

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida.

**Caracterización de bacterias fijadoras de nitrógeno (N₂) de vida libre,
provenientes de cultivos comerciales de cacao y maíz**

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Biólogo

Presentado por:

Hugo Antonio Chiriboga Azanza.

Jennifer Katherine Armijos Cabrera.

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2022

DEDICATORIA

El presente proyecto lo dedico a profesores y familiares que me guiaron y apoyaron en el trayecto de mi vida académica.

Hugo Chiriboga Azanza

El presente proyecto se lo dedico a mis padres por guiarme y apoyarme en cada paso que he dado.

Jennifer Katherine Armijos Cabrera.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios y todas las personas que me apoyaron en el transcurso de mi carrera universitaria, a mi tutor el Ing, Milton Barcos, a la analista de laboratorio Thalía Castillo y a mi compañera Jennifer Armijos por el apoyo y guía en el desarrollo de este proyecto, a mi novia Gabriela Reyes por el soporte, a mis mascotas Saira que me ha acompañado durante toda la carrera y Ra por su compañía en estas últimas semanas y a mi familia.

Hugo Antonio Chiriboga Azanza

Agradezco a Dios y a la Virgen por permitirme culminar esta carrera universitaria, a mi tutor el Ing. Milton Barcos, a mi compañero de proyecto Hugo Chiriboga, a todas las personas especiales que me acompañaron en este proceso y a mi familia.

Jennifer Armijos Cabrera

DECLARACIÓN EXPRESA

"Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; Hugo Antonio Chiriboga Azanza y Jennifer Katherine Armijos Cabrera, damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual"



**Hugo Antonio
Chiriboga Azanza**



**Jennifer Katherine
Armijos Cabrera**

EVALUADORES

Msc. Diego Arturo Gallardo Polit.

PROFESOR DE LA MATERIA

Milton Senen Barcos Arias PhD.

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

Ecuador se encuentra considerado, uno de los países con mayor tasa de producción agrícola y debido a esto los suelos se han visto alterados y perjudicados de manera considerable por el uso intensivo de biofertilizantes químicos, los cuales han presentado serios efectos secundarios a lo largo de la historia agrícola en el país. Este proyecto integrador se enfoca en caracterizar bacterias fijadoras de nitrógeno N₂ de vida libre provenientes de muestra de suelo de cultivos comerciales (cacao y maíz). Para el estudio se recolectaron muestras de suelo de los cultivos antes mencionados de tres provincias diferentes, El Oro, Guayas y Los Ríos. Mediante diluciones seriadas se logró el crecimiento microbiológico de las muestras en medio Jensen permitiendo aislar las bacterias fijadoras de N₂. Se pudo evidenciar que el crecimiento de las bacterias transcurridas las 144 horas presentaban un halo de promedio 1,16 cm; en cuanto a los aislados bacterianos del cultivo de maíz el halo de mayor crecimiento en dicho período fue de 1,3 cm y para el caso de cacao de 1,2 cm. La conservación de bacterias fue realizada en el medio bacto tryptic soy broth en combinación con glicerol y después almacenados a -80 °C.

ABSTRACT

Ecuador is considered one of the countries with the highest agricultural production rate and because of this, soils have been considerably altered and damaged by the intensive use of chemical biofertilizers, which have presented serious side effects throughout the agricultural history of the country. This integrative project focuses on characterizing free-living N₂ nitrogen-fixing bacteria from soil samples of commercial crops (cocoa and corn). For the study, soil samples of the aforementioned crops were collected from three different provinces, El Oro, Guayas and Los Ríos. By means of serial dilutions, microbiological growth of the samples in Jensen medium was achieved, allowing the isolation of N₂-fixing bacteria. It was evident that the growth of the bacteria after 144 hours presented an average halo of 1.16 cm; as for the bacterial isolates of the corn crop, the halo of greatest growth in that period was 1.3 cm and for the case of cocoa, 1.2 cm. The bacteria were preserved in the bacto tryptic soy broth medium in combination with glycerol and then stored at -80 °C.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
DECLARACIÓN EXPRESA.....	4
EVALUADORES.....	5
RESUMEN.....	
ABSTRACT.....	
ÍNDICE GENERAL.....	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V

CAPÍTULO 1

1. Introducción.....	<u>11</u>
1.1 Descripción del problema.....	<u>11</u>
1.2 Justificación del problema	<u>12</u>
1.3 Objetivos.....	13
1.3.1 Objetivo General.....	13
1.3.2 Objetivos Específicos.....	13
1.4 Marco teórico.....	13
1.4.1 Bacterias diazotróficas.....	13
1.4.2 El nitrógeno, elemento vital para las plantas.....	14
1.4.3 Cultivos comerciales de cacao y maíz.....	15
1.4.3.1 Cacao.....	15
1.4.3.2 Maíz.....	15

1.4.4 Producción de cacao y maíz en Ecuador.....	15
1.4.4.1 Producción de cacao.....	15
1.4.4.2 Producción de maíz.....	15
1.4.5 Deterioro de suelos en cultivos comerciales y uso de fertilizantes nitrogenados...	16
1.4.6 Alternativas de fertilizantes desarrollados a partir de bacterias diazotróficas.....	16

