido a que resultan ser elementos esenciales para el metabolismo de las plantas, lo que ha demostrado en la actualidad, un impacto favorable de su aplicación en el sector agrícola; pues según Mantilla L. *et al.*, (2007):

“los resultados de investigaciones sobre la incorporación a los suelos de esta clase de microorganismos (inoculantes microbianos o biofertilizantes) han originado altos rendimientos en las cosechas de una gran diversidad de cultivos como arroz, maíz, fríjol, tomate, etc., minimizando el uso de fertilizantes químicos especialmente los nitrogenados”
(p.8)

Haciendo que se aumenten las expectativas de una alternativa viable y de gran valor para la agricultura sostenible. De igual forma, se han observado diferentes comportamientos de estos microorganismos, debido a que se aislaron cepas nativas de géneros de la familia *Acetobacteraceae* en suelos de bosque de niebla, con la capacidad para degradar compuestos aromáticos (benceno, tolueno, etilbenceno y antroceno) (Narváez *et al.*, 2019); ampliando así el espectro de aplicaciones que pueden tener estos microorganismos.

5. MARCO TEÓRICO

5.1. Nitrógeno

En términos bioquímicos y ecosistémicos, el nitrógeno al igual que el Carbono, Hidrógeno y Oxígeno, es uno de los elementos más comunes que conforma la vida misma (C, H, O, N, P, S), pues además de sus escasas formaciones inorgánicas (Ej: $\text{Li}_3\text{N}_{(s)}$), tiende por lo general a formar enlaces de tipo covalente con el hidrógeno y el oxígeno, dando como productos un sin fin de compuestos con números de oxidación que van desde -3 a +5 (Goldsby & Chang, 2013). Dentro de estos compuestos, se encuentran las purinas y pirimidinas de los ácidos nucleicos en donde se asienta la información genética, que determina la regulación y expresión de componentes funcionales y estructurales para la organización de la materia viva como las proteínas y/o enzimas, siendo así, un factor clave en la productividad de cualquier ecosistema. (Sampiña, 2006)

Aunque en la actualidad, se ha reflejado la existencia de diversos biomas capaces de albergar una fuente de nitrógeno en sus formas iónicas como $\text{NH}_4^+_{(g)}$, $\text{NH}_3_{(g)}$, $\text{NO}_{(g)}$, $\text{N}_2\text{O}_{(g)}$, $\text{NO}_2^-_{(s)}$, $\text{NO}_3^-_{(s)}$ entre otras; no se ha dejado de comprobar que la fuente de nitrógeno más abundante en el planeta, es el nitrógeno atmosférico en su estado basal ($\text{N}_2 \rightarrow \text{N}\equiv\text{N}$), pues conforma aproximadamente el 78% de la composición atmosférica con relación a los otros gases, sin embargo, esta molécula al estar unida en su estado natural por un triple enlace, refleja una estabilidad química que requiere de altas presiones y temperaturas (Haber Bosch process) o de un consumo energético muy elevado (Fijación Biológica de Nitrógeno) para transformarse en una fuente de nitrógeno asimilable, ya sea a nivel industrial o de forma natural respectivamente. Pues a pesar de su abundancia en la atmósfera, suele ser un limitante en los ecosistemas terrestres principalmente en la nutrición vegetal, ya que al ser asimilado por las plantas de forma nítrica

(NO_3 , NO_2^-) o de forma amoniacal (NH_4^+ , NH_3), solo un grupo selecto de bacterias denominadas bacterias diazótroficas o fijadoras de nitrógeno, tienen la capacidad para iniciar con la transformación del N_2 presente en la atmosfera. (Navarro B. & Navarro G., 2003)

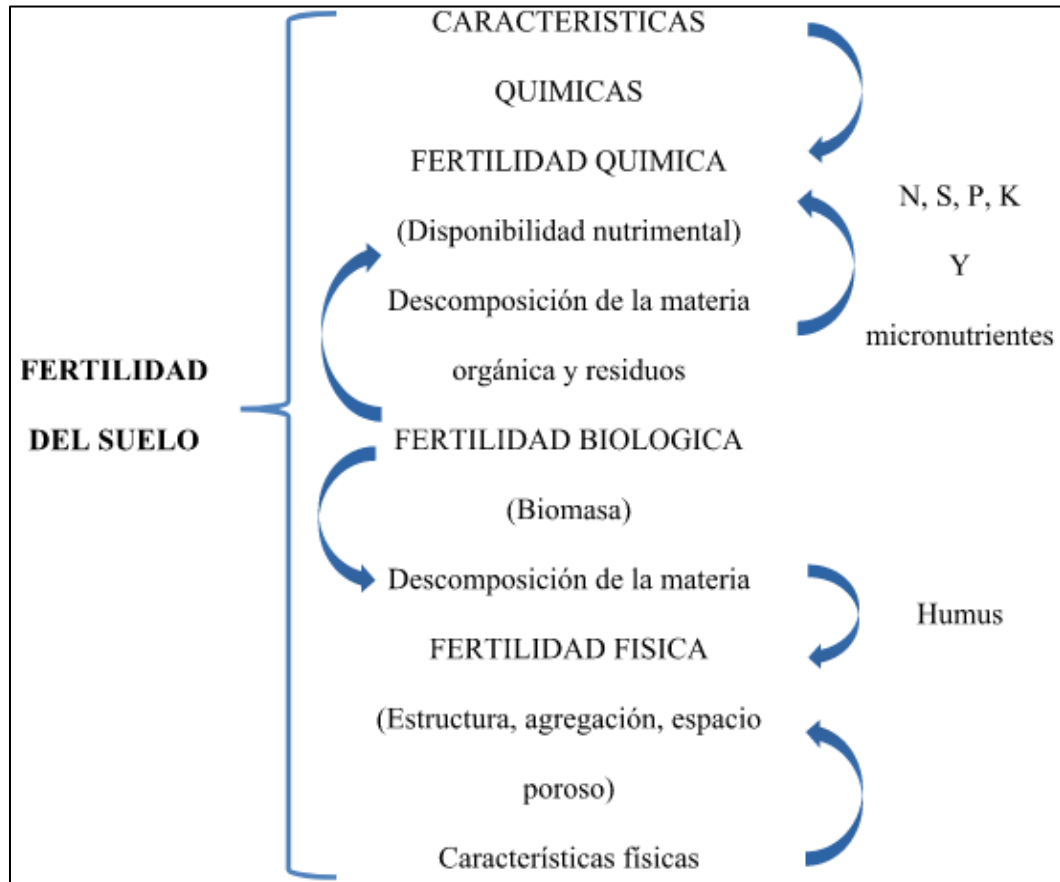
5.2. Dinámica del nitrógeno y la fertilidad del suelo.

En términos generales, la fertilidad del suelo, se entiende como el producto de un comportamiento donde se integran diversos factores propios de un ecosistema, que interactúan con las características físicas, químicas y biológicas del suelo (Figura 1), del cual depende el sostenimiento de cualquier especie vegetal, pues dichas interacciones, terminan por desarrollarse con el fin de promover el crecimiento vegetal en condiciones “ideales”. Sin embargo, el factor clave mediante el cual se encuentran encaminados la mayor parte de los procesos que determinan la fertilidad del suelo, son los factores biológicos, ya que con base a estos factores, es que actúa de manera intrínseca la cantidad de biomasa microbiana, la materia orgánica e incluso la vegetación presente en el suelo. (Etchvers *et al.*, 2000)

No obstante, al verse implicado el nitrógeno en un sinnúmero de procesos biológicos, su dinámica biogeoquímica en el suelo, resulta ser fácilmente descrita por Navarro B. y Navarro G. (2003) en tres simples procesos, donde se enseña la ganancia, la transformación y la pérdida de nitrógeno en el suelo (Figura 2), que en resumidas cuentas, define los mecanismos por el cual el nitrógeno suele ser incorporado al suelo, los mecanismos mediante el cual, tiende a ser procesado para su correcta asimilación y por último, los procesos en los que se pierde o regulan los excesos de este nutriente en el suelo; ya que sin este último, se inhibiría la capacidad de fijar más nitrógeno además de que terminaría siendo tóxico para la mayoría de los organismos vivos.

Figura 1

Características Físicas, Químicas y Biológicas determinantes en la fertilidad el suelo

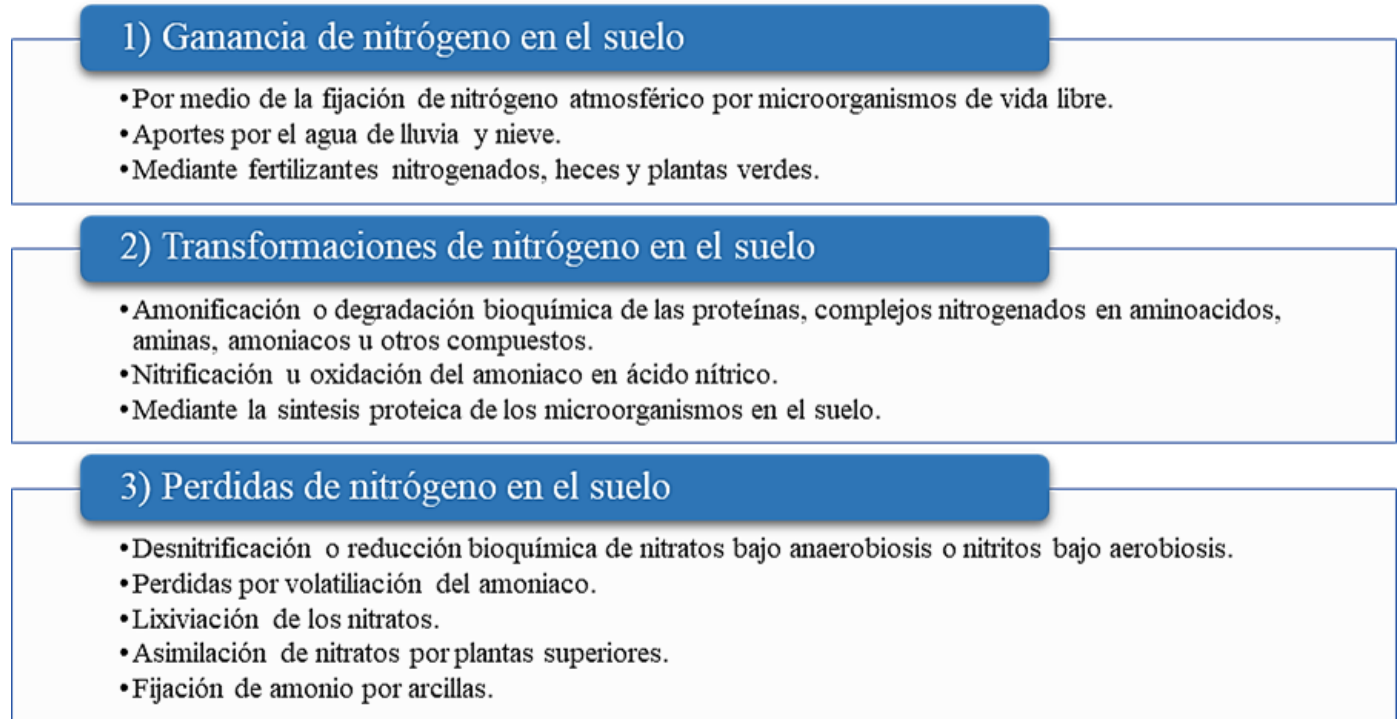


Tomado y modificado de Etchvers *et al.*, (2000)

De esta forma, se puede observar la relevancia que poseen cada uno de los procesos implicados durante la fijación biológica de nitrógeno, la nitrificación, la amonificación y la desnitrificación, ya que respectivamente se encuentran involucradas durante la ganancia, la transformación y la pérdida de nitrógeno en el suelo (Figura 2).

Figura 2

Dinámica del nitrógeno en el suelo



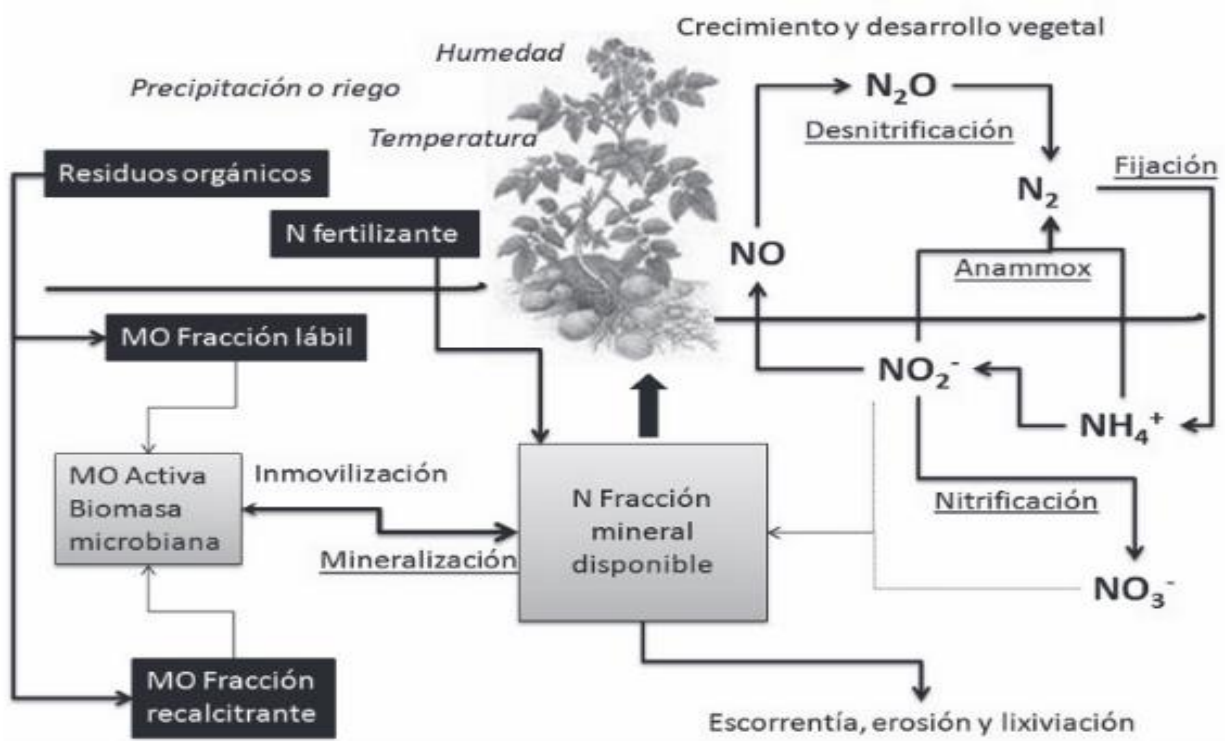
Tomado y modificado de Navarro B. y Navarro G., (2003)

En este orden de ideas, se ha identificado un perfil enzimático desarrollado por los microorganismos con relación a cada una de las etapas correspondientes al ciclo del nitrógeno (Figura 3), permitiendo denominarlas respectivamente como bacterias fijadoras de nitrógeno o diazótrofes, bacterias nitrificantes y bacterias desnitrificantes, donde, básicamente el primer grupo de microorganismos se encarga de incorporar el nitrógeno atmosférico al suelo, seguidamente el segundo grupo de bacterias transforma el nitrógeno fijado (bacterias nitrificantes) y finalmente, el último grupo de bacterias (las bacterias desnitrificantes), se encargan de restablecer los excesos de nitrógeno no asimilado a la atmósfera. Sin embargo, estos dos últimos comportamientos solo pueden ocurrir siempre y cuando, prevalezca en el medio una fuente de nitrógeno, la cual puede

ser fijada de la atmosfera mediante la acción enzimática de la nitrogenasa o en su defecto, mediante una reducción asimilatoria de nitrato hasta amonio, siempre y cuando el microorganismo pueda sintetizar las enzimas *nitrato-reductasa B* y *nitrito reductasa*. (Cerón R. & Aristizábal G., 2012; Madigan *et al.*, 2009; Schlegel & Zaborosch, 1997)

Figura 3

Ciclo del nitrógeno con respecto al crecimiento y desarrollo vegetal



Tomado de Cerón R. & Aristizábal G., (2012)

5.3. Enzima Nitrogenasa

Para llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno, gran parte de los microorganismos diazótrofos emplean un complejo enzimático denominado nitrogenasa; el cual, fue observado y analizado por primera vez en 1960 a partir de la bacteria *Clostridium pasteurianum*, aclarando los

indicios que se tenían acerca de este proceso. Al observar que dicho complejo enzimático, suele estar presente en todas las bacterias fijadoras de nitrógeno y a su vez, no parece diferir significativamente entre una especie u otra, ya que las unidades que lo componen están codificadas en un gen denominado “gen *nif*”; diversos autores han podido realizar un modelo bioquímico de este complejo enzimático, debido a que este gen se encuentra localizado en un plásmido que facilita su manipulación genética.(FCA, 2014; Madigan *et al.*, 2009)

En este orden, la FCA, (2014), manifiesta que la enzima nitrogenasa (Nasa), se encuentra integrada por dos sulfo-ferro-proteínas denominadas Unidad I (KP I) y Unidad II (KPII), codificadas respectivamente por los genes *nifD*, *nifK* y *nifH*; donde cada una consta de las siguientes características:

“a) Unidad I (KPI): Llamada dinitrogenasa o molibdo-ferro-proteína está formada por 4 unidades peptídicas con 24 átomos de Fe, 28 de S y 2 de Mo. Tiene un peso molecular de aproximadamente 300 kDa. Esta unidad constituye el sitio catalítico del N₂ (ruptura del triple enlace N≡N).

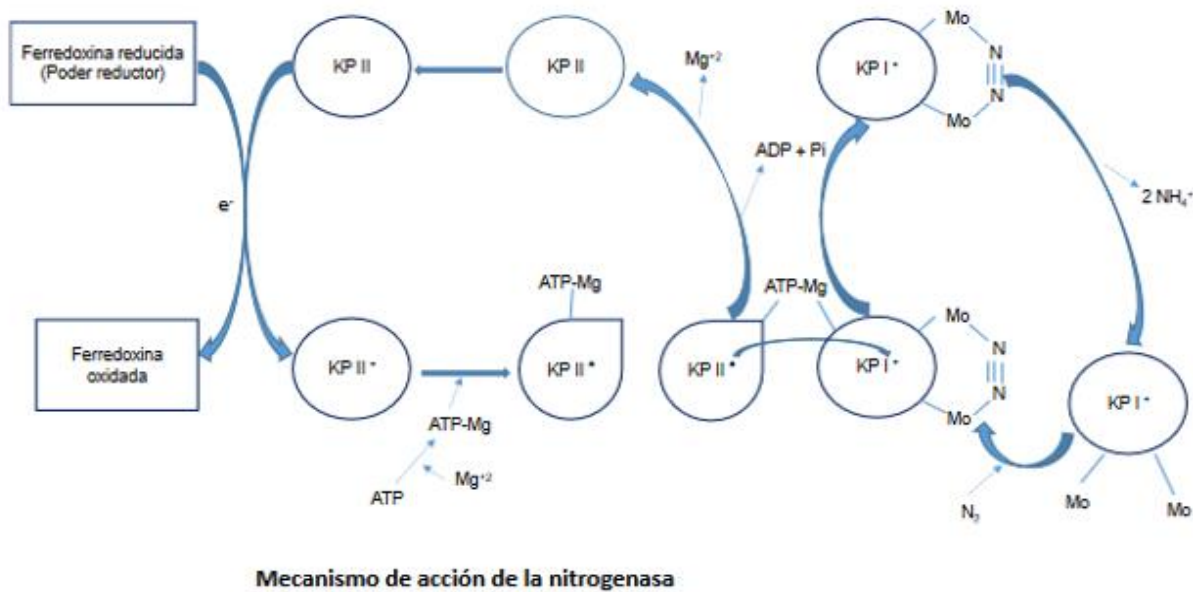
b) Unidad II (KPII): Llamada nitrogenasa reductasa es una ferro-proteína posee dos subunidades peptídicas con 4 átomos de Fe y 4 de S. Tiene un peso molecular de 60 kDa y participa en el transporte de e⁻ desde las ferredoxinas a la unidad I, donde se acoplan al N formando NH₃.”(FCA, 2014, p.103)

con base a estas descripciones, se realizaron algunos modelos bioquímicos que ilustran la fijación biológica de nitrógeno (Figura 4), con el cual se trata de ajustar el uso de 16 moléculas de ATP

para la fijación de 1 molécula de N_2 , dando como producto la formación de 2 moléculas de NH_3 (amoníaco) o NH_4^+ (ion amonio). (FCA, 2014; Navarro B. & Navarro G., 2003)

Figura 4

Flujo de la Fijación Biológica de Nitrógeno



Tomado de FCA, (2014), p.104.

5.4. Bacterias fijadoras de nitrógeno

Aunque no se puede especificar con exactitud un género o dominio específico que realice una actividad diazotrofa, debido a que un gran número de microorganismos poseen este comportamiento; se han precisado con base a diversos reportes (Brenner *et al.*, 2010; Fernández P. *et al.*, 2002; Ferrera & Alarcón, 2007; Madigan T *et al.*, 2009; Pajares & Bohanna, 2016; Schlegel & Zaborosch, 1997) un gran número de géneros pertenecientes al dominio Bacteria con la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. Con relación a las bacterias del suelo, se han identificado los siguientes géneros:

5.4.1. Phylum Proteobacteria

- Clase Gammaproteobacteria, géneros: *Methylomonas*, *Azotobacter*, *Azomonas*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Rahnella*.
- Clase Alphaproteobacterias, géneros: *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Azospirillum*, *Rhodospirillum*, *Caulobacter*, *Beijerinckia*, *Nitrobacter*, *Bradyrhizobium*, *Hyphomicrobium*, *Pedomicrobium*, *Xanthobacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Phyllobacterium*, *Mesorhizobium*, *Alcaligenes*, *Herbaspirillum*, *Hydrogenophaga*, *Burkholderia*, *Aquaspirillum*, *Azoarcus*, *Azonexus*, *Campylobacter*, *Arcobacter*

5.4.2. Phylum Actinobacteria

- Clase Actinobacteria, géneros: *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Arthobacter*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Streptomyces*,

5.4.3. Phylum Firmicutes

- Clase Bacilli, géneros: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*
- Clase Clostridiales, géneros: *Clostridium*, *Sarcina*, *Heliobacterium*, *Heliobacillus*, *Heliophilum*, *Heliorestis*

5.4.4. Phylum Bacteroidetes

- Clase Bacteroidia, género: *Prevotella*
- Clase Flavobacteria, género: *Flavobacterium*

5.5.Ecosistemas primarios y Bosques de Niebla

En términos generales, un ecosistema es un entorno en el que interactúan condiciones bióticas y abióticas de forma autosostenible, sin embargo, la intervención del hombre en estos sistemas tiende a alterar algunos comportamientos “naturales”, por lo que un ecosistema primario es aquel en donde ocurren las mismas interacciones en ausencia de la intervención del hombre. (Atlas & Bartha, 2002)

Por otro lado, aunque no se ha establecido en términos meteorológicos, ambientales y ecosistémicos el comportamiento propio de un bosque de niebla, ya que se desconoce una cifra exacta de la extensión geográfica que poseen y más los bosques primarios, debido a que solo se cuentan con unos pocos registros que permiten estimar una extensión global de aproximadamente 214,630 km² (0.14% de la superficie terrestre), García de la Cruz *et al.*, (2014) define los bosques de niebla también llamados bosques mesófilos de montaña, bosques nubosos o en el contexto colombiano bosques alto andino; como un ecosistema en el que además de poderse observar una presencia continua de niebla que interactúa con la energía, la luz, la temperatura y las grandes cantidades de agua a través de la lluvia, presentan un papel fundamental como reguladores en el ciclo del agua y del carbono.