CAPÍTULO 2

2. Metodología.....	17
2.1 Área de estudio.....	17
2.2 Recolección de muestras.....	18
2.3 Preenriquecimiento de muestras.....	18
2.4 Preparación de medios selectivos BNF.....	19
2.5 Dilución de muestras.....	19
2.6 Aislamiento bacteriano.....	20
2.7 Conservación de los aislados.....	20
2.8 Medición de halos de crecimiento.....	21

CAPÍTULO 3

3. Resultados y análisis.....	21
3.1 Aislamiento de cepas bacterianas fijadoras de nitrógeno (N ₂).....	21
3.2 Crecimiento de halo en colonias bacterianas.....	22
3.3 Conservación de cepas bacterianas fijadoras de nitrógeno (N ₂).....	24
3.4 Protocolo de aislamiento selectivo de bacterias fijadoras de nitrógeno (N ₂).....	24

CAPÍTULO 4

4. Conclusiones y recomendaciones.....	26
4.1 Conclusiones.....	26
4.2 Recomendaciones.....	26
BIBLIOGRAFÍA.....	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.4. Composición del medio de cultivo Jensen.....	19
Tabla 2.7. Composición del medio Bacto Tryptic soy Broth (TSB).....	21
Tabla 3.2. Mediciones del halo de crecimiento bacteriano.....	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.4. Ubicaciones geográficas de los sitios donde fueron realizados los muestreos.....	<u>18</u>
Figura 3.1.1. Cultivo de bacterias por estrías.....	21
Figura 3.1.2. Cultivo de bacterias haciendo un punto central.....	21
Figura 3.1.3. Cultivo de bacterias haciendo un punto central en 3 placas distintas.....	21
Figura 3.2.1. Medición del halo de crecimiento en cada placa.....	22
Figura 3.3.1. Proceso de conservación de bacterias.....	24
Figura 3.3.2. Almacenamiento de bacterias conservadas.....	24
Figura 3.4.1. Uso de medio Burks sin presencia microbiana.....	25
Figura 3.4.2. Uso de medio Jensen con presencia microbiana.....	25

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Descripción del problema.

El aumento de fertilizantes durante los últimos años ha conllevado una decadencia incesante en la capacidad de absorción de nutrientes en cultivos comerciales como maíz y cacao, presentando un aumento en la demanda de abonos sintéticos. Sin embargo, debido a las propiedades volátiles que cuenta el nitrógeno, ésta se pierde fácilmente en el medio, resultando que su biodisponibilidad en el suelo se reduzca y que las plantas no tengan su enriquecimiento óptimo.

Las orientaciones biológicas para mejorar la calidad del suelo se han acrecentado con el objetivo de reducir el uso de fertilizantes externos debido al deterioro ineludible de la tierra producidos por estos productos. Por consiguiente, se han estado estudiando nuevas alternativas menos perjudiciales al entorno como lo es, el estiércol de ganado que constituye una fuente de nutrientes menos agresiva en la tierra, (Nining, Elkawakib, Burhanuddin, & Feranita, 2021) beneficiando de manera natural la fijación de nitrógeno en las tierras agrícolas beneficiando a la vegetación cultivada.

Por otro lado, las bacterias tienen el potencial de fijar nitrógeno en diferentes formas, entre las cuales pueden ser de manera independiente al absorberlo de la atmósfera o en forma simbiótica con las plantas. Estas interacciones aportan a su crecimiento estructural, la floración, senescencia, entre otros aspectos (Sembiring & Sabrina, 2021). Aunque estos procesos en muchas ocasiones pueden llegar a ser beneficiosos para las plantas, podría pasar todo lo opuesto, en el que estas relaciones llegan a convertirse en factores negativos en el desarrollo de esta.

La contaminación general en la atmosfera ha desatado una infinidad de consecuencias en contra del suelo, alterándolo y dando como resultado la eliminación de propiedades físicas, químicas y biológicas. Los Laboreos de maíz y cacao son géneros que necesitan de un eminente rendimiento y comportamiento fotosintético para llevar a cabo su desarrollo. Las asociaciones microbianas también se encuentran influenciadas por diferentes factores como falta de

elementos biológicos, impidiendo que las plantas adquirieran las características necesarias para su desarrollo, provocando una alteración en el afloramiento, pérdida de proteínas y disminución de la floración. El rendimiento del suelo se ha visto en decadencia en los últimos tiempos, alterando así la productividad de los cultivos de cacao y maíz. Las bacterias nitrificantes, son microorganismos que tienen cabida de realizar una alternativa de biorremediación para ayudar en la recuperación de los suelos agrícolas y de cultivos comerciales que con el pasar del tiempo ha sufrido un daño externo por medio de los fertilizantes químicos nitrogenados.

La base de nuestro estudio fue tomada de acuerdo con las características presentadas sobre cultivos comerciales, escogiendo el área de estudio en tres regiones, El Oro, Guayas y Los Ríos. Los prototipos de tierra fueron sometidos al medio selectivo Jensen, ya que, este presenta las características libres de nitrógeno y permitiría observar las bacterias reconociendo cuales son las que pueden llegar a fijar el elemento en los suelos comerciales.

1.2 Justificación del problema.

Debido a la escasez de fertilizantes naturales biológicamente permitidos para un buen desarrollo de los cultivos en general, los agricultores se ven de cierta manera sin alternativas y tienen que agregar fertilizantes nitrogenados sintéticos para acelerar el crecimiento de sus plantaciones, pero sin tener pendiente los efectos secundarios que han tenido relevancia en el estado de los suelos, este aumento en su uso ha conllevado que los precios sobre los fertilizantes aumenten de manera exponencial, ya que la producción que se realiza, requiere más producto para abastecer la demanda y despunta los precios estimados, convirtiéndose en una problemática constante, perjudicando las particularidades del suelo; dañando la flora y fauna propia de cada uno de estos, perdiendo fertilidad de producto, especies desvigorizadas, baja utilidad de cultivo y originando la pérdida total de la producción.

Existen diferentes técnicas de biorremediación que pueden llegar a ser parte fundamental para enfrentar esta demanda y se ven enfrascados como una solución proactiva para evitar la salinización de los cultivos, las cuales consisten

en ayudar a la superficie a que se recupere en proporción, degradando todas las sustancias externas a unas con menos posibilidad de dañar, convertir o alterar el suelo negativamente, perdiendo totalmente los beneficios y características que puedan derivarse a las plantaciones, causando que el fruto final no sea de óptimas condiciones y apto para el consumo. Debido a esta causa, una de las posibilidades planteadas en la ecología actual, es la de buscar y realizar un prototipo que se base en el uso de las bacterias fijadoras de nitrógeno N₂ propias del suelo, la cual se presenta como alternativa positiva y viable, para suplir la demanda y necesidad nutricional que ha estado asechando a los sembríos comerciales.

1.3 Objetivos.

1.3.1 Objetivo General.

- Caracterizar bacterias fijadoras de nitrógeno N₂ de vida libre mediante cultivos selectivos para ser usadas en la nutrición de cultivos comerciales.

1.3.2 Objetivos Específicos.

- Estandarizar un protocolo para el aislamiento selectivo de las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre.
- Aislar cepas bacterianas fijadoras de nitrógeno N₂ provenientes de cultivos comerciales de cacao y maíz.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Bacterias diazotróficas.

Las bacterias diazotróficas o fijadoras de nitrógeno. Esta función la pueden llevar a cabo de algunas maneras; de forma independiente, cuando la bacteria capta el nitrógeno del ambiente y no necesita establecer ningún tipo de relación o, dependencia con las plantas del ecosistema. Estos tipos de bacterias se las denomina de vida libre. Otro modo de captación suele presentarse con algunos tipos de asociaciones de forma no estrecha entre plantas y bacterias. Además, fijan el nitrógeno cuando se lleva a cabo una interacción simbiótica estrecha entre vegetal y microorganismo. Este último método, representa una de las asociaciones con mejor rendimiento de fijación, lo cual, es muy utilizado en varios

cultivos comerciales, como lo es en la soja producida en Brasil. (Reinhardt, y otros, 2008)

Los microorganismos fijadores de nitrógeno (N_2) contribuyen a los ecosistemas con formas de nitrógeno más asimilables por las plantas como lo son el amonio. Para llegar a este compuesto las enzimas nitrogenasas catalizan reacciones óxido-reducción, transformando el nitrógeno de su forma molecular a su forma catiónica como es el amonio NH_4 . La constitución del complejo de enzimas son dos metaloproteína; la hierro–molibdeno- que representa la primera proteína, y la hierro proteína considerada la segunda proteína del complejo. En la reducción de la nitrogenasa, la ferredoxina lleva los electrones, con el fin de que la hierro-molibdeno proteína se active, lo cual al llegar al hierro proteína e interactuar con la ferredoxina, el nitrógeno molecular se fija en su forma de amino (Baca, Soto, & Pardo, 2000).

1.4.2 El nitrógeno, elemento vital para las plantas.

El nitrógeno corresponde uno de los elementos más importantes para el desarrollo de las plantas, se encuentra en los aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas y ácidos nucleicos; también está presente en las moléculas grandes y pequeñas de la composición molecular de las plantas. Tiene participación en varios procesos; como la conversión de materia inorgánica a orgánica con la participación de la luz solar, o también llamada fotosíntesis; algunos procesos vitales de las células como la degradación de compuestos orgánicos durante la respiración celular, el crecimiento de las plantas mediante la multiplicación celular, y el cambio de células jóvenes sin especialización a otros tipos de células maduras ya especializadas en funciones en particular. El nitrógeno también se encuentra ligado al nivel de floración y fructificación de plantas ya que incentiva el crecimiento de yemas florales y fructíferas; además de prolongar el inicio del proceso de senescencia vegetal, con lo cual, un ecosistema pobre de este elemento producirá plantas de tamaño reducido y flores y frutos de mala calidad y en menor cantidad (Rodríguez, y otros, 2020).