Así mismo, algunos autores como Díaz B. & Ladino M.,(2018) en conjunto con García de la Cruz *et al.*, (2014), han establecido algunos rangos, comportamientos y factores bióticos que pueden caracterizarse dentro de estos ecosistemas; algunos de ellos son las precipitaciones anuales, que suelen estar entre los 1,000 a 3,000 mm/año, la altitud que oscila entre los 500 a 2,800 msnm, la temperatura promedio de 18 °C que puede ir de 12 a 23 °C anual, junto con el alto grado de endemismo; ya que albergan una gran cantidad de especies florísticas que abarcan un sin número

de plantas epífitas, trepadoras, leñosas y helechos, distribuyéndose generalmente algunos géneros como *Liquidámbar*, *Encinos (Quercus)*, *Hayas (platanus, fagus)*, *Olmos (ulmus)* y *pinos*, en el dosel del bosque, así como otros géneros tropicales (*Eugenia*, *Myrsine*, *Ocotea*, *Arborecentes* y *epifitas*), en la zona correspondiente al soto bosque. Así mismo, son ecosistemas que suelen abarcar una gran colección de ejemplares de fauna silvestre en la que se han reportado pumas, leopardos, osos de anteojos, dantas, roedores y una composición diversa de monos, al igual que diferentes clases de aves y especies de quirópteros (*Chrioptera*), que en resumen, demuestran el alto grado de riqueza específica y endémica presente en estos bosques.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General

Identificar las bacterias cultivables de vida libre responsables de la fijación biológica de nitrógeno presentes en un área de suelo de un bosque de niebla primario en el Parque Natural Regional Cerro Páramo Miraflores (PNRCPM).

6.2. Objetivos específicos

- Caracterizar mediante un análisis microbiológico convencional las bacterias con presunta actividad diazotrofa que habitan el área de un suelo del bosque de niebla primario cercano al Cerro Páramo Miraflores
- Comparar la riqueza específica entre el medio de cultivo Nfb y Burk, empleando el índice de riqueza específica de Margalef (D_{mg}).
- Identificar la posibilidad de obtener diferencias en el perfil microbiológico (características morfológicas y bioquímicas) de las bacterias aisladas al emplear los medios de cultivo Nfb y Burk

7. METODOLOGÍA

7.1. Diseño Experimental

Para el desarrollo y análisis de datos en el siguiente trabajo de investigación, se empleó un enfoque metodológico mixto tipo DEXPLOS propuesto por Hernández *et al.*, (2010), en donde se manejó cualitativamente todo lo relacionado con el análisis microbiológico convencional (recuento en placa, descripciones morfológicas, pruebas bioquímicas, etc.) y con base a estos resultados, se cuantificó todo lo relacionado con la determinación de las Unidades Formadoras de Colonia (UFC), la similitud entre los aislamientos obtenidos, la riqueza específica (D_{Mg}) y la probabilidad de observar alguna diferencia en el perfil microbiológico de los aislamientos obtenidos, al emplear los medios de cultivo Nfb y Burk.

7.2. Área de muestreo y recolección de la muestra

El área de muestreo se realizó bosque adentro del PNRCPM, sobre los 2600 msnm en las coordenadas 2°13'19.00"N 75°28'22.96"W, dentro de una zona identificada por la CAM, (2018) como bosque primario entre los municipios de Gigante y Garzón. Para establecer esta área de muestreo, se inspeccionó antes de recolectar la muestra que las condiciones ambientales en cuanto a paisajismo, temperatura, altura, vegetación y presencia de niebla fuesen características de un bosque mesófilo de montaña o bosque de niebla con base a lo descrito por García de la Cruz *et al.* (2014); posteriormente, se procedió a delimitar un área de 100m² partiendo de la coordenada inicial (2°13'19.00"N 75°28'22.96"W), registrando por cada 10m del área total una nueva coordenada (2°13'18.67"N 75°28'22.95"W; 2°13'18.72"N 75°28'22.63"W y 2°13'19.04"N 75°28'22.64"W) para proyectar en Google Earth Pro los alrededores de la zona de muestreo (Figura 5).

Figura 5

Delimitación del área de muestreo



Puntos de muestreo A: $2^{\circ}13'19.00''N$ $75^{\circ}28'22.96''W$, B: $2^{\circ}13'18.67''N$ $75^{\circ}28'22.95''W$, C: $2^{\circ}13'18.72''N$ $75^{\circ}28'22.63''W$ y D: $2^{\circ}13'19.04''N$ $75^{\circ}28'22.64''W$, tomado de *Google Earth Pro*.

Después de haber establecido el área de muestreo total, se procedió a delimitar pequeños cuadrantes de 2m x 2m, en donde se recolectaron de 2 a 3 submuestras por cada cuadrante hasta realizar un barrido del área total, empleando la técnica de transectos en zig-zag descrita por McKean, (1993). Cada submuestra de suelo, se tomó sin hojarasca, ramas y rocas grandes a una profundidad máxima de entre 15 y 20 cm recolectando en total una muestra compuesta de aproximadamente 3,5 kg de suelo proveniente de 40 submuestras; esta muestra, se almacenó en una bolsa tipo Ziploc cubierta con papel kraft y se transportó dentro de una nevera de icopor a $4^{\circ}C$ hasta el laboratorio de biología ubicado en la facultad de Ciencias Exactas en la Universidad Surcolombiana. Allí se tomaron 500 g de suelo para el análisis microbiológico y se enviaron 3 kg de suelo en las mismas condiciones de almacenamiento para su respectivo análisis fisicoquímico, el cual, fue realizado en los laboratorios de la Corporación Colombiana de Investigación AGROSAVIA sede Bogotá.

7.1. Análisis fisicoquímico del suelo

El análisis fisicoquímico del suelo desarrollado por AGROSAVIA con acreditación ONAC ISO/IEC 17025:2005 13 – LAB – 031, determinó algunos parámetros físico-químicos como: textura del suelo mediante la Técnica: Bouyoucos IGAC 2006; pH mediante la técnica: Potenciómetro pH<5,5 y método NTC 5263 modificado VC_R_004 versión 3 de 2017; conductividad del suelo mediante la técnica: Potenciometría, método NTC 5596:2008 relación 1:5; contenido de carbono total mediante la técnica: Extracción por pasta saturada por el método extracción de KCl 1M IGAC y Kit Merck; presencia de nitrógeno total mediante la técnica: Volumetría por el método EPA 351,3 modificado FOSS; concentración de materia orgánica total mediante la técnica: Espectrofotometría VIS modificado de la norma NTC 5403 (Walkey & Black), presencia fósforo disponible mediante la técnica: Espectrofotometría VIS, procedimiento VC_R_007 ver 2 de 22-09-2017; bases intercambiables mediante la técnica: Espectrofotometría de Absorción Atómica establecidas en el método ID_R_072 ver 5 de 28-09-2017.

7.2. Análisis microbiológico y caracterización de los aislamientos obtenidos

Para realizar el análisis microbiológico de la muestra de suelo, se establecieron tres fases de trabajo; en la primera fase, se realizó todo lo relacionado con la selección de la muestra y la determinación de UFC, en la segunda fase, se seleccionaron las cepas de interés y se purificaron los aislamientos obtenidos, por último, en la tercera fase de trabajo, se realizaron y compilaron todas las observaciones morfológicas y bioquímicas necesarias, para validar la identificación de los aislamientos y el respectivo análisis estadístico. El desarrollo de cada una de las fases mencionadas, se realizó detalladamente de la siguiente manera:

En la primera fase de trabajo, se realizó una dilución seriada siguiendo la metodología propuesta por Mantilla P. *et al.*, (2009), donde se homogenizó la muestra de suelo dentro de su

respectiva bolsa y se tomaron pequeñas porciones de diferentes partes hasta completar una muestra compuesta de 10g de suelo, la cual se adicionó en 90 mL de agua peptonada estéril y se rotuló como la “dilución 10⁻¹” (dilución inicial), posteriormente se homogenizó la dilución (10⁻¹) en un vortex, se tomó una alícuota de 1 mL, se agregó a un tubo con 9 mL de agua peptonada estéril y se rotuló esta nueva dilución como la “dilución 10⁻²”, este procedimiento se realizó de manera seriada tomando 1 mL de la dilución anterior hasta completar un set total de 7 diluciones (dilución 10⁻⁷).

Cada una de las diluciones obtenidas se inocularon por triplicado en los medios de cultivo Nfb y Burk libres de nitrógeno (Anexo A), extendiendo con una espátula de Drigalsky 100 µL de cada dilución en un medio de cultivo independiente; al finalizar la siembra, se incubaron los medios de cultivo a 28°C durante 7 días en condiciones aeróbicas; transcurrido este periodo de incubación, se realizó el respectivo recuento en placa mediante la técnica por cuadrante propuesta por Hernández *et al.*, (2003) y con base a este, se determinaron las UFC por gramo de suelo siguiendo la ecuación establecida en la Figura 6.

Figura 6

Ecuación para determinar UFC/g

$UFC/g_{\text{Total}} = \sum UFC/g$	Ecuación 1
$UFC/g = \frac{\text{No.de colonias} \times FD}{ml}$	Ecuación 1.1

Donde: **FD** = al factor inverso de la dilución; **mL** = al volumen de la muestra inoculado, tomado de Jiménez J., (2017).

En la segunda fase de trabajo, se observaron y seleccionaron las colonias con morfologías diferentes en cuanto color, superficie, densidad, forma, borde o tipo de elevación, al mismo tiempo, se les realizó a cada una de ellas la respectiva tinción de Gram para determinar la morfología celular

y la textura de la colonia; cada una de las descripciones realizadas, se establecieron con base a los parámetros descritos en el “*Manual de prácticas de laboratorio en microbiología*” realizado por Echeverry H., (2017); estos registros, fueron empleados como puntos de referencia para contrastar y validar cada una de las observaciones realizadas durante la purificación de los aislamientos. Cada una de las colonias seleccionadas se purificó con un asa bacteriológica recta mediante la técnica de siembra por agotamiento, para ello, se tomó una pequeña porción de la colonia de interés y se inoculó en un medio de cultivo nuevo y estéril empleando los mismos periodos de incubación y medios de aislamiento descritos en la fase anterior, finalmente se realizó la respectiva tinción de Gram y se contrastaron las descripciones iniciales con los datos obtenidos hasta conseguir cultivos puros (cepas).

En la tercera y última fase de trabajo, se le realizó por triplicado a cada una de las cepas un set de pruebas bioquímicas (oxidasa, catalasa, citrato de Simmons, reducción de nitratos, rojo de metilo (RM), Vogues Proskauer (VP), TSI y SIM) propuesto por Álvarez, (2012) para la identificación de bacterias diazótrofes de vida libre. Tomando estos resultados junto con los de la fase anterior y el tipo de crecimiento observado en el medio de cultivo, se realizó una matriz binaria (1 positivo y 0 negativo) en Excel denominada “Matriz Práctica”, con la cual se concatenaron 63 OTU’s, 49 para las descripciones morfológicas (morfología de colonia y morfología celular), 3 para el tipo de crecimiento en el medio de cultivo y 11 para los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas; con base a esta información, se estableció el perfil microbiológico de cada cepa. En otro libro de Excel, se emplearon los mismos 63 OTU’s con las descripciones realizadas por Ferrera & Alarcón, (2007); Madigan T *et al.*, (2009); Pajares y Bohanna, (2016); Schlegel & Zaborosch, (1997) y otros autores (tomando siempre como referente principal lo descrito en “*Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*” (Brenner *et al.*, 2010)) para algunos géneros de bacterias diazótrofes,

con el fin de establecer una matriz (“Matriz Teórica”) basada en las descripciones fenéticas de los géneros de interés.

Finalmente, se realizó un análisis de compatibilidad mediante el software MEGA-X entre la “Matriz Práctica” y “la Matriz Teórica”, logrando establecer los presuntos géneros relacionados con cada una de las cepas; posteriormente se determinó la similitud entre los aislamientos establecidos dentro de la “Matriz Práctica”, validando su cercanía y logrando corroborar así la identificación de cada una de las cepas. Dicha similitud, se estableció mediante un fenograma, empleando el método *Neighbor Joining* bajo una corrección bootstrap de 500 repeticiones sugerido por Acero B., (2007) debido a que las cepas en cuestión, coincidieron con algunos géneros de diferentes Phylums.

7.3. Estimación de riqueza específica y análisis estadístico

La riqueza específica proporcionada por cada medio de cultivo, se estableció mediante el índice de diversidad de Margalef (D_{Mg}) (ecuación 2), en donde “S” fueron las cepas aisladas y “N” la sumatoria de UFC obtenidas en el recuento en placa, de igual forma se estimó un valor de D_{Mg} por gramo de suelo, cambiando el valor de “N” por “N_g”, el cual es equivalente a las UFC resultantes de la Ecuación 1 (Figura 6). Por último, se determinó estadísticamente la posibilidad de obtener diferencias en el perfil microbiológico de cada uno de los aislamientos, al emplear los medios de cultivo Nfb y Burck, para ello se realizó en el software Stata 15 una prueba de CHI-CUADRADO tomando los resultados establecidos en la “Matriz Práctica”.

$$D_{Mg} = \frac{S-1}{\ln N} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde: S = número de especies, N = número de individuos y lnN = logaritmo natural de N.

8. RESULTADOS

En primer lugar, se registró *in situ* una temperatura ambiental de $19^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$, una temperatura interna del suelo de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ y una altura cercana a los 2610 msnm; así mismo, se observó una vegetación compuesta de diferentes pinos, plantas leñosas, epífitas y en mayor medida briófitos, pteridófitas, pteridófitas arbóreas o arborescentes (Figura 7).

Figura 7

Vegetación presente en la toma de muestra



Con respecto a los parámetros fisicoquímicos del suelo registrados en la Tabla 1, el suelo muestreado se pudo clasificar como un suelo no salino, ligeramente ácido, de textura franco-arenosa, con bajo niveles de nitrógeno total, fósforo, iones intercambiables (Ca^{++} , Mg^{++} , K^{+} y Na^{+})

y CIC (Capacidad de Intercambio Catiónico) para diversos cultivos y altos niveles de MO (11,06 %), clasificándolo como rico en materia orgánica y en carbono total.

Tabla 1

Análisis fisicoquímico realizado por AGROSAVIA (Informe S18-27591), Anexo B.

DETERMINACIÓN ANALÍTICA	UNIDAD	VALOR
pH	Unidades de pH	6,05
Nitrógeno total	mg/kg	0,59
Fósforo disponible (P) Bray II	mg/kg	4,72
Calcio intercambiable (Ca)	cmol(+)/kg	0,79
Magnesio intercambiable (Mg)	cmol(+)/kg	0,47
Potasio intercambiable (K)	cmol(+)/kg	0,19
Sodio intercambiable (Na)	cmol(+)/kg	<0,14
Capacidad de intercambio catiónico (CIC)	cmol(+)/kg	1,58

DETERMINACIÓN ANALÍTICA	UNIDAD	VALOR
Conductividad eléctrica	dS/m	0,34
Carbono total	mg/kg	6,41
Materia orgánica (MO)	g/100g	11,06

Así mismo, se pudo validar con el estudio de suelos FS18-19242 realizado por AGROSAVIA que el suelo presente en el área de muestreo presenta una composición franco-arenosa debido a que se encuentra conformado en mayor proporción por Arenas (65,40 %), Limo (26,58%) y en menor medida Arcilla (8,02%).

Con relación al análisis microbiológico del suelo, se logró estimar un total de 2.623'563.800 $\approx 2,6 \times 10^9$ UFC/g de suelo equivalente a 9,419 Log UFC / g de suelo, en donde se observó de manera detallada (Anexo B) un recuento mayor de UFC en el medio de cultivo Burk con respecto al medio de cultivo Nfb (Tabla 2), sin embargo, se observó una mayor cantidad de cepas con morfologías de colonia diferentes al emplear el medio de cultivo NFb con respecto al medio de cultivo Burk.

Tabla 2*Determinación de UFC por gramo de suelo*

Medio de cultivo empleado	UFC / g de suelo	Log UFC / g de suelo
Nfb	$3.068.800 \approx 3 \times 10^6$	6,486
Burk	$2.620.495.000 \approx 2 \times 10^6$	9,418
Nfb y Burk en total	$2.623.563.800 \approx 2,6 \times 10^9$	9,419

De los aislamientos observados durante el recuento en placa, se seleccionaron 64 colonias completamente diferentes, pero sólo 57 fueron completamente viables durante el proceso de purificación; de las cuales, 27 (C1 a C27) se desarrollaron en Burk y 30 (C28 a C57) en NFb. Al registrar las descripciones morfológicas relacionadas con el perfil microbiológico de cada una de las cepas (Anexo D), se observó que las cepas desarrolladas en ambos medios de cultivo se conforman en su mayoría por colonias con pigmentos blancos o transparentes, formas circulares, complejas e incluso irregulares, bordes enteros, elevaciones planas o convexas y consistencias viscosas, de igual forma, gran parte de los aislamientos (89%) presentó un crecimiento sobre el medio de cultivo, a diferencia de las cepas C12, C13, C22, C38, C44 y la cepa C18, que respectivamente presentaron un desarrollo parcial e incluso totalmente inmerso en el agar.

Así mismo, al registrar en la matriz los OTU's relacionados con las descripciones de morfología celular (Anexo D), se concretó con mayor veracidad, el aislamiento de 43 cepas Gram positivas y 14 cepas Gram negativas conformadas en su totalidad por células bacilares de diferentes

tamaños, formas y agrupaciones, de las cuales, 15 presentaron esporulación central, 3 esporulación terminal y alrededor de 9 cepas (C12, C13, C18, C22, C23, C24, C26, C27, C39) presentaron pleomorfismo ya sea en forma de esferoplastos o quistes. Por último, en lo que respecta al perfil bioquímico de los aislamientos caracterizados, ninguno de los aislamientos presentó la capacidad para la producción de Indol, solo el 1,75% presentó crecimiento sobre el Citrato de Simmons (CS) haciendo virar ligeramente el medio, el 5,26% resultó positivo en la prueba TSI en donde la cepa C20, acidificó todo el medio y solo dos de estas cepas (C10 y C15) acidificaron el fondo del medio debido a la fermentación de la glucosa; el 21,05 % de las cepas fueron Rojo de Metilo (RM) positivo, el 31,58 % de las cepas fueron positivas en la prueba Vogues-Proskauer (VP), el 36,84 % presentaron motilidad en el medio SIM, el 24,56 % de las cepas redujeron nitratos a nitritos (RN) y el 10,52% hasta amonio, el 52,63 % fueron Catalasa (CT) positivo y el 92,98 % fueron Oxidasa (OX) positivo.

De acuerdo con lo establecido en “*Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*” (Brenner *et al.*, 2010) y algunos autores como Barua *et al.*, 2012; Cardona M. & Sánchez de Prager, 1998; Flores Gallegos *et al.*, 2012; Greiner-Mai *et al.*, 1987; Ferrera y Alarcón, (2007); Madigan T *et al.*, (2009); Pajares y Bohanna, (2016); Cordero *et al.*, (2017) entre otros, en donde se definen algunos comportamientos morfológicos y bioquímicos de las bacterias en cuestión; se logró consolidar una “Matriz Teórica” con un total de aproximadamente 2268 OTU’s de referencia, con el que se logró establecer la primera similitud entre la “Matriz Teórica” y la “Matriz Práctica” en donde se lograron relacionar los primeros géneros con base a cada cepa (Figura 8), con base a la cercanía de cada cepa, se lograron identificar los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Clostridium*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Corynebacterium*, *Azotobacter* y *Flavobacterium* con una similitud del 91 al 100%

(Figura 9), a excepción del género *Geobacillus*, el cual se identificó con base a su cercanía con el género *Bacillus* y no con base a un reporte que defina su comportamiento diazótrofo.

Figura 8

Relación entre la Matriz Teórica y Práctica

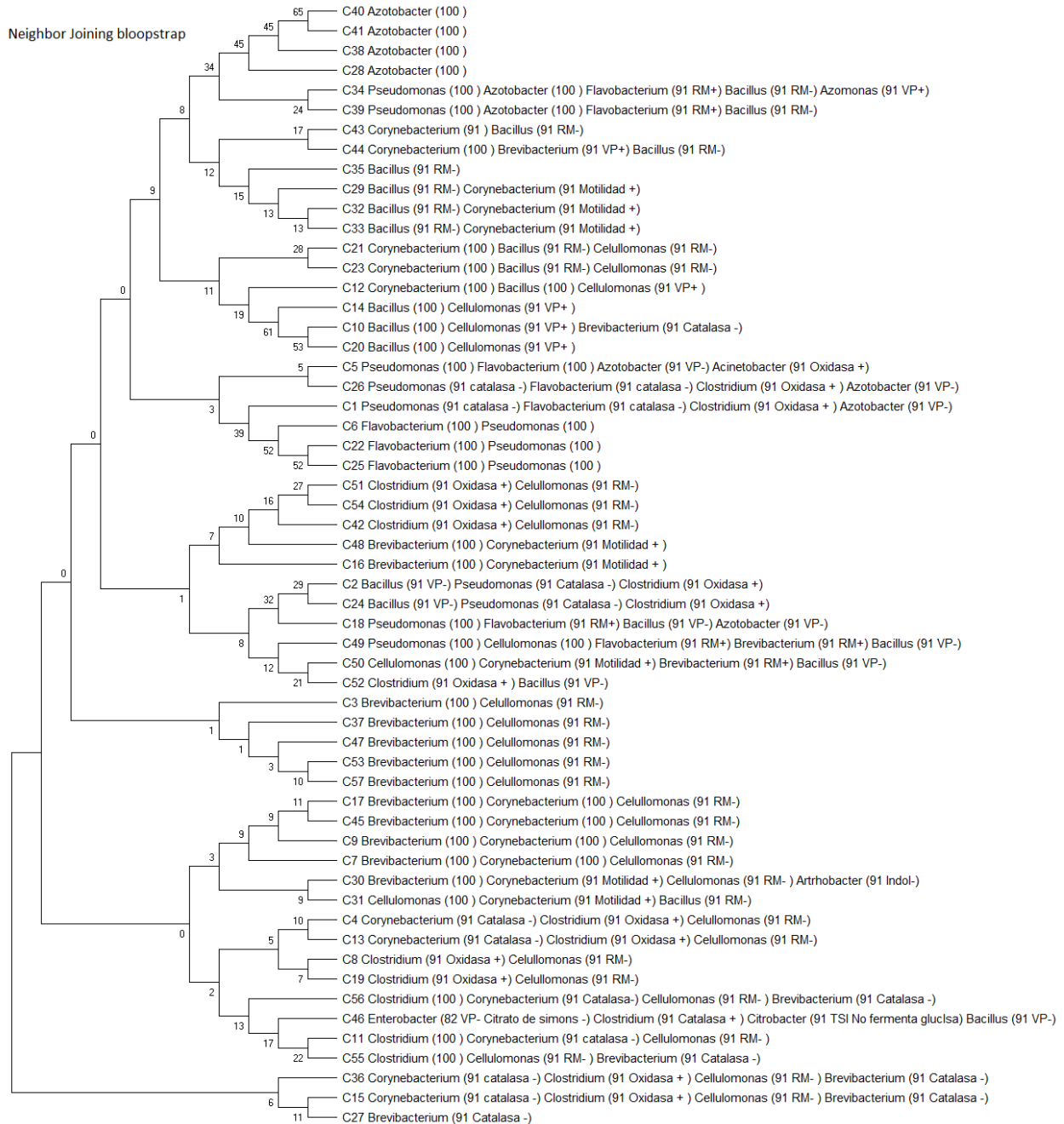
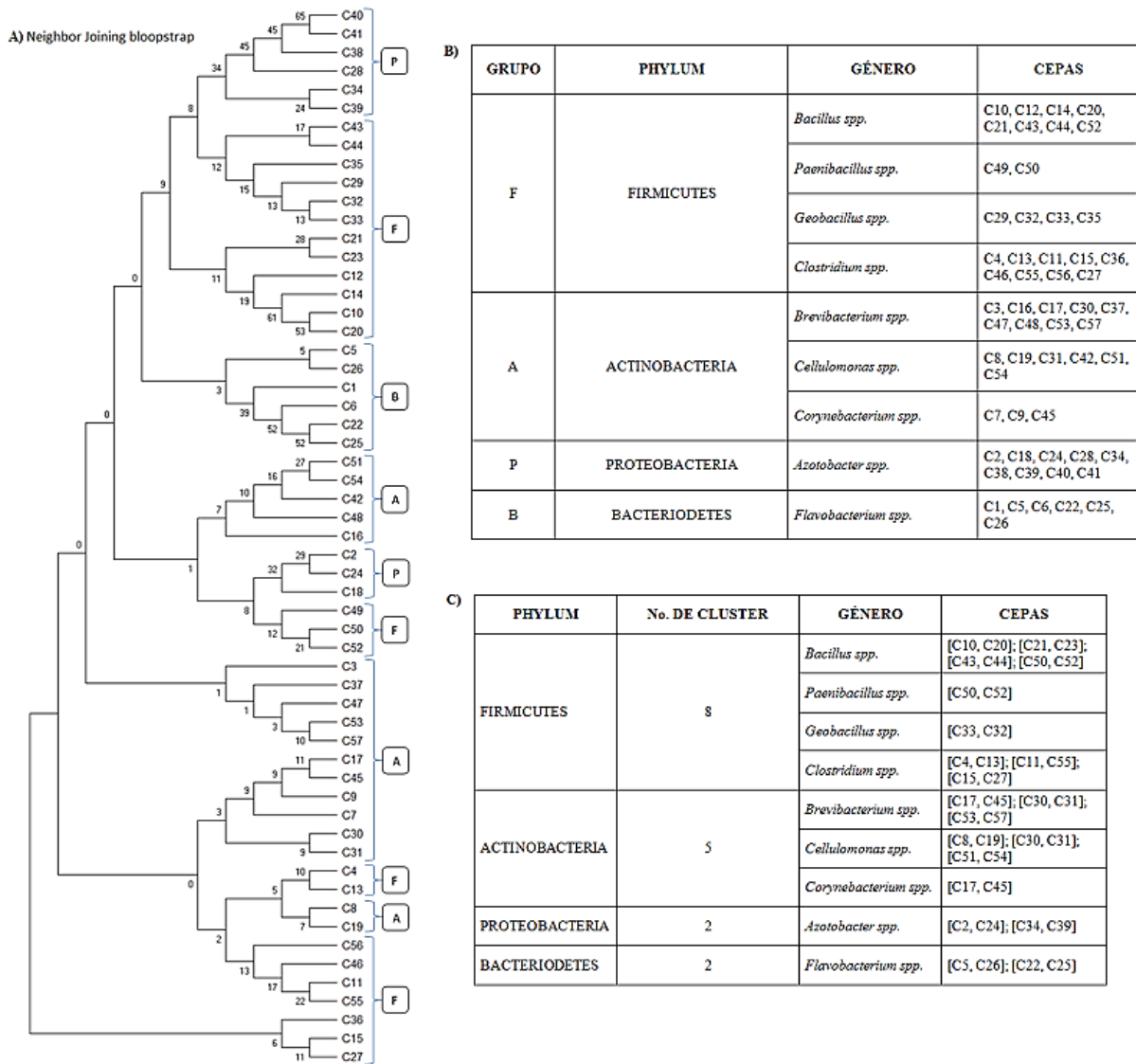


Figura 9

Relación fenética de los aislamientos caracterizados



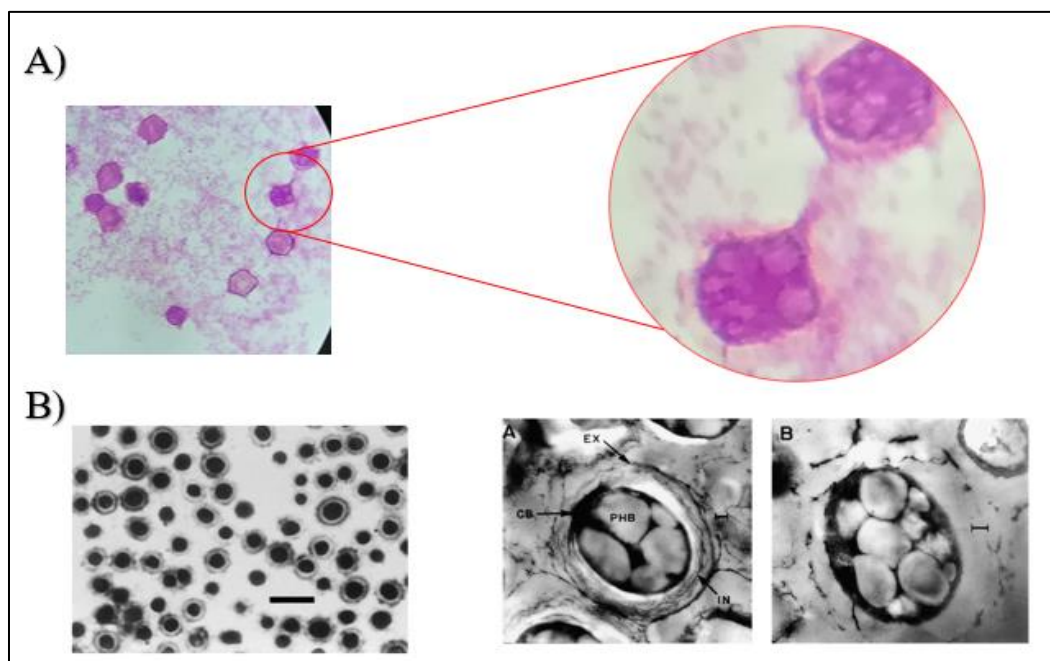
A) Ilustra la similitud fenética entre las cepas aisladas. B) Se idéntica el grupo de cepas aisladas de acuerdo con su Phylum y género. C) Ilustra una identificación general de los Clústeres formados en el fenograma.

Así como se observó un resultado “inesperado” con el caso de los *Geobacillus*, se observó cierto pleomorfismo en la morfología celular de la cepa C23, la cual presentó una similitud

morfológica y bioquímica del 91% con una alta cercanía fenética hacia el género *Bacillus*, pero con un pleomorfismo celular muy similar a los quistes desarrollados por las bacterias del género *Azotobacter* (Figura 10); dada su cercanía con el género *Bacillus*, se consideró especulativamente que esta morfología, puede ser el estado celular de alguna especie de *Bacillus* bajo condiciones de estrés, producto de alguna condición con las que se realizó el trabajo en el laboratorio. No obstante, pese a que no se contó con un análisis molecular, se optó por clasificar esta cepa dentro del phylum Firmicutes, ya que este se conforma de aproximadamente 250 géneros y tan solo el género *Bacillus* cuenta con alrededor de 95 especies según lo establecido en el manual de Bergey's vol 3 “*The Firmicutes*”.

Figura 10

Morfología celular cepa C23 y de quistes formados por el género Azotobacter



A) Morfología celular de la cepa C23 presente en el Anexo D; **B)** Microfotografías de quistes relacionados con el género *Azotobacter* tomadas del manual de Bergey's vol 2 “*The Proteobacteria Part C*” pag 387 – 388.

Con base a la cantidad de aislamientos relacionados en cada uno de los phylums observados en el fenograma de la Figura 9, se concretó cierta dominancia por el Phylum Firmicutes (42,1 %) y la presencia en menor proporción de los Phylums Actinobacteria (31,6 %), Proteobacteria (15,8 %) y Bacteriodetes (10,5 %).

Con respecto a la estimación de la riqueza específica (D_{mg}), se pudo observar que el valor de D_{mg} en ambos medios fue de 7,3 con relación al promedio de UFC registrado en la Tabla 6. Sin embargo, al observar de forma independiente la riqueza específica en los medios de cultivo (Nfb y Burk) con respecto al valor general ($D_{mg} = 7,3$) se evidenció un índice de riqueza específica mucho mayor en el medio Nfb con respecto al medio Burk (Tabla 3).

Tabla 3

Datos de Riqueza específica (D_{mg}) y Riqueza específica por gramo de suelo ($D_{mg/g}$)

MEDIO DE CULTIVO	S	N	D_{mg}	N_g	$D_{mg/g}$
Nfb	30	731	≈ 4,4	3068800	≈ 1,9
Burk	27	1394	≈ 3,6	2620495000	≈ 1,2
Nfb y Burk	57	2125	≈ 7,3	265118300	≈ 2,9

S: Número de las cepas aisladas; **N:** Sumatoria (Σ) del promedio de las UFC registrado en el Anexo B; **D_{mg} :** Estimación de riqueza específica; **N_g :** Sumatoria (Σ) UFC por gramo de suelo (UFC/g) (Tabla 3) y **$D_{mg/g}$:** Estimación de riqueza específica por gramo de suelo.

Al realizar la escala de la riqueza específica por gramo de suelo (sin cambiar el valor “S” en la ecuación), se observó en la Figura 11 una reducción en los valores equivalente al 58% en Burk, 67% en Nfb y del 60% en ambos medios con relación al índice de riqueza inicial (D_{mg}) establecido en la Tabla 3, sin embargo, al observar las proporciones entre cada uno de los índices de riqueza (D_{mg} y $D_{mg}/\text{gramo de suelo}$), se observó de manera independiente que los medios de cultivo con respecto al valor de ambos medios (Nfb y Burk) presentan una diferencia “mínima”, guardando casi la misma relación (Tabla 4).

Tabla 4

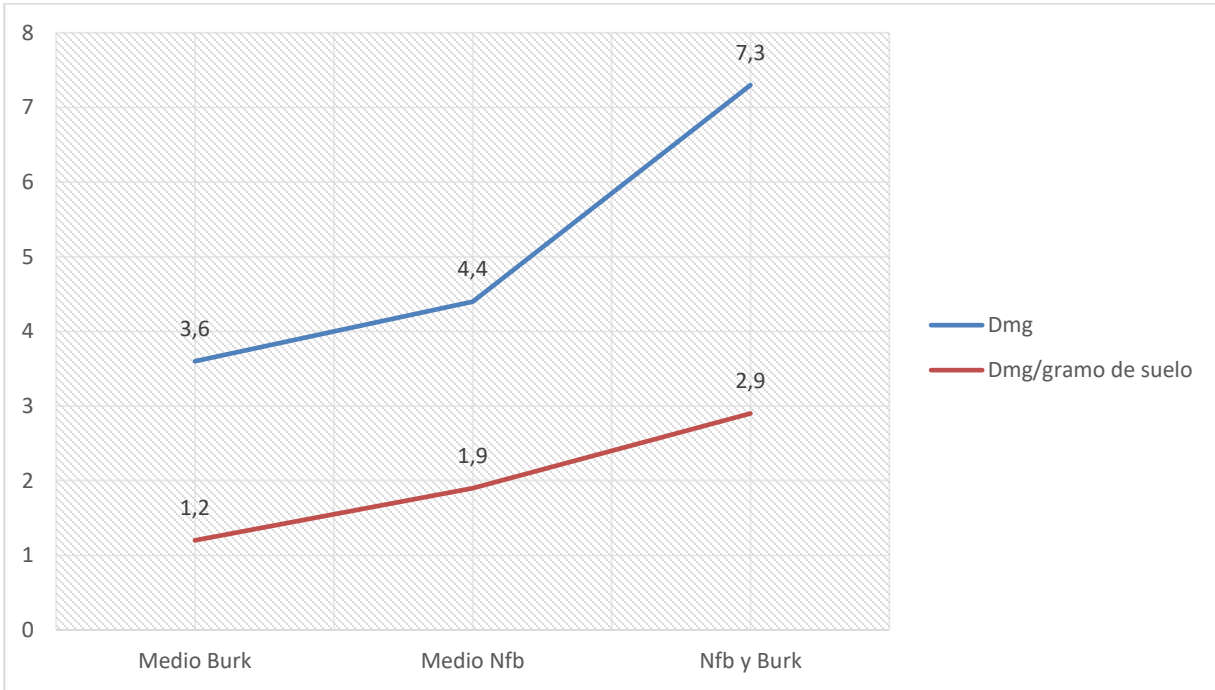
Relación entre los valores de riqueza específica D_{mg} y $D_{mg}/\text{gramo de suelo}$

Medio de cultivo	*Proporción D_{mg}	*Proporción $D_{mg}/\text{gramo de suelo}$	Diferencia entre riq. específica	% estimado
Nfb	1,65	1,52	$\approx 0,133$	4,17 %
Burk	2,02	2,41	$\approx 0,389$	8,75 %

*La proporción de cada uno de los medios de cultivo, se estimó con los resultados registrados en la Tabla 3 de los medios en conjunto (Nfb y Burk), es decir $\approx 7,3$ para D_{mg} y $\approx 2,9$ para $D_{mg}/\text{gramo de suelo}$.

Figura 11

Gráfico de Riqueza específica (D_{mg} y $D_{mg}/\text{gramo de suelo}$) entre los medios de cultivo



Finalmente se observó en los valores obtenidos durante la prueba CHI-CUADRADO, que el perfil microbiológico de las cepas detallado en el Anexo D, presenta una sucesión de $P < 0.05$ en donde se refleja una gran probabilidad para encontrar cepas de textura viscosa en Nfb y cepas no motiles, capaces de reducir nitrato y de formar quistes o esporulación central al emplear el medio de cultivo Burk.

Tabla 5*Factores con valor de P < 0.05 en la prueba CHI-CUADRADO*

Factor	Medio de cultivo		Valor de P
	Burk	Nfb	
Textura Viscosa	44%	77%	0.013
Presencia de esporulación central	37%	11%	0.025
Presencia de quistes	30%	3%	0.007
No motil	78%	50%	0.030
Capacidad para reducir nitratos	67%	17%	< 0.001

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la actualidad, existen diferentes mecanismos y métodos para el aislamiento y la caracterización de las bacterias diazótrofes comúnmente denominadas Bacterias Fijadoras de Nitrógeno; sin embargo, su aislamiento y la demostración de un comportamiento diazótrofo, se ha seguido evidenciando por la comprobación de crecimiento en medios de cultivos exentos de

nitrógeno combinado (Schlegel & Zaborosch, 1997), debido a que “*el nitrógeno en estado gaseoso (N₂) es usado como fuente de nitrógeno por algunas bacterias, las bacterias fijadoras de nitrógeno...*” (Madigan *et al.*, 2009, p.104). Bajo las condiciones de crecimiento mencionadas, junto con una purificación por agotamiento en los medios de cultivo, se garantizó que los aislamientos identificados crecieran por las condiciones del medio y no por la formación de metabolitos provenientes de otras cepas, permitiendo validar el desarrollo y la caracterización de 57 cepas en lugar de los 64 aislamientos seleccionados durante el recuento en placa.

Aunque la fijación biológica de nitrógeno es concebida comúnmente como una característica intrínseca o “exclusiva” de algunos microorganismos, atribuir dicho comportamiento a un grupo, orden, familia o género de bacterias específico, no sería correcto, ya que en principio, termina siendo un proceso de represión o regulación genética en el que se encuentran involucrados los genes “*nif*” (genes encargados de sintetizar las enzimas responsables de la fijación de N₂); un claro ejemplo de ello se puede observar con las cianobacterias, las bacterias pertenecientes a grupos de procariontes fototróficos, las proteobacterias, las bacterias rojas del azufre y sin azufre, que a pesar de ser microorganismos de diferentes grupos taxonómicos, son capaces de fijar N₂. (Madigan *T et al.*, 2009; Schlegel & Zaborosch, 1997; Willey J. *et al.*, 2014)

Debido a lo anterior, diferentes autores como Brenner *et al.*, (2010); Cordero *et al.*, (2017); Ferrera & Alarcón, (2007); Madigan T *et al.*, (2009); Pajares & Bohanna, (2016) entre otros, describen la capacidad diazotrofa de algunas especies de bacterias con las que se logró corroborar fenética y bioquímicamente el aislamiento de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Clostridium*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Corynebacterium*, *Azotobacter*, *Flavobacterium* y *Geobacillus*; sin embargo, cabe resaltar que este último género, se identificó a partir de la cercanía observada con el género *Bacillus* y no de un reporte que estableciera su capacidad diazotrofa. Para la identificación

de este género con respecto al género *Bacillus*, se tuvo en cuenta las diferencias morfológicas y los resultados obtenidos en la prueba “Rojo de metilo” (RM: negativo), debido a que dicha prueba, además de ser uno de los pocos caracteres fenotípicos de rutina empleados en la distinción del género *Geobacillus*, resulta ser una prueba positiva en casi todos los *Bacillus*, ya que estos suelen producir ácidos a partir de una variedad de carbohidratos logrando estabilizar su crecimiento dentro de estos. (Brenner *et al.*, 2010)

Con relación a los *Geobacillus* mencionados, cabe aclarar que, aunque su identificación no se haya realizado conforme a un reporte donde se describa su capacidad diazotrofa, diversos estudios permiten considerar su aislamiento bajo las condiciones trabajadas, pues a pesar de ser un género termófilo y extremófilo, se encuentran reportes de su aislamiento en condiciones de laboratorio a 25°C tras procesar muestras provenientes de biomas mesófilos e incluso psicrófilos (Brenner *et al.*, 2010), esta adaptabilidad o plasticidad biológica, fue complementada por Ching *et al.*, (2020), al observar en el genoma del *Geobacillus* genes capaces de codificar proteínas útiles de adaptación al estrés térmico, clasificando la mayoría de estas en la familia de la chaperona molecular y proteínas de choque térmico e incluso, se ha observado que las especies de este género son capaces de sintetizar varias enzimas como la amilasa, la lipasa, la proteasa, la celulasa, entre otras (Adhikari *et al.*, 2020; Kurashiki, 2020) que en definitiva, le permiten emplear diversos sustratos como fuentes de carbono y energía sin importar la temperatura o las condiciones del medio en el que se encuentren; gracias a estos comportamientos, dicho género posee una gran ubicuidad y puede encontrarse “con facilidad” en diversos biomas. (Brenner *et al.*, 2010; Dion & Shekhar N., 2008).

Además de los *Geobacillus* identificados, con respecto al pleomorfismo celular observado en la cepa C23 el cual se asemejó con los quistes que desarrollan algunas especies del género

Azotobacter, su caracterización dentro de este género fue reconsiderada, tras analizar su metabolismo, así como las demás características morfológicas, bioquímicas y su cercanía fenética dentro de un grupo de *Bacillus*, ya que en algunos casos, el género *Bacillus* desarrolla ciertos pleomorfismos denominados formas L o “*L-forms*”, con el que se puede establecer cierta relación, debido a que estas “bacterias en fase L” o “L-form” se caracterizan por presentar una escasa pared celular en la que se difumina o decolora parcialmente la tinción de Gram en la célula, suelen presentar células normales y células con morfologías esféricas de gran tamaño, las cuales pueden sufrir una lisis osmótica o quedar muy susceptible a ella. De igual forma, estas estructuras morfológicas fueron descritas por primera vez con Klieneberger, tras observar cierto pleomorfismo a causa del estrés causado por la presencia de algunos osmolitos como la sacarosa o las sales presentes en los medios de cultivos empleados en el laboratorio, al procesar muestras de *Bacillus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *Enterococcus*, *Klebsiella* y otras bacterias obtenidas de humanos, animales y plantas. (Errington *et al.*, 2016; Sykes, 2014)

Por otro lado, aunque “*la FBN es un carácter muy primitivo y altamente adaptativo.*” (FCA, 2014, p.105), este proceso, no deja de ser fácilmente reprimido cuando se encuentra el oxígeno presente en el medio o cuando el microorganismo sufre un estrés oxidativo (Cerón R. & Aristizábal G., 2012), por lo que existen ciertos factores ambientales y metabólicos como el tipo de suelo, la temperatura, la vegetación, el paisajismo, un alto consumo de ATP, “*Feedback Inhibition*” (inhibición por producto final) y el tipo de respiración realizada por el microorganismo, que además de limitar o regular en la mayoría de los casos un comportamiento diazótrofo, puede determinar la dominancia de un grupo taxonómico, así como la homogeneidad o heterogeneidad de una comunidad microbiana dentro de un ecosistema. (Eldor A., 2015; Madigan *et al.*, 2009; Schlegel & Zaborosch, 1997)

Con el fin de comprender un poco la naturaleza de los aislamientos obtenidos y su presunta relación con los factores ambientales y metabólicos descritos anteriormente, se consideró a groso modo que algunos de ellos como la vegetación, la presencia de nitrógeno en el suelo, los niveles de MO presente en el suelo, el tipo de suelo y el tipo de respiración realizada por el microorganismo, pueden ser más importantes que otros, pues a diferencia del paisajismo, la temperatura y el consumo de ATP; dichos factores, terminan de justificar algunos comportamientos morfológicos, bioquímicos y poblacionales registrados durante la caracterización de los aislamientos obtenidos.