1.4.3 Cultivos comerciales de cacao y maíz

1.4.3.1 Cacao

El cacao (*Theobroma cacao*) es un árbol denominado perenne porque permanece funcional y conserva sus hojas verdes durante más de una temporada y puede llegar a medir 12 metros de altura. Cuyo origen se toma en climas tropicales y subtropicales del territorio de América. Su nombre tiene un significado especial; comida de dioses, además era utilizado como forma de pago en trueques por los mayas y los aztecas. Es un fruto muy utilizado como alimento y también como producto medicinal (Dostert, Roque, Cano, Torre, & Weigend, 2012).

1.4.3.2 Maíz.

El maíz (*Zea mays*) es una planta herbácea de la familia de las gramíneas, tiene un ciclo de vida anual, creciendo, madurando y dejando sus frutos en una sola temporada. Puede llegar a medir 5 metros de altura. Tiene origen en el continente americano, en lo que actualmente es México. Se presume que los mayas comenzaron el proceso de domesticación del maíz, esta monocotiledónea es considerada una de las principales fuentes de alimentación en el mundo (Sánchez, 2014).

1.4.4 Producción de cacao y maíz en Ecuador.

1.4.4.1 Producción de cacao.

La comercialización de cacao a nivel mundial está representada por dos grupos principales, el cacao fino o de aroma, cuya característica es una fermentación de duración menor y olor agradable al olfato y el cacao al granel o común. En 2014 Ecuador se ubicó en el sexto lugar a nivel mundial con una intervención del 4,59% en producción de cacao (López A. , 2017).

1.4.4.2 Producción de maíz.

La economía del Ecuador tiene algunos productos representativos, uno de los principales es el maíz, ya que en la industria agropecuaria es el principal componente de alimentos balanceados, especialmente requeridos por las empresas avícolas. En el año 2009, el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y pesca del Ecuador estableció un total de 220,558 hectáreas de

tierras sembradas con maíz en el país, en la cual la provincia con mayor producción fue Los Ríos, con el 43,37% (95665 hectáreas), segundo se ubicó Manabí con un 28,22% de la producción de cultivos de maíz (62250 hectáreas), tercero, Guayas con un 19,62% del total de tierras sembradas (43290 hectáreas) y por último Loja, con un 8,79% del total cultivado (19353 hectáreas) (Villavicencio & José, 2014).

1.4.5 Deterioro de suelos en cultivos comerciales y uso de fertilizantes nitrogenados

La reducción de calidad de los suelos en cultivos comerciales está influenciada por varios aspectos, de los cuales generalmente los antropológicos son los que lo deterioran en mayor medida, entre estos podemos establecer la deforestación, una compactación y desplazamiento de la tierra a causa de máquinas pesadas, una errónea técnica de manipulación de los suelos como la inexistencia de zanjas, falta de materia orgánica, etc, así también, la pérdida de calidad de la tierra está condicionada por la contaminación de lixiviados a partir de desechos orgánicos de otras fuentes de producción agropecuaria y la generación de la erosión debido a la modificación de la salinidad del mismo por incorrectas medidas de riego. El continuo uso de fertilizantes sintéticos en actividades agrícolas provoca un desgaste y una pobre capacidad de absorción del nitrógeno del suelo, esto conlleva a una deficiencia de materia orgánica y fertilidad, así como la pérdida de las propiedades fisicoquímicas, bioquímicas y microbiológicas del entorno terrestre (Nining, Elkawakib, Burhanuddin, & Feranita, 2021).

1.4.6 Alternativas de fertilizantes desarrollados a partir de bacterias diazotróficas.

Actualmente de las bacterias diazotróficas de vida libre que se conocen pertenecen a los géneros: *Enterobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, etc (Zebua, Guchi, & Sembiring, 2020). En una investigación realizado sobre bacterias no simbióticas fijadoras de nitrógeno por (Sembiring & Sabrina, 2021), se concluyó que la bacteria *Enterobacter cloacae* en suelos andisoles cubiertos por capas de ceniza luego de haberse suscitado la actividad volcánica del Monte Sinabung puede ser capaz de potenciar la absorción de nitrógeno en un 111,76% con respecto a lugares sin presencia de dicha bacteria,

lo que demostraría el gran valor que tienen este tipo de bacterias para el potencial desarrollo de biofertilizantes.

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

2.1 Área de estudio.

Esta investigación tuvo su desarrollo en 3 provincias del Ecuador; Los Ríos, Guayas y El Oro. En la provincia de Los Ríos se muestreó en el cantón Vinces en las haciendas “Solanda” y “La Bonita”, en la provincia de Guayas se recopiló muestras en el cantón Balao en la hacienda “Colón” y en la provincia de El Oro se llevó a cabo el muestreo en el cantón Pasaje en la hacienda “Calichama”.