La razón por la que el paisajismo al igual que la temperatura y el consumo de ATP, no se consideraron como “factores de interés”, se debe a que en principio el área trabajada no presentó algún patrón o comportamiento ajeno a las características de un bosque de niebla definidos por García de la Cruz *et al.*, 2014; de igual forma, el hecho de haber observado dentro y fuera del área de muestreo una espesa vegetación sin aparente fragmentación o intervención antrópica (Figura 4), se debe a que el área en cuestión, está ubicada en lo que la CAM, (2018) define como: “*El sector de bosque primario y secundario poco intervenido...*”(p.18); en donde se puede considerar la conservación del estado natural de algunos comportamientos como la descomposición de la hojarasca y los restos de material vegetal sobre el suelo, que en definitiva, determinan un sinnúmero de procesos microambientales, que además de enriquecer el suelo con MO (Materia Orgánica), amortiguan por definición edafológica la temperatura del suelo con respecto a la temperatura del ambiente, haciendo que en muchas ocasiones esta se logre mantener sin importar que las condiciones atmosféricas sean frías o calientes (Eldor A., 2014; Quintero, 2018). Estos comportamientos, no solo permiten comprender el hecho de que la temperatura del suelo ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$) fuera un poco mayor con respecto a la temperatura ambiental ($19^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$), sino que también,

justifica los altos contenidos de MO presente en el suelo, el cual puede terminar siendo empleado para la síntesis de ATP debido a la naturaleza quimiorganótrofa de todos los aislamientos obtenidos (Luters & Salazar, 2000; Molina, 2007).

En cuanto a los demás factores mencionados, se puede afirmar que la vegetación del PNRCPM es muy heterogénea, ya que al realizarse estudios exploratorios rápidos para cuantificar la conservación del PNRCPM, Días B. & Ladino M., (2018) en compañía con la CAM estimaron la presencia de alrededor de 18 familias y 63 géneros de plantas con un alto grado de conservación (97,8 %), haciendo que en resumen sea un ecosistema muy prometedor en cuanto a su riqueza de flora endémica. Este grado de conservación, permitió considerar en el área de muestreo algunos resultados como la dominancia del phylum Firmicutes, la variedad de morfotipos observados, la diversa similitud fenética entre los aislamientos obtenidos, el gran número de UFC, la diferencia de cantidades en UFC desarrolladas en Burk con respecto al medio de cultivo Nfb e incluso, permitió considerar indirectamente la razón por la cual el pH del suelo muestreado fue ligeramente ácido y que el nitrógeno total del suelo, se conformara en mayor proporción por el ion amonio (NH_4^+).

Cada una de las deducciones mencionadas, en especial la cantidad de UFC, así como la variedad de morfotipos observados, la diversa similitud fenética entre los aislamientos obtenidos y la dominancia del phylum Firmicutes, fueron consideradas debido a que en principio, la vegetación de cualquier ecosistema tiende a establecer con los microorganismos del suelo, el mismo tipo de condiciones de sinergismo y antagonismo que pueden desarrollar los microorganismos entre sí, ya sea por la liberación directa de exudados o por los restos de vegetales como ramas u hojas, que quedan suspendidos sobre el suelo no rizosférico o suelo a granel (Atlas & Bartha, 2002) haciendo que en términos generales, la abundancia, la riqueza y la dominancia poblacional de los

microorganismos presentes en el suelo, tenga cierta relación con la abundancia y riqueza vegetal presente en el área de estudio, siempre y cuando se considere la edad de las plantas que lo conforman.

Un claro ejemplo en cuanto a riqueza y dominancia relacionado con lo anterior, en especial con la edad de las plantas; se puede apreciar en los resultados publicados por Cordero *et al.*, (2017), en el cual, se aprecia la dominancia del phylum Proteobacteria durante la caracterización de las bacterias de vida libre presentes en el suelo rizosférico de la “*Caesalpinia spinosa (Mol.) Kuntze*”, que a pesar de estar ubicada en dos áreas similares (Área conservada adulta y Área recuperada en conservación), permitió observar en una de estas áreas, la presencia de un Phylum de más, sin importar que dichas zonas de muestreo se encontraran en el mismo bosque de niebla.

Por otro lado, aunque el valor del pH en el suelo varíe ampliamente con la capacidad de lavado, las pluviometrías del área, la presencia y contenido de MO e incluso con las raíces que se encuentren presentes en el suelo (Navarro B. & Navarro G., 2003); este parámetro, no deja de guardar cierta relación con el grado de madurez de la vegetación y la forma en la que se encuentra el nitrógeno presente en el medio, ya que en los suelos con valores de pH neutro/alcalino predomina la presencia de amoníaco (NH_3) (Alconada M. *et al.*, 2018), debido a que la vegetación en el área, cuando es joven, libera grandes cantidades de amoníaco al suelo durante la amonificación, ya que poseen tejidos más ricos en proteínas y los fenómenos de reutilización de estas, son más intensos al tener altos contenidos de glúcido y hemicelulosas (Navarro B. & Navarro G., 2003); a diferencia de los suelos donde el pH tiende a ser neutro/ácido, pues allí, prima la liberación de amonio (NH_4^+) (Alconada M. *et al.*, 2018) debido a que “...las plantas adultas, con tejidos más lignificados, son atacadas lentamente, con una débil liberación de amoníaco” (Navarro B. & Navarro G., 2003,p.202).

De acuerdo con lo anterior y al pH del suelo cercano a neutro (pH = 6,05), se puede validar en términos generales la relación entre el grado de conservación registrado por la CAM, (2018) y la vegetación presente en el área de muestreo, pues al ser un suelo cuyo pH tiende a ser neutro/ácido, va a primar la liberación y asimilación del nitrógeno en forma de ion amonio (NH_4^+), lo cual, no solo constata el grado de madurez de la vegetación presente en el área de muestreo, sino que también permite intuir que los procesos desarrollados allí se pueden “mantener” de forma natural debido a la conservación que se presenta *in situ*, por lo que existe indirectamente cierto grado de confiabilidad, de que los géneros identificados hacen parte de la microbiota edáfica de un ecosistema primario del PNRCPM y aún no han sido alterados o son producto de algún tipo de actividad agropecuaria.

Así mismo, la razón por la que se afirmó que la vegetación del área incidió sobre el aumento de la riqueza específica en el medio de cultivo Nfb con respecto a Burk, así como en la abundancia de las UFC desarrolladas en Burk con respecto al medio de cultivo Nfb; se debe a que en principio la fuente de carbono empleada en Burk tiende a ser más abundante en el área de muestreo, ya que la glucosa a diferencia del ácido málico suele ser más común en un entorno natural cuando predominan restos de material vegetal en el área, tal como lo enfatiza Echeverry & Méndez, (2017), *“en el suelo son más las fuentes naturales de glucosa que de malato, especialmente las que provienen del material vegetal.”*(p.62), ya que en principio las fuentes naturales de malato, suelen encontrarse principalmente en los frutos, mientras que la glucosa se puede encontrar fácilmente en la celulosa de las hojas u hojarasca. (Willey *et al.*, 2014)

Por otra parte, en cuanto al análisis de los demás factores mencionados (el tipo de suelo y el tipo de respiración realizada por el microorganismo); es necesario aclarar que los parámetros de referencia empleados por AGROSAVIA para clasificar en el suelo como “alto” o “bajo” los niveles

de nitrógeno total, fósforo total, la concentración de iones intercambiables (Ca^{++} , Mg^{++} , K^+ y Na^+) y la CIC (Capacidad de Intercambio Catiónico) evaluados en el informe *SI8-27591*, se encuentran sujetos a la interpretación “*ICA 1992. Fertilización en diversos cultivos*”, aplicada para la producción de cultivos de interés, por lo que su interpretación, puede variar cuando se trata de un análisis ajeno a dicha aplicación. No obstante, bajo un contexto microbiológico general, se puede afirmar de acuerdo con las propiedades físico-químicas registradas en la Tabla 1 con relación a la textura del suelo (informe *FS18-19242*), que las concentraciones presentes allí, mantienen el balance apropiado en el suelo para la correcta asimilación de cada uno de los parámetros evaluados, debido al lavado y a la selectiva retención que pueden llegar a presentar los suelos franco-arenosos (Garrido V., 2006; Lutens & Salazar, 2000).

De acuerdo con los parámetros evaluados (conductividad, fósforo disponible, materia orgánica, nitrógeno y carbono total), el suelo muestreado se puede clasificar como un suelo no salino, bajo en concentraciones de fósforo, rico en materia orgánica, bien provisto de nitrógeno y de carbono total, haciendo que en resumidas cuentas, los microorganismos presentes en él y sus procesos metabólicos, “*no se vean afectados por los iones Ca, Mg, K, Na, H (como cationes) o SO_4 , Cl, HCO_3 y OH (como aniones)*”(Lutens & Salazar, 2000, p.59); empleen alternativas en las que el uso del fósforo sea limitado para la fijación biológica de nitrógeno (Pajares y Bohanna, 2016) o en su defecto, obtengan gran parte de los nutrientes requeridos de la MO, ya que allí, se puede contar con unas excelentes reservas de C, N y S cuando supera el 5% de la composición en el suelo. (Eldor A., 2014; Garrido V., 2006; McKean J., 1993; Molina, 2007)

Aunque Pajares & Bohanna, (2016), se basaron en las proporciones de nitrógeno y fósforo (N/P) registradas en diferentes estudios, para considerar que la fijación biológica del nitrógeno en el suelo, varía de acuerdo con la cantidad de fósforo disponible en el medio, ya que a diferencia

del molibdeno (Mo), este elemento puede compensar de manera significativa la demanda energética de ATP. Otros autores como Reed *et al.*, (2013), demuestran mediante un análisis biogeoquímico, que la relación existente entre el molibdeno y el fósforo con respecto a la fijación de nitrógeno en bacterias de vida libre, varían dependiendo del ambiente y de otros factores como la disponibilidad de carbono, la humedad del sustrato, junto con los demás factores que se han mencionado durante esta discusión. Por lo que no se puede afirmar con los resultados obtenidos, si en esencia, las concentraciones “bajas” de fósforo disponible pueden intervenir de manera significativa con la FBN realizada en el área de muestreo, ya que los suelos con altos contenidos de hojarasca, suelen presentar altos contenidos de molibdeno con relación al contenido de fósforo, debido a que las concentraciones de fósforo son mayores conforme aumenta la profundidad en el horizonte O.

Sin discriminar la importancia del fósforo disponible en el suelo, se puede afirmar con base a este y a los demás parámetros físico químicos testeados, en especial con la textura del suelo y el índice de MO, que los aislamientos obtenidos coexisten con el área de muestreo en función al “ahorro de energía”, realizando una fijación de nitrógeno selectiva o en su defecto, alternan su función diazótropa con otra funciones metabólicas y/o biogeoquímicas en las que aprovechan los altos niveles de MO u hojarasca presentes en el área de muestreo, tal como lo documentó Atlas & Bartha, (2002) de Leschine *et al.* (1988), quienes manifestaron la capacidad de algunas bacterias celulolíticas para desarrollar una función diazótropa.

El “ahorro de energía” descrito anteriormente, se consideró al comprender la selectiva retención que poseen los suelos franco-arenosos debido a su grado de infiltración (alto-medio) (Luters & Salazar, 2000; SPEHU, 2009), ya que intervienen con el movimiento continuo de los nutrientes, haciendo que muchas de las comunidades allí sean muy heterogéneas y cuenten con una

continua variedad de sustratos (Mantilla P. *et al.*, 2009; Torsvik *et al.*, 1996); “disminuyendo” de alguna u otra forma la búsqueda de nutrientes y de paso el consumo energético (ATP), requerido para un mecanismo de desplazamiento flagelado. Esta particularidad del suelo muestreado, no solo sigue constatando la variedad de los aislamientos caracterizados (Figura 7), sino que también, permite comprender la ausencia de motilidad (SIM negativo) en el 63,15 % de las cepas, así como la formación de una banda de motilidad ligeramente difusa en la mayoría de los demás aislamientos caracterizados.

A pesar de que el requerimiento energético (ATP), no fue considerado en este caso como un factor directo que pudiese limitar o regular la FBN en condiciones naturales; los mecanismos mediante el cual se sintetizan estas moléculas sí. Ya que en principio, la FBN es considerado como uno de los procesos más exigentes con respecto al consumo energético (como mínimo un total de 16 ATP para fijar 2 NH₃ (Madigan *et al.*, 2009; Soto-Urzuá & Baca, 2001) y estas moléculas, solo pueden sintetizarse mediante la respiración o en su defecto, mediante un proceso de fermentación cuando los microorganismos en cuestión presentan un metabolismo quimiorganótrofo, tal como el de los aislamientos obtenidos según lo descrito por Brenner *et al.*, (2010); Madigan *et al.*, (2009); Willey *et al.*, (2014) entre otros autores.

Aunque los mecanismos de fermentación, pueden “*dar lugar a la producción de más ATP.*”(Willey *et al.*, 2014, p.192) e incluso es un proceso “*tan efectivo que algunos quimioorganotrofos no realizan una respiración en presencia del oxígeno u otro aceptor exógeno de electrones.*”(Willey *et al.*, 2014, p.192); se pudo observar con base a los resultados obtenidos, que las cepas identificadas sintetizan la mayor cantidad de ATP en función al tipo de respiración y no a un proceso de fermentación, debido a que menos del 50 % de los aislamientos presentó la capacidad para realizar un tipo de fermentación, ya sea al emplear una ruta butanodiólica (31,57

%), ácido mixta (14,03 %), de azúcares (5,26 %) o en su defecto de citrato (1,75 %), en comparación con el tipo de respiración, el cual fue realizado por el 100 % de los aislamientos; ya sea de forma anaerobia facultativa (45,61 % RN+, OX y CT +/-), microaerófila (29,82 % OX + y CT +) o estrictamente aerobia (24,57 % CT y RN -).

Debido a que la mayoría de los aislamientos, realizan una respiración anaerobia facultativa o microaerófila y al hecho de que una *“respiración anaerobia no es tan eficaz con respecto a la síntesis de ATP como la respiración aerobia...”* (Willey et al., 2014, p.204); se consideró que los aislamientos obtenidos, tienen la capacidad de incorporar una fuente de nitrógeno al suelo de manera selectiva y de forma regulada, ya sea mediante el nitrógeno atmosférico o mediante los compuestos presentes en la MO (Mayz F., 2004), en donde la textura del suelo, termina por favorecer estos procesos, ya que al ser un suelo en mayor proporción arenoso (65,4%) el *“... Silicio puede actuar como mejorador del suelo y puede reducir la lixiviación de los nutrientes en los suelos arenosos, especialmente N y K, guardándolos en una forma disponible para la planta.”* según lo descrito por Hernández, 2012, p.2. De igual forma, dicha particularidad del suelo, aumenta las probabilidades de que en este ocurra un mecanismo denominado *“Feedback Inhibition”* (Schlegel Hans, 1992, p.550), en donde se regula la incorporación de nitrógeno al suelo de forma natural, mediante *“un fenómeno llamado efecto “interruptor” del amoníaco”*.(Madigan et al., 2009, p.602)

Si bien la selectividad de un mecanismo de incorporación de nitrógeno al suelo, puede variar debido a la interacción entre el oxígeno y la nitrogenasa, ya que por definición, la presencia del O₂ así como los mecanismos de fosforilación oxidativa, suelen desnaturalizar e incluso afectar de forma irreversible la acción enzimática de la nitrogenasa (Soto-Urzúa & Baca, 2001), debido a que *“los e⁻ transferidos desde la ferredoxina pueden ser captados por el O₂ y no llegar a la unidad*

II de la Nasa.”(FCA, 2014, p.104); diversos microorganismos han optado por desarrollar algunos mecanismos de protección, con el fin de conservar de manera estable su comportamiento diazótrofo, ya que si se mantiene realizando una síntesis “*de novo*” de la nitrogenasa cada que esta se desnaturalice, se estaría empleando un alto consumo energético además del requerido durante la FBN y se estaría “*alterando el equilibrio entre la inactivación y la síntesis.*”(Soto-Urzúa & Baca, 2001, p.39) de la enzima.

En este orden de ideas, se consideró que los aislamientos estrictamente aerobios (*Bacillus* cepa C43 y C52, *Geobacillus* cepa C35, *Azotobacter* cepas C2, C24, C27, C28, C38, C40, C41, *Flavobacterium* cepa C26 y *Cellulomonas* cepas C42, C51 y C54), se encuentran sujetos a incorporar el oxígeno en su metabolismo debido a la ausencia de catalasas en su interior, lo cual, aunque termine siendo favorable en términos energéticos, tiende a limitar el uso de los mecanismos de protección para realizar una FBN sin que ocurra una desnaturalización de la enzima; dentro de estos se encuentra la síntesis “*de novo*” de la nitrogenasa (Soto-Urzúa & Baca, 2001) o en su defecto, la protección conformacional en la que ocurre una “*Eliminación metabólica del O₂ para reducir su concentración a niveles aceptables cerca del complejo enzimático*” (Soto-Urzúa & Baca, 2001 p.39).

Indistintamente del mecanismo de protección desarrollado por dichos aislamientos, su condición oxidativa, les proporcionaría la producción de ATP suficiente para realizar una fijación de nitrógeno atmosférico de manera continua, reduciendo a su vez la presencia del oxígeno para los demás aislamientos, permitiéndoles a su vez emplear diferentes mecanismos o estrategias de protección que van desde la formación de Clusters, la protección respiratoria, la autoprotección e incluso, la producción de alginato o de barreras que disminuyan la tensión del oxígeno (Soto-Urzúa & E. Baca, 2001), hasta el desarrollo de otros procesos de incorporación de nitrógeno al suelo como

la reducción asimilatoria o desasimilatoria de nitrato a amonio a partir de la materia orgánica.(Atlas & Bartha, 2002; García G., 1973; Willey *et al.*, 2014)

Con relación a los dos últimos mecanismos mencionados (reducción asimilatoria o desasimilatoria de nitrato a amonio), su funcionamiento se ve reflejado en condiciones naturales cuando los anaerobios facultativos emplean el NO_3^- (nitrato) de la MO como una fuente de nitrógeno o como un aceptor de electrones respectivamente; al ser reducido por la *nitrato-reductasa B* y posteriormente por la *nitrito-reductasa*, el nitrito es llevado hasta la liberación de amoniaco (NH_3) o amonio (NH_4^+), este comportamiento se puede observar en condiciones de laboratorio, si al realizar una reducción de nitratos, “*la adición de zinc no produce un cambio de color, los nitratos en el medio fueron reducidos más allá de nitritos a amonio o nitrógeno gaseoso N_2* ” (traducción realizada de Cappuccino & Sherman, 2014, p.197) tal como se observa en el Anexo C. Sin embargo, la diferencia más relevante ente estos mecanismos de reducción radica en el hecho en que “*la reductasa desasimilatoria de nitrato no se inhibe en presencia del amoniaco; por tanto, los iones de amonio pueden ser excretados en concentraciones relativamente elevadas.*”(Atlas & Bartha, 2002, p.420).

Con base en lo anterior, se puede afirmar que algunos de los aislamientos pertenecientes al género *Bacillus* (Cepa C10, C12, C14, C20, C21) desarrollan una reducción desasimilatoria de nitratos a amonio, debido a que redujeron los nitratos más allá de nitritos al adicionar polvo de zinc, lo cual resultó normal en este caso, ya que se encuentra dentro de los géneros más comunes que presentan este tipo de comportamientos en condiciones anóxicas (Atlas & Bartha, 2002; Eldor A., 2015; Madigan *et al.*, 2009; Willey *et al.*, 2014). De igual forma, se puede esperar que el 29,82 % de los aislamientos restantes cuyas pruebas de RN (Reducción de Nitratos) y OX (Oxidasa) fueron positivas, presenten una reducción asimilatoria de nitratos a amonio, ya que en primera

instancia el nitrato presente en la MO del suelo “no participaría en la producción de energía”(Willey *et al.*, 2014, p.228), puesto que sería más eficiente emplear la oxidasa para sintetizar la energía libre a partir del oxígeno, aun cuando las concentraciones de este sean “bajas” y en segunda instancia, este “...proceso está muy extendido entre las bacterias, hongos y algas”.(Willey *et al.*, 2014, p.228)

Para finalizar con el análisis entre la interacción de los factores ambientales y los aislamientos caracterizados; se puede añadir con base a lo descrito por algunos autores (Brenner *et al.*,2010; Guerrero 2015; Tejera H. *et al.*, 2011), que a raíz de la naturaleza quimiorganótrofa de los aislamientos obtenidos, los microorganismos en cuestión además de fijar nitrógeno, pueden sintetizar componentes de la MO presente en el suelo a fin de producir auxinas o fitohormonas como el AIA (ácido Indolacético), tal como lo realizan algunas especies de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Azotobacter* y *Cellulomonas*, las cuales a su vez, junto con algunas especies de *Clostridium*, establecen en la mayoría de los casos una acción antagónica con múltiples hongos fitopatógenos, nemátodos e incluso, larvas de insectos como *Phyllophaga elenans* (considerado como un fitófago de importancia agrícola) que afectan la integridad de diversas especies vegetales; por otra parte, algunas especies del género *Geobacillus*, suelen aumentar en masa mejorando la integridad del suelo cuando este sufre algún incendio o desastre forestal (Dion & Shekhar N., 2008) e incluso, algunos de los géneros en cuestión como lo es el caso del *Flavobacterium*, *Corynebacterium* y *Brevibacterium*, suelen remediar algunos hidrocarburos y otros contaminantes tal como se ilustra en las diferentes investigaciones registradas en el libro “*Rhizomicrobiome Dynamics in Bioremediation*” de Kumar, (2021).

En cuanto a la determinación de la riqueza específica mediante el índice de diversidad de Margalef, se puede afirmar, que aunque sea de esperarse cierta reducción en el valor de D_{mg} al

reemplazar el valor de “N” por “ $N_g = \text{UFC por gramo de suelo}$ ”, ya que este índice “*Transforma el número de especies por muestra a una proporción a la cual las especies son añadidas por expansión de la muestra*”(Moreno, 2001, p.26), cabe resaltar que la proporción de estos resultados (Tabla 4), trata de “mantenerse” puesto que su relación llega a variar por menos del 10% al emplear el medio de cultivo menos selectivo.