- La hacienda “Solanda” se la encuentra en la ubicación geográfica “969C+W3J, Vinces “.
- La hacienda “La Bonita” se la encuentra en la ubicación geográfica “C6WQ+F24, Playas de, Vinces “.
- La hacienda “Colón” se la encuentra en la ubicación geográfica “-2.91739,-79.79304“.
- La hacienda “Calichama” se la encuentra en la ubicación geográfica “-3.5, -79.9833“.

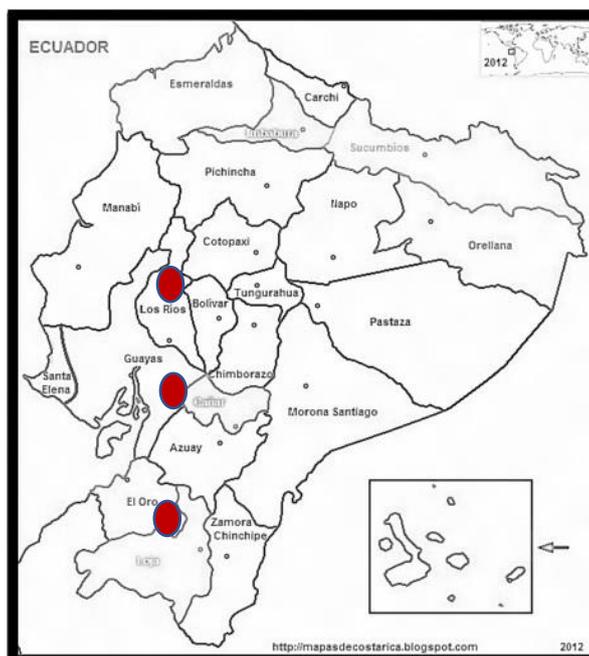


Figura 2.1. Ubicaciones geográficas de los sitios donde fueron realizados los muestreos.

2.2. Recolección de muestras

Las muestras se obtuvieron de dos plantaciones comerciales; cacao y banano. Se tomaron 10 muestras de aproximadamente 1 Kg y a 20 cm de profundidad por cada sitio basándonos en el método del zigzag. Las muestras fueron etiquetadas en bolsas de polietileno y almacenadas a temperatura ambiente hasta su posterior análisis. La investigación se realizó en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE-ESPOL), este proceso tomó aproximadamente 4 meses, en el período de junio y septiembre de 2022.

2.3. Preenriquecimiento de las muestras.

Para el preenriquecimiento microbiológico de las bacterias fijadoras de nitrógeno se siguió la metodología propuesta por (Lara, Villalba, & Oviedo, 2007), empleando el medio Jensen, cuya composición se encuentra en la tabla 2.4, se usó este medio ya que las bacterias estudiadas requieren para su crecimiento un medio libre de nitrógeno con una fuente combinada de carbonos, esto permitió el desarrollo de bacterias diazotróficas requeridas para el análisis.

Medio Jensen	Medida	Unidad
Glucosa	20	g
Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄)	1	g
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ . 7H ₂ O)	0,5	g
Cloruro de Sodio (NaCl)	0,5	g
Sulfato de hierro FeSO ₄ , 7H ₂ O (0.3%)	0,1	g
Molibdato de sodio Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O (0.05%)	0,005	g
Carbonato de calcio CaCO ₃	2	g
Agar	15	g
Bromothymol blue indicator	0,01	g

Tabla 2.4. Composición del medio de cultivo Jensen.

2.4 Preparación de medios selectivos BNF.

Todos los recipientes utilizados en la elaboración de medios estuvieron en el autoclave, aproximadamente 60 min a una temperatura de 110 °C para su correcta esterilización. Para la activación de bacterias, se colocó 90ml de agua destilada con 10 ml de peptona, ya que solamente funciona como fuente de enriquecimiento de nutrientes de las bacterias; este compuesto fue dispensado en 9 recipientes de vidrio de 90 ml de medio cada uno, 8 correspondientes a las muestras de estudio y 1 recipiente de control.

2.5 Diluciones de muestra

Para realizar este proceso se utilizaron tubos de ensayo plásticos llenados con 9ml de agua destilada, para cada una de las muestras se realizó 5 diluciones rotuladas de 10⁻¹ hasta 10⁻⁵, todos estos tubos con su contenido fueron previamente esterilizados en el autoclave durante 60 min a 110° C, luego con una micropipeta se tomaba 1 ml de muestra de suelo diluida en peptona y lo colocaba en el tubo con la dilución 10⁻¹, se agitaba durante unos segundos y se homogenizaba con la micropipeta realizando absorciones y expulsiones, luego se

tomaba 1 ml de muestra del tubo rotulado 10^{-1} y se lo colocaba en el tubo rotulado 10^{-2} , se volvían hacer agitaciones y homogenizaciones con la micropipeta, este proceso se repitió hasta llegar al tubo con la dilución 10^{-5} . Para cada una de las muestras de suelo de cacao y maíz se realizaba el mismo procedimiento para obtener las diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-5} .