Por último, con respecto a los resultados obtenidos en la prueba CHI-CUADRADO, se puede afirmar que las diferencias en el perfil microbiológico de cada cepa, se relacionan con la selectividad que representa la fuente de carbono en cada uno de los medios evaluados, pues como ya se ha mencionado en párrafos anteriores, al emplearse la glucosa como fuente de carbono en el medio de cultivo Burk, la cantidad de UFC va a ser mayor y a su vez la competencia por los recursos, haciendo que de alguna u otra forma ciertos nutrientes se agoten más rápido que otros, por lo que es de esperarse la presencia de endosporas y quistes, ya que “*La formación de esporas no se desencadena hasta que faltan nutrientes o cuando se acumulan productos metabólicos...*”(Schlegel & Zaborosch, 1997, p81-82), de igual forma ocurre con la formación de quistes; sin embargo estos se diferencian de las endosporas, debido a que su función se enfoca más en el almacenamiento de nutrientes como el PHB (poly-13-hydroxybutyrate) como lo es en el caso de algunas especies del género *Azotobacter*; ya que los quistes en sí, pueden llegar a ser menos tolerantes a condiciones de estrés proveniente del calor e incluso de la luz UV. (Willey *et al.*, 2014)

Así como el uso directo de los nutrientes inmersos en el medio de cultivo, la presencia de O_2 puede llegar a ser un limitante en el medio Burk con relación al medio Nfb, por lo que es de esperarse que la mayoría de los aislamientos desarrollados en Burk cuenten con mecanismos alternos a una respiración aerobia, este suceso no solo asegura el hecho de que la mayoría de los aislamientos en Burk puedan reducir nitratos, sino que también constata la formación de células

viscosas en Nfb, pues como ya se ha mencionado dentro de los mecanismos de protección de la nitrogenasa, esta, al estar más expuesta al O₂, puede inactivar su desnaturalización, “*bien sea eliminando rápidamente el O₂ por la respiración, bien produciendo capas de mucosas que retardan el O₂...*”. (Madigan *et al.*, 2009, p.598)

Finalmente, aunque la motilidad de un microorganismo suele relacionarse con la presencia de flagelos y estos a su vez, llegan a ser un taxón específico para la diferenciación de algunos géneros e incluso especies (Greiner-Mai *et al.*, 1987; Willey *et al.*, 2014); se terminó por relacionar con base al valor de P en el factor “No motil” (Motilidad negativa en el medio SIM) de la Tabla 5, que la probabilidad de encontrar cepas motiles en el medio de cultivo Nfb con respecto al medio Burk resulta ser mayor, debido a que presuntamente la fuente de carbono (malato) en condiciones naturales no resulta ser tan abundante como la glucosa, por lo que no podrían acogerse con facilidad al “ahorro de energía” descrito en párrafos anteriores y por ende, serían cepas que tendrían que estar de alguna u otra forma en la búsqueda de nutrientes.

10. CONCLUSIONES

Indudablemente el PNRCPM, no solo resulta ser prometedor en el estudio de una amplia gama de especies de flora y fauna endémica, sino que también puede llegar a representar una gran variedad de bacterias, pues tan solo en lo que respecta al aislamiento de bacterias diazótroficas presentes en una muestra de suelo inferior al 1% de la extensión total del PNRCPM según lo establecido por Puentes C., (2020); se lograron replicar 57 cepas morfológica y en su mayoría bioquímicamente diferentes, relacionadas con los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Clostridium*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Corynebacterium*, *Azotobacter*, *Flavobacterium* y *Geobacillus*, en donde se puede considerar de este último género, un nuevo reporte que describe su capacidad diazótropa.

Por otra parte, se pudo corroborar con base a los resultados obtenidos y a las investigaciones realizadas, que las bacterias diazótroficas presentes en el área de muestreo pueden incorporar una fuente de nitrógeno asimilable al suelo, ya sea mediante la fijación directa de nitrógeno gaseoso (N_2) y/o mediante una reducción asimilatoria o desasimilatoria de nitratos, en donde se terminan incorporando respectivamente moléculas de amoníaco (NH_3) o en su defecto, iones de amonio (NH_4^+) durante el uso de la materia orgánica presente en el suelo. Así mismo, se puede afirmar que los aislamientos obtenidos, pueden desarrollar estos comportamientos de manera regulada bajo el principio “*Feedback Inhibition*”, logrando evitar en condiciones naturales la sobre carga de nitrógeno total mediante un proceso denominado “*interruptor del amoníaco*”, ya que en términos ecosistémicos, estos aislamientos no solo se limitan a desempeñar una actividad diazótropa, sino que también pueden desarrollar otros procesos biogeoquímicos, donde contribuyen de manera a priori con el sostenimiento de la vegetación presente en el área de muestreo, compuesta por briófitos, pteridofitas, pteridofitas arbóreas o arborescentes, pinos, plantas leñosas y epífitas.

Con relación a la determinación de la riqueza específica, se puede afirmar que a pesar de haberse observado una disminución de aproximadamente el 60% en el valor de $D_{\text{mg/gramo}}$ de suelo con respecto al valor de D_{mg} ; la proporción de cada uno de los valores obtenidos en la riqueza específica de cada medio con respecto a la riqueza total se trata de conservar, a pesar de la “selectividad” que puede llegar a representar la fuente de carbono en cada uno de los medios. Sin embargo, es recomendable considerar las fuentes de carbono que pueden observarse de forma natural (*in situ*), ya que, al momento de determinar la riqueza específica en un área de muestreo, esta termina por definir la abundancia de las UFC que se van a desarrollar sobre cada uno de los medios de cultivo.

De igual forma, conforme a la abundancia descrita anteriormente, se terminó por asegurar de acuerdo con los valores obtenidos en la prueba CHI-CUADRADO cuya sucesión de P fue menor al 0.05, la probabilidad de aislar cepas con texturas viscosas, reductoras de nitratos y formadoras de quistes o esporulación central, exceptuando el factor “no motil” observado en la mayoría de cepas desarrolladas sobre Burk, ya que este a diferencia de una “competencia por nutrientes” en el medio de cultivo, termina por guardar cierta relación con el “ahorro de energía” y la abundancia de la fuente de carbono presente en condiciones naturales.

11. REFERENCIAS

- Alconada Magliano, M. M., Lanfranco, J. W., & Pellegrini, A. E. (2018). Suelo en el paisaje. In *SUELO EN EL PAISAJE PARTE I CONDICIONES DE DOTACIÓN* (1 ed, Vol. 1). EDULP. <https://doi.org/10.35537/10915/96774>
- Acero Barraza, S. M. (2007). *Algoritmo para análisis filogenético: UPGMA*. Barranquilla: (Master's thesis, Pregrado en Ingeniería de Sistemas y Computación).
- Adhikari, H., Ghimire, S., Khatri, B., & KC, Y. (2020). Análisis polifásico de dos termotolerantes y exozimas que producen especies geobácilas de los resortes calientes de Nepal. *Revista de Microbiología, Biotecnología y Ciencias de los Alimentos*, 9(4), 1059-1064.
- Álavarez López, C. L. (2012). Identificación y caracterización bioquímica, morfológica y molecular de microorganismos cultivables asociados a la rizosfera y al sustrato de plantas de vainilla. Tesis Doctoral. Medellín: Universidad Nacional.
- Alimonda, H., Pérez, C. T., & Martín, F. (2017). Alimonda, Héctor, Toro Pérez, Catalina y Martín, Facundo (Coordinadores) (2017) *Ecología política latinoamérica. Pensamiento crítico, diferencia latinoamericana y rearticulación epistémica*. In *Espacio Abierto* (Vol. 27, Issue 1).
- Atlas, R. M., & Bartha, R. (2002). *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*. PEARSON EDUCACIÓN, S.A.
- Barua, S., Tripathi, S., Chakraborty, A., Ghosh, S., & Chakrabarti, K. (2012). Characterization and crop production efficiency of diazotrophic bacterial isolates from coastal saline soils. *Microbiological Research*, 167(2), 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.04.001>

- Beltrán Pineda, M. E., Rocha Gil, Z. E., Bernal Figueroa, A. A., & Pita Morales, L. A. (2017). Microorganismos funcionales en suelos con y sinvegetalización en el municipio de Villa De Leyva, Boyacá. *Colombia Forestal*, 20(2), 158-170.
- Brenner, D. J., Kireg, N. R., Staley, J. T., Garrity, G. M., Ludwig, W., Rainey, F. A., y otros. (2010). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer.
- Cappuccino, J. G., & Sherman, N. (2014). *MICROBIOLOGY A LABORATORY MANUAL* (10 ed). PEARSON EDUCATION.
- Cardona M., S., & Sánchez de Prager, M. (1998). Bacterias de vida libre fijadoras de N₂ en dos suelos del valle del cauca. *Acta Agronómica*, 48(3-4), 43-54. http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/48011
- Castillo B., A. P., Figueroa R., B. L., Lozano G., S., Olvera V., M., & Cuevas G., R. (2016). Historia florística y ambiental del bosque mesófilo de montaña en el centro-occidente de México durante la pequeña edad de hielo. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, VIII, 216 - 229.
- Cerón Rincón, L. E., & Aristizábal Gutiérrez, F. A. (2012). Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1) 285-295.
- CHING, X. J., TEOH, C. P., LEE, D. J., GONZÁLEZ-ARAVENA, M., NAJIMUDIN, N., CHEAH, Y. K., . . . WONG, C. M. (2020). Genome Of A Thermophilic Bacterium *Geobacillus* sp. TFV3 from Deception Island, Antarctica. *Advances in Polar Science*, 146-152.

- Cordero, I., Ruiz Díez, B., Balaguer, L., Richter, A., Pueyo, J., & Rincón, A. (2017). Rhizospheric microbial community of *Caesalpinia spinosa* (Mol.) Kuntze in conserved and deforested zones of the Atiquipa fog forest in Peru. *Applied Soil Ecology*, 128 - 133.
- Corporación Autónoma Regional del Alto Magdalena. (2018). *Actualización Plan de Manejo Ambiental Parque Natural Regional Cerro Páramo Miraflores*. 142, 180.
<https://www.cam.gov.co/areas-protegidas/planes-de-manejo/category/71-pnr-miraflores.html?download=6969:pma-pnr-miraflores>
- Díaz B., C. A., & Ladino M., J. L. (2018). Estructura y composición del ensamblaje de mamíferos terrestres y voladores de la franja altoandina y de subpáramo del parque natural regional cerro páramo Miraflores (Huila, Colombia). Bogotá, Colombia.
- Dion, P., & Shekhar Nautiyal, C. (2008). *Microbiology of Extreme Soils* (Vol. 13). Verlag , Heidelberg, Berlin : Springer.
- Echeverry Hernández, S. (2017). *Manual de prácticas de laboratorio en microbiología*. Neiva.
- Echeverry Hernández, S., & Méndez Puentes, C. A. (2017). Estudio exploratorio de la microbiota edáfica en el Centro de Investigación y Educación Ambiental La Tribuna, Neiva-Huila. *Ingeniería y Región* (18), 53-64.
- Eldor A., P. (2015). *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry* (4 ed). ELSEVIER.
- Errington, J., Mickiewicz, K., Kawai, Y., & Juan Wu, L. (2016). L-form bacteria, chronic diseases and the origins of life. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1707).

- Etchvers, J., Fisher, R., Vidal, I., Sayre, K., Sandoval, M., Olesho, K., y otros. (2000). Labranza de conservación, índices de calidad del suelo y captura de carbono. In Memorias del Simposio Internacional de labranza de conservación. Mazatlán, Sinaloa: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agro Pecuarias–Produce.
- FCA. (2014). *UNIDAD VII: FIJACIÓN BIOLÓGICA DE N₂*. Facultad de Ciencias Agropecuarias.<http://agro.unc.edu.ar/~microbiologia/wp-content/uploads/2014/04/unidad-7-Fijación-biológica-de-nitrógeno.pdf>
- Ferrera, R., & Alarcón, A. (2007). Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo. Mexico: Trillas.
- Flores Gallegos, A. C., Contreras Esquivel, J. C., Reyes Valdés, M. H., & Rodríguez Herrera, 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.
- García de la Cruz, Y., Ramos prado, J. M., Quintanar I., P. Alejandra, & Hernández Ramírez, A. M. (2014). Bosque de niebla: importancia, situación actual y manejo. *Elementos*, 93, 23–29.
- García Guerrero, M. (1973). *El sistema reductor de nitrato de "Azobacter chroococcum"*. Recuperado el septiembre de 2019, de Deposito de Investigación Universidad de Sevilla: <https://idus.us.es/xmlui/handle/11441/15623>
- Garrido Valero, S. (2006). *Interpretación de análisis de suelos* (Vol. 5). Madrid: Rivadeneyra S.A.
- Goldsby, K. A., & Chang, R. (2013). *Química, undécima edición*.

- Greiner-Mai, E., Kroppenstedt, R. M., Korn-Wendisch, F., & Kutzner, H. J. (1987). Morphological and biochemical characterization and emended descriptions of thermophilic actinomycetes species. *Systematic and Applied Microbiology*, 9(1–2), 97–109. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(87\)80062-0](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(87)80062-0)
- Guerrero, A. M. (2015). Caracterización de *Paenibacillus* sp. JH1 aislada del agua de mar de la Bahía de Cartagena. Bogotá: Uniandes.
- Hernández S., R., Fernández C., C., & Baptista L., P. (2010). *Metodología de la investigación* (5 ed.). México: McGraw-Hill.
- Hernández, E., Ferra Cerrato, R., & Rodriguez, R. (2003). Bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno atmosférico en rizósfera de frijol contaminado con queroseno. *Terra Latinoamericana*, 81-89.
- Jiménez J., J. (2017). Guía para la realización de un estudio ambiental: El caso de la cuenca del río Adra (Vol. 11). España: Universidad de Almería.
- Kumar, V. (2021). Rhizomicrobiome Dynamics in Bioremediation. In *Rhizomicrobiome Dynamics in Bioremediation*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780367821593>
- Kurashiki, R., Mizuno, T., Murata, K., Ohshir, T., & Suzuki, H. (2020). Un vector plasmídico que dirige la hiperproducción de proteínas recombinantes en las especies de *Geobacillus* termófilos. *Extremophiles*, 24(1), 147-156.
- Luters, A., & Salazar Lea, J. C. (2000). Guía para la Evaluación de la Calidad y Salud del Suelo. *Departamento de Agricultura USDA*, 66(2), 4.

- Lara, C., Villalba, M., & 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. <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/711>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2009). *Brock, biología de los microorganismos*. (10 ed). PEARSON.
- Mantilla L., C., Villaba Anaya, M., & Oviedo Zumaké, L. E. (2007). Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos Cordoba Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, IX, 6-14.
- Mantilla Paredes, A. J., Cardona, G. I., Peña Vanegas, C. P., Murcia, U., Rodríguez, M., & 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*, 4(57), 915-927.
- Mayz Fuigeroa., J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *UDO Agrícola*, 1-20.
- McKean J., S. (agosto de 1993). *Manual de análisis de suelos y tejido vegetal: Una guía teórica y práctica de metodologías*. Recuperado el septiembre de 2019, de CIAT: http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/Digital/S593.M2_Manual_de_an%C3%A1lisis_de_suelos_y_tejido_vegetal_Una_gu%C3%ADa_te%C3%B3rica_y_pr%C3%A1ctica_de_metodologia.pdf
- Molina, E. (2007). Análisis de suelos y su interpretación. *Amino Grow Internacional*.
- Moreno, C. E. (2001). Métodos para medir la biodiversidad. In *Syria Studies* (M&T-Manu, Vol. 1).

https://www.researchgate.net/publication/269107473_What_is_governance/link/548173090cf22525dcb61443/download%0Ahttp://www.econ.upf.edu/~reynal/Civilwars_12December2010.pdf%0Ahttps://think-asia.org/handle/11540/8282%0Ahttps://www.jstor.org/stable/41857625

Moreno, S. R., Armenteras Pascual, D., & Cadena Vargas, C. E. (2017). *Evaluación del estado de los bosques de niebla y de la meta 2010 en Colombia*. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.

Navarro Blaya, S., & Navarro García, G. (2003). *QUÍMICA AGRÍCOLA EL SUELO Y LOS ELEMENTOS QUÍMICOS ESENCIALES PARA LA VIDA VEGETAL* (Mundi-Pren).

Narváez Cruz, Y., Rico Arzate, E., Castro-Arellano, J. J., Noriega-Altamirano, G., Piña-Escobedo, A., Murugesan, S., y otros. (2019). Obtención de microorganismos en suelos de un bosque de niebla, para la degradación de hidrocarburos aromáticos. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 95-107.

Olimpa, P., Valeria, V., & Giuseppe, B. (2013). Dynamic of functional microbial groups during mesophilic composting of agro industrial wastes and free living (N₂) fixing bacteria application. *Waste Management*, Vol 33.

Pajares, S., & Bohannon, B. J. (2016). Ecology of nitrogen fixing, nitrifying, and denitrifying microorganisms in tropical forest soils. *Frontiers in microbiology*, 7, 1045.

Palacio Hernández, N. D. (2012). Uso de tres mejoradores de retención de nutrientes en el suelo. In Cevallos – Ecuador. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5224/1/UPS-QT03885.pdf>

Panke Buisse, K., Poole, A. C., Goodrich, J. K., Ley, R. E., & Kao Kniffin, J. (2015). Selection on soil microbiomes reveal reproducible impacts on plant function. *The ISME Journal*, 9(4), 980.

Puentes Caballero, A. F. (2020). Revisión de Proyectos de Compra de Predios en la Vigencia 2019 Para el Manejo y Conservación del Cerro Paramo de Miraflores “Rigoberto Urriago” en el Municipio de Garzón Departamento del Huila [Universidad Nacional Abierta y a Distancia]. In *Universidad Nacional Abierta y a Distancia*.

Quintero, O. (5 de mayo de 2018). *Temperatura del suelo, manifestación de la eficiencia tropical*.
Obtenido de Engormix: <https://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/temperatura-suelo-manifestacion-eficiencia-t42127.htm>

Reed, S. C., Cleveland, C. C., & Townsend, A. R. (2013). Relationships among phosphorus, molybdenum and free-living nitrogen fixation in tropical rain forests: results from observational and experimental analyses. *Biogeochemistry*, 114(1-3), 135-147.

Sampiña, F. (2006). *¿Un futuro sostenible? El cambio global visto por un científico preocupado*. Valencia: Universidad de València.

Schlegel, H. G., & Zaborosch, C. (1997). *MICROBIOLOGÍA GENERAL* (9 ed). Omega, S.A.

Sociedad Española de productos húmicos S.A. (14 de mayo de 2009). *El silicio (si) como elemento fertilizante y protector de enfermedades y plagas*. Recuperado el septiembre de 2019, de Interempresas:
https://www.interempresas.net/FeriaVirtual/Catalogos_y_documentos/81972/028---15.05.09---El-Silicio-como-fertilizante-y-fungicida.pdf



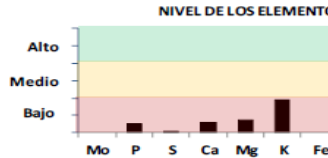
- Soto-Urzúa, L., & Baca, B. E. (2001). Mecanismos de protección de la nitrogenasa a la inactivación por oxígeno. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 43(1), 37–49.
- Sykes, J. E. (2014). Cell Wall–Deficient Bacterial Infections. *Canine and Feline Infectious Diseases*, 380-381.
- Tejera Hernández, B., Rojas Badía, M. M., & Heydrich Pérez, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *CENIC Ciencias Biológicas*, 43(3), 131-138.
- Torsvik, V., Sorheim, R., & Goksoyr, J. (1996). Total bacterial diversity in soil and sediment communities-a review. *Indust. Microbiol*, 17, 170-178.
- Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2014). *Prescott's Microbiology* (9 ed). McGraw-Hill.

12. ANEXOS

Anexo A. Composición de los medios de cultivo empleados.

Medio de cultivo sólido "Nfb"		Medio de cultivo sólido "BURK"	
Composición:		Composición:	
Ácido málico	5 g/L	Glucosa	5 g/L
Azul de bromotimol	5 %	Agar Agar	15 g/L
Agar Agar	15 g/L		
KH ₂ PO ₄	0.4 g/L	Sln A	
K ₂ HPO ₄	0.1 g/L	KH ₂ PO ₄	0.4g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g/L	K ₂ HPO ₄	0.1 g/L
NaCl	0.1 g/L		
CaCl ₂	0.02 g/L	Sln B	
FeCl ₃	0.01 g/L	NaCl	2 g/L
MoO ₄ Na · 2H ₂ O	0.002 g/L	CaSO ₄ · 2H ₂ O	0.5 g/L
		MgSO ₄	2 g/L
		Sln C	
		MoO ₄ Na · 2H ₂ O	0.03 g/L
		FeSO ₄	0.01 g/L
Se ajustó el pH a 6.8 directamente con perlas de KOH.		Para la preparación del medio, se toman 100 mL de cada solución (sln A, sln B, sln C), se añade la glucosa, el agar agar y se ajusta el pH a 7,2.	