2.6 Aislamiento bacteriano.

Luego de revisar las placas y teniendo un resultado positivo en el crecimiento de las bacterias, se procedió a dividir las placas y nos permita contar las colonias, a raíz de aquello se realizará el aislamiento ayudándonos del mismo medio Jensen, el cual contiene un compuesto de carbono, lo cual permite recuperar los organismos diazotróficos. Para esto, con el asa bacteriológica previamente esterilizada se tomó porcentaje de las colonias y se lo sembró mediante el método de estrías (Figura 3.1.1). El crecimiento bacteriano tuvo lugar en incubadora a 35°C durante 7 días, en este tiempo se realizó revisiones periódicas de las placas para visualizar el desarrollo de las colonias e identificar los cambios suscitados en el proceso, finalizado el período de 7 días de crecimiento en incubadora las placas fueron colocadas en nevera a 5°C para su posterior uso en otros procesos.

2.7 Conservación de los aislados

Para realizar la conservación de las bacterias en crecimiento en el medio sólido, se realizó un medio líquido basándonos en la metodología de Bacto Tryptic soy Broth y su composición se encuentra en la (Tabla 2.7). Se rotuló la colonia a tomar con el asa metálica previamente purificada y se la ingreso en los tubos de Eppendorf, agitándole para que se homogenice las bacterias con el medio, este procedimiento se lo realizó de manera duplicada por placa.

Bacto Tryptic soy Broth (TSB)	0.6 gr
Agua destilada	15 ml
Glicerol	5 ml

Tabla 2.7. Composición del medio Bacto Tryptic soy Broth (TSB).

2.8 Medición de halos de crecimiento

Con la utilización de una regla se realizó la medición de halos de crecimiento, se colocó la regla apoyada sobre la placa y se tomó las medidas, estas mediciones fueron hechas transcurridas las 144 horas desde que se aisló las bacterias.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Aislamiento de cepas bacterianas fijadoras de nitrógeno (N2)



Figura 3.1.1 Cultivo de bacterias por estrías.

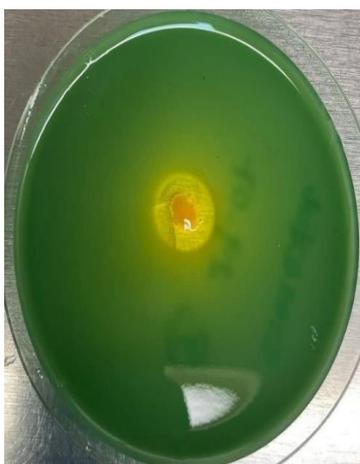


Figura 3.1.2 Cultivo de bacterias haciendo un punto central.



Figura 3.1.3 Cultivos de bacterias haciendo un punto central en 3 placas distintas.

Se realizó el crecimiento de bacterias en el medio de cultivo Jensen, las muestras empleadas fueron obtenidas de suelo de cultivo comercial de cacao y maíz, en ambos tipos de cultivos se pudo aislar agentes microbiológicos que tuvieron presencia transcurridas las 48 horas de inicio del proceso, esto evidencia que las plantaciones de cacao y maíz cuentan con los recursos microbiológicos para la absorción de nutrientes como el nitrógeno y completar un desarrollo óptimo de su metabolismo. En cuanto a características microbiológicas, una vez comienza el crecimiento bacteriano se puede observar un cambio del medio de cultivo Jensen en las placas por una tonalidad amarilla, superficie sin rugosidades y una ligera elevación de la colonia sobre el nivel del medio, esto podría deberse al consumo de nutrientes que demandan las bacterias por lo que se ve modificado el medio; se encuentra una similitud visual con lo expuesto en la investigación (Argüello & Moreno, 2014), en donde fue empleado el medio de crecimiento JMV para bacterias fijadoras de nitrógeno obteniendo particularidades morfológicas similares como la tonalidad amarilla, una textura de apariencia lisa y una pequeña altura sobre el nivel del medio.

3.2 Crecimiento de halo en colonias bacterianas

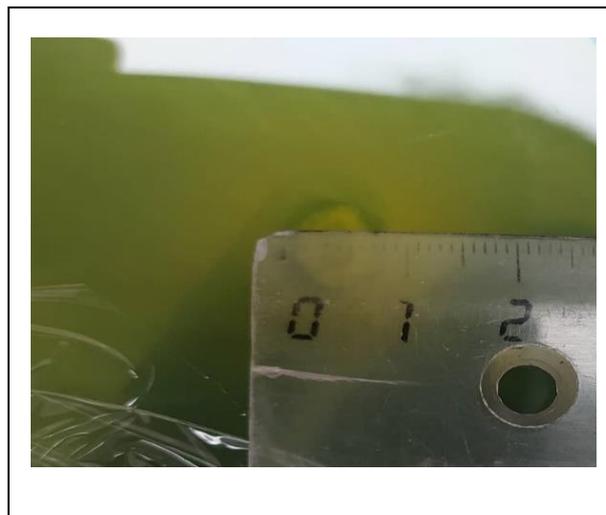


Figura 3.2.1 Medición del halo de crecimiento en cada placa.