Anexo B. Informe S18-27591 realizado por AGROSAVIA

				REPORTE DE RESULTADOS LABORATORIO DE SERVICIOS UNA MUESTRA VINCULACIÓN DE CONOCIMIENTO Y TECNOLOGÍA					
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria		ORGANISMO NACIONAL DE ACREDITACIÓN DE COLOMBIA		ISO/IEC 17025:2005 13-LAB-031					
LABORATORIO DE QUÍMICA DE SUELOS, AGUAS Y PLANTAS				<table border="1"> <tr> <td># DE SOLICITUD</td> <td>CODIGO DE LABORATORIO</td> </tr> <tr> <td>4107</td> <td>S18-27591</td> </tr> </table>		# DE SOLICITUD	CODIGO DE LABORATORIO	4107	S18-27591
# DE SOLICITUD	CODIGO DE LABORATORIO								
4107	S18-27591								
1. Información del cliente									
Nombre y Apellido: WENNY VANESSA BARRIOS LOZANO									
Cédula o NIT: 1075296390									
Dirección: CLL 19 38-63									
Dpto: HUILA									
Municipio: NEIVA									
Tel. fijo/Celular: 3186897898									
Tipo de análisis: Fertilidad Caracterización. Elemento Carbono Total. Elemento Nitrogeno Total. **									
2. Información de la muestra									
Identificación:	1	Altura	NO INDICA						
Matriz	SUELO	Cultivo	NO INDICA						
Vereda	NO INDICA	Estado:	NO INDICA						
Finca:	NO INDICA	Topografía del terreno	NO INDICA						
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA con acreditación ONAC vigente a la fecha, con código de acreditación 13-LAB-031, bajo la norma ISO/IEC 17025:2005*El laboratorio tiene acreditación ONAC bajo la norma NTC ISO/IEC 17025 en los ensayos de: pH (VC_R_004 versión 03 de 2017-01-28), fósforo disponible Bray II (VC_R_007 versión 02 de 2017-09-22), conductividad eléctrica en suelos (NTC 5596:2008), cationes cambiables en suelo calcio, magnesio, potasio y sodio disponibles (ID_R_072 versión 5 de 2017-09-28), micronutrientes en suelo por Olsen modificado Hierro, Manganeso, Cobre y Zinc (NTC 5526:2007)*.									
Fecha de recepción: 2018-10-26		Yeni Rodriguez Giraldo. (E6968)							
Fecha(s) de análisis: De: 2018-10-31 2018-11-08		Coordinador Técnico de Laboratorio							
Fecha de reporte: 2018-11-20									
DETERMINACION ANALÍTICA	UNIDAD	MÉTODO	VALOR*	INTERPRETACIÓN*					
pH	Unidades de pH	VC_R_004 Versión 03	6,05	LIGERAMENTE ACIDO					
Conductividad eléctrica	dS/m	NTC 5596:2008	0,34	NO SALINO					
Materia orgánica (MO)	g /100 g	Walkey & Black	11,06						
Fósforo disponible (P) Bray II	mg/kg	VC-R-007 Versión 02	4,72	BAJO					
Nitrógeno total	mg/kg	Fosfato monobásico de calcio	0,59	BAJO					
Acidez intercambiable (Al+H)	cmol _e /kg	KCl	ND						
Aluminio intercambiable (Al)	cmol _e /kg	KCl	ND						
Calcio intercambiable (Ca)	cmol _e /kg	ID-R-072 Versión 5	0,79	BAJO					
Magnesio Intercambiable (Mg)	cmol _e /kg	ID-R-072 Versión 5	0,47	BAJO					
Potasio intercambiable (K)	cmol _e /kg	ID-R-072 Versión 5	0,19	BAJO					
Sodio intercambiable (Na)	cmol _e /kg	ID-R-072 Versión 5	<0,14	BAJO					
Capacidad de intercambio catiónico (CICE)	cmol _e /kg	Suma de cationes	1,58	BAJO					
Carbono Total	mg/kg	Combustión Seca / Analizador elemental	6,41						
SATURACION DE BASES		NIVEL DE LOS ELEMENTOS*							
Saturación de Calcio	50% Medio								
Saturación de Magnesio	29% Alto								
Saturación de Potasio	12% Alto								
Saturación de Sodio	9% Normal								
Saturación de Aluminio	ND ND								
RELACIONES IÓNICAS									
Relacion Ca/Mg	1,7								
Relacion (ca+Mg)/K	6,7								
Relacion Mg/K	2,5								
Relacion Ca/B	#DIV/0!								
OBSERVACIONES: * Interpretación basada en: ICA, 1992. Fertilización en diversos cultivos. Quinta aproximación. Manual de asistencia N 25; ND: No Determinado; Se hace corrección por pW (factor de corrección por humedad) para los análisis de Materia orgánica (MO), Fósforo disponible (P) Bray II, Azufre disponible (S), Acidez intercambiable (Al+H), Aluminio intercambiable (Al), Calcio intercambiable (Ca), Magnesio Intercambiable, Potasio intercambiable (K), Sodio intercambiable (Na), Hierro disponible (Fe)Olsen, Manganeso disponible (Mn) Olsen, Zinc disponible (Zn) Olsen, Cobre disponible (Cu) Olsen y Boro disponible (B).									
Los resultados son válidos únicamente para la muestra en referencia Este documento ha sido producido electrónicamente y es válido sin la firma. Este documento no puede ser reproducido total ni parcialmente, sin la autorización formal de AGROSAVIA Para peticiones, quejas, solicitudes de información comuníquese al correo electrónico atencionalcliente@agrosavia.co o a la línea telefónica 018000121515									
CORPORACIÓN COLOMBIANA DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA, NIT: 800194600-3 CENTRO DE INVESTIGACIÓN TIBAITATA KILOMETRO 14 VÍA MOSQUERA (CUNDINAMARCA) TELÉFONOS: 4227300, extensión 1414 E-MAIL: ypaecz@agrosavia.co									
GA-F-97 Version: 3 Fecha de aprobación: 2018-10-11									

FIN DEL INFORME

Anexo C. Registro detallado del recuento en placa

Tabla 6

Conteo detallado de UFC obtenidas en los medios de cultivo Burk y Nfb

Medio de cultivo Nfb			Medio de cultivo Burk		
No. de Dilución.	UFC/ réplica	Promedio de UFC	No. de Dilución.	UFC/ réplica	Promedio de UFC
	> 300			> 300	
10-1	> 300	> 300	10-1	> 300	> 300
	> 300			> 300	
	268			300	
10-2	300	284	10-2	289	295
	283			296	

Medio de cultivo Nfb			Medio de cultivo Burk		
No. de Dilución.	UFC/ réplica	Promedio de UFC	No. de Dilución.	UFC/ réplica	Promedio de UFC
	84			223	
10-3	127	106	10-3	284	258
	108			268	
	37			184	
10-4	35	38	10-4	164	174
	42			173	
	1			124	
10-5	2	2	10-5	119	122
	2			123	

Medio de cultivo Nfb			Medio de cultivo Burk		
Dilución seriada No.	UFC/ réplica	Promedio de UFC	Dilución seriada No.	UFC/ réplica	Promedio de UFC
	0			130	
10-6	1	1	10-6	124	127
	1			126	
	0			129	
10-7	1	0	10-7	107	118
	0			117	

Anexo C. Registro fotográfico de reducción desasimilatoria de nitratos.

Figura 12

Reducción de nitratos con polvo de zinc



Reducción desasimilatoria (el medio permanece amarillo con polvo de zinc) RN +

Anexo D. Descripción teórica de los géneros identificados según “*Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*” (Brenner *et al.*, 2010) y perfil microbiológico de los aislamientos obtenidos.

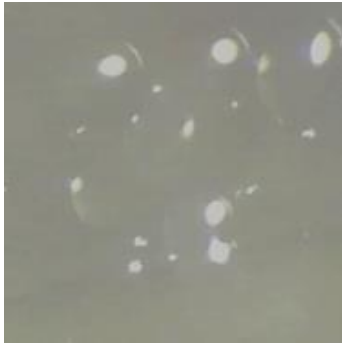
Phylum: BACTERIODETES

Género: <i>Flavobacterium</i>	Cepas aisladas: C1, C5, C6, C22, C25, C26
Descripción teórica: El género <i>Flavobacterium</i> se encuentra conformado por aproximadamente 44 especies de las cuales, se han introducido 4 debido a su similitud genética; todas las especies de este género se caracterizan por ser bacilos Gram negativos rectos o ligeramente curvos con terminaciones redondeadas o cónicas y de longitudes muy diversas que suelen estar entre las 2 a 5 μm en condiciones óptimas; sin embargo, en su fase de desarrollo estacionaria se suelen observar células más cortas o filamentosas en forma de bacilos largos y flexibles; a pesar de no ser un género formador de endosporas, varias especies tienden a formar en el interior de sus células estructuras esféricas degenerativas conocidas como esferoplastos. En condiciones naturales suelen abarcar una variedad de hábitats de suelo, agua dulce, agua marina, ambientes cálidos salinos, templados o polares, pero aún no se han encontrado aislamientos en ambientes hipersalinos y en cuanto a las condiciones de laboratorio, se han realizado aislamientos en temperaturas que oscilan los 20 y 30°C, en conjunto a ello, se ha observado que en algunos casos la composición del medio de cultivo suele intervenir en la morfología de colonia.	

C1

FLAVOBACTERIUM

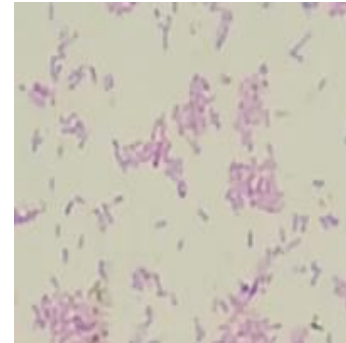
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias traslucidas con forma circular que crecen sobre el medio de cultivo, elevación convexa, borde entero, superficie brillante, densidad transparente y consistencia mucoide.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos Gram negativos de tamaño pequeño y agrupados en pares

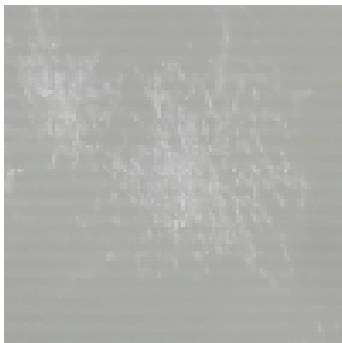
PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	-	K/K	+	-	-	-

C5

FLAVOBACTERIUM

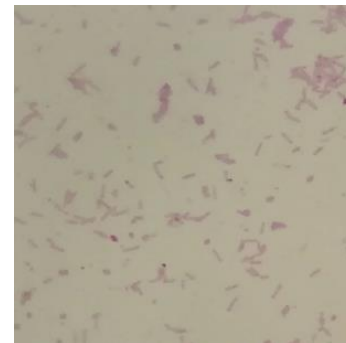
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias de color blanco que crecen sobre el medio de cultivo, forma puntiforme, ligeramente plana, borde entero, superficie cerosa, densidad opaca y consistencia petrea.

Morfología celular



Descripción:

Se observan formas bacilares de coloración Gram negativa.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	+	K/K	-	-	-	-

C6

FLAVOBACTERIUM

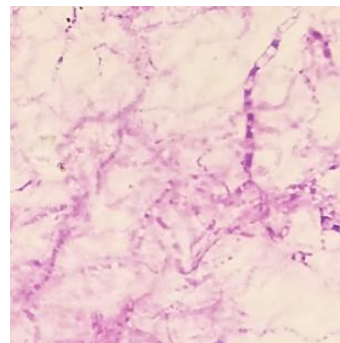
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias de color traslucido que crecen sobre el medio de cultivo, morfología compleja, ligeramente elevada, borde entero, superficie brillante, densidad transparente y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos Gram negativos con una distribución en cadena y de diferentes tamaños.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Vogues Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	+	K/K	-	-	-	-

C22

FLAVOBACTERIUM

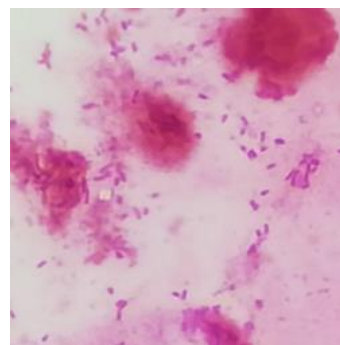
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias de color traslucido que crecen sobre el medio de cultivo, forma filamentosas, elevación plana, borde filamentosos, superficie brillante, densidad transparente y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos cortos Gram negativos de tamaño pequeño y agrupados en pares.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Vogues Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	+	K/K	-	-	-	-

C25

FLAVOBACTERIUM

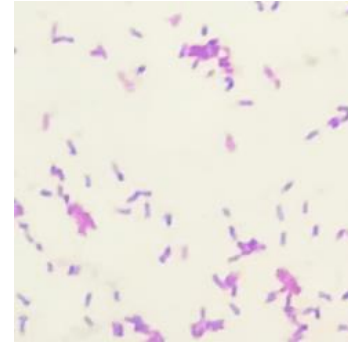
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias de color blanco que crecen sobre el medio de cultivo, forma ovalada, elevación convexa, borde entero, superficie brillante, densidad transparente y consistencia mucoide.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos pequeños Gram negativos.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	+	K/K	-	-	-	-

C26

FLAVOBACTERIUM

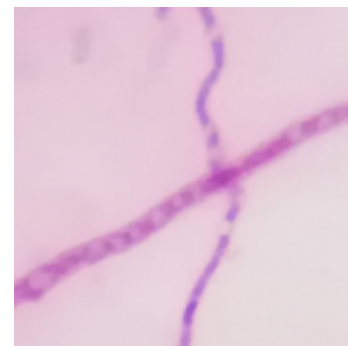
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias de color pardo que crecen sobre el medio, forma circular, elevación convexa, borde entero, superficie brillante, densidad transparente y consistencia mucoide.

Morfología celular



Descripción:


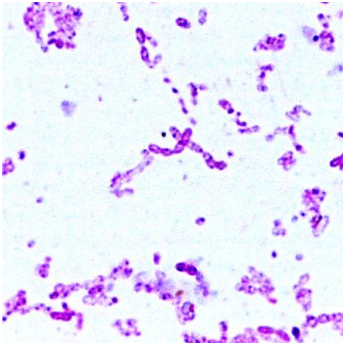
Se observan bacilos Gram negativos en cadena.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	-	K/K	-	-	-	-

Phylum: PROTEOBACTERIA

Género: <i>Azotobacter</i>	Cepas aisladas: C2, C18, C24, C28, C34, C38, C39, C40, C41
<p>Descripción teórica:</p> <p>El género <i>Azotobacter</i> se encuentra conformado por 7 especies, las cuales tienden encontrarse en suelos fértiles y en algunos casos suelos rizosféricos o cursos de cuerpos de agua dulce, se desarrollan en ambientes con pH de 6.0 hasta 8.5, suelen proliferar en mayor número cuando existen altos contenidos de fósforo en el medio y presentan un comportamiento diazótrofo en condiciones microaerófilas, exentas de nitrógeno y en medios con pH ligeramente ácido o alcalino.</p> <p>Morfológicamente, este género se conforma principalmente de células bacilares que van desde la formación de barras completamente rectas con extremos redondeados hasta barras más elipsoidales o cocoides dependiendo la especie, el medio de cultivo y la fase de crecimiento en la que se encuentre el microorganismo, el tamaño de las células varía de 2 μm de diámetro hasta 4 μm de longitud y presenta agrupaciones en pares, grupos irregulares o más raramente cadenas de longitudes variadas de tamaños pequeños o en algunos casos filamentos largos como ocurre con la especie <i>A. paspali</i>; al desarrollarse en medios de cultivo libres de nitrógeno puede presentar formación de quistes durante su fase de crecimiento estacionaria.</p>	

C2	AZOTOBACTER	
<p>Morfología de colonia</p>  <p>Descripción: Se observan colonias de color traslucido que crecen sobre el medio de, forma circular, ligeramente elevada, borde entero, superficie brillante, densidad transparente y consistencia viscosa, se asemejan a gotas de agua ligeramente turbias.</p>	<p>Morfología celular</p>  <p>Descripción: Se observan células bacilares Gram positivos ovoides</p>	

PRUEBAS BIOQUÍMICAS								
Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	-	K/K	-	+	-	-

C18

AZOTOBACTER

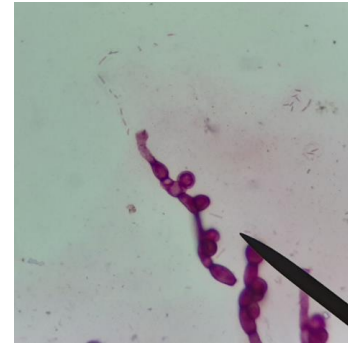
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias de color negro que se encuentran inmersas en el medio de cultivo, de morfología compleja, elevación plana, borde filamentososo, superficie cerosa, densidad opaca y consistencia cremosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos Gram negativos con formación de quistes.

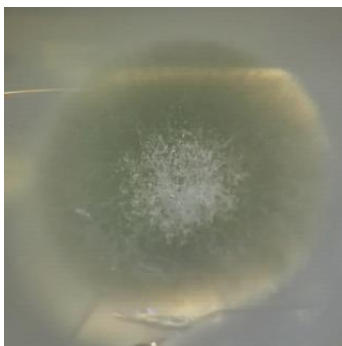
PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	+	K/K	-	+	-	-

C24

AZOTOBACTER

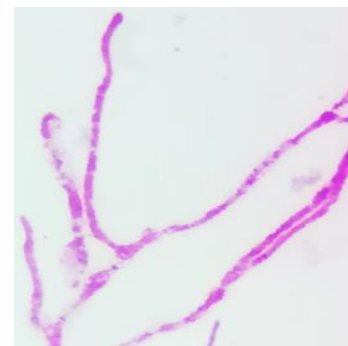
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias morfología compleja que crecen sobre el medio, color beige, elevación umbonada, borde entero, superficie cerosa, densidad opaca y consistencia pétrea.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos Gram negativos en cadena con presencia de quistes.

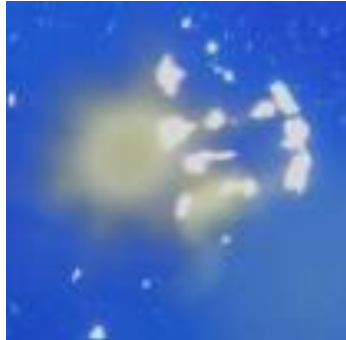
PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	-	K/K	-	+	-	-

C28

AZOTOBACTER

Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias que crecen sobre el medio de color blanco, forma irregular, elevación convexa, borde lobulado, superficie brillante, densidad transparente y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

Bacilos Gram negativos agrupados en parejas

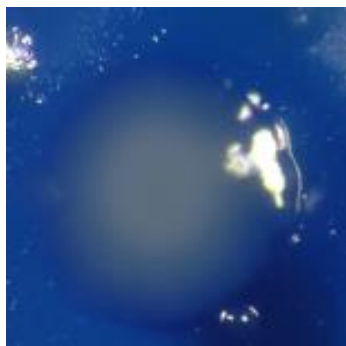
PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	-	K/K	-	-	+	-

C34

AZOTOBACTER

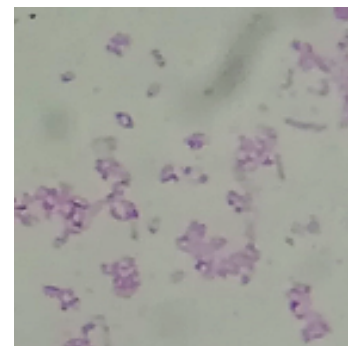
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias que crecen sobre el medio de color blanco, forma circular, elevación convexa, borde entero, superficie brillante, densidad transparente y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

Bacilos Gram positivos.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	+	+	+	K/K	-	-	+	-

C38

AZOTOBACTER

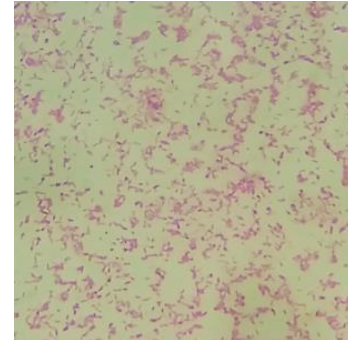
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias que crecen sobre el medio de un color ligeramente turbio, morfología compleja, elevación plana, borde ondulado, superficie brillante, densidad transparente y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos Gram negativos de tamaño pequeño y agrupados en pares

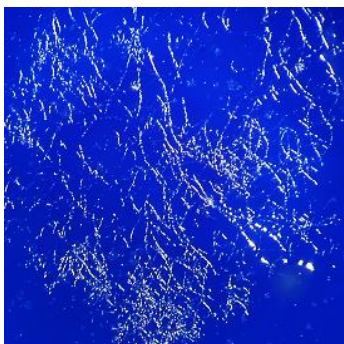
PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Vogues Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	-	K/K	-	-	+	-

C39

AZOTOBACTER

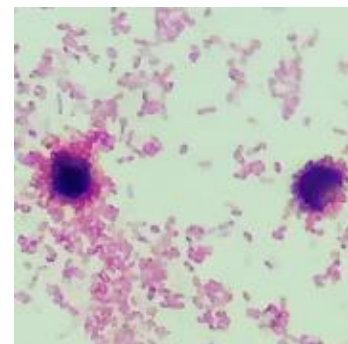
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias que crecen sobre el medio de color traslucido, forma filamentososa, elevación plana, borde filamentososo, superficie brillante, densidad transparente y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos Gram negativos con presencia de quistes.

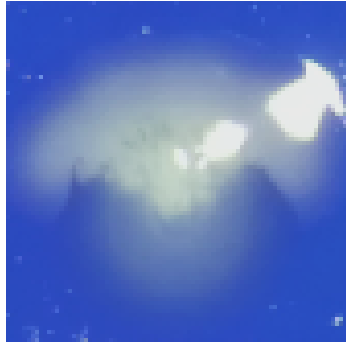
PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Vogues Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	+	K/K	-	-	+	-

C40

AZOTOBACTER

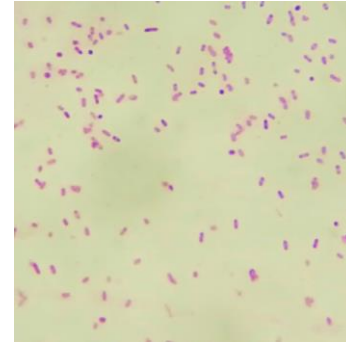
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias que crecen sobre el medio de color blanco, forma circular, elevación convexa, borde entero, superficie brillante, densidad transparente y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

Bacilos Gram negativos de tamaño pequeño y agrupados en pares

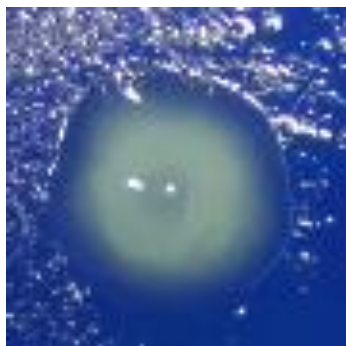
PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	-	K/K	-	-	+	-

C41

AZOTOBACTER

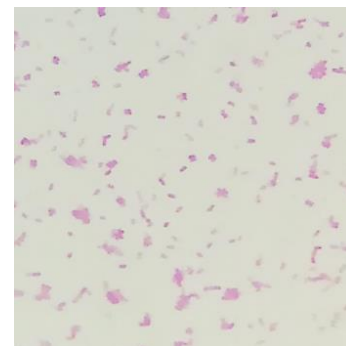
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias que crecen sobre el medio de color beige, forma irregular, elevación plana, borde ondulado, superficie cerosa, densidad opaca y consistencia cremosa.

Morfología celular



Descripción:

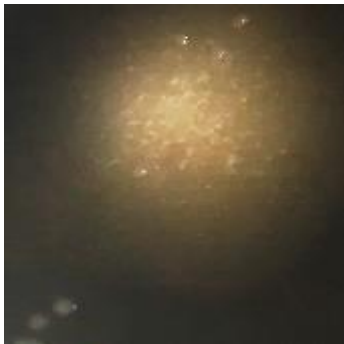
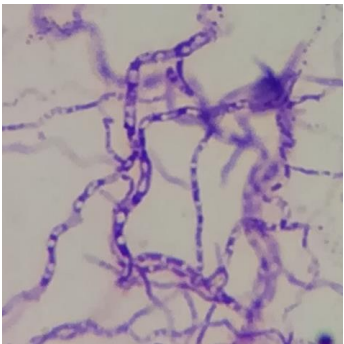
Se observan bacilos cortos Gram negativos.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	-	K/K	-	-	+	-

Phylum: ACTINOBACTERIA

Género: <i>Brevibacterium</i>	Cepas aisladas: C3, C16, C17, C30, C37, C47, C48, C53, C57
<p>Descripción teórica:</p> <p>El género <i>Brevibacterium</i> se encuentra conformado por 24 especies reportadas, las cuales presentan una morfología bacilar en su fase de crecimiento exponencial y en algunos casos cocoide durante la fase de crecimiento estacionaria, al mismo tiempo presentan coloración Gram positiva la cual suele decolorarse en algunos casos con la edad del medio; tanto las células esféricas como bacilares tienden a variar de tamaño (0.6 – 1.0 µm) y en muchos casos suelen agruparse formando ángulos dando como resultado en la mayoría de las veces una agrupación en “V”.</p> <p>Se desarrollan en medios con pH cercanos a la neutralidad en temperaturas de 20 a 37°C; aunque suelen encontrarse en alimentos como el queso o en la piel de humanos, existen algunas especies como <i>B. album</i>, <i>B. marinum</i>, <i>B. salitolerans</i>, <i>B. samyangense</i> entre otras, que tienden a proliferar en suelos, suelos salinos, sedimentos marinos y arenas de playa.</p>	

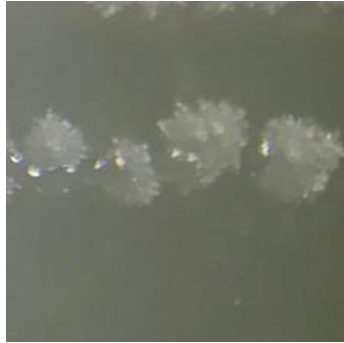
C3	BREVIBACTERIUM	
<p>Morfología de colonia</p>  <p>Descripción: Se observan colonias de color blanco con un crecimiento sobre el medio cultivo, forma circular, elevación plana, borde entero, superficie cerosa, densidad opaca y consistencia petrea.</p>	<p>Morfología celular</p>  <p>Descripción: Se observan bacilos Gram positivos con esporulación central y agrupados en cadena</p>	

PRUEBAS BIOQUÍMICAS								
Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	-	K/K	-	+	-	-

C16

BREVIBACTERIUM

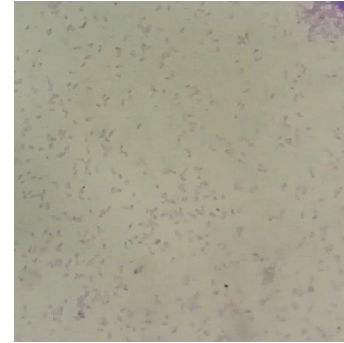
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias de color blanco con un crecimiento sobre el medio cultivo de morfología circular, elevación plana, borde entero, superficie cerosa, densidad opaca y consistencia cremosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos Gram positivos pequeños con una coloración muy tenue.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Vogues Proskauer	Citrato de Simmons
-	+	+	+	K/K	-	-	-	-

C17

BREVIBACTERIUM

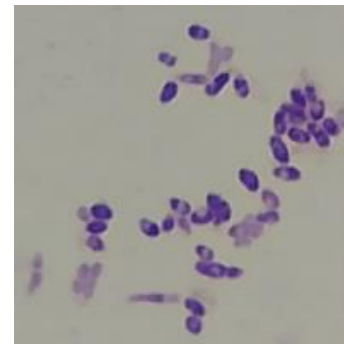
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias que crecen sobre el medio con forma irregular, color blanco, elevación plana, borde ondulado, superficie cerosa, densidad opaca y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos Gram positivos, ligeramente redondeados y con esporulación central.

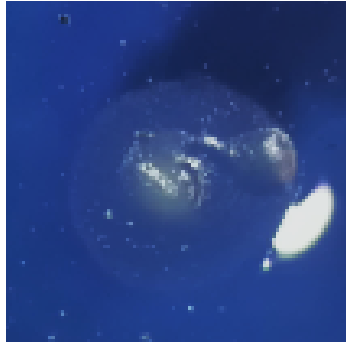
PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Vogues Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	+	K/K	+	-	-	-

C30

BREVIBACTERIUM

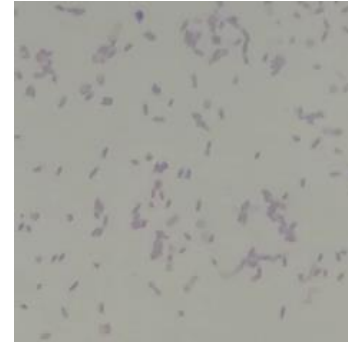
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias que crecen sobre el medio de color transparente, forma circular, elevación umbonada, borde entro, superficie brillante, densidad transparente y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos Gram positivos agrupados en parejas y de tamaño reducido.

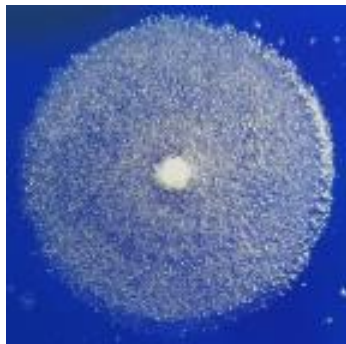
PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Vogues Proskauer	Citrato de Simmons
-	+	+	+	K/K	+	-	-	-

C37

BREVIBACTERIUM

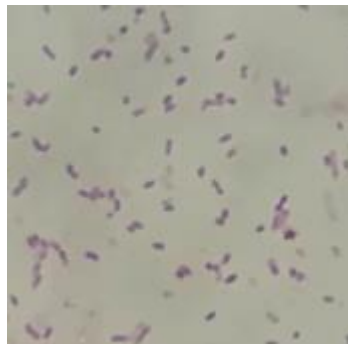
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias que crecen sobre el medio de color blanco, forma compleja, ligeramente elevada, borde rizoide, superficie cerosa, densidad opaca y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos Gram positivos con forma ovoide y tamaño reducido.

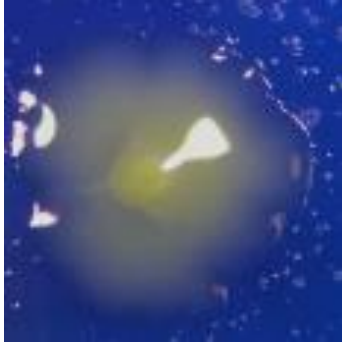
PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Vogues Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	+	K/K	-	-	-	-

C47

BREVIBACTERIUM

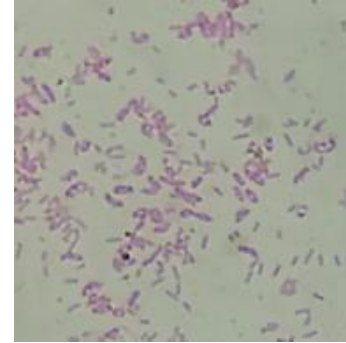
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias turbias que crecen sobre el medio de cultivo de color amarillento, forma irregular, elevación umbonada, borde ondulado, superficie brillante, densidad transparente y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos Gram positivos, ligeramente decolorados y con esporulación central.

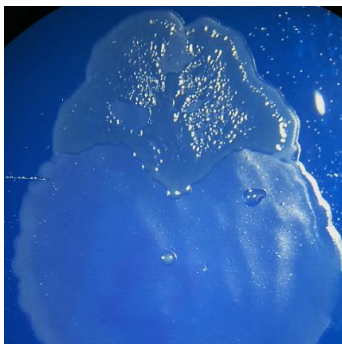
PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	+	K/K	-	-	-	-

C48

BREVIBACTERIUM

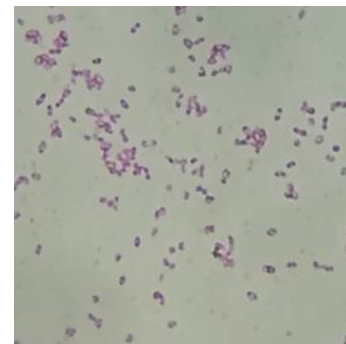
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias incoloras que crecen sobre el medio cultivo con forma irregular, ligeramente elevada, borde ondulado, superficie cerosa, densidad opaca y consistencia pétre.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos pequeños de coloración Gram positiva, ligeramente decolorados y con esporulación central

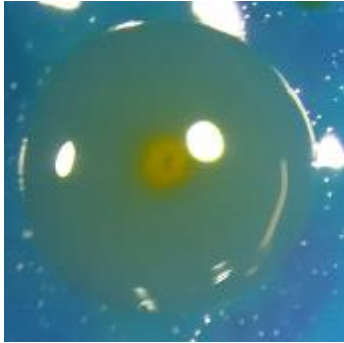
PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	+	+	+	K/K	-	-	-	-

C53

BREVIBACTERIUM

Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias turbias que crecen sobre el medio de cultivo de color amarillento con pigmentos difusibles, forma circular, elevación convexa, borde entero, superficie brillante, densidad transparente y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos Gram positivos ligeramente decolorados y con esporulación central

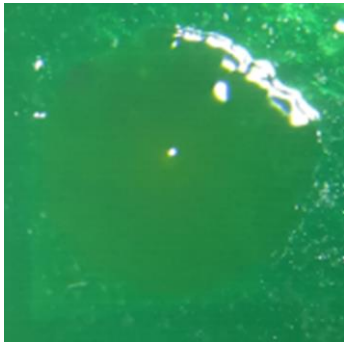
PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	+	K/K	-	-	-	-

C57

BREVIBACTERIUM

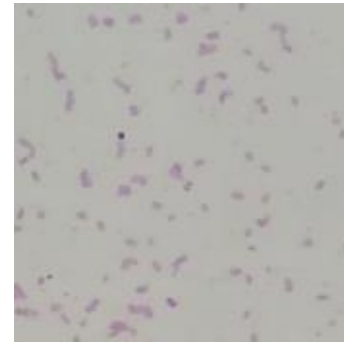
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias transparentes que crecen sobre el medio cultivo, forma irregular, elevación plana, borde ondulado, superficie brillante, densidad trasparente y consistencia mucoide.

Morfología celular



Descripción:


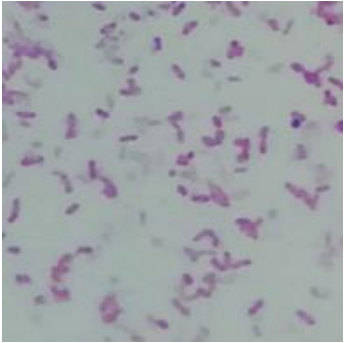
Se observan bacilos Gram positivos, pequeños y agrupados en parejas.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	+	K/K	-	-	-	-

Phylum: ACTINOBACTERIA

Género: <i>Cellulomonas</i>	Cepas aisladas: C8, C19, C31, C42, C51, C54
<p>Descripción teórica:</p> <p>El género <i>Cellulomonas</i> se encuentra conformado por 15 especies de bacterias principalmente quimiorganotrofas que presentan una morfología celular en forma de bacilos delgados, rectos o en algunas ocasiones curvos; sin embargo, cuando los cultivos son “viejos” (con más de una semana), la morfología celular tiende a conformarse de bacilos, cortos y en una pequeña proporción suelen presentar células cocoides, las células son Gram positivas y suelen encontrarse como células individuales sin agrupación o en parejas en forma de “V”, no son formadoras de endosporas y a pesar de ser células Gram positivas, con el tiempo se pueden decolorar fácilmente.</p> <p>Son microorganismos que se desarrollan fácilmente en temperaturas cercanas a los 30°C y en medios con un pH entre 6,5 y 7,4, pueden habitar ambientes como el suelo, compost y en entornos enriquecidos con celulosa, es decir donde haya materiales en descomposición como: la madera, cortezas y/o rumen.</p>	

C8	
CELLULOMONAS	
<p>Morfología de colonia</p>  <p>Descripción: Se observan colonias transparentes que crecen sobre el medio de forma irregular, elevación plana, borde ondulado, superficie cerosa, densidad opaca y consistencia viscosa.</p>	<p>Morfología celular</p>  <p>Descripción: Se observan bacilos Gram positivos ligeramente decolorados.</p>

PRUEBAS BIOQUÍMICAS								
Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	+	+	-	K/K	+	-	-	-

C19

CELLULOMONAS

Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias de color ligeramente blanco que crecen sobre el medio de cultivo de forma circular, elevación plana, borde entero, superficie brillante, densidad transparente y consistencia mucoide.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos Gram positivos delgados y ligeramente alargados.

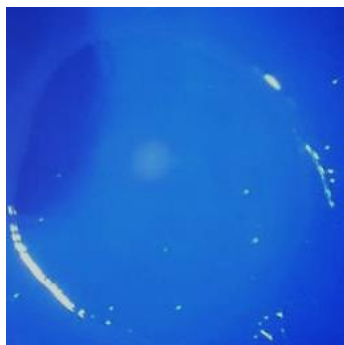
PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	+	+	-	K/K	+	-	-	-

C31

CELLULOMONAS

Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias transparentes que crecen sobre el medio de cultivo con una forma irregular, elevación convexa, borde ondulado, superficie brillante, densidad transparente y consistencia mucoide.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos Gram positivos con los extremos ligeramente redondeados y algunas formas cocoides.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	+	+	+	K/K	+	+	-	-

C42

CELLULOMONAS

Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias transparentes que crecen sobre el medio de cultivo con una forma irregular, ligeramente elevada, borde entero, superficie brillante, densidad transparente y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos cortos un poco ovoides de coloración Gram positiva y ligeramente decolorados.

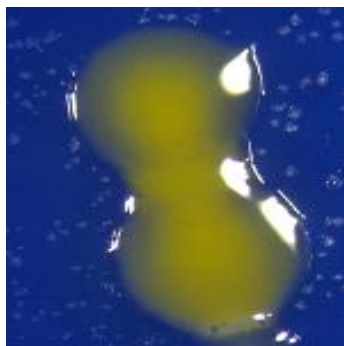
PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	+	+	-	K/K	-	-	-	-

C51

CELLULOMONAS

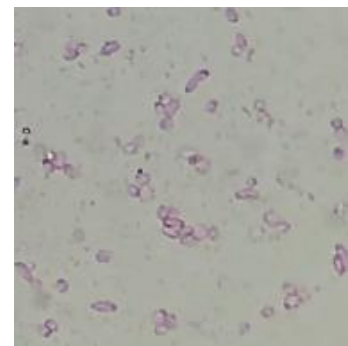
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias que crecen sobre el medio de cultivo de color amarillo, forma circular, elevación convexa, borde entero, superficie brillante, densidad transparente y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos un poco redondeados, de coloración Gram positiva ligeramente decolorados.

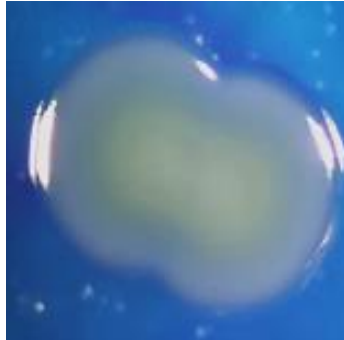
PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	+	+	-	K/K	-	-	-	-

C54

CELLULOMONAS

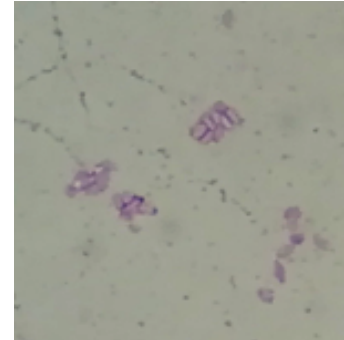
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias que crecen sobre el medio de un color ligeramente turbio, morfología compleja, elevación plana, borde ondulado, superficie brillante, densidad transparente y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos un poco redondeados, de coloración Gram positiva ligeramente decolorados

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	+	+	-	K/K	-	-	-	-

Phylum: ACTINOBACTERIA

Género: *Corynebacterium*

Cepas aisladas: C7, C9, C45

Descripción teórica:

El género *Corynebacterium* se encuentra conformado por 84 especies reportadas; presentan una morfología celular dispuesta en bacilos rectos o ligeramente curvos, son células Gram positivas no formadoras de endosporas con terminaciones cónicas o en algunos casos en forma de maza que al dividirse suelen presentar agrupaciones en forma de “V”, su tamaño puede variar de acuerdo con la edad del medio, siendo más largos en cultivos jóvenes o más cortos y medianos en cultivos viejos.

Algunas especies han sido empleadas ampliamente en aplicaciones industriales debido a las enzimas que sintetizan, muchas de ellas son anaerobias facultativas y su desarrollo se puede observar en rangos de temperatura que van desde los 27 a los 45°C tolerando pH ligeramente ácidos, en condiciones naturales estos microorganismos suelen habitar la flora de la piel humana, en la flora transeúnte de animales o aves, algunos alimentos, el medio ambiente y/o cuerpos de agua.

C7

CORYNEBACTERIUM

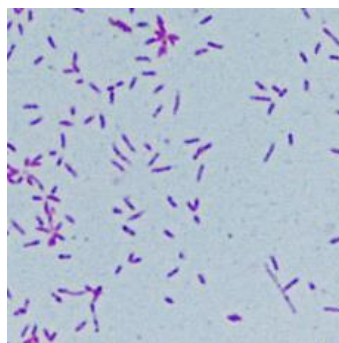
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias transparentes muy similares a pequeñas gotas de agua que crecen sobre el medio de cultivo, forma circular, elevación plana, borde entero, superficie brillante, densidad transparente y consistencia mucoide.

Morfología celular



Descripción:

Se observan células bacilares en forma de masa Gram positivas y ligeramente alargadas.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	+	K/K	+	-	-	-

C9

CORYNEBACTERIUM

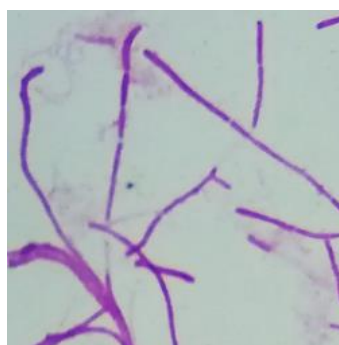
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias de morfología compleja que crecen sobre el medio de cultivo de color blanco, elevación plana, borde recortado, superficie cerosa, densidad opaca y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos largos en cadena y de coloración Gram positiva.

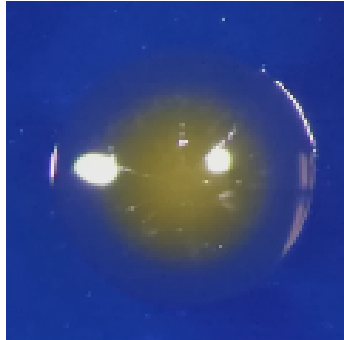
PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	+	K/K	+	-	-	-

C45

CORYNEBACTERIUM

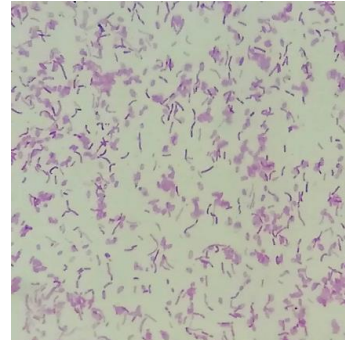
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias que crecen sobre el medio de cultivo de forma circular, color amarillo, elevación convexa, borde entero, superficie brillante, densidad transparente y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan ligeros bacilos en cadena Gram positivos.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	+	K/K	+	-	-	-

Phylum: FIRMICUTES

Género: *Bacillus*

Cepas aisladas: C10, C12, C14, C20, C21, C23, C43, C44, C52

Descripción teórica:

El género *Bacillus* se encuentra conformado aproximadamente por 141 especies ampliamente distribuidas en diferentes medios como: el suelo, suelos contaminados, agua, alimentos e incluso especímenes clínicos, su ubicuidad se debe a que en principio son poco exigentes con los recursos que requieren para su desarrollo y a la facilidad que poseen para formar endosporas.

Gracias a su adaptabilidad para desarrollarse en diferentes medios de cultivo, su morfología de colonia al igual que su morfología celular resulta ser muy característica dependiendo el medio de cultivo y la especie en cuestión; no obstante, su morfología celular tiende a presentar siempre formas bacilares rectas o ligeramente curvas, las cuales son en la mayoría de los casos formadores de endosporas cuando culminan su fase de crecimiento exponencial o cuando se presentan cambios bruscos en algunos factores como: el pH, la aireación, la escasez de ciertos minerales, la fuente de carbono y/o ausencia de nitrógeno en el medio que puedan generar algún tipo de estrés durante su desarrollo; la mayoría de las especies son Gram positivas y en algunos casos Gram negativas, al observarlas bajo el microscopio suelen encontrarse distribuidas de forma individual, en pares, en cadena, en forma de letras chinas o en algunos casos aparentan ser ligeros filamentos.

C10

BACILLUS

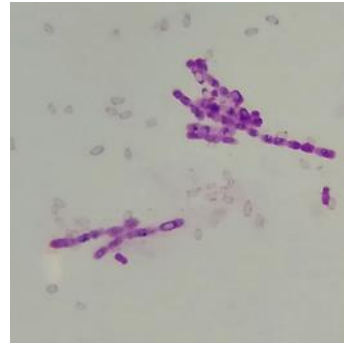
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias de morfología compleja que crecen sobre el medio de cultivo, color blanco con elevación plana, borde rizoide, superficie cerosa, densidad opaca y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos Gram positivos en fase de esporulación con una agrupación en cadena.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Vogues Proskauer	Citrato de Simmons
-	+	+	-	K/K	+	+	+	-

C12

BACILLUS

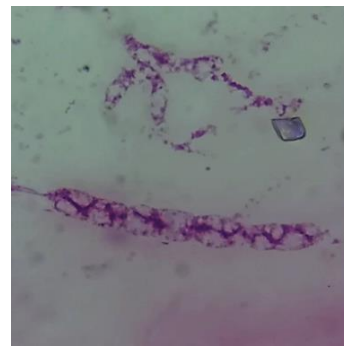
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias de color negro que se encuentran inmersas en el medio de cultivo, de morfología compleja, elevación plana, borde filamentoso, superficie cerosa, densidad opaca y consistencia cremosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos de gran tamaño, en cadena y de coloración Gram positivas, aloja en su interior sacos blancos sin colorear.