Muestra	144 horas	
Control 2 punto arriba	CTR1	1,1
Maíz grande	MAGR	0,7
Cacao calichama solo bacterias	CCAL1	1,2
Combinado maíz	COMZ1	1,3
Combinado maíz solo bacterias	COMZ2	1,2
Control	CTR2	1,1
Maíz combinado	COMZ3	1
Cacao calichama	CCAL2	1,2
Cacao colon	CCOL	0,9

Tabla 3.2 Mediciones del halo de crecimiento bacteriano.

Se obtuvo colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno en el medio de cultivo Jensen, el halo de crecimiento de los 9 aislados transcurridas las 144 horas tiene un promedio de 1,16 cm, variando entre 0,7 cm y 1,3 cm, estos corresponden a MAGR y COMZ1, respectivamente, ambos obtenidos de muestras de suelo de cultivo de maíz. En cuanto a los aislados provenientes de cultivo de cacao, los halos de mayor tamaño fueron de 1,2 cm para las muestras CCAL1 y CCAL2. La aplicación de cepas fijadoras de nitrógeno de origen nativo representa un aumento considerable en los niveles de producción de cultivos, en el experimento realizado en cultivos de maíz en Venezuela (López, y otros, 2008) se emplearon cepas nativas de forma asociativa, evaluándose la germinación de semillas a los 4 días y la aparición de la primera hoja a los 6 días, para el primer caso en la germinación de todas las plantas sembradas en el cultivo sin inocular germinaron semillas el 52% de estas, mientras que para el cultivo con bacterias fijadoras de nitrógeno en el mismo período germinaron 75% de las semillas, un aumento del 23% de germinación; en cuanto a la aparición de la primera hoja en el cultivo sin inocular, transcurrido los 6 días, el 63% de las plantas contaban con la existencia de 1 hoja al menos, y las plantas inoculadas con bacterias fijadoras de nitrógeno tenían un 87% de presencia de al menos 1 hoja, un aumento del 24% de presencia de primera hoja transcurridos los primeros 6 días. En otra investigación se evaluó el rendimiento de la capacidad fijadora de nitrógeno por las bacterias (Lara, Villalba, & Oviedo, 2007), en donde fueron analizados 36 aislados de Córdova en Colombia, identificando que 14 aislados de los géneros *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp fueron capaces de generar entre 0,9 hasta 5,2 mg/l de ión amonio,

demostrando el inmenso potencial beneficioso en el desarrollo sostenible de cultivos comerciales.

3.3 Conservación de cepas bacterianas fijadoras de nitrógeno (N₂)

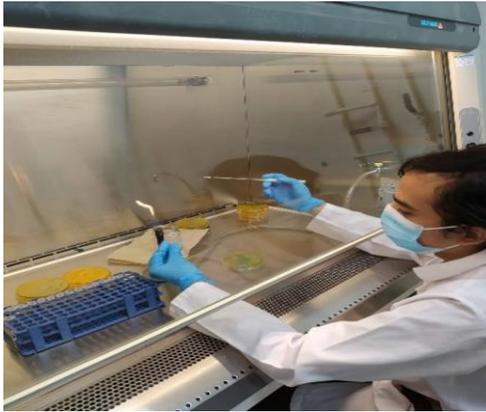


Figura 3.3.1 Proceso de conservación de bacterias.

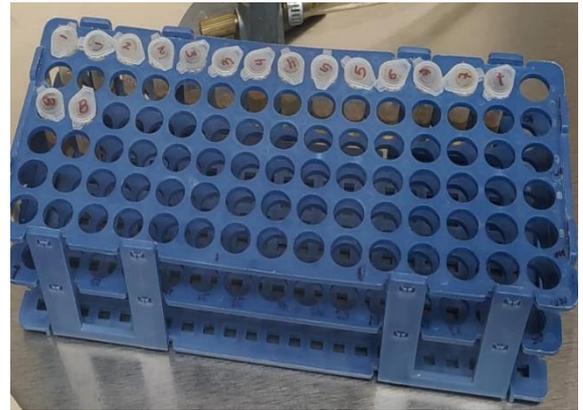


Figura 3.3.2 Almacenamiento de bacterias conservadas.

Se realizó la conservación de las muestras aisladas, este proceso nos permitirá mantener en un medio enriquecido para microorganismos para que no pierdan sus características y funcionalidades, y que puedan ser utilizadas en el futuro para el desarrollo de algún biofertilizante a base de bacterias fijadoras de nitrógeno.

3.4 Protocolo de aislamiento selectivo de bacterias fijadoras de nitrógeno (N₂)



Figura 3.4.1 Uso de medio Burks sin presencia microbiana



Figura 3.4.2 Uso de medio Jensen con presencia microbiana

El proceso de aislamiento tuvo modificaciones durante su desarrollo, por eso se planteó la estandarización de un protocolo de aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, inicialmente se intentó realizar el crecimiento de bacterias en medio Burks (Figura 3.4.1), los cuales fueron evaluados durante 1 semana pero no hubo crecimiento bacteriano en ninguna de las placas, este proceso de observación se realizó en 2 ocasiones con la misma duración de 1 semana pero no se obtuvo ningún desarrollo de microorganismos, debido a esto se replanteó la elaboración de las placas sustituyendo el medio por Jensen (Figura 3.4.2), en el cual se obtuvo crecimiento bacteriano a partir de las 48 horas, estableciendo que para el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre en cultivos comerciales de cacao y maíz lo más recomendable es utilizar el medio Jensen. En cuanto a la etapa de conservación bacteriana el medio líquido empleado puede ser bacto tryptic soy broth, con activaciones regulares cada 3 meses para evitar la pérdida de las propiedades de los microorganismos.