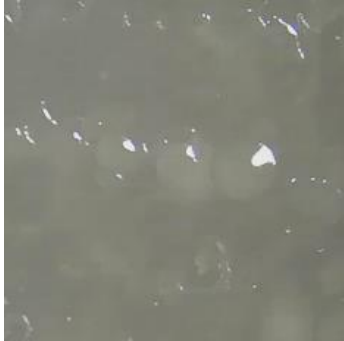
PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Vogues Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	+	K/K	+	+	+	-

C14

BACILLUS

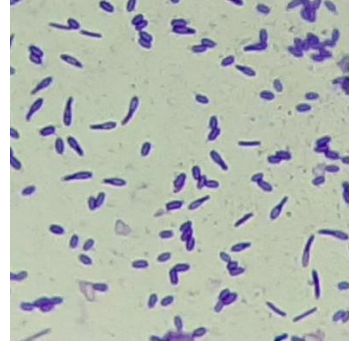
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias transparentes que crecen sobre el medio de cultivo con una forma circular, elevación convexa, borde entero, superficie brillante, densidad transparente y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos individuales de coloración Gram positiva y con esporulación terminal.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	+	+	-	K/K	+	+	+	+

C20

BACILLUS

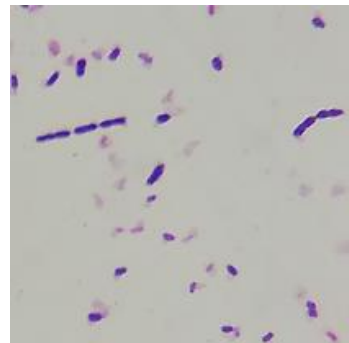
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias ligeramente turbias que crecen sobre el medio de color blanco de forma irregular, elevación convexa, borde lobulado, superficie brillante, densidad transparente y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos Gram positivos agrupados en cadena.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	+	+	-	K/K	+	+	+	-

C21

BACILLUS

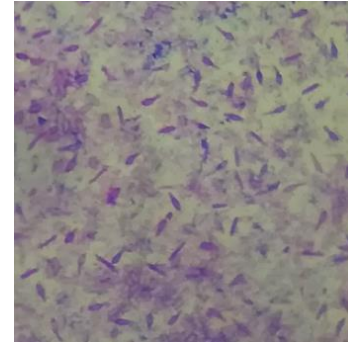
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias transparentes que crecen sobre el medio de cultivo con forma irregular, elevación convexa, borde entero, superficie brillante, densidad transparente y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos Gram positivos en fase de esporulación terminal.

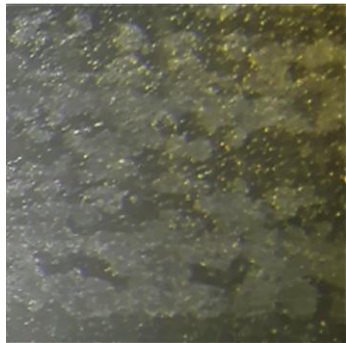
PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	+	K/K	+	-	+	-

C23

BACILLUS

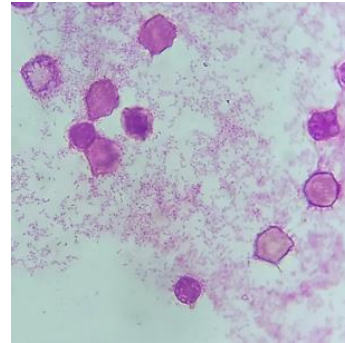
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias blancas que crecen sobre el medio de cultivo con forma irregular, elevación plana, borde ondulado, superficie cerosa, densidad opaca y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan células bacilares de tamaño pequeño con esporulación central, de coloración Gram Positiva y pleomorfismo presuntamente en "L-forms".

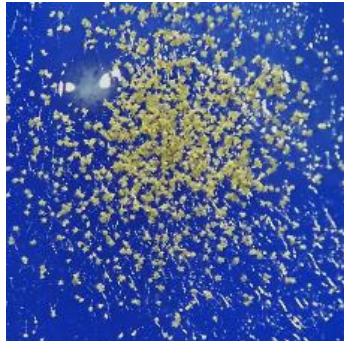
PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	+	K/K	+	-	+	-

C43

BACILLUS

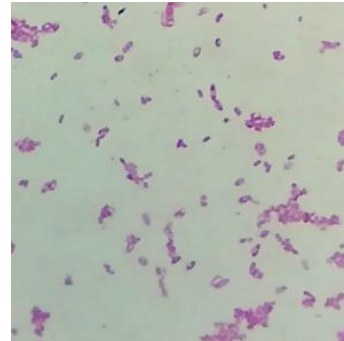
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias de color amarillo que crecen sobre el medio de cultivo, morfología compleja, elevación plana, borde rizoide, superficie cerosa, densidad opaca y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos Gram positivos con esporulación central.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	-	K/K	-	-	+	-

C44

BACILLUS

Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias de morfología compleja que crecen sobre el medio, color blanco, elevación plana, borde entero, superficie cerosa, densidad opaca y consistencia cremosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos en cadena de tamaño corto y coloración Gram positiva.

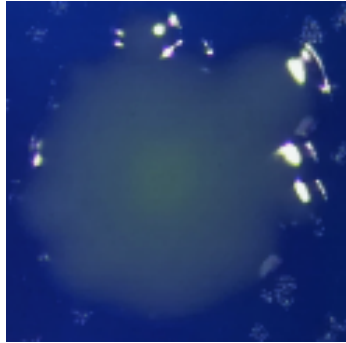
PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	+	K/K	-	-	+	-

C52

BACILLUS

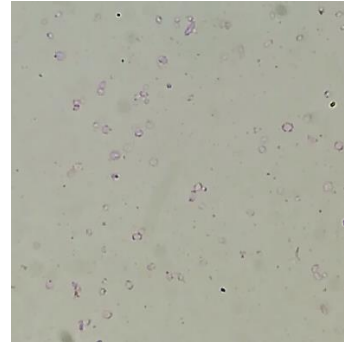
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias turbias que crecen sobre el medio de cultivo de forma irregular, elevación plana, borde ondulado, superficie brillante, densidad transparente y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan mayormente esporas de bacilos y algunas células de Gram positivos en fase de esporulación central.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	+	+	-	K/K	-	+	-	-

Phylum: FIRMICUTES**Género:** *Paenibacillus*

Cepas aisladas: C49, C50

Descripción teórica:

Dentro del género *Paenibacillus* se encuentran aproximadamente 73 especies de bacterias conformadas en su mayoría por bacterias aerobias y en algunos casos anaerobias facultativas, son microorganismos que suelen habitar suelos húmicos, suelos ricos en materia orgánica e incluso suelos con restos de materiales vegetales; en términos ecosistémicos, son productores de fitohormonas, nitrógeno, componentes antifúngicos y enzimas supresoras de enfermedades fúngicas.

Respecto a su taxonomía, la morfología de colonia, no se encuentra muy bien definida debido a que esta tiende a variar con relación al medio de cultivo empleado; sin embargo, la mayoría de las especies pertenecientes a este género se caracterizan por presentar colonias con motilidad o desplazamiento sobre el medio; en cambio, su morfología celular, siempre resulta ser bacilar de coloración Gram positiva en cultivos frescos, no obstante, se ha observado que en condiciones de laboratorio, la tinción puede ser Gram variable o aparentemente Gram negativa cuando los cultivos llevan cierto tiempo de almacenamiento; las células tienden a medir entre 2 a 5 μm de longitud y 0.8 μm de diámetro, las células no suelen agruparse pero suelen formar endosporas ovaladas de un tamaño mayor al de la célula vegetativa o célula madre el cual se destiñe completamente.

C49

PAENIBACILLUS

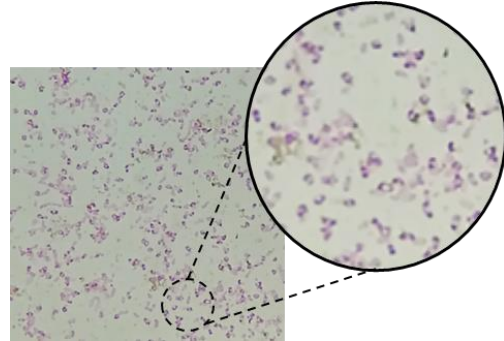
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias filamentosas de color transparente que crecen sobre el medio de cultivo, elevación plana, borde rizoide, superficie brillante, densidad transparente y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan células bacilares de coloración Gram positiva y esporulación central.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	+	K/K	-	+	-	-

C50

PAENIBACILLUS

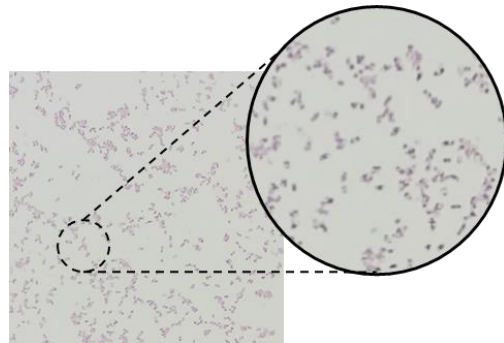
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias filamentosas de color transparente con crecimiento sobre el medio de cultivo, elevación plana, borde rizoide, superficie brillante, densidad transparente y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:


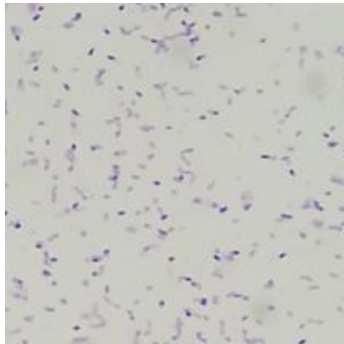
Se observan bacilos diminutos de coloración Gram positiva con esporulación central.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	+	+	+	K/K	-	+	-	-

Phylum: FIRMICUTES

Género: <i>Geobacillus</i>	Cepas aisladas: C29, C32, C33, C35
<p>Descripción teórica:</p> <p>Dentro del género <i>Geobacillus</i> se encuentran reportadas 17 especies, las cuales, a pesar de ser consideradas termófilas y extremófilas, presentan una gran adaptabilidad al estrés térmico, ya que suelen estar distribuidas en suelos de todo el mundo abarcando grandes extensiones de suelos fríos, áridos, volcánicos, desérticos hasta suelos usados en cultivos de arroz y en compost; además de esto, se han logrado registrar aislamientos en rangos de 40 a 80°C con muestras de suelo que no superan los 25°C y pH que van desde 6.0 a 8.5.</p> <p>Las especies de este género presentan una morfología bacilar y de acuerdo con la especie, se pueden encontrar agrupadas en forma de letras chinas o en la mayoría de los casos sin agrupación alguna, así mismo, su coloración puede ser Gram positiva o Gram negativa; son bacterias formadoras de endosporas en forma de óvalo con distribución terminal o subterminal, forman una endospora por célula y en algunas ocasiones el esporangio tiende a ser un poco hinchado o se puede observar de un tamaño acorde a la célula vegetativa.</p>	

C29	GEOBACILLUS	
<p>Morfología de colonia</p>  <p>Descripción: Se observan colonias traslucidas de forma irregular que crecen sobre el medio cultivo, elevación convexa, borde entero, superficie brillante, densidad transparente y consistencia viscosa, se asemejan a gotas de agua ligeramente turbias.</p>	<p>Morfología celular</p>  <p>Descripción: Se observan células bacilares Gram positivos ovoides</p>	

PRUEBAS BIOQUÍMICAS								
Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	+	+	+	K/K	-	-	+	-

C32

GEOBACILLUS

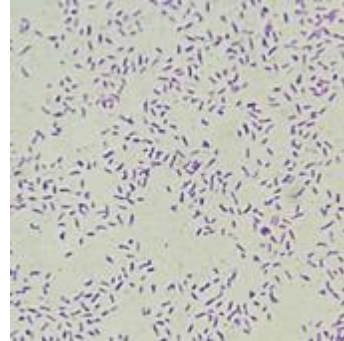
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias ligeramente transparentes con un crecimiento sobre el medio de cultivo de forma irregular, ligeramente elevada, borde ondulado, superficie brillante, densidad transparente y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos Gram positivos.

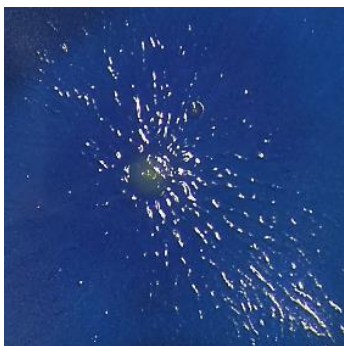
PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	+	+	+	K/K	-	-	+	-

C33

GEOBACILLUS

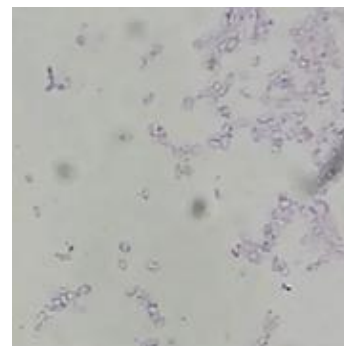
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias morfología compleja que crecen sobre el medio, color beige, elevación umbonada, borde filamentososo, superficie cerosa, densidad opaca y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos esporulados de coloración Gram positiva y con las endosporas de tamaño mayor al de la célula vegetativa.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	+	+	+	K/K	-	-	+	-

C35

GEOBACILLUS

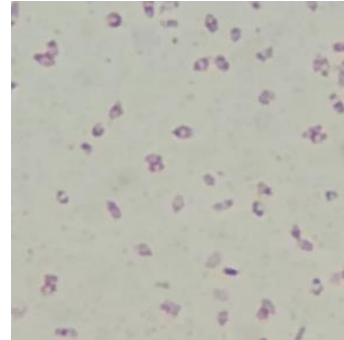
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias que crecen sobre el medio de cultivo de color beige, forma irregular, elevación plana, borde lobulado, superficie brillante, densidad transparente y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos esporulados de coloración Gram positiva y con las endosporas de un tamaño mayor al de la célula vegetativa.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	+	+	-	K/K	-	-	+	-

Phylum: FIRMICUTES**Género:** *Clostridium*

Cepas aisladas: C4, C13, C11, C15, C36, C46, C55, C56, C27

Descripción teórica:

El género *Clostridium* se encuentra conformado por aproximadamente 168 especies de bacterias, las cuales, gracias a su naturaleza quimiorganótrofa, se encuentran fácilmente distribuidas en diferentes ambientes como el suelo, el agua dulce, los sedimentos marinos, los alimentos, el rumen, las heces e incluso el veneno de algunas serpientes; suelen conformarse mayormente de bacterias anaerobias y en algunos casos microaerófilas, además de esto, tienden a desarrollarse rápidamente en un pH de 6.5 a 7 y en un rango de temperatura que van desde los 30°C hasta los 37°C.

Las especies de este género presentan una morfología celular en forma de bacilos individuales o en algunos casos agrupados en cadenas largas, cadenas cortas o en forma de "V"; se caracterizan por ser Gram positivos, aunque en algunas especies la coloración puede ser tenue o difícil de observar; la mayoría de las especies son formadoras de endosporas esféricas u ovaladas; sin embargo, gran parte de las microaerófilas carecen de esporulación o en su defecto pueden ser casi imperceptibles.

C4**CLOSTRIDIUM**

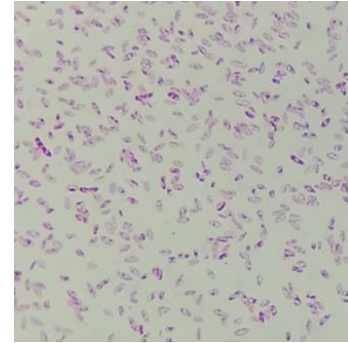
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias circulares de color traslucido que crecen sobre el medio de cultivo, elevación convexa, borde entero, superficie brillante, densidad transparente y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

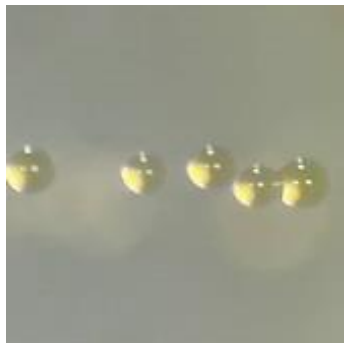
Se observan células bacilares de coloración Gram positivas con esporulación central.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	-	K/K	+	-	-	-

C11**CLOSTRIDIUM**

Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias circulares de color amarillo que crecen sobre el medio de cultivo con una elevación convexa, borde entero, superficie brillante, densidad transparente y consistencia cremosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos Gram positivos pequeños.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	-	-	K/K	+	-	-	-

C13

CLOSTRIDIUM

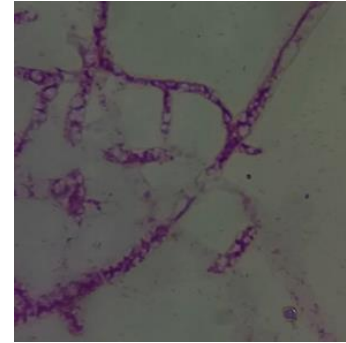
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias filamentosas de color blanco que crecen sobre el medio de cultivo, elevación plana, borde filamentosos, superficie cerosa, densidad opaca y consistencia pétrea.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos Gram positivos en cadena con presencia de quistes.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Vogues Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	-	K/K	+	-	-	-

C15

CLOSTRIDIUM

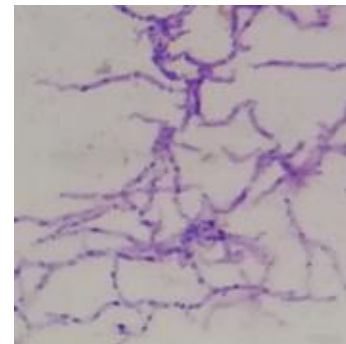
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias blancas de morfología compleja que crecen sobre el medio de cultivo, ligeramente elevadas, borde ondulado, superficie cerosa, densidad opaca y consistencia pétrea.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos Gram positivos en cadenas largas.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Vogues Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	-	K/K	-	-	-	-

C27

CLOSTRIDIUM

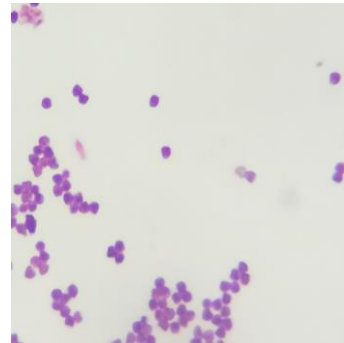
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias filamentosas un poco turbias que crecen sobre el medio de cultivo, ligeramente elevadas, borde filamentososo, superficie brillante, densidad transparente y consistencia mucosida.

Morfología celular



Descripción:

Se observan estructuras esféricas de coloración Gram positiva.

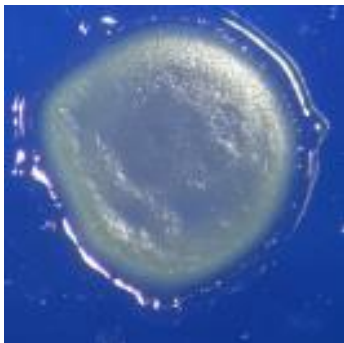
PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	-	K/K	-	-	-	-

C36

CLOSTRIDIUM

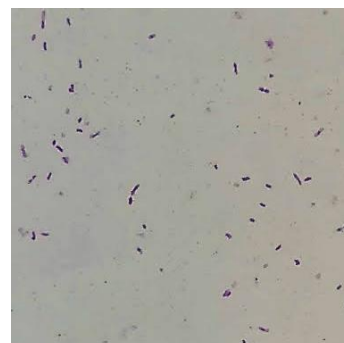
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias de color beige que crecen sobre el medio cultivo, presenta una forma compleja, elevación umbonada, borde entero, superficie cerosa, densidad opaca y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos Gram positivos.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	+	-	K/K	-	-	-	-

C46

CLOSTRIDIUM

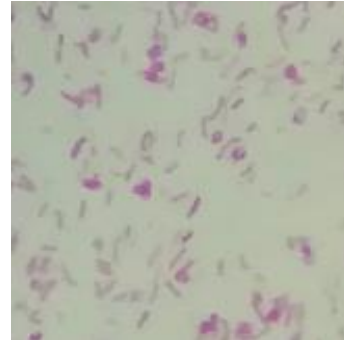
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias que crecen sobre el medio de color blanco, forma circular, elevación convexa, borde entero, superficie brillante, densidad transparente y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos Gram positivos con pleomorfismo celular.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	+	-	+	K/K	+	+	-	-

C55

CLOSTRIDIUM

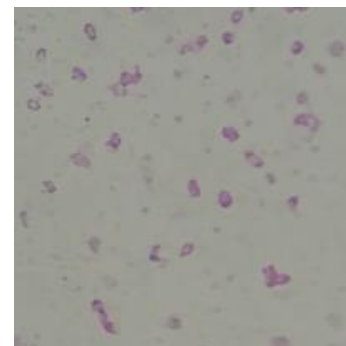
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias ligeramente turbias que crecen sobre el medio de cultivo de morfología compleja, elevación plana, borde entero, superficie cerosa, densidad opaca y consistencia mucoide.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos Gram positivos con esporulación central.

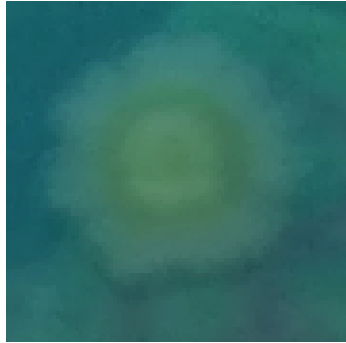
PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	+	-	-	K/K	+	-	-	-

C56

CLOSTRIDIUM

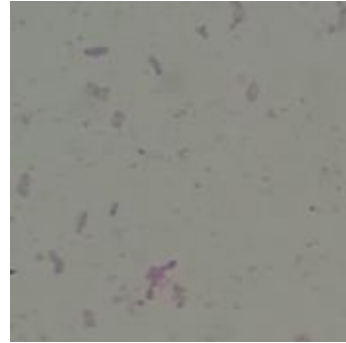
Morfología de colonia



Descripción:

Se observan colonias de color beige con pigmentos difusibles que crecen sobre el medio de cultivo, presenta una morfología compleja, elevación plana, borde ondulado, superficie brillante, densidad transparente y consistencia viscosa.

Morfología celular



Descripción:

Se observan bacilos Gram positivos.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Indol	Motilidad	Oxidasa	Catalasa	TSI	Reducción de nitratos	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	-	-	K/K	-	-	-	-