CAPÍTULO 4

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones:

1. Se estudiaron muestras de 3 provincias diferentes, El Oro, Guayas y Los Ríos, de las cuales se obtuvo un resultado positivo con más predominancia en las muestras de banano, de acuerdo con lo indicado en la tabla N. 3.2, lo que significa que el suelo adquiere la capacidad de fijar N₂ en un mayor grado de captación especie, más aún en su periodo de floración.
2. El crecimiento mostrado en las placas de cacao fue relativamente poco, lo cual permite evidenciar diferencias que puedan verse afectadas por las características fisiológicas del suelo, las cuales marcan la diferencia en la composición, textura y capacidad de fijación del elemento teniendo efectos sobre los cultivos y su producción en los campos.
3. Las características presentadas en los aislados bacterianos provenientes de los cultivos del banano y cacao se han visto enmarcadas por tipologías similares, como la curva de crecimiento, forma y color.

4.2 Recomendaciones:

1. Dejar por escrito el protocolo de estandarización que permita realizar de manera más ágil y efectiva en futuros procesos a ejecutar.
2. Debido a la deficiencia y escasez del elemento en los suelos agrícolas que está marcando hoy en día, se ha visto y presentado la posibilidad en base al proyecto integrador, de poder crear un biofertilizante ecológico de manera natural con cepas nativas a partir de la caracterización de las bacterias, con el objetivo de ayudar en la capacidad de fijación de los cultivos comerciales, brindando una mejor opción de cultivo y cuidado de los suelos.

3. Ampliar la variación de cultivos comerciales a partir de los cuales se extraigan muestras de suelo para la obtención de aislados de bacterias fijadoras de nitrógeno.

BIBLIOGRAFÍA

- Argüello, A., & Moreno, L. (2014). Evaluación del potencial biofertilizante de bacterias diazótropas aisladas de suelos con cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta agronómica*, 238-245.
- Baca, B., Soto, L., & Pardo, M. (2000). Fijación biológica de nitrógeno. *Elementos: Ciencia y cultura Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*, 43-49.
- Dostert, N., Roque, J., Cano, A., Torre, M., & Weigend, M. (2012). Hoja botánica: Cacao. *Proyecto Perúbiodiverso*, 1-19.
- Lara, C., Villalba, M., & Oviedo, L. (2007). Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia. *Revista colombiana de biotecnología*, 5-14.
- López, A. (2017). Producción y comercialización de cacao fino de aroma en el Ecuador - Año 2012-2014. Superintendencia de Control del Poder de Mercado, 1-32.
- López, M., Martínez, R., Brossard, M., Bolívar, A., Alfonso, N., Alba, A., & Pereira, H. (2008). Efecto de biofertilizantes bacterianos sobre el crecimiento de un cultivar de maíz en dos suelos contrastantes venezolanos. *Agronomía tropical*, 391-401.
- Nining, H., Elkawakib, S., Burhanuddin, R., & Feranita, H. (2021). Isolation and characterization of N-fixing and IAA producing rhizobacteria from two rice field agro-ecosystems in South Sulawesi, Indonesia. *Biodiversitas*, 2497-2503.
- Reinhardt, É., Ramos, P., Mnafo, G., Barbosa, H., Pavan, C., & Moreira, C. (2008). Molecular characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from Brazilian agricultural plants at São Paulo state. *Brazilian Journal of Microbiology*, 414-422.
- Rodríguez, G., Pradenas, H., Basso, C., Barrios, M., León, R., & Pérez, M. (2020). Effect of doses of nitrogen in the agronomy and physiology of yellow passion fruit. *Agronomía Mesoamericana Universidad de Costa Rica*, 117-128.
- Sánchez, I. (2014). Maíz I (*Zea mays*). *Reduca (Biología). Serie Botánica*, 151-171.
- Sembiring, M., & Sabrina, T. (2021). Diversity of non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria and their potential in andisols affected by the eruption of Mount Sinabung, North Sumatra, Indonesia. *Biodiversitas*, 3539-3544.
- Villavicencio, P., & José, Z. (2014). Guía para la producción de maíz amarillo duro en la zona central del litoral ecuatoriano. Estación Experimental Tropical Pichilingue, Programa de Maíz. (Boletín Divulgativo no. 353). Quevedo-Ecuador: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias.
- Zebua, A., Guchi, H., & Sembiring, M. (2020). Isolation of non-symbiotic Nitrogen-fixing bacteria on andisol land affected by Sinabung eruption. *Earth and Environmental Science*, 1-7.